

Cilt / Volume: 13, Sayı / Issue: 4

Aralık / December, 2023

ISSN 2146-0574

E-ISSN 2536-4618

FBED / JIST

Uluslararası Hakemli Dergi / International Peer Reviewed Journal

**İĞDIR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ DERGİSİ**

**JOURNAL OF THE INSTITUTE
OF SCIENCE AND
TECHNOLOGY**



FBED / JIST

IĞDIR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ DERGİSİ

Journal of the Institute
of Science and Technology

<http://dergipark.gov.tr/jist>



İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
Kısaltılmış Başlık: İğdır Üniv. Fen Bil. Enst. Der.

Journal of the Institute of Science and Technology
Abbreviated Title: J. Inst. Sci. and Tech.

Uluslararası Hakemli Dergi / International Peer Reviewed Journal

Basılı ISSN: 2146-0574

Elektronik ISSN: 2536-4618

Veri Tabanı / Indexed by

TR Dizin, EBSCO, ROAD, Open Access Library (oalib), COSMOS IF, Sobiad, Google Scholar, Türkiye Atıf Dizini, International Institute of Organized Researches, Sindex, CrossRef, Scientific Indexing Services (SIS), Eurasian Scientific Journal Index, CiteFactor, International Scientific Indexing, CAB Abstract, Online Journal Platform and Indexing Association (OJOP)

Sahibi / Owner

Doç. Dr. Ahmet TAN / Assoc. Dr. Ahmet TAN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü / Graduate Education Institute Director

Baş Editör / Editor in Chief

Doç. Dr. Fikret TÜRKAN / Assoc. Prof. Dr. Fikret TÜRKAN

Yardımcı Editörler / Associate Editors

Doç. Dr. Adem KOÇYİĞİT / Assoc. Prof. Dr. Adem KOÇYİĞİT
Doç. Dr. Ersin GÜLSOY / Assoc. Prof. Dr. Ersin GÜLSOY
Doç. Dr. Mehmet Harbi ÇALIMLI / Assoc. Prof. Dr. Mehmet Harbi ÇALIMLI
Dr. Öğr. Üyesi Sevtap TIRINK / Assist. Prof. Dr. Sevtap TIRINK

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ, *Fizik*, University of Ottawa, Canada
Prof. Dr. Kağan KÖKTEN / *Field Crop*, Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Agricultural, Sivas, Türkiye
Prof. Dr. Abdulmecit TÜRÜT / *Physics*, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
Prof. Dr. Muhammad SARWAR, *Animal Science*, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan
Prof. Dr. Vaqif ABBASOV, *Chemistry*, Neft Kimya Prosesleri Institutu, Azerbaijan
Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR, *Biochemistry*, Anadolu Üniversitesi, Eskisehir, Türkiye
Prof. Dr. Özkan AKSAKAL, *Botanical*, Ataturk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye
Prof. Dr. Salih DOĞAN, *Zoology*, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Erzincan, Türkiye
Doç. Dr. Mehmet POLAT, *Horticulture*, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Isparta, Türkiye
Dr. Snezana ANDJELKOVIC, *Forage Crops*, Institute Za Krmno Bilje, Krusevac, Republic of Serbia
Dr. Öğr. Üyesi Asim FARAZ, *Zootehni*, Bahauddin Zakariya University Multan, Pakistan

Yayın ve Mizanpaj Editörleri / Editorial Reviews and Layouts

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARACALI TUNÇ
Öğr. Gör. Dr. Adem AKDAĞ
Öğr. Gör. Rabia ACEMİOĞLU
Öğr. Gör. Cansu ÇOLAK
Öğr. Gör. Binnaz BOZKURT

Tasarım / Design

Öğr. Gör. Dr. Adem AKDAĞ

Web link: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jist>

Mail address: fbed@igdir.edu.tr

ULUSAL EDİTÖRLER KURULU
NATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Ferhad MURADOĞLU, <i>Horticulture</i> Abant İzzet Baysal University, Bolu, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Sinan KUL, <i>Environmental Engineering</i> Bayburt University, Bayburt, Türkiye
Doç. Dr. Ersin GÜLSOY, <i>Horticulture</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Sevtap TIRINK, <i>Environmental Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Doç. Dr. Mete YAĞANOĞLU, <i>Computer Engineering</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Doç. Dr. Adem KOÇYIĞIT, <i>Electrical Electronic Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Gültekin IŞIK, <i>Computer Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. Kenan ÇİÇEK, <i>Electrical Electronic Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Doç. Dr. Ferhat BOZKURT, <i>Computer Engineering</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Agah Oktay ERTAY, <i>Electrical Electronic Engineering</i> Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Özge ÖZKÖK, <i>Computer Engineering</i> Erciyes University, Kayseri, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Said BOYBAY, <i>Electrical Electronic Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi İshak PACAL, <i>Computer Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. Seda TÜRK, <i>Industrial Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Prof. Dr. Ahmet ULUDAĞ, <i>Plant Protection</i> Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Hamid YILMAZ, <i>Industrial Engineering</i> Bayburt University, Bayburt, Türkiye
Doç. Dr. Celalettin GÖZÜAÇIK, <i>Plant Protection</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. İkram ORAK, <i>Physics</i> Bingöl University, Bingöl, Türkiye
Doç. Dr. Fatih DADAŞOĞLU, <i>Plant Protection</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Osman AĞAR, <i>Physics</i> Karamanoğlu Mehmetbey University, Karaman, Türkiye
Doç. Dr. Alime BAYINDIR EROL, <i>Plant Protection</i> Pamukkale University, Denizli, Türkiye	Doç. Dr. Abdulkemal KARABULUT, <i>Physics</i> Erzurum Technical University, Erzurum, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Tuba GENÇ KESİMCİ, <i>Plant Protection</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. Harun GÜNEY, <i>Physics</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜRBÜZ, <i>Plant Protection</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT, <i>Food Engineering</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Prof. Dr. Ümit İNCEKARA, <i>Biology</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN, <i>Food Engineering</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Prof. Dr. Hasan AKAN, <i>Biology</i> Harran University, Şanlıurfa, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Yasemin ÇELEBİ SEZER, <i>Food Engineering</i> Uşak University, Uşak, Türkiye
Doç. Dr. Tülin GÜVEN GÖKMEN, <i>Biology</i> Çukurova University, Adana, Türkiye	Doç. Dr. Mubin KOYUNCU, <i>Food Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Doç. Dr. Medeni AYKUT, <i>Biology</i> Dicle University, Diyarbakır, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Melek ZOR, <i>Food Engineering</i> Ağrı İbrahim Çeçen University, Ağrı, Türkiye
Doç. Dr. Erhan ZEYTUN, <i>Biology</i> Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, Türkiye	Öğr. Dr. Hacer AKPOLAT, <i>Food Engineering</i> Bayburt University, Bayburt, Türkiye
Doç. Dr. Arzu ÜNAL, <i>Biology</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. Menekşe BULUT, <i>Food Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Emel DIRAZ YILDIRIM, <i>Biology</i> Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Kahramanmaraş, Türkiye	Doç. Dr. Muhammed Yasin ÇODUR, <i>Civil Engineering</i> Erzurum Technical University, Erzurum, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet POLAT, <i>Biology</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Prof. Dr. Rıza POLAT, <i>Civil Engineering</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Prof. Dr. Hakan KİBAR, <i>Biosystem Engineering</i> Bolu Abant İzzet Baysal University, Bolu, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Alperen ÖZDEMİR, <i>Civil Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye
Prof. Dr. Sefa ALTİKAT, <i>Biosystem Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Prof. Dr. Mehmet GÜLCAN, <i>Chemistry</i> Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye
Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK, <i>Environmental Engineering</i> Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN, <i>Chemistry</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Prof. Dr. Alper NUHOĞLU, <i>Environmental Engineering</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Prof. Dr. Fatma Zerrin SALTAN, <i>Chemistry</i> Anadolu University, Eskişehir, Türkiye
Doç. Dr. Hülya ÖZKOÇ, <i>Environmental Engineering</i> Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye	Prof. Dr. Ercan BURSAL, <i>Chemistry</i> Muş Alparslan University, Muş, Türkiye
Doç. Dr. Züleyha REÇBER, <i>Environmental Engineering</i> Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Prof. Dr. Mehmet Salih AĞIRTAŞ, <i>Chemistry</i> Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye

Doç. Dr. Fikret TÜRKAN, <i>Chemistry</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Prof. Dr. Hasan KOTAN, <i>Materials and Metallurgical Engineering</i> Bursa Technical University, Bursa, Türkiye
Doç. Dr. Mesut IŞIK, <i>Chemistry</i> Bilecik Şeyh Edebali University, Bilecik, Türkiye	Prof. Dr. Mehmet Hakkı ALMA, <i>Forestry Engineering</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Haydar KILIÇ, <i>Chemistry</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL, <i>Molecular Biology and Genetic</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Doç. Dr. Adnan ÇETİN, <i>Chemistry</i> Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye	Doç. Dr. Can Ali AĞCA, <i>Molecular Biology and Genetic</i> Bingöl University, Bingöl, Türkiye
Doç. Dr. Hasan SAYĞILI, <i>Chemistry</i> Mus Alparslan University, Mus, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Kaan HÜRKAN, <i>Molecular Biology and Genetic</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN, <i>Chemistry</i> Bingöl University, Bingöl, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Barış EREN, <i>Molecular Biology and Genetic</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Velid UNSAL, <i>Chemistry</i> Mardin Artuklu University, Mardin, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TÜLEK, <i>Molecular Biology and Genetic</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BALCI, <i>Chemistry</i> Gümüşhane University, Gümüşhane, Türkiye	Prof. Dr. Mehmet Akif IRMAK, <i>Landscape Architecture</i> Atatürk University, Erzurum, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Servet AŞKIN, <i>Chemistry</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Meryem Bihter BİNGÜL BULUT, <i>Landscape Architecture</i> Kırkkale University, Kırkkale, Türkiye
Doç. Dr. Uğur GÜLLER, <i>Chemistry</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Doç. Dr. İlknur MERİÇ TURGUT, <i>Fisheries</i> Ankara University, Ankara, Türkiye
Doç. Dr. Zeynep Şilan TURHAN, <i>Chemistry</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Doç. Dr. Alihsan ŞEKERTEKİN, <i>Map Engineering</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KAZANCIOĞLU, <i>Chemistry</i> Kilis 7 Aralık University, Kilis, Türkiye	Doç. Dr. Yakup Erdal ERTÜRK, <i>Agricultural Economy</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Adem RÜZGAR, <i>Chemistry</i> Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye	Doç. Dr. Bengü EVEREST, <i>Agricultural Economy</i> Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Türkiye
Doç. Dr. Gülşah SAYDAN KANBEROĞLU, <i>Chemistry</i> Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Tuba ALBAYRAK, <i>Agricultural Economy</i> Bozok University, Yozgat, Türkiye
Doç. Dr. Mehmet Harbi ÇALIMLI, <i>Chemistry</i> İstanbul University, İstanbul, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Selime CANAN, <i>Agricultural Economy</i> Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye
Doç. Dr. Selcan KARAKUŞ, <i>Chemistry</i> İstanbul University, İstanbul, Türkiye	Dr. Öğr. Üyesi Kasım ŞAHİN, <i>Farming Economy</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Prof. Dr. Alime ÇITAK, <i>Chemistry Engineering</i> Eskişehir Osmangazi University, Eskişehir, Türkiye	Prof. Dr. Bilal KESKİN, <i>Field Crops</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Selçuk EKİCİ, <i>Mechanical Engineering</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Prof. Dr. Süleyman TEMEL, <i>Field Crops</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Mahir UZUN, <i>Mechanical Engineering</i> İnönü University, Malatya, Türkiye	Doç. Dr. Tamer ERYİĞİT, <i>Field Crops</i> Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa HAMAMCI, <i>Mechanical Engineering</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Prof. Dr. Ali Rıza DEMİRKIRAN, <i>Soil Science and Plant Nutrition</i> Bingöl University, Bingöl, Türkiye
Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Raci AYDIN, <i>Mechanical Engineering</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Prof. Dr. Adem GÜNEŞ, <i>Soil Science and Plant Nutrition</i> Erciyes University, Kayseri, Türkiye
Prof. Dr. Serpil HALICI, <i>Mathematics</i> Sakarya University, Sakarya, Türkiye	Doç. Dr. Serdar SARI, <i>Soil Science and Plant Nutrition</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Aynur ŞAHİN, <i>Mathematics</i> Sakarya University, Sakarya, Türkiye	Doç. Dr. Mücahit KARAOĞLU, <i>Soil Science and Plant Nutrition</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Alkan ÖZKAN, <i>Mathematics</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Doç. Dr. Ali İhsan ATALAY, <i>Animal Science</i> İğdır University, İğdır, Türkiye
Doç. Dr. Lokman BİLEN, <i>Mathematics</i> İğdır University, İğdır, Türkiye	Doç. Dr. İsa YILMAZ, <i>Animal Science</i> Muş Alparslan University, Muş, Türkiye
Dr. Ahmet Burçin BATIBAY, <i>Materials and Metallurgical Engineering</i> Necmettin Erbakan University, Konya, Türkiye	Doç. Dr. Ali Vaiz GARİPOĞLU, <i>Animal Science</i> Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye
Dr. Mehmet KURU, <i>Materials and Metallurgical Engineering</i> Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye	Doç. Dr. Cem TIRINK, <i>Animal Science</i> İğdır University, İğdır, Türkiye

ULUSLARARASI EDİTÖRLER KURULU
INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Muhammad HANIF, <i>Mathematic</i> Lahore University, Lahore, Pakistan	Prof. Dr. Lenka KOURIMSKA, <i>Food and Nutrition</i> Czech Uni. of Life Sciences Prague, Suchdol, Czech Republic
Prof. Dr. Çetin Kaya KOÇ, <i>Computer Engineering</i> University of California, Santa Barbara	Prof. Dr. Tan YANWEN, <i>Economics</i> South China Agricultural University, Guangzhou, China
Prof. Dr. Muhammad SARWAR KHAN, <i>Agri. Biotechnology</i> University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan	Prof. Dr. Zafar IQBAL, <i>Veterinary Science</i> University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan
Prof. Dr. Abdul WAHID, <i>Department of Botany</i> University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan	Assist. Prof. Dr. Christina BENEKI, <i>Dep. of Bus. Admin.</i> Tech. Educ. Inst. of Ionian Islands, Cephalonia, Greece
Prof. Dr. Khalid JAVED, <i>Dep. of Livestock Prod.</i> University of Vet. & Animal Sciences, Lahore, Pakistan	Dr. Reza ABDİ, <i>Physics</i> University of Bonab, İran
Prof. Dr. Guang Jie ZHAO, <i>Forestry</i> Beijing Forestry University, China	Dr. Mahdi HOSSEINI, <i>Civil Engineering</i> Nanjing Forestry University, China
Prof. Dr. Vaqif ABBASOV, <i>Chemistry</i> Neft Kimya Prosesleri Institutu, Azerbaijan	Dr. Snezana ANDJELKOVIC, <i>Forage Crops</i> Institute for Forage Crops (IFC), Krusevac, Republic of Serbia
Prof. Dr. Afsun SUJAYEV, <i>Chemistry</i> Institute of Additive Chemistry of the ANAS, Azerbaijan	Dr. Abdul WAHEED, <i>Animal Science</i> Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan
Prof. Dr. Emanuele BOSELLI, <i>Food Science and Technology</i> Free University of Bozen, Bolzano, Italy	Dr. Ferhat ABBAS, <i>Vet- Animal Science, CASVAB</i> University of Balochistan, Balochistan, Pakistan
Dr. Naveen KUMAR, <i>Horticulture</i> University of Florida, Florida, USA	Dr. Öğr. Üyesi Asim FARAZ, <i>Zootečni</i> Bahauddin Zakariya University Multan, Pakistan
Dr. Mohamad Mazen HAMOUD-AGHA, <i>Microbiology</i> Institut Polytechnique UniLaSalle, Beauvais, France	Assoc. Prof. Dr. Lilong XIONG, <i>Chemistry</i> Xi'an Jiaotong University, Beilin, Xi'An, Shaanxi, China
Dr. Neciah DORH, <i>Electrical Engineering</i> University of Bristol, Bristol, United Kingdom	

DİL EDİTÖRLERİ
LANGUAGE CONSULTANTS

İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ
STATISTICS CONSULTANTS

Dr. Öğr. Üyesi Didem ERDEL Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. Cem TIRINK Iğdır University Iğdır, Türkiye
Öğr. Gör. Barış YILDIZ Iğdır University, Iğdır, Türkiye	Doç. Dr. Samet Hasan ABACI Ondokuz Mayıs University, Samsun, Türkiye
Öğr. Gör. Gökhan YİDIRIM Iğdır University, Iğdır, Türkiye	

2023 YILI CİLT 13 HAKEM LİSTESİ
REFEREE LIST OF 2023 YEAR VOLUME 13

Prof. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ, Ağrı İbrahim Çeçen University Prof. Dr. Adnan TOPUZ, Bülent Ecevit University Prof. Dr. Ahmet KILIÇ, DİCLE University Prof. Dr. Ahmet TOLUNAY, Isparta Applied Sciences University Prof. Dr. Ali KAYGISIZ, Kahramanmaraş Sütçü İmam University Prof. Dr. Ali Kemal BİRGÜCÜ, Isparta University of Applied Sciences Prof. Dr. Ali Rıza DEMİRKIRAN, Bingöl University Prof. Dr. Arif SEMERCİ, Çanakkale Onsekiz Mart University Prof. Dr. Atakan KOÇ, Aydın Adnan Menderes University Prof. Dr. Avni BİRİNCİ Atatürk University Prof. Dr. Ayhan HOROZ, Ondokuz Mayıs University Prof. Dr. Ayşe KULEYİN, Ondokuz Mayıs University Prof. Dr. Bahri BAYRAM, Atatürk University Prof. Dr. Behçet KIR, Ege University Prof. Dr. Burak Nazmi CANDOĞAN, Bursa Uludağ University Prof. Dr. Can Özgür ÇOLPAN, Dokuz Eylül University Prof. Dr. Cüneyt AKI, Çanakkale Onsekiz Mart University Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ, Tokat Gaziosmanpaşa University Prof. Dr. Davut KARAASLAN, Dicle University Prof. Dr. Deniz EKİNCİ, Ondokuz Mayıs University Prof. Dr. Derya TEKİN, Atatürk University Prof. Dr. Dolunay SAKAR DAŞDAN, Yıldız Technical University	Dr. Öğr. Üyesi H. Alperen BULUT, Erzincan Binali Yıldırım University Dr. Öğr. Üyesi İbrahim UYSAL, Çanakkale Onsekiz Mart University Dr. Öğr. Üyesi Melek ZOR, Ağrı İbrahim Çeçen University Dr. Öğr. Üyesi ALAMETTİN BAYAV, Isparta University of Applied Sciences Dr. Öğr. Üyesi Aliye YILDIRIM, Ege University Dr. Öğr. Üyesi Alper ÇİÇEK, Trakya University Dr. Öğr. Üyesi Arslan KAPTAN, Sivas Cumhuriyet University Dr. Öğr. Üyesi Aybek YİĞİT, Iğdır University Dr. Öğr. Üyesi Aydan ACAR ŞAHİN, ANKARA University Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARACALI TUNÇ, Iğdır University Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Özgür UNCU, Necmettin Erbakan University Dr. Öğr. Üyesi Ayşe TÜRKHAN, Iğdır University Dr. Öğr. Üyesi Aziz Hakan ALTUN, Selçuk University Dr. Öğr. Üyesi Bayram ÜRKEK, Gümüşhane University Dr. Öğr. Üyesi Berna DOĞRU ÇOKRAN, Pamukkale University Dr. Öğr. Üyesi Beyza CABİR, Van Yüzüncüyıl University Dr. Öğr. Üyesi Buğra SERPER, Tarsus University Dr. Öğr. Üyesi Canan GÜLMEZ, Iğdır University Dr. Öğr. Üyesi Cemal KARAASLAN, Iğdır University Dr. Öğr. Üyesi Cevat ÖZARPA, Ankara Medipol University Dr. Öğr. Üyesi Cevriye KALKANDELEN, İstanbul University Dr. Öğr. Üyesi Çağatay YILDIRIM, Ondokuz Mayıs University
---	---

- Prof. Dr. Duran KARAKAŞ, Sivas Cumhuriyet University
Prof. Dr. Duygu EVİN, Malatya Turgut Özal University
Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL, Erzincan Binali Yıldırım University
Prof. Dr. Emrah EVREN KARA, Düzce University
Prof. Dr. Emre AYDEMİR, İstanbul Esenyurt University
Prof. Dr. Engin ÖZKAN, Erzincan Binali Yıldırım University
Prof. Dr. Erdal KENDÜZLER, Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Prof. Dr. Erhan DİNCKAYA, Ege University
Prof. Dr. EROL İSKENDER, Karadeniz Technical University
Prof. Dr. Ersin KARABACAK, Çanakkale Onsekiz Mart University
Prof. Dr. Fatih UCUN, Süleyman Demirel University
Prof. Dr. FERHAN KÜÇÜKBASMACI SABIR, Selçuk University
Prof. Dr. FEYZİ UĞUR, Çanakkale Onsekiz Mart University
Prof. Dr. FİGEN ÇİLİNGİR, İğdir University
Prof. Dr. Filiz Nuran ACAR, Atatürk University
Prof. Dr. GÖKHAN ZENGİN, Selçuk University
Prof. Dr. HAKAN GEREN, Ege University
Prof. Dr. Hakan SÖYÜT, Bursa Uludağ University
Prof. Dr. HALİL DEMİR, Karabük University
Prof. Dr. HALİL GÖKCE, Giresun University
Prof. Dr. Hasan KARABIYIK, Dokuz Eylül University
Prof. Dr. İbrahim TEĞİN, SİİRT University
Prof. Dr. İbrahim TURNA, Karadeniz Technical University
Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT, Atatürk University
Prof. Dr. İlker İNAM, Bilecik Şeyh Edebali University
Prof. Dr. İlnur DEMİRAL, Eskişehir Osmangazi University
Prof. Dr. İnanç ÖZGEN, Fırat University
Prof. Dr. Kadriye URUÇ PARLAK, Ağrı İbrahim Çeçen University
Prof. Dr. Kamil ŞİRİN, Manisa Celal Bayar University
Prof. Dr. KASIM KOÇAK, İstanbul Technical University
Prof. Dr. Kudusi KAYADUMAN, Gaziantep University
Prof. Dr. Lale Canan DÜLGER, İzmir Ekonomi University
Prof. Dr. Luminita-Ioana COTİRLA, Technical University of Cluj-Napoca
Prof. Dr. Macid NURBAŞ, Eskişehir Osmangazi University
Prof. Dr. Mahmut KARA, Van Yüzüncüyıl University
Prof. Dr. Mahmut TOPRAK, BİNGÖL University
Prof. Dr. Mehmet KARA, Bursa Uludağ University
Prof. Dr. Mehmet Uğur Toprak, Dumlupınar University
Prof. Dr. Meryem ÇAMUR DEMİR, Kırklareli University
Prof. Dr. Mesut TAŞKIN, Atatürk University
Prof. Dr. Mete YANAR, Atatürk University
Prof. Dr. Murat AYDIN, Adıyaman University
Prof. Dr. Murat ÇAĞLAR, Erzurum Technical University
Prof. Dr. Murat RAKAP, Bartın University
Prof. Dr. Mustafa Emre AYDEMİR, İstanbul Arel University
Prof. Dr. Mustafa KIZILŞİMŞEK, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Bursa Technical University
Prof. Dr. Müslüm ARICI, Kocaeli University
Prof. Dr. Müslüm KUZU, Karabük University
Prof. Dr. Naci TÜZEMEN, Kastamonu University
Prof. Dr. Nazime DOĞAN, Pamukkale University
Prof. Dr. Necmi İŞLER, Mustafa Kemal University
Prof. Dr. Nevzat BEYAZIT, Ondokuz Mayıs University
Prof. Dr. Nilüfer CİHANĞİR, Hacettepe University
Prof. Dr. Nur Münevver PINAR, Ankara University
Prof. Dr. Nuran Ay, Eskişehir Technical University
Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU, Çanakkale Onsekiz Mart University
Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU, Çanakkale Onsekiz Mart University
Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU, OSMANİYE KORKUT ATA University
Prof. Dr. Nurdan Gamze TURAN, Samsun Ondokuz Mayıs University
Prof. Dr. Nursel GÜL, Ankara University
Prof. Dr. O. Sermet KABASAKAL, Eskişehir Osmangazi University
Prof. Dr. Okan ACAR, Çanakkale Onsekiz Mart University
Prof. Dr. Osman EREKUL, Aydın Adnan Menderes University
Prof. Dr. Özgür KALKIŞIM, Recep Tayyip Erdoğan University
Prof. Dr. Özlem BARIŞ, Atatürk University
Prof. Dr. Öznur ASLAN, Erciyes University
Prof. Dr. Ramazan ACAR, Selçuk University
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem Gözde ASLAN, BİRÜNİ University
Dr. Öğr. Üyesi Derya DOĞANAY, Health Sciences University
Dr. Öğr. Üyesi Derya GÜNGÖRDÜ SOLGÜN, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Derya SEKMAN, Kırşehir Ahi Evran University
Dr. Öğr. Üyesi Dilek KABAKCI, Muş Alparslan University
Dr. Öğr. Üyesi Dilek ŞAHİN, Sinop University
Dr. Öğr. Üyesi Doğan TÜRKYILMAZ, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Duygu BAŞKAYA SEZER, Amasya University
Dr. Öğr. Üyesi Ebru BATI AY, Amasya University
Dr. Öğr. Üyesi Ebubekir SEYYARER, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Elvan ŞENARSLAN, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Emin KAPLAN, Bingöl University
Dr. Öğr. Üyesi Emre ALARSLAN, Bandırma Onyeddi Eylül University
Dr. Öğr. Üyesi Engin EYCEYURT, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University
Dr. Öğr. Üyesi Engin KILIÇ, Erzincan Binali Yıldırım University
Dr. Öğr. Üyesi Erdem ERGAN, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Erdem IŞIK, Munzur University
Dr. Öğr. Üyesi Erdin DALKILIÇ, Çankırı Karatekin University
Dr. Öğr. Üyesi Erdiç ALADAĞ, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Eren Özden, İğdir University
Dr. Öğr. Üyesi Ergün KORKMAZ, Isparta Applied Sciences University
Dr. Öğr. Üyesi Erkan AZİZOĞLU, Hakkari University
Dr. Öğr. Üyesi Erkan GÜLER, Giresun University
Dr. Öğr. Üyesi Erkan ÖNER, ADIYAMAN University
Dr. Öğr. Üyesi Ersin KARATAŞ, Ağrı İbrahim Çeçen University
Dr. Öğr. Üyesi Esra Nurten YER ÇELİK, Kastamonu University
Dr. Öğr. Üyesi Evrim KARACETİN, ERCİYES University
Dr. Öğr. Üyesi Fadime GÖKÇE, Pamukkale University
Dr. Öğr. Üyesi Faruk Emre AYSAL, Afyon Kocatepe University
Dr. Öğr. Üyesi Fatih KATRANCI, İnönü University
Dr. Öğr. Üyesi Fatih TEZCAN, Tarsus University
Dr. Öğr. Üyesi Fatma AKSAKAL DAĞDELEN, Kocaeli Health and Technology University
Dr. Öğr. Üyesi FERİDE ÖNCAN SÜMER, Aydın Adnan Menderes University
Dr. Öğr. Üyesi FESİH KESKİN, İğdir University
Dr. Öğr. Üyesi Fevzi ALTUNER, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi FEYZİ ŞİNAN TOKALI, Kafkas University
Dr. Öğr. Üyesi Funda Hatice SEZGİN, İstanbul University
Dr. Öğr. Üyesi Funda KUTLU ONAY, Amasya University
Dr. Öğr. Üyesi Furgan ASLANOĞLU, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi GAMZE ÜÇÖK, Necmettin Erbakan University
Dr. Öğr. Üyesi GÖKHAN GÖKÇE, ÇUKUROVA University
Dr. Öğr. Üyesi Gökhan ÖZTÜRK, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Yeliz ŞENTÜRK, İstanbul Gelişim University
Dr. Öğr. Üyesi HACER TÜFEKÇİ, Yozgat Bozok University
Dr. Öğr. Üyesi HALİL İBRAHİM AKOLAŞ, Balıkesir University
Dr. Öğr. Üyesi Halit ALPEREN BULUT, Erzincan Binali Yıldırım University
Dr. Öğr. Üyesi Hamed GHORBANPOOR, Eskişehir Osmangazi University
Dr. Öğr. Üyesi HARUN ARTUNER, Hacettepe University
Dr. Öğr. Üyesi Hasan BAŞAK, Artvin Çoruh University
Dr. Öğr. Üyesi HATİCE ÇALIŞ KARATEKİN, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Hatice Gamze SOĞUKÖMEROĞULLARI, Gaziantep University
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin GÖKÇE, Çankırı Karatekin University
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KARAKURT, Erzincan Binali Yıldırım University
Dr. Öğr. Üyesi İltir Demirhan, Harran University
Dr. Öğr. Üyesi İshak PAÇAL, İğdir University
Dr. Öğr. Üyesi İsrail OKUMUŞ, Erzincan Binali University
Dr. Öğr. Üyesi Kaan HÜRKAN, İğdir University
Dr. Öğr. Üyesi Kadirhan POLAT, Ağrı İbrahim Çeçen University
Dr. Öğr. Üyesi Kasım TAKIM, Harran University
Dr. Öğr. Üyesi Kerim KOÇ, Yıldız Technical University
Dr. Öğr. Üyesi Kübra FETTAHOĞLU, Ağrı İbrahim Çeçen University
Dr. Öğr. Üyesi Lokman BİLEN, İğdir University
Dr. Öğr. Üyesi Mahir GÜLEN, Bartın University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmed Zahid MALASLI, Necmettin Erbakan University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif BÜLBÜL, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağlar FIRAT, Erzincan Binali Yıldırım University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Harbi ÇALIMLI, İğdir University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Murat CEYLAN, İğdir University

- Prof. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ, Ağrı İbrahim Çeçen University
Prof. Dr. Recep AYDIN, Atatürk University
Prof. Dr. Rüveyde TUNÇTÜRK, Van Yüzüncüyıl University
Prof. Dr. Seda BEYAZ, Balıkesir University
Prof. Dr. Serkan GÜL, Recep Tayyip Erdoğan University
Prof. Dr. Serkan ISLAK, Kastamonu University
Prof. Dr. Serkan SÜTLÜ, Gebze Technical University
Prof. Dr. Serpil HALICI, Pamukkale University
Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN, Kırıkkale University
Prof. Dr. Sıddık KESKİN, Van Yüzüncüyıl University
Prof. Dr. Sulhattin YAŞAR, Karamanoğlu Mehmet Bey University
Prof. Dr. Suna CEBESÖY, Ankara University
Prof. Dr. Şahika Sena BAYAZİT, İstanbul University
Prof. Dr. Şevket ALP, Van Yüzüncüyıl University
Prof. Dr. Şeyma TULUCE DEMİRAY, OSMANİYE KORKUT ATA University
Prof. Dr. Şükrü TALAŞ, Afyon Kocatepe University
Prof. Dr. Talip ÇETER, KASTAMONU University
Prof. Dr. Taner TEKİN, Atatürk University
Prof. Dr. Tevfik KÜÇÜKÖMEROĞLU, Karadeniz Technical University
Prof. Dr. Turgay Tuğay BİLGİN, Bursa Technical University
Prof. Dr. Uğur ÇALIGÜLÜ, Fırat University
Prof. Dr. Ünal GEÇGEL, Trakya University
Prof. Dr. Ünsal DOĞRU, Atatürk University
Prof. Dr. Vedat DAĞDEMİR, Atatürk University
Prof. Dr. Yavuz KÖYSAL, Ondokuz Mayıs University
Prof. Dr. Zehra Arzu BECER ÖCAL, Akdeniz University
Doç. Dr. Ertuğrul ALTUNTAŞ, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Doç. Dr. Fadime ÖZDEMİR KOÇAK, Bilecik Şeyh Edebali University
Doç. Dr. FERHAT BOZKURT, Atatürk University
Doç. Dr. FEVZİ TOPAL, Gümüşhane University
Doç. Dr. FUAT KARTAL, KASTAMONU University
Doç. Dr. GÖRKEM ÖRÜK, SİİRT University
Doç. Dr. HASAN HÜSEYİN ÖZBEK, Erzincan Binali Yıldırım University
Doç. Dr. HÜSNÜ AKTAŞ, Mardin Artuklu University
Doç. Dr. Yeşim AKBULUT, Atatürk University
Doç. Dr. Burak SÜRMEK, Karamanoğlu Mehmetbey University
Doç. Dr. A. Ersin DİNÇER, Abdullah Gül University
Doç. Dr. Abdulgani Şahin, Ağrı İbrahim Çeçen University
Doç. Dr. Abdullah EREN, Mardin Artuklu University
Doç. Dr. Abdülmelik ARAS, İğdır University
Doç. Dr. Abidin Çalışkan, Batman University
Doç. Dr. Adem KOÇYİĞİT, Bilecik Şeyh Edebali University
Doç. Dr. Adnan AKTEPE, Kırıkkale University
Doç. Dr. Ahmet Gökhan AĞGÜL, Ağrı İbrahim Çeçen University
Doç. Dr. Ali ARSLANTAS, İzmir Bakırcaay University
Doç. Dr. Ali İhsan MEŞE, Trakya University
Doç. Dr. Ali ÖZKAN, Gaziantep University
Doç. Dr. Ali Rıza DENİZ, HAKKARİ University
Doç. Dr. Ali TÜMAY GÜRLER, Ondokuz Mayıs University
Doç. Dr. Alper SAĞLIK, Çanakkale Onsekiz Mart University
Doç. Dr. Alperen TOZLU, Bayburt University
Doç. Dr. Aydın KAYA, Hacettepe University
Doç. Dr. Ayhan AKYOL, İZMİR KATİP ÇELEBİ University
Doç. Dr. Ayhan DURAN, Aksaray University
Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN, Ağrı İbrahim Çeçen University
Doç. Dr. Azim GÖKÇE, Sakarya University of Applied Sciences University
Doç. Dr. Barış ÖZLÜ, AKSARAY University
Doç. Dr. Behçet İNAL, Siirt University
Doç. Dr. Betül ÇELEBİ, Hacettepe University
Doç. Dr. Bünyamin AYGÜN, Ağrı İbrahim Çeçen University
Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ, Erzurum Technical University
Doç. Dr. Can YILMAZ, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Cem TIRINK, İğdır University
Doç. Dr. Çağlar BAYIK, Zonguldak Bülent Ecevit University
Doç. Dr. Çetin MUTLU, Harran University
Doç. Dr. Derya EFE, Giresun University
Doç. Dr. Ebru AKKEMİK, Siirt University
Doç. Dr. Elif AYKIN DİNÇER, Akdeniz University
Doç. Dr. Elif SOMUNCU, Uşak University
Doç. Dr. Emel BİÇER, Bingöl University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Onur GÜLBAHÇE, İstanbul Technical University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Şerif CANSEVER, İstanbul University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YURDERİ, Bartın University
Dr. Öğr. Üyesi Melek ZOR, Ağrı İbrahim Çeçen University
Dr. Öğr. Üyesi Melih YILDIZ, Erciyes University
Dr. Öğr. Üyesi Merve BALLI YÜKSEL, İstanbul Topkapı University
Dr. Öğr. Üyesi Mesude Figen DÖNMEZ, İğdır University
Dr. Öğr. Üyesi Mesut HÜSEYİNOĞLU, Dicle University
Dr. Öğr. Üyesi Mete ÖZBALTAN, Erzurum Technical University
Dr. Öğr. Üyesi Miraç DİLİRUBA, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Mohsen MIRZAPOUR, Siirt University
Dr. Öğr. Üyesi Mojtaba HASSANZADEHDELOUEI, İslam Azad University
Dr. Öğr. Üyesi Muammer Edip GÜRKAN, Karabük University
Dr. Öğr. Üyesi Muaz KEMERLİ, Sakarya University
Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Said YOLCU, Sakarya University of Applied Sciences University
Dr. Öğr. Üyesi Muhammet Hanifi SELVİ, Necmettin Erbakan University
Dr. Öğr. Üyesi Murat AKPULAT, Erciyes University
Dr. Öğr. Üyesi Murat TAŞYÜREK, Kayseri University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa AKBABA, İğdır University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÇAVUŞ, Kayseri University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ERGÜN, Bayburt University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Mikail ÖZÇİLOĞLU, Kilis 7 Aralık University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa RUSTEMOĞLU, Şırnak University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÜSTÜNER, ARTVİN ÇORUH University
Dr. Öğr. Üyesi Mücahit PAKSOY, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Dr. Öğr. Üyesi Mücahit SEÇME, Ordu University
Dr. Öğr. Üyesi N. Lerzan ÇİÇEK, Isparta Applied Sciences University
Dr. Öğr. Üyesi Nadire ÜÇLER, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Nazım KURTULMUŞ, Adana Alparslan Türkeş Science and Technology University
Dr. Öğr. Üyesi Necati ÇETİN, Ankara University
Dr. Öğr. Üyesi Necdet KARAKOYUN, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BAL, Gazi University
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR, Çanakkale Onsekiz Mart University
Dr. Öğr. Üyesi Nihat YILMAZ, Kayseri University
Dr. Öğr. Üyesi Nilgün POYRAZ, Kütahya Dumlupınar University
Dr. Öğr. Üyesi Nuh AZGİNOĞLU, Kayseri University
Dr. Öğr. Üyesi Nüvit COŞKUN, Kafkas University
Dr. Öğr. Üyesi Oğuz MISIR, Tokat Gazi Osman Paşa University
Dr. Öğr. Üyesi Onur GÜVEN, Adana Alparslan Türkeş Science and Technology University
Dr. Öğr. Üyesi Onur SÖZÜDOĞRU, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Orhan ERMETİN, Yozgat Bozok University
Dr. Öğr. Üyesi Orhan ULUÇAY, Kafkas University
Dr. Öğr. Üyesi Osman BABAYİĞİT, Karamanoğlu Mehmetbey University
Dr. Öğr. Üyesi Osman Safa ÇİFÇİ, Boğaziçi University
Dr. Öğr. Üyesi Osman YÜKSEL, Uşak University
Dr. Öğr. Üyesi Özay AKDEMİR, Ege University
Dr. Öğr. Üyesi Özer KURT, Muş Alparslan University
Dr. Öğr. Üyesi Rüya SAĞLAMTAŞ, Ağrı İbrahim Çeçen University
Dr. Öğr. Üyesi Samet MERT, Kütahya Dumlupınar University
Dr. Öğr. Üyesi Seda OKUR, Recep Tayyip Erdoğan University
Dr. Öğr. Üyesi Sefa GÖZCÜ, Erzincan Binali Yıldırım University
Dr. Öğr. Üyesi Sefer Demirbaş, Tekirdağ Namık Kemal University
Dr. Öğr. Üyesi Selim BIYIK, Ondokuz Mayıs University
Dr. Öğr. Üyesi Senai YALÇINKAYA, Marmara University
Dr. Öğr. Üyesi Serhat AKSUNGUR, Malatya Turgut Özal University
Dr. Öğr. Üyesi Serhat ÇELİKTEN, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University
Dr. Öğr. Üyesi Serhat KILIÇARSLAN, Bandırma Onyeddi Eylül University
Dr. Öğr. Üyesi Serhat KILIÇARSLAN, Bandırma On Yedi Eylül University
Dr. Öğr. Üyesi Serhat ŞAP, Bingöl University
Dr. Öğr. Üyesi Serkan AKOĞUL, Pamukkale University
Dr. Öğr. Üyesi Serkan ÇAŞKA, Manisa Celal Bayar University
Dr. Öğr. Üyesi Seval AKSOY PEHLİVANOĞLU, Sinop University
Dr. Öğr. Üyesi Sibel BOYSAN CANAL, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Sinan KUL, Bayburt University
Dr. Öğr. Üyesi Sıpan SOYSAL, Siirt University
Dr. Öğr. Üyesi Şilan BATURAY, Sinop University
Dr. Öğr. Üyesi Tahsin KÖROĞLU, Adana Alparslan Türkeş University
Dr. Öğr. Üyesi Tolga ÖZER, Afyon Kocatepe University
Dr. Öğr. Üyesi Tuğba KILIÇ, Kilis 7 Aralık University
Dr. Öğr. Üyesi Uğur BAŞER, Ondokuz Mayıs University

- Doç. Dr. Emrah KUŞ, Iğdır University
Doç. Dr. Emrah YERLİKAYA, Siirt University
Doç. Dr. Emre BABUR, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Doç. Dr. Emre ÖZAN, Ondokuz Mayıs University
Doç. Dr. Engin ERBAYRAK, Bayburt University
Doç. Dr. Eray Metin GÜLER, Health Sciences University
Doç. Dr. Erdal ÇAÇAN, Bingöl University
Doç. Dr. Erdem UZUN, Karamanoğlu Mehmetbey University
Doç. Dr. Erdiñ BAL, Tekirdağ Namık Kemal University
Doç. Dr. Erol ORAL, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Ersin DİNÇER, ABDULLAH GÜL University
Doç. Dr. Esra DİLEK, Erzincan Binalı Yıldırım University
Doç. Dr. Ezgi TOPÇU, Atatürk University
Doç. Dr. Fahriye Biher ZALMOĞLU ONAT, Çukurova University
Doç. Dr. Fatih KOÇYİĞİT, Dicle University
Doç. Dr. Ferit SÖNMEZ, Bolu Abant İzzet Baysak University
Doç. Dr. Ferit SÖNMEZ, Bolu Abant İzzet Baysal University
Doç. Dr. Fırat KURT, Muş Alparslan University
Doç. Dr. Gökhan ŞEN, Kastamonu University
Doç. Dr. Gözde ÖZKAN TÜKEL, Isparta Uygulamalı Bilimler University
Doç. Dr. Gülşah BENGİSÜ, Harran University
Doç. Dr. Gültekin UZUN, Gazi University
Doç. Dr. Hadi GENÇELİ, YILDIZ TEKNİK University
Doç. Dr. Hakan ÇETİNKAYA, Kilis 7 Aralık University
Doç. Dr. Hakan KAYGUSUZ, Altınbaş University
Doç. Dr. Hakan KIZILTAŞ, Atatürk University
Doç. Dr. HALİL İBRAHİM BURGAN, Akdeniz University
Doç. Dr. Halil İbrahim ÖZTÜRK, Erzincan Binalı Yıldırım University
Doç. Dr. Halil İbrahim ÖZTÜRK, Erzincan Binalı Yıldırım University
Doç. Dr. Hamid CEYLAN, Atatürk University
Doç. Dr. Hasan Basri ULAŞ, Gazi University
Doç. Dr. Hasan OĞUL, Sinop University
Doç. Dr. Hasan SAYGILI, Batman University
Doç. Dr. Hatice KUSAK SAMANCI, Bitlis Eren University
Doç. Dr. Hatice KUŞAK SAMANCI, Bitlis Eren University
Doç. Dr. Hayati MAMUR, Manisa Celal Bayar University
Doç. Dr. Hüseyin CÜCE, Giresun University
Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI, Akdeniz University
Doç. Dr. İbrahim AYTEKİN, Selçuk University
Doç. Dr. İbrahim DEMİR, Bitlis Eren University
Doç. Dr. İhsan Alacabey, Mardin Artuklu University
Doç. Dr. İlhan Subaşı, Abant İzzet Baysal University
Doç. Dr. İlkay GÜMÜŞ, Mersin University
Doç. Dr. İlknur ŞENTÜRK, Sivas Cumhuriyet University
Doç. Dr. İsmail ALTIN, Karadeniz Technical University
Doç. Dr. İsmail TOPCU, Alanya Alaaddin Keykubat University
Doç. Dr. İsmail ÜLGER, Erciyes University
Doç. Dr. Kadir Bozukluhan, Kafkas University
Doç. Dr. Kadir Ersin TEMİZEL, Ondokuz Mayıs University
Doç. Dr. Kadir GELİŞ, Bolu Abant İzzet Baysal University
Doç. Dr. Kemal ADEM, Sivas Bilim Ve Teknoloji University
Doç. Dr. Mahmut DOĞAN, Harran University
Doç. Dr. Mehmet CANBAZ, Eskişehir Osmangazi University
Doç. Dr. Mehmet Emre EREZ, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Mehmet Fatih DİLEKOĞLU, Harran University
Doç. Dr. Mehmet KAPLAN, Siirt University
Doç. Dr. Mehmet MAMAY, Harran University
Doç. Dr. Mehmet Sait İZGİ, Siirt University
Doç. Dr. Mehmet ŞENGÖNÜL, Adıyaman University
Doç. Dr. Melek ÖZPİÇAK, Ondokuz Mayıs University
Doç. Dr. Melek ZEYBEK YÜNLÜ, Süleyman Demirel University
Doç. Dr. Melih KUNCAN, Siirt University
Doç. Dr. Mert GÜRKAN, Çanakkale Onsekiz Mart University
Doç. Dr. Mine MENEKŞE YILMAZ, Gaziantep University
Doç. Dr. Miraç ALAF, Bilecik Şeyh Edebali University
Doç. Dr. Mubin KOYUNCU, Iğdır University
Doç. Dr. Murat ALAN, Karabük University
Doç. Dr. Murat EYVAZ, Gebze Technical University
Doç. Dr. Murat ÖZDAL, Atatürk University
Doç. Dr. Mustafa AKKAYA, Manisa Celal Bayar University
Doç. Dr. Mustafa ASKER, Aydın Adnan Menderes University
Doç. Dr. Mustafa ERTÜRK, Sakarya University of Applied Sciences University
Doç. Dr. Mustafa KARATAŞ, Aksaray University
Doç. Dr. Mustafa KÜSEK, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER, Iğdır University
Dr. Öğr. Üyesi Umur KÖKBAŞ, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University
Dr. Öğr. Üyesi Ümrhan KURTAN, İstanbul University
Dr. Öğr. Üyesi Üsame Ali USCA, Bingöl University
Dr. Öğr. Üyesi Üsame DEMİR, Bilecik Şeyh Edebali University
Dr. Öğr. Üyesi Vesile Hatun AKANSEL, Muğla Sıtkı Koçman University
Dr. Öğr. Üyesi Volkan TAŞDEMİR, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin ÇELEBİ, Uşak University
Dr. Öğr. Üyesi Yasin DEMİR, Bingöl University
Dr. Öğr. Üyesi Yasin YAKAR, Harran University
Dr. Öğr. Üyesi Yaşar KARATAŞ, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz UĞUR, İnönü University
Dr. Öğr. Üyesi Yunus ÇETİNTAŞ, Muğla Sıtkı Koçman University
Dr. Öğr. Üyesi Yunus Emre ARVAS, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Öğr. Üyesi Yunus KAYA, Bayburt University
Dr. Öğr. Üyesi Yusuf DOĞAN, Sivas bilim ve Teknoloji University
Dr. Öğr. Üyesi Yusuf SAVSATLI, Recep Tayyip Erdoğan University
Dr. Öğr. Üyesi Zafer CİVELEK, Çankırı Karatekin University
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKŞİT, Erzincan University
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Neşe KURT ALBAYRAK, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Zihni Onur ÇALIŞKANER, Biruni University
Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU, Balıkesir University
Dr. Öğr. Üyesi Abdullah Ammar KARCIOĞLU, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Abdurrahman SEFALLI, Bayburt University
Dr. Öğr. Üyesi Abdussamat GÜZEL, İNONU University
Dr. Öğr. Üyesi Abdülmelik ARAS, Iğdır University
Dr. Öğr. Üyesi Adem NECİP, Harran University
Dr. Öğr. Üyesi Adnan AYDIN, Iğdır University
Dr. Öğr. Üyesi Adnan KILIÇ, Bursa Uludağ University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ATALAY, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BATTAL, Muş Alparslan University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BULUT, Bartın University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KARAKOÇ, Osmaniye Korkut Ata University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet POLAT, Atatürk University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Serdar GÜLDİBİ, Karabük University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Tarık TORUN, Ankara Hacı Bayram Veli University
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TAŞER, Ağrı İbrahim Çeçen University
Dr. Öğr. Üyesi Akife DALDA ŞEKERCİ, Erciyes University
Dr. Abdullah BİÇER, Bilecik Şeyh Edebali University
Dr. Abdurrahim ÇETİN, Bingöl University
Dr. Adem AKDAĞ, Iğdır University
Dr. Adnan KARATAŞ, Pamukkale University
Dr. Ahmet GÖRGÜÇ, Aydın Adnan Menderes University
Dr. Asim GENÇ, GAZİ University
Dr. Aslan AKDULUM, Hacettepe University
Dr. Ayten BOSTANCI, Trakya University
Dr. Berker NACAK, Uşak University
Dr. Burak ÖZDEMİR, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Büşra MUTLU, Bursa Technical University
Dr. Cem KORKMAZ, Çukurova University
Dr. Cihangir UYGUN, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Dr. Davut ARI, Bitlis Eren University
Dr. Dilek KAAN, Erciyes University
Dr. Dr. Ummahan ÖZ, Manisa Celal Bayar University
Dr. Elif TOPKARA, Ondokuz Mayıs University
Dr. Emrah DİKİCİ, Aksaray University
Dr. Emrah Şimşek, Erzurum Technical University
Dr. Emre ÇINTAŞ, Erzurum Technical University
Dr. Emre İREN, Mimar Sinan University
Dr. Enes KAVRUT, Iğdır University
Dr. Ercüment ÖZTÜRK, ARTVİN ÇORUH University
Dr. Erhan ÖZTÜRK, Iğdır University
Dr. Esin HAZNECİ, Ondokuz Mayıs University
Dr. Ezelhan ŞELEM, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Ezgi DOĞAN MERAL, Bingöl University
Dr. Fatih ARTUK, Atatürk University
Dr. Fatih GÜLBAĞ
Dr. Fatih HACIMUSTAFAOĞLU, Health Sciences University
Dr. Fatma Tuba KIRIÇ, Bursa Technical University
Dr. Feyza Döndü BİLGİN
Dr. Gözde ÖZBAL SARGIN, Bilkent University
Dr. Hatice TÜRKİTEN, Ondokuz Mayıs University
Dr. Hilmi KARA, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Hüseyin DEMİRCAN, Bursa Technical University

- Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA, Kocaeli University
Doç. Dr. Mustafa Serkan YALÇIN, Mersin University
Doç. Dr. Namık KILINÇ, Iğdır University
Doç. Dr. Nejmettin AVCI, Muğla Sıtkı Koçman University
Doç. Dr. Neriman MOR, Kafkas University
Doç. Dr. Neşe OKUT, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Nihan GÜNGÖR, Gümüşhane University
Doç. Dr. Nizamettin TURAN, Siirt University
Doç. Dr. Nükhet Nilüfer DEMİREL ZORBA, Çanakkale Onsekiz Mart University
Doç. Dr. Oğuz DOĞAN, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Doç. Dr. Onur DOĞAN, İzmir Bakırçay University
Doç. Dr. Orhan YAMAN, Fırat University
Doç. Dr. Ömer Faruk CAN, Dicle University
Doç. Dr. Ömer Lütfü ÇORBACI, Recep Tayyip Erdoğan University
Doç. Dr. Özge SÜFER, Osmaniye Korkut Ata University
Doç. Dr. Özgür BALLI
Doç. Dr. Özgür BAYTUT, Ondokuz Mayıs University
Doç. Dr. Pınar GÜLLER, Atatürk University
Doç. Dr. Pınar İLGIN, Çanakkale Onsekiz Mart University
Doç. Dr. Pınar TAŞLI, Pamukkale University
Doç. Dr. Ramazan AYRANCI, Kırşehir Ahi Evran University
Doç. Dr. Ramazan KALIN, Erzurum Technical University
Doç. Dr. S. Hakan YETGIN, Tarsus University
Doç. Dr. Sabahattin CÖMERTPAY, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Doç. Dr. Sabri BIÇAKÇI, Balıkesir University
Doç. Dr. Sadreddin TUSUN, Dicle University
Doç. Dr. Sait KURŞUNOĞLU, Batman University
Doç. Dr. Sancar BULUT, Kayseri University
Doç. Dr. Seçkin AKIN, Necmettin Erbakan University
Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ, Namık Kemal University
Doç. Dr. Selcan KARAKUŞ, İstanbul University
Doç. Dr. Selçuk ÖZYÜREK, Erzincan Binali Yıldırım University
Doç. Dr. Selim BUYRUKOĞLU, Çankırı Karatekin University
Doç. Dr. Sema AKAYALÇIN, Eskişehir University
Doç. Dr. Serkan ŞENOCAK, Atatürk University
Doç. Dr. Sertaç GÖKTAŞ, Mersin University
Doç. Dr. Sevda TURKİS, Ordu University
Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA Gümüşhane University
Doç. Dr. Soner SAVAŞ, Erciyes University
Doç. Dr. Süleyman Mesut PINAR, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK, Atatürk University
Doç. Dr. Şahset İRDEMEZ, Atatürk University
Doç. Dr. Şengül UYSAL, Erciyes University
Doç. Dr. Şenol KÖSE, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Şükran KONCA, İzmir Bakırçay University
Doç. Dr. Tolga MERT, Yıldız Technical University
Doç. Dr. Tuba KÜTÜK, Recep Tayyip Erdoğan University
Doç. Dr. Tuğba MERT, Sivas Cumhuriyet University
Doç. Dr. Ufuk ATMACA, Atatürk University
Doç. Dr. Uğur MORALI, Eskişehir Osmangazi University
Doç. Dr. Ümmü Özgül KARAGÜZEL, Recep Tayyip Erdoğan University
Doç. Dr. Üyesi Eren YILMAZ, Sakarya University of Applied Sciences University
Doç. Dr. Üyesi Orhan KARAKAYA, Sakarya University of Applied Sciences University
Doç. Dr. Veli ŞİMŞEK, Bilecik Şeyh Edebali University
Doç. Dr. Veysel NEZİR, Kafkas University
Doç. Dr. Yağmur Erim KÖSE, Van Yüzüncüyıl University
Doç. Dr. Yahya TAŞGIN, Munzur University
Doç. Dr. Yeliz DEMİR, Ardahan University
Doç. Dr. Yılmaz KÜÇÜK, Bartın University
Doç. Dr. Yunus ÖNAL, İnönü University
Doç. Dr. YUSUF ALAN, Bitlis Eren University
Doç. Dr. Yusuf SİCAK, Muğla Sıtkı Koçman University
Dr. Öğr. Üyesi Faruk Baturalp GUNAY, Atatürk University
Dr. Işıl Nihan KORKMAZ, Muğla Sıtkı Koçman University
Dr. Işıl Nihan KORKMAZ, Atatürk University
Dr. MEHMET BURUKANLI, Bitlis Eren University
Dr. Mehmet Zeki KOÇAK, Iğdır University
Dr. Menekşe BULUT, Iğdır University
Dr. Merve Yasemin ALTINTAŞ, Ordu University
Dr. Metehan GÜNDE, Iğdır University
Dr. Muhammed Said YOLCU, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Muhammet ATEŞ, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Muhammet YILMAZ, Erzurum University
Dr. Murat DENER, Bingöl University
Dr. Mustafa Eray BOZYEL, Çanakkale Onsekiz Mart University
Dr. Oğuz KÖYSAL, DÜZCE University
Dr. Oğuzhan ÖZAKIN, Atatürk University
Dr. Osman AĞAR, Karamanoğlu Mehmetbey University
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa AKBABA, Iğdır University
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Salih NAS, Iğdır University
Dr. Öğretim Üyesi Kader POTURCU, Süleyman Demirel University
Dr. Öğretim Üyesi Servet AŞKIN, Iğdır University
Dr. Ömür ACET, Tarsus University
Dr. ÖZLEM TURAN, BURSA ULUDAĞ University
Dr. Öznur ÖZDİNÇ, Gaziantep University
Dr. Perihan ÇULUN, Bingöl University
Dr. Perihan ÖCAL, Bingöl University
Dr. Ramazan KELEŞ
Dr. Sabahattin CÖMERTPAY, Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Dr. Samiye ADAL, Afyon Kocatepe University
Dr. Sebahat ÖZDEMİR, Bursa Technical University
Dr. Sevdü ÜSTÜN ODABAŞI, Ondokuz Mayıs University
Dr. Sıraç YAVUZ, Bingöl University
Dr. Songül Şahin ERCAN, Gaziantep University
Dr. Sümeyye CESUR, Marmara University
Dr. Şehriban OĞUZ, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Tahir YÜCEL, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Tamer GÜÇLÜ, Bayburt University
Dr. Ümit ECER, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Yasemin KEŞKEK KARABULUT, Kırklareli University
Dr. Yaşar KARATAŞ, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Yunus Emre FIRAT, Karamanoğlu Mehmetbey University
Dr. Zeynebe BİNGÖL, Tokat Gaziosmanpaşa University
Dr. Bıpan HAZARIKA, Gauhati University
Dr. Cihangir UYGUN, Kahramanmaraş Sutcu İmam University
Dr. İbrahim GÖZETEN, Van Yüzüncüyıl University
Dr. Merve BAYHAN, Dicle University
Dr. Öğr. Üyesi Şeyma ARIKAN, Selçuk University
Dr. Yasemin KEMEÇ HÜRKAN, Çanakkale Onsekiz Mart University
Dr. Demet ALICI KARACA, Erzincan Binali Yıldırım University
Dr. Burcu DURMUŞ, Muğla Sıtkı Koçman University
Dr. Emre KUŞKAPAN, Erzurum Technical University
Dr. Ercüment ÖZTÜRK, Artvin Çoruh University
Dr. Gizem DİMLİOĞLU, University of Warwick
Dr. HALİL UĞUR TAŞDEMİR, Necmettin Erbakan University
Dr. Haris ÇALGAN, Balıkesir University
Dr. Hasan KART, Pamukkale University
Dr. Hüseyin Saygın PORTAKAL, İzmir Ekonomi University
Dr. İbrahim GÖZETEN, Van Yüzüncüyıl University
Dr. İlkay ORHAN, Eskişehir Technical University
Dr. Merve Kayacı ÇODUR, Erzurum Technical University
Dr. Özgür ÇAKMAKCI, Karamanoğlu Mehmetbey University
Dr. Perihan ÇULUN, Bingöl University
Dr. Sefa IŞIK, Muş Alparslan University
Dr. Yakup YAPAR, BİNGÖL University
Dr. Halis Bahadır KASİL, Erzurum Technical University

Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (FBED)
YAYIN İLKELERİ

1. FBED, Uluslararası hakemli bir dergi olup yılda dört kez yayınlanır. Dergimiz herhangi bir ücret talep etmemektedir. Makalelerin tümüne açık erişimle ulaşılabilir ve tam metin olarak indirilebilir.
2. Dergiye gönderilebilecek makale konuları Bahçe bitkileri, Bilgisayar mühendisliği, Bitki koruma, Biyoloji, Biyosistem mühendisliği, Çevre mühendisliği, Elektrik elektronik mühendisliği, Endüstri mühendisliği, Fizik, Gıda mühendisliği, İnşaat mühendisliği, Kimya, Makina mühendisliği, Matematik, Moleküler biyoloji ve genetik, Orman mühendisliği, Peyzaj mimarlığı, Su ürünleri, Tarım ekonomisi, Tarla bitkileri, Toprak bilimi ve bitki besleme ve Zootekni'dir. Dergide orijinal araştırma makalesi, derleme, teknik not yayımlanabilir.
3. Tüm yazılar iki profesyonel hakem tarafından değerlendirilir, Editör ve Yayın Kurulu tarafından incelenir.
4. FBED Türkçe ve İngilizce dillerinde yazılmış orijinal araştırma makalesi, teknik not ve derleme (toplam yayınların %20) yayınlamaktadır.
5. Yayımlanması istenilen eserlerin herhangi bir yerde yayınlanmamış veya yayınlanmak üzere herhangi bir dergiye gönderilmemiş olması zorunludur.
6. Dergiye yayınlanmak üzere gönderilen eserlerle birlikte Telif Hakkı Devir Sözleşmesi de tüm yazarlarca (farklı adreslerde bulunan yazarlar forma ait tüm bilgileri doldurarak ayrıca imzalamak suretiyle gönderebilirler) imzalanarak gönderilmelidir.
7. Eserlerin tüm sorumluluğu yazarlarına aittir.
8. Aynı sayıda ilk isim olarak bir yazarın en çok iki makalesi basılır.
9. Eserler bilim etiği ilkelerine uygun olarak hazırlanmalı, gerekliyse Etik Kurul Raporu'nun bir kopyası eklenmelidir.
10. Herhangi bir sorunuz için lütfen fbed@igdir.edu.tr adresine başvurun.

Journal of the Institute of Science and Technology (JIST)
PUBLISHING POLICIES

1. JIST is International Peer Reviewed Journal and published four times a year. Our journal does not charge any fees. All of the articles are accessible by open access and can be downloaded in full text.
2. The articles that can be sent to the journal are Horticulture, Computer engineering, Plant protection, Biology, Biosystem engineering, Environment engineering, Electrical-electronic engineering, Industrial engineering, Physics, Food engineering, Civil engineering, Chemistry, Mechanical engineering, Mathematics, Molecular biology and genetic, Forestry engineering, Landscape architecture, Fisheries, Agricultural economy, Field crops, soil science and plant nutrition and animal science.
3. All the manuscripts submitted to our journal are peer reviewed by two professional referees, Editor in Chief, and Editorial Board.
4. JIST intends to publish original research papers, technical notes, and reviews (20% of total papers) written in Turkish and English languages.
5. Manuscripts and communications are accepted on the understanding that these have not been published nor are being considered for publication elsewhere.
6. All the authors should submit their manuscript with transfer form of copyright for potential publication. The transfer form of Copyright should be signed by all authors.
7. All the authors will be responsible contextually for contents of their manuscripts.
8. Only two manuscripts of each author as first author can be published in same issue of JIST.
9. Manuscripts should be prepared in accordance with scientific ethic rules. When required, ethical committee reports with the related documents should be submitted to JIST.
10. Please contact for any question to fbed@igdir.edu.tr

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Bahçe Bitkileri/ Horticulture

Araştırma Makalesi / Research Article

Pollen Quality of Some Spray Chrysanthemum Varieties at Different Holding Time and Temperature
Farklı Sıcaklık ve Sürelerde Bekletilen Kasımpatı Polenlerinde Polen Kalitesinin Belirlenmesi
Hilal Beyza DURSUN, Soner KAZAZ, Tuğba KILIÇ

2303

Araştırma Makalesi / Research Article

Some Bioactive Components of Sweet Potato And Taro: A Comparative Study Based on Plant Organs
Tatlı Patates ve Gölevezin Bazı Biyoaktif Bileşenleri: Bitki Organlarına Dayalı Karşılaştırmalı Bir Çalışma
Berk Can YILDIZ, Emir Furkan DEMİR, Fatih HANCI

2315

Araştırma Makalesi / Research Article

Effects of Short Term Pollen Storage on Fruit Set, Seed Number and Seed Germination Rate in Cut Rose Hybridization
Gülşah TURNA, Soner KAZAZ, Tuğba KILIÇ

2325

Bilgisayar Mühendisliği / Computer Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Recognition of Microexpressions Using Xception Deep Learning Model and Gabor Filters with RFECV-SVM Algorithm
Xception Derin Öğrenme Modeli ve Gabor Filtreleri ile ÇDÖÖE-DVM Algoritması Kullanılarak Mikro İfadelerin Tanınması
Mehmet Zahit UZUN, Erdal BAŞARAN, Yüksel ÇELİK

2339

Araştırma Makalesi / Research Article

Adversarial Attack Detection with Convolutional Neural Networks on Images for Selection of the Most Suitable Model in
Object Detection
Nesne Tespitinde En Uygun Modelin Seçimi İçin Görüntüler Üzerinde Evrişimli Sinir Ağları ile Çekişmeli Saldırı Tespiti
Murat TAŞYÜREK, Ertuğrul GÜL

2353

Bitki Koruma / Plant Protection

Araştırma Makalesi / Research Article

Determination of Antifungal Activity of Leaf Extracts from Hypericum ssp. Against Plant Pathogenic Fungi *Fusarium
oxysporum* and *Alternaria alternata*
İdris BEKTAŞ, Fadime SEYREKOĞLU, Mustafa KÜSEK, Ceyda CEYHAN BAŞARAN

2364

Biyoloji / Biology

Araştırma Makalesi / Research Article

A New Invasive Plant Record For Flora of Turkey: *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn.
Türkiye Florası İçin Yeni Bir İstilacı Bitki Kaydı: *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn.
Abdurrahman SEFALI, Kübra Uzun

2373

Araştırma Makalesi / Research Article

Does Melatonin Prevent Damage Caused by Cadmium Chloride Toxicity to the Liver, Kidney, ve Pancreas?
Kadmiyum Klorür Toksisitesinin Karaciğer, Böbrek ve Pankreasta Neden Olduğu Hasarı Melatonin Önler mi?
Erhan ŞENSOY

2382

Araştırma Makalesi / Research Article

The Effects of Smoke and Smoke-Derived Compounds on Seed Germination of *Liquidambar orientalis* Mill. (Anatolian
Sweetgum Tree)
Duman ve Duman Kökenli Bileşiklerin *Liquidambar orientalis* Mill. (Anadolu Sığıla Ağacı)'in Tohum Çimlenmesi Üzerindeki
Etkileri
Şükrü Serter ÇATAV, Kenan AKBAŞ

2393

Araştırma Makalesi / Research Article

Histomorphological Study on Digestive Tract of Van Fish (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814))
Van Balığı (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814))'nın Sindirim Kanalı Üzerinde Histomorfolojik Çalışma
Burcu ERGÖZ AZİZOĞLU, Ahmet Regaib OĞUZ

2403

Araştırma Makalesi / Research Article

Evaluation of Uses of Some Enzymes in Removal of Plant Impurities from Raw Wool Fabrics
Elif DEMİRKAN, Dilek YAŞAR KUT, Nilay ALADAĞ TANİK

2415

Araştırma Makalesi / Research Article

Ornithological Observations in Strandzha Mountains, Kırklareli-Dereköy
Istranca (Yıldız) Dağları, Kırklareli / Dereköy Bölgesinde Ornitolojik Gözlemler
Mustafa KAYA

2423

Araştırma Makalesi / Research Article

Pollen Morphology of Five Species of *Picris* L. (Asteraceae)
Picris L. (Asteraceae) Cinsine Ait Beş Türün Polen Morfolojisi
Hanife AKYALÇIN, Kadir UÇAN

2437

Araştırma Makalesi / Research Article

Investigation of Flora and General Vegetation Structure of Some Natural Protected Areas in Anamur, Bozyazı and Aydıncık
(Mersin-Türkiye)
Anamur, Bozyazı ve Aydıncık (Mersin-Türkiye)'daki Bazı Doğal Sit Alanlarının Flora ve Genel Vejetasyon Yapısının
İncelenmesi
Ahmet Zafer TEL, İshak ORTAÇ, Ergün ÖZUSLU, Ahmet İLÇİM

2450

Araştırma Makalesi / Research Article

Antifungal Activity of Extracts From the *Ferulago Pauciradiata* in Vitro Against *Botrytis Cinerea* Pers
Sinem KARAKUŞ, Tuba Nur SUYURDU, Ekrem KÖKSAL, Cemalettin ALP

2467

Araştırma Makalesi / Research Article

Pre-Sowing Seed Applications in Some Orchid Species and The Effect of These Applications on Seed Germination and
Development
Bazı Orkide Türlerinde Ekim Öncesi Tohum Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Tohum Çimlenme ve Gelişmesine Olan Etkisi
İbrahim Özkoç, Mustafa Bilgili, Cem Tolga Gürkanlı, Luay Burhan Mustafa

2476

Araştırma Makalesi / Research Article

Thlaspi harungalipii (Brassicaceae), A New Species from Turkey
Thlaspi harungalipii (Brassicaceae), Türkiye'den Yeni Bir Tür
Mehmet Cengiz KARAIŞMAİLOĞLU

2485

Araştırma Makalesi / Research Article

Evaluation of Oxidative/Nitrosative Stress Parameters and Histopathological, Immunohistochemical Effects on Cisplatin-
Induced Lung Toxicity in Rats
Ratlarda Sisplatin Kaynaklı Akciğer Toksisitesi Üzerine Oksidatif/Nitrozatif Stres Parametrelerinin ve Histopatolojik,
İmmünohistokimyasal Etkilerin Değerlendirilmesi
Kezban YILDIZ-DALGINLI, Melek OZTURKLER, Hatice BESEREN-HAVADAR, Yasemen ADALI, Onur ATAKISI

2495

Araştırma Makalesi / Research Article

Development of Controlled Release of *Cistus creticus* Extracts Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Investigation of
Their Antimicrobial Activities
Cistus creticus Ekstrelerinin Kontrollü Salımını Gerçekleştiren Katı Lipid Nanopartiküllerin (KLN) Geliştirilmesi ve
Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması
Sevim Feyza ERDOĞMUŞ, Şerife Nur DURMUŞ, Saniye ÖZDEMİR

2505

Biyosistem Mühendisliği / Biosystem Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Analysis of Reports on The Occupational Health and Safety in The Agricultural Industry: A Bibliometrix-Aided Approach
Okan ÖZBAKIR

2516

Çevre Mühendisliği / Environmental Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Determination of Carbon Footprint at Institutions of Higher Education: The Case of the Iğdır University
Yükseköğretim Kurumlarında Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi: Iğdır Üniversitesi Örneği
Sevtap TIRINK, Hülya AYKAÇ ÖZEN

2532

Araştırma Makalesi / Research Article

Phycoremediation of Thallium Toxic Metal Present in Gallery Water of an Abandoned Mine Area by Algae *Cladophora
fracta*
Murat TOPAL, E. Işıl ARSLAN TOPAL, Erdal ÖBEK

2546

Araştırma Makalesi / Research Article

Comparison of Ca-Based Commercial and Natural Catalysts Performance on Olive Pomace Pyrolysis Process
Gamze GÖKTEPELİ, Esra YEL

2555

Araştırma Makalesi / Research Article

Daily Average Discharge Prediction of Stream Gages with ANFIS Method: A Case for Kızılırmak River
Akım Gözlem İstasyonlarında ANFİS Yöntemi ile Günlük Ortalama Debi Tahmini: Kızılırmak Örneği
Hilal Nur DEMİR, Mehmet Seren KORKMAZ, Sema ARIMAN

2565

Elektrik Elektronik Mühendisliği / Electrical Electronic Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Adaptive Radar Detection of Extended Targets in Diffuse Multipath Environments
Çoklu Yansıma Ortamlarında Geniş Menzilli Hedeflerin Uyarlanabilir Radar Tespiti
Harun Taha HAYVACI

2583

Fizik / Physics

Araştırma Makalesi / Research Article

Discrete Eigenvalues of the Radiative Transfer Equation with Legendre and Chebyshev Polynomials Solutions
Legendre ve Chebyshev Polinomları Çözümü ile Radyasyon Transfer Denkleminin Kesikli Özdeğerleri
Hatice Asel ZİLAYAZ, Halide KÖKLÜ

2594

Araştırma Makalesi / Research Article

Investigation of the Geometric Structure of 4-butoxyphenyl 4'-hexylbenzoate Liquid Crystal Molecule
4-butoxyphenyl 4'-hexylbenzoate Sıvı Kristal Molekülünün Geometrik Yapısının İncelenmesi
Pınar ÖZDEN

2604

Araştırma Makalesi / Research Article

Identification of Free Radicals Formed in Gamma-Irradiated Chlorpropamide and Procainamide Hydrochloride Pharmaceutical Raw Materials by EPR Spectroscopy
Gama ile Işınlanmış Klorpropamid ve Prokainamid Hidroklorür İlaç Hammaddelerinde Oluşan Serbest Radikallerin EPR Spektroskopisi ile Tanımlanması
Kerem SÜTÇÜ, Yunus Emre OSMANOĞLU

2616

Gıda Mühendisliği / Food Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Evaluation of Nutritional Composition, Antioxidant Activities and Anti-cancer Effect of Edible and Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus*
Yenilebilir ve Tıbbi Mantar *Hericium erinaceus*'un Besin Bileşimi, Antioksidan Aktiviteleri ve Anti-kanser Etkisinin Değerlendirilmesi
Özlem ERDAL ALTINTAŞ

2622

Araştırma Makalesi / Research Article

Hexanal Analysis in Corn Oil and Olive Oil
Mısırrözü Yağı ve Zeytinyağında Hekzanal Tayini
Nur ÇELİK, Tahir YÜCEL, İsa CAVIDOĞLU

2634

Araştırma Makalesi / Research Article

Comparison of Fatty Acid Profile and Quality Properties of Commercial Apricot (*Prunus Armeniaca*) Kernel Oils
Pınar GUMUS, Umit Haydar EROL

2646

Araştırma Makalesi / Research Article

Determination of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'s Extracts Antioxidant Activity, Effect on Metabolic Enzymes, and Chemical Characterization by UPLC-MS/MS Analysis
Cephalaria tchihatchewii Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi
Leyla Güven

2655

Derleme Makalesi / Review Article

Use of Mulberry Leaves in Edible Film and Coatings
Yenilebilir Film ve Kaplamalarda Dut Yapraklarının Kullanımı
Murad GULİYEV, Yasemin ÇELEBİ

2673

Derleme Makalesi / Review Article

Probiotic Yeasts in Olives and Olive Oil, Their Benefits and Mechanisms of Action
Zeytin ve Zeytinyağında Bulunan Mayalar, Faydaları, Probiyotik Aktiviteleri ve Etki Mekanizmaları
Pınar KESKİN, Eda KILIÇ KANAK, Suzan ÖZTÜRK YILMAZ

2683

İnşaat Mühendisliği / Civil Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Effect of Ground-Baked Clay and Marble Wastes on Strength Development of Cementitious Mortars
Öğütülmüş Pişmiş Kil ve Mermer Atıklarının Çimentolu Harçlarda Dayanım Gelişimine Etkisi
Ahmet Ferdi ŞENOL, Cenk KARAKURT

2692

Araştırma Makalesi / Research Article

Investigation of Sulphate Resistance of Concretes Containing Silica Fume Exposed to Sodium Sulphate at Different Concentrations
Farklı Konsantrasyonlarda Sodyum Sülfata Maruz Kalan Silis Dumanı İçerikli Betonların Sülfat Direncinin İncelenmesi
Emrah AKSAKAL, Zinnur ÇELİK, Ahmet Ferhat BİNGÖL

2706

Araştırma Makalesi / Research Article

Explanation of the Problems in Reinforced Concrete Buildings Observed in the February 6th, 2023 Earthquakes with a Hierarchical Triangle
6 Şubat 2023 Depremlerinde Gözlenen Betonarme Binalardaki Sorunların Hiyerarşik Bir Üçgen ile Açıklanması
Halit Cenan MERTOL

2717

Araştırma Makalesi / Research Article

Investigation of the Effects of Foundation Geometry and Dimensions on Bearing Capacity in Soils Reinforced with Geocells
Geohücre ile Donatılan Zeminlerde Temel Geometrisi ve Boyutlarının Taşıma Gücü Üzerine Etkilerinin Araştırılması
Gökçe Gizem PORTAKAL, Ömer YEŞİLTEPE, Murat ÖRNEK

2730

Kimya / Chemistry

Araştırma Makalesi / Research Article

Amino Acids Profile of *Loranthus europaeus* from Different Countries
Farklı Ülkelerdeki *Loranthus europaeus*'un Amino Asit Profili
Haval Mohammed ALİ, Fikret KARATAS, Dursun ÖZER, Sinan SAYDAM

2743

Araştırma Makalesi / Research Article

Kinetic Investigation of The Effect of Sulfur on Extending The Shelf Life of Sulfurized Apricots
Kükürtlenmiş Kayısıların Raf Ömrünün Uzatılmasında Kükürdün Etkisinin Kinetik Olarak İncelenmesi
Duygu GÜRBÜZ, Yunus ÖNAL, Tuğba UTKU

2751

Araştırma Makalesi / Research Article

Development of Galactose Biosensor Based on Ruthenium Mediator Complex
Rutenyum Mediyatör Kompleksi Temelli Galaktoz Biyosensörü Geliştirilmesi
Erhan CANBAY, Sevval KUNDAKÇI, Ezginur YILDIZ, Zeynep ÇELİK CANBAY, Serçin DOĞAN, Erol AKYILMAZ

2769

Araştırma Makalesi / Research Article

Determination of Antioxidant Activity of The Leaves of Hawthorn (*Crataegus Monogyna*)
Emrah DİKİCİ, Ekrem KÖKSAL

2780

Araştırma Makalesi / Research Article

Removal of Food Dyes by Peroxymonosulfate and Hydrogen Peroxide Activation Using Layered Double Hydroxide Catalysts:
Optimization of Reaction Conditions by Box-Behnken Design
Tabakalı Çift Hidroksit Katalizörler Kullanılarak Peroksimonosülfat ve Hidrojen Peroksit Aktivasyonu ile Gıda Boyalarının Giderimi: Box-Behnken Tasarımı ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu
Burcu PALAS, Gülin ERSÖZ, Süheyda ATALAY

2790

Araştırma Makalesi / Research Article

Phytochemical Analysis and Antioxidant, Anticholinesterase and Antiatherogenic Activity of Hairy Tea (*Stachys lavandulifolia*)
Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik Aktivitesi
Abdussamat GÜZEL

2809

Araştırma Makalesi / Research Article

Investigating *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different Sorbus Species in Artvin Province of Türkiye
Yasemin CAMADAN, Hayal AKYILDIRIM BEĞEN, Şule CEYLAN, Ayşegül SARAL SARIYER, Özgür EMİNAĞAOĞLU

2818

Araştırma Makalesi / Research Article

Fabrication of Highly Efficient Fe₃O₄/SSIP/GO Composite Films for Removal of Methylene Blue Dye
Mehmet Salih NAS, Mehmet Harbi CALIMLI, Özkan DEMİRBAŞ

2829

Araştırma Makalesi / Research Article

Screening of Inhibitory Effects Lanosterol on Butyrylcholinesterase, Acetylcholinesterase and Carbonic Anhydrase Enzymes
Eda Mehtap OZDEN

2838

Araştırma Makalesi / Research Article

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum
Resul ADANAŞ, Vedat TÜRKÖĞLU, Zehra BAŞ

2847

Araştırma Makalesi / Research Article

Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits
Bazı Hurma Çeşitlerinde Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Belirlenmesi, Geri Kazanımı ve Antioksidan özelliklerinin Araştırılması
Güldeniz Yazıcı, Mustafa AKIN, Neslihan ŞAKİ

2861

Araştırma Makalesi / Research Article

Enzyme Inhibitory Properties and Antimicrobial Activity of *Geranium tuberosum* Methanol Extract
Geranium tuberosum Metanol Ekstraktının Enzim İnhibitör Özellikleri ve Antimikrobiyal Aktivitesi
Züleyha ALMAZ

2875

Makina Mühendisliği / Mechanical Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

Experimental and Numerical Comparison of the Multistage Submersible Pump Performance
Kademeli Bir Dalgıç Pompa Performansının Deneysel ve Sayısal Olarak Karşılaştırılması
Sercan DOĞAN, Sercan YAĞMUR

2883

Araştırma Makalesi / Research Article

The Effect of Nanofluids on Energy Efficiency in Thermal Systems: The Evaluation of the Experimental Data with Thermal and Hydrodynamic Performance Criteria
Nanoakışkanların Isıl Sistemlerde Enerji Verimliliğine Etkisi: Deneysel Verilerin Isıl ve Hidrokinamik Performans Ölçütleri ile Değerlendirilmesi
Murat ÜNVERDİ, Hasan KÜÇÜK, M. Senan YILMAZ

2892

Araştırma Makalesi / Research Article

Determination of the Optimal Tilt Angles for Solar Energy Applications in Iğdır Province
İğdir İlinde Güneş Enerjisi Uygulamaları için Optimum Panel Eğim Açısının Belirlenmesi
Erdoğan GÜNER

2905

Matematik / Mathematics

Araştırma Makalesi / Research Article

Extension of Pick's Theorem to Spherical Geometry using Girard's Theorem
Halil Rıdvan ÖZ

2915

Araştırma Makalesi / Research Article

Gauss, Mean and Total Curvature Formulae of Rational Bezier Curves in Minkowski 4-Space
Filiz ERTEM KAYA

2926

Araştırma Makalesi / Research Article

Prediction of Biochemical Oxygen Demand in Wastewater Treatment Plants Using Artificial Neural Network and Regression Analysis
Atık Su Arıtma Tesislerinde Biyokimyasal Oksijen İhtiyacının Yapay Sinir Ağı ve Regresyon Analiziyle Tahmin Edilmesi
Furkan SİDAL, Yener ALTUN

2934

Araştırma Makalesi / Research Article

Self-Adjoint Sturm-Liouville Dynamic Problem via Proportional Derivative
Tuba GÜLŞEN, Mehmet ACAR

2945

Araştırma Makalesi / Research Article

Crossed Cat1-Modules
Çaprazlanmış Cat1-Modüller
Tunçar ŞAHAN, Emre KENDİR

2958

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği / Metallurgical and Materials

Araştırma Makalesi / Research Article

Improvement of Hole Qualities and Optimization of Machining Parameters Through Experimental and Finite Element Analysis in Drilling Of AISI D2 Cold Work Steel
AISI D2 Soğuk İş Çeliğinin Delinmesinde Deneysel ve Sonlu Elemanlar Analizi Yoluyla Delik Kalitelerinin İyileştirilmesi ve İşleme Parametrelerinin Optimizasyonu
Harun YAKA, Kaan Emre ENGİN

2973

Moleküler Biyoloji ve Genetik / Molecular Biology and Genetic

Araştırma Makalesi / Research Article

Investigation of Interactions Between Tetracycline Antibiotics and Bromelain Enzyme Using Docking Tools
Tetrasiklin Antibiyotikleri ve Bromelain Enzimi Arasındaki Etkileşimlerin Kenetleme Araçları Kullanılarak İncelenmesi
Gülğün AYLAZ

2986

Araştırma Makalesi / Research Article

In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines
Menderes SUICMEZ, Gamze NAMALIR, Hilal OZDIL

2997

Orman Mühendisliği / Forestry Engineering

Araştırma Makalesi / Research Article

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Türkiye
Gamze SAVACI, Yunus DOĞAN

3007

Tarım Ekonomisi / Agricultural Economy

Araştırma Makalesi / Research Article

Assessment of Economic Aspects of Animal Welfare in Farm
İşletmelerde Hayvan Refahının Ekonomik Yönlerinin Değerlendirilmesi
Selime CANAN

3021

Tarla Bitkileri / Field Crops

Araştırma Makalesi / Research Article

Effect of Different Vermicompost Applications on Some Plant Characteristics in Paddy (*Oryza sativa* L.)
Çeltik (*Oryza sativa* L.)'de Farklı Vermikompost Uygulamalarının Bazı Bitkisel Özellikler Üzerine Etkisi
Gözde Hafize YILDIRIM, Nuri YILMAZ

3030

Araştırma Makalesi / Research Article

Multienvironment Testing of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Grain Yield and Some Important Quality Traits in Thrace Region in Türkiye
Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Dane Verimi ve Bazı Önemli Kalite Özellikleri için Trakya Bölgesinde Bulunan Farklı Çevrelerde Testlenmesi
Halil İbrahim GÖKDERE, Ali Baran YILMAZ, Mehmet TEKİN, Mehmet Zahit YEKEN, Vahdettin ÇİFTÇİ

3040

Araştırma Makalesi / Research Article

Effects Of Different Microbial Fertilizer Doses and Rooting Media on Cuttings Of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Plant
Farklı Mikrobiyal Gübre Dozları ve Köklendirme Ortamlarının Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Çelikleri Üzerine Etkileri
Olca ARABACI, Uğur TAN

3053

Araştırma Makalesi / Research Article

Lignocellulosic Bioethanol Efficiency of Different Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions
Şanlıurfa Ekolojik Koşullarında Farklı Tatlı Sorgum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotiplerinin Lignoselülozik Biyoetanol Verimleri
Ayşegül EFENDİOĞLU ÇELİK, Mine AKSOY, Mahmut DOK, Kadir AYDIN, Celal YÜCEL

3064

Zootekni / Animal Science

Araştırma Makalesi / Research Article

Establishment of Body Condition Scoring Standard in Anatolian Water Buffaloes
Anadolu Mandalarında Vücut Kondisyonu Değerlendirme Standartının Oluşturulması
Onur ŞAHİN, Önder Bayram ÇOBAN, Mehmet İhsan Soysal

3075

Düzeltilme Notu

Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisinde 2013 yılı Cilt:3 – Sayı: 3’de yayınlanan 383789 Id numaralı ve “Çok Ölçütlü Karar Verme Yaklaşımlarından Analitik Hiyerarşi Süreci’nin Hayvancılıkta Kullanımı (Use in Animal Husbandry of Analytical Hierarchy Process from Multi Criteria Decision Approach)” başlıklı makalenin düzenleme aşamasında sehven Dergipark sistemine makalenin eski versiyonu yüklenmiştir. Ancak makalenin düzenleme sonrası kabul edilen son hali TR dizin sistemine yüklü olduğu görülmektedir. Mevcut makale ile ilgili bu durum, yeni fark edildiğinden ötürü TR dizin sayfasında görünen güncel hali dergi sistemimize yeniden yüklenmiştir.

Atf İçin: Dursun, H.B., Kazaz, S. ve Kılıç, T. (2023). Farklı Sıcaklık ve Sürelerde Bekletilen Kasımpatı Polenlerinde Polen Kalitesinin Belirlenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2303-2314.

To Cite: Dursun, H.B., Kazaz, S. & Kılıç, T. (2023). Pollen Quality of Some Spray Chrysanthemum Varieties at Different Holding Time and Temperature. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2303-2314.

Farklı Sıcaklık ve Sürelerde Bekletilen Kasımpatı Polenlerinde Polen Kalitesinin Belirlenmesi

Hilal Beyza DURSUN¹, Soner KAZAZ¹, Tuğba KILIÇ^{2*}

Öne Çıkanlar:

- Polen tanelerinin canlılığını koruma süresi bilinmelidir
- Kasımpatı polenleri için Monnier kültür ortamı uygun bir çimlenme ortamıdır
- Kasımpatı polenleri +4°C’de bekletilerek 4 güne kadar kullanılabilir

Anahtar Kelimeler:

- Krizantem
- Canlı polen oranı
- TTC yöntemi
- Monnier
- Asılı damla

ÖZET:

Polen kalitesi, tohum oluşumu üzerindeki etkilerinden dolayı ıslah programlarında en önemli faktörlerden biridir. Etkili bir ıslah programı için ıslahçılar, polenin canlılığını, çimlenme oranını ve polenlerin canlılığını koruma süresini mutlaka bilmelidir. Bu çalışma, farklı sıcaklık ve sürelerde bekletilen 'Chic' ve 'Barolo' sprey kasımpatı çeşitlerinin polen canlılığı ve çimlenme oranlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Her iki çeşide ait polenler, tam otomasyonlu bir ıslah serasında yetiştirilen bitkilerden elde edilmiştir. Polenler, +24°C’de ve +4°C’de 7 gün boyunca bekletilmiştir. 0. gün dahil olmak üzere 8 gün boyunca günlük olarak TTC yöntemi ile polen canlılıkları, modifiye ME_{3-m} ortamı ile asılı damla yönteminde ise çimlenme oranları belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, 'Chic' çeşidinin 'Barolo' çeşidinden daha fazla canlı polene sahip olduğu saptanmıştır. Canlı polen ve çimlenme oranları, bekletme sürelerinin artmasıyla sürekli olarak azalma eğilimi göstermiştir. 7. günde çimlenme oranı 'Barolo' ve 'Chic' çeşitlerinde sırasıyla %93.44 ve %71.64 oranında azalmıştır. Ancak +4°C’de tutulan polenin canlılığını koruma kapasitesi her iki çeşitte de daha iyi bulunmuştur. Çalışmada, polenlerin öncelikle taze olarak uygulanması, gerektiğinde +4°C’de saklanarak kullanılması, +24°C’de bekletilen polenlerin ise 2 güne kadar kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. +4°C’de bu süre çeşide göre 4 güne kadar uzayabilir.

Pollen Quality of Some Spray Chrysanthemum Varieties at Different Holding Time and Temperature

Highlights:

- The period of preservation of the viability of pollen should be known
- Monnier culture medium is a suitable germination medium for chrysanthemum pollen
- Chrysanthemum pollen can be used for up to 4 days by keeping it at +4°C

Keywords:

- Mums
- Viable pollen rate
- TTC methods
- Monnier
- Hanging drop

ABSTRACT:

Pollen quality is one of the most important factors in breeding programs because of its effects on seed formation. For an effective breeding program, breeders must know pollen viability, germination rate, and the duration of maintaining pollen viability. This study was carried out to determine pollen viability and germination rates of 'Chic' and 'Barolo' spray chrysanthemum varieties kept at different temperatures and times. Pollen from both varieties was obtained from plants grown in a fully automated greenhouse. Pollens were stored at +24°C and +4°C for 7 days. Pollen viability was determined by the TTC method and germination rates were determined by the hanging drop method with modified ME_{3-m} medium, daily for 8 days, including day 0. The 'Chic' varieties had more viable pollen than the 'Barolo' variety. Viable pollen and germination rates tended to decrease continuously with time. On the 7th day, the germination rate decreased by 93.44% and 71.64% in the 'Barolo' and 'Chic' varieties, respectively. However, the capacity to maintain the viability of pollen kept at +4°C was found to be better in both varieties. In the study, it was concluded that the pollen should be applied freshly but stored at +4°C when necessary. The pollen kept at +24°C can be used for up to 2 days. This period can be extended up to 4 days at +4°C, depending on the variety.

¹Hilal Beyza DURSUN ([Orcid ID: 0000-0002-7869-655X](https://orcid.org/0000-0002-7869-655X)), Soner KAZAZ ([Orcid ID: 0000-0002-6644-9690](https://orcid.org/0000-0002-6644-9690)), Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Ankara, Türkiye

²Tuğba KILIÇ ([Orcid ID: 0000-0002-0528-7552](https://orcid.org/0000-0002-0528-7552)), Yozgat Bozok University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Yozgat, Türkiye

*Corresponding Author: Tuğba KILIÇ, e-mail: tugba.kilic@yobu.edu.tr

This study was produced from Hilal Beyza DURSUN's Master's thesis.

INTRODUCTION

Chrysanthemum (*Chrysanthemum* spp.) is known as one of the most important plant species used both as a pot and garden plant as well as a cut flower. It is the second-most traded species of cut flower in the world after the rose, and millions of cut flowers are produced every year. In the year 2020, a total of 399 million, in the year 2021, 392 million, and in the year 2022, 369 million units of chrysanthemums were sold (AIPH, 2021, Royal FloraHolland, 2023). At the same time, chrysanthemum varieties with flowers of different shapes, types, and colors are developed every year to meet consumer demands and expectations. Many countries maintain their position in the market with the new varieties they have introduced to the sector. It is known that more than 30.000 varieties have been developed in chrysanthemums to date (Wang et al., 2019).

Crossbreeding and mutation breeding are the most widely used methods in the development of new chrysanthemum varieties (Ibitoye & Akin-Idowu, 2011). Mutation breeding enables new varieties to be obtained in a short time due to the high heterozygosity of chrysanthemums and this increase in the mutation rate (Miler & Kulus, 2018). However, in mutation breeding, mutations occur suddenly in an unpredictable way and cause only one change, making it very difficult to develop varieties with many desired characteristics. For this reason, crossbreeding is preferred primarily in the development of new chrysanthemum varieties with desired characteristics (Kharkwal et al., 2004). It has been reported that 90% of the varieties developed in chrysanthemums to date have been developed by crossbreeding. The most important advantage of crossbreeding in chrysanthemums is the high success rate in interbreeding due to self-incompatibility. As a matter of fact, the greater the genetic difference among the parents, the greater the success of crossbreeding, and by increasing the genetic variation, it is possible to develop new varieties with desired characteristics (Zhang et al., 2018).

In addition to the advantages of crossbreeding in chrysanthemums, the low number of seeds per capitulum is one of the most frequently encountered problems. Considering that a large number of seeds are set per fruit in breeding programs, successful pollination and fertilization are of great importance for the breeder. Successful pollination and fertilization are possible by first selecting the pollen parent with high pollen quality suitable for the seed parents with high fertility (Nadeem et al., 2013). It is known that knowing the fertility of the pollen parents is one of the most important factors in seed formation, and the breeder must know the pollen viability and germination rate and the duration of maintaining the viability of pollen of the species/varieties that can be used as pollen parents.

The literature stated that pollen should not be kept for a long time in chrysanthemum breeding programs because they lose their viability in a short time, and pollen viability and germination rate differ significantly between species and commercial varieties (Zhao et al., 2005; Zhao et al., 2008; Yang & Endo, 2005; Wang et al., 2018). Various methods (TTC, IKI, FDA, acetocarmine, safranin, lactophenol cotton blue, monnier culture, Brewbaker and Kwack's medium etc. in hanging drop or petri dishes method) have been used to determine pollen viability and germination rate of chrysanthemums, and different results have been obtained from them. While pollen viability and germination rate could not be obtained from some methods, very low pollen viability and germination were obtained from other methods (Jie et al., 1995). Zhao et al. (2006) reported that in some chrysanthemum species and varieties, chemical methods are not suitable for determining pollen viability rates, and the most appropriate method is biological testing. In addition, successful results were not obtained when many germination medias recipes previously reported in the preliminary studies conducted by us were used.

When both web pages and cultivar catalogs of chrysanthemum breeders around the world were examined, no information could be found regarding pollen viability or pollen germination rates of the

varieties they developed. In addition, there is very little research on pollen viability and germination rate in chrysanthemums. The studies found that when pollen viability and germination rates in chrysanthemums were stored for 1 day and 16 days under room temperatures, pollen viability and germination rates decreased rapidly with the prolongation of the storage period, and therefore pollen should not be kept for more than 3 days (Zhao et al., 2008). In the oral interviews with the chrysanthemum breeders in the Netherlands, we were informed that pollen from chrysanthemums should be used in crosses immediately and not kept for any time. As a result, there is no clear information about how many days the pollen can be kept successfully after being taken from the flowers in chrysanthemum breeding by hybridization. Considering that the flowers used as seed and pollen parents in the greenhouse do not bloom at the same time and the need for pollen to make all hybridizations cannot be met on the same day, it makes it necessary to store pollen for a certain period of time for future use.

This study aimed to determine the pollen viability and germination rates of some chrysanthemum varieties and contribute to breeding programs by revealing the capacity of the pollen to maintain its viability.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The study was carried out in the cytology laboratory of Ankara University, Faculty of Agriculture, and Department of Horticulture between September and December 2020. Pollens of commercial spray varieties 'Chic' and 'Barolo', belonging to *Chrysanthemum morifolium* L., were used as plant material. Pollens were obtained from plants grown in soil from cuttings in the greenhouse of the Ankara University Faculty of Agriculture, Department of Horticulture (39°57'40.2''N 32°51'51.7''E). The cuttings were purchased from Royal Van Zanten companies. In May, planting was done in 8 rows at 12.5 x 12.5 cm intervals on the beds prepared in one meter width and 20 m length. 600 ppm IBA was applied before planting. When cuttings became seedlings about 35 cm tall four weeks after planting, the blackout application was started, and then the application was terminated after seven weeks. When the buds reached the size of a pea, the apical buds were removed. The temperature and humidity of the pollen taken from the greenhouse between April and October varied between 20°C and 30°C and 65% and 70%, respectively. The EC of the nutrient solution given to the plants was 1.5-1.7 mS cm⁻¹ at the beginning of the development period of the plants and between 1.7-2.0 mS cm⁻¹ during the flowering period, and the pH of the nutrient solution is 6.5.

Method

Pollen of the 'Chic' and 'Barolo' varieties was collected in glass petri dishes with the help of a sable brush when the pollen matured on the anthers during the period when tubular flowers opened 4-5 rows from outside to inside. Pollen viability and germination rates were determined immediately in some of the pollen (control, day 0, fresh pollen), and the remaining pollen was divided into two parts, half of which were kept in a climate cabinet at +24°C with 60±5% humidity and dark conditions, and the other half were kept in a refrigerator at +4°C for different periods of time. In both the climate cabinet and the refrigerator, the pollen was placed in glass petri dishes, covered with lids, and wrapped with aluminum foil.

The pollen was kept at both +24°C and +4°C for 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days, and the viability and germination rates were determined for each day of holding time. The viability and germination rates of the pollen kept at +24°C were determined immediately after the pollen was removed from the climate cabinet. While the viability and germination rates of the pollen kept in the refrigerator at +4°C were

determined after they were removed from the refrigerator and kept in the climate cabinet for one night (12 hours) at +24°C and 60±5% humidity conditions.

In the study, the TTC (2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride) staining test was used to determine pollen viability rates. One drop of the prepared TTC solution was placed on the slide, and pollen was sown on each drop with a brush. Then, the sown drops were covered with coverslips and kept in the dark for 2 hours for staining. In pollen counting, pollen grains stained dark red, red, or dark pink were considered "viable", those stained light red, or pink were considered "semi-viable", and those stained yellow or unstained and abnormally shaped pollen were considered "non-viable" (Figure 1). Theoretically, 50% of semi-viable pollen grains were considered viable, and this value was added to the absolute amount of viable pollen (Eti, 1990; Eti, 1991). The rate of viable pollen was expressed as %.

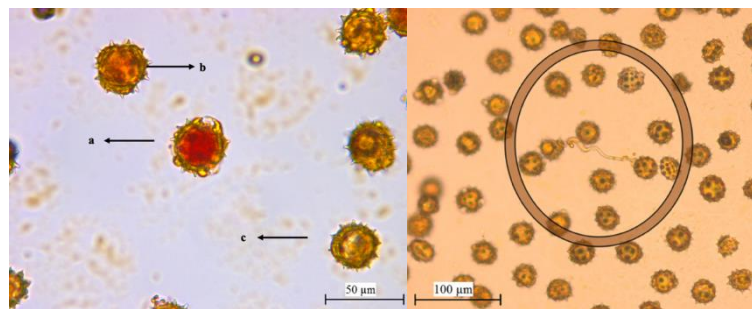


Figure 1. Viable (a), semi-viable (b), and non-viable (c) pollen grains (left); pollen considered germinated (right)

The hanging drop method was used to determine pollen germination rates. Firstly, liquid culture medium was prepared, and modified Monnier culture medium (ME_{3-m}) was used as liquid culture medium (Table 1). The hanging drop preparations were placed in petri dishes containing moist filter paper and kept in a climate cabinet with 60±5% humidity at +24°C for 24 hours for germination. Pollen counts were made under a microscope, and pollen forming a grass tube 1.5 times larger than its own diameter was considered "germinated" (Figure 1) (Sun et al., 2010; Chen et al., 2009). Pollen germination rates were expressed as % and calculated as the ratio of the number of germinated pollen grains to the total number of pollen grains.

Table 1. Nutrients and concentrations used in modified ME_{3-m} medium

Macro Element	Amount (mg/L)	Micro Elements	Amount (mg/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA	7.45
KNO ₃	950	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	85	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CaCl ₂ .2H ₂ O	880	FeSO ₄ .7H ₂ O	5.55
NH ₄ NO ₃	412.5	KCl	175
Micro Elements		Vitamins	
MnSO ₄ .H ₂ O	16.80	B1	1.0
ZnSO ₄ .H ₂ O	10.50	B6	1.0
H ₃ BO ₃	50	Others	
KI	0.83	PEG4000 (g/L)*	200
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	-	-

*(Zhao et al., 2005; Zhao et al., 2008)

Experimental design and statistical evaluation

The studies to determine pollen viability and germination rates were established according to a factorial, completely randomized design with three replicates. In pollen viability tests, 8 slides for each variety and a total of 16 areas, 2 on each slide, were counted. In germination rate tests, counting was performed by scanning the whole area on 16 slides. At least 350 pollen counts were made in each count. The data obtained were subjected to an analysis of variance after applying an angle transformation. The difference between the means was evaluated by the 'Duncan Multiple Comparison Test'. The IBM SPSS 20 statistical package program was used for both variance and Duncan test analysis. The mean standard

errors of variables were calculated. Means were given at the tables, and standard errors were given at the figures as error bars.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of the analysis of variance applied to the data obtained, the effects of 'variety', 'holding temperature', and 'holding time' factors on the viable pollen and germination rate were statistically significant. At the same time, the effects of 'variety x holding time' and 'holding temperature x holding time' interactions on viable pollen rate and 'holding temperature x holding time' interactions on pollen germination rate were found to be statistically significant.

Pollen Viability Rate

The effects of different holding times and temperatures on the pollen viability rates of 'Barolo' and 'Chic' are given in Table 2. According to Table 2, the highest viable pollen rate was recorded at 'Chic' on day 0 with 19.24%. The viable pollen rate of 'Barolo' was also higher on day 0 (8.82%) than on other days. Regardless of the holding times and holding temperatures, 'Chic' showed a higher viable pollen rate than 'Barolo'.

For both 'Chic' and 'Barolo', viable pollen rates decreased as the holding times increased, and the lowest viable pollen rates were found on day 7 with 4.35% and 2.43% values, respectively, regardless of the holding temperatures. After day 0, the highest viable pollen rate was recorded on day 1. Considering the holding temperatures, both varieties were kept at +4°C for both day 1 ('Chic': 14.39%; 'Barolo': 8.27%) and day 7 ('Chic': 10.14%; 'Barolo': 6.22%), and the viability rates obtained from pollen kept at +4°C were higher than those obtained from pollen kept at +24°C for both day 1 ('Chic': 14.39%; 'Barolo': 8.27%) and day 7 ('Chic': 3.33%; 'Barolo': 1.85%) (Figure 2).

In addition to the viability rates of the pollen, the potential to maintain their viability also differed between varieties and holding temperatures. On the 7th day, regardless of the holding temperatures, the rate of viable pollen decreased by 72.45% and 77.39% in 'Barolo' and 'Chic', respectively, compared to the fresh pollen. As of the 5th day, the loss of viability rate in 'Barolo' was over 50%, while the same rate of decrease was realized in 'Chic' as of the 3rd day. In the 'Barolo', the loss of viability in pollen kept at +4°C reached above 50% on the 7th day, while the loss of viability in pollen kept at +24°C reached above 50% on the 5th day. In the 'Chic', the loss of viability was faster than in the 'Barolo', and the loss of viability in pollen kept at +4°C reached above 50% on the 4th day, and the loss of viability in pollen kept at +24°C reached above 50% on the 2nd day.

Table 2. Viable pollen rates of chrysanthemum varieties kept at different temperatures and times

Variety	Holding Temperature (°C)	Holding Time (Days)	Viable Pollen Rate (%)
Barolo	+4	0	8.82 a
		1	8.27 ab A
		2	8.31 ab A
		3	7.62 b A
		4	7.26 b A
		5	5.31 c A
		6	4.82 c A
		7	3.01 d A
	Average		6.68 a B
	+24	0 (Control)	8.82 a
		1	6.22 b B
		2	6.28 b B
		3	5.31 c B
		4	4.89 c B
		5	3.73 d B
6		2.67 e B	
7		1.85 f B	
Average		4.97 b B	

Pollen Quality of Some Spray Chrysanthemum Varieties at Different Holding Time and Temperature

Table 2. Viable pollen rates of chrysanthemum varieties kept at different temperatures and times (Continued)

		0 (Control)	19.24 a
Chic	+4	1	14.39 b A
		2	11.69 cd A
		3	10.19 cd A
		4	8.82 de A
		5	9.30 de A
		6	7.39 ef A
		7	5.37 f A
		Average	10.80 a A
	+24	0 (Control)	19.24 a
		1	10.54 b B
		2	8.11 c B
		3	7.74 c B
		4	6.53 cd B
		5	5.57 de B
6		4.16 ef B	
7		3.33 f B	
Average	8.15 b A		

*p is statistically significant at the probability level of ≤0.05. Lowercase letters represent the difference between days in the same variety, in the same column, at the same holding temperature. Capital letters, the difference between holding temperatures of the same variety and on the same days, in the same column. Bold lowercase letters indicate the difference between holding temperatures within the same variety, at the same holding time. Bold capital letters indicate the difference between the average holding temperatures of the varieties

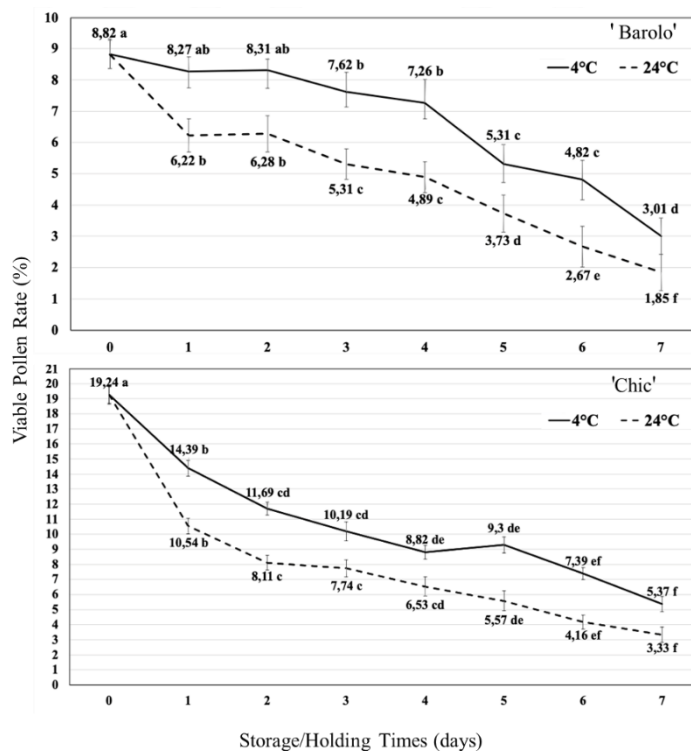


Figure 2. Viable pollen rates of chrysanthemum varieties at different holding times and temperatures (error bars show standard errors)

Pollen Germination Rate

The effects of different holding times and temperatures on the pollen germination rates of 'Barolo' and 'Chic' are given in Figure 3 and Table 3. The highest pollen germination rate was determined on day 0 in 'Chic' with 7.58% and 'Barolo' with 5.18% (Figure 3). Similar to the viable pollen rates, 'Chic' showed a higher pollen germination rate than 'Barolo', regardless of holding times and temperatures (Table 3).

For both varieties, germination rates tended to decrease continuously as holding times increased. The highest germination rate was obtained on day 1 after day 0. The lowest pollen germination rate was 2.58% for the 'Chic' and 0.53% for the 'Barolo' on day 7, regardless of the holding temperatures (Figure 3). When temperatures were analyzed regardless of cultivars, the germination rate of pollen kept at +4°C

Pollen Quality of Some Spray Chrysanthemum Varieties at Different Holding Time and Temperature

on day 1 (5.17%) was higher than that of pollen kept at +24°C for 1 day (4.81%). Except for the 3rd and 7th days, the germination rates obtained from pollen kept at +4°C were higher than those obtained from pollen kept at +24°C (Figure 3, Table 3). Within the varieties, there was no difference between the holding temperatures up to day 3 for the 'Barolo' and up to day 2 for the 'Chic'.

Table 3. Pollen germination rates of chrysanthemum varieties kept at different temperatures and times

Variety	Holding Temperature (°C)	Holding Time (Days)	Viable Pollen Rate (%)
Barolo	+4	0	5.18 a
		1	3.74 b A
		2	2.58 c A
		3	1.46 de A
		4	1.65 d A
		5	1.50 de A
		6	1.04 de A
		7	0.72 e A
	Average	2.23 a B	
	+24	0 (Control)	5.18 a
		1	3.37 b A
		2	2.10 c A
		3	1.38 d A
		4	0.99 de B
5		0.67 e B	
6		0.51 e B	
7		0.34 e B	
Average	1.82 b B		
Chic	+4	0 (Control)	7.58 a
		1	6.61 b A
		2	6.16 b A
		3	5.22 c A
		4	5.05 c A
		5	4.27 d A
		6	3.70 d A
		7	3.01 e A
	Average	5.20 a A	
	+24	0 (Control)	7.58 a
		1	6.24 b A
		2	5.80 b A
		3	4.62 c B
		4	4.29 c B
5		2.85 d B	
6		2.77 d B	
7		2.15 e B	
Average	4.54 b A		

*p is statistically significant at the probability level of ≤ 0.05 . Lowercase letters represent the difference between days in the same variety, in the same column, at the same holding temperature. Capital letters, the difference between holding temperatures of the same variety and on the same days, in the same column. Bold lowercase letters indicate the difference between holding temperatures within the same variety, at the same holding time. Bold capital letters indicate the difference between the average holding temperatures of the varieties

When the potential of the pollen to maintain their viability was evaluated in terms of germination rates, pollen germination rates of 'Barolo' and 'Chic' on day 7 showed a decrease of 89.77% and 65.96%, respectively, compared to fresh pollen, regardless of the holding temperatures. As of day 2, the loss of germination rate in 'Barolo' was over 50% for both holding temperatures. In the 'Chic', the same percentage decrease was realized on day 6 (51.19%) for pollen kept at +4°C and on day 5 (62.40%) for pollen kept at +24°C. In 'Chic', the loss of viability was slower than in 'Barolo' in terms of pollen germination rate, contrary to the findings obtained in the viable pollen test.

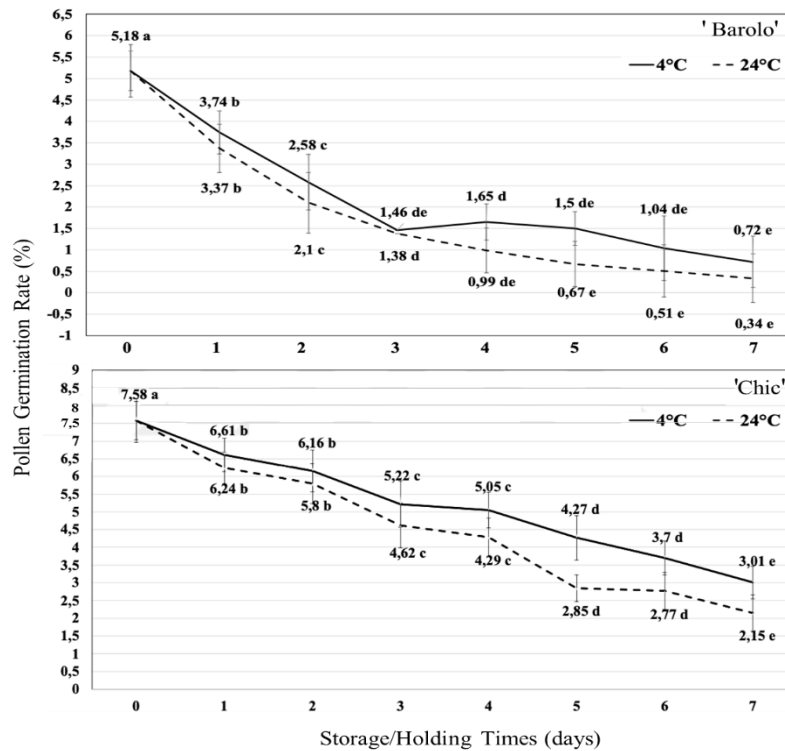


Figure 3. Pollen germination rates of chrysanthemum varieties at different holding times and temperatures (error bars show standard errors)

When the research on the determination of pollen viability in chrysanthemum species and varieties was examined, very few studies were found in which staining methods were used. Biological methods were generally used to determine the rate of viable pollen. However, Yang & Endo (2005) reported that viable pollen rates ranged between 83.50% and 96.30% in some chrysanthemum species and cultivars by the acetocarmine method. Kattera et al. (2013) reported that viable pollen rates of six different chrysanthemum genotypes varied between 70.0% and 87.0% in a 5% TTC solution. Zhao et al. (2006) reported that TTC, modified TTC, IKI, and FDA methods were not suitable for determining pollen viability rates in chrysanthemums. The viability rates obtained in this study differed from the studies mentioned above, and lower viable pollen rates (8.82%-19.24%) were obtained than the viability rates reported by Yando & Endo (2005) and Kattera et al. (2013). The variation in pollen viability rates among the studies may be due to the differences between the methods used and the species and cultivars. However, contrary to Zhao et al. (2006), the TTC test is considered a suitable method for determining viable pollen rates in chrysanthemums since it gives results close to germination rates. The suitability of the methods may vary depending on the differences in species and varieties' responses to the solution dose, active ingredient, and method of application. It has been reported by many researchers that the results obtained from viability tests performed on the same species or variety and under the same conditions vary and that the rate of viable pollen varies depending on the species and variety, the dyes used, and the dose of the active substance (Bolat & Güleriyüz, 1994; Kalyoncu et al., 2013; Erbaş et al., 2015).

In the studies carried out to determine pollen viability in chrysanthemum species and varieties, biological tests were generally applied to determine germination rates. Yang & Endo (2005) found the germination rate of pollen in five different wild chrysanthemum species and three different chrysanthemum varieties to be between 69.40% and 76.40%. Zhao et al. (2005) reported that pollen germination rates varied between 46.0% and 54.0% in chrysanthemum species and between 23.0% and 25.0% in chrysanthemum varieties. Zhao et al. (2006) also reported that pollen germination rates varied

between 20.0% and 26.0% in some chrysanthemum species and varieties. Kattera et al. (2013) determined that pollen germination rates in six different chrysanthemum genotypes varied between 0% and 67.0% depending on the holding time. Miler & Wozny (2021) reported that pollen germination rates varied between 5.30% and 6.63% in four different chrysanthemum varieties at different storage temperatures and times. The germination rates obtained in this study are generally similar to the findings of Miler & Wozny (2021) and partially similar to the findings of Kattera et al. (2013). In the other studies mentioned, very low germination rates (5.18%, 7.58%) were obtained. It is thought that the difference between the lower and upper limits of pollen germination rates between the studies may be due to factors such as the species and/or variety used, the temperature, light, and humidity conditions of the greenhouse where the plant material is grown, the cultivation technique, the methods used to determine the germination rates of the pollen, the season and time of pollen collection, and the temperature and duration of pollen storage. As a matter of fact, it has been reported by many researchers that pollen germination rates differ depending on genotype, ploidy levels, climatic conditions, pH, sucrose content, etc. of the germination medium, nutritional status of the plant, pollen collection time (season, flowering period, flower development period), storage conditions, and duration (Günes et al., 2005; Mert & Soylu, 2006; Richer et al., 2007; Zlesak, 2007; Sulusoglu & Cavusoglu, 2014; Martins et al., 2017; Fragallah et al., 2019).

Although there were differences among chrysanthemum varieties in terms of pollen viability and germination rates, the viable pollen and pollen germination rates obtained as a result of chemical and biological methods in the same variety also differed from each other. The rate of viable pollen obtained by the TTC method was higher than the germination rates obtained by the hanging drop method. Parfitt & Ganeshan (1989) determined that chemical methods were not similar to biological methods. Considering that both methods reveal pollen viability, a linear relationship between viable pollen and germination rate is expected (Martins et al., 2017). However, since immature pollen can also be stained by chemical methods, higher viable pollen rates can be obtained when compared to the results obtained by biological methods (Sensoy et al., 2003).

In the study, the highest viability and germination rates were obtained from fresh pollen of both 'Barolo' and 'Chic'. In both cultivars, the viability and germination rates of pollen kept at both +4°C and +24°C decreased significantly with increasing holding time. At the same time, it was determined that the ability to maintain their viability differed between the varieties. Many researchers (Zhao et al., 2008; Xu et al., 2012; Miler & Wozny, 2021) also reported that viable pollen rate and germination rate decreased with the prolongation of storage and/or holding time in chrysanthemum species and varieties. It is thought that the fact that pollen loses its viability over time or its ability to maintain its viability is related to its resistance to dehydration. In addition, it is thought that there is variation in the holding times due to the difference in dehydration resistance between species and varieties. Pacini & Dolferus (2019) reported that the resistance of pollen to dehydration may vary depending on plant species and varieties.

The viable pollen and pollen germination rates kept at +24°C in 'Barolo' and 'Chic' were lower than pollen kept at +4°C. Similarly, Miler & Wozny (2021) reported that pollen germination rates decreased with increasing storage temperature in chrysanthemum varieties; Güclü et al. (2021) in different blackberry varieties; Perveen & Sarwar (2011) in *Jasminum sambuc* L. and *Nycanthes arbortristis* L. species; Giovannini et al. (2015); and Macovei et al. (2016) in rose varieties. Similar to the results obtained in our study, Erbaş et al. (2015) reported that the viability rate of pollen kept at +4°C was higher than that of pollen kept at +25°C in oil rose (*R. damascena* Mill.). Temperature is one of the most important factors affecting pollen quality (Paupie`re et al., 2017), and the variation between viable pollen

and pollen germination rates at different temperatures may be related to changes in the metabolic activities of pollen. Pollen kept at +24°C may have strong respiratory and metabolic activity. Pollen kept at +4°C may maintain pollen viability because it has lower respiratory and metabolic activities. Indeed, Almeida et al. (2011) reported that high temperatures accelerate metabolic activity, respiration, and dehydration in pollen.

CONCLUSION

In this study carried out to determine the viability and germination rates of chrysanthemum pollen and to investigate the effects of different holding times and temperatures on viability and germination rates, the viability and germination rates of chrysanthemum pollen were quite low. The TTC method and ME_{3-m} medium were found to be applicable tests for chrysanthemum pollen. The highest pollen viability and germination rates for both varieties were obtained from fresh pollen. Therefore, the pollen of parents should be used immediately after collection without waiting for the breeding of chrysanthemums by hybridization. However, considering the fact that the flowers used as parents in the breeding greenhouse do not bloom at the same time and that the pollen requirement for all crosses cannot be met on the same day, it becomes a necessity to keep the pollen for a certain period of time for future use. Therefore, the results obtained show that pollen should be kept at +4°C and used when necessary (within a short time). The chrysanthemum pollen kept at +24°C can be used for up to 2 days, while at +4°C this period can be extended up to 4 days, depending on the variety. The results obtained from our study would be appropriate to plan repetitively. In addition, comparing the results obtained from pollen holding temperatures and times with the crossing success in greenhouse conditions will allow more precise findings to be obtained.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was produced from the master's thesis entitled 'Determination of Pollen Quality and Germination in Some Spray Chrysanthemum Varieties' completed in the Department of Horticulture of Agriculture Faculty in Ankara University.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

Conceived and planned the experiments: SK. Performed the experiments: SK and HBD. Analyzed the data: TK. Wrote the paper: TK and HBD. Reviewed and edited the paper: SK.

REFERENCES

- Almeida, C., Amaral, A.L., Neto, J.F.B. & Sereno, M.J.C.M. (2011). Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). *Revista Brasileira de Botânica*, 34(4), 493-497.
- AIPH (2021). International statistics flowers and plants 2021. Volume 69, ISSN: 2313-7126, ISBN: 978-1-9164807-9-7, Access address: www.aiph.org/statistical-yearbook (Access date: August 23, 2023).
- Bolat, İ. & Güleriyüz, M. 2010. A study on the determination of pollen viability and germination and their interaction of some apricot cultivars. *Atatürk University Journal of Agricultural Faculty* 25(3), 3344-353.
- Chen, F., Feng-Tong, L., Su-Mei, C., Zhi-Yong, G. & Wei-Min, F. (2009). Meiosis and pollen germinability in small-flowered anemone type chrysanthemum cultivars. *Plant Systematics and Evolution*, 280(3-4), 143-151.

- Erbaş, S., Alagöz, M. & Baydar, H. (2015). A research on flower morphology and pollen viability of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.). *Isparta University of Applied Sciences*, 10(2), 40-50.
- Eti, S. (1990). A practical method for the determination of pollen production. *Journal of Agriculture Faculty of Cukurova University*, 5(4), 49-58.
- Eti, S. (1991). Determination of pollen viability and germination capability of some fruit species and cultivars by different in vitro tests. *Journal of Agriculture Faculty of Cukurova University*, 6(1), 69-80.
- Fragallah, S.A.D.A., Lin, S., Li, N., Ligat, E.J. & Chen, Y. (2019). Effects of sucrose, boric acid, pH, and incubation time on in vitro germination of pollen and tube growth of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.). *MDPI Forests*, 10(2), 1-16.
- Giovannini, A., Macovei, A., Donà, M., Valassi, A., Caser, M., Mansuino, A., Ghione, G., Carbonera, D., Scariot, V. & Balestrazzi, A. (2015). Pollen grain preservation at low temperatures in valuable commercial rose cultivars. VI International Symposium on Rose Research and Cultivation. ISHS Acta Horticulturae 1064, Germany (Hannover) Jan 25. pp: 63-66.
- Güçlü, S.F., Kaçal, E. & Koyuncu, F. (2021). Determination of pollen performance of some blackberry varieties during different incubation temperatures and incubation periods. *ANADOLU Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 31(1), 74-83.
- Güneş, M., Çekiç, Ç. & Edizer, Y. (2005). Determination of pollen quantity, pollen viability and pollen germination in some dogrose species (*Rosa caninae*). I International Rose Hip Conference ISHS Acta Horticulturae 690, Turkey (Gümüşhane), Sept 30. pp: 211-216.
- Ibitoye, D. & Akin-Idowu, P. (2011). Marker-assisted-selection (MAS): a fast track to increase genetic gain in horticultural crop breeding. *African Journal of Biotechnology*, (10), 11333-11339.
- Jie, Y., Ziran, S., Mingfang, Y., Deying, L. & Yubin, N. (1995). The breeding of early-blossoming cut Chrysanthemum (*Dendranthema morifolium* Tzvc). International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Part 3: Flowers Acta Horticulturae, 404, China (Beijing), July 1. pp: 131-138.
- Kalyoncu, İ.H., Ersoy, N. & Yılmaz, M. (2013). Determination of pollen viability germination and production of selected K-3 cornelian cherry (*Cornus mas* L.) type. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 3(1), 39-45.
- Kattera, S. Panchbhai, D.M., Reddy, M.P. & Reddy, B.R. (2013). Study on crossing ability of annual chrysanthemum genotypes. *International Journal of Applied Biology*, 5(1), 17-22.
- Kharkwal, M.C., Pandey, R.N. & Pawar, S.E. (2004). Mutation breeding for crop improvement. Jain, H.K., Kharkwal, M.C. (ed), in Plant breeding (pp. 601-645). Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Macovei, A., Caser, M., Dona, M., Valassi, A., Giovannini, A., Carbonera, D., Scariot, V. & Balestrazzi A. (2016). Prolonged cold storage affects pollen viability and germination along with hydrogen peroxide and nitric oxide content in *Rosa hybrida*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 6-10.
- Martins, E.S., Davide, L.M.C., Miranda, G.J., Barizon, J.O., Souza Junior, F., Carvalho, R.P. & Gonçalves, M.C. (2017). In vitro pollen viability of maize cultivars at different times of collection. *Ciencial Rural*, 47(2), 1-8.
- Mert, C. & Soylu, A. (2006). Studies on the fertilisation biology of some cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Faculty of Bursa Uludag University*, 2(21), 45-49.
- Miler, N. & Kulus, D. (2018). Microwave treatment can induce chrysanthemum phenotypic and genetic changes. *Scientia Horticulturae*, 227, 223-233.
- Miler, N. & Wozny, A. (2021). Effect of pollen genotype, temperature and period of storage on in vitro germinability and in vivo seed set in chrysanthemum preliminary study. *MDPI Agronomy*, 11(12), 1-10.

- Nadeem, M., Akond, M., Riaz, A., Qasim, M., Younis, A. & Farooq, A. (2013). Pollen morphology and viability relates to seed production in hybrid roses. *Breeding and Seed Sciences*, 68(1), 25-38.
- Pacini, E. & Dolferus, R. (2019). Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1-15.
- Parfitt, D.E. & Ganeshan, S. (1989). Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *HortScience*, 24(2), 354-356.
- Paupie`re, M.J., Van Haperen, P., Rieu, I., Visser, R.G.F., Tikunov, Y.M. & Bovy, A.G. (2017). Screening for pollen tolerance to high temperatures in tomato. *Euphytica*, 213(6), 1-8.
- Perveen, A. & Sarwar, G.R. (2011). Pollen germination capacity of two cultivated species (*Jasminum sambuc* (L.) Ait. and *Nycanthes arbor-tristis* L.) of family *Oleaceae*. *Pakistan Journal of Botany*, 43(4), 2109-2112.
- Richer, C., Poulin, M. & Rioux, J.A. (2007). Factor influencing pollen germination in three Explorer™ roses. *Canadian Journal of Plant Science*, 87, 115-119.
- Royal FloraHolland (2022). Annual reports. Access address: <https://www.royalfloraholland.com/en/about-us/annual-reports> (Access date: August 23, 2023)
- Sulusoglu M. & Cavusoglu, A. (2014). In vitro pollen viability and pollen germination in cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.), *The Scientific World Journal*, 657123, 1-7.
- Sun, C.Q., Chen, F.D., Teng, N.J., Liu, Z.L., Fang, W. & Hou, X.L. (2010). Factors affecting seed set in the crosses between *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura and its wild species. *Euphytica*, 171(2), 181-192.
- Şensoy, S., Ercan, N., Ayar, F. and Temirkaynak, M. (2003). The evaluation of pollen viability and the determine some pollen characteristics in some species of *Cucurbitaceae* family. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 16(1), 1-6.
- Wang, F., Zhong, X., Wang, H., Song, A., Chen, F., Fang, W., Jiang, J. & Teng, N. (2018). Investigation of differences in fertility among progenies from self-pollinated chrysanthemum. *MDPI International Journal of Molecular Sciences*, 19(832), 1-22.
- Xu, L., Liu, C.L., Wang, H.D. & Chen, K.L. (2012). Study on the pollen viability and stigma receptivity of *Chrysanthemum morifolium* 'Fubaiju'. *Zhong Yao Cai* 35(10): 1546-1550.
- Yang, J. & Endo, M. (2005). *In vitro* germination and viability of *Dendranthema* pollen. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4(6), 673-677.
- Zhang, M., Huang, H., Wang, Q. & Dai, S. (2018). Cross breeding new cultivars of early- flowering multiflora chrysanthemum based on mathematical analysis. *HortScience*, 53(4), 421-426.
- Zhao, H., Chen, F. & Fang, W. (2005). Pollen germination *in vitro* of chrysanthemum cultivars with small inflorescences and several species of *Dendranthema*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28(2), 22-27.
- Zhao, H., Chen, F. & Fang, W. (2006). Detection methods of pollen viability of *Dendranthema*. *J Journal of Zhejiang University*, 23(4), 406-409.
- Zhao, H., Chen, F., Wang, Y., Chen, S., Fang, W. & Guo, W. (2008). Study on pollen viability, longevity, and pistil receptivity of self-compatible Chrysanthemum with small inflorescences. XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: International Symposium on Ornamentals, ISHS Acta Horticulturæ 766, Korea (Seoul), March 31, pp: 402-415.
- Zlesak, D.C. (2007). Rose: *Rosa x hybrida*. Anderson, N.O. (ed.), in Flower breeding and genetics (pp. 695-740), Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Atf İçin: Yıldız, B. C., Demir, E. F. ve Hanci, F. (2023). Tatlı Patates ve Gölevezin Bazı Biyoaktif Bileşenleri: Bitki Organlarına Dayalı Karşılaştırmalı Bir Çalışma. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2315-2324.

To Cite: Yıldız, B. C., Demir, E. F. & Hanci, F. (2023). Some Bioactive Components Of Sweet Potato and Taro: A Comparative Study Based On Plant Organs. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2315-2324.

Tatlı Patates ve Gölevezin Bazı Biyoaktif Bileşenleri: Bitki Organlarına Dayalı Karşılaştırmalı Bir Çalışma

Berk Can YILDIZ¹, Emir Furkan DEMİR¹, Fatih HANCI^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Alternatif tarım ürünleri
- Fonksiyonel Gıdalar
- Yerel sebze türleri

Anahtar Kelimeler:

- Antioksidan
- Fenolik
- Flavanoid
- Gölevez
- Tatlı patates

ÖZET:

Bu çalışmada, Türkiye'de lokal olarak yetiştirilen tatlı patates ve gölevez bitkilerinin farklı organlarının biyoaktif bileşenlerinin değişkenliğini ve dağılımını değerlendirmek amacıyla yürütülmüştür. Bu iki türün farklı organından (tatlı patatesin yumru ve yaprakları; gölevezin yaprakları, yaprak sapları, ana yumruları ve lateral yumruları) ekstrakte edilen örneklerde değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışmada iki farklı türün ve örnek alınan organlarının toplam suda çözülebilir protein, toplam flavonoid, toplam fenolik, H₂O₂ giderme kapasitesi, toplam karotenoid, FRAP antioksidan kapasitesi, CUPRAC antioksidan kapasitesi ve toplam kuru madde parametreleri ölçülmüştür. İncelenen tüm parametreler için organ ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Genel olarak her iki türün yaprakları toplam kuru madde ve CUPRAC antioksidan kapasitesi dışındaki tüm parametreler için en yüksek içeriğe sahip bulunmuştur. Ayrıca parametrelerin gen havuzundaki varyasyonu açıklamadaki etkinliği temel bileşenler analizi kullanılarak incelenmiştir. H₂O₂ giderme kapasitesi, toplam kuru madde içeriği ve CUPRAC antioksidan kapasitesi dışındaki tüm parametreler varyasyona yüksek katkı yapmıştır. Elde edilen bulgulara göre, bu iki tür ve organları arasında yüksek varyasyon olduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, ileride bu iki tür ile ilgili yapılacak çalışmalara yol gösterici olacaktır.

Some Bioactive Components of Sweet Potato and Taro: A Comparative Study Based On Plant Organs

Highlights:

- Alternative agricultural crops
- Functional foods
- Local vegetable species

Keywords:

- Antioxidant
- Phenolic
- Flavanoid
- Taro
- Sweet Potato

ABSTRACT:

This study was carried out to evaluate the variability and distribution of bioactive components of different organs of sweet potato and taro plants grown locally in Turkey. Samples extracted from different organs of these two species (tubers and leaves of sweet potato; leaves, petioles, main tubers, and lateral tubers of taro) were evaluated. Total water-soluble protein, total flavonoids, total phenolics, H₂O₂ scavenging capacity, carotenoids, FRAP antioxidant capacity, CUPRAC antioxidant capacity, and total dry matter parameters of two different species and their organs were measured. The difference between the organ averages for all parameters examined was statistically significant. In general, leaves of both species had the highest content for all parameters except total dry matter and CUPRAC antioxidant capacity. The effectiveness of the parameters in explaining variation in the gene pool was also examined using principal component analysis. All parameters contributed highly to the variation except H₂O₂ capacity, total dry matter content, and CUPRAC antioxidant capacity. According to the findings, there is a high variation between each species and between the organs. These results will guide future studies on these two species.

¹Berk Can YILDIZ (Orcid ID: 0009-0004-6685-2094), Emir Furkan DEMİR (Orcid ID: 0009-0005-9019-3217), Fatih HANCI (Orcid ID: 0000-0002-2015-0351), Erciyes University, Faculty of Agriculture, Kayseri, Türkiye

*Corresponding Author: Fatih HANCI, e-mail: fatihhanci@erciyes.edu.tr

INTRODUCTION

After grains and legumes, roots and tubers are the third most significant food crop. Cassava (*Manihot esculenta*), potatoes (*Solanum tuberosum*), yams (*Dioscorea alata*), and sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) have the highest production values (Afzal et al, 2021). To meet the Global Sustainable Development Goals (SDGs) 1.0, 2.0, and 7.0, small farmers must invest in root and tuber crops that supply both food and energy at a low environmental cost (such as sweet potatoes) (Rukundo et al., 2020).

The sweet potato (*I. batatas*), a member of the family, originates from Latin America. Although there is no definite information about its entry into Turkey, it is stated that it was first brought by immigrants from Crete in the early 20th century (Çalışkan et al., 2007). Today, varieties with different skin and inner colors are grown in the southern provinces of Turkey with names such as HatayNative, HatayRed, Carrot, Kalem and YellowPotato. Sweet potato is an important source of income for smallholder producers in Turkey. Sweet potato production is generally carried out as a small-scale family business, but it can provide high returns to the producer (Çalışkan et al., 2011). Above-ground leaves and branches of sweet potato are also used in animal nutrition. Sweet potato, which is widely produced in countries such as China, Vietnam, Indonesia, Philippines, Papua New Guinea, Cuba, Uganda, is an important industrial plant in terms of starch and alcohol raw material and has an important place in human nutrition (Geren et al., 2010). The sweet potato, one of the oldest known vegetables to mankind, has been cultivated for over 10000 years and has evolved into many morphological types, creating a wide genetic diversity for many of the desirable agronomic traits (Ugent and Peterson, 1988).

The total tuber production of sweet potato, which is widely grown in 107 countries in the world, is 88867913 tons in 2021. This production took place in an area of 7410026 ha. The highest production was in China with 47621146 tons and Malawi with 7449971 tons.

Sweet potato, an important representative of tropical root crops with high utilization potential, is currently an underutilized resource in developing countries. Sweet potato has a wide range of uses and can be used for both human and animal nutrition. In addition, its starches are reported to be a source of industrial raw materials. (Tian et al., 2005). Sweet potatoes contain a wide range of phytochemicals with antioxidant capacity (flavonoids), antinycalopia / xerophthalmia (carotenoids), hepatoprotective/spasmolytic (scopoletin), and antibacterial (friedelin), among other health benefits extensively documented by others (Albuquerque et al., 2019; Petropoulos et al., 2019). Although the control of these processes is undoubtedly related with synergistic actions owing to the phytochemicals present, carotenoids and polyphenolic compounds have piqued the scientific community's interest due to their quantity and diversity in sweet potato (Escobar-Puentes, 2022).

Taro is a broad-leaved, flowering, tropical/semi-tropical tuberous plant from the *Araceae* family (Kristl et al., 2016). Taro is also known by names such as old cocoyam, eddoe dasheen or kolakas, sunchoke. However, the most widely used name around the world is "taro". It is an annual herbaceous plant with a wide wing on the long petioles that come out vertically. Petioles emerge from the growth buds at the top of the tubers. These tubers are underground. Tubers are cylindrical or spherical in shape. Nodules emerge from the sides to surround the tubers (McCartan et al., 1996). The leaves of the gorge are in the shape of an elephant's ear. Botanically, the tubers are known as "corm" and the tubers "cormel".

Fukushima et al. (1962) and Strauss (1983), taro is a starchy plant class and consists of 5 lineages. It has two main groups according to tuber development. Of these, there is *C. esculenta antiquorum* bears one small main tuber and several tubercles around it. *esculenta* var. *esculenta* produces one large main tuber and several tubers (Agbor-Egbe and Rickard, 1990). The total tuber production of taro, which is widely grown in 46 countries in the world, is 12,396,248 tons in 2021. This production

took place in an area of 1,793,703 ha. Most of the production is in Africa, Asia, and the Pacific Islands. The highest production was in Nigeria with 3,216,116 tons and Ethiopia with 2,106,018 tons (Anonymous, 2023).

In Turkey, it is locally grown and consumed in the coastal areas of Anamur and Bozyazı districts of Mersin province and Alanya and Gazipaşa districts of Antalya province. It is easily grown in wetlands and riverbeds where the temperature does not fall below 0°C, the altitude is low, irrigation facilities are suitable, the ground water is high, saturated with water. The coastal areas of the Mediterranean, Aegean and Marmara regions have suitable conditions for taro cultivation.

Since raw taro tuber contains various substances that irritate the digestive tract, excessive consumption can be harmful to human health (Göhl, 1981). Since the tuber contains calcium oxalate crystals, it gives a bitter and unpleasant taste. Therefore, it is necessary to melt these crystals by cooking. In countries with intensive cultivation, starch-filled tubers, and secondary tubers, developed leaves and bleached petioles are widely consumed in culinary culture (Ochse, 1931; Lind and Barrau, 1946; Plunknett et al., 1970). In these countries, taros' tuber and secondary tubers are peeled and boiled, like potatoes (De Vries et al., 1967).

In Turkey, taro tubers and their secondary tubers are harvested at the beginning of winter and are the favorite food of that period. Traditionally, the addition of sour, such as sumac and lemon, makes the flavor of boiled tubers more appealing. The leaves are also boiled and wrapped (Şen et al., 2001). It is known that vitamin A and C deficiency is seen in countries that meet their carbohydrate needs from cereals in their nutrition system. Since sweet potato storage roots contain high levels of vitamins A and C, it is reported that if it is included in the nutrition system, it will eliminate the deficiency of these vitamins (Kapinga et al., 2009). Other phytochemicals with a range of biological activity, as well as nutritional and antinutritional elements, make up the taro's underlying food consistency qualities Kapoor et al., 2021). According to Padhan and Panda (2020), phytochemicals that have health-improving benefits are referred to as nutritional factors, while those that have the opposite effect are known as antinutritional factors. It is considered important to cultivate sweet potato and taro, which are important sources of income for small farmers, have very low input costs under favorable conditions, and have high nutritional values, as alternative crops in different regions of Turkey.

The hypothesis of this study is that some biochemical contents of sweet potato and taro plants, which are new alternative for small farms, vary between organs. The purpose of this study was to assess the variability and distribution of bioactive components in sweet potato and taro leaf, stalk, and storage root. This data will be utilized to develop consumption strategies for the content and profile of some bioactive compounds found in sweet potato and taro, which will improve its usage as a functional food.

MATERIALS AND METHODS

In the study, sweet potato and taro plants sampled from the Bozyazı/Mersin provinces of Turkey were used as plant material. None of these plants are commercial varieties and have been grown in small sections of farms. Main tubers, secondary tubers, stems, and leaves of taro flowers have been used in the study. For candy potato, tuber and leaf samples were analyzed. The technique of Yuan et al. (2012) was applied for leaf analysis. For leaf analysis, all leaves of the vegetation besides the backside two leaves have been collected before harvesting. These leaves had been dried at room temperature for 10 days and ground into powder in an herb grinder. The samples, which were kept in 60% ethanol two instances for two hours, have been kept at 50°C till the weight loss stopped. Jantaharn et al., (2018) approach used to be used to preparation of tuber, and stalk samples. All the leaves, stalks, and tubers on seven vegetation

have been accumulated at some point of the harvesting period. In the study, analyses were held in a randomized block sketch with 6 replications.

The protocol described by Danilcenko et al. (2017) was used to prepare samples for analysis of tubers. They were cut into 5 mm thick pieces after being totally freed from the dirt. Following a 24-hour period of complete drying at 60°C, the samples were ground into a powder in an herb grinder. Each organ's 3 g of powder sample was homogenized for 2 minutes with 25 ml of pure methanol before being stored at +4°C for 16 hours. For examination, the supernatant from the samples was removed, centrifuged for 20 minutes at 10000 rpm, and then refrigerated at -20°C (Thaipong et al. 2006). The antioxidant capacity was assessed using the ferric reducing antioxidant power technique (FRAP) (Zhang et al., 2013) and the copper (II) ion reducing antioxidant capacity determination (CUPRAC) method (Güçlü et al., 2006). To calculate the total quantity of gallic acid equivalent (GAE) phenolic compounds, Singleton and Rossi's (1965) Folin-Ciocalteu technique was applied. The total quantity of flavonoids as Quercetin equivalent (Q) was calculated using the technique described by Zhishen et al. (1999). The capacity to remove hydrogen peroxide (H₂O₂) has been determined using the method proposed by Ruch et al., in 1989. The quantity of soluble protein was calculated using a technique described by Lowry et al. (1951). The ANOVA test was used to assess the significance of the data's variance. Results across groups were compared using the least significant difference (LSD) test in cases where there were significant differences. To determine the connection between each independent variable, the Pearson correlation test was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The differences between the results obtained for all measured parameters were statistically significant ($p < 0.01$). The findings and statistical groupings obtained in the study are shown in Figures 1 and 2. According to the findings, sweet potato leaves have the highest total carotenoid concentration (1170.667 mg/g), followed by taro leaves (618.406 mg/g). The carotenoid content of sweet potato leaves was 2.87 times higher than that of tubers of the same plant. A similar situation was also found in the taro plant. The carotenoid content of the leaves was 2.02 times higher than the main tuber; 3.93 times higher than the petioles; and 8.07 times higher than the secondary tubers. In terms of H₂O₂ scavenging capacity, the variation between both species and their organs was relatively small. Taro leaves and petioles had the highest results for this parameter and were statistically in the same grouping (53.863% and 53.712%, respectively). The tuber of taro and the leaves of sweet potato had the lowest values compared to the others (50.114% and 47.059% respectively). The leaves of both plants ranked the highest in terms of total phenolic matter content. This value was 45.338 GAE mg/g for sweet potato leaves and 36.291 GAE mg/g for taro leaves. The phenolic content of the main and lateral tuber of taro was found to have the lowest value compared to the other parts examined (12.429 GAE mg/g and 10.841 GAE mg/g). The ranking of the species and organs analyzed according to total flavonoid amounts was the same as for total phenolic matter. However, for this parameter, the variation between different organs of the same species was much wider than for phenolic matter. In fact, the total amount of flavonoids in sweet potato leaves was 6.24 times higher than in tubers (296.619 Q mg/g and 47.571 Q mg/g, respectively). Similarly, the total flavonoid value obtained from the leaves of taro is 8.08 times higher than that of the main tubers and 12.46 times higher than that of the secondary tubers. Plant extracts' antioxidant activity may be assessed using a variety of techniques, but no single standard has been established due to the extracts' complexity. To assess the antioxidant activity in the various parts of the two species, the CUPRAC radical scavenging test and FRAP assay were utilized in the current investigation. As a result of FRAP analysis, the highest value was obtained in the leaves of sweet potato (63.052 mM Trolox / g).

It was followed by the leaf values of taro (60.158 mM Trolox / g). In the CUPRAC results, the reverse order was observed. As a result of this analysis, the tubers of sweet potato and the main tuber of taro had the highest values (0.177 mM Trolox / g and 0.141 mM Trolox / g, respectively). Another prominent result is that the secondary tubers of taro had the lowest value in both antioxidant capacity determination methods. As in the case of total flavonoids and total phenolic substances, the leaves of both species were found to have higher soluble protein content than the other organs. The lowest values of soluble protein were obtained from the main and lateral tubers of taro (12.032 mg/g and 8.582 mg/g, respectively). Except for the stems of taro, the dry matter percentages of all plant organs examined were close to each other. The highest dry matter percentage was obtained from the leaves of sweet potato plant (22.871%).

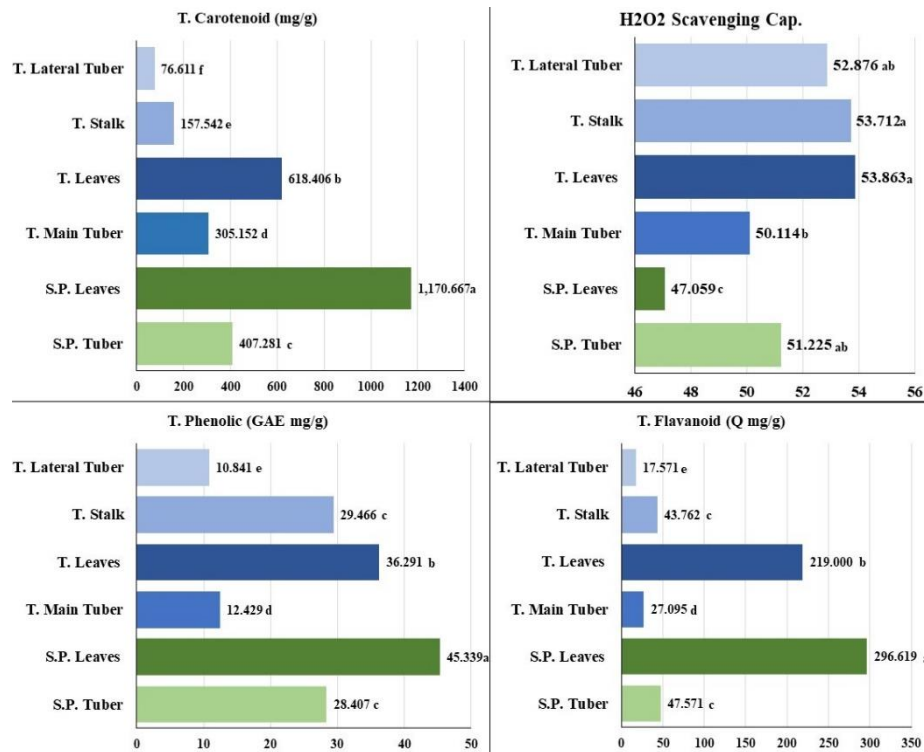


Figure 1. Total carotenoids, total flavonoids, total phenolics, and H₂O₂ scavenging capacity of the samples analyzed. T: Taro, S.P: Sweet potato. The differences between the values indicated with different letters for each parameter are statistically significant ($p < 0.01$)

Following the results obtained were standardized, the effectiveness of the investigated parameters in describing the variation in the gene pool was assessed using principal component analysis. Two of the five main components have been shown to have eigenvalues larger than "1" (Table 1). 81.293% of the total variance was explained by the first two main components. To assess the degree of influence in explaining the variance of each analyzed parameter, parameters with an Eigen value larger than |0.3| were taken into consideration among the first two main components (Table 1). Total phenolic content, H₂O₂ removal capacity, antioxidant capacity determined by FRAP, total flavonoid, dry matter, and soluble protein were found to be the most significant factors in this context's first principal component, which explained 62.361% of the total variation. In this context, in the first principal component (explaining 62.361% of the total variation), total phenolic amount, H₂O₂ removal capacity, antioxidant capacity based on FRAP, total flavonoid, dry matter, soluble protein were found to be the most effective parameters in explaining the variation.

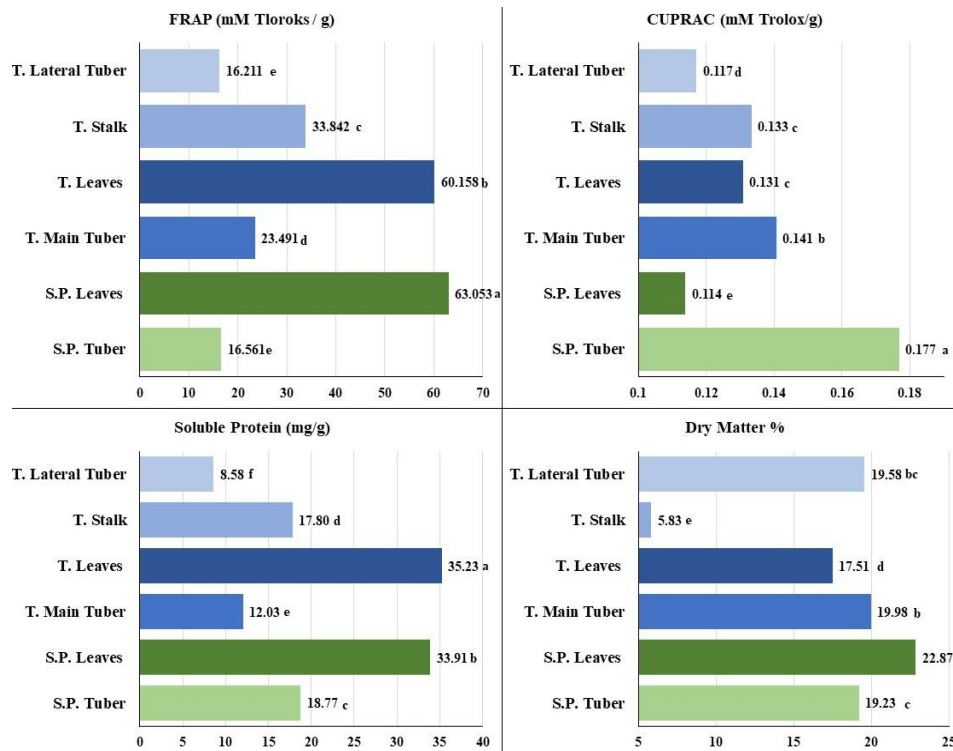


Figure 2. Antioxidant capacity (FRAP and CUPRAC), soluble protein and dry matter amount of the samples analyzed. T: Taro, S.P: Sweet potato. The differences between the values indicated with different letters for each parameter are statistically significant ($p < 0.01$)

When the positioning of the studied plant species and organs in the plane of basic coordinates is evaluated in accordance with the eigenvalues of the first two basic components, it can be observed that the tubers of the sweet potato and taro are situated in locations that are relatively dissimilar from the others. As with other parameters, FRAP, total phenolic content, and soluble protein value are found in more remote regions when the distribution of the measured characters is examined.

Table 1. Eigen values of each trait

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
Eigenvalue	4.989	1.565	0.996	0.393	0.057
Variance (%)	62.361	19.562	12.454	4.916	0.707
T. Carotenoid	0.434*	-0.174	0.098	-0.111	0.009
H ₂ O ₂ Scavenging Cap.	-0.246	0.582*	-0.017	0.650*	0.229
T. Phenolic	0.393	0.239	0.305*	-0.237*	0.655*
T. Flavonoid	0.444*	0.049	-0.054	0.147	0.100
FRAP	0.414*	0.253	-0.136	0.086	-0.618*
CUPRAC	-0.169	-0.100	0.915*	0.109*	-0.255
S. Protein	0.414*	0.223	0.188	0.275	-0.164
Dry Matter	0.167	-0.669*	-0.060	0.627*	0.189

According to Tumwegamire et al.'s (2011) study, sweet potato tubers range in dry matter ratio from 19.4% to 39.3%. According to our research, the average total dry matter ratio of sweet potatoes was 22.871% for the leaves and 19.23% for the tubers. This finding agrees with the research done by Tumwegamire et al. (2011). According to Lebot et al. (2004), the taro tuber's dry matter percentage was 27.09. In research involving 40 taro varieties in India, Angami et al. (2015) reported that the dry matter of the tubers ranged between 17.17% and 27.50%. The dry matter of the taro used in this study was 19.976% for the main tubers and 19.577% for the lateral tubers. There is agreement among others consequently.

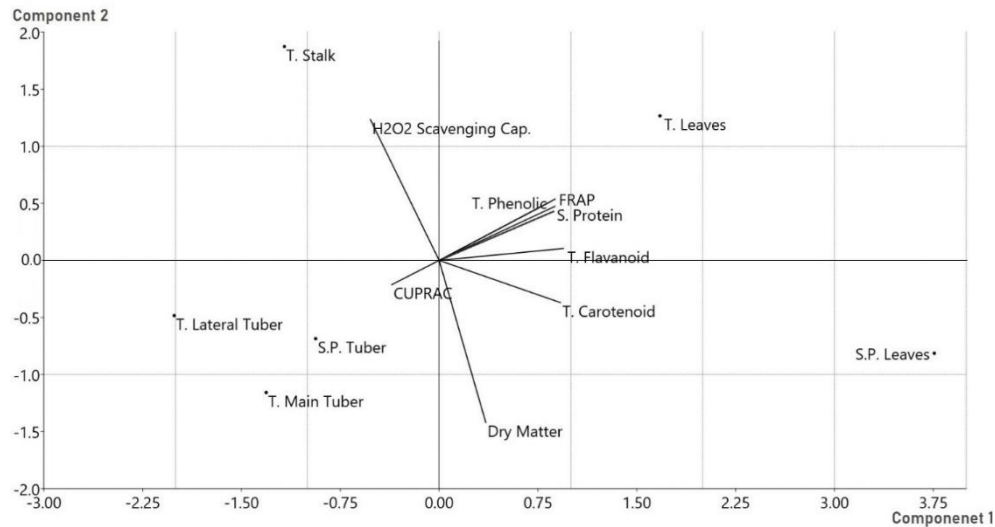


Figure 3. Distribution of the analyzed parameters and the evaluated plant material in principal component coordinates

According to Cartier et al. (2017), the total flavonoid concentration of sweet potato tubers ranges from 5.75 mg/g to 84.4 mg/g. The same study revealed that the total phenolic content ranged from 1,40 to 11.50 mg/g. These results are comparable in terms of total flavonoid substance (47.571 mg/g), even if they are lower than the total phenolic substance values found in our study (28.407 mg/g). In another study examining the total amount of phenolic substances in sweet potato tubers, it was reported that this value varied in a wide range of 30.73 to 492.89 in 10 different genotypes (Sun et al., 2019).

According to Akyüz (2019), the taro tuber extract contains a total phenolic content of 2,4 mg/g and a flavonoid level of 2.05 mg/g. The overall concentration of flavonoids and phenolic matters was found to be much greater in our investigation (12.429 mg/g and 27.095 mg/g, respectively) than in that study.

Seven distinct sweet potato cultivars' carotenoid content was examined by Islam et al. in 2016. In the entire study, the samples' results ranged from 1.02 to 61.95 mg/g (with an average of 18.74 mg/g). This value was determined in our investigation to be 16.561 mg/g.

CONCLUSION

This study provided new information on some biochemical composition in sweet potato and taro plants. In terms of chemical structure, phenolic compounds, and antioxidant capabilities, two species and their organs showed significant variances. Since many factors, including treatment after harvest, location, genetic divergence, season, temperature, and storage, affect biochemical content in plants, more research is required to identify the critical variables that affect the overall and specific biochemical properties of local sweet potato and taro to increase their productivity and nutritional value. The two species used in the study have reached great economic value in some parts of the world but are not yet widely produced in Turkey. However, changing climatic conditions and emerging trends towards different products in the food spectrum indicate that these two species may increase their market value soon. In this study, high variation in terms of biochemical content was found both between the two species and between the organs. These results will guide future studies on these two species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by The Scientific and Technological Research Council of Türkiye-TÜBİTAK (2209-A - Research Project Support Programme for Undergraduate Students Project No. 1919B012214990).

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

Berk Can YILDIZ: laboratory analyzes, Data curation. Emir Furkan DEMİR: Methodology, Formal analysis Fatih HANCI: Methodology, laboratory analyzes, data curation, writing draft, Visualization.

REFERENCES

- Afzal, N., Afionis, S., Stringer, L., Favretto, N., Sakai, M., Sakai, P. (2021). Benefits and trade-offs of smallholder sweet potato cultivation as a pathway toward achieving the sustainable development goals. *Sustainability*, 13, 552.
- Agbor-Egbe, T., Rickard, J.E. (1990). Evaluation of the chemical composition of fresh and stored edible aroids. *J. Sci. Food Agric.* 53:487-495.
- Akyüz, M. (2019). Determination of Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Gölevez [(*Colocasia esculenta* (L.)) Tubers. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22, 388-394.
- Albuquerque, T.M.R., Sampaio, K.B., de Souza, E.L.(2019). Sweet potato roots: Unrevealing an old food as a source of health promoting bioactive compounds—A review. *Trends Food Sci. Technol.* 85, 277–286
- Angami, T., Jha, A. K., Buragohain, J., Deka, B. C., Verma, V. K., and Nath, A. (2015). Evaluation of taro (*Colocasia esculenta* L.) cultivars for growth, yield and quality attributes. *Journal of Horticultural Sciences*, 10(2), 183-189.
- Anonymous (2023). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division, URL: <http://faostat3.fao.org/home/E>, (accessed date: May 02, 2023).
- Cartier, A., Woods, J., Sismour, E., Allen, J., Ford, E., Githinji, L., and Xu, Y. (2017). Physiochemical, nutritional and antioxidant properties of fourteen Virginia-grown sweet potato varieties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 1333-1341.
- Çalışkan, M.E., Can, E., Çalışkan, S., Gazel, M. (2011). The Studies on Establishment of A Seed Production System for sweet potato, Türkiye IV Seed Congress, 14-17 June 2011, Samsun.
- Çalışkan, M.E., Söğüt, T., Boydak, E., Ertürk, E. ve Arıoğlu, H. (2007). Growth, yield and quality of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivars in contrasting environments in Turkey, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31: 213-227.
- Danilcenko, H., Jariene, E., Slepeliene, A., Sawicka, B., Zaldariene, S. (2017). The distribution of bioactive compounds in the tubers of organically grown Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) during the growing period. *Acta Sci Pol. Hortorum Cultus*, 16:97–107.
- De Vries, C.A., Ferwerda, J.D., Flach, M. (1967). Choice of food crops in relation to actual and potential production in the tropics. *Neth. J. Agric. Sci.* 15:241-248.
- Escobar-Puentes, A.A., Palomo, I., Rodríguez, L., Fuentes, E., Villegas-Ochoa, M.A., González-Aguilar, G.A., Olivas-Aguirre, F.J., Wall-Medrano, A. (2022). Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Phenotypes: From Agroindustry to Health Effects. *Foods*, 11, 1058
- Fukushima, E., Iwasa, S., Tokumasu, S., Iwasa, M. (1962). Chromosome numbers of the taro varieties cultivated in Japan. *Chromosome Inf. Serv.* 3:38-39.
- Geren, H., Öztürk, G., Kavut, T.Y., Yıldırım, Z., 2010. An investigation on insolubility possibilities of vines of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes grown under Bornova conditions, *Journal of Agriculture Faculty of Ege University*, 47(2):171-179.

- Göhl, B. (1981). Tropical Feeds. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Series 12, 314, Rome.
- Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S. E., and Apak, R. (2006). Antioxidant capacity of fresh, sun-and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods. International journal of food science & technology, 41, 76-85.
- Gülçin, İ., Taslimi, P., Aygün, A., Sadeghian, N., Bastem, E., Kufrevioglu, O. I., Türkan, F., Şen, F. (2018). Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione S-transferase enzymes. International journal of biological macromolecules, 119, 741-746.
- Islam, S. N., Nusrat, T., Begum, P., and Ahsan, M. (2016). Carotenoids and β -carotene in orange fleshed sweet potato: A possible solution to vitamin A deficiency. Food Chemistry, 199(1), 628-631.
- Jantaharn, P., Mongkolthanaruk, W., Senawong, T., Jogloyd, S., McCloskey, S. (2018). Bioactive compounds from organic extracts of *Helianthus tuberosus* L. flowers. Ind Crops Prod, 119:57–63.
- Kapinga, R., Byaruhanga, P., Zschocke, T., Tumwegamire, S. (2009). Growing orange fleshed sweet potato for a healthy diet. A supplementary learners' resource book for upper primary schools. International Potato Center (CIP), Kampala, Uganda, 142 pp.
- Kapoor, B., Singh, S., and Kumar, P. (2022). Taro (*Colocasia esculenta*): Zero wastage orphan food crop for food and nutritional security. South African Journal of Botany, 145, 157-169.
- Kristl, J., Ivancic, A., Mergedus, A., Sem, V., Kolar, M., and Lebot, V. (2016). Variation of nitrate content among randomly selected taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) genotypes and the distribution of nitrate within a corm. Journal of Food Composition and Analysis, 47, 76-81.
- Lebot, V., Prana, M. S., Kreike, N., Van Heck, H., Pardales, J., Okpul, T., T. Gendua, M. Thongjiem, H. Hue, N. Viet Yap, T. C. (2004). Characterization of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) genetic resources in Southeast Asia and Oceania. Genetic Resources and Crop Evolution, 51, 381-392.
- Lind, H.Y. Barrau, M.L. (1946). Ways to use vegetables in Hawaii. Hawaii Agric. Expt. Sta. Bull. 97, Honolulu, Hawaii.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193:265-275.
- McCartan, S. A. Staden, J. V. and Finnie, J. F. (1996). In Vitro Propagation of Taro. Southern African Society For Horticultural Sciences, 6;1-3.
- Ochse, J.J. (1931). Vegetables of the Dutch East Indies. Dept. Agric., Indus. Comm., Neth. E. Indies, Buitenzorg, Java, Indonesia.
- Padhan B, Panda D. (2020). Potential of Neglected and Underutilized Yams (*Dioscorea* spp.) for Improving Nutritional Security and Health Benefits. Front Pharmacol., 24;11:496.
- Petropoulos, S.A., Sampaio, S.L., Di Gioia, F., Tzortzakis, N., Roupheal, Y., Kyriacou, M.C., Ferreira, I. (2019). Grown to be blue—Antioxidant properties and health effects of colored vegetables. Part I: Root vegetables. Antioxidants 8, 617.
- Plunknet, D.L., De La Pena R.S. and Obrero, F. (1970). Taro (*Colocasia esculenta*). Field Crop, 23, 412-426.
- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis 10:1003-1008.
- Rukundo, P., Shimelis, H., Laing, M., Mashilo, J. (2020). Genotype-by-environment interaction for dual-purpose traits in sweet potato. J. Crop Improv. 34, 800–823.

- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Strauss, M. S. (1983). Anatomy and morphology of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. A Review of *Colocasia esculenta* and Its Potentials. Wang, J. (ed.), 20-23. University of Hawaii Press. Honolulu.
- Sun, Y., Pan, Z., Yang, C., Jia, Z., and Guo, X. (2019). Comparative assessment of phenolic profiles, cellular antioxidant and antiproliferative activities in ten varieties of sweet potato (*Ipomoea Batatas*) storage roots. *Molecules*, 24(24), 4476.
- Şen M, Akgül A, Özcan M (2001). Physical and chemical characteristics of taro (*Colocasia esculenta*(L.) Schoott) corms and processing to chips and puree. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25(6), 427- 432.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 19:669-675.
- Tian Q., Konczak I., Schwartz S.J. (2005). Probing anthocyanin profiles in purple sweet potato cell line (*Ipomoea batatas* L. Cv. Ayamurasaki) by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53:6503–6509.
- Tumwegamire, S., Kapinga, R., Rubaihayo, P. R., LaBonte, D. R., Grüneberg, W. J., Burgos, G., Felde, T. z., Carpio, R., Pawelzik, E., & Mwanga, R. O. (2011). Evaluation of Dry Matter, Protein, Starch, Sucrose, β -carotene, Iron, Zinc, Calcium, and Magnesium in East African Sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] Germplasm, *HortScience horts*, 46(3), 348-357
- Ugent, D. and Peterson, L. (1988). Archeological remains of potato and sweet potato in Peru. CIP (International Potato Centre) Circular, 16: 3.
- Yuan, X., Gao, M., Xiao, H., Tan, C., Du, Y. (2012). Free radical scavenging activities and bioactive substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves. *Food Chem*, 133:10–14.
- Zhang, R., Zeng, Q., Deng, Y., Zhang, M., Wei, Z., Zhang, Y., Tang, X. (2013). Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. *Food Chem*, 136:1169-1176.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64:555-559.

To Cite: Turna, G., Kazaz, S. & Kılıç, T. (2023). The Effect of Pollen Age on Fruit Set, Seed Number and Seed Germination Rate in Cut Rose Breeding. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2325-2338.

Effects of Short Term Pollen Storage on Fruit Set, Seed Number and Seed Germination Rate in Cut Rose Hybridization

Gülşah TURNA¹, Soner KAZAZ¹, Tuğba KILIÇ^{2*}

Highlights:

- Seed set in roses is key to hybridization success
- There is a positive correlation between pollen germination rate and seed set
- Roses' pollen can be used for up to 3 days by keeping it at +4°C

Keywords:

- Hybridization
- Cut flower
- Pollen germination
- Seed set
- IKI

ABSTRACT:

Roses are known for their low pollen quality. It remains unclear how many days of pollen should be used in order not to reduce crossbreeding success. The study was conducted to determine whether short-term pollen storage is effective on the crossing success of roses comparatively in vivo and in vitro. The study was conducted in a greenhouse and a cytology laboratory at Ankara University, Turkey. The 'Avalanche' rose variety was used as the seed parent, and 'Magnum' was the pollen parent. A total of 210 crosses were made. Pollens were used immediately (day 0) and stored at +4°C for 6 days after collection. The pollen viability by IKI and the germination rates by the petri dish method, the fruit and seed set, the fruit and seed weight, and the seed germination rate were recorded. All examined traits showed a decreasing trend as the storage time increases. The pollen germination rates were recorded at 1.63% for stored pollen at six days and 15.27% for fresh pollen. The highest fruit and seed set rates were obtained from crossing with pollen stored for one day. The fruit set decreased below 10% as of the 5th day, and the seed numbers decreased 1.8 times compared to one day of storage. No germination was observed in seeds obtained from crosses with pollen stored for 5 or 6 days. A positive correlation was found between seed number and pollen germination rate. The study concluded that successful crossing could be made with pollen stored at +4°C for up to 3 days.

¹Gülşah TURNA ([Orcid ID: 0000-0002-4297-1070](https://orcid.org/0000-0002-4297-1070)), Soner KAZAZ ([Orcid ID: 0000-0002-6644-9690](https://orcid.org/0000-0002-6644-9690)), Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara, Türkiye

²Tuğba KILIÇ ([Orcid ID: 0000-0002-0528-7552](https://orcid.org/0000-0002-0528-7552)), Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Tuğba KILIÇ, e-mail: tuğba.kilic@yobu.edu.tr

Bu çalışma Gülşah TURNA'nın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

INTRODUCTION

The global cut flower industry shows rapid change every year in line with consumer and market demands. Cut flower breeding companies, which want to maintain their place in the industry, constantly offer different colors, shapes, and types, high yield and quality cultivars to the market (Kılıç, 2020). Until today, more than 37.000 cultivars have been developed and brought to the market by breeding studies in roses, which are one of the most popular cut flower species traded in the world (Anonymous, 2019).

Crossbreeding is the most commonly utilized breeding technique in developing new rose cultivars. However, low seed number per fruit and low seed germination rate are two of the most common challenges in cut rose hybridization, and modern roses are frequently known to have low fertility (Pipino et al., 2011; Bosco et al., 2015). Incompatibility, meiotic abnormalities, heterozygous polyploid parents, and the accumulation of deleterious recessive alleles are the causes of poor fertility (Nadeem et al., 2013). Thus, parental selection is critical for a successful crossbreeding program (Zlesak, 2007). The success rate in pollination and fertilization can be increased by using pollen with high viability and germination rates (Farooq et al. 2016).

The quality of pollen, which indicates its viability and germination rate, varies according to the genotype and is highly affected by climatic conditions. The viable pollen rate at room temperature is initially high on the first day and then gradually decreases in the following days (Giovannini et al., 2017). Visser et al. (1977) reported that the rate of fruit set rate decreased with pollen stored at room temperature for more than three days in some rose species, while some breeders stated they used the rose pollen for up to seven days (Gülbağ et al., 2021). Considering that repeated pollination is typically performed within 1-2 days or up to 5 days immediately after emasculation in rose breeding programs, it is essential to know the effective duration for using pollen parent. In addition, pollen must be preserved to enable controlled pollination between rose species and varieties blooming at different times or among cross combinations where geographical distance is a consideration. For these reasons, pollen holding time and pollen storage are critical factors affecting success in rose breeding. It is believed that rose pollen stored for a short time can be used more effectively and for longer periods than pollen kept at room conditions in terms of fruit and seed set rates. However, it is not known how many days the pollen can be used effectively with short-term storage. This study investigated, using both in-vivo and in-vitro methods, how long pollen stored at +4°C and fresh pollen for six days can be used in crossing studies.

MATERIALS AND METHODS

Cross-pollinations were carried out in the greenhouse at Ankara University in the Ankara province of Turkey (39°57'40.2"N 32°51'51.7"E). The determination of pollen viability and germination rates of the pollen parent was carried out in a cytology laboratory.

Plant Material

The 'Avalanche' and 'Magnum' cultivars belonging to *Rosa x hybrida* L. species were used as plant materials. 'Avalanche' was used as the seed parent (the stigma number is between 70 and 180) in the hybridization and the 'Magnum' was used as the pollen parent. Both of them are tetraploid by $2n=4x=28$ chromosome numbers (Kılıç, 2020). The plants were grown in pots with coco peat as the growing medium. The greenhouse temperature was monitored and maintained between 23°C and 30°C, and the relative humidity was stabilized between 60% and 70% during the vegetation season. A heat-shade curtain with 55% shade was used to protect the plants from excessive light intensity. The drip

irrigation system was used for watering and nutrient supply, and the it was automatically regulated by a fertigation computer. The nutrient solutions' electrical conductivity (EC) given to the plants was 1.5-1.7 mS/cm in April and May, and 1.8-2.0 mS/cm between June and October. The pH of the solutions was kept between 5.5-5.8 during the vegetation period. Both pesticide and biological control were used against diseases and pests. However, no pesticides were applied to the plants between 7 days before and 15 days after crossing.

Methods

Cross-pollination and storage of pollen

Cross-pollination (hybridization) was performed from July 12 to July 18. First, the blooms of 'Avalanche' were emasculated, and the anthers of 'Magnum' were collected when 1/3 of the flowers were opened at 09.00-10.00 am. Then emasculated flowers were covered with a paper bag for one day (Crespel & Mouchotte, 2003; Chimonidou et al., 2007). For one day, the anthers were placed in an incubator at 24°C and 60% humidity to release pollen. Twenty-four hours after anthers were collected, pollen was divided into seven different glass bottles. Six of them were stored at +4°C in the fridge for six days. One of them was used immediately (control). One day after the emasculation of flowers, the fresh pollen (control) was rubbed onto the stigma by a brush and again covered with a paper bag for four days (De Vries & Dubois, 1983; Gudin, 2003). Crosses were continued for six days with pollen taken daily from the fridge, and stored pollen was rubbed onto the stigma of the seed parent emasculated the day before. The stored pollen was taken out of the fridge at one-day intervals and then kept for two hours in a climate cabinet with a temperature of 20-24°C and a relative humidity of 60-65%, and it was used in hybridization studies. The pollen viability and germination rates were recorded simultaneously. The detailed methods for assessing them are given under the section titled 'Evaluation of viable pollen and germinated pollen rate'. Hybridizations were only made in the flowers of the axillary buds. Both the apical buds and the flowers on the weakly growing shoots were not used for crosses.

The fruits were harvested between November 30 and December 2, 2020, when they reached harvest maturity (the fruit color changed from green to orange and red). The fruit set rate (%) was calculated by dividing the total number of hybridizations by the number of harvested fruits. The average fruit weight per hybridization that day was determined by weighing the fruits and expressed as grams (g). The seed number per fruit was recorded by removing seeds from the fruit, and the average seed weight, as expressed in milligrams (mg), was determined by weighing the seeds. The seeds were placed in storage in sealed bags containing moist perlite to determine the germination rate. After being subjected to moist stratification at 3±1°C for four months, the seeds sown in vials containing peat were considered to have germinated when hypocotyls were seen (Roy, 2010).

Evaluation of viable pollen and germinated pollen rate

The iodine potassium iodide (IKI), a chemical pollen viability method, was used to determine viable pollen rate under in vitro conditions, while the petri dish, a biological pollen viability method, was applied to determine germinated pollen rate.

The IKI method was modified according to Eti (1990). Counts were made under the microscope within 5 minutes after the samples was prepared. Pollen grains dyed black and dark brown were considered 'viable', pollen grains dyed orange, red, or light brown were considered 'semi-viable', and pollen grains dyed yellow or colorless were considered 'non-viable'. Theoretically, 50% of the pollen grains counted as semi-viable were accepted as viable.

The petri dish method was modified according to Imrak (2010) and Kılıç (2020). Germination media containing 20% sucrose, 10 ppm boric acid, and 1% agar solution were poured into plastic petri dishes with a thickness of 2 mm. The agar solution in petri dishes was divided into four separate areas, and pollen was sprinkled lightly on each area with the help of the brush. The preparation, which was incubated for 8 hours at 24°C and 60% humidity, was taken from petri dishes and then counted with a microscope. Pollen grains that form a pollen tube longer than their diameter was considered germinated.

Both procedures used the Leica DM1000 version microscope and imaging system with x40 and x100 magnifying objectives for pollen grain count.

Experimental design and statistical evaluation

The hybridization and pollen quality experiments were established in a completely randomized design with three replicates. Ten crosses were made in each replication of the hybridization, and a total of 210 crosses were made during the seven days. Two coverslips were utilized in the pollen viability test, and four distinct areas on each coverslip were counted. In each petri dish, two slices were randomly selected, and pollen grains were counted in four distinct areas for the pollen germination test. On average, 350 pollen grains were counted per area using both techniques. IBM SPSS Statistics version 22.0 was used for the statistical analysis. The angularly converted data were subjected to an analysis of variance. Duncan's test revealed mean differences ($p \leq 0.05$). A correlation matrix was also created to ascertain the connection between the attributes investigated. For the estimation of the effects of storage time on fruit set, seed number per fruit, seed weight, fruit weight, seed germination rate and pollen germination rate, linear regression was performed.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of variance showed that the fruit set rate, seed number per fruit, and seed germination rate differed statistically according to the time of pollen storage. However, the pollen storage times did not have a statistically significant effect on fruit weight and seed weight. Moreover, the pollen quality decreased as the storage time increased, and there was a statistically significant decrease in both in vitro conditions and in vivo conditions ($p \leq 0.05$).

Cross-pollination

The highest fruit set rate was obtained from hybridization with pollen stored for one day at 4°C by 23.33%. There was no statistical difference between the fruit set rates of pollen stored for 1, 2, and 3 days at 4°C and pollen stored for 0 days at 24°C. The lowest fruit set rate was obtained from crossing pollen stored at 4°C for 6, 5, and 4 days, respectively. Similar to the fruit set rate, the highest value of average seed number per fruit was recorded in pollen stored for one day at 4°C (5.01), which was in the same statistical group as the values obtained from crossbreeding with pollen stored at 4°C for 1, 2, and 3 days, as well as fresh pollen. The least number of seeds (1.00) was obtained from 6 days of storage at 4°C, followed by storage at 4°C for 5 and 4 days, respectively (Table 1).

The fruit weights varied between 1.26 g and 1.79 g, and the seed weights were between 120 mg and 260 mg in the combination of 'Avalanche' x 'Magnum'. The variation among the seed weights was statistically insignificant, as was the variation among the fruit weights. While there was no statistical difference in the seed germination rate between fresh pollen and the first four days of short-term storage, a significant difference emerged as of the 5th day, and no germination was observed in the seeds obtained as a result of hybridization with pollen stored for the 5th to 6th day. Seed germination rates in the first five days, including day 0, varied between 19.44% and 27.78% (Table 1).

Effects of Short Term Pollen Storage on Fruit Set, Seed Number and Seed Germination Rate in Cut Rose Hybridization

Between day 0 and day 6, the fruit set decreased by 75%, the average number of seeds per fruit by 75.66%, and the seed germination rate by 100%. On the 4th day, when a statistically significant difference was observed, the fruit set rate decreased by 16.66%, the seed set rate by 25.55%, and the seed germination rate by 25.50%. As of the 5th day, the decrease in fruit set rate, the number of seeds per fruit, and the seed germination rate were almost 50% and above.

Table 1. Crossability indices data obtained from crossing pollen stored at different temperatures and times.

Storage Temperature	Storage Time (Days)	FSR (%)	SNpF (pcs/fruit)	FW (g)	SW (mg)	SGR (%)
24°C	0	13.33 ± 3.85 ac	4.11 ± 0.81 ab	1.26 ± 0.40 ns	220 ± 0.06 ns	26.11 ± 3.89 a
	1	23.33 ± 3.33 a	5.01 ± 0.72 a	1.32 ± 0.29	260 ± 0.06	25.65 ± 3.84 a
	2	18.89 ± 1.11 ab	3.42 ± 0.45 ab	1.39 ± 0.22	210 ± 0.03	27.78 ± 5.55 a
	3	12.22 ± 5.55 ac	3.60 ± 0.46 ab	1.44 ± 0.11	160 ± 0.03	26.11 ± 3.88 a
	4	11.11 ± 4.84 bc	3.06 ± 0.06 b	1.57 ± 0.09	140 ± 0.02	19.44 ± 10.0 a
	5	6.67 ± 1.92 c	2.77 ± 0.36 b	1.62 ± 0.03	210 ± 0.05	0.00 ± 0.00 b
	6	3.33 ± 0.10 c	1.00 ± 0.20 c	1.79 ± 0.03	120 ± 0.02	0.00 ± 0.00 b

The difference between the means shown with the same letters in same column is insignificant at the 0.05 level, ± standard errors, ns: not significant. FSR: fruit set rate, SNpF: seed number per fruit, FW: fresh weight, SW: seed weight, SGR: seed germination rate.

In this study, the fruit set rate, the seed number per fruit, and the seed germination rate varied depending on the storage period of the pollen, and the longer the pollen storage period, the lower the fruit set rate, fewer seeds were obtained, and the germination ability of the seeds was lost. Similar findings were reported by Visser et al. (1977), who observed a decrease in the fruit set rate in roses with pollination made using pollen stored at room temperature for more than 3 days. Veerasha et al. (2018) reported that the seed yield per plant in *Solanum melongena* L. decreased with longer pollen storage times, and they also found a higher seed germination rate for seeds obtained from hybridizations with fresh pollen compared to pollen kept for 1 and 2 days. Pereira et al. (2014) suggested that short-term storage conditions and duration of pollen in *Annona squamosa* plants affect fruit set and fruit quality and that the best storage conditions and durations should be determined for each species and variety. The decrease in fruit and seed set rates observed in this study could be attributed to the decrease in pollen germination rates as the storage time increased, which is consistent with the findings of the other researchers mentioned above.

While fruit weight and seed weight were not affected by the pollen storage period in this study, Santosh & Malabasari (2014) reported that the fruit and seed weight of *Momordica charantia* L. species were affected by the storage period of the pollen, and both decreased as the storage period extended. They attributed this to the decrease in fertilization rate due to a decrease in the viable pollen rate. Pereira et al. (2014) also reported that the longer pollen storage period in *Annona squamosa* plants, the lower the fruit quality, but it was related to the number of fruits obtained. Considering that each pistil of a rose contains an ovary, it is expected to obtain as many seeds as the number of stigmas. Therefore, it can be expected to obtain 100 or more seeds from one fruit in roses. However, in this study, the average number of stigmas was 125, which is therefore less than the expected number of seeds obtained. The reason for this could be that the plant has the necessary nutrient content to feed fewer seeds than expected, which might explain why there was no change in seed and fruit weight.

The fruit set rates of roses vary according to the species and types of roses used (Zlesak, 2007). Generally, the fruit set rate is less than 50% in modern roses (Gudin, 2003). Similarly, in crosses made

between nine different hybrid tea roses, the fruit set rate was between 0% and 43.75% (Nadeem et al., 2013). Fruit set rates can be much higher in combinations where wild and old garden roses are used as parents. For instance, the fruit set rates varied between 0% and 90% in cross combinations made among 36 different modern roses and between modern rose and wild rose species (Abdolmuhammadi et al., 2014), while the fruit set rates ranged from 11.32% to 100% in cross combinations made between old garden roses and modern roses (Kılıç, 2020). In this study, the average fruit set rate was 12.69%. The differences in fruit set rates observed in various studies can be attributed to the complex genetic structures and ploidy levels of the genotypes used as parents (Ueckert, 2014), parental fertility (Nadeem et al., 2015), incompatibility between the cross combinations (MacPhail & Kevan, 2009), the climatic conditions at the study location, nutritional status of the plant, and the pollination method (Farooq et al., 2016). Kılıç (2020) revealed the effects of paternal parents on fruit set rate by reporting that the fruit set rate varied between 29.92% and 56.00% in cross combinations where the same seed parent and different pollen parents were used. It has also been reported that seed formation has effects on fruit set (Gudin, 2003). Successful seed formation combinations, may lead to increased fruit set rates. Indeed, a positive correlation was found between the fruit set rate and the seed number in this study.

The seed numbers per fruit vary between 0 and 50 depending on the genetic structure of the parents and environmental conditions in roses, although they can exceed 100 in some cross combinations (Zlesak, 2007; Gülbağ et al., 2018; Erken et al., 2018). In addition, Gülbağ et al. (2018) reported that the seed number per fruit in garden roses varied between 2.0 and 57.57, while it was found between 2.17 and 59.47 in cut roses by Erken et al. (2018), between 7.29 and 31.5 in modern roses by Doğan et al. (2019), between 7 and 25.67 in cut rose varieties by Kazaz et al. (2020), and between 0 and 14.33 in roses by Khan et al. (2021). In this study, the average seed number per fruit varied between 1 and 5.01, while it ranged between 0 and 35.33 in the other studies. The upper limit values of the findings obtained from this study are considerably lower than the studies mentioned above. The seed number per fruit can be influenced by various factors such as pollination time, pollination method, pollination number, and pollen fertility (Nadeem et al., 2013; Gülbağ et al., 2021). Moreover, factor such as the seed parent fertility, difference in the developmental status of the plants, and the incompatibility in the combinations may also contribute to a lower seed set. Farooq et al. (2016) reported that pre-pollination barriers can prevent fertilization, obstruct pollen tubes from entering styles, and subsequently lead to limited fruit and seed set.

The seed germination rate in rose breeding varies between 10% and 60% according to the combinations (Zlesak, 2007). However, Leus et al. (2018) stated that the seed germination rate could reach 80%. On the other hand, Pipino et al. (2011) reported that the germination rate of the seeds obtained from 11 different hybrid tea roses varied between 15.4% and 37.1%. Abdolmuhammadi et al. (2014) found that the seed germination rate in seeds obtained from hybridizations among hybrid tea roses and between hybrid tea roses and wild rose species ranged from 0% to 93.40%, and Kılıç (2020) determined that the seed germination rate in seeds obtained from hybridization between fragrant rose species and hybrid tea roses varied between 0% and 30.80%. Uran (2022) recorded that the seed germination rate varied between 0% and 47.5% in hybridizations between miniature roses and different commercial cut rose varieties. While seed germination rates in this study ranged from 0% to 27.78%, seed germination rates in the studies mentioned above ranged between 0% and 93.40%. Although the results obtained from this study are generally similar to those obtained from other studies, the upper limit values differ. Seed germination rate varies according to the species and variety,

the method and temperature of seed stratification, and the degree of maturation at the seed development stage (De Vries & Dubois, 1987; Gudin et al., 1990; Anderson & Byrne, 2007). Alp et al. (2009) stated that species and cultivars respond differently to the stratification methods and temperatures applied to eliminate dormancy among cross combinations. Moreover, varying levels of post-pollination barriers may exist depending on the cross combinations. Post-pollination barriers play a role in embryo abortion and/or abnormal growth of endosperm, which can lead to reduced seed germination rates (Tonosaki et al., 2016).

Evaluation of Pollen Quality

The viability rate and germination rate were determined to be 48.33% and 15.27%, respectively, in fresh pollen. The highest viable pollen rate was obtained on the 1st day of storage (50.49%), and the highest germination rate was observed in fresh pollen (15.27%). However, no statistically significant difference was found between pollen stored at 4°C for one day and fresh pollen. A continuous decrease was recorded in pollen viability and germination rates from the 1st to the 6th day of storage. Between one day of storage and six days of storage, a decrease of 34.22% in viability and 89.29% in germination rate was observed. The least viable pollen and germination rate were determined on the 6th day of storage. There was no statistical difference between the viability rates of pollen stored for 3, 4, 5, and 6 days, and the germination rates of pollen stored for 5 to 6 days (Figure 1).

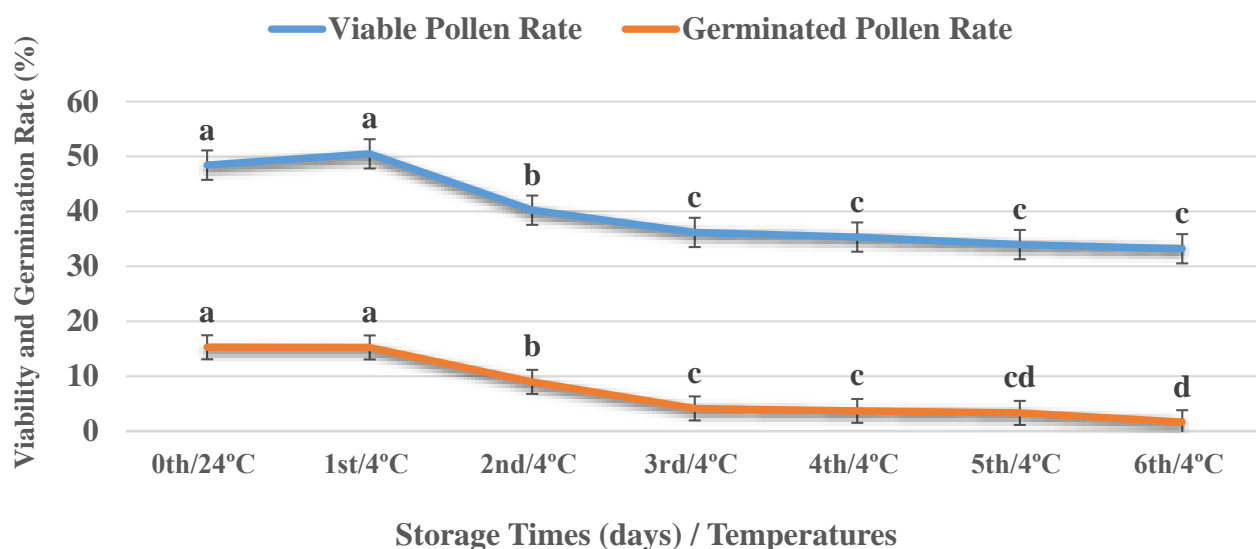


Figure 1. Pollen viability and germination rate of 'Magnum' at different storage temperatures and times (The difference between the means shown with the same letters is insignificant at the 0.05 level; error bars show standard errors.)

The storage conditions and duration of pollen significantly affect pollen quality, making pollen and pollen storage crucial factors in successful rose breeding. Numerous studies have been conducted on rose pollen viability and germination rates at different storage times and conditions. In these studies, the viable pollen rate gradually decreases as the storage period is prolonged, whether at room temperature or in short-term or long-term storage (Seyhan, 2020; Kılıç et al., 2020; Korkut et al., 2022). Kılıç et al. (2020) reported that the viable pollen rate of 'Magnum', which was kept for four days at room temperature, decreased by 30.91% and the germination rate by 68.96% on the 3rd day compared to the 0th day. Similar to their research, this study also observed a loss of viability of over 20% in pollen viability rates and over 50% in pollen germination rates as of the 3rd day. In addition, although the decrease in the viability rate in pollen stored for a short time in this study was similar, the

reduction in the germination rate was found to be higher than the pollen stored at room temperature in their research. This may be related to the period when pollen was collected. While the researchers collected pollen during the second flowering period in June of their study, pollen collection in this study was carried out during the third flowering period in July. Erbaş et al. (2015) reported that pollen quality decreases as the flowering season progresses.

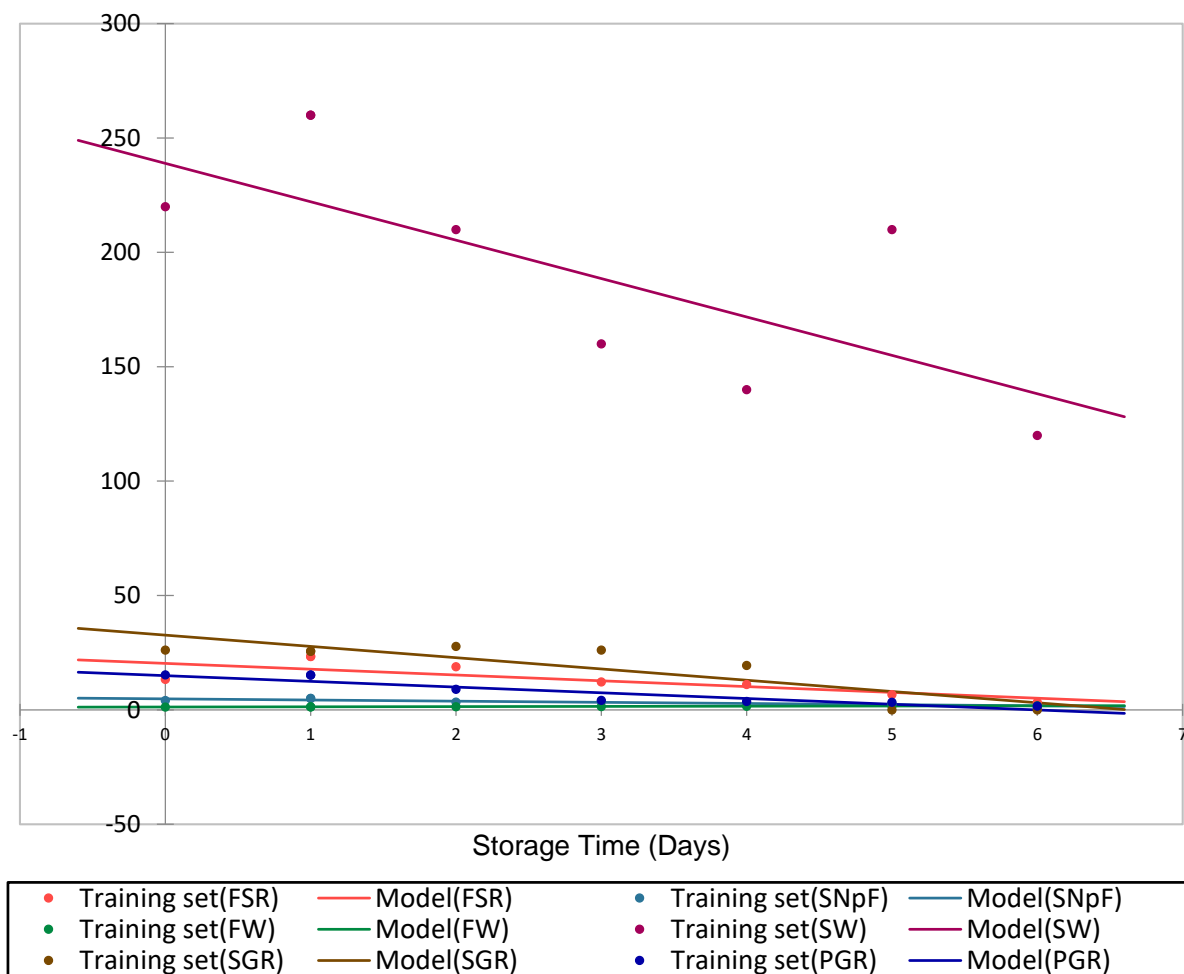
In this study, the viable pollen rate was 48.33% and the germination rate was 15.27% in fresh pollen. However, Pipino et al. (2011) found that the germinated pollen rates of eleven different hybrid tea rose varieties were between 0% and 46.5%. Nadeem et al. (2013) showed that the viability rates of 13 different hybrid tea roses were between 35.0% and 70.0%, and the germination rates were between 1.3% and 46.5%. Erbaş et al. (2015) determined that pollen viability rates in *R. damascena* at different flowering periods were between 32.8% and 71.5%, and germination rates were between 24.2% and 57.0%. Żuraw et al. (2015) reported that the pollen viability rates of 4 different rose species ranged from 26.7% to 96.9%, and Giovannini et al. (2017) stated that the germinated pollen rates of 44 hybrid tea roses ranged from 6.0% to 99.0% based on storage conditions. Although the findings obtained from the present study are generally in line with the results obtained from the investigations mentioned above, pollen quality showed variation among the studies. Pollen viability is thought to vary depending on factors such as the genetic makeup of species or varieties, ploidy levels, the method used for assessment, climate conditions, nutritional status of the plant, collection time of pollen, storage conditions, and duration (Güneş et al., 2005; Zlesak, 2009; Sulusoglu & Cavusoglu, 2014; Martins et al., 2017).

The viable pollen rate of the 'Magnum' at chemical and biological methods differed from each other, and the viable pollen rates obtained from the IKI method were found to be higher than the agar method in petri dishes. Similarly, Parfitt & Ganeshan (1989) determined that chemical methods do not show similarities with biological methods. In general, although it is expected that there is a linear relationship between chemical and biological methods (Martins et al., 2017), pollen that has not yet matured can be dyed using chemical methods (Şensoy et al., 2003). The possibility of staining immature pollen using the IKI method may have affected the results, as the culture medium used for germination may not have provided the optimum conditions for the Magnum. Some researchers stated that the pH, sucrose, and boric acid content of the germination medium can affect the germination rate of pollen (Mert & Soylu, 2006; Fragallah et al., 2019).

Effects of Storage Time on Traits and the Relationships between Traits

The regression of FSR, SNpF, SW, FW, SGR, and PGR by storage time is shown in Figure 2. According to Figure 2, it can be concluded that storage time had significant effects on FW, SGR, PGR, FSR, and SNpF, playing a crucial role in shaping these traits. However, the impact of storage time on SW was not found to be statistically significant. The storage time explained 64.8% of the variance in FSR, 77% in SNpF, 96.7% in FW, 53% in SW, 72.7% in SGR, and 87.5% in PGR. Furthermore, it was evident that, as the storage time increased, there was a noticeable decrease in all other traits, except for FW.

Effects of Short Term Pollen Storage on Fruit Set, Seed Number and Seed Germination Rate in Cut Rose Hybridization



	FSR	SNpF	FW	SW	SGR	PGR
R²	0.648	0.770	0.967	0.530	0.727	0.875
F	9.204	16.757	148.203	5.638	13.287	34.985
Pr > F	0.029	0.009	<0.000	0.064	0.015	0.002
β	-0.105	-0.021	0.003	-0.699	-0.205	-0.105

Figure 2. Linear regression analysis showing the effects of storage time on FSR (fruit set rate), SNpF (seed number per fruit), FW (fruit weight), SW (seed weight), SGR (seed germination rate), PGR (pollen germination rate). β= parameter estimate

The results obtained from this study regarding the effects of storage time on various traits in plants are in line with some previous research findings. Regarding FSR, the observed significant effect of storage time is in line with previous studies showing the importance of pollen freshness in achieving higher fruit set rates. Other studies have also reported a decrease in fruit set as the storage time increases (Kadri et al., 2022). Similarly, the significant effect of storage time on SNpF is consistent with previous research highlighting the impact of pollen quality on seed production success (Parimala & Swarnalatha Devi, 2018). The significant variation in these traits, explained by storage time, indicates that maintaining pollen viability is crucial to ensure reproductive success in the plants in question. The study's findings also support previous research highlighting the critical role of storage time in influencing PGR (Aldahadha et al., 2020).

The correlation matrix given in Table 2 showed a high positive correlation between the pollen germination rate and fruit set rate (r=0.78) and between the pollen germination rate and the seed number per fruit (r=0.82). At the same time, there was a high positive correlation between fruit set rate

Effects of Short Term Pollen Storage on Fruit Set, Seed Number and Seed Germination Rate in Cut Rose Hybridization

and seed number ($r=0.87$), between seed number and seed weight ($r=0.81$), between seed germination rate and seed number ($r=0.79$), and between seed germination rate and fruit number ($r=0.82$).

Table 2. Correlations among the fruit set rate, seed set rate, seed and fruit weight, seed germination rate, and pollen germination rate

Traits	FSR	SNpF	FW	SW	SGR	PGR
FSR	1	.872*	-.825*	.744	.819*	.779*
SNpF	.872*	1	-.923**	.805*	.791*	.818*
FW	-.825*	-.923**	1	-.752	-.874*	-.883**
SW	.744	.805*	-.752	1	.417	.824*
SGR	.819*	.791*	-.874*	.417	1	.657
PGR	.779*	.818*	-.883**	.824*	.657	1

*Correlation is significant at the 0.01 level. **Correlation is significant at the 0.05 level. FSR: fruit set rate. SNpF: seed number per fruit. FW: fruit weight. SW: seed weight. SGR: seed germination rate. PGR: pollen germination rate.

It is expected that there will be a similar trend in the pollen germination rate, fruit set, and seed set rates. Pipino et al. (2011) stated that there was a positive correlation between the pollen germination rate and the average number of seeds per fruit. Nadeem et al. (2013) and Deng et al. (2022) reported that they obtained the least fruit from their crosses with parents with the lowest pollen germination rate and the most fruit from their hybridization with parents with the highest pollen germination rate. In the results of this study, pollen germination rate, fruit set, and seed set rates showed a positive correlation similar to their findings. However, the germination ability in vitro may not completely reflect the ability to germinate in vivo in some cases (Pipino et al., 2011), and it is thought that the culture medium used in the germination method is related to the success of imbibition of the stigma fluid. The positive correlation between the seed number and the fruit set rate may be related to the fact that the seed number is calculated per fruit. The positive correlation among seed number, seed weight, and seed germination rate may be related to obtaining more endosperm, larger embryos, and thinner seed coats. Germination occurs as a result of successful fertilization and healthy seed development, and it may indicate that heavier seeds in roses have a higher germination ability. Because they have had a low seed germination rate due to embryo abortion and dormancy due to a thick seed coat. However, each increase in seed weight may not necessarily correspond to the size of the embryo and endosperm. Heavier seeds can be obtained due to an increase in seed coat weight, even if the embryo and endosperm are relatively smaller.

CONCLUSION

This study investigated how many days can be successfully made crossed with pollen stored for a short time. The study results confirm the importance of considering pollen storage duration, which is a significant factor that affects various characteristics of plants. The pollen viability and germination rates decreased over time, but this decrease did not create a significant difference in fruit and seed set rates in hybridization studies carried out for up to 3 days. However, after 3 days, significant decreases were observed in fruit set, seed number, and seed germination rates. The study suggests that parents with pollen showing a germination rate of 4.00% or more on roses can be considered moderately fertile. The positive correlation between seed germination rate and seed number highlights the importance of obtaining a considerable number of seeds for successful breeding studies. Studies to increase the seed set rate are of great importance as they will increase the effectiveness of breeding programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was produced from the master's thesis entitled 'The effect of pollen age fruit set. seed number and seed germination in cut rose breeding' completed in the Department of the Horticulture of Agriculture Faculty at Ankara University.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

Conceived and planned the experiments: SK. Performed the experiments: SK and GT. Analyzed the data: TK. Wrote the paper: TK. Reviewed and edited the paper: SK.

REFERENCES

- Anonymous. (2019). Modern roses. <https://modernroses.rose.org/>. 19.05.2022.
- Abdolmohammadi. M., Kermani. M.J., Zakizadeh. H. & Hamidoghli. Y. (2014). An vitro embryo germination and interploidy hybridization of rose (*Rosa* sp). *Euphytica*. 198(2). 255- 264.
- Aldahadha. A.M., Samarah. N., Bataineh. A. (2020). Effect of storage temperature and duration on pollen viability and in vitro germination of seven pistachio cultivars. *Journal of Applied Horticulture*. 22(3). 184-188.
- Anderson. N. & Byrne. D.H. (2007). Methods for rosa germination. IV International Symposium on Rose Research and Cultivation Acta Horticulture 751. August 31. USA (Santa Barbara. CA). pp. 503-507.
- Alp. Ş., Çelik. F., Türkoğlu. N. & Karagöz. S. (2009). The effects of different warm stratification periods on the seed germination of some *Rosa* taxa. *African Journal of Biotechnology*. 8(21). 5838-5841.
- Bosco. R., Caser. M., Ghione. G.G., Mansuino. A., Giovannini. A. & Scariot V. (2015). Dynamics of abscisic acid and indole-3-acetic acid during the early-middle stage of seed development in *Rosa hybrida*. *Plant Growth Regulation*. 75. 265-270.
- Chimonidou. D., Bolla. A., Pitta. C., Vassiliou. L., Kyriakou. G., Henriette. M.C. & Put H.M.C. (2007). Is it possible to transfer aroma from *Rosa damascena* to hybrid tea rose cultivars by hybridization?. IV International Symposium on Rose Research and Cultivation Acta Horticulture 751. August 31. USA (Santa Barbara. CA). pp. 299-304.
- Crespel. L. & Mouchotte. J. (2003). Methods of cross-breeding. Roberts. A.V., Debener. T. & Gudin. S. (ed). in Encyclopedia of rose science (pp. 30-33.). Elsevier. Amsterdam.
- De Vries. D.P. & Dubois. L.A.M. (1983). Pollen and pollination experiments. The effect of repeated pollination on fruit- and seed set in crosses between the hybrid tea-rose cvs. Sonia and Ilona. *Euphytica*. 32. 685-689.
- De Vries. D.P. & Dubois. L.A.M. (1987). The effect of temperature on fruit set. seed set and seed germination in Sonia×Hadley hybrid Tea-rose crosses. *Euphytica*. 36. 117-120.
- Deng. L., Wang. T., Hu. J., Yang. X., Yao. Y., Jin. Z., Huang. Z., Sun. G., Xiong. B., Liao. L. & Wang. Z. (2022). Effects of pollen sources on fruit set and fruit characteristics of 'Fengtangli' Plum (*Prunus salicina* Lindl.) based on microscopic and transcriptomic analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 23. 12959.

- Doğan. E., Kazaz. S., Ünsal. H.T., Uran. M., Dursun. H. & Kılıç. T. (2019). A Research on determination of the performance *Rosa damascena* Mill. as pollen source in rose breeding by hybridization. *Journal of Agricultural Faculty Bursa Uludag University*. 34 (Special issue). 194-201.
- Erbaş. S., Alagöz. M. & Baydar. H. (2015). A research on flower morphology and pollen viability of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.). *Suleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences*. 10(2). 40-50.
- Erken S., Gülbağ. F., Erken. K., Kazaz. S. & Özzambak. M.E. (2018). Development of new cut rose varieties by crossbreeding. General Directorate of Agricultural Research. Final Report. Project No: TAGEM/BBAD/14/A09/P08/01-II. Manuscript No:359.
- Eti. S. (1990). A practical method for the determination of pollen production. *Journal of Agriculture Faculty of Cukurova University*. 5. 49-58.
- Farooq. A., Lei. S., Nadeem. M., Asif. M., Akhtar. G. & Butt. S.J. (2016). Cross compatibility in various scented rosa species breeding. *Pakistan Journal of Agricultural Science*. 53(4). 863-869.
- Fragallah. S.A.D.A., Lin. S., Li. N., Ligat. E.J. & Chen. Y. (2019). Effects of sucrose, boric acid, pH and incubation time on in vitro germination of pollen and tube growth of chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.). *Forests*. 10(102). 1-16.
- Giovannini. A., Macovei. A., Caser. M., Mansuino. A., Ghione. G.G., Savona. M., Carbonera. D., Scariot. V. & Balestrazzi. A. (2017). Pollen grain preservation and fertility in valuable commercial rose cultivars. *Plants*. 6(17). 1-8.
- Gudin. S., Arene. L., Chavagnat. A. & Bulard. C. (1990). Influence of endocarp thickness on rose achene germination: genetic and environmental factors. *HortScience*. 25. 786-788.
- Gudin. S. (2003). Breeding. Roberts. A.V., Debener. T. & Gudin. S. (ed). in Encyclopedia of rose science (pp. 25-30). Elsevier. Amsterdam.
- Gülbağ. F., Erken. S., Erken. K. & Özzambak. M.E. (2018). Development of new garden rose varieties by crossbreeding. General Directorate of Agricultural Research. Final Report. Project No:TAGEM/BBAD/14/A09/P08/01-I. Manuscript No:357.
- Gülbağ. F., Erken. S., Erken. K. & Kazaz. S. (2021). Rose. Kazaz. S. & Yalçın-Mendi. Y. (ed). in Ornamental plant breeding (species) (pp. 133-189). Gece Kitaplığı Publishing. Ankara.
- Güneş. M., Çekiç. Ç. & Edizer. Y. (2005). Determination of pollen quantity, pollen viability and pollen germination in some dogrose species (*Rosa* Section Caninae). I International Rose Hip Conference Acta Horticulturae 690. Sept 30. Turkey (Gümüşhane). 211-216p.
- İmrak. B. (2010). *Performances of some sweet cherry cultivars (Prunus avium L.) under the subtropical climatic conditions and research to the solution of multiple pistil* (Doctoral Thesis). Çukurova University. Turkey.
- Kadri. K., Elsafy. M., Makhlof. S., Aawad. M. (2022). Effect of pollination time, the hour of daytime, pollen storage temperature and duration on pollen viability, germinability, and fruit set of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv "Deglet Nour". *Saudi Journal of Biological Science*. 29(2). 1085-1091.
- Kazaz. S., Doğan. E., Kılıç. T., Ergür Şahin. E.G., Dursun. H. & Tuna. G.S. (2020). Does pollination with scented Rose genotypes as pollen source affect seed set? *Journal of Agriculture Faculty of Ege University*. 57(3-3). 393-399.

- Khan. M.F., Hafiz. I.A., Khan. M.A., Nadeem. A.B., Habib. U. & Shah. M.K.N. (2021). Determination of pollen fertility and hybridization success among *Rosa* species (*Rosa hybrida*). *Pakistan Journal of Botany*. 53(5). 1-10.
- Kılıç. T. (2020). *Scented rose breeding by hybridization* (Doctoral Thesis). Ankara University. Turkey.
- Kılıç. T., Doğan. E., Dursun. H.B., Çamurcu. S., Ünsal. H.T. & Kazaz. S. (2020). Effects of pollen holding duration in some rose species and varieties on pollen viability and germination. *Journal of Agricultural Faculty of Bursa Uludag University*. 34 (Special issue). 173-184.
- Korkut. S.S., Kazaz. S. & Kılıç. T. (2022). Different storage temperatures and times on pollen quality in cut rose varieties. *Ornamental Horticulturae*. 28(2). 202-211.
- Leus. L., Van Laere. K., De Riek. J. & Van Huylenbroeck. J. 2018. Rose. Van Huylenbroeck. J. (ed). in *Handbook of plant breeding volume 11: ornamental crops* (pp. 719-767). Springer International Publishing AG. Switzerland.
- MacPhail. J.V. & Kevan. P.G. (2009). Review of the breeding systems of wild roses (*Rosa* spp.). *Floriculture Ornamental Biotechnology*. 3(special issue 1). 1-13.
- Martins. E.S., Davide. L.M.C., Miranda. G.J., Barizon. J.O., Junior. F.A.S., de Carvalho. R.P. & Gonçalves. M.C. (2017). In vitro pollen viability of maize cultivars at different times of collection. *Ciencia Rural*. 47(02). 1-8.
- Mert. C. & Soylu. A. (2006). Studies on the fertilisation biology of some cornelian cherry (*Cornus mas* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Faculty of Bursa Uludag University*. 2(21). 45-49.
- Nadeem. M., Akond. M., Riaz. A., Qasim. M., Younis. A. & Farooq. A. (2013). Pollen morphology and viability relates to seed production in hybrid roses. *Plant Breeding and Seed Science*. 68(1). 25-38.
- Nadeem. M., Younis. A., Riaz. A. & Lim. K.B. (2015). Crossability among modern roses and heterosis of quantitative and qualitative traits in hybrids. *Horticulture. Environment and Biotechnology*. 56(4). 487-497.
- Parfitt. D.E. & Ganeshan. S. (1989). Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *HortScience*. 24(2). 354-356.
- Pereira. M.C.T., Crane. J.H., Montas. W., Nietsche. S. & Vendrame. W.A. (2014). Effects of storage length and flowering stage of pollen influence its viability, fruit set and fruit quality in 'Red' and 'Lessard Thai' sugar apple (*Annona squamosa*) and 'Gefner' atemoya (*A. cherimola* x *A. squamosa*). *Scientia Horticulturae*. 178. 55-60.
- Pipino. L., Scariot. V., Gaggero. L., Mansuino. A., Van Labeke. M.C. & Giovannini. A. (2011). Enhancing seed germination in hybrid tea roses. *Propagation of Ornamental Plants*. 11(3). 111-118.
- Parimala. K., & Swarnalatha Devi. I. (2018). Pollen storage and pollination studies for maximization of hybrid seed production in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(8). 2661-2664.
- Roy. P.K. (2010). *The complete book of roses*. ISBN: 978-81-7910-304-3. Aavishkar Publishers. Jaipur. India. 556 p.
- Santosh. Y. & Malabasari. T.A. (2014). Effect of period of pollen storage and pollination day after flower opening on fruit set and seed yield in bitter melon (*Momordica charantia* L.) under shade house. *Research & Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences*. 3(4). 13-16.

- Seyhan. S. 2020. The effects of different storage temperatures and duration on pollen quality and germination of some rose species spreaded in Turkish flora. Master Thesis. Ankara University. Turkey.
- Suluşoğlu. M. & Cavuşoğlu. A. (2014). In vitro pollen viability and pollen germination in cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). *The Scientific World Journal*. 6571237. 1-7.
- Şensoy. S.. Ercan. N.. Ayar. F. & Temirkaynak. M. (2003). The evaluation of pollen viability and the determine some pollen characteristics in some species of Cucurbitaceae family. *Mediterranean Agricultural Science*. 16(1). 1-6.
- Tonosaki. K.. Osabe. K.. Kawanabe. T. & Fujimoto. R. (2016). The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breeding Science*. 66(3). 333-349.
- Ueckert. J.A. (2014). *Understanding and manipulating polyploidy in garden roses* (Master Thesis). Texas A&M University. USA.
- Uran. M. (2022). *Determination of hybridization success. seed yield and germination rates in pot miniature rose x cut rose hybrid* (Master thesis). Ankara University. Turkey.
- Visser. T.. de Vries. D.P.. Scheurink. J.A.M. & Welles. G.W.H. (1977). Hybrid tea-rose pollen I. germination and storage. *Euphytica*. 26(3). 721-728.
- Veerasha. S.M.. Tirakannavar. S.. Masuti. D.K.. Jagadeesha. R.C.. Shet. R.M. & Gowda. V.H. (2018). Effect of time of pollination and period of pollen storage on seed yield and quality of brinjal hybrid (*Solanum melongena* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(7). 1783-1791.
- Zlesak. D.C. (2007). Rose: *Rosa hybrida*. In: Anderson. N.O. (ed). in Flower breeding and genetics (pp. 694-740). Springer. Netherlands.
- Zlesak. D.C. (2009). Pollen diameter and guard cell length as predictors of ploidy in diverse rose cultivars. species. and breeding lines. *Floriculture Ornamental Biotechnology*. 3(1). 53-70.
- Żuraw. B.. Sulborska. A.. Stawiarz. E. & Weryszko-Chmielewska. E. (2015). Flowering biology and pollen production of four species of the genus *Rosa* L.. *Acta Agrobotanica* 68(3). 267-278.

Atf İçin: Uzun, M. Z., Başaran, E. ve Çelik, Y. (2023). Xception Derin Öğrenme Modeli ve Gabor Filtreleri ile RFECV-SVM Algoritması Kullanılarak Mikro İfadelerin Tanınması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2339-2352.

To Cite: Uzun, M. Z., Başaran, E. & Çelik, Y. (2023). Recognition of Microexpressions Using Xception Deep Learning Model and Gabor Filters with RFECV-SVM Algorithm. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2339-2352.

Xception Derin Öğrenme Modeli ve Gabor Filtreleri ile ÇDÖÖE-DVM Algoritması Kullanılarak Mikro İfadelerin Tanınması

Mehmet Zahit UZUN^{1*}, Erdal BAŞARAN², Yüksel ÇELİK³

Öne Çıkanlar:

- Çalışmada hem geleneksel hem de veriye dayalı yöntemler kullanılmıştır
- Modelde farneback ve TV-L1 optik akış teknikleri karşılaştırılmıştır
- Casme-II veri seti üzerinde 0.9184 doğruluk elde edilmiştir

Anahtar Kelimeler:

- Mikro ifade
- Optik akış
- Xception
- Gabor
- ÇDÖÖE
- DVM

ÖZET:

Mikro ifade (Mİ), insanların riskli bir ortamda bir olaya karşı istemsiz ve kontrolsüz duygusal tepkilerini gizlemeye çalıştıklarında ortaya çıkan sızıntıdır. Duyguyu yaşayan kişi risk altında bunu bastırmaya çalıştığı için yüze yansımaları düşük yoğunlukta, belirli bir bölgede ve çok kısa sürede gerçekleşir. İfade istemsizce ortaya çıktığı için sahte değil tamamen doğal olmaktadır. Bu doğal ifadelerin doğru tespiti sayesinde adli, klinik, eğitim gibi birçok alanda etkili bir şekilde kullanılması sağlanabilir. Bu çalışmada Mİ tanıma hedefi için oluşturulan model yapısında sırasıyla önışleme, öznelik çıkarma, öznelik seçme ve sınıflandırma görevleri kullanılmıştır. Önerilen model yapısında literatürde en çok kullanılan, kamuya açık Mİ veri setlerinden CASME-II kullanılmıştır. Ön işleme aşamasında Optik Akış algoritmalarında kullanılmak üzere her bir video klipin görüntü dizisinden başlangıç (onset) ve tepe (apex) kareleri seçilir. Bu iki kare kullanılarak Farneback, TV-L1 Dual ve TV-L1 e ait yatay ve dikey optik akış görüntüleri elde edilmiş, ardından bu optik akış görüntüleri evrişimsel sinir ağı (ESA) modeli olan Xception ve geleneksel model olan Gabor modelleri kullanılarak görüntülere ait öznelikler elde edilmiştir. Elde edilen bu özneliklere ait ayırt edici olanları filtrelemek için çapraz doğrulama ile özylenelemeli özellik eleme (ÇDÖÖE) öznelik seçim algoritması kullanılmıştır. Son olarak doğrusal destek vektör sınıflandırıcısı (DVS), filtrelenmiş Mİ özneliklerini pozitif, negatif ve sürpriz olmak üzere üç sınıfa ayırmıştır. Önerilen Mİ model yapısından elde edilen sonuçlar 0.9248 doğruluk oranı başarısı göstermiştir.

Recognition of Microexpressions Using Xception Deep Learning Model and Gabor Filters with RFECV-SVM Algorithm

Highlights:

- Both traditional and data-based methods were used in the study.
- Farneback and TV-L1 optical flow techniques are compared in the model.
- An accuracy of 0.9184 was obtained on the Casme-II dataset.

Keywords:

- Micro-expression
- optical flow
- xception
- gabor
- RFECV
- SVM

ABSTRACT:

Micro Expression (ME) is the leakage that occurs when people try to mask their involuntary and uncontrolled emotional response to an event in a risky environment. Because the person experiencing the emotion at risk tries to suppress it, its reflection on the face occurs in a low intensity, a specific region, and a very short time. Since the expression emerges involuntarily, it is not fake but completely natural. Thanks to the correct detection of these natural expressions, it can be used effectively in many fields such as forensics, clinical, and education. This study used preprocessing, feature extraction, feature selection, and classification tasks in the framework created for the ME recognition target. CASME-II, one of the literature's most widely used publicly available ME datasets, was used in the proposed framework. In the preprocessing stage, onset and apex Frames are taken from the image sequence of each video clip to be used in optical flow algorithms. These two frames obtained horizontal and vertical optical flow images of Farneback, TV-L1 Dual, and TV-L1. Then the features of these optical flow images were obtained using the convolutional neural network (CNN) model Xception and the traditional Gabor model. Recursive feature elimination with a cross-validation (RFECV) feature selection algorithm was used to filter the distinctive ones of these features. Finally, the SVC Linear classifier divided the filtered ME features into three classes: positive, negative, and surprise. The results obtained from the proposed ME framework showed an accuracy rate of 0.9248.

¹Mehmet Zahit UZUN (Orcid ID: 0000-0002-6180-5860), Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Ermenek Meslek Yüksekokulu, Bilgisayar Programcılığı, Karaman, Türkiye

²Erdal BAŞARAN (Orcid ID: 0000-0001-8569-2998), Ağrı Üniversitesi, Uzaktan Eğitim Merkezi, Bilgisayar Teknolojileri, Ağrı, Türkiye

³Yüksel ÇELİK (Orcid ID:0000-0002-7117-9736), Karabük Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği, Karabük, Türkiye.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Zahit UZUN, e-mail: mzuzun@kmu.edu.tr

GİRİŞ

Duygular beyindeki ilgili sinir sistemini uyararak, yüzdeki duygusal gösterimleri geçici ve irade dışında otomatik olarak harekete geçirmektedir (Warren ve ark.,2009; Hurley ve ark.,2014). Mİ, kişilerin gizlemeye çalıştığı bir duyguyu istemsizce kısa süreli olarak sızdırdığı yüz hareketi olarak tanımlanmaktadır. İnsanlar yetiştiği ortamlardan dolayı, toplumsal, kültürel ya da bireysel etkenlerden dolayı duygularını gizleme eğiliminde olabilmektedirler. Bu mimikler istenmeyen durumlarda meydana geldiğinden, benzer şartların oluşmasının güç olmasından dolayı taklit edilmesi ve üretilmesi zor olmaktadır. Ayrıca istemsiz meydana geldiğinden kontrol edilemez ve gerçek duyguları yansıtmaktadırlar. Ulaştırma güvenliği, klinik, politik alanlarında kullanıldığında avantaj sağlayacak olan Mİ' yi diğer yüz ifadelerinden ayıran temel özelliklerden biri de imiklerin süreleri gösterilmiştir. Mİ sürelerinde bir fikir birliği olmasa da bugüne kadar öne sürülen süreler içerisinde maksimum, saniyenin yarısından daha az sürdüğü belirtilmiştir (Yan ve ark., 2013). Bazı kaynaklarda ise saniyenin 1/25–1/5'in aralığında gerçekleştiği literatüde arasında eleştirilmeden kabul edildiği belirtilmiştir (Yan ve ark., 2013; Fan ve ark., 2022) Araştırmalarda fark edilen bir diğer husus ise Mİ yüzün hem alt hem de üst kısmında aynı anda görülmedikleridir (Porter ve ark., 2012). Yani Mİ diğer yüz ifadeleri gibi tam olarak değil yüzün kısmi bölgelerinde parçalı bir şekilde oluşmaktadır. Mİ'lerin yüzdeki oluşumları literatürde belirtildiği gibi kısa süreli ve kısmi olduğundan dolayı insan gözüyle tespit edilmeleri zordur. Yetenekli ve eğitilmiş uzmanlar tarafından bile tespit edilme oranları %45 ila %59 aralığında değiştiğinden, bu da istenen hedefin oldukça altındadır (Hurley ve ark., 2014). Buna yaşlı yetişkinlerin genç yetişkinlere göre aldatıcı yüz ifadelerini çok daha zor tespit ettiği, yaşa bağlı farklılıkların da önem kazandığı (Stanley ve Webster, 2019), düşünülürse Mİ tanıma oldukça emek ve çaba isteyen bir görev haline gelmiştir.

Video klip görüntülerinde Mİ' lerin meydana gelme aralığı üç ortak kare ile tanımlanmaktadır. Mikro ifadenin başladığı an olarak belirtilen başlangıç karesi, ifadenin yüzde belirmesinin zirve yaptığı ve en yoğun görüldüğü tepe karesi ve ifadenin son bulduğu kare olarak belirtilen bitiş karesidir. Tüm Mİ video kare dizileri, ifadelerin süreçlerinin çok kısa olmasından dolayı, bu üç kare ile temsil edilebilmektedir (Ben ve ark., 2021; Gan ve ark., 2022; Zhou ve ark., 2022). Bu çalışmada da video klibe ait tüm kare dizileri yerine, belirtilen bu üç önemli kare kullanılarak önışleme ve öznitelik çıkarma süreçleri gerçekleştirilmiştir.

Kamuya açık doğal mikro ifade veri seti olarak en yaygın kullanılan veri setleri CASME II, SAMM ve SMIC veri setleridir (Uzun ve ark., 2022). Modellerine STSNET adı verdikleri çalışmalarında örnekleri üç etikete ayırdıkları CASME-II veri seti ile 0.8382 ağırlıksız F1, 0.8686 ağırlıksız ortalama duyarlılık değerleri elde etmişlerdir (Liong ve ark., 2019). Off-ApexNet isimli bir diğer çalışmada ise örnekleri üç etikete ayırdıkları SAMM, CASME-II ve SMIC veri setleri kendi içlerinde değerlendirildiğinde en yüksek performansı CASME-II veri seti 0.8828 doğruluk, 0.8697 F1 ölçümüyle elde etmiştir. Üç veri seti birleştirilerek elde ettikleri bileşik üç etiketli veri setinde ise 0.746 doğruluk, 0.7104 F1 ölçümü elde etmişlerdir (Gan ve ark., 2019).

Literatürde Mİ ile ilgili yapılan uygulamalarda kullanılan modellerin ortak işlemleri sırasıyla önışleme, öznitelik çıkarma, sınıflandırma olarak üç bölümden oluşmaktadır. Mİ paçalı olarak meydana geldiğinden, yüzün alt ya da üst kısmının küçük bir bölümünde meydana gelmektedir. Bundan dolayı baş hareketleri, aydınlatma ve gölgelendirmelerden kaynaklı tanıma doğruluğunu etkileyecek negatif faktörler bulunmaktadır (Liong ve ark., 2019). Önışleme aşamasında ilk olarak piksel değişiminden küçük hareket ve değişimleri yakalayabilen optik akış tekniği Mİ çalışmalarında öznitelik çıkarma aşamasından önce uygulanmaktadır. Yüz ifadelerinin tanınmasında optik akış yöntemleri

karşılaştırıldığında en iyi sonuçları yoğunluk tabanlı tekniklerden, Farneback ve TV-L1 elde etmiştir (Zhao ve Xu, 2020).

Öznitelik çıkarma aşamasında geleneksel ve veriye dayalı makine öğrenimi yöntemleri kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerden en çok kullanılan yerel ikili desen (Local Binary Pattern-LBP) ve üç ortogonal düzlemde yerel ikili desen (Local Binary Pattern on Three Orthogonal Plane-LBP-TOP) (Sun ve ark., 2020; Adegun ve Vadapalli 2020) ve türevleri, yönlendirilmiş gradyan histogramı (Histogram of Oriented Gradient -HOG) (Ahadit ve Jatoth, 2022), Gabor (Lin ve ark., 2018) Mİ görüntülerine uygulanmıştır. Yerel ikili desen, 2B görüntülerde piksellerin yerel komşuluğundan görüntünün doku özelliğini çıkarırken, üç ortogonal düzlemde yerel ikili desen video görüntülerinin yerel komşuluklarını uzamsal ve zamansal olarak hesaplamaktadır. Yönlendirilmiş gradyan histogramı ise görüntülerin piksellere gradyanların büyüklük ve yön bilgisini iki boyutlu bir vektör şeklinde tanımlamaktadır. Bunu görüntüyü küçük pencerele bölüp, sobel filtresi kullanarak yapmaktadır.

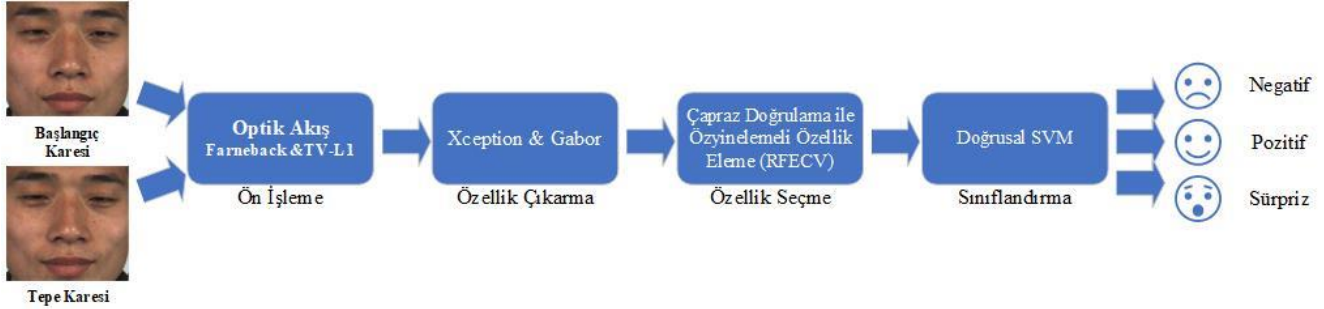
Makine öğrenmesinde, veriye dayalı modeller kullanılarak yapılan öznitelik çıkarma işleminde derin öğrenme yöntemleri uygulanmıştır. Bu modeller yapılarında evrişimsel ve havuzlama katmanları içermektedir. Evrişimsel katmanı öznitelik haritaları çıkarırken, havuzlama katmanı veri boyutlarını azaltmaktadır. Görüntüler için kullanılan 2B ESA modelleri önemli bilgileri içeren uzamsal öznitelik haritalarını çıkarıp sınıflandırmaktadır (Zhou ve ark., 2022; Tang ve ark., 2022). Video görüntüleri için kullanılan 3B ESA modelleri ise hem uzamsal boyutta hem de zamansal boyutta önemli bilgileri içeren öznitelik haritalarını çıkarıp sınıflandırmaktadır (Zhou ve ark., 2022; Cai ve ark., 2022). Bu modeller ayrıca binlerce örneğe sahip veri tabanları ile eğitilip bu öğrenme durumunu hiç karşılaşmadığı başka öğrenme ortamlarına aktarabilmektedirler. Öğrenmeyi aktarma yöntemi, Mİ gibi örnek sayısı az olan veri setlerinde uygulandığında da verimli sonuçlar elde edilmiştir (Zhou ve ark 2019; Xia ve ark., 2020).

Sınıflandırma aşamasında, makine öğrenmesinde kullanımı çok popüler olan Destek Vektör Makinesi (DVM) ve farklı çekirdekleri öznitelik haritalarının sınıflandırılmasında kullanılmıştır (Uzun ve ark., 2022). Ayrıca derin öğrenme modellerinin mimarisinde bulunan sınıflandırma katmanları da öznitelik haritalarını sınıflandırmada kullanılmıştır (Zhou ve ark., 2019; Xia ve ark., 2020). Başka bir çalışmada Üç ortogonal düzlemin yerel ikili deseninden elde ettikleri ve ESA'dan elde ettikleri Mİ özelliklerini birleştirerek softmax ve DVM sınıflandırıcılarında eğitmişlerdir. Çalışmalarında DVM'nin doğrusal, polinom, radyal ve sigmoid gibi dört farklı çekirdeğinin kullanılmıştır. DVM, CASME II, SMIC-NIR, CAS(ME)2 veri setleri için softmax sınıflandırma algoritmasından %4 ila %7 oranında üstün olduğunu gözlemlemişlerdir (Takalkar ve ark., 2020). Peng vd. CASME ve CASME II veri setlerini kullandıkları çalışmalarında veri setlerindeki video kliplerinin farklı kare hızlarına adapte olabilen biri 64fps diğeri 128 fps iki akışlı Çift Zamansal Ölçekli Konvolüsyonel Sinir Ağı (DTSCNN) adı verdikleri 3B ESA modeli kullanmaktadır. Modelin yapısında aşırı uydurmadan kaçınmak için sığ bir ağ yapısı tasarlanırken, sınıflandırma kısmında doğrusal bir DVM'den yararlanmışlardır (Peng ve ark., 2017).

Önerilen çalışmanın deneylerinde, kamuya açık en yaygın kullanılan CASME-II spontane Mİ veri seti kullanılmıştır. Ayrıca önerilen çalışmada, geleneksel yöntemler ve veriye dayalı yöntemler kullanılarak performans ölçümleri karşılaştırılmıştır. Veriye dayalı olarak derin öğrenme modellerinden Xception ESA modeli, geleneksel yöntem olarak gabor filtre bankaları uygulamalarda kullanılmıştır. Veri setindeki düşük örneklemeden dolayı veriye dayalı Xception modelinde veri artırma ve öğrenmeyi aktarma teknikleri uygulanmıştır. Gabor ve Xception modellerinden elde edilen öznitelik haritaları daha sonra makine öğrenmesinin fenomen sınıflandırıcısı olan doğrusal destek vektör sınıflandırıcısı (DVS) ile sınıflandırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Önerilen modelin yapısı önışleme, öznitelik çıkarma, öznitelik seçimi ve sınıflandırma aşamalarından oluşmaktadır. Modelin yapısı Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Mİ sınıflandırma için önerilen mimari yapı

Modelin önışleme aşamasında başlangıç kare ve tepe kare görüntülerinden optik akış yöntemi uygulanarak hareket öznitelikleri çıkarılmıştır. Görüntüler, optik akış yönteminin Farneback ve TV-L1 teknikleri uygulandıktan sonra döndürme veri artırma yöntemi uygulanarak veri setindeki örnekler artırılmıştır. Artırılmış veri setine veriye dayalı model olan Xception ve geleneksel model olan Gabor uygulanarak öznitelik haritaları çıkartılmış ve iki model kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Xception modelinde tam bağlı katmanlardan hemen önceki katmandan 100352 öznitelik haritası, Gabor yöntemi ile 50176 öznitelik haritası elde edilmiştir. Ardından kullanılan modelin, Mİ tanımda en az öznitelik haritası ile maksimum performansı vermesini sağlayacak olan ÇDÖÖE öznitelik seçim algoritması kullanılmıştır. Bu iki modelde de sınıflandırıcı olarak doğrusal DVM algoritması uygulanmıştır. Önerilen çalışmada kullanılan metotların detaylı açıklamaları aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

Veri Seti

Günümüzde halka açık veri seti olarak oluşturulan CAME-II (Yan ve ark., 2014) veri setinde 26 katılımcıdan elde edilen 247 adet Mİ bulunmaktadır. Mİ örnekleri spontan ve dinamiktir. Video kayıtlar, uygun aydınlatma koşulları altında 200 fps kare hızına ve yaklaşık 280x340 yüz çözünürlüğüne sahiptir. İfadeleri etiketlemede (Facial Action Coding Sytem) FACS kullanılmıştır. Doğal Mİ üretmenin zorlukları ve laboratuvar koşulları, farklı kategorilerde eşit olmayan örnek dağılımına sebep olmuştur.

Yedi kategoriye ayrılmış Casme-II veri seti negatif, pozitif ve sürpriz olmak üzere üç etikete sahip veri seti oluşturulmuştur. Bu dönüştürmede iğrenme, korku, baskı ve üzüntü kategorileri negatif sınıf altında gruplandırılırken, mutluluk kategorisi pozitif sınıf altında, sürpriz kategorisi isim değiştirmeden aynı isimli sınıfta bulunmaktadır. Diğerleri kategorisine ait örnekler bu çalışmada kullanılmamıştır. Böylece negatif sınıfında 94 adet örnekleme, pozitif sınıfında 32 adet örnekleme ve sürpriz sınıfında 28 adet örnekleme sahip veri seti kullanılmıştır. Çizelge 1’de önerilen çalışmada kullanılan CASME-II veri setine ait özellikler gösterilmektedir.

Çizelge 1. Önerilen modelde kullanılan spontane Mİ veri tabanı CASME II’ nin özellikleri

Katılımcı	Örnek	Negatif	Pozitif	Sürpriz	Kare hızı (fps)	Çözünürlük	Yüz çözünürlüğü	Etnik
24	154	94	32	28	200	640*480	280*340	1

CASME-II veri setinde örnekler hem video klipi biçiminde hem de görüntü kareleri biçiminde sunulmaktadır. Ayrıca bu görüntü kareleri kullanıcılar için hem önışleme aşamasından geçirilmiş hem de başlangıç, tepe ve bitiş karelerinin indeksleri verilmiştir. Önışleme aşamasında yüz bölgesi ASM tekniği kullanılarak 68 nokta ile belirlenmiş, LWM tekniği ile hizalanıp kırılmıştır.

Ön İşleme

İki kare arasındaki piksel başına değişiminden hareket ve farklılıkları vektörel olarak tahmin eden bir el yapımı yöntemidir (Liu ve ark., 2020). Mİ çalışmalarında sıkça kullanılan Farneback (Farneback, 2003) ve TV-L1 yoğunluk tabanlı optik akış teknikleridir. Farneback tekniği, hesaplama açısından daha hızlı, piramidal ayırıştırma kullanma, yüz hareketlerinin analizinde daha az hata üretme gibi avantajları bulunurken, TV-L1 ise görüntülerin süreksizliğini tahmin etme ve kenar özelliklerini koruma, L1 normunu kullanma gibi avantajlarından dolayı tercih edilmiştir (Benjamin ve ark., 2019; Liu ve ark., 2021).

Önerilen çalışmada başlangıç ve tepe kareleri kullanılarak, bu iki kare arasındaki değişikliklerden hareketi tahmin etmek için Farneback ve TV-L1 optik akış teknikleri uygulanmış ve karşılaştırılmıştır. Elde edilen optik akış görüntülerin buldukları kategoriler, veri setinden dolayı eşit değildir. DVM sınıflandırma, örnekleme fazla olan sınıfın lehine ölçüm sonuçları verdiği için (Li ve ark., 2020; Bozkurt 2023), optik akış görüntülerde veri arttırma tekniği uygulanarak, dengeli sınıfların oluşturulması hedeflenmektedir. Veri setinde 94 negatif, 32 pozitif ve 28 sürpriz örnekleme sayısı, veri arttırma tekniği sonrası her biri 94 örneklemeyle sahip üç sınıf haline getirilmiştir. Keras kütüphanesinin ImageDataGenerator sınıfı, pozitif ve sürpriz sınıflara uygulanarak 90⁰, 180⁰, 270⁰ döndürme işlemi sonunda sınıflar eşitlenmiştir. Veri kaybına ve gürültüye sebep olmamak için diğer teknikler tercih edilmemiştir.

Gabor Filtresi

Gabor filtreleri, görüntü işlemede ve bilgisayar görüşünde kullanılan kenar algılama, doku analizi, öznitelik vektörü çıkarma gibi görevleri yapabilen doğrusal bir hesaplama yöntemidir. Gabor filtrelerinin çalışma prensibi, memelilerin görsel sisteminde bulunan korteks hücrelerinin fizyolojik çalışmasına dayanmaktadır (Rose, 2006; Takalkar ve ark., 2018).

Gabor filtreleri bir görüntüdeki kenar ve doku yapısındaki değişim noktalarını algılamakta, ilgili filtreler bu uzamsal konumlarda ayırt edici özelliğe sahiptir. Gabor filtreleri nesne, yüz ve yüz ifadesi tanıma için kullanılmaktadır (Lee ve Chen, 2009; Ou ve ark., 2010). Ayrıca yüze ait öznitelik haritaları çıkarılırken yüzün tamamında ya da bir kısmında (Gao ve ark., 2017) kullanılabilir. Yüz hareketlerini sınıflandırmada iyi performans veren gabor, aydınlatma ve döndürmelere karşı dayanıklı farklı frekans ve yönlere sahip filtre bankaları kullanan piksel tabanlı popüler bir yöntemdir (Lee ve Chen, 2009; Takalkar ve ark., 2018). Belirli bir bant frekansın geçişine izin veren bir gabor filtresi bir sinüs dalgası ve bir Gauss zarf fonksiyonunun birleşiminden oluşmaktadır. Denklem 1-3 arasında Gabor filtresine ait eşitlik verilmektedir. (Jirik ve ark., 2011).

$$Gabor(x, y) = \exp\left(-\frac{x'^2}{2\sigma_x^2}\right) \exp\left(-\frac{y'^2}{2\sigma_y^2}\right) \cos\left(2\pi\frac{x'}{\lambda} + \psi\right), \quad (1)$$

$$x' = (x - m_x) \cos \gamma - (y - m_y) \sin \gamma, \quad (2)$$

$$y' = (x - m_x) \sin \gamma + (y - m_y) \cos \gamma, \quad (3)$$

Burada ψ parametresi bir faz kaymasını, γ parametresi yönü, σ_x^2 ve σ_y^2 parametreleri alıcı alanı, m_x ve m_y görüntü koordinatlarında gabor fonksiyonunun merkezini belirtir.

Xception

Google tarafından 2017 tarihinde sunulan Extreme Inception (Chollet, 2017) anlamına gelen bu ağ, Inception modülü yerine modifiye edilmiş derinlemesine ayrışabilir evrişim katmanlarını temel alan bir evrişim mimari modelidir. Modelin temel fikri uzamsal ve derinlikli olarak öznitelik haritalarını

ayrıştırmak ve ek olarak artık (residual) bağlantılarla öznelik haritalarını güçlendirmektedir. Burada ayrılabilir evrişim ağlarında önce derinlemesine evrişim yapıp daha sonra noktasal evrişim yapılırken, Xception modelinin kullandığı değiştirilmiş derinlemesine ayrılabilir evrişim ağında ise tersi kullanılmaktadır.

Çapraz Doğrulama ile Özyinelemeli Özellik Eleme (ÇDÖÖE)

Önerilen çalışmada özyinelemeli özellik eleme (ÖÖE) algoritmasının bir güncellenmiş versiyonu olan çapraz doğrulama ile özyinelemeli özellik eleme öznelik seçim algoritması kullanılmıştır. ÇDÖÖE, öznelik haritalarının sınıflandırmadaki önemlerine göre otomatik çapraz doğrulama kullanarak sıralamaktadır. Ardından algoritma sıralanmış öznelik haritaları içerisinde Mİ sınıflandırmasında en alakasız öznelikleri birer birer kaldırmaktadır. Bu algoritma adından da anlaşılacağı üzere öznelik haritalarının sıralarken özyinelemeli bir prosedür kullanıp sınıflandırmada en yüksek puanı verecek minimum sayıdaki öznelikleri belirleyip seçmektedir. Böylece sınıflandırmanın performansını artmasına yardımcı olmaktadır (Wang ve ark., 2019; Mustaqim ve ark., 2021).

Destek Vektör Makinesi (DVM)

DVM başta ikili sınıflandırmada kullanılmak üzere Cortes ve Vapnik (Cortes ve Vapnik, 1995) tarafından 1995 yılında tasarlanmıştır. Zamanla uygulamalarda geliştirilerek ikiden fazla sınıflandırma kabiliyeti elde etmiştir. DVM, sınıflandırma problemlerinde veri setini en iyi ayıran fonksiyonu öğrenme, regresyon problemlerinde fonksiyon kestirimi yapabilen bir denetimli öğrenme algoritmasıdır (Ukil, 2007). Görüntü ve konuşma işleme, zaman serisi tahmini, veri madenciliği, güç sistemleri gibi uygulama alanlarda kullanılmaktadır.

DVM çekirdek hilesi ile verileri daha yüksek boyutlu bir uzaya taşıyarak doğrusal olmayan sınıflandırma becerisi kazanmaktadır. Böylelikle ilk olarak literatüre doğrusal sınıflandırıcı olarak giren DVM algoritması zamanla doğrusal olmayan sınıflandırma görevlerinde de kullanılmaktadır. Ayrıca destek vektör regresyonu (DVR), regresyon analizlerinde kullanılabilen DVM versiyonu olarak sunulmuştur (Ukil, 2007).

DVM algoritmasının kolay uygulanabilirliği, n boyut özellik uzayına sahip problemler için uygun yöntemlerden biri olmasından dolayı önerilen model için kullanılmıştır (Karcıoğlu ve Aydın, 2019).

Performans Ölçümleri

Veri setinde bulunan sınıflara ait örnekleme sayılarının bazı sınıflarda dominant olduğu durumlarda modelin performansının ölçümünde sadece doğruluk değerine başvurmak değerlendirmede önyargıya sebep olacaktır. Modelin veri seti üzerindeki performansını daha etkili değerlendirebilmek için başka ölçümlere de başvurulmaktadır (Basaran ve ark., 2020; Tonkal ve ark., 2021). Doğruluk değeri sadece yapılan tahminlerin kaçının doğru olduğunu verdiğinden dolayı karmaşıklık matrisi modelin performansını analiz etmede doğruluk değerinden farklı değerli bilgilerde sunmaktadır. Tahmin olumlu olduğu durumlarda, değerlendirilen sonuç doğru olduğunda Doğru Pozitif (DP), yanlış olduğunda Yanlış Pozitif (YP) değerleri, tahmin olumsuz olduğu durumlarda, değerlendirilen sonuç doğru olduğunda Doğru Negatif (DN), yanlış olduğunda Yanlış Negatif (YN) değerleri karmaşıklık matrisinden elde edilecek olan parametrelerdir.

Doğruluk ölçümü haricinde duyarlılık pozitif sınıfın tahmin performansını verirken, özgüllük negatif sınıfın tahmin oranını veren bir ölçümdür. Kesinlik, örneklerin kaç tanesinin gerçekte pozitif olduğunu veren bir ölçümdür. Kesinlik ve duyarlılık arasında denge sağlayan F1 ölçümü, bu iki değer

harmonik ortalamasını veren ölçümdür. Denklem 4-8 arasında performans ölçümlerine ait eşitlikler verilmektedir. (Başaran ve Çelik, 2020).

$$\text{Doğruluk} = \frac{DP+DN}{DP+YP+DN+YN} \quad (4)$$

$$\text{Duyarlılık} = \frac{DP}{DP+YN} \quad (5)$$

$$\text{Özgüllük} = \frac{DN}{YP+DN} \quad (6)$$

$$\text{Kesinlik} = \frac{DP}{DP+YP} \quad (7)$$

$$F1 = \frac{2 * \text{Kesinlik} * \text{Duyarlılık}}{\text{Kesinlik} + \text{Duyarlılık}} \quad (8)$$

Bunun yanı sıra kullanılan yöntemler beş kat çapraz doğrulama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çapraz doğrulama yönteminde veri setindeki örnekler her biri eşit beş gruba ayrılmaktadır. Dört grupta bulunan örnekler eğitim setini, kalan bir gruptaki örnekler de test setini oluşturmaktadır. Her gruptaki örnekler bir kez test setini oluşturduktan sonra çapraz doğrulama işlemi sona ermektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kamuya açık CASME-II Mİ veri seti ön işleme aşaması gerçekleştirildikten sonra geleneksel yöntemlerden gabor modeli ve veriye dayalı yöntemlerden derin öğrenme modeli olan Xception ile öznitelik çıkarma, öznitelik seçme ve doğrusal DVM sınıflandırma algoritmaları kullanılarak deneysel test sonuçları elde edilmiştir. Derin öğrenme kullanılarak yapılan deneysel ölçümlerin hepsinde Xception modeline ait parametreler Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Deneysel ölçümlerde kullanılan Xception modeline ait parametreler

Weights (ağırlıklar)	İnclude_top (tam bağlı katman kullanımı)	İnput_shape (giriş biçimi)	Batch_size (parti boyutu)	Özniteliklerin elde edildiği katman
ImageNet	False	224*224*3	12	block14_sepconv2_act

Gabor uygulamalarında, 64 farklı filtre kullanılmıştır. Gabor çekirdek boyutu (5,5) değeri, sigma bir ve üç değerleri, theta ve lamda 0^0 , 45^0 , 90^0 , 135^0 açı değerleri ve gamma 0.05 ve 0.25 değerleri, faz kayması (psi) sıfır değeri yapılan uygulamalarda kullanılmıştır.

Hem Xception derin öğrenme modelinde hem de Gabor filtreleme modelinde kullanılan sınıflandırma algoritması olan SVC’de ‘kernel’ parametre değeri ‘linear’, ‘C’ parametre değeri ‘1.0’ olarak ayarlanırken, çapraz doğrulama olarak kullanılan RepeatedKfold algoritmasında ise ‘n_splits’ değeri ‘5’, ‘n_repeats’ değeri ‘5’, ‘random state’ değeri ‘42’ olarak belirlenmiştir.

CASME-II veri setinde önışlem aşamasında farklı öznitelik ler elde etmek için, her bir video klipinde bulunan başlangıç ve tepe kareleri kullanılarak Farneback, TV-L1, TV-L1 yatay ve TV-L1 dikey optik akış görüntüleri oluşturulmuştur. Bunun yanı sıra önışleme aşamasından geçmemiş doğal görüntülerin de tepe kareleri deneylerde kullanılmıştır.

İlk deneysel çalışmada, seçilen veri setinde 94 negatif, 32 pozitif, 28 sürpriz örneklemeinden oluşan veri setinin, doğal görüntülerinin tepe kareleri ve iki farklı optik akış görüntüleri Xception ve Gabor modellerine girdi olarak verilmiştir. Buna göre 2 boyutlu görüntü verileri Xception’dan 100352 adet öznitelik ve Gabor’dan 50176 adet öznitelik çıkarılarak sınıflandırılmıştır. Bu iki modelden alınan öznitelik haritalarının doğrusal DVM sınıflandırma performanslarının sonuçları Çizelge 3 de verilmiştir.

Çizelge 3. Modellerin arttırılmamış CASME-II veri tabanına uygulanması ve doğrusal DVM ile sınıflandırma sonuçları

Model	Öznitelik Çıkarma	Doğruluk	Duyarlılık	Özgüllük	Kesinlik	F1
Xception	Normal	0.6766	0.5818	0.7909	0.6138	0.5944
Gabor	Görüntü	0.6922	0.6016	0.8008	0.6166	0.6075
Xception	Farneback	0.6325	0.4878	0.7439	0.5869	0.5112
Gabor		0.6013	0.5056	0.7528	0.5188	0.5112
Xception	TVL1_Dual	0.6597	0.5543	0.7772	0.6319	0.5795
Gabor		0.5870	0.4922	0.7461	0.5101	0.4992
Xception	TVL1_u	0.6442	0.5363	0.7682	0.5576	0.5447
Gabor		0.7870	0.7403	0.8701	0.7318	0.7354
Xception	TVL1_v	0.7805	0.7246	0.8623	0.7670	0.7430
Gabor		0.8260	0.7919	0.8960	0.8003	0.7952

Çizelge 3' deki CASME-II veri setinde TV-L1 dikey görüntülerinden elde edilen özniteliklerin sınıflandırma ölçümleri iki model içinde en yüksek performansı göstermiştir. Buna göre Gabor modeli, doğruluk 0.8260, duyarlılık değeri 0.7919 özgüllük değeri 0.8960, kesinlik değeri 0.8003 ve f1 değeri 0,7952 ile en başarılı performansı göstermiştir.

İkinci deneysel çalışmada veri tabanı, veri arttırma tekniği ile her sınıf en büyük örnekleme sahip negatif sınıfa eşitlenerek, her sınıf 94 adet örnekleme sahip olmuştur. Böylece veri seti dengeli hale getirilip, sınıflandırıcının daha iyi sınıflandırması beklenmektedir (Liu ve ark., 2019). Arttırılmış veri tabanının, doğal biçimi ve farklı optik akış öznitelikleri Xception ve Gabor modellerine girdi olarak verilmiştir. ESA ve Gabor modellerinden alınan özniteliklerin doğrusal DVM sınıflandırma performanslarının sonuçları Çizelge 4' de verilmiştir.

Çizelge 4. Modellerin dengeli arttırılmış CASME-II veri setine uygulanması ve doğrusal DVM ile sınıflandırma sonuçları

Model	Öznitelik Çıkarma	Doğruluk	Duyarlılık	Özgüllük	Kesinlik	F1
Xception	Normal	0.7504	0.7504	0.8752	0.7501	0.7492
Gabor	Görüntü	0.7447	0.7447	0.8723	0.7430	0.7428
Xception	Farneback	0.6723	0.6723	0.8362	0.6722	0.6722
Gabor		0.6191	0.6191	0.8096	0.6167	0.6173
Xception	TVL1_Dual	0.6979	0.6979	0.8489	0.6983	0.6980
Gabor		0.5837	0.5837	0.7918	0.5879	0.5822
Xception	TVL1_u	0.6709	0.6709	0.8355	0.6679	0.6667
Gabor		0.7099	0.7099	0.8550	0.7092	0.7061
Xception	TVL1_v	0.7702	0.7702	0.8851	0.7707	0.7700
Gabor		0.8291	0.8291	0.9145	0.8293	0.8287

Çizelge 4' deki arttırılmış dengeli veri setinde TV-L1 dikey görüntülerinden elde edilen özniteliklerin sınıflandırma ölçümleri iki model içinde en yüksek performansı göstermiştir. Buna göre Gabor modeli, doğruluk değeri 0.8291, duyarlılık değeri 0.8291 özgüllük değeri 0.9145, kesinlik değeri 0.8293 ve f1değeri 0.8287 ile en başarılı performansı göstermiştir. Veri arttırma tekniği ve dengeli örneklemenin sonrasında bir önceki deneysel çalışmada elde edilen en başarılı performanslar karşılaştırıldığında duyarlılık ve F1 ölçümlerinde %3 den daha fazla bir performans artışına, bazı modellerde ise %16'den fazla F1 artışı, %18'den fazla duyarlılık artışı ölçülerek modelin performansına olumlu etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Üçüncü deneysel çalışmada, öznitelik seçim yöntemi kullanılarak Mİ tanımada en verimli öznitelikler filtrelenerek, modelin performansı arttırılması hedeflenmiştir. Öznitelik seçimi algoritmalarından olan ÇDÖÖE algoritması kullanılıp, algoritmada 'estimator' parametresi DVM

sınıflandırıcısı, ‘step’ parametresi ‘1000’, ‘scoring’ parametre değeri ‘accuracy’, ‘verbose’ parametresi ise ‘1’ olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu öznitelikler doğrusal DVM sınıflandırıcı ile sınıflandırılmıştır. Çizelge 5’de arttırılmış dengeli CAME-II veri setinde TV-L1_dikey optik akış görüntüleri ile birlikte kullanılan Xception modelinin, geleneksel ESA modellerinin ve Gabor modelinin performansları karşılaştırmalı olarak sunulmaktadır.

Çizelge 5. Filtrelenmiş TVL1_dikey öznitelik haritalarının Xception ve Gabor modelleri ve Doğrusal DVM ile sınıflandırma sonuçları

Model	Öznitelik Seçimi	Doğruluk	Duyarlılık	Özgüllük	Kesinlik	F1
Xception		0.9248	0.9248	0.9624	0.9251	0.9249
Gabor		0.9170	0.9170	0.9585	0.9173	0.9168
VGG-16	ÇDÖÖE	0.8709	0.8709	0.9355	0.8704	0.8705
ResNet-50		0.9092	0.9092	0.9546	0.9093	0.9091
MobilNet		0.8936	0.8936	0.9468	0.8944	0.8936

İncelenen modeller arasında en performanslı ölçümleri veren Xception modelinden elde edilen en iyi performans ölçümleri doğruluk 0.9184, duyarlılık 0.9184, özgüllük 0.9592, kesinlik 0.9190 ve F1 0.9185 olarak ölçülmüştür. Başlangıçta yapılan deneysel çalışmada (Çizelge 3) en başarılı performansı veren Gabor modeli ile son deneysel çalışmada elde edilen en performanslı ölçümler (Çizelge 5) karşılaştırılması Çizelge 6’da verilmiştir.

Çizelge 6. En performanslı ilk ve son deneysel çalışmanın karşılaştırılması

Model	Öznitelik Çıkarma	Doğruluk	Duyarlılık	Özgüllük	Kesinlik	F1
Xception	TVL1_v	0.9248	0.9248	0.9624	0.9251	0.9249
Gabor		0.8260	0.7919	0.8960	0.8003	0.7952

Çizelge 3’deki en başarılı ölçüm ile karşılaştırıldığında modelin son ölçümlerinde %9.88 doğruluk, %13.29 duyarlılık, %6.64 özgüllük, %12.48 kesinlik, %12.97 F1 oranında bir performans artışı gözlemlenmektedir.

Mİ tanıma görevi kullanıldığında güvenlikten ticarete, sağlıktan eğitime birçok alanda fayda sağlayabilir. Yapılan ilk deneysel çalışmada CASME-II veri seti üzerinde kullanılan modellerin ölçümlerinde F1 ve duyarlılık sonuçları ile doğruluk sonuçları arasında büyük farklar olduğu görülmektedir. Bunun sebebi negatif sınıfa ait verilerin diğer iki sınıfa ait verilerin toplamından daha büyük olması ve sınıflar arasında veri dengesizliğidir. Baskın örneklemeli sınıfların bulunduğu veri setlerinde performans değerlendirilmesinde doğruluk ölçüsünün tek başına kullanılması önyargıya sebep olabilmektedir. Dolayısıyla F1 ve duyarlılık ölçümleri, dengesiz örneklemeli sınıfları bulunan veri setlerinin sınıflandırılmasında tüm sınıfların eşit derecede iyi tahmin edilip edilmediği hakkında dengeli bir yargı sunmaktadır (Yap ve ark., 2018; See ve ark., 2019). Her ne kadar doğruluk oranları kısmen iyi gibi görünse de F1 ve duyarlılık değerleri bazı ölçümlerde %50’nin altında bulunmaktadır. Diğer ölçümlerinde başarısını artırıp daha tutarlı ölçümler elde etmek için veri arttırma tekniği kullanılarak veri tabanı çoğaltılıp dengelenmiştir. Veri arttırma sonrası artan başarı oranlar incelendiğinde; farneback görüntüleri kullanılarak yapılan Xception modeli deneyinde %16 yı geçen F1 ve %18’i geçen duyarlılık ölçümleri görülmektedir. Buradan veri arttırma tekniğinin kullanılması ve dengeli örneklemeyle sahip sınıflandırmanın Mİ tanıma performansını arttırdığı (Uzun ve ark., 2022), Xception ve Gabor modelinde olumlu etkiler yaptığı sonucuna ulaşılmaktadır.

Öznitelik seçim algoritması kullanıldığında ise Mİ tanımada verimliliği daha fazla olan özniteliklerin filtrelenerek seçilmesiyle yapılan sınıflandırmalarda, ölçüm sonuçlarının performansında önemli artışlar gözlemlenmiştir. ÇDÖÖE öznitelik seçim algoritması kullanılarak yapılan ölçümlerde

başlangıçtaki en iyi ölçümlerle kıyaslandığında %9.24 doğruluk, %12.65 duyarlılık ve %12.33 F1 oranında performansa katkı sağladığı gözlemlenmiştir. Öznitelik seçimi yapılarak elde edilen verilerin, Mİ tanıma performansını arttırmada olumlu etkisi olduğu deneyler sonucu gözlemlenmiştir.

Xception teknolojisinin avantajlarından biriside Inception modelinde tasarlandığı gibi derinlemesine ayrıştırılabilir evrişim ve noktasal evrişim kullanarak parametre sayısını büyük oranda azaltıp hesaplama yükünü azaltmaktadır. Xception modelinde ise kendisinden önceki versiyonu olan Inception dan farkı, önce noktasal evrişim ardından derinlemesine ayrıştırılabilir evrişim uygulamaktadır. Böylece Inception modelinden hem daha az parametre kullanmakta hem de doğruluk ve hata oranı performansında daha başarılı olmaktadır (Chollet, 2017).

Çalışma (Allaert ve ark., 2022) 'de farklı optik akış yöntemleri karşılaştırıldığında farklı blok boyutlarında en sağlam iki yöntem olarak Farneback ve TV-L1 sonucuna varılmıştır. Bundan dolayı çalışmamızda bu iki yöntem haricinde TV-L1 yatay ve dikey görüntüleri de Mİ tanıma görevinde kullanılmıştır. Optik akış tekniğinin kullanılmasının başka bir avantajı da video kare dizisinin tamamının kullanılmasına yerine, hareketin başladığı ve zirve yaptığı kareler kullanılarak hesaplama yükü azaltılmaktadır. En başarılı sonuçların TV-L1 dikey bileşenlere sahip görüntülerden elde edildiği gözlemlenmiştir. Önerilen model yapısının dezavantajlarından birisi ise ÇDÖÖE algoritmasının özyinelemeli yapısından dolayı öznitelik haritaları arttıkça filtreleme süresi de doğru orantılı olarak artmaktadır. Farklı öznitelik seçim algoritmaları kullanılarak model maliyetinde ve başarısında daha verimli sonuçlar elde edilebilir. Mİ tanıma görevinde elde edilen diğer son teknoloji modeller ile önerdiğimiz modelin karşılaştırılması Çizelge 6'de sunulmuştur. Buna göre modelimizin rekabetçi ve sonuçların tatmin edici olduğu görülmektedir.

Çizelge 7. Önerilen çalışmanın en son modellerle karşılaştırılması

Metot	Doğruluk	F1	Veri Tabanı
OFF-ApexNet (Gan ve ark., 2019)	0.746	0.710	SMIC+CASME-II +SAMM
STSTNet+GA (Liu ve ark., 2021)	0.859	0.837	SMIC+CASME-II +SAMM
Deep3DCANN (Thuseethan ve ark., 2022)	0.86	0.84	CASME II
ESA+PSO+DVM (Uzun ve ark., 2022)	0.8784	0.8765	SMIC+CASME-II +SAMM
DFN (Sun ve ark., 2022)	0.9028	0.8923	CASME II
Önerilen model	0.9248	0.9249	CASME II

Bu makale yazıldığı sırada Mİ konusuna ait literatür incelendiğinde , Mİ'ye ait farklı optik akış görüntülerin ve bu görüntülere ait bileşenlerin incelendiği sınırlı sayıda çalışma olduğu gözlemlenmiştir. Mİ optik akış görüntülerinin farklı bileşenleri de Mİ tanımaya yönelik daha zengin özellikler içerebileceği literatüre katkı olarak düşünülebilir.

Bu makelede bulunan sınırlamalar Mİ sınıf etiketleri ve labaratuvar ortamından elde edilmiş Mİ örnekleridir. Modelin öğrendiği sınıf etiketleri deneylerde kullanılan mevcut etiketlerdir. Farklı bir Mİ duygusu içeren bir sınıf etiketi için çözüm üretmeyeceğidir. Bir diğer husus ise veri seti örnekleri labaratuvar ortamında katılımcılardan yüz ifadelerini bastırmaları ve kontrol etmeleri istendiğinden, gerçek hayattaki Mİ örnekleri koşullanma olmadan doğal olacağı için öğrenilen örneklerden farklı olabileceği göz önüne alınmalıdır.

SONUÇ

Mİ tanıma görevi için önerilen bu çalışmada sırasıyla önışleme, öznitelik çıkarma, öznitelik seçimi ve sınıflandırma işlemleri gerçekleştirilen bir model yapısı sunulmuştur. Görüntülerden yüz bölgesi çıkarıldıktan sonra önışleme aşamasında optik akış yöntemleri öznitelik çıkarma aşamasında geleneksel ve derin öğrenme yöntemleri, öznitelik seçim aşamasında çapraz doğrulama ile özyinelemeli öznitelik eleme algoritmaları kullanılmıştır. Sınıflandırma aşamasında DVM sınıflandırma algoritması kullanılarak sonuçlar diğer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızın özgünlüklerinden biri Mİ tanıma görevinde çapraz doğrulama ile özyinelemeli öznitelik eleme algoritmasının geleneksel ve derin öğrenme yöntemleri ile birlikte deneysel çalışmalarda kullanılıp karşılaştırılmasıdır. Bu çalışmada Mİ veri seti görüntülerinin yapay olarak artırılarak sınıfların dengelenmesi sonucunda performans ölçümlerinin başarısının artırılabilceği kanıtlanmıştır. Veri artırma yöntemine bağlı olarak modelin performansında F1 ve duyarlılık ölçüm değerlerinde %3'ten fazla bir artış görülmüştür. Veri seti farklılıklarına göre %16'den fazla F1 artışı, %18'den fazla duyarlılık ölçüm artışı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak önerilen modelimiz ile başlangıçta elde edilen deneysel test sonuçlarına göre en başarılı ölçümler referans alındığında %9.88 doğruluk, %13.29 duyarlılık, %6.64 özgüllük, %12.48 kesinlik, %12.97 F1 oranında model performansını artırılmıştır. Modelimiz, CASME-II veri seti üzerinde 0.9248 doğruluk, 0.9249 F1 ve 0.9248 duyarlılık değerleri elde ederek en yüksek sınıflandırma doğruluğu sağlamıştır. Ek olarak özgüllük ölçüm değeri 0.9624'ye, kesinlik ölçüm değeri 0.9251'e ulaşmıştır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye numaralandırma sırasında göre katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Adegun, I. P., & Vadapalli, H. B. (2020). Facial micro-expression recognition: A machine learning approach. *Scientific African*, 8, e00465. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00465>
- Ahadit, A. B., & Jatoth, R. K. (2022). A novel multi-feature fusion deep neural network using HOG and VGG-Face for facial expression classification. *Machine Vision and Applications*, 33(4), 55. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1007/s00138-022-01304-y>
- Allaert, B, Ward, I. R., Bilasco, I. M., Djeraba, C., & Bennamoun, M. (2022). A comparative study on optical flow for facial expression analysis. *Neurocomputing*, 500, 434–448. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neucom.2022.05.077>
- Allaert, Benjamin, Ward, I. R., Bilasco, I.-M., Djeraba, C., & Bennamoun, M. (2019). Optical flow techniques for facial expression analysis: Performance evaluation and improvements.
- Başaran, E., Cömert, Z., & Çelik, Y. (2020). Convolutional neural network approach for automatic tympanic membrane detection and classification. *Biomedical Signal Processing and Control*, 56, 101734.
- Basaran, E., Cömert, Z., Çelik, Y., Budak, Ü., & Sengür, A. (2020). Otitis media diagnosis model for tympanic membrane images processed in two-stage processing blocks. *IOP Sci*, 14, 1–27.
- Ben, X., Ren, Y., Zhang, J., Wang, S.-J., Kpalma, K., Meng, W., & Liu, Y.-J. (2021). Video-based Facial Micro-Expression Analysis: A Survey of Datasets, Features and Algorithms. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2021.3067464>
- Bozkurt, F. Skin lesion classification on dermatoscopic images using effective data augmentation and pre-trained deep learning approach. *Multimed Tools Appl* 82, 18985–19003 (2023).

- Cai, L., Li, H., Dong, W., & Fang, H. (2022). Micro-expression recognition using 3D DenseNet fused Squeeze-and-Excitation Networks. *Applied Soft Computing*, 119, 108594. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.asoc.2022.108594>
- Chollet, F. (2017). Xception: Deep learning with depthwise separable convolutions. İçinde *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (ss. 1251–1258).
- Cortes, C., & Vapnik, V. (1995). Support-vector networks. *Machine Learning*, 20(3), 273–297. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1007/BF00994018>
- Fan, L., He, J., Zheng, Y., Nie, Y., Chen, T., & Zhang, H., “Facial micro-expression recognition impairment and its relationship with social anxiety in internet gaming disorder”, *Curr. Psychol.*, 2022, doi: 10.1007/s12144-022-02958-7.
- Farneback, G. (2003). Two-frame motion estimation based on polynomial expansion. İçinde *Scandinavian conference on Image analysis* (ss. 363–370). Springer.
- Gan, Y S, See, J., Khor, H.-Q., Liu, K.-H., & Liong, S.-T. (2022). Needle in a Haystack: Spotting and recognising micro-expressions “in the wild”. *Neurocomputing*, 503, 283–298. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neucom.2022.06.101>
- Gan, Yee Siang, Liong, S.-T., Yau, W.-C., Huang, Y.-C., & Tan, L.-K. (2019). OFF-ApexNet on micro-expression recognition system. *Signal Processing: Image Communication*, 74, 129–139.
- Gao, T., Zhao, X. M., Chen, T., Liu, Z. W., & Ni, C. (2017). Face description based on adaptive local weighted Gabor comprehensive histogram feature. *Multimedia Tools and Applications*, 76(10), 12893–12916. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1007/s11042-016-3701-y>
- Hurley, C. M., Anker, A. E., Frank, M. G., Matsumoto, D., & Hwang, H. C. (2014). Background factors predicting accuracy and improvement in micro expression recognition. *Motivation and emotion*, 38(5), 700–714.
- Jirik, M., Ryba, T., & Zelezny, M. (2011). Texture based segmentation using graph cut and Gabor filters. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 21, 258–261.
- Karcioglu, A. A., & Aydin, T. (2019, April). Sentiment analysis of Turkish and english twitter feeds using Word2Vec model. In 2019 27th Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU) (pp. 1-4). IEEE
- Lee, Y.-C., & Chen, C.-H. (2009). Feature Extraction for Face Recognition Based on Gabor Filters and Two-Dimensional Locality Preserving Projections. İçinde *2009 Fifth International Conference on Intelligent Information Hiding and Multimedia Signal Processing* (ss. 106–109). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/IIH-MSP.2009.210>
- Li, Y., Huang, X., & Zhao, G. (2020). Joint Local and Global Information Learning With Single Apex Frame Detection for Micro-Expression Recognition. *IEEE Transactions on Image Processing*, 30, 249–263.
- Lin, C., Long, F., Huang, J., & Li, J. (2018). Micro-Expression Recognition Based on Spatiotemporal Gabor Filters. İçinde *2018 Eighth International Conference on Information Science and Technology (ICIST)* (ss. 487–491). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/ICIST.2018.8426088>
- Liong, S.-T., Gan, Y. S., See, J., Khor, H.-Q., & Huang, Y.-C. (2019). Shallow triple stream three-dimensional cnn (ststnet) for micro-expression recognition. İçinde *2019 14th IEEE International Conference on Automatic Face & Gesture Recognition (FG 2019)* (ss. 1–5). IEEE.
- Liu, K.-H., Jin, Q.-S., Xu, H.-C., Gan, Y.-S., & Liong, S.-T. (2021). Micro-expression recognition using advanced genetic algorithm. *Signal Processing: Image Communication*, 93, 116153. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.image.2021.116153>
- Liu, N., Liu, X., Zhang, Z., Xu, X., & Chen, T. (2020). Offset or Onset Frame: A Multi-Stream Convolutional Neural Network with CapsuleNet Module for Micro-expression Recognition. İçinde *2020 5th International Conference on Intelligent Informatics and Biomedical Sciences (ICIIBMS)* (ss. 236–240). IEEE.
- Liu, Y., Du, H., Zheng, L., & Gedeon, T. (2019). A neural micro-expression recognizer. İçinde *2019 14th IEEE international conference on automatic face & gesture recognition (FG 2019)* (ss. 1–4). IEEE.

- Mustaqim, A. Z., Adi, S., Pristyanto, Y., & Astuti, Y. (2021). The Effect of Recursive Feature Elimination with Cross-Validation (RFECV) Feature Selection Algorithm toward Classifier Performance on Credit Card Fraud Detection. İçinde *2021 International Conference on Artificial Intelligence and Computer Science Technology (ICAICST)* (ss. 270–275). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/ICAICST53116.2021.9497842>
- Ou, J., Bai, X.-B., Pei, Y., Ma, L., & Liu, W. (2010). Automatic Facial Expression Recognition Using Gabor Filter and Expression Analysis. İçinde *2010 Second International Conference on Computer Modeling and Simulation* (C. 2, ss. 215–218). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/ICCMS.2010.45>
- Peng, M., Wang, C., Chen, T., Liu, G., ve Fu, X., “Dual temporal scale convolutional neural network for micro-expression recognition”, *Front. Psychol.*, c. 8, s. 1745, 2017.
- Porter, S., Ten Brinke, L., & Wallace, B. (2012). Secrets and lies: Involuntary leakage in deceptive facial expressions as a function of emotional intensity. *Journal of Nonverbal Behavior*, 36(1), 23–37.
- Rose, N. (2006). Facial Expression Classification using Gabor and Log-Gabor Filters. İçinde *7th International Conference on Automatic Face and Gesture Recognition (FG06)* (ss. 346–350). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/FGR.2006.49>
- See, J., Yap, M. H., Li, J., Hong, X., & Wang, S. (2019). MEGC 2019 – The Second Facial Micro-Expressions Grand Challenge. İçinde *2019 14th IEEE International Conference on Automatic Face & Gesture Recognition (FG 2019)* (ss. 1–5). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/FG.2019.8756611>
- Stanley, J. T., & Webster, B. A. (2019). A comparison of the effectiveness of two types of deceit detection training methods in older adults. *Cognitive Research: Principles and Implications*, 4(1), 26. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1186/s41235-019-0178-z>
- Sun, M.-X., Liong, S.-T., Liu, K.-H., & Wu, Q.-Q. (2022). The heterogeneous ensemble of deep forest and deep neural networks for micro-expressions recognition. *Applied Intelligence*, 52(14), 16621–16639. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1007/s10489-022-03284-y>
- Sun, Z., Hu, Z., Zhao, M., & Li, S. (2020). Multi-scale active patches fusion based on spatiotemporal LBP-TOP for micro-expression recognition. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 71, 102862. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jvcir.2020.102862>
- Takalkar, M., Xu, M., Wu, Q., & Chaczko, Z. (2018). A survey: facial micro-expression recognition. *Multimedia Tools and Applications*, 77(15), 19301–19325.
- Takalkar, M., Xu, M., ve Chaczko, Z. “Manifold feature integration for micro-expression recognition”, *Multimed. Syst.*, c. 26, sayı 5, ss. 535–551, 2020, doi: 10.1007/s00530-020-00663-8.
- Tang, J., Li, L., Tang, M., & Xie, J. (2022). A novel micro-expression recognition algorithm using dual-stream combining optical flow and dynamic image convolutional neural networks. *Signal, Image and Video Processing*. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1007/s11760-022-02286-0>
- Thuseethan, S., Rajasegarar, S., & Yearwood, J. (2022). Deep3DCANN: A Deep 3DCNN-ANN Framework for Spontaneous Micro-expression Recognition. *Information Sciences*. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ins.2022.11.113>
- Tonkal, Ö., Polat, H., Başaran, E., Cömert, Z., & Kocaoğlu, R. (2021). Machine Learning Approach Equipped with Neighbourhood Component Analysis for DDoS Attack Detection in Software-Defined Networking. *Electronics*, 10(11), 1227.
- Ukil, A. (2007). Support Vector Machine BT - Intelligent Systems and Signal Processing in Power Engineering. İçinde A. Ukil (Ed.) (ss. 161–226). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Tarihinde adresinden erişildi https://doi.org/10.1007/978-3-540-73170-2_4
- Uzun, M. Z., Celik, Y., & Basaran, E. (y.y.). Micro-Expression Recognition by Using CNN Features with PSO Algorithm and SVM Methods. *learning*, 2(3), 5–8, (2022).
- Wang, C., Xiao, Z., & Wu, J. (2019). Functional connectivity-based classification of autism and control using SVM-RFECV on rs-fMRI data. *Physica Medica*, 65, 99–105. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2019.08.010>

- Warren, G., Schertler, E., & Bull, P. (2009). Detecting deception from emotional and unemotional cues. *Journal of Nonverbal Behavior*, 33(1), 59–69.
- Xia, B., Wang, W., Wang, S., & Chen, E. (2020). Learning from Macro-expression: a Micro-expression Recognition Framework. İçinde *Proceedings of the 28th ACM International Conference on Multimedia* (ss. 2936–2944).
- Yan, W.-J., Li, X., Wang, S.-J., Zhao, G., Liu, Y.-J., Chen, Y.-H., & Fu, X. (2014). CASME II: An improved spontaneous micro-expression database and the baseline evaluation. *PloS one*, 9(1), e86041.
- Yan, W.-J., Wu, Q., Liang, J., Chen, Y.-H., & Fu, X. (2013). How Fast are the Leaked Facial Expressions: The Duration of Micro-Expressions. *Journal of Nonverbal Behavior*, 37(4), 217–230. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1007/s10919-013-0159-8>
- Yap, M. H., See, J., Hong, X., & Wang, S.-J. (2018). Facial Micro-Expressions Grand Challenge 2018 Summary. İçinde *2018 13th IEEE International Conference on Automatic Face & Gesture Recognition (FG 2018)* (ss. 675–678). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/FG.2018.00106>
- Zhao, Y., & Xu, J. (2020). Compound Micro-Expression Recognition System. İçinde *2020 International Conference on Intelligent Transportation, Big Data & Smart City (ICITBS)* (ss. 728–733). Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/10.1109/ICITBS49701.2020.00161>
- Zhou, L., Mao, Q., Huang, X., Zhang, F., & Zhang, Z. (2022). Feature refinement: An expression-specific feature learning and fusion method for micro-expression recognition. *Pattern Recognition*, 122, 108275. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.patcog.2021.108275>
- Zhou, L., Mao, Q., & Xue, L. (2019). Cross-database micro-expression recognition: a style aggregated and attention transfer approach. İçinde *2019 IEEE International Conference on Multimedia & Expo Workshops (ICMEW)* (ss. 102–107). IEEE.
- Zhou, Y., Song, Y., Chen, L., Chen, Y., Ben, X., & Cao, Y. (2022). A novel micro-expression detection algorithm based on BERT and 3DCNN. *Image and Vision Computing*, 119, 104378. Tarihinde adresinden erişildi <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imavis.2022.104378>

Atf İçin: Taşyürek, M. ve Gül, E. (2023). Nesne Tespitinde En Uygun Modelin Seçimi İçin Görüntüler Üzerinde Evrişimli Sinir Ağları ile Çekişmeli Saldırı Tespiti. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2353-2363.

To Cite: Tasyurek, M. & Gul, E. (2023). Adversarial Attack Detection with Convolutional Neural Networks on Images for Selection of the Most Suitable Model in Object Detection. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2353-2363.

Nesne Tespitinde En Uygun Modelin Seçimi İçin Görüntüler Üzerinde Evrişimli Sinir Ağları ile Çekişmeli Saldırı Tespiti

Murat TAŞYÜREK^{1*}, Ertuğrul GÜL²

Öne Çıkanlar:

- Çekişmeli saldırı tespiti
- Nesne tespiti için evrişimli sinir ağı seçimi
- YOLO v5 ve Faster R-CNN modellerinin transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz eğitimi

Anahtar Kelimeler:

- Nesne tespiti
- Çekişmeli saldırı
- Faster R-CNN
- YOLO v5
- ESA

ÖZET:

Görüntülerdeki nesnelerin yüksek doğrulukta tespit edilmesi gerçek zamanlı uygulamalar başta olmak üzere birçok uygulama alanı için önemli bir konudur. Evrişimli sinir ağları ise son yıllarda nesne tespiti uygulamalarında kullanılan ve yüksek doğrulukta başarılar elde edilebilen derin öğrenme tabanlı yöntemlerdir. Klasik Evrişimli sinir ağları orijinal görüntülerdeki nesnelere yüksek doğruluk tespit edebilmesine rağmen ağların FGSM, PGD ve APGD gibi çekişmeli saldırıların uygulandığı görüntülerde başarımları yetersiz kalabilmektedir. Bu problemin üstesinden gelmek için saldırılı görüntülerde nesne tespiti için farklı modeller ve ön işlemler geliştirilmektedir. Ancak saldırılı ve saldırısız durumlar için modellerin başarımları değişebilmektedir. Bu yüzden saldırının olup olmadığının tespit edilmesi ve duruma göre en başarılı modelin seçilmesi gerekmektedir. Bahsedilen problemi çözmek için bu çalışmada görüntülerde çekişmeli saldırı olup olmadığının evrişimli sinir ağları kullanarak tespit edilmesi gerçekleştirilmektedir. Çalışma kapsamında YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz olarak çekişmeli saldırı tespiti görevi için eğitilmiştir. Deneysel sonuçlar transfer öğrenmeli Faster R-CNN modelinin 0.971 f1 skoru ile dört model arasından en başarılı sonucu elde ettiğini göstermektedir.

Adversarial Attack Detection with Convolutional Neural Networks on Images for Selection of the Most Suitable Model in Object Detection

Highlights:

- Adversarial attack detection
- Convolutional neural network selection for object detection
- Training of YOLO v5 and Faster R-CNN models with and without transfer learning

Keywords:

- Object detection
- Adversarial attack
- Faster R-CNN
- YOLO v5
- CNN

ABSTRACT:

Object detection on images with high accuracy is an essential issue for many application areas, especially real-time applications. Convolutional neural networks, on the other hand, are deep learning-based methods that have been used in object detection applications in recent years and have achieved high accuracy. However, although classical convolutional neural networks can detect objects on original images with high accuracy, their performance may be insufficient on images where adversarial attacks such as FGSM, PGD, and APGD are applied. To overcome this problem, different models and pre-processes are developed for object detection on attacked images. However, the performance of the models may vary for attacked and non-attacked cases. Therefore, it is necessary to determine whether the attack occurred and select the most successful model according to the case. To solve the problem mentioned above, detect whether there is an adversarial attack on the images using convolutional neural networks has been performed in this study. Within the scope of the study, YOLO v5 and Faster R-CNN models were trained for the adversarial attack detection task with and without transfer learning. Experimental results show that the Faster R-CNN model with transfer learning achieved the most successful result among the four models with an f1 score of 0.971.

¹Murat TAŞYÜREK ([Orcid ID: 0000-0001-5623-8577](https://orcid.org/0000-0001-5623-8577)), Kayseri Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık ve Tasarım Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Kayseri, Türkiye

²Ertuğrul GÜL ([Orcid ID: 0000-0002-5591-3435](https://orcid.org/0000-0002-5591-3435)), Kayseri Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık ve Tasarım Fakültesi, Yazılım Mühendisliği Bölümü, Kayseri, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Murat TAŞYÜREK, e-mail: murattasyurek@kayseri.edu.tr

GİRİŞ

Nesne tespiti, görüntülerdeki araç, insan, kedi, yüz ve tabela gibi bilinen bir veya birden fazla sınıftaki nesne örneklerinin tespit edilmesidir. Görüntülerde genellikle az sayıda nesne bulunur, ancak bu nesnelerin çok sayıda olası konumu ve nesnelerin görüntü üzerindeki çok sayıda olası ölçeği bulunmaktadır (Amit ve ark., 2020). Son yıllarda nesne tespiti uygulamalarının tıp (Shelatkar ve ark., 2022; Terzi ve Terzi, 2022), askeri (Du ve ark., 2022; Liu ve ark., 2022) ve endüstri (Wang ve ark., 2021; Guo ve ark., 2022) gibi birçok alanda kullanımı büyük oranda artmıştır. Bu yüzden özellikle gerçek zamanlı uygulamalarda nesnelerin doğru olarak tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Evrişimli sinir ağları nesne tespiti için kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Gu ve ark., 2022). Evrişimli sinir ağları, bilgisayarla görü ve görüntü işleme gibi uygulama alanlarında yaygın olarak kullanılan derin öğrenme yöntemleridir. Evrişimli sinir ağları nesne tespitinin yanı sıra sınıflandırma ve segmentasyon uygulamaları içinde sıkça kullanılmaktadır (Längkvist ve ark., 2016; Balamurugan ve Gnanamanoharan, 2023).

Son yıllarda internet teknolojilerinin hızla gelişmesi ile dijital görüntülerin kullanımı ve dağıtımı hızla artmış, görüntülere erişim kolaylaşmıştır. Bu yüzden görüntülerin paylaşılması veya dağıtılması sırasında çekişmeli saldırı gibi istenmeyen birçok manipülasyon ile karşılaşılabilir. Ancak, klasik evrişimli sinir ağları orijinal görüntüler üzerinde başarılı sonuçlar elde ederken saldırıya uğrayan görüntüler üzerinde nesne tespitini yeterli doğrulukta gerçekleştiremeye bilmektedir. Çekişmeli saldırı, belirli görevler için eğitilmiş modellerin yanlış tahmin yapmasına neden olabilmektedir. Literatürde modellerin tahminlerinde hata yapması için birçok çekişmeli saldırı önerilmiştir. Fast gradient signed method (FGSM) (Goodfellow ve ark., 2014), Goodfellow ve arkadaşları tarafından, girdi görüntüsünün kayıp gradyanını kullanarak çekişmeli örneğinin oluşturulması için önerilmiştir. Kurakin ve arkadaşları, FGSM'yi küçük bir adım boyutuyla uygulayarak FGSM'nin yinlemeli bir sürümü olan Iterative Fast Gradient Sign Method (I-FGSM) (Kurakin ve ark., 2016)'yi önermiştir. Momentum Iterative Fast Gradient Sign Method (MI-FGSM) (Dong ve ark., 2018), I-FGSM'ye momentum terimi eklenerek Dong ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Projected Gradient Descent (PGD) (Madry ve ark., 2017) saldırısı ise Madry ve diğerleri tarafından önerilen FGSM saldırısının güçlü yinelemeli bir versiyonudur. PGD saldırısının adım boyutu ve objektif fonksiyon sorunlarını ele alan ve PGD saldırısının uzantısı olan Auto Projected Gradient Descent (APGD) (Croce ve Hein, 2020) ise, Govindarajulu ve arkadaşları tarafından önerilmiştir.

Saldırı durumuna göre ağların başarımlarının değişmesinden dolayı, nesne tespiti uygulamalarında görüntüde saldırı olup olmadığının tespit edilerek kullanılacak ağın belirlenmesi önemli bir hale gelmiştir. Yapılan son çalışmada, çekişmeli saldırı uygulanmış görüntülerde nesne tespiti için ayrık dalgacık dönüşümü ve gri tonlama tabanlı derin öğrenme yöntemleri önerilmiştir (Tasyurek ve Gul, 2023). Gerçekleştirilen deneylerde, klasik derin öğrenme yöntemleri saldırısız görüntülerde daha iyi sonuçlar üretirken ayrık dalgacık dönüşümü ve gri tonlama tabanlı derin öğrenme yöntemleri çekişmeli saldırı uygulanmış görüntülerde daha iyi sonuçlar üretmiştir. Yapılan çalışmadaki deney sonuçları dikkate alındığında, saldırı durumuna göre derin öğrenme modelinin seçilmesi daha yüksek doğrulukta nesne tespitinin gerçekleştirilebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, görüntünün türüne göre nesne tespitinde kullanılacak ağların seçimi için evrişimli sinir ağları ile görüntüler üzerinde çekişmeli saldırı uygulanıp uygulanmadığının tespiti gerçekleştirilmiştir. Evrişimli sinir ağları olarak son yıllarda en çok kullanılan derin öğrenme ağlarından olan YOLO v5 (Jocher ve ark., 2020) ve Faster R-CNN (Ren ve ark., 2015) modelleri kullanılmıştır. Faster R-CNN modeli bölge tabanlı modellerin başında gelmekteyken, YOLO ise düşük hesaplama

maliyeti ve yüksek doğruluk oranına sahiptir. Bu yüzden bu iki model çekişmeli saldırı tespitinde kullanılmak üzere evrişimli sinir ağı olarak seçilmiştir. Çalışma kapsamında öncelikle doğal sahne görüntülerinden oluşan veri setindeki görüntülerin belirli bir kısmına FGSM, PGD ve APGD çekişmeli saldırıları ayrı ayrı uygulanmıştır. Böylelikle içerisinde orijinal ve çeşitli çekişmeli görüntülerden oluşan ve çekişmeli saldırı tespiti için kullanılacak veri seti oluşturulmuştur. Veri setinin oluşturulmasından sonra, YOLO v5 ve Faster R-CNN evrişimli sinir ağları çalışma kapsamında transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmez olarak ayrı ayrı eğitilmiştir. Eğitilmiş ağlar daha sonra veri kümesindeki test veri seti ile test edilmiştir. Deneysel sonuçta en yüksek başarı oranı 0.971 f1 skoru ile transfer öğrenmeli Faster R-CNN ağında elde edilirken en düşük başarı oranı 0.960 f1 skoru ile transfer öğrenmesiz YOLO v5 ağında elde edilmiştir. Deneysel sonuçlar görüntülerde çekişmeli saldırı olup olmadığının tespitinin yüksek oranda doğruluk ile elde edilebileceğini göstermektedir. Bu yüzden, nesne tespiti için kullanılacak ağ seçiminde bir ön işlem olarak görüntülerin çekişmeli saldırılı olup olmadığının sınıflandırılmasının gerçekleştirilebileceği görülmüştür. Görüntüde saldırı tespit edilirse saldırılı görüntülerde daha yüksek doğruluk ile nesne tespiti gerçekleştiren ve bu görev için eğitilmiş evrişimli sinir ağlar seçilerek daha yüksek başarılar elde edilebilir.

Makalenin organizasyonu şu şekildedir: Materyal ve metot bölümünde kullanılan derin öğrenme modelleri, çekişmeli saldırılar, saldırı tespiti için oluşturulan veri seti, metot ve başarımleri sunulmuştur. Bulgular ve tartışma bölümünde deneysel sonuçlara ve son bölümde ise genel değerlendirme ve olası gelecek çalışmalara değinilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Makalenin bu bölümünde çalışmada kullanılan derin öğrenme modelleri, saldırı uygulanmış görüntüleri üretmek için kullanılan çekişmeli saldırılar, derin öğrenme modellerini eğitmek ve test etmek için kullanılan veri seti, ağların başarımlerini ölçmek için kullanılan metrikler ve önerilen yaklaşımdan bahsedilmektedir.

You Only Once Look (YOLO)

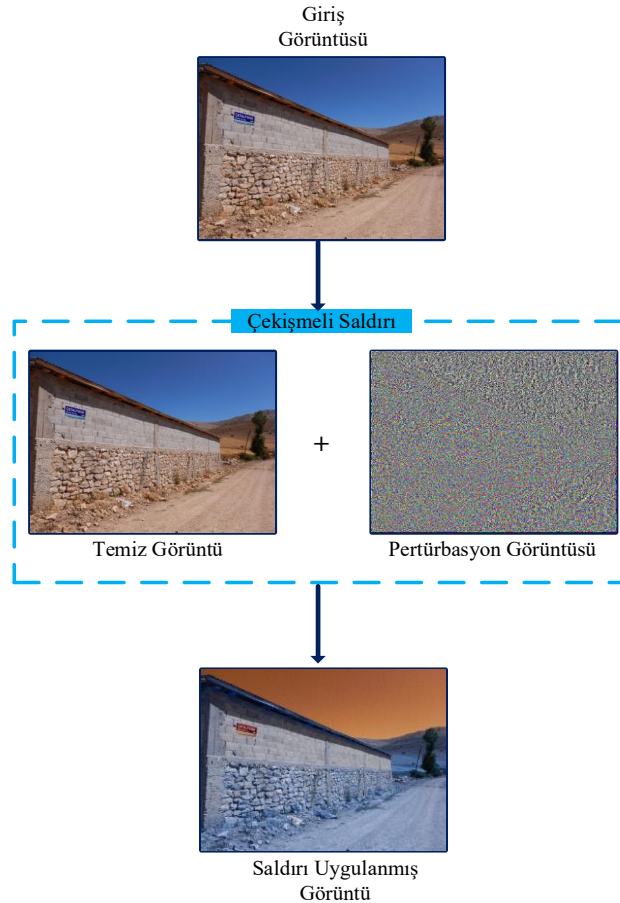
You Only Once Look (YOLO), Redmon ve diğerleri tarafından 2016 yılında hızlı nesne tespiti için geliştirilen evrişimli sinir ağıdır (Redmon ve ark., 2016). Küçük model boyutu, düşük hesaplama maliyeti ve yüksek doğruluk oranı YOLO'nun en önemli avantajlarıdır (Jiang ve ark., 2022). YOLO'nun V2 (Redmon ve Farhadi, 2017), V3 (Redmon ve Farhadi, 2018), V4 (Bochkovskiy ve ark., 2020), V5 gibi birçok versiyonu bulunmaktadır. Her yeni sürüm, önceki modelin hızını ve doğruluğunu artırmak için geliştirilmiştir. Günümüzde en çok tercih edilen YOLO versiyonlarından biri V5 versiyonudur.

Faster R-CNN

Region Based CNN (R-CNN) modeli, birden fazla nesne içeren görüntülerde CNN lokalizasyon probleminin üstesinden gelmek için Girshick ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Ancak, R-CNN'nin eğitim ve tahmin süresi, bölgeye dayalı yaklaşımı nedeniyle çok yüksektir. Bu yüzden, Girshick, R-CNN'nin hesaplama maliyeti problemini çözmek Fast R-CNN (Girshick, 2015) modelini önermiştir. Yine de Fast R-CNN modelinin hesaplama maliyeti R-CNN modeline göre düşük olmasına rağmen, birçok uygulama için yeterli değildir. Bu nedenle, Fast R-CNN'nin arama bölgesi yaklaşımının neden olduğu darboğazın üstesinden gelmek için daha az tespit süresine sahip olan Faster R-CNN modeli, Ren ve ark. tarafından geliştirilmiştir (Ren ve ark., 2015). Faster R-CNN modeli son yıllarda tercih edilen bölge tabanlı modellerin başında gelmektedir.

Çekişmeli Saldırı

Çekişmeli saldırılar, modellerin tahminlerinde hata yapmasına neden olmak için kasıtlı olarak uygulanan ve çekişmeli örnekler oluşturmak için kullanılan yöntemlerdir. Çekişme saldırısı ile bozulan test örnekleri, belirli görevler için eğitilmiş modellerin yanlış tahmin yapmasını sağlayabilmektedir. Çekişme saldırılarında, saldırı uygulanmış görüntü pertürbasyonun test örneğine eklenmesi ile oluşturulmaktadır. Çekişmeli saldırı uygulanmış görüntü üretiminin örneği, Şekil 1'de gösterilmektedir. Bu çalışmada FGSM, PGD ve APGD olmak üzere üç farklı çekişmeli saldırı çeşidi kullanılmıştır. Goodfellow ve arkadaşları tarafından önerilen Fast gradient signed method (FGSM) saldırısı, en çok kullanılan çekişmeli saldırılardan biridir (Goodfellow ve ark., 2014). FGSM saldırısı, girdi görüntüsünün kayıp gradyanını kullanarak bir görüntünün rakip bir örneğini oluşturmak için görüntü üzerine uygulanmaktadır. Madry ve diğerleri tarafından önerilen Projected Gradient Descent (PGD) (Madry ve ark., 2017) saldırısı ise temel olarak FGSM saldırısının yinelemeli bir çeşididir (Ayas ve ark., 2022). Giriş, orijinalden başlayarak yinelemeli olarak güncellenir (Liu ve ark., 2019). PGD daha etkili bir saldırı olmasına rağmen, hesaplama açısından FGSM saldırısından daha maliyetlidir. Auto Projected Gradient Descent (APGD) (Croce ve Hein, 2020), PGD saldırısının optimal olmayan adım boyutu ve objektif fonksiyon sorunlarını ele alan bir uzantısıdır (Govindarajulu ve ark., 2023). PGD saldırısının standart formülasyonundaki zayıflıkların üstesinden gelmek için önerilmiştir (Croce ve Hein, 2020).



Şekil 1. Çekişmeli saldırı uygulanmış görüntü üretimi

Veri Seti

Bu çalışmada, nesne tespitinde kullanılacak olan görüntülerin orijinal ya da çekişmeli saldırıya maruz kalıp kalmadığını tespit etmek için bir veri seti oluşturulmuştur. Veri setini oluşturmak için Kayseri Büyükşehir Belediyesi'nden alınan 2.904 adet doğal sahne görüntüsü kullanılmıştır. Bu sahne

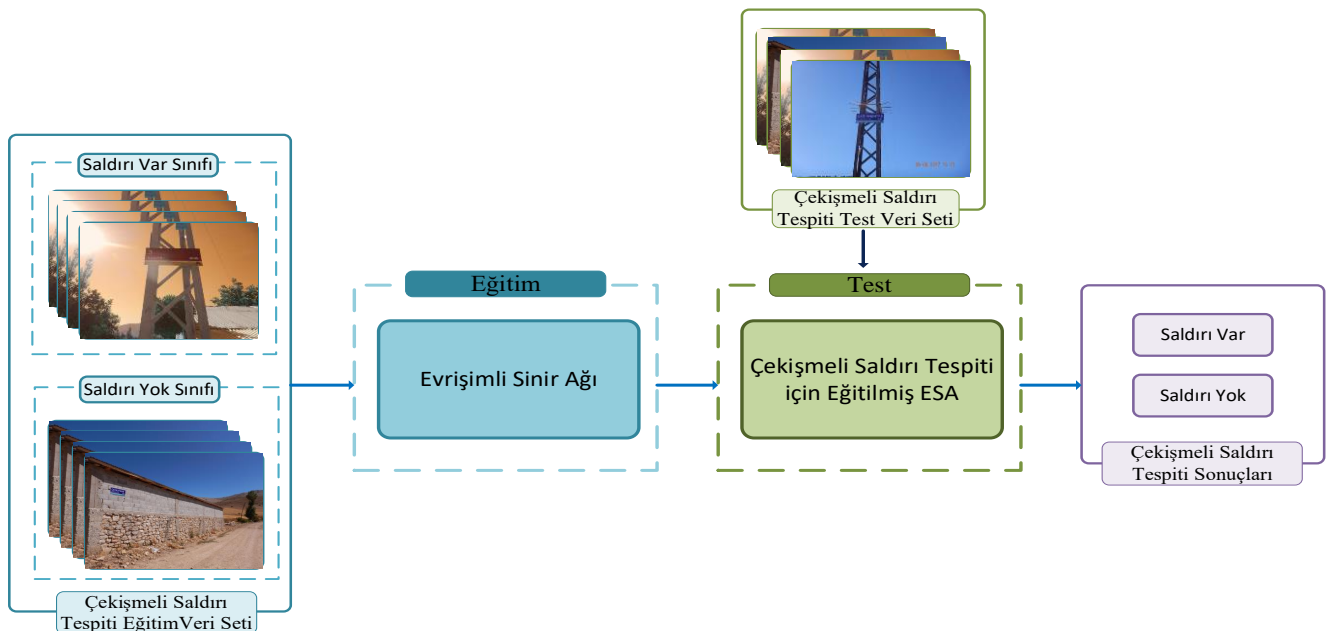
görüntülerinden 2.178 (%75) tanesine çekişmeli saldırı uygulanmıştır. Saldırılmış görüntülerin 726 (%33,33) tanesi FGSM, 726 (%33,33) tanesi PGD ve 726 (%33,33) tanesi APGD kullanılarak üretilmiştir. Veri setindeki orijinal görüntülerden 420 (%57,85) tanesi eğitim verisi olarak kullanılırken, doğrulama ve test verisi olarak sırasıyla 106 (%14,60) ve 200 (%27,54) adet orijinal görüntü kullanılmıştır. Saldırılmış görüntülerden ise 1260 (%57,85) tanesi eğitim verisi olarak kullanılırken, doğrulama ve test verisi olarak sırasıyla 318 (%14,60) ve 600 (%27,54) adet görüntü kullanılmıştır. Toplamda 1680 (%57,85) adet görüntü eğitimde, 424 (%14,60) adet doğrulamada ve 800 (%27,54) adet ise testte kullanılmıştır. Oluşturulan veri seti Çizelge 1’de sunulmuştur.

Çizelge 1. Oluşturulan veri seti

Veri Seti	Eğitim Veri Seti (adet)	Doğrulama Veri Seti (adet)	Test Veri Seti (adet)
Orijinal görüntü sayısı	420	106	200
FGSM uygulanmış görüntü sayısı	420	106	200
PGD uygulanmış görüntü sayısı	420	106	200
APGD uygulanmış görüntü sayısı	420	106	200
Toplam görüntü sayısı	1680	424	800

Metot

Bu çalışmada, nesne tespiti gerçekleştirilecek görüntülerde çekişmeli saldırının olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, son yıllarda nesne tespiti için sıklıkla kullanılan YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz olarak eğitilmiştir. Eğitimlerde önceki bölümde bahsedilen çekişmeli saldırıların tespiti için oluşturulan veri seti kullanılmıştır. Transfer öğrenmeli eğitimde öncelikle farklı bir görev için eğitilmiş olan ön eğitilmiş YOLO v5 ve Faster R-CNN ağlarının sınıflandırıcı katmanı yerine problemimizdeki iki sınıfa özgü sınıflandırıcı eklenmiştir. Ardından, çekişmeli saldırı uygulanmış görüntüler ve orijinal görüntülerden oluşturulan eğitim veri seti ile ağlar yeniden eğitilmiştir. Son olarak ise transfer öğrenme ile eğitilen ağların başarımları, veri setindeki test verileri kullanılarak gözlemlenmiştir. Transfer öğrenmesiz eğitim için ise transfer öğrenmede olduğu gibi ön eğitilmiş ağların sınıflandırma katmanı probleme özgü olacak şekilde iki sınıf için ayarlanmıştır. Daha sonra, bu ağlar görüntülerde çekişmeli saldırı olup olmadığını tespit etmek için eğitim veri seti ile transfer öğrenmesiz olarak eğitilmiştir. Transfer öğrenmesiz eğitilen ağlar son olarak test veri seti ile test edilmiştir. Çalışmada kullanılan metodoloji Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. Çekişmeli saldırı tespiti metodolojisi

Performans kriterleri

Derin öğrenme modellerinin nesne tespit başarımını (sınıflandırma) değerlendirmek için doğruluk, duyarlılık, hassaslık ve f1 skor metrikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Ming ve ark., 2021). Bu metrikler true positive (TP), true negative (TN), false positive (FP) ve false negative (FN) değerleri kullanılarak hesaplanmaktadır. TP değeri derin öğrenme modeli tarafından tespit edilen nesne sayısını göstermektedir. Diğer bir ifade ile girdi görüntüde nesne var ve derin öğrenme modeli bu nesneyi tespit etmişse bu işlem TP olarak kabul edilmektedir. TN değeri ise nesne olmadığı ve derin öğrenme modelinin nesne tespit etmediği görüntü sayısını ifade etmektedir. Görüntüde nesne yok ise ve derin öğrenme modeli nesne tespit etmemişse bu durum TN olarak ifade edilmektedir. FP değeri ise nesne olmadığı halde derin öğrenme modelinin tespit ettiği nesne sayısını göstermektedir. Görüntüde nesne olmamasına rağmen derin öğrenme modeli nesne tespit etmektedir ve bu durum FP olarak ifade edilir. FN değeri ise nesne olduğu halde derin öğrenme modelinin tespit edemediği nesne sayısını göstermektedir. Görüntüde nesne olduğu halde derin öğrenme modeli bu nesneyi tespit edememektedir ve bu durum FN olarak ifade edilir.

Derin öğrenme metriklerinden doğruluk doğru olarak sınıflandırılan nesne sayısının toplam sınıflandırma sayısına oranını gösterir ve Eşitlik 1. ile hesaplanır.

$$\text{Doğruluk} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \quad (1)$$

Duyarlılık metriği, pozitif olarak tahmin edilmesi gereken işlemlerin ne kadarının pozitif olarak tahmin edildiğini gösteren bir metriktir ve Eşitlik 2. ile hesaplanır.

$$\text{Duyarlılık} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (2)$$

Hassaslık metriği, derin öğrenme modelleri tarafından pozitif olarak değerlendirilen değerlerden gerçekten ne kadarının pozitif olduğunu gösteren bir metriktir ve Eşitlik 3. ile hesaplanır.

$$\text{Hassaslık} = \frac{TP}{TP+FP} \quad (3)$$

f1 skor metriği duyarlılık ve hassaslık metriklerinin harmonik ortalamasından oluşmaktadır. f1 skor metriği derin öğrenme yöntemlerinin başarımı değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Das ve ark., 2022). f1 skor metriği Eşitlik 4. ile hesaplanır.

$$f1 \text{ skor} = \frac{2 \times \text{Duyarlılık} \times \text{Hassaslık}}{\text{Duyarlılık} + \text{Hassaslık}} \quad (4)$$

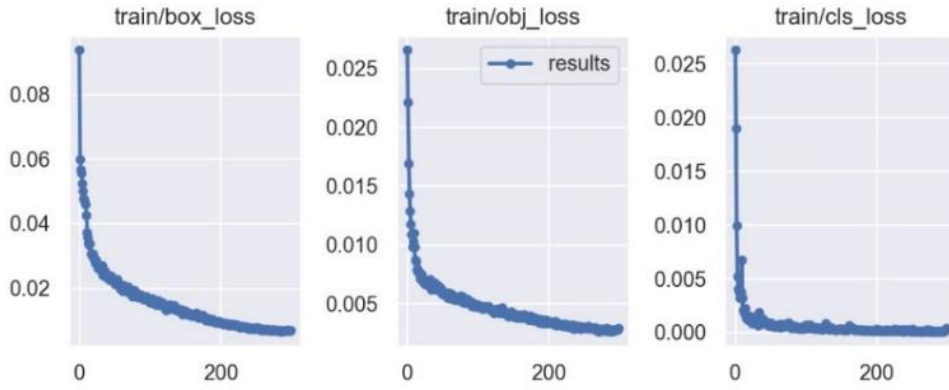
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, nesne tespitinde kullanılacak olan görüntülerin çekişmeli saldırıya maruz kalıp kalmadığını tespit etmek için eğitilen ağların deneysel sonuçları sunulmaktadır. Eğitim ve test için ayrılan veri setinde orijinal görüntüler ve çekişmeli saldırı uygulanmış görüntüler bulunmaktadır. Çekişmeli saldırılı görüntüleri oluşturmak için FGSM, PGD ve APGD saldırıları kullanılmıştır. Çalışmada, Evrişimli sinir ağı olarak YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri kullanılmıştır. Modelleri eşit koşullarda test etmek için modellerin PyTorch versiyonları kullanılmıştır ve modeller Python 3.9 kullanılarak eğitilip test edilmiştir. Deneysel çalışmalar i9 12. nesil 3.19 GHz veri yolu hızına sahip, 64

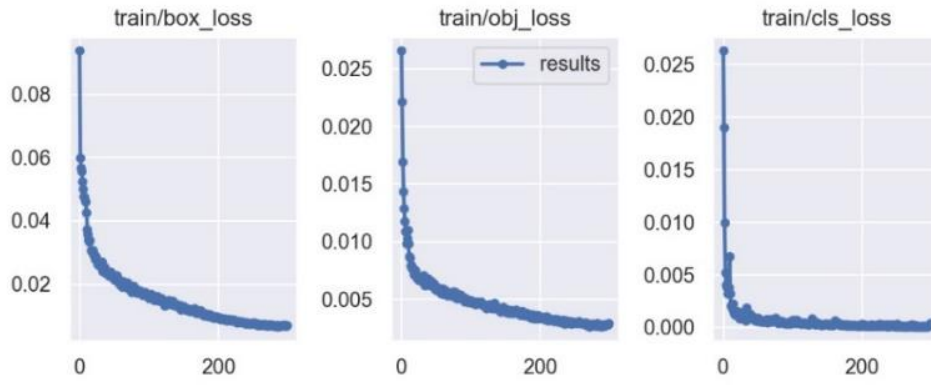
GB 3200 MHz RAM, 2 TB SSD ve 12 GB NVIDIA GeForce ekran kartına sahip bir bilgisayar kullanılarak yapılmıştır.

Modellerin Eğitilmesi

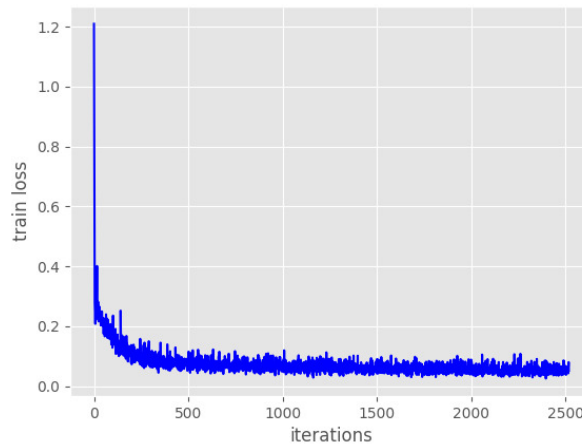
Modellerin eğitimi transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz olarak ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Derin öğrenme modelleri 200 epok eğitilmiştir. Transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz eğitilen YOLO v5 modellerinin eğitimler sırasında elde ettiği yitim değerleri sırasıyla Şekil 3 ve 4'te sunulmuştur. Transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz eğitilen Faster R-CNN modellerinin eğitimler sırasında elde ettiği yitim değerleri ise sırasıyla Şekil 5 ve 6'da sunulmuştur.



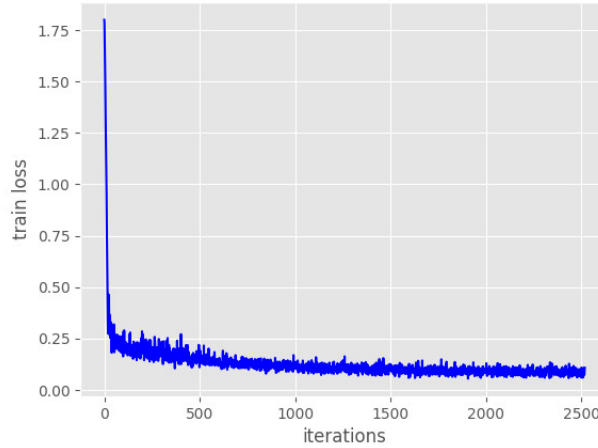
Şekil 3. Transfer öğrenmeli eğitilen YOLO V5 modelinin eğitimdeki yitim değerleri



Şekil 4. Transfer öğrenmesiz eğitilen YOLO V5 modelinin eğitimdeki yitim değerleri



Şekil 5. Transfer öğrenmeli eğitilen Faster R-CNN modelinin eğitimdeki yitim değerleri



Şekil 6. Transfer öğrenmesiz eğitilen Faster R-CNN modelinin eğitimdeki yitim değerleri

Yitim değeri derin öğrenme modellerinin eğitim başarımını göstermektedir (Moustapha ve ark., 2022). Yitim değerlerinin 0'a çok yakın olması derin öğrenme modellerinin başarılı bir şekilde eğitildiğini göstermektedir (Hu ve ark., 2018). Şekil 3-6'daki yitim değerlerinden görüldüğü üzere transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz eğitilen YOLO v5 ve Faster R-CNN modellerinin başarılı bir şekilde eğitildiği anlaşılmaktadır.

Deneysel Sonuçlar ve Tartışma

Test verisi üzerinde transfer öğrenme ile eğitilen YOLO v5 ve Faster R-CNN modellerinin saldırı tespiti başarımı performans metriklerine göre incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de sunulmuştur. Çizelge 2'de sunulduğu üzere transfer öğrenmeli YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri 200 orijinal ve 600 saldırılı görüntü üzerinde test edilmiştir. Çizelge 2'de transfer öğrenme ile eğitilen YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri sırasıyla 0.965 ve 0.971 f1 skoru elde etmiştir. Çizelgeden Faster R-CNN modelinin daha başarılı olduğu açıkça görülmektedir. Öte yandan, duyarlılık metriğine göre transfer öğrenmeli YOLO v5 modelinin daha başarılı olduğu görülmektedir.

Çizelge 2. Transfer Öğrenmeli Yöntemlerin Başarımları

CNN	Görüntü Türleri	Veri Sayısı	TP	TN	FP	FN	Doğruluk	Duyarlılık	Hassaslık	f1 skor
YOLO v5	Orijinal	200	183	0	0	17	0.915	1.000	0.915	0.956
YOLO v5	Saldırlı	600	555	0	0	37	0.938	1.000	0.938	0.968
YOLO v5	Orijinal ve Saldırlı	800	738	0	0	54	0.932	1.000	0.932	0.965
Faster R-CNN	Orijinal	200	189	0	1	10	0.945	0.995	0.950	0.972
Faster R-CNN	Saldırlı	600	566	0	7	27	0.943	0.988	0.954	0.971
Faster R-CNN	Orijinal ve Saldırlı	800	755	0	8	37	0.944	0.990	0.953	0.971

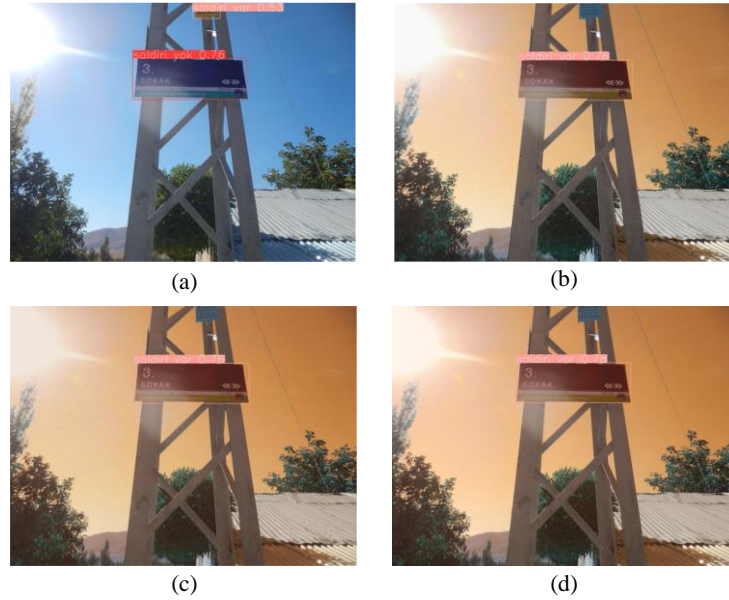
Test verisi üzerinde transfer öğrenmesiz eğitilen YOLO v5 ve Faster R-CNN modellerinin saldırı tespiti başarımları ise Çizelge 3'te gösterilmiştir. Çizelge 3'te görüldüğü üzere transfer öğrenmesiz eğitilen YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri sırasıyla 0.960 ve 0.964 f1 skoru elde etmiştir. Çizelgeden Faster R-CNN modelinin transfer öğrenmesiz eğitim sonucunda YOLO v5 modeline göre daha başarılı olduğu açıkça görülmektedir. Diğer yandan, duyarlılık metriğine göre ise transfer öğrenmesiz YOLO v5 modelinin daha başarılı olduğu görülmektedir.

Çizelge 3. Transfer Öğrenmesiz Yöntemlerin Başarımları

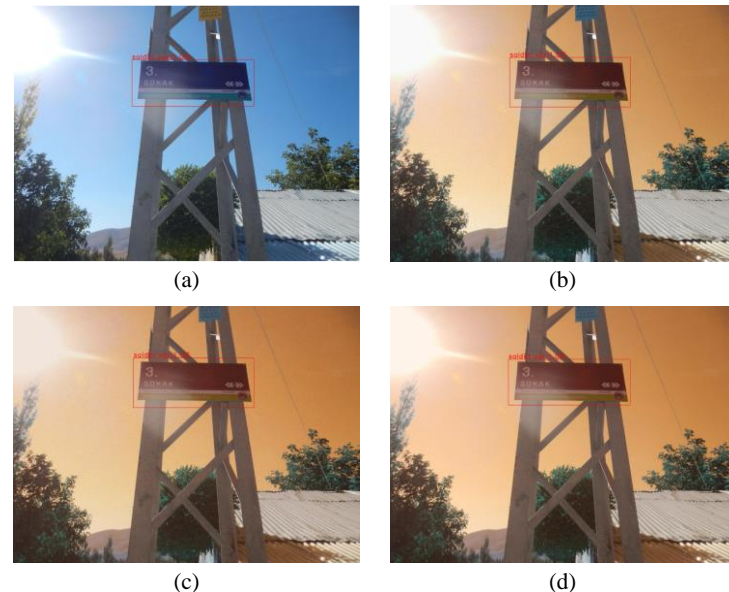
CNN	Görüntü Türleri	Veri Sayısı	TP	TN	FP	FN	Doğruluk	Duyarlılık	Hassaslık	f1 skor
YOLO v5	Orijinal	200	183	0	0	17	0.915	1.000	0.915	0.956
YOLO v5	Saldırlı	600	555	0	0	45	0.925	1.000	0.925	0.961
YOLO v5	Orijinal ve Saldırlı	800	738	0	0	62	0.923	1.000	0.923	0.960
Faster R-CNN	Orijinal	200	191	0	4	9	0.936	0.979	0.955	0.967
Faster R-CNN	Saldırlı	600	557	0	11	32	0.928	0.981	0.946	0.963
Faster R-CNN	Orijinal ve Saldırlı	800	748	0	15	41	0.930	0.980	0.948	0.964

Çizelge 2 ve 3 incelendiğinde test veri seti üzerinde en başarılı sonucu 0.971 f1 skoru ile transfer öğrenme ile eğitilen Faster R-CNN modeli elde etmiştir. Transfer öğrenmeli YOLO v5 modeli ise 0.965 f1 skoru ile ikinci en başarılı sonucu elde etmiştir. Ayrıca, transfer öğrenmeli YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri transfer öğrenmesiz eğitilen modellerine kıyasla daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir.

Yöntemlerin başarımını daha iyi irdelemek için bir test görüntüsü üzerinde transfer öğrenmeli YOLO v5 ve Faster R-CNN modellerinin saldırı tespitleri gerçekleştirilmiştir. Tespit sonuçları sırasıyla Şekil 7 ve 8’de gösterilmektedir. Şekil 7a ve 8a’da ağların orijinal görüntüdeki saldırı tespiti sonuçları gösterilirken Şekil 7b-d ve 8b-d’de ağların sırasıyla FGSM, PGD ve APGD saldırıları uygulanmış görüntülerdeki tespitleri göstermiştir. Şekillerden görüldüğü üzere transfer öğrenmeli eğitilen YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri görüntüde saldırı olup olmadığını başarılı bir şekilde tespit etmiştir. Ayrıca şekillerden Faster R-CNN modelinin YOLO v5 modeline kıyasla daha yüksek güven skoru ile saldırı tespiti yaptığı açıkça görülmektedir.



Şekil 7. Transfer öğrenmeli eğitilen YOLO v5 modelinin örnek test görüntülerinde saldırı tespiti sonucu: (a) orijinal görüntü, (b) FGSM uygulanmış görüntü, (c) PGD uygulanmış görüntü (d) APGD uygulanmış görüntü



Şekil 8. Transfer öğrenmeli eğitilen Faster R-CNN modelinin örnek test görüntülerinde saldırı tespiti sonucu: (a) orijinal görüntü, (b) FGSM uygulanmış görüntü, (c) PGD uygulanmış görüntü (d) APGD uygulanmış görüntü

SONUÇ

Bu çalışmada, nesne tespitinin daha yüksek doğrulukta yapılabilmesi için nesne tespitinde kullanılacak görüntülerin çekişmeli saldırıya maruz kalıp kalmadığı tespit edilmiştir. Çalışma, nesne tespitinde kullanılmak üzere seçilecek olan derin öğrenme modellerinin belirlenmesine yardımcı olmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışma kapsamında, orijinal ve saldırılı görüntülerden oluşan veri seti kullanılarak YOLO v5 ve Faster R-CNN modelleri transfer öğrenmeli ve transfer öğrenmesiz olarak eğitilmiştir. Eğitilen ağlar daha sonra test verisi kullanılarak test edilmiştir. Deneysel sonuçlar eğitilen modellerin yüksek başarı ile görüntülere çekişmeli saldırıların (FGSM, PGD ve APGD) uygulanıp uygulanmadığını tespit edebildiğini göstermiştir. Deneysel sonuçlara göre en yüksek başarıyı 0.971 f1 skoru ile transfer öğrenmeli Faster R-CNN modelinin elde ettiği görülmüştür.

Gelecek çalışmalarda nesne tespitine yardımcı olmak amacıyla gürültü, geometrik ve filtreleme gibi saldırı türlerinin de tespit çalışmaları gerçekleştirilebilir. Ayrıca, önerilen yöntem nesne tespiti sistemlerinin model seçimi aşamasına entegre edilebilir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Amit, Y., Felzenszwalb, P., & Girshick, R. (2020). Object detection. *Computer Vision: A Reference Guide*, 1-9.
- Ayas, M. S., Ayas, S., & Djouadi, S. M. (2022, July). Projected Gradient Descent Adversarial Attack and Its Defense on a Fault Diagnosis System. In *2022 45th International Conference on Telecommunications and Signal Processing (TSP)* (pp. 36-39). IEEE.
- Balamurugan, T., & Gnanamanoharan, E. (2023). Brain tumor segmentation and classification using hybrid deep CNN with LuNetClassifier. *Neural Computing and Applications*, 35(6), 4739-4753.
- Bochkovskiy, A., Wang, C. Y., & Liao, H. Y. M. (2020). Yolov4: Optimal speed and accuracy of object detection. *arXiv preprint arXiv:2004.10934*.
- Croce, F., & Hein, M. (2020, November). Reliable evaluation of adversarial robustness with an ensemble of diverse parameter-free attacks. In *International conference on machine learning* (pp. 2206-2216). PMLR.
- Das, S. D., Basak, A., & Dutta, S. (2022). A heuristic-driven uncertainty based ensemble framework for fake news detection in tweets and news articles. *Neurocomputing*, 491, 607-620.
- Dong, Y., Liao, F., Pang, T., Su, H., Zhu, J., Hu, X., & Li, J. (2018). Boosting adversarial attacks with momentum. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (pp. 9185-9193).
- Du, X., Song, L., Lv, Y., & Qiu, S. (2022). A Lightweight Military Target Detection Algorithm Based on Improved YOLOv5. *Electronics*, 11(20), 3263.
- Girshick, R. (2015). Fast r-cnn. In *Proceedings of the IEEE international conference on computer vision* (pp. 1440-1448).
- Goodfellow, I. J., Shlens, J., & Szegedy, C. (2014). Explaining and harnessing adversarial examples. *arXiv preprint arXiv:1412.6572*.
- Govindarajulu, Y., Amballa, A., Kulkarni, P., & Parmar, M. (2023). Targeted Attacks on Timeseries Forecasting. *arXiv preprint arXiv:2301.11544*.
- Gu, X., Li, S., Ren, S., Zheng, H., Fan, C., & Xu, H. (2022). Adaptive enhanced swin transformer with U-net for remote sensing image segmentation. *Computers and Electrical Engineering*, 102, 108223.
- Guo, Z., Wang, C., Yang, G., Huang, Z., & Li, G. (2022). Msft-yolo: Improved yolov5 based on transformer for detecting defects of steel surface. *Sensors*, 22(9), 3467.

- Hu, K., Zhang, Z., Niu, X., Zhang, Y., Cao, C., Xiao, F., & Gao, X. (2018). Retinal vessel segmentation of color fundus images using multiscale convolutional neural network with an improved cross-entropy loss function. *Neurocomputing*, 309, 179-191.
- Jiang, P., Ergu, D., Liu, F., Cai, Y., & Ma, B. (2022). A Review of Yolo algorithm developments. *Procedia Computer Science*, 199, 1066-1073.
- Jocher, G., Nishimura, K., Mineeva, T., & Vilariño, R. (2020). Yolov5. *Code repository* <https://github.com/ultralytics/yolov5>.
- Kurakin, A., Goodfellow, I. J., & Bengio, S. (2016). Adversarial examples in the physical world. *arXiv preprint arXiv:1607.02533*, 2016.
- Längkvist, M., Kiselev, A., Alirezaie, M., & Loutfi, A. (2016). Classification and segmentation of satellite orthoimagery using convolutional neural networks. *Remote Sensing*, 8(4), 329.
- Liu, H., Yu, Y., Liu, S., & Wang, W. (2022). A Military Object Detection Model of UAV Reconnaissance Image and Feature Visualization. *Applied Sciences*, 12(23), 12236.
- Liu, S., Wu, H., Lee, H. Y., & Meng, H. (2019, December). Adversarial attacks on spoofing countermeasures of automatic speaker verification. In *2019 IEEE Automatic Speech Recognition and Understanding Workshop (ASRU)* (pp. 312-319). IEEE.
- Madry, A., Makelov, A., Schmidt, L., Tsipras, D., & Vladu, A. (2017). Towards deep learning models resistant to adversarial attacks. *arXiv preprint arXiv:1706.06083*.
- Ming, Y., Meng, X., Fan, C., & Yu, H. (2021). Deep learning for monocular depth estimation: A review. *Neurocomputing*, 438, 14-33.
- Moustapha, M., Tasyurek, M., & Ozturk, C. (2022). A Novel YoloV5 Deep Learning Model for Handwriting Detection and Recognition. *International Journal on Artificial Intelligence Tools*. doi:10.1142/S0218213023500161
- Redmon, J., Divvala, S., Girshick, R., & Farhadi, A. (2016). You only look once: Unified, real-time object detection. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (pp. 779-788).
- Redmon, J., & Farhadi, A. (2017). YOLO9000: better, faster, stronger. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition* (pp. 7263-7271).
- Redmon, J., & Farhadi, A. (2018). Yolov3: An incremental improvement. *arXiv preprint arXiv:1804.02767*.
- Ren, S., He, K., Girshick, R., & Sun, J. (2015). Faster r-cnn: Towards real-time object detection with region proposal networks. *Advances in neural information processing systems*, 28.
- Shelatkar, T., Urvashi, D., Shorfuzzaman, M., Alsufyani, A., & Lakshmana, K. (2022). Diagnosis of brain tumor using light weight deep learning model with fine-tuning approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022.
- Tasyurek, M., & Gul, E. (2023). A new deep learning approach based on grayscale conversion and DWT for object detection on adversarial attacked images. *The Journal of Supercomputing*, 1-34.
- Terzi, R., Azginoglu, N., & Terzi, D. S. (2022). False positive repression: Data centric pipeline for object detection in brain MRI. *Concurrency and Computation: Practice and Experience*, 34(20), e6821.
- Wang, Y., Hao, Z., Zuo, F., & Pan, S. (2021, September). A fabric defect detection system based improved yolov5 detector. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2010, No. 1, p. 012191). IOP Publishing.
- Zhang, Y., Jiang, Z., Villalba, J., & Dehak, N. (2020, October). Black-Box Attacks on Spoofing Countermeasures Using Transferability of Adversarial Examples. In *Interspeech* (pp. 4238-4242).

To Cite: Bektas, İ., Seyrekoglu, F., Kusek, M., & Ceyhan Başaran, C. (2023). Determination of Antifungal Activity of Leaf Extracts from *Hypericum* ssp. Against Plant Pathogenic Fungi *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2364-2372.

Determination of Antifungal Activity of Leaf Extracts from *Hypericum* ssp. Against Plant Pathogenic Fungi *Fusarium oxysporum* and *Alternaria Alternata*

İdris BEKTAŞ^{1*}, Fadime SEYREKOĞLU², Mustafa KÜSEK³, Ceyda CEYHAN BAŞARAN³

Highlights:

- The antifungal effect of *Hypericum* ssp. was determined.
- It was determined that *F.oxysporum* was more resistant.
- Alternative control to chemical control was introduced.

Keywords:

- *Hypericum* ssp.
- *Fusarium oxysporum*
- Antifungal activity
- *Alternaria alternata*

ABSTRACT:

In this study, the antifungal activity of ethanol extracts of three plant species of *Hypericum perforatum*, *Hypericum scabrum* and *Hypericum origanifolium* were evaluated for against two plant pathogenic fungal species of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. The antifungal activities of *Hypericum* ssp. extracts (3, 15, 45, 80, 120, 200, 240, 300 ppm) were tested against fungi. Ethanol 30% as control; Commercial fungicide (1 µg/mL) was used as a positive control. All *Hypericum* ssp. plant extracts were effective in different rates against the fungi depending on the doses. In addition, IC₅₀ values of the three selected plant *Hypericum* ssp. leaf extract against pathogenic fungus *F.oxysporum* and *A. alternata* were determined with of probit analysis. In terms of the IC₅₀ values, the antifungal activity of *H. perforatum* plant extract against *F.oxysporum* (122.525 µg/mL) > *A.alternata* (108.484 µg/mL). On the other hand, IC₅₀ values of *H. scabrum* against *A.alternata* (126.390 µg/mL) > *F.oxysporum* (113.714 µg/mL). Moreover, the IC₅₀ value of *H. origanifolium* against two pathogenic fungi was calculated as *F.oxysporum* (159.931 µg/mL) > *A.alternata* (55.759 µg/mL). Results showed that *H.origanifolium* has the best fungicidal activity, with IC₅₀ value of 55.759 µg/mL against *A.alternata* and *H.scabrum* 113.717 µg/mL against *F.oxysporum*. However, the highest concentrations (300 ppm) caused completely inhibition in the both fungi mycelial growth followed by lower concentrations of plant extracts. *A. alternata* were the sensitive fungal species, while the *F. oxysporum* were a more resistant to the *Hypericum* ssp. extracts. Based on the antifungal activity tests, these plants extracts this may have effective as the new natural fungicide protecting crops against fungal diseases.

¹İdris BEKTAŞ ([Orcid ID: 0000-0001-7409-4837](https://orcid.org/0000-0001-7409-4837)), Amasya University, Department of Plant and Animal Production, Amasya, Türkiye

²Fadime SEYREKOĞLU ([Orcid ID: 0000-0001-9787-4115](https://orcid.org/0000-0001-9787-4115)), Amasya University, Department of Food Processing, Amasya, Türkiye

³Mustafa KÜSEK ([Orcid ID: 0000-0002-6320-5869](https://orcid.org/0000-0002-6320-5869)), Ceyda CEYHAN BAŞARAN ([Orcid ID: 0000-0002-9695-281X](https://orcid.org/0000-0002-9695-281X)), Kahramanmaraş Sutçu Imam University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Kahramanmaraş, Türkiye

*Corresponding Author: İdris BEKTAŞ, e-mail: idris.bektas@amasya.edu.tr

INTRODUCTION

Plant pathogenic fungi are possible for 30–45 % of known plant diseases by attacking plants and cause major losses in agricultural production (Morshedloo et al., 2015 ; Elshafie et al., 2017). Among these pathogens *Fusarium* spp. causes root rot during plant production. *Fusarium* root rot is the most common fungal disease affecting wheat, onions and tomato worldwide (Gibert et al., 2022). Another fungus, *Alternaria alternata* causes wilt disease in plants and brown rot in fruits such as apples (Wang et al., 2021). *Alternaria* spp. mycotoxins were detected in various naturally contaminated fruits and vegetables, such as tomato, apple, grape, blueberry, orange, lemon, mandarin, and olive. The same time the pathogen is an opportunistic that attacks different plant parts, causing leaf spots and rots (Roy et al., 2019). This effect in direct economic damages including a decrease in crop production and quality. Moreover many fungi are capable of producing mycotoxin and contamination caused by mycotoxins leads to the refusal of the crop in the market (Parry et al., 1995).

Chemical fungicides are the most efficient method in controlling fungal diseases. Use of chemical fungicides may can cause a risk to human health and organisms in the environment. Nevertheless fungicides will face important borders in the the following years due to different major concerns (Nieder et al., 2018). Plant extracts and essential oils and natural products are therefore becoming to be more acceptable and have less health risk or pollute the environment than chemical compounds and can be for this reason used as an alternate to antifungal chemicals (Jobling, 2000). Under *in vitro* study conducted by Bilici et al. (2021) was tested three different essential oils and five different doses of oils (25, 50, 75, 100, 150 $\mu\text{L L}^{-1}$) against *Fusarium oxysporum* *in vitro* conditions. As a result of the study, it was determined that all doses of essential oils obtained from thyme prevented the development of micellar colonies of the pathogen by 50.8-80.8%.

There are nearly 80 species of *Hypericum* spp. in Turkey and this species have been used for years for treating of exterior injury and gastric ulcer (Erken et al., 2001). *H. hyssopifolium* and *H. heterophyllum* essential oils showed antifungal potential against *Fusarium* species and five groups of *Rhizoctonia solani* (El-Shahir et al., 2022). Other studies on *H. scabrum* plants showed that toxicity owing to the secondary metabolites against the microorganisms *E. coli* ATCC 8739, *C. albicans* ATCC 10231, *B. subtilis* ATCC 19659, *C. tropicalis* ATCC 750 and *S. aureus* ATCC 6538 (Dadkhah et al., 2015 ; Ergin et al., 2022).

In the presented study decreased the use of chemical fungicides by determining the antifungal activities of the leaves ethanol extract of *Hypericum perforatum*, *Hypericum scabrum* and *Hypericum organifolium* against *Alternaria alternata* and *F. oxysporum*. For the efficacy of ethanol extracts of this plant was investigated against fungi radial growth at the *in vitro* conditions.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Plant Samples

H. perforatum, *H. scabrum* and *H. organifolium* were collected from the Amasya region in the term June–August 2018. The identification of the plants was performed by Dr. Cengiz Yıldırım and specimens were deposited at the Herbarium of Ondokuz Mayıs University as OMUB-6640 (HP), OMUB-0527 (HS), OMUB-4203 (HO) respectively.

Preparation of plant extracts

The aerial parts of the *H. perforatum*, *H. scabrum* and *H. organifolium* were dried in the shade at room temperature for about two weeks. Ultrasonic assisted extraction (UAE) technique was used to for extraction of *Hypericum* species. Dried *Hypericum* species aerial parts (5 g) were grounded. The

extraction process was applied at 35°C for 45 min with water-ethanol (7:3, v/v) solvent mixture, keeping the material to liquor (M:L) ratio as 1:30 (v/v) based on the previous results (Seyrekoğlu & Temiz, 2020). After the extraction procedure, the filtration was performed and the solvent were evaporated by rotary evaporator.

Fungal strains

The used in the study plant fungal pathogens, *F. oxysporum* and *A.alternata* were provided stock cultures from the Laboratory of Microbiology and Plant Pathology at the Suluova Vocational School University of Amasya. *A. alternata* was isolated from apple, while *F.oxysporum* was isolated from onion. These fungi are among the very significant pathogenic fungi of economic harm to plants. Fungal cultures were maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) on petri dish (9 cm) and kept at 27±1° C.

In vitro antifungal activity

The antifungal activities of *Hypericum* ssp. plant extract were determined by use of agar plate method (Nwosu & Okafor, 1995). Plant extracts were prepared at the 3, 15, 45, 80, 120, 200, 240, 300 ppm concentrations in PDA (39 gr/l) medium. Without extracts in PDA media, commercial fungicide (1 µg/mL fungicide) the recommended dose was used as a positive control and Methanol (%30) was used as a negative control. The medium was 121°C 15 min. autoclaved and up to cool at 40°C and transferred to media petri plate (90 mm) (15mL plate⁻¹). The selected fungal mycelium disc (7 mm in diameter) from 5-day fresh fungus cultures were transferred to petri plates in the middle. Then incubated at 27±1 °C (Nuve Incubator) during 10 days and were followed the growth of fungi Daily (Onaran & Yılar, 2012). The tests were done three replicate. The percentage inhibition of fungus growth due to different concentrations of plant extract was calculated as follows:

$$\text{Mycelial growth inhibition (\%)} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100$$

where dc = average diameter of fungi in control, and dt = average diameter of fungi in treatment (Şesan et al. 2017).

Statistical analysis

All applications were adjusted in a entirely randomized plan. The probit analysis of the data derived in result of the experiment was performed and rates of IC₅₀ were calculated. All data were calculated statistically using the SPSS22 program. Variations among concentrations and controls were compared with using DUNCAN Multiple Range Test of p < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Antifungal activity

It was determined from the conclusions that the inhibitive activity of *Hypericum perforatum*, *Hypericum scabrum* and *Hypericum origanifolium* plant extracts showed significant variation depending on the dose against the mycelial growth of tested fungi. Positive control of chemical fungicides were decreased *F. oxysporum* mycelial growth by 14% according to control but in *A.alternata*, this ratio was 1.1%. In the solvent control, ethanol had no impact on fungal growth.

Effects of *hypericum perforatum* extracts on the mycelial growth of fungi

The fungi *F. oxysporum* and *A. alternata* were incubated on PDA medium with different concentrations of *Hypericum perforatum* extracts (Table 1). According to probit analysis, IC₅₀ values against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* of 122.523 and 108.484 µg/mL, respectively.

**Determination of Antifungal Activity of Leaf Extracts from *Hypericum* ssp. Against Plant Pathogenic Fungi
Fusarium oxysporum and *Alternaria alternata***

All concentrations of *Hypericum perforatum* extract were shown antifungal activity at different rates on fungi. This activity has also rises with the rise in the quantity of concentrations. Other concentrations except 3 and 15 ppm were decreased significantly growth of *F. oxysporum* according to control ($p < 0.05$). The decrease in 3 ppm and 15 ppm concentrations was not found to be significantly compared to the control. The concentration 300 ppm of *H. perforatum* extract were completely inhibited the growth of *Fusarium oxysporum* ($p < 0.05$). However, except for the 3 ppm concentration of extract, the other concentrations were statistically reduced the growth of *A. alternata*. The highest concentrations(240 and 300 ppm) of plant extract was observed 100% mycelium inhibition on *A. alternata*.

Table 1. Effects of *H. perforatum* Plant extracts on the Mycelial Growth of Fungi

Plant extracts	Concentrations (ppm)	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
		Diameter of fungi \pm standard error	Mycelial growth inhibition (%)	diameter of fungi \pm standard error	Mycelial growth inhibition (%)
<i>H. perforatum</i>	3	7.033 \pm 0.14 ^a	1.77	6.2 \pm 0.14 ^a	1.5
	15	6.96 \pm 0.05 ^a	2.7	5,033 \pm 0.03 ^b	20.15
	45	4.23 \pm 0.25 ^c	40.9	4.16 \pm 0.88 ^c	33.9
	80	4.1 \pm 0.05 ^c	42.7	4.10 \pm 0.57 ^c	34.9
	120	3.9 \pm 0.1 ^c	45.5	3.76 \pm 0.14 ^d	40,3
	200	1.9 \pm 0.12 ^d	73.4	1.16 \pm 0.12 ^e	81.5
	240	1.03 \pm 0.25 ^e	85.6	0.00 \pm 0.00 ^f	100
	300	0.00 \pm 0.00 ^f	100	0.00 \pm 0.00 ^f	100
Control	Ethanol % 30	7.16 \pm 0.37 ^a	-	6.30 \pm 0.11 ^a	-
Positive Control	1 μ g/mL	6.1 \pm 0.05 ^b	14.8	6.23 \pm 0.14 ^a	1.1

* Values are means of three replicates, Mean values(mean \pm standard error) sharing the same letter do not differ significantly by Duncan's Multiple Range Test at $p \leq 0.05$.

Effects of *Hypericum scabrum* extracts on the mycelial growth of fungi

Table 2. Effects of *H. scabrum* Plant Extracts on the Mycelial Growth of Fungi

Plant extract	Concentrations (ppm)	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
		Average diameter of fungi \pm SE	Mycelial growth inhibition (%)	Average diameter of fungi \pm SE	Mycelial growth inhibition (%)
<i>Hypericum scabrum</i>	3	6.70 \pm 0.11 ^{ab}	6.42	6.26 \pm 0.26 ^a	0.6
	15	6.56 \pm 0.12 ^{bc}	8.37	5.53 \pm 0.25 ^b	12.2
	45	5.43 \pm 0.21 ^d	25.6	5.00 \pm 0.28 ^b	20.63
	80	4.56 \pm 0.23 ^e	36.3	4.10 \pm 0.05 ^c	34.9
	120	3.90 \pm 0.01 ^f	45.5	3.73 \pm 0.14 ^c	38.5
	200	2.23 \pm 0.12 ^g	68.8	2.16 \pm 0.16 ^d	65,7
	240	1.36 \pm 0.18 ^h	81.8	0.00 \pm 0.00 ^e	100
	300	0.9 \pm 0.03 ^h	87.4	0.00 \pm 0.00 ^e	100
Control	Ethanol % 30	7.16 \pm 0.37 ^a	-	6.30 \pm 0.11 ^a	-
Positive Control	1 μ g/mL	6.1 \pm 0.05 ^c	14.8	6.23 \pm 0.14 ^a	1.1

*Values are means of three replicates, Mean values(mean \pm standard error) sharing the same letter do not differ significantly by Duncan's Multiple Range Test at $p \leq 0.05$.

In the second phase of the study *F. oxysporum* and *A. alternata* were incubated in PDA medium with different concentrations of *H. scabrum* extract. Using probit analysis, the IC₅₀ value of *Hypericum scabrum* against *F. oxysporum* was determined 113,714 μ g/mL while 126,390 μ g/mL for *A. alternata*. The results obtained are showed in Table 2. Control and the concentration of 5 ppm plant extract showed statistically similar effects on the growth of *Fusarium oxysporum* ($p < 0.05$). The concentration 15 ppm of plant and positive control were effect similar to growth of *F. oxysporum*. The other results compared with controls, showed statistically better effect rates were found with regard to

**Determination of Antifungal Activity of Leaf Extracts from *Hypericum* ssp. Against Plant Pathogenic Fungi
Fusarium oxysporum and *Alternaria alternata***

inhibit *F. oxysporum*. The highest dose (300 ppm) of *Hypericum scabrum* extract was observed a 87.4% mycelium inhibition rate on *F. oxysporum*. Similarly, the *Hypericum scabrum* extract were also showed a similar effect on *A.alternata*. The concentrations (300 and 240 ppm) of *Hypericum scabrum* extract showed a 100% mycelium inhibition rate on *A. alternata* fungi ($p < 0.05$).

Effects of *Hypericum origanifolium* extracts on the mycelial growth of fungi

Table 3 shows the effect of extracts of *Hypericum origanifolium* on the mycelium growth of *F.oxysporum* and *A. alternata*. Using a growth inhibition assay technique, the *Hypericum origanifolium* ethanolic extracts demonstrated varying antifungal activities against *F.oxysporum* and *A. alternata* at different concentrations($p < 0.05$). The extracts showed significant antifungal activity at except 3 and 15 ppm against *F.oxysporum* growth. The greatest(100%) antifungal activity was detected at 300 ppm against *F.oxysporum* and *A.alternata*. At the same time the extracts showed significant antifungal activity at except 3 ppm against *A.alternata* growth(Figure 1).

Table 3. Effect of *H. origanifolium* Plant Extracts on the Mycelial Growth of Fungi

Plant extract	Concentrations (ppm)	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
		Average diameter of fungi \pm SE	Mycelial growth inhibition (%)	Average diameter of fungi \pm SE	Mycelial growth inhibition (%)
<i>Hypericum origanifolium</i>	3	6.80 \pm 0.11 ^a	5.02	6.00 \pm 0.05 ^a	4.18
	15	6.63 \pm 0.83 ^{ab}	7.4	5.26 \pm 0.14 ^b	26.5
	45	5.83 \pm 0.16 ^c	18.5	3.10 \pm 0.05 ^c	56.7
	80	5.56 \pm 0.06 ^c	22.3	2.86 \pm 0.08 ^{cd}	60
	120	4.93 \pm 0.06 ^d	31.1	2.57 \pm 0.12 ^{de}	64.1
	200	2.76 \pm 0.53 ^e	61.4	2.53 \pm 0.03 ^{ef}	64.6
	240	2.20 \pm 0.05 ^e	69.2	2.23 \pm 0.14 ^f	68.8
	300	0.00 \pm 0.00 ^f	100	0.00 \pm 0.00 ^g	100
Control	Ethanol %30	7.16 \pm 0.37 ^a	-	6.30 \pm 0.11 ^a	-
Positive Control	1 μ g/mL	6.1 \pm 0.05 ^{bc}	14.8	6.23 \pm 0.14 ^a	1.1

*Values are means of three replicates, Mean values(mean \pm standard error) sharing the same letter do not differ significantly by Duncan's Multiple Range Test at $p \leq 0.05$.

According to these findings, *Hypericum* ssp. of extracts showed antifungal activities against different plant pathogens. This difference may be because the different plant species were defined bioactive compounds at different rates. *Hypericum origanifolium* plants extract toxicity against the fungi *F. oxysporum* (inhibitory concentration (IC₅₀)= 159.93 μ g/mL) and *A. alternata* (IC₅₀)=55.759 μ g/mL) were calculated use of probit analysis.

All doses of *Hypericum* ssp. leaf extract when the comparison with negative control and positive control was shown antifungal effect on fungi. According to the value of the IC₅₀, generally the *Alternaria alternata* was found susceptible pathogen against *Hypericum* ssp. leaf extract according to *Fusarium oxysporum*. Generally, leaves ethanol extracts of *Hypericum* ssp. were found to potent of *in vitro* antifungal activity against tested fungi. In antifungal tests, however, *Hypericum* ssp. extracts have demonstrated better antifungal activity than the chemical fungicide in our study.

IC₅₀ values of the three selected plant *Hypericum* ssp. leaf extract against pathogenic fungus *F.oxysporum* and *A. alternata* were determined with of probit analysis. In terms of the IC₅₀ values, the antifungal activity of *H. perforatum* plant extract against *F.oxysporum* (122.525 μ g/mL) > *A.alternata* (108.484 μ g/mL). On the other hand, IC₅₀ values of *H. scabrum* against *A.alternata* (126.390 μ g/mL) > *F.oxysporum* (113.714 μ g/mL). Moreover, the IC₅₀ value of *H. origanifolium* against two pathogenic fungi was calculated as *F.oxysporum* (159.931 μ g/mL) > *A.alternata* (55.759 μ g/mL).

Results showed that *H. origanifolium* has the best fungicidal activity, with IC₅₀ value of 55.759 against *A. alternata* and *H. scabrum* 113.717 µg/mL against *F. oxysporum*.

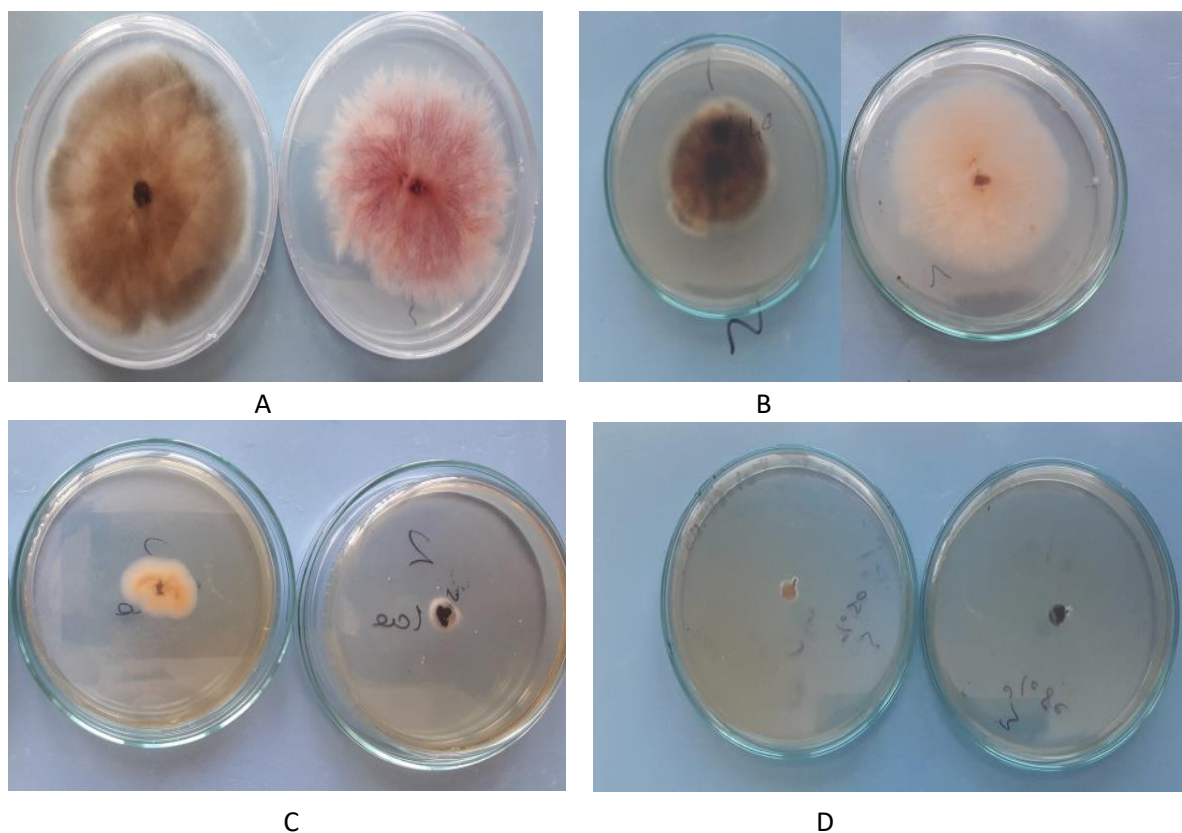


Figure 1. Antifungal Effect of *Hypericum Origanifolium* Plant Extracts on the Mycelial Growth of *F. oxysporum* and *A. alternata* (A: Control, B: 120 ppm dose of *H. origanifolium*, C: 240 ppm dose of *H. origanifolium*, D: 300 ppm dose of *H. origanifolium*)

Extraction of natural compounds from plants and the used extraction method are critical. It is the first step to determine the optimum extraction conditions to benefit from the determined activity and bioactive compounds. In this study, ultrasonic wave assisted extraction method was used as the extraction method. Ultrasonic wave-assisted extraction conditions of *Hypericum* species were carried out according to previous studies (Seyrekoğlu & Temiz, 2020). Extraction conditions were applied using an ethanol-water (3:7) solvent system at 30 °C for 40 min. keeping the material/liquor (M:L) ratio of 1:30. After the extraction, the mixtures were filtered on a Whatman filter paper no. 42 (125mm). The solvent was evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator. All operations were done in triplicate. At the end of the ultrasound assisted of *H. perforatum*, *H. scabrum* and *H. origanifolium* extraction yields of 9.3 %, 5.3% and 9.3 % (w/w) were obtained respectively. In recent studies, ultrasonic wave assisted method is generally used as the extraction method. Similarly, Estevinho et al. (2021), used to ultrasonic wave assisted extraction method for the extraction of *Hypericum perforatum* L. Then 80 % ethanolic solution and only deionized water used as solvent system. The extraction of avocado using ultrasonic waves gave the better results than the maceration extraction (Arlene et al., 2015). In another study, is to produce an edible saffron extract with high quality factors (crocin, picrocrocin, and safranal) using ultrasonic wave-assisted extraction (Gazeran et al., 2016). Additionally, Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) is a simpler, faster and more effective extraction technique than other methods. It consumes less energy, time and solvent. Thus, it has the feature of being a fast technique that produces more efficient and purer products (Syahir et al., 2020).

In this study, the extracts of the *Hypericum* ssp. which is widely grown in Turkey and collected from Amasya province, were obtained. Additionally, the antifungal activities of different extracts of leaf parts of the plant were determined against pathogenic fungi. Previous studies have demonstrated that the genus of *Hypericum* ssp. from varied areas have varying compounds (Heshmati et al., 2018). In many researchs, it has been noticed that α -pinene and β -pinene were the main components (Khorshidi et al., 2020). Khorshidi et al. (2020) reported that, α -pinene, β -pinene, limonene, and E-caryophyllene were determined as the main compounds of *H. scabrum*. In another study, α -pinene (46.3 %) was found as the important compounds in the essential oil obtained from the flowers of the plant (Heshmati et al., 2018). In a study by Morshedloo et al. (2015) were investigated the chemical composition of *H. perforatum*. Among chemicals, 2,6-dimethyl-heptane (6.25–36.07%), γ -pinene (5.56–26.03%), 1-cadinene (0.0–22.58%) and δ -cadinene (0.0–16.9%) were found as the most abundant compounds. Bertoli et al.(2015) were identified as Caryophyllene oxide the main compound of *H. origanifolium* from North of Turkey (Samsun province). This difference in bioactive compounds may be due to the fact that the same plant species was grown in different regions. Similar to our conclusions, in the previous research, plant extracts were detected to be efficient against the microorganism (Carvalho et al., 2011). The antifungal and antibacterial (Castillo et al., 2012 ; Aljubiri et al., 2021) and antiviral (Denaro et al., 2020 ; Lowe et al., 2021) activities of bioactive compounds of plants were reported from many research. In the similar studies, different research stated that the extracts of plants play a major role in controlling phytopathogenic fungi. Chahal et al. (2021) reported that extracts of *Ageratum conyzoides* L. exhibited total inhibitory effects on the mycelial growth of *Aspergillus*, *Alternaria*, *Candida*, *Fusarium*, *Phytophthora* and *Pythium* owing to the presence of various secondary metabolites. Similar studies have been carried out by Amin et al. (2022) on the antifungal activity of *Alternanthera philoxeroides* (Mart). Griseb] against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger* Tiegh. and *Macrophomina phaseolina* (Tassi) different fungi and they reported that crude leaf extract of *Alternanthera philoxeroides* inhibited the mycelial growth of the test fungi. Riaz et al. (2010) similarly, in our study, methanol extracts of the plant parts of *Hypericum* ssp. were found to be most effective against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. Similar to our results, previous reports confirmed the IC50 rates varied depending on the fungus and different plant species. Furthermore, varied plant extracts are against the pathogenicity of different fungi because secondary plant metabolites have a marked potential as a resource of effective antifungal agents (Carvalho et al., 2011). These conclusions were found to be compatible with the literature.

CONCLUSION

The leaves ethanol extract of *Hypericum* ssp. it was showed antifungal activity against *A. alternata* and *F.oxysporum*. The present study indicated that the *F.oxysporum* according to *A. alternata* is resistant against plant extract. These remarkable results form the source for future researchers proposed at a better understanding of the bioactivity of *Hypericum* ssp.plant extracts.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Aljubiri, S. M., Mahgoub, S. A., Almansour, A. I., Shaaban, M., & Shaker, K. H. (2021). Isolation of diverse bioactive compounds from *Euphorbia balsamifera*: Cytotoxicity and antibacterial activity studies. *Saudi journal of biological sciences*, 28(1), 417 - 426.
- Amin, A., Akbar, M., Khalil, T., Akram, W., & Ahmad, A. (2022). Antifungal activity of *Alternanthera philoxeroides* organic solvent extracts against plant pathogenic fungi. *Pak. J. Bot*, 54 (1), 337-344.
- Arlene, A. A., Prima, K. A., Utama, L., & Anggraini, S. A. (2015). The preliminary study of the dye extraction from the avocado seed using ultrasonic assisted extraction. *Procedia Chemistry*, 16, 334 - 340.
- Bertoli, A., Çirak, C., & Seyis, F. (2015). *Hypericum origanifolium* Willd.: The essential oil composition of a new valuable species. *Industrial Crops and Products*, 77, 676 - 679.
- Bilici S, Demir S, Boyno G, 2021. The Effects of Essential Oils and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Decay Disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) of Root and Root Collar of Tomato. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2): 857 - 868.
- Carvalho, D. D. C., Alves, E., Camargos, R. B., Oliveira, D. F., Scolforo, J. R. S., de Carvalho, D. A., & Batista, T. R. S. (2011). Plant extracts to control *Alternaria alternata* in *Murcott tangor* fruits. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28 (4), 173 - 178.
- Castillo, F., Aguilar, C., Hernández, D., Gallegos, G., & Rodríguez, R. (2012). *Antifungal properties of bioactive compounds from plants: INTECH Open Access Publisher*.
- Chahal, R., Nanda, A., Akkol, E. K., Sobarzo-Sánchez, E., Arya, A., Kaushik, D., . . . Mittal, V. (2021). *Ageratum conyzoides* L. and its secondary metabolites in the management of different fungal pathogens. *Molecules*, 26 (10), 2933.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., Alipour, M., Fatourehchi, S., & Parchini, F. S. (2015). Regulatory effect of Iranian *Hypericum scabrum* essential oils on hepatic metabolizing enzymes in rats treated by acetaminophen. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18 (2), 335 - 348.
- Denaro, M., Smeriglio, A., Barreca, D., De Francesco, C., Occhiuto, C., Milano, G., & Trombetta, D. (2020). Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update. *Phytotherapy Research*, 34 (4), 742 - 768.
- El-Shahir, A. A., El-Wakil, D. A., Abdel Latef, A. A. H., & Youssef, N. H. (2022). Bioactive Compounds and Antifungal Activity of Leaves and Fruits Methanolic Extracts of *Ziziphus spina-christi* L. *Plants*, 11 (6), 746.
- Elshafie, H. S., Sakr, S., Bufo, S. A., & Camele, I. (2017). An attempt of biocontrol the tomato-wilt disease caused by *Verticillium dahliae* using *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* and its bioactive secondary metabolites. *International Journal of Plant Biology*, 8 (1), 7263.
- Ergin, K. N., Karakaya, S., Göger, G., Sytar, O., Demirci, B., & Duman, H. (2022). Anatomical and Phytochemical Characteristics of Different Parts of *Hypericum scabrum* L. Extracts, Essential Oils, and Their Antimicrobial Potential. *Molecules*, 27 (4), 1228.
- Erken, S., Malyer, H., Demirci, F., Demirci, B., & Baser, K. (2001). Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey-I. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (5), 434-438.
- Estevinho, B. N., Horciu, I.-L., Blaga, A.-C., & Rocha, F. (2021). Development of controlled delivery functional systems by microencapsulation of different extracts of plants: *Hypericum perforatum* L., *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum*. *Food and Bioprocess Technology*, 14 (8), 1503 - 1517.
- Gazeran, S., Tajalli, F., & Mohamadi Sani, A. (2016). Effect of ultrasonic extraction on qualitative parameters of saffron edible extract. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19 (5), 1286 - 1291.

- Gibert, S., Edel-Hermann, V., Gautheron, E., Gautheron, N., Sol, J.-M., Capelle, G., . . . Steinberg, C. (2022). First Report of *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens*, and *Fusarium solani* causing root rot in pea in France. *Plant Disease*, 106 (4), 1297.
- Heshmati, A., Alikhani, M., Godarzi, M., & Sadeghimanesh, M. (2018). The Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil and Aqueous, Methanol, Ethanol, Ethyl Acetate and Acetone Extract of *Hypericum scabrum*. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 12 (2), 47 - 51.
- Jobling, J. (2000). Essential oils: A new idea for postharvest disease control. *Good fruit and vegetables magazine*, 11 (3), 50 - 54.
- Khorshidi, J., Morshedloo, M. R., & Moradi, S. (2020). Essential oil composition of three Iranian *Hypericum* species collected from different habitat conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101755.
- Lowe, H., Steele, B., Bryant, J., Fouad, E., Toyang, N., & Ngwa, W. (2021). Antiviral activity of Jamaican medicinal plants and isolated bioactive compounds. *Molecules*, 26 (3), 607.
- Morshedloo, M. R., Ebadi, A., Maggi, F., Fattahi, R., Yazdani, D., & Jafari, M. (2015). Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products*, 76, 565 - 573.
- Nieder, R., Benbi, D. K., & Reichl, F. X. (2018). Health risks associated with pesticides in soils. In *Soil components and human health* (pp. 503-573): Springer.
- Nwosu, M. O., & Okafor, J. I. (1995). Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi: Vorläufige Studien zur antimyzetischen Aktivität einiger offizineller Pflanzen auf *Basidiobolus* und andere pathogene Pilze. *Mycoses*, 38 (5-6), 191 - 195.
- Onaran, A., & Yılar, M. (2012). Antifungal activity of *Trachystemon orientalis* L. aqueous extracts against plant pathogens. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10 (3 & 4), 287 - 291.
- Parry, D., Jenkinson, P., & McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant pathology*, 44 (2), 207 - 238.
- Riaz T, Nawaz Khan S, Javaid A. (2010). Management of corm-rot disease of gladiolus by plant extracts. *Natural Product Research*, 24 (12), 1131 - 1138.
- Roy, C. K., Akter, N., Sarkar, M. K., Pk, M. U., Begum, N., Zenat, E. A., & Jahan, M. A. (2019). Control of early blight of tomato caused by and screening of tomato varieties against the pathogen. *The Open Microbiology Journal*, 13 (1).
- Seyrekoğlu, F., & Temiz, H. (2020). Effect of Extraction Conditions on the Phenolic Content and DPPH Radical Scavenging Activity of *Hypericum perforatum* L. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8 (1), 226 - 229.
- Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., & Sulaiman, S. Z. (2020). *An Overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process*. Paper presented at the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.
- Şesan, T. E., Enache, E., Iacomi, B. M., Oprea, M., Oancea, F., & Iacomi, C. (2017). *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16 (6), 167 - 176.
- Wang, F., Saito, S., Michailides, T. J., & Xiao, C.-L. (2021). Postharvest use of natamycin to control *Alternaria* rot on blueberry fruit caused by *Alternaria alternata* and *A. arborescens*. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111383.

Atf İçin: Sefalı, A. ve Uzun, K. (2023). Türkiye Florası için yeni bir istilacı bitki kaydı: *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn.. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2373-2381.

To Cite: Sefalı, A. & Uzun, K. (2023). A new invasive plant record for Flora of Turkey: *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn.. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2373-2381.

Türkiye Florası İçin Yeni Bir İstilacı Bitki Kaydı: *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn.

Abdurrahman SEFALI^{1*}, Kübra Uzun²

Öne Çıkanlar:

- *Grindelia* cins kaydı
- İstilacı bitki kaydı
- Türkiye Florası için yeni bitki kaydı

Anahtar Kelimeler:

- *Grindelia*
- Yeni cins
- İstilacı bitki
- Yeni kayıt
- Kütahya

ÖZET:

Türkiye’de son yıllarda birçok istilacı bitki kaydı verilmiştir. Bunların bazıları tıbbi ve ekonomik öneme sahip olduğundan bahçe veya tarla kaçkını olarak değerlendirilmektedir. Bahçe kaçkını olduğu düşünülen ve tıbbi kullanımı (üst solunum yolları enfeksiyonlarının tedavisi) olan *Grindelia hirsutula* stilacı bir bitki olarak Kütahya ilimizde tespit edilmiştir. Bu istilacı bitki kaydı aynı zamanda ülkemiz florası için yeni bir cins kaydı (*Grindelia*) niteliğindedir. Bitkiye ait betimlemelerin yanı sıra fotoğraflar ve ayırt edici karakterler (papus kılıçkları, glandular tüyler ve yaprak özellikleri gibi) makalede sunulmuştur. *Grindelia hirsutula*’nın ülkemiz florasında yer alan *Inula* cinsinden farklılıkları belirlenmiştir. Bitkinin Kew Herbariyumu’nda bulunan isotip örneğine ait bilgilere ve dünya üzerindeki yayılışına yer verilmiştir.

A New Invasive Plant Record For Flora of Turkey: *Grindelia hirsutula* Hook. & Arn.

Highlights:

- *Grindelia* genus record
- Record of invasive plant
- New plant record for Flora of Turkey

Keywords:

- *Grindelia*
- New genus
- Invasive plant
- New record
- Kütahya

ABSTRACT:

Many invasive plant records have been given in Turkey in recent years. Some of these are considered as escapees from garden or farm when they have medicinal properties and economic value. *Grindelia hirsutula*, which is thought to be the garden escapees, has many medicinal uses (for example treatment of the upper respiratory tract infection). It has been identified in the province of Kütahya as an invasive plant. The record of this invasive plant is also a new genus record (*Grindelia*) for the flora of Turkey. Photographs and distinctive characters (such as papus awns, glandular hairs and leaf features) as well as plant descriptions are presented in the article. The differences of *Grindelia hirsutula* from genus *Inula* which is present in the flora of Turkey have been determined. Information about the isotype specimen of the plant in the Kew Herbarium and its distribution in the world are given.

¹Abdurrahman SEFALI (Orcid ID: 0000-0002-0092-0857), Bayburt Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Bayburt, Türkiye

²Kübra UZUN (Orcid ID: 0000-0003-0381-5152), Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmokognozi, Kayseri, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Abdurrahman SEFALI, e-mail: asefali@bayburt.edu.tr

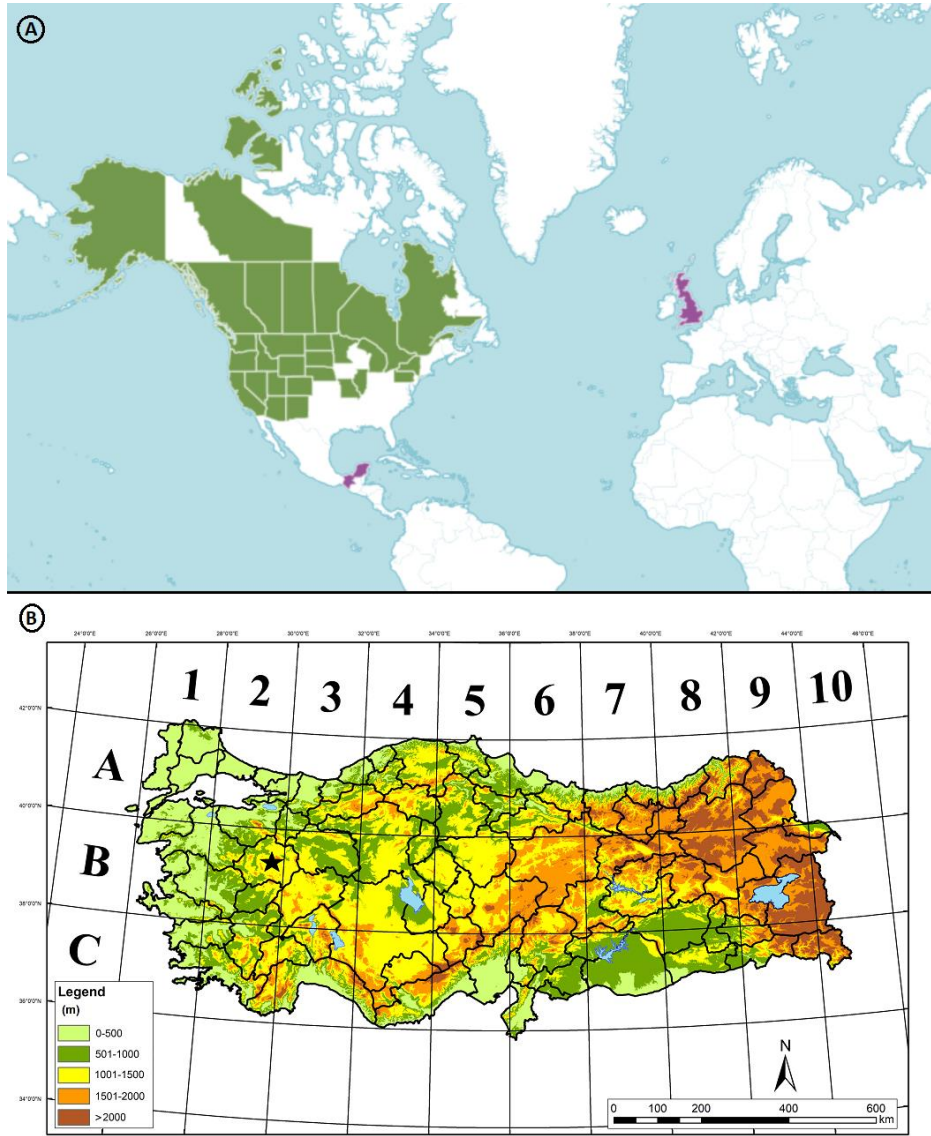
GİRİŞ

İstilacı türler kavramı, ait olmadığı ekosistemlerde hızla çoğalıp geniş alanlara yayılma özelliği göstererek ekoloji veya ekonomi üzerinde istenmeyen etkiler oluşturan türleri tanımlamak için kullanılır (Ricciardi, 2012). İstilacı türler, genellikle biyolojik çeşitliliği az olan alanları işgal ederek yeni girdikleri bölgelerdeki yerli türler ile rekabete girip ekosistemlerin yapısında değişimler meydana getirir (Sağlam ve ark., 2011). Bu türler, rekabet etme güçleri ve genetik çeşitlilikleri sayesinde tarım alanlarından çayır-mera alanlarına, park-bahçelerden tarihi alanlara, sulak habitatlar, tarla ve yol kenarlarından demiryollarına kadar birçok ortama kolaylıkla uyum sağlayabilir. (Özer ve ark., 2001; Uygur ve Uygur, 2010). Bitkilerin yerli olmadıkları başka alanlara taşınmasında özellikle antropojenik faaliyetler etkili olmaktadır (Sefalı ve ark., 2020). İnsanlar bitkileri tıbbi, ekonomik, gıda ve peyzaj amaçlı taşıyabilmektedirler.

Türkiye yaklaşık 92 familya ile 251 cinse ait 340 kadar istilacı bitki taksonunu florasında barındırmaktadır (Uludağ ve ark., 2017). Son on yılda, ülkemizin yerli türlerinden olmayan, egzotik, yabancı ot veya istilacı gibi isimlerle adlandırılan birçok bitki türü kaydının verildiği görülmektedir (Üremiş ve ark., 2014; Ekizoğlu, 2016; Hançerli ve ark., 2018; Fırat, 2018; Yıldırım ve ark., 2019; Terzioğlu, 2020; Terzioğlu ve Özkan, 2020; Karaer ve ark., 2020; Eker ve Tuzlacı, 2021; Yılmaz, 2021; Yazlık, 2021; Bozkurt, ve ark., 2021; Önen, ve ark., 2021; Tunçkol, 2022; Coşkunçelebi ve Terzioğlu, 2022; Sefalı ve Eroğlu, 2022; Asal ve ark., 2022). Kaydı verilen bu bitkiler için farklı araştırmacılar tarafından istilacı, egzotik ve yabancı ot terimleri birbirlerinin yerine kullanılmıştır. Yabancı türler için kullanılan birden fazla kavramın anlam bütünlüğü için hem fikir olunamamıştır (Colautti ve Richardson, 2009). Bu makalede istilacı kavramının kullanılması uygun görülmüştür (Asal ve ark., 2022).

Asteraceae familyası Türkiye’de tespit edilen istilacı bitki türleri içerisinde 38 taksonla ilk sırada yer alırken % 82 doğallaşma başarısına sahiptir (Uludağ vd., 2017). Ülkemizde doğallaşan istilacı türlerin % 30’u Kuzey Amerika kökenlidir (Uludağ vd., 2017). Yeni Dünya bitkilerinden olan *Grindelia* cinsi de Asteraceae familyasına ait olup Amerika kökenlidir (Kuzey ve merkez Amerika) (Cullen, 2000; Bartoli ve Tortosa, 2012). Bu cins dünya genelinde yaklaşık olarak 60 takson ile temsil edilmektedir (Cullen, 2000; Strother ve Wetter, 2006; Moore vd., 2012). Cinsin bazı türleri ise Avrupa’da süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Cullen, 2000). *Grindelia hirsutula* türünün bilimsel amaçlı (özellikle fitokimyasal çalışmalar için) olarak Mısır ve Roma’da kültüre alındığı görülmektedir (El-Shamy vd., 2000; Veres ve ark., 2014). *Grindelia* bitkisi geleneksel olarak üst solunum yolları hastalıkları tedavisinde adjuvan olarak, antispazmodik ve balgam söktürücü amaçlarla kullanılır (Mills ve Hutchins, 2015).

Bu araştırmada 2021 yılı Temmuz ayında, Kütahya ilinde yapılan arazi çalışması neticesinde tuzcul ve drenajı bozuk habitatlarda *Inula* benzeri bir bitki toplanmıştır. Yapılan incelemelerde, papus özellikleri bakımından bitkinin *Inula* cinsine ait olmadığı belirlenince 2022 yılında tekrar saha çalışması yapılarak bitkiye ait örnekler arttırılmıştır. Ayrıntılı incelemeler sonucunda bitkinin *Grindelia* cinsine ait *G. hirsutula* türü olduğu tespit edilmiştir. Bu türün dünyada ve Türkiye’deki yayılışı Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. *Grindelia hirsutula*'ya ait: A. Dünya genelindeki dağılımı: yeşil renk bitkinin doğal olarak bulunduğu, bordo renk ise bitkinin taşındığı ve uyum sağladığı alanları göstermektedir (Royal Botanic Gardens Kew, Plants of the World Online [POWO], 2023)'den alınmıştır), B. Türkiye'deki dağılımı (yıldız şeklinde gösterilmiştir.)

MATERYAL VE METOT

Araştırma materyallerini 2021 yılında Kütahya İli Tavşanlı-Kütahya arası 45. km civarından toplanılan *Grindelia hirsutula* türleri oluşturmaktadır. Bu materyaller Bingöl Üniversitesi Herbaryumu (BIN)'nda muhafaza edilmektedir. Materyallerin Türkiye florasına ait olup olmadığını anlamak için sırasıyla Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası (Davis 1965-1985; Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) (Güner ve ark., 2012) ve Türkiye'nin yabancı bitki florası listesi (Uludağ ve ark., 2017) eserleri incelenmiştir. Bitkinin dünya genelinde istilacı özelliklere sahip olduğunu kontrol etmek amacıyla European Alien Species Information Network (EASIN, 2023) ve European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO, 2023) veri tabanları incelenmiştir. *Grindelia hirsutula*'ya ait cins ve tür tanımlamaları yapılırken Bartoli ve Tortosa (2012)'nin *Grindelia* cinsinin revizyonuna ait çalışmalarından alıntılar yapılarak Türkçeleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Grindelia Willd., Mag. Neuesten Entdeck. Gesammten Naturk. Ges. Naturf. Freunde Berlin1(4):259. 1807. TYPE: *Grindelia inuloides* Willd.

Cins Betimi: Bitkiler, tek veya çok yıllık olup bazen yarı çalı- çalimsı veya çalı halindedir. Basit ve/veya salgı tüyleri bulunabilir. Bu salgı tüyleri saplı veya sapsız olabilir. Yapraklar alternat, sapsız veya saplı, basit ve parçalanmış, kenarları düz veya dişli, bazen dikencik şeklinde olabilir. Kapitulumlar tek veya grup halinde, ışımsal veya disk şeklinde; genellikle yarı küremsi; 4 ila 8 seri halinde fillariler bulunur. Reseptakulumda aken oyukları mevcut, tüysüz. Korolla sarı, bütün, loblu veya dişli; tüp genellikle tüysüz, nadiren glandüler tüylü; stil dallanmış lineer-eliptik, tepesi küt, çıplak. Disk çiçeği, boru şeklinde, 5 dişli; tüp genellikle tüysüz, nadiren bezelidir. Akenler basık veya prizmatik, bazen kanatlı, tüysüz; pappus 2 ila 5 parçalı veya kılçıklı, kılçıklar beyaz ve dökülücü (Bartoli ve Tortosa, 2012).

Grindelia hirsutula Hook. & Arn., Bot. Beechey Voy. 147 (1833) TYPE: USA California: [probably from San Francisco Bay to Monterey Bay, cf. A. Gray, Geol. Surv. Calif. Bot. 1: 304. 1876.] s.d., Botany Beechey's Voyage s.n. (isotip: K 000250075 foto!, Şekil 2).

Syn: *Grindelia camporum* Greene, *G. humilis* Hook. & Arn., *G. maritima* (Greene) Steyerl., *G. nana* Nutt., *G. rubricaulis* DC., *G. stricta* DC. ... (The Plant List [TPL], 2023).

Tür betimi: Bitki çok yıllık olup bazen çalimsı formdadır ve 80 cm kadar yükselebilir; gövdeler bir veya birkaç, dik veya dik ila yukarı doğru dallı, glandüler tüyler mevcut. Alt yapraklar, 7-9 x 2-3 cm, uzun kanatlı saplı, derimsi dokuda, dikdörtgen ila mızrak şekilli, genellikle dişli; gövdede giderek daha küçülen ve gövdeyi saran yapraklar bulunur; yaprak ucu keskin veya küt, kenar düz veya dişli, basit tüyler yok veya yalnızca kenarlarda mevcut. Kapitulumlar ışımsal, saplı, 2-3 cm çapında; yarıküremsi, 10-15 x 15-25 mm; fillariler 4 ila 6 eşit olmayan dizi halinde, dereceli, sivri uçlu; dış ve orta fillariler dar yumurtamsı, geriye kıvrık, 4-6 mm, tüysüz; fillari uçları, kıvrık, 2-3 mm, sapsız glandüler; üst brakteler dar bir şekilde eliptik, dik, kısaca sivri. Dilsel çiçek 15 ila 40; tüp tüysüz, ligulat eliptik ila yumurtamsı, 8-15 mm, apeks tam veya dişli. Tüpsü çiçek 6-7 mm. Akenler sarımsı veya donuk kahverengimsi sarı, 2- veya 3-köşeli, geniş eliptik, 3-5 mm, pürüzsüz, eğik kesik veya tepesinde bir taç mevcut; 2 veya 3 kılçıklı pappus, 3-7 mm, düz, pürüzsüz (Bartoli ve Tortosa, 2012) (Şekil 3, 4).

Çiçeklenme zamanı: (Mayıs) Temmuz – Ağustos (Eylül)

Habitat: Denajı bozuk topraklar.

Türkçe ismi: *Grindelia* cins ismi için grindelya, *Grindelia hirsutula* için de İngilizce ismi coastal gumplant (EPPO, 2022) olduğundan Türkçe isim olarak sakız grindelyası önerilmektedir (Menemen, ve ark., 2016).

Toplanan örnekler: B2: Kütahya, Kütahya Tavşanlı arası, 39° 26' 41" N – 29° 57' 16" E, 931 m, 24.07.2022, *Sefalı 844* (Bingöl Üniversitesi Herbariyumu [BIN]).



Şekil 2. *Grindelia hirsutula*'ya ait Kew'de bulunan isotip örneği (K000250075)



Şekil 3. *Grindelia hirsutula*'ya ait genel görünüm, habitat (A, B.) ve çiçek yapısı (C, D.)



Şekil 4. *Grindelia hirsutula*'ya ait A. Dilsî çiçek, B. Tüpsü çiçek, C. Kılıçık papuslar, D. Aken ve E. Genel kapitula görünümü

SONUÇ

Ülkemizde son yıllarda birçok istilacı bitki kaydı verilmiştir. Bunların bazıları tıbbi ve ekonomik öneme sahip olduğundan bahçe veya tarla kaçkını olarak değerlendirilebilmektedir. Bu bitkilerin % 67 kadarının doğallaştığı bilinmektedir (Uludağ ve ark., 2017). Bahçe kaçkını olduğu düşünülen ve tıbbi kullanımını (üst solunum yolları tedavisi gibi (Mills ve Hutchins, 2015)) olan *Grindelia hirsutula* istilacı bir bitki olarak (Takekawa ve ark., 2002; EPPO, 2023; EASIN, 2023) Kütahya ilimizde tespit edilmiştir. Bitkinin ülkemizde görülmesine, peyzaj/süs bitkisi amaçlı veya tıbbi öneminden dolayı getirilerek doğal habitatlara yayılması neden olmuş olabilir. Bunlara ek olarak bitkinin fark edilmeden getirilmiş olması da olası sebepler içerisinde. Bitkinin Türkiye’de tahrip edilmiş habitatlarda görülmesi, Amerika’da da benzer habitatlarda yaşamakta olduğu için şaşırtıcı olmamıştır. Bu yeni istilacı bitkinin yerli türlerimiz ile birlikte drenajı bozuk, zor bir habitatta bulunması bitkinin ülkemizde yayılma ihtimalini arttırmaktadır. Nihayetinde bitki Amerika’nın yerli türü olmasına rağmen (Bartoli ve Tortosa, 2011) Avrupa ve Avustralya’ya kadar taşınmıştır (EPPO, 2023). *G. hirsutula*’nın, Dünya’nın farklı bölgelerinde yeni yayılış alanları oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu türün ülkemizde takip edilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

Grindelia hirsutula, istilacı bitki kaydı aynı zamanda ülkemiz florası için yeni bir cins kaydı (*Grindelia*) niteliğindedir. Bu cinsin üyelerinin fitokimyasal çalışmalarda da kullanıldığı görülmektedir (Rodriguez ve ark., 2022; Schepetkin ve ark., 2022; Poudel ve ark., 2023). Ülkemiz ekolojik şartlarında yeni yayılmaya başlayan *G. hirsutula*’nın fitokimyasal içeriği ile ilgili olarak çok az sayıda çalışma yer almaktadır (Veres ve ark., 2014). Tıbbi kullanımını da mevcut olan bu türün ilaç hammaddesi kaynağı olabilecek bileşenlerinin belirlenmesinin, hem bitkiden hazırlanacak ekstraların hem de fitokimyasal ayırma ve saflaştırma çalışmaları sonucu elde edilecek sekonder metabolitlerin etkilerinin araştırılmasının ve hatta belirlenen saf bileşiklerin yapı-etki ilişkilerinin belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *G. hirsutula*’nın üzerinde özelleşmiş bir meyve sineği türü (*Goedenia steyskali*) de keşfedilmiştir (Goeden, 2002). Bitkinin ülkemizdeki polinatörler ile ilişkisi de ayrı bir ekoloji konusu olabilir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Asal, D., Çimen, Ö., & Güner, A. (2022). Türkiye’den istilacı bir bitki kaydı: *Eschscholzia californica* Cham. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 9(2), 29-34.
- Bartoli, A., & Tortosa, R. D. (2012). Revision of the North American species of *Grindelia* (Asteraceae) 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 98(4), 447-513.
- Bozkurt, N., Öz, A., & Yıldırım, H. (2021). Türkiye florası için yeni bir bitki türü kaydı: *Zeuxine strateumatica* (L.) Schltr. (Orchidaceae). *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 8(2), 1-6.
- Colautti, R.I., & Richardson, D.M. (2009). Subjectivity and flexibility in invasion terminology: too much of a good thing? *Biological Invasions*, 11, 1225-1229.
- Coşkunçelebi, K., & Terzioğlu, S. (2022). Contribution to the alien flora of Turkey: *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(1), 78-82.

- Cullen J. (2000). *Grindelia*. In Cullen, J., Alexander, J. C. M., Brickell, C. D., Edmondson, J. R., Green, P. S., Heywood, V. H., Jorgenson, P. M., Jury, S. L., Knees, S. G., Maxwell, H. S., Miller, D. M., Murphy, M., Robson, N. K. B., Walters, S. M. & Yeo, P. F. (Eds), *The European Garden Flora* (pp. 565-566). Cambridge- United Kingdom: Cambridge University Press.
- Davis, P. H. (1965-1985). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands 1-9*. Edinburgh-Scotland: Edinburgh University Press.
- Davis, P.H., Mill, R., & Tan, K. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands 10*. Edinburgh-Scotland: Edinburgh University Press.
- European Alien Species Information Network. (2023). European Commission: *Grindelia hirsutula* of EASIN. 13 Mart 2023 tarihinde, <https://alien.jrc.ec.europa.eu/spexplorer/search/searchpaged> adresinden alındı.
- Eker, İ., & Tuzlacı, H. (2021). Türkiye florası için doğallaşmış yeni bir egzotik bitki kaydı: *Freesia leichtlinii* subsp. *alba* (Iridaceae). *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 8(1), 96-105.
- Ekizoğlu, A. (2016). *Pteris multifida* Poir. (Ptericeae): Türkiye için yeni bir eğrelti kaydı. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 3(2), 1-5.
- El-Shamy A. M., El-Hawary S. S., El-Shabrawy A. O., & El-Hefnawy H. M. (2000) Essential oil composition of three *Grindelia* species. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 631-634.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2023). *Grindelia hirsutula* of EPPO. 13 Mart 2023 tarihinde, <https://gd.eppo.int/taxon/GRNST> adresinden alındı.
- Fırat, M. (2018). *Ribes aureum* Pursh (Grossulariaceae): A new record for the flora of Turkey. *Eurasian Journal of Forest Science*, 6(4), 26-31.
- Goeden, R. D. (2002). Life history and description of adults and immature stages of *Goedenia steyskali*, n. sp.(Diptera: Tephritidae) on *Grindelia hirsutula* Hooker and Arnott var. *halli* (Steyermark) MA Lane (Asteraceae) in Southern California. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 104(3), 785-800.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babaç, M.T., (edlr.), (2012). *Türkiye bitkileri listesi (Damarlı bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., & Başer, K. H. C. (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands 11*. Edinburgh –Scotland: Edinburgh University Press.
- Hançerli, L., Ayata, M. U., Çakan, H., Uygur, F. N., & Uygur, S. (2018). Türkiye florası için yeni yabancı ot türü kaydı *Ipomoea hederifolia* L.(Convolvulaceae). *Turkish Journal of Weed Science*, 21(2), 36-38.
- Plants of World Online. (2023). Royal Botanic Gardens: *Grindelia hirsutula* of POWO. 13 Mart 2023 tarihinde, <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:210605-1> adresinden alındı.
- Karaer, F., Terzioğlu, S., & Kutbay, H. G. (2020). A new genus record for the flora of Turkey: *Reynoutria* (Polygonaceae). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(3), 606-610.
- Menemen, Y., Aytaç, Z., & Kandemir, A. (2016). Türkçe bilimsel bitki adlandırma yönergesi. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 3(3), 1-3.
- Mills, S., & Hutchins, R. (2015). *Grindeliae Herba-Grindelia*. Notaries House-United Kingdom: European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) Press.
- Moore, A. J., Bartoli, A., Tortosa, R. D., & Baldwin, B. G. (2012). Phylogeny, biogeography, and chromosome evolution of the amphitropical genus *Grindelia* (Asteraceae) inferred from nuclear ribosomal and chloroplast sequence data. *Taxon*, 61(1), 211-230.
- Önen, H., Özaslan, C., Farooq, S., & Jones, C. A. (2021). *Ipomoea coccinea* L.(Convolvulaceae): A new introduced alien plant species in Turkey. *EPPO Bulletin*, 51(1), 207-212.
- Özer, Z., Kadioğlu, İ., Önen H., & Tursun, N. (2001). *Herboloji (Yabancı ot bilimi)*. Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.

- Poudel, A., Dosoky, N. S., Satyal, P., Swor, K., & Setzer, W. N. (2023). Essential Oil Composition of *Grindelia squarrosa* from Southern Idaho. *Molecules*, 28(9), 3854.
- Ricciardi, A. (2012). *Invasive species*. In *Ecological systems: selected entries from the Encyclopedia of sustainability science and technology* (pp. 161-178). New York, NY: Springer New York.
- Rodriguez, S. A., Velasco, M., Corbalán Córdoba, E., & Murray, A. P. (2022). Bioactive Diterpenoids Obtained from *Grindelia ventanensis* Bartola & Tortosa (Asteraceae). *Chemistry Proceedings*, 12(1), 71.
- Sağlam, N. E., Kesici, U. Y., ve Akdoğan, P. (2011). Karadeniz'deki Bazı İstilacı Türler ve Karadeniz Ekosistemi Üzerine Olan Etkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 25-38.
- Schepetkin, I. A., Özek, G., Özek, T., Kirpotina, L. N., Khlebnikov, A. I., & Quinn, M. T. (2022). Neutrophil Immunomodulatory Activity of (-)-Borneol, a Major Component of Essential Oils Extracted from *Grindelia squarrosa*. *Molecules*, 27(15), 4897.
- Sefalı, A. ve Eroğlu, H. (2022). Türkiye florası için yeni bir melez bitki taksonu kaydı: *Rorippa* × *anceps* (Wahlenb.) Rchb.(Brassicaceae). *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 9(2), 1-10.
- Sefalı, A., Murat, Ü., & Gıdık, B. (2020). Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi kampüs alanında doğal olarak yetişen Brassicaceae çeşitliliğinin belirlenmesi. *Bahçe*, 49(1), 25-33.
- Strother, J. L., & Wetter, M. A. (2006). *Grindelia*. *Flora of North America North of Mexico*, 20, 424-436.
- Takekawa, J. Y., Bias, M. A., Woo, I., Demers, S. A., & Downard, G. T. (2002). *Restoration research and monitoring in bayland wetlands of the San Francisco Bay estuary: The Tolay Creek project*. US Geological Survey, Unpubl. Prog. Rep. Vallejo, CA. 74pp.
- Terzioğlu, S. (2020). *Arrhenatherum elatius* subsp. *bulbosum* (Poaceae): A new alien record for the flora of Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(4), 924-927.
- Terzioğlu, S., & Özkan, K. (2020). *Leptatherum* (Poaceae): A new genus record for the flora of Turkey. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 20(2), 175-180.
- The Plant List. (2023). *Grindelia hirsutula*, TPL. 13 Mart 2023 tarihinde, <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-134411> adresinden alındı.
- Tunçkol, B. (2022). *Verbena brasiliensis* Vell.: A new record of an invasive alien species in the flora of Turkey. *BioInvasions Records*, 11(1), 57-61.
- Uludağ, A., Aksoy, N., Yazlık, A., Arslan, Z. F., Yazmış, E., Üremiş, İ., Cossu, T. A., Groom, Q., Pergl, J., Pyšek, P., & Brundu, G. (2017). Alien flora of Turkey: Checklist, taxonomic composition and ecological attributes. *NeoBiota*, 35, 61-85.
- Uygur S., & Uygur F. N. (2010). Yabancı otların biyolojik mücadelesi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1(1), 79-95.
- Üremiş, İ., Uludağ, A., Arslan, Z. F., & Abacı, O. (2014). A new record for the flora of Turkey: *Ichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae). *EPPO Bulletin*, 44(1), 83-86.
- Veres, K., Roza, O., Laczkó-Zöld, E., & Hohmann, J. (2014). Chemical composition of essential oils of *Grindelia squarrosa* and *G. hirsutula*. *Natural Product Communications*, 9(4), 573-574.
- Yazlık, A. (2021). *Impatiens balfourii* (Balsaminaceae): First recording from the Western Black Sea Region of Turkey. *Turkish Journal of Weed Science*, 24(1), 13-18.
- Yıldırım, H., Özdöl, T., & Yaşayacak, H. (2019). Türkiye için yeni bir istilacı tür kaydı: *Malvastrum coromandelianum* (L.) Gracke (Ebegümeçigiller / Malvaceae Juss.). *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 6, 40-44.
- Yılmaz, H. (2021). *Gamochaeta coarctata*: A new alien species for Turkey. *Turkish Journal of Biodiversity*, 4(2), 77-81.

Atf İçin: Şensoy, E. (2023). Kadmiyum Klorür Toksisitesinin Karaciğer, Böbrek ve Pankreasta Neden Olduğu Hasarı Melatonin Önler mi?. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2382-2392.

To Cite: Şensoy, E. (2023). Does Melatonin Prevent Damage Caused by Cadmium Chloride Toxicity to the Liver, Kidney, and Pancreas?. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2382-2392.

Kadmiyum Klorür Toksisitesinin Karaciğer, Böbrek ve Pankreasta Neden Olduğu Hasarı Melatonin Önler mi?

Erhan ŞENSOY*¹

Öne Çıkanlar:

- CdCl₂ organ ağırlığında artışa neden oldu
- CdCl₂ patolojilere yol açtı
- Melatonin; CdCl₂ kaynaklı patolojileri önledi

Anahtar Kelimeler:

- Kadmiyum
- Melatonin
- Toksisite
- Gebelik

ÖZET:

Yedinci tehlikeli ağır metal olan Kadmiyum, insan sağlığı için temel risk faktörlerinden birisi olarak ifade edilebilir. Besinlerle veya suyla vücuda alınan Kadmiyum, doku ve organlarda birikerek patolojilere yol açar. Düzenleyici görevleri olan Melatonin, aynı zamanda antioksidan bir hormondur. Çalışmanın amacı, oral ve intraperitoneal yolla CdCl₂ verilen gebe farelerin karaciğer, böbrek ve pankreaslarında belirlenen patolojilerin önlenmesinde melatoninin koruyucu rolünün araştırılmasıdır. Sunulan çalışmada gebelik sürecinde Cd alımı arttığı için gebe fareler kullanıldı. 42 gebe fare ile yedi grup (n:6) oluşturuldu. Kontrol (I.) grubuna oral yolla serum fizyolojik verildi. II. gruba CdCl₂, III. gruba Melatoin, IV. gruba CdCl₂+Melatoin oral yolla verildi. V. gruba CdCl₂, VI. gruba Melatoin, VII. gruba CdCl₂+Melatoin intraperitoneal yolla verildi. Her iki uygulama yönteminde CdCl₂ için 2 mg/kg/bw, Melatonin için 3 mg/kg/bw kullanıldı. Rutin histolojik işlemler gerçekleştirilen karaciğer, böbrek ve pankreas dokuları Hematoksilen-Eozinle boyandı. Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu kullanılarak karşılaştırma yapıldı. CdCl₂ verilen grupların ortalama organ ağırlıklarında artış belirlenirken, CdCl₂+Mel gruplarında ortalama organ ağırlıklarının azaldığı görüldü (p: 0.02). Uygulama gruplarında CdCl₂ kaynaklı patolojiler belirlenirken, CdCl₂+Mel verilen gruplarda patolojilerin azaldığı belirlendi. İyileşmenin en çok karaciğerde olduğu görüldü. Melatonin'in karaciğer, böbrek ve pankreasta görülen CdCl₂ kaynaklı patolojilerin tedavisinde etkili olabileceği belirlendi. Gebelik döneminde kadmiyuma yoğun olarak maruz kalan kadınların, uyku düzenlerine dikkat etmeleri ve melatonin takviyesi almaları önerilir. Kadmiyum maruziyetine karşı melatoninin diğer organlardaki etkisinin belirlenmesi için uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Does Melatonin Prevent Damage Caused by Cadmium Chloride Toxicity to the Liver, Kidney, ve Pancreas?

Highlights:

- CdCl₂ caused an increase in organ weight
- CdCl₂ caused pathologies
- Melatonin; prevented pathologies caused CdCl₂

Keywords:

- Cadmium
- Melatonin
- Toxicity
- Pregnancy

ABSTRACT:

Cadmium, the seventh dangerous heavy metal, it may be one of the main risk factors for human health. Cadmium taken into the body with food or water causes pathologies by accumulating in tissues ve organs. Melatonin, which has regulatory functions, is also an antioxidant hormone. The aim of this study is to investigate the protective role of melatonin in the prevention of pathologies determined in the liver, kidney ve pancreas of pregnant mice given CdCl₂ via oral ve intraperitoneally. Pregnant mice were used because Cd uptake was increased during pregnancy. Seven groups (n:6) were formed with 42 pregnant mice. The saline was given to the control (first) group orally. CdCl₂ was given in group II, Melatoin was given Group III, CdCl₂+Melatoin was given Group IV orally. CdCl₂ was given in group V, Melatoin was given Group VI, CdCl₂+Melatoin was given Group VI intraperitoneally. For the both application method 2 mg/kg/bw CdCl₂ and 3 mg/kg/bw Melatonin were used. Hematoxylin-Eosin was applied to the tissues for which routine histological procedures were performed. For evaluation used the light and electron microscope. While an increase determined in average organ weights in CdCl₂ groups, the average organ weights in CdCl₂+Mel groups was decreased. While pathologies were observed in CdCl₂ groups, the pathologies decreased in CdCl₂+Mel groups. Healing effect of Melatonin was mostly in the liver. Melatonin may be effective to treatment pathologiesons in the liver, kidney and pancreas. Pregnant women exposed to cadmium during should pay attention to their sleep patterns and take melatonin supplements. Long-term studies are needed to determine effect of melatonin in other organs against cadmium exposure.

¹Erhan ŞENSOY (Orcid ID: 0000-0003-2989-459X), Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, Karaman, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Erhan ŞENSOY, e-mail: erhansensoy@kmu.edu.tr

Etik Kurul Onayı /Ethics Committee Approval: Bu makalede yer alan hayvan deneyi için "Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Yerel Etik Kurulu"nın Tarih: 29.11.2019 Toplantı No 2019-64 sayılı kararı ile Etik Kurul Onayı alınmıştır.

GİRİŞ

Endüstriyel üretimin artmasıyla birlikte ağır metal kullanımını da artırmış, bu durum önemli sağlık sorunlarını da beraberinde getirmiştir. Ağır bir metal olan Kadmiyum (Cd) vücut için gerekli bir element olmayıp, toksik etkiye sahiptir (Farhan, 2020). Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Kurumu'na (ATSDR) göre kanserojen tip-I olarak sınıflandırılmıştır (Janicka ve ark., 2015). Kadmiyumun doğada farklı formları olmakla birlikte; kadmiyum klorür ($CdCl_2$), kadmiyum sülfat, kadmiyum sülfür, kadmiyum oksit en yaygın olanlarıdır (Kumar ve ark.,2018). Kaya erozyonu, volkanik patlama, fosil yakıtların yanması ve endüstriyel faaliyetler sonucu açığa çıkar (Mohammadi ve ark., 2019). Düşük dozları bile toksisiteye yol açabilen Cd; uzun biyolojik yarılanma ömrü, vücuttan düşük atılım hızı ve dokularda birikme gibi özellikleri nedeniyle besin zinciri ve insan sağlığı açısından risk teşkil eder (Renugadevi ve Milton, 2010). Cd, ince barsaktan emildikten sonra kan hücresi proteini olan albümine bağlanarak önce karaciğere, ardından Cd-Metallotiyonin bileşiğine dönüşerek (Cd-MT) böbreğe geçtiği için vücutta biriken Cd'nin yaklaşık %50'si karaciğer ve böbrekte bulunur (Akyolcu ve ark., 2003). Mevcut araştırmalar, çok düşük seviyelerde bile maruz kalınan Cd maruziyetinin karaciğer, böbrek ve pankreasta olumsuz etkilere yol açtığına işaret etmektedir (Zhang ve ark., 2007; Mohammadi ve ark., 2019).

Günümüzde Cd toksisitesinin önlenmesine yönelik çalışmalar devam etmekle birlikte, yan etkisi olmayan doğal ve tamamlayıcı alternatif ajanlara yönelim artmaktadır. Epifiz bezinin bir hormonu olan Melatonin (Mel; N-asetil-5-metoksitriptamin); omurgalıların bağırsak, deri ve lökositlerden, ayrıca bakteri, protozoa, bitki, mantar ve omurgasızlar tarafından üretilebilir (Shen ve ark., 2022). Uyku döngüsü ve mevsimsel ritimleri düzenlemesinin yanında, immünostimülatör ve sitoprotektif doğal bir antioksidan ajandır (Carlomagno ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2022). Melatoninin antioksidatif rolüne yönelik çalışmalar bulunmakla beraber (Karaca ve ark., 2014; Wilkinson ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2022), farklı yollarla Cd'a maruz kalan memelilerin gebelik durumunda organlarındaki etkisinin karşılaştırıldığı ve Mel'in koruyucu rolünün test edildiği çalışmalar yetersizdir. Çalışmanın amacı; oral ve intraperitoneal (i.p.) yolla $CdCl_2$ verilen gebe farelerin karaciğer, böbrek ve pankreaslarında meydana gelen değişimlerin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi ve Mel'in koruyucu rolünün test edilmesidir.

MATERYAL VE METOT

Etik Kurul İzni

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden etik kurul izni (SÜDAM, 2019-64) alındı.

Deney Hayvanı

Deney hayvanı olarak kullanılan sekiz haftalık Swiss Albino gebe fareler SÜDAM'dan temin edildi, çalışma süresince farelerin günlük bakımları aynı kurumda gerçekleştirildi.

Çalışma Grupları ve Yapılan İşlemler

Bir gece çiftleşmeye bırakılan fareler arasından vajinal tıkaç oluşumu gözlenen 42 fare (Şensoy ve Öznurlu, 2019), gebeliğin başladığı kabul edilerek rastgele kafeslere alınarak yedi grup oluşturuldu (n:6) (Çizelge1). 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde ve oda sıcaklığında tutulan farelere, yemek ve su kısıtlaması uygulanmadı.

Çizelge 1. Gruplar ve yapılan işlemler

Uygulama Grupları (n:6)	Uygulanan Madde	Uygulanan Maddenin Dozu	Uygulama Yöntemi	Uygulama Süresi (Gün)
I. Grup	Salin (S)	2 ml bw	Oral	21
II. Grup	S+ CdCl ₂	2 ml bw+2 mg kg bw	Oral	21
III. Grup	S+Mel	2 ml bw+3 mg kg bw	Oral	21
IV. Grup	S+ CdCl ₂ +Mel	2 ml +2 mg kg bw+3mg kg bw	Oral	21
V. Grup	S+CdCl ₂	2 ml bw+2 mg kg bw	i.p.	21
VI. Grup	S+Mel	2 ml bw+3 mg kg bw	i.p.	21
VII. Grup	S+CdCl ₂ +Mel	2ml bw+2 mg kg bw+3mg kg/bw	i.p.	21

Cd'nin oral LD₅₀ değeri fareler için 107 mg/kg/bw'dir (Sigma-Aldrich, 2022). Çalışmada farelere LD₅₀ değerinin 1/50'si olan 2 mg/kg/bw CdCl₂ ve 3 mg/kg/bw Mel uygulandı (Çizelge1). Uygulanan dozlar literatür bilgisi dikkate alınarak belirlendi (Oliveira ve ark., 2009; Zargar ve ark., 2015; Satarug ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2022; Schaupp ve ark., 2022; Feng ve ark., 2022; Cvean ve ark., 2017; Jiang ve ark., 2022; Pivonello ve ark., 2022; Rahbarghazi ve ark., 2022; Lopes ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2022). Grup I'e oral yolla salin verildi. Mel ve CdCl₂ salin içinde çözülerek Grup II, III ve IV'e oral yolla; Grup V, VI, VII'ye i.p. yolla 21 gün süreyle uygulandı (Çizelge1). Uygulama sonrası fareler servikal dislokasyon yoluyla öldürüldü. Karaciğer, böbrek ve pankreasta bisturi yardımıyla alınan örnekler %10'luk formaldehite transfer edildi (Şensoy ve Öznurlu, 2019). Kararlı yapısının bozulmaması için Mel karanlıkta tutuldu ve tüm uygulamalar akşam aynı saatte yapıldı. Kullanılan kimyasallar Sigma ve Merck'ten temin edildi.

Histolojik Analiz ve Yöntemler

Karaciğer, böbrek ve pankreasta alınan dokular, rutin doku takibinin ardından %10'luk formaldehitte fikse edilip parafine aktarıldı. Parafin bloklardan alınan 6 µm'lik kesitlerin boyanması için Hematoksilin-Eozin kullanıldı (Şensoy ve Öznurlu, 2019). Dokular elektron mikroskopisi için 4.39 nm iridyum ile kaplandı. Aynı doku bölgeleri, ışık (Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 ve DS-5M dijital kamera x40 büyütmede) ve elektron mikroskopu (ZEISS Gemini SEM 500 Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskopu; FE-SEM, x5K büyütme) altında incelendi.

Histolojik incelemelerde histomorfolojik kriter olarak; karaciğerde hepatosit ve sinüzoidlerin genel durumu, mukozal dejenerasyon, hemoraji ve nekroz oluşumu açısından değerlendirildi (Aydoğdu ve ark., 2007, Karaca ve ark., 2014, Alharbi ve ark., 2019). Böbrekte; Glomerul ve Bowman kapsülü yapılarının genel durumu, kapsül ve boşluk değişimleri, dejeneratif alan ve hemoraji varlığı araştırıldı (Kaplan ve ark., 2009, El-Neweshy ve Srag 2011, Alharbi ve ark., 2019). Pankreasta; Langerhans yapıları ve β hücrelerinin genel durumu ile dejenerasyonu ve hemoraji oluşumu açısından değerlendirildi(Gökalp ve ark., 2005; Alharbi ve ark., 2019).

İstatistiksel Analiz

Analizler için SPSS paket programı kullanıldı. Tek yönlü varyans analizleri için Anova ve ikili karşılaştırmalarda LSD testleri yapıldı (p<0.05).

BULGULAR VE TARTIŞMA**Organ Ağırlıkları**

Çalışma sürecinde hayvan kaybı yaşanmadı. Sıçanların organ ağırlıkları çalışmanın son günü tartıldı.

Çizelge 2. Farelerin organ ağırlıkları

Grup	Ortalama Organ Ağırlığı (gr)*		
	Karaciğer	Pankreas	Böbrekler
I. grup	2.10 ^a	0.39 ^a	0.54 ^a
II. grup	2.95 ^b	0.39 ^a	0.59 ^b
III. grup	2.86 ^c	0.35 ^a	0.53 ^c
IV. grup	2.69 ^c	0.39 ^a	0.52 ^c
V. grup	2.68 ^b	0.34 ^a	0.57 ^b
VI. grup	2.64 ^c	0.35 ^a	0.52 ^c
VII. grup	2.55 ^c	0.36 ^a	0.55 ^c

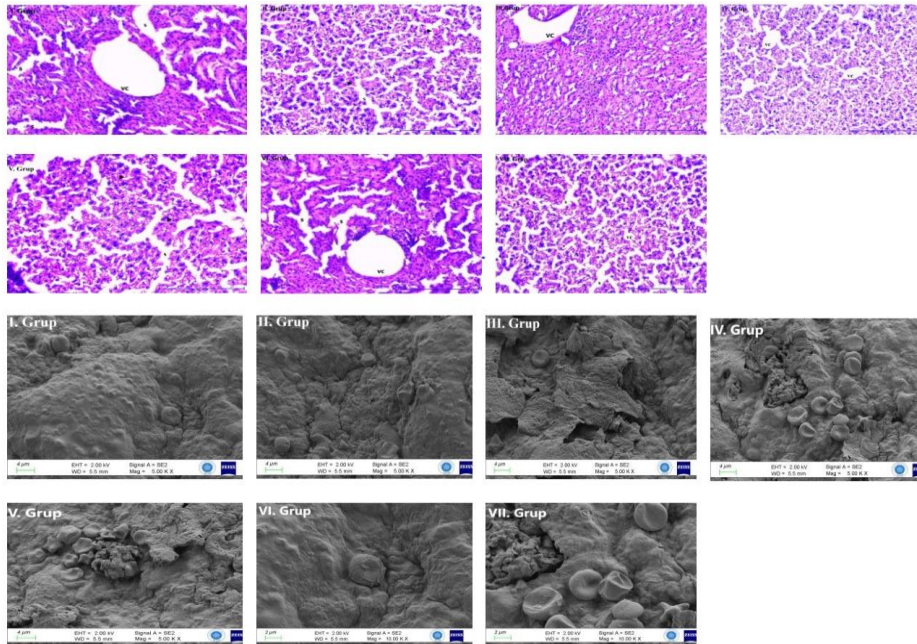
*Aynı sütunda bulunan farklı harfler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (p<0.05)

Ortalama karaciğer ağırlığının tüm gruplarda artış gösterdiği, oral yolla CdCl₂ verilen gruplardaki artışın i.p. yolla uygulanan gruplardan yüksek olduğu ve II. Gruptaki artışın maksimum olduğu belirlendi (p: 0.02). Ortalama böbrek ağırlığının, hem oral hem de i.p. yolla CdCl₂ uygulanan gruplarda benzer olduğu görüldü (p: 0.02). CdCl₂+Mel gruplarında karaciğer ve böbrek ağırlıklarının azalarak kontrol grubu seviyesine gerilemesi önemli olarak değerlendirildi. Ortalama pankreas ağırlığı bakımından bütün gruplar arasında benzerlik olduğu görüldü (p: 0.15;Çizelge2).

Histolojik Analiz

Karaciğer

Kontrol grubu karaciğer dokusunda; hepatosit ve sinüzoid görünümünün standart olduğu, normal büyüklükte olan hepatositlerin nükleus ve sitoplazmalarının koyu boyandığı, sinüzoidlerin Vena Cava etrafında düzenli olarak konumlandığı belirlendi (I. Grup). Oral ve i.p. yolla CdCl₂ verilen gruplarda; dejeneratif hepatositler, sinüzoidlerde daralma ve düzensizlik ile hemoraji ve yer yer nekrotik alanlar görüldü (II. grup ve V. grup). Söz konusu dejenerasyonların oral yolla CdCl₂ verilen V. grupta daha yoğun olması önemli olarak değerlendirildi. Oral ve i.p. yolla CdCl₂+Mel verilen gruplarda; uygulama gruplarına nazaran toksisite kaynaklı patolojilerin azaldığı, sinüzoidlerin düzenli olduğu ve dejeneratif hepatositlerin çok azaldığı belirlenirken, hemoraji görülmedi (IV. grup ve VII. Grup; Şekil 1).



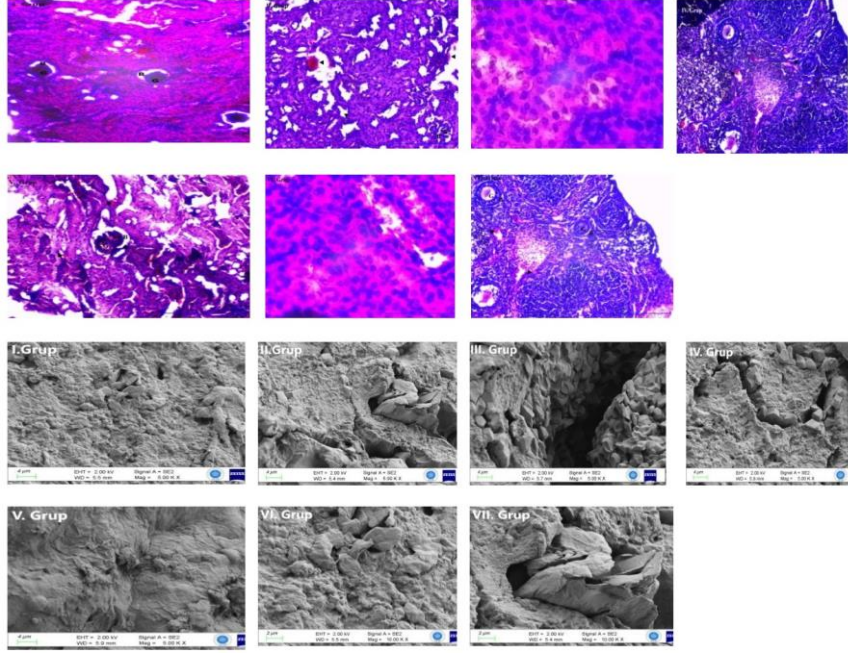
Şekil 1. Karaciğer dokusu ışık mikroskobu görüntüleri

(H-E boyama, Büyütme: 100 µm X 40). VC: Vena Centralis, S: Sinüzoid, →: Normal görünümlü hepatosit, →:Dejeneratif görünümlü hepatosit, ►: Hemoraji

Karaciğer dokusu elektron mikroskobu görüntüleri (EHT: 2.00 kV; Büyütme: 5 K – 10K).

Böbrek

Kontrol grubu böbrek dokusunda; Glomerul ve Bowman kapsülü yapılarının standart, Bowman kapsül boşluklarının normal genişliğe sahip olduğu belirlendi (I. Grup). Oral ve i.p. yolla CdCl₂ verilen gruplarda; Glomerul ve Bowman kapsülünün konturlarının tabii olmadığı, kapsül boşluklarının genişlediği tespit edildi (II. grup ve V. grup). Her iki grupta ileri düzeyde hemoraji tespit edilmekle birlikte, söz konusu patolojilerin ve hemoraji varlığının II. grupta ileri düzeyde olduğu görüldü. Oral ve i.p. yolla CdCl₂+Mel verilen gruplarda; uygulama gruplarına nazaran hemorajinin azaldığı belirlendi (IV. grup ve VII. grup), (Şekil 2).



Şekil 2. Böbrek dokusu ışık mikroskobu görüntüleri (H-E boyama, Büyütme: 100 µm X 40*).
G: Glomerul, B: Bowman boşluğu, ►: Hemoraji
Böbrek dokusu elektron mikroskobu görüntüleri (EHT: 2.00 kV; Büyütme: 5 K – 10K).

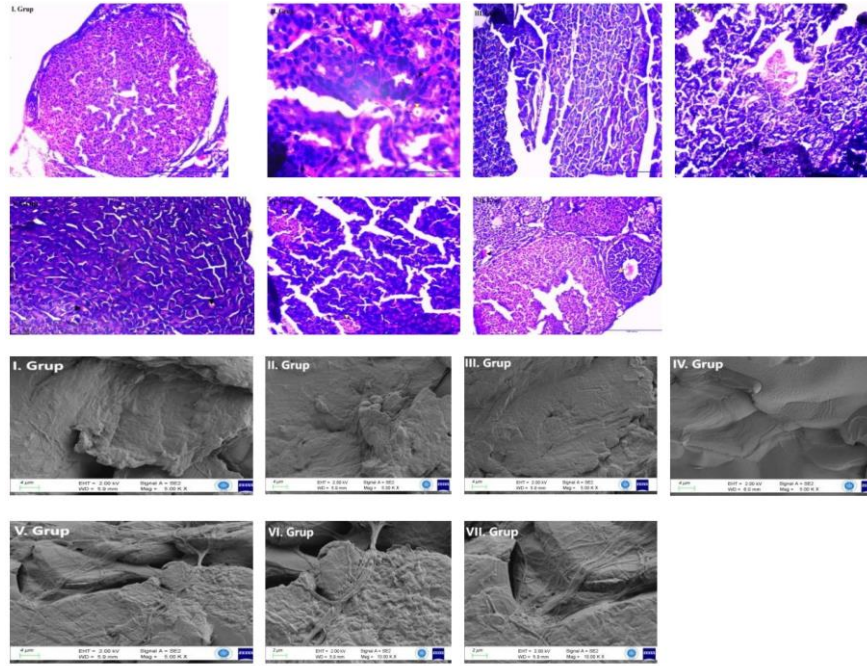
Pankreas

Kontrol grubu pankreas dokusunun normal görünümde olduğu belirlenirken, Langerhans yapılarında ve β hücrelerinde dejenerasyon tespit edilmedi (I. Grup). Oral ve i.p. yolla CdCl₂ verilen gruplarda; Langerhans adacığının konturlarında düzensizlik, β hücrelerinde dejenerasyon ile birlikte yoğun hemoraji saptandı (II. grup ve V. grup). Oral ve i.p. yolla CdCl₂+Mel verilen gruplarda; belirgin bir normalleşme belirlenirken, Langerhans adacığının konturlarının steverta yakın olduğu, uygulama gruplarında görülen β hücresi dejenerasyonu ve hemoraji gibi patolojilerin önemli ölçüde azaldığı görüldü (II. grup ve V. grup). (Şekil 3).

Önemli bir çevresel kirlenici olan ağır metaller canlılarda patolojilere yol açabilirler (Liu ve ark.,2019). Yedinci tehlikeli ağır metal olan Cd (Arroyo ve ark.,2012), organların karbonhidrat ve lipid kompozisyonlarını bozarak, şekil ve ağırlıklarında değişime (Fuad ve Jresat 2015) ve çoklu organ toksisitesine neden olabilir (Beyrami ve ark.,2020). Söz konusu etkiler Cd'ye maruz kalma yoluna, dozuna ve süresine bağlı olarak değişir (Liu ve ark.,2018). Gebelik döneminde Cd toksisitesine maruz bırakılan farelerin yavrularında ortalama kuyruk, iki temporal bölge arası ve femur uzunluğu gibi temel büyüme ve gelişme parametrelerinde, değişim görüldüğü ifade edilmiştir (Şensoy, 2023). Konuyla ilgili olarak yapılan güncel çalışmalarda; Cd toksisitesinin farelerin vücut ve organ ağırlıklarında azalmaya neden olduğuna yer verilmiştir (Saedi ve ark.,2020; Chen ve ark.,2023; Chen ve ark., 2023; Howard ve

Kadmiyum Klorür Toksisitesinin Karaciğer, Böbrek ve Pankreasta Neden Olduğu Hasarı Melatonin Önler mi?

ark.,2023). Model canlı olarak *Drosophila Melanogaster* kullanılan çalışmalarda Cd toksisitesinin böceklerde sağ kalım oranını azalttığı (Güneş ve Şensoy, 2020) ve lipotoksisiteye yol açtığı bildirilmiştir (Güneş ve Şensoy, 2022). Buna karşın, El-Demerdash ve ark.,(2004) göre, i.p. yolla uygulanan Cd, ratların ortalama karaciğer ve böbrek ağırlıklarında artışa neden olmuştur. Sunulan çalışmada, ortalama karaciğer ve böbrek ağırlıklarının hem oral hem de i.p. yolla CdCl₂ verilen gruplarda diğer gruplardan anlamlı şekilde yüksek olmasının, söz konusu organlarda CdCl₂ birikim gerçekleşmesi nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir.



Şekil 3. Pankreas dokusu ışık mikroskobu görüntüleri (H-E boyama; Büyütme: 100 µm X 40^{*}). →: Langerhans adacığı, ►: Beta hücreleri.
Pankreas dokusu elektron mikroskobu görüntüleri (EHT: 2.00 kV; Büyütme: 5 K – 10)

Cd toksisitesinin giderilmesinde aktif olarak görev alan ve birikiminin en yoğun olarak gerçekleştiği organlar olan karaciğer ve böbreklerde, ileri düzeyde patolojiler görülür (Kumar ve ark., 2019; Yu ve ark., 2019; Zhu ve ark., 2019; Xiong ve ark., 2021). Karaciğerden sentezlenen ve böbrek hücrelerince tutulan Kadmiyum-Metallothionein (Cd-MT) kompleksi seviyesi, yüksek değerlere ulaştığında kortekste hasara yol açar (Erdem ve Hatipoğlu, 2011). Malki (2014) göre, oral yolla verilen CdCl₂ ratların böbrek dokularında hasara yol açmıştır. Benzer bir çalışmada, Cd maruziyetinin fare böbrek tübüllerinde nekroza neden olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark.,2013). Oral yolla Cd uygulanan sıçanların karaciğerinde; yağ ve hidropik dejenerasyon ile fibrosiz ve mononükleer hücre infiltrasyonu olduğu bildirilmiştir (Karaca ve ark., 2014). Cd toksisitesinin fare karaciğerinde hücresel dejenerasyona, parankim dokuda yapısal anormalliğe, vakuol oluşumuna ve nekroza neden olduğu bildirilmiştir (El-Sokkary ve ark.,2010). Farelerle yapılan benzer bir çalışmada, Cd'nin karaciğerde enflamatuar hücre infiltrasyonuna, sinüzoidlerde daralmaya, yağ hücrelerinde dejenerasyona, vakuol ve nekrotik alan oluşumuna yol açtığı vurgulanmıştır (Renugadevi ve Prabu, 2010). Diğer bir çalışmada Cd'nin fare karaciğerinde biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklere neden olduğuna yer verilmiştir (Deveci ve ark. 2023). Buna karşın Tuna (2010), Cd'nin ratların karaciğer ve böbreklerinde hafif şiddette dejenerasyona yol açmasına karşın, pankreasta önemli değişiklikler saptanmadığını ifade etmiştir. İçme suyuna Cd eklenen ratların pankreas dokusunda hemoraji ve bağ dokuda artış olduğu bildirilmiştir

(Gökalp ve ark., 2005). Cd'nin farelerde pankreasta apoptozu indüklediği, Langerhans adacıklarının sayısı ve aktivitesinde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Mohammadi ve ark., 2019).

Literatürde, Cd toksisitesi nedeniyle oluşan patolojilerin belirlenmesinde, farklı deney hayvanlarının model canlı olarak kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır. Oral yolla Cd verilen ördeklerin karaciğerde dejenerasyona, sinüzoidlerde daralmaya, Centralis etrafında enflamasyona (Cao ve ark.,2016), böbreklerde interstisyum tıkanıklığına, hemoraji ve epitel hücrelerinde şişme gibi ağır dejenerasyonlara yol açtığı bildirilmiştir (Xia ve ark., 2015). Cd toksisitesinin *Carassius auratus gibelio* türünde hepatosit hipertrofinine, sinüzoidlerde daralmaya ve karaciğer dokusunda nekroza (Liu ve ark.,2019), *Oreochromis niloticus* türünde karaciğer sinüzoidlerinde tıkanmaya, böbrek glomeruluslarda daralmaya ve her iki orgvea da nekroza (Omer ve ark., 2012), *Labidochromis caeruleus* türünde karaciğerde dejenerasyona (Küçük ve ark., 2018) yol açtığı bildirilmiştir. Karaciğer, böbrek ve pankreasta CdCl₂ kaynaklı patolojilerin varlığına işaret eden sonuçlarımız, benzer çalışmalarla uyumlu olup, söz konusu dejenerasyonların oral yolla CdCl₂ verilen grupta ileri düzeyde gerçekleştiğinin belirlenmesi yönüyle özgün bir değere sahiptir.

Doğal ve güçlü bir antioksidan olan Melatonin; mevsimsel döngü, uyku ve bazı fizyolojik olayların düzenlenmesinde görev yapar (Carlomagno ve ark.,2018; Wilkinson ve ark.,2016; Zhang ve ark.,2022). Literatürde, Melatoninin koruyucu rolünün araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. İnsanlarla yapılan bir çalışmada; melatoninin, prostat stromal hücrelerinde mitokondriyal STAT3 sinyali yoluyla kadmiyum kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olduğuna yer verilmiştir (Hyun ve ark., 2023).Melatoninin, fare ve insan plasental trofoblastlarında, Cd kaynaklı patolojileri engellediği ve apoptozu yavaşlattığı bildirilmiştir (Zhang ve ark.,2022; Zhu ve ark.,2022). Mel ile beslenen farelerin bağırsak florasının olumlu etkilendiği, bağırsak hastalıklarının azaldığı ifade edilmiştir (Wilkinson ve ark.,2016; Zhang, 2022). I.p. yolla Cd verilen sıçan karaciğerinde oluşan dejenerasyon, fibrosiz ve mononükleer hücre infiltrasyonu gibi patolojilerin, Mel uygulamasıyla kaybolduğuna yer verilmiştir (Karaca ve ark., 2014). Benzer bir çalışmada, 22 gün süreyle i.p. yolla Cd verilen sıçanların karaciğerinde meydana gelen patolojilerin, Mel uygulamasıyla iyileştiği bildirilmiştir (El-Sokkary ve ark.,2010). Chwelatiuk ve ark., (2006) göre, Mel farelerin böbrek, karaciğer ve bağırsaklarındaki Cd konsantrasyonlarını azaltmıştır. Melatoninin kadmiyum stresi sırasında bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Chmur ve Bajguz (2023). Mel uygulamasının gebe farelerin karaciğer, böbrek ve pankreasında Cd kaynaklı patolojileri iyileştirdiğine işaret eden sonuçlarımız benzer çalışmalarla uyumlu olup, belirlenen iyileşmenin Cd birikiminin en yoğun olduğu organlar olan karaciğer ve böbrekte ileri düzeyde gözlenmesi çalışmanın önemli bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

SONUÇ

Sunulan çalışmada; Mel'in karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelen toksisite kaynaklı ağırlık artışını normal seviyelere geriletmediği belirlendi. Mel'in karaciğer ve böbrekteki patolojilerin önlenmesinde, pankreasa nazaran daha etkili olduğu saptandı. Bu nedenle gebelik döneminde kadmiyuma yoğun olarak maruz kalan kadınların, uyku düzenlerine dikkat etmeleri ve Mel takviyesi almaları önerilir. Cd maruziyetine karşı Mel'in diğer organlardaki etkisinin belirlenmesi için uzun süreli çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Araştırmanın planlanması, deney hayvanlarının temini, deney hayvanlarına yapılan uygulamalar, histolojik işlemler, istatistiksel analiz ile makalenin yazımı ve eleştirel son okuma Erhan ŞENSOY tarafından gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akyolcu, M.C., Ozcelik, D., Durseu, S., Toplan, S., Kahraman, R. (2003). Accumulation of cadmium in tissue ve its effect on live performance. *J Phys IV France*, 107, 333–336
- Alharbi, N., Elobeid, M., Virk, P. (2019). Protective effect of quercetin treatment against cadmium-induced oxidative stress in a male rat model. *Pakistan J Zool* 15,(6), 2287-96. DOI: [http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/\(2019\).51.6.2287.2296](http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/(2019).51.6.2287.2296)
- Arroyo, S., Flores, M., Ortiz, B., Gómez-Quiroz, E., Gutiérrez-Ruiz, C. (2012). Liver ve cadmium toxicity. *J Drug Metab Toxicol S*, 5,1-9.
- Aydoğdu, N., Kanter, M., Erbaş, H., Kaymak, K. (2007). Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri. *Erciyes Tıp Fak Derg*, 29,(2), 89-96.
- Beyrami, M., Karimi, E., Oskoueian, E. (2020). Synthesized chrysin-loaded nanoliposomes improves cadmium-induced toxicity in mice. *Environ Sci Pollut Res*, 27, 40643–40651 <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10113-7>
- Cvean, D., Bayram Ş, Calapoğlu N, Gürbüz N, Cankara M (2017). Effect of melatonin ve selenium on reproductive system of cadmium given Female Rats. *SDU Med Fac*, J 24 (3) 84-95, 10.17343/sdutfd.270310
- Cao, H., Gao, F., Xia, B., Zhang, M., Liao, Y., Yang, Z., Zhang, C. (2016). Alterations in trace element levels ve mRNA expression of Hsps ve inflammatory cytokines in livers of duck exposed to molybdenum or/ve cadmium. *Ecotoxicology ve Environmental Safety*, 125, 93-101. [https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.\(2015\).12.003](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.(2015).12.003)
- Carlomagno, G., Minini, M., Tilotta, M., Unfer, V. (2018). From implantation to birth: insight into molecular melatonin functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (9), 2802: <https://doi.org/10.3390/ijms19092802>
- Chen, Q., Zhang, R., Ngu, Y., (2013). The protective effect of grape seed procyanidin extract against cadmium induced renal oxidative damage in mice. *Environmental Toxicology ve Pharmacology*, 36, 759–68
- Chen, Y., Zhou, C., Bian, Y., Fu, F., Zhao, X., Zhang, M., Ruan, H. (2023). Cadmium exposure promotes thyroid pyroptosis ve endocrine dysfunction by inhibiting Nrf2/Keap1 signaling. *Ecotoxicology ve Environmental Safety* 249, 114376.
- Chmur, M., & Bajguz, A. (2023). Melatonin involved in protective effects against cadmium stress in *Wolffia Arrhiza*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2), 1178.
- Chwelatiuk, E., Włostowki, T., Krasowska, A., Bonda, E. (2006). The effect of orally administered melatonin on tissue accumulation ve toxicity of cadmium in mice. *Journal of Trace Elements in Medicine ve Biology*, 19 (4), 259-65.
- Deveci, A., Gökhan, R., Kükürt, A., Mushap, K., & Deveci, A. (2023). The protective effect of caffeic acid phenethyl 5 ester on cadmium-induced liver toxicity: A histopathological ve biochemical study. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1-23.

- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Kedwany, F.S., Baghdadi, H.H. (2004). Cadmium induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters ve semen quality of male rats: protective role of vitamin E ve β -carotene. *Food Chem Toxicol*, 42, 1563-71.
- El-Neweshy, S., Srag, A. (2011). Chronic malachite green toxicity in nile tilapia: pathological ve haematological studies with special reference to quantitative histopathological assessment. *Researcher* 3 (4), 55-64.
- El-Sokkary, G., Nafady, A., Shabash, H. (2010). Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress ve morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73, 456-63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.014>
- Erdem, T., Hatipoğlu, F. (2011). Pathology of single dose cadmium toxicity ve investigations of protective effect of simultaneous chlorpromazine administrations in rats. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 27 (1), 45-58.
- Farhan, S. (2020). Effects of tribulus terrestris fruits on renal ve lung tissues in female mice administered with cadmium. *World's Veterinary Journal*, 10 (3), 414-0. DOI: [https://dx.doi.org/10.36380/scil.\(2020\).wvj51](https://dx.doi.org/10.36380/scil.(2020).wvj51).
- Feng, X., Jin, R., Zhou, Q., Jiang, Y., Wang, X., Zhang, J. (2022). Deep learning approach identified a gene signature predictive of the severity of renal damage caused by chronic cadmium accumulation. *J Hazard Mater*, 433 Article 128795, 10.1016/j.jhazmat.(2022).128795
- Fouad A, Jresat I. (2015). Thymoquinone therapy abrogates toxic effect of cadmium on rat testes. *Verologia* 47, 417–26, <https://doi.org/10.1111/ve.12281>
- Güneş, E., & Şensoy, E. (2020). The effect of Turkish coffee ve cadmium acetate on Drosophila Melanogaster. *Journal of International Environmental Application ve Science*, 15 (1), 1-8.
- Güneş, E., & Şensoy, E. (2022). Is Turkish coffee protects Drosophila melanogaster on cadmium acetate toxicity by promoting antioxidant enzymes?. *Chemosphere*, 296, 133972.
- Gökalp, O., Mehmet, Ö., Ahmet, K., Çiçek, E., Sütçü, R., Koçak, A., Aktürk, O. (2005), Ratlarda kadmiyumun pankreasa etkileri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 12 (3), 27-30.
- Hagar, H., Al Malki, W. (2014). Betaine supplementation protects against renal injury induced by cadmium intoxication in rats: role of oxidative stress ve caspase-3. *Environmental Toxicology ve Pharmacology* 37 (2), 803-11.
- Hyun, M., Kim, H., Kim, J., Lee, J., Lee, J., Rathor, L., & Heo, D. (2023). Melatonin protects against cadmium-induced oxidative stress via mitochondrial STAT3 signaling in human prostate stromal cells. *Communications Biology*, 6 (1), 157.
- Howard, A., Kuznietsova, H., Dziubenko, N., Aigle, A., Natuzzi, M., Thomas, E., Tillement, O. (2023). Combating lead ve cadmium exposure with an orally administered chitosan-based chelating polymer. *Scientific Reports*, 13(1), 2215. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28968-4>.
- Janicka, M., Binkowski, Ł.J., Błaszczyk, M., Paluch, J., Wojtaś, W. (2015). Cadmium, lead ve mercury concentrations ve their influence on morphological parameters in blood donors from different age groups from southern Polve. *Journal of Trace Elements in Medicine ve Biology*, 29, 342-6.
- Jiang, Z., Xu, D., Yao, X., Liu, W., Liu, N., Wang, Q. (2022). An integrated multi-omics approach revealed the regulation of melatonin on age-dependent mitochondrial function impair ve lipid dyshomeostasis in mice hippocampus. *Pharmacol Res*, 179,1 Article 106210, 10.1016/j.phrs.(2022).106210
- Kaplan, M., Atakan, H., Aydoğdu, N., Aktoz, T., Puyan, Ö., Şeren, G., Tokuç, B., İnci, O. (2009). The effect of melatonin on cadmium-induced renal injury in chronically exposed rats. *Turkish Journal of Urology*, 35 (2), 139-147

Kadmiyum Klorür Toksisitesinin Karaciğer, Böbrek ve Pankreasta Neden Olduğu Hasarı Melatonin Önler mi?

- Karaca, Ö., Sunay, B., Kuş, A., Gülcen, B., Özcan, E., Ögetürk, M., Kuş, İ. (2014). Investigation of the effects of melatonin against cadmium-induced experimental liver injury at biochemical ve histopathological levels. *Firat Medical Journal*, 19 (3), 110-5. info:eu-repo/semantics/openAccess
- Kumar, N., Kumari, V., Ram, C., Kumar, B.S.B., Verma, S. (2018). Impact of oral cadmium intoxication on levels of different essential trace elements ve oxidative stress measures in mice: a response to dose. *Environ Sci Pollut Res*, 25, 5401–1. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0868-3>.
- Küçük, S., Midilli, S., Güler, M., Çoban, D. (2018). Kadmiyuma maruz bırakılmış Sarı Prens (Labidochromis caeruleus) balıklarında saptanan histolojik değişiklikler üzerine bir ön çalışma. *Ege Journal of Fisheries ve Aquatic Sciences*, 35(3), 261-266.
- Liu, J., Pang, J., Tu, C., Wang, H., Sha, M., Shao, H., Liu, X. (2019). The accumulation, histopathology, ve intestinal microorganism effects of waterborne cadmium on *Carassius auratus gibelio*. *Fish Physiology Ve Biochemistry*, 45,231-243. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0557-2>
- Liu, W., Liu, Y., Lu, H., Tian, C., Duan, L. (2018). Piperlongumine restores the balance of autophagy ve apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models. *Autophagy*, 14 (5), 845-61. [https://doi.org/10.1515/reveh-\(2019\)-0016](https://doi.org/10.1515/reveh-(2019)-0016)
- Mohammadi, P., Rahimifard, M., Baeri, M., Abdollahi, M., Mostafalou, S. (2019). Mechanistic assessment of cadmium toxicity in association with the functions of estrogen receptors in the Langerhans islets. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22 (4),445. doi:10.22038/IJBMS.(2019).33939.8076.
- Omer, A., Elobeid, A., Fouad, D., Daghestani, H., Al-Olayan, E. (2012). Cadmium bioaccumulation ve toxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal ve Veterinary Advance*, 11 (10), 1601-6.
- Pivonello, C., Negri, M., Patalano, R., Amatrudo, F., Montò, T., Liccardi, A., Colao, K. (2022). The role of melatonin in the molecular mechanisms underlying metaflammation ve infections in obesity: A narrative review. *Obesity Reviews*, 23 (3), e13390. <https://doi.org/10.1111/obr.13390>
- Rahbarghazi, R., Farhoudi, M., Rahmani-Youshanlouei, H., Hassanpour, M., Rahbarghazi, A., Rezaie, J., Ahmadi, M. (2022). Putative effect of melatonin on cardiomyocyte senescence in mice with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes ve Metabolic Disorders*, 21 (1), 353-9. [10.1007/s40200-022-00982-9](https://doi.org/10.1007/s40200-022-00982-9)
- Renugadevi, J., Milton, P.S. (2010). Cadmium induced hepatotoxicity in rats ve the protective effect of naringin. *Exp Toxicol Pathol*, 62, 171–1.
- Saedi, S., Jafarzadeh, T., Shirazi, R., Totonchi, M. (2020). Effect of prepubertal exposure to CdCl₂ on the liver, hematological, ve biochemical parameters in female rats: an experimental study. *Biological Trace Element Research*, 194,472–81. [https://doi.org/10.1007/s1\(2011\)-019-01800-194,472-481](https://doi.org/10.1007/s1(2011)-019-01800-194,472-481)
- Satarug, S., Vesey, A., Gobe, C. (2017). Health risk assessment of dietary cadmium intake: do current guidelines indicate how much is safe? *Environmental Health Perspectives* 125 (3), 284-8.
- Shen, Y., Jiang, Z., Zhong, X., Wang, H., Liu, Y., Li, X. (2022). Manipulation of cadmium ve diethylhexyl phthalate on *Rana chensinensis* tadpoles affects the intestinal microbiota ve fatty acid metabolism. *Science of The Total Environment*, 821,153455. [https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.\(2022\).153455](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.(2022).153455)
- Sigma-Aldrich, <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/sds/ALDRICH/202908> Erişim tarihi: 15.03. (2023)
- Şensoy, E. (2023). Investigation of the effect of Cadmium chloride applied during pregnancy on the morphological parameters of mouse offspring ve the protective role of melatonin. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 9,100222. [https://doi.org/10.1016/j.hazadv.\(2022\).100222](https://doi.org/10.1016/j.hazadv.(2022).100222)

- Şensoy, E., Öznurlu, Y. (2019). Determination of the changes on the small intestine of pregnant mice by histological, enzyme histochemical, ve immunohistochemical methods. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(10), 917. doi: 10.5152/tjg.(2019).18681
- Wilkinson, D., Shepherd, E., Wallace, M. (2016). Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1 (3), 1-8, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010527.pub2>
- Xia, B., Cao, H., Luo, J. (2015). The Co-induced effects of molybdenum ve cadmium on antioxidants ve heat shock proteins in duck kidneys. *Biol Trace Elem Res* 168, 261–268 [https://doi.org/10.1007/s1\(2011\)-015-0348-x](https://doi.org/10.1007/s1(2011)-015-0348-x)
- Xiong, W., Xu, F., Zhu, L., Cao, L., Yi, J., Shi, T., Wang, H. (2021). Environmental exposure to cadmium impairs fetal growth ve placental angiogenesis via GCN-2-mediated mitochondrial stress. *Journal of Hazardous Material*, 401 (5), 1-10, 123438. [https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.\(2020\).123438](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.(2020).123438)
- Yu, Y., Liew, Z., Wang, A., Arah, A., Li, J., Olsen, J., Li, J. (2019). Mediating roles of preterm birth ve restricted fetal growth in the relationship between maternal education ve infant mortality: A Danish population-based cohort study. *PLoS Medicine*, 16 (6), e1002831. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002831>
- Zargar, S., Siddiqi, J., Al Daihan, K., Wani, A. (2015). Protective effects of quercetin on cadmium fluoride induced oxidative stress at different intervals of time in mouse liver. *Acta Biochimica Polonica*, 62 (2), 1-10.
- Zhang, H., Liu, X., Zheng, Y., Zha, X., Elsabagh, M., Zhang, Y., Wang, H. (2022). Effects of the maternal gut microbiome ve gut-placental axis on melatonin efficacy in alleviating cadmium-induced fetal growth restriction. *Ecotoxicology ve Environmental Safety*, 237, 113550. [https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.\(2022\).113550](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.(2022).113550)
- Zhang, W., Yan, J., Wang, J. (2007). Comparative studies on the increase of uterine weight ve related mechanisms of cadmium ve p-nonylphenol. *Toxicology* 241, 84–91
- Zhou, X., Liu, B., Dai, M., Zhu, L., Xiong, W., Li, X., Wang, H. (2022). Environmental cadmium impairs blood-testis barrier via activating HRI-responsive mitochondrial stress in mice. *Science of The Total Environment* 810, 152247. [10.1016/j.scitotenv.\(2021\).152247](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.(2021).152247)
- Zhu, L., Dai, M., Xiong, W., Shi, T., Liu, B., Fu, T., Wang, H. (2022). Gestational exposure to environmental cadmium induces placental apoptosis ve fetal growth restriction via Parkin-modulated MCL-1 degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 424 (A), 1-15, 127268. [https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.\(2021\).127268](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.(2021).127268)
- Zhu, L., Xu, F., Shi, T., Feng, J., Xiong, W., Nan, Y., Zhang, C. (2019). Activation of autophagy inhibits cadmium-triggered apoptosis in human placental trophoblasts ve mouse placenta. *Environ Pollut*, 254 (A), Article, 1,10. [https://doi.org/10.1016/j.envpol.\(2019\).112991](https://doi.org/10.1016/j.envpol.(2019).112991)

Atf İçin: Çatav, Ş. S. ve Akbaş, K. (2023). Duman ve Duman Kökenli Bileşiklerin *Liquidambar orientalis* Mill. (Anadolu Sığla Ağacı)'in Tohum Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2393-2402.

To Cite: Çatav, Ş. S. & Akbaş, K. (2023). The Effects of Smoke and Smoke-Derived Compounds on Seed Germination of *Liquidambar orientalis* Mill. (Anatolian Sweetgum Tree). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2393-2402.

Duman ve Duman Kökenli Bileşiklerin *Liquidambar orientalis* Mill. (Anadolu Sığla Ağacı)'in Tohum Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri

Şükrü Serter ÇATAV^{1*}, Kenan AKBAŞ²

Öne Çıkanlar:

- Duman, KAR₁ ve mandelonitril *L. orientalis*'in çimlenmesini uyardı
- Işığın çimlenme üzerinde pozitif bir etkisi vardı
- GA₃ ve ROT, dumanla indüklenen çimlenmede rol alabilir

Anahtar Kelimeler:

- Duman suyu
- Karrikinolid
- Giberellik asit
- Reaktif oksijen türleri
- Siyanohidrin

ÖZET:

Duman ve duman kökenli bileşikler, bitkilerde tohum çimlenmesi, somatik embriyogenez ve çiçeklenme gibi fizyolojik ve gelişimsel süreçleri düzenleyebilmektedir. Dumanla ilişkili çimlenme yanıtları, karrikinler, gliseronitril, siringaldehit, katekol ve 3,4,5-trimetilfuran-2(5H)-on gibi uyarıcı ve inhibe edici bileşiklerin mevcudiyeti nedeniyle oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu çalışmada, duman suyu, karrikinolid (KAR₁), mandelonitril (MAN) ve katekol (KAT) uygulamalarının *Liquidambar orientalis* Mill.'in tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca KAR₁ ve siyanohidrin ile indüklenen tohum çimlenmesinde rol aldıkları düşünülen giberellik asit (GA₃) ve reaktif oksijen türleri de (ROT) deneylere dâhil edilmiştir. ROT uygulamaları için hidrojen peroksit ve metil violojen çözeltileri kullanılmıştır. Çimlenme deneyleri, 20 °C'ye ayarlanmış inkübatörlerde farklı ışık koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, *L. orientalis* tohumlarının dumana karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, 0.01 ve 0.1 µM KAR₁ ve 50 µM MAN solüsyonları hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında çalışma türünün çimlenmesini teşvik etmiştir ($p < 0.05$). Öte yandan, KAT uygulamaları çimlenme üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki yaratmamıştır. KAR₁ ve siyanohidrine hassas olan *L. orientalis* tohumları 10⁻⁵ ila 10⁻³ M konsantrasyon aralığında GA₃'e karşı pozitif bir çimlenme cevabı vermiştir. GA₃ uygulamaları yüksek çimlenme başarısı için ışığa olan gereksinimi de ortadan kaldırmıştır. ROT ile uyarılan çimlenme ise sadece ışık varlığında gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, dar yayılışlı bir tür olan *L. orientalis*'in çimlenme başarısını arttırmak için kullanılabilir.

The Effects of Smoke and Smoke-Derived Compounds on Seed Germination of *Liquidambar orientalis* Mill. (Anatolian Sweetgum Tree)

Highlights:

- Smoke, KAR₁, and mandelonitrile stimulated the germination of *L. orientalis*
- The light had a positive impact on germination
- GA₃ and ROS may be involved in smoke-induced germination

Keywords:

- Smoke-water
- Karrikinolide
- Gibberellic acid
- Reactive oxygen species
- Cyanohydrin

ABSTRACT:

Smoke and smoke-derived compounds can regulate physiological and developmental processes, such as seed germination, somatic embryogenesis, and flowering in plants. Smoke-related germination responses are highly complex due to the presence of stimulatory and inhibitory compounds, such as karrikins, glyceronitrile, syringaldehyde, catechol, and 3,4,5-trimethylfuran-2(5H)-one. In this study, the effects of smoke water, karrikinolide (KAR₁), mandelonitrile (MAN), and catechol (CAT) treatments on seed germination of *Liquidambar orientalis* Mill. were investigated. Moreover, gibberellic acid (GA₃) and reactive oxygen species (ROS), which are thought to play a role in KAR₁- and cyanohydrin-induced seed germination, were also included in the experiments. Hydrogen peroxide and methyl viologen solutions were used for ROS treatments. Germination experiments were carried out under different light conditions in incubators set at 20 °C. The results of the study showed that *L. orientalis* seeds were sensitive to smoke. In addition, 0.01 and 0.1 µM KAR₁ and 50 µM MAN solutions promoted the germination of the study species under both dark and light conditions ($p < 0.05$). On the other hand, CAT treatments did not have a positive or negative effect on germination. *L. orientalis* seeds sensitive to KAR₁ and cyanohydrin gave a positive germination response to GA₃ in the concentration range of 10⁻⁵ to 10⁻³ M. GA₃ treatments also eliminated the requirement of light for high germination success. ROS-induced germination was only observed in the presence of light. The findings of this study can be used to increase the germination success of *L. orientalis*, a narrowly distributed species.

¹Şükrü Serter ÇATAV (Orcid ID: 0000-0002-9934-254X), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla, Türkiye

²Kenan AKBAŞ (Orcid ID: 0000-0002-0198-4668), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Köyceğiz Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Muğla, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Şükrü Serter ÇATAV, e-mail: sertercatav@mu.edu.tr

GİRİŞ

Yangınlar sonucu açığa çıkan dumanın, tohum çimlenmesi, kök büyümesi ve fotomorfogenez de dâhil olmak üzere bitkilerde çeşitli fizyolojik ve gelişimsel süreçleri etkileyen birçok bileşiği içerdiği bilinmektedir (Wang ve ark., 2017; Waters ve Nelson, 2023). Selüloz kökenli karrikinler (KAR) ve gliseronitril (bir siyanohidrin), tohum çimlenmesinin uyarılmasında rol alan başlıca duman kimyasallarıdır (Çatav ve ark., 2018). Karrikinler ile siyanohidrinlerin etkileşiminin çimlenme üzerinde aditif ve sinerjistik etkiler oluşturabileceği de bildirilmiştir (Çatav ve Akbaş, 2021). Ayrıca dumanda bulunan benzaldehit, hidrokinon ve siringaldehit gibi lignin kökenli bileşiklerin bazı türlerde (örneğin, *Heteropogon contortus* (L.) P.Beauv. ex Roem. & Schult. ve *Nicotiana attenuata* Torr. ex S.Watson) çimlenmeyi teşvik ettikleri gösterilmiştir (Cao ve ark., 2023). Bunlara ek olarak, dumanın önemli bir bileşeni olan katekolün, reaktif oksijen türleri (ROT) aracılı redoks sinyalizasyonu ile birincil kök büyümesini ve kök tüyü uzamasını etkileyebileceği ortaya konulmuştur (Wang ve ark., 2017). Öte yandan, duman, yüksek konsantrasyonlarda çimlenmeyi engelleyen veya KAR₁'e (karrikinolid) karşı antagonistik etki gösteren birçok bileşiği de ihtiva etmektedir (Baldwin ve ark., 1994; Lee ve ark., 2021). Genel olarak değerlendirildiğinde, dumanla ilişkili bitki yanıtları, çoklu uyarıcı ve inhibe edici kimyasalların varlığı ve etkileşimi nedeniyle oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.'da gerçekleştirilen bir ileri genetik taramanın sonuçları karrikin sinyal yolunun keşfine yol açmıştır (Nelson ve ark., 2012). Karrikinlerin algılanmasında, α/β hidrolaz reseptör proteini KAI2/HTL (KARRIKIN INSENSITIVE2 / HYPOSENSITIVE TO LIGHT, buradan sonra KAI2 olarak adlandırılacaktır) önemli bir rol oynamaktadır. Bu protein, poliübikitinasyon ve proteazomal bozunma için SMAX1 (SUPPRESSOR OF MAX2 1) ve SMXL2 (SMAX1-LIKE2) baskılayıcı proteinlerini hedeflemek üzere E3 ubiquitin ligaz kompleksi SCF^{MAX2} (Skp1-Cullin-F-box^{MAX2}) ile birlikte çalışmaktadır. Baskılayıcı proteinlerin degradasyonunun, tohum çimlenmesi, fide fotomorfogenez ve abiotik stres toleransı gibi süreçleri etkileyebileceği gösterilmiştir (Yao ve Waters, 2020; Waters ve Nelson, 2023). Tüm streptofitlerde bulunan KAI2 geninin yaklaşık bir milyar yıl önce yatay gen transferi yoluyla proteobakterilerden edinildiği ileri sürülmüştür (Wang ve ark., 2022). Yangınlara dair en eski kanıtların 420 milyon yıl öncesine tarihlendiği ve karrikinlerin de yanan bitki materyaliyle ilişkili olduğu düşünüldüğünde, KAI2'nin tanımlanamayan bir molekül için reseptör olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle, karrikinlerin veya olası karrikin metabolitlerinin “KAI2 ligandı (KL)” olarak da adlandırılan bu molekülü taklit ettikleri düşünülmektedir (Scott ve Glasspool, 2006; Yao ve ark., 2021). Yangını takip eden bazı türlerin karrikinlere olan aşırı hassasiyeti ise KAI2'nin duplikasyonu sonrasında paralog genlerden birinin KL'ye göre artan KAR₁ duyarlılığıyla açıklanmaktadır (Martinez ve ark., 2022).

Tohumlarda, duman bileşiklerine maruziyetle ilgili fizyolojik değişiklikleri anlamaya yönelik artan bir ilgi vardır. *Avena fatua* L. ve *A. thaliana*'da, KAR₁ ile uyarılan çimlenme için giberellin biyosentezine gereksinim olduğu belirlenmiştir (Nelson ve ark., 2009; Rudus ve ark., 2019). Buna ek olarak, KAR₁'le muamele edilmiş tohumlarda çimlenme ve dormansi ile ilişkili endojen hormon (örneğin, absisik asit ve etilen) seviyelerinin değiştiği tespit edilmiştir (Sami ve ark., 2021). Ayrıca marul tohumlarında alfa-amilaz ve lipaz aktivitelerinin KAR₁'e yanıt olarak arttığı ortaya konulmuştur (Gupta ve ark., 2019). Gliseronitrilin tohumlarda neden olduğu değişimlere yönelikse doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan, bu bileşiğin hidrolizi sonrasında açığa çıkan siyanürün çimlenmeyi indüklediği bilinmektedir (Flematti ve ark., 2015). Siyanürün aracılık ettiği dormansi

kırılmasına da ROT ile etilen biyosentetik yolunun dâhil olduğu öne sürülmüştür (Oracz ve ark., 2009; Gniazdowska ve ark., 2010).

Liquidambar orientalis Mill. (Anadolu sıgla ağacı veya günlük ağacı) Altingiaceae familyasında yer alan dar yayılışlı bir türdür. Doğal *L. orientalis* popülasyonları ülkemizin güneybatı kısımlarında (özellikle Köyceğiz, Marmaris ve Fethiye ilçeleri) ve Rodos adasında bulunmaktadır (Arslan ve Şahin, 2016). Tarım, turizm ve kentleşme gibi antropojenik faaliyetler nedeniyle *L. orientalis* ormanları bugün yalnızca 1500 ila 2000 hektarlık bir alanı kapsamaktadır (Ürker ve ark., 2014). *L. orientalis*'den elde edilen reçine (balsam, storax ve styrax şeklinde de adlandırılmaktadır) fitoterapide yaygın olarak kullanılırken, artan habitat tahribatı reçine üretimini de önemli ölçüde azaltmıştır (Öztürk ve ark., 2008; Nalbantsoy ve ark., 2016). *L. orientalis* yaprak ve reçine ekstraktlarının antimikrobiyal, antimutajenik ve hepatoprotektif etkilere sahip olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Saraç ve Şen, 2014; Suzek ve ark., 2015; Keskin ve Güvensen, 2022).

Bu çalışmada, ekolojik ve ekonomik açıdan önemli bir bitki olan *L. orientalis*'in duman ve duman bileşiklerine olan çimlenme cevabı incelenmiştir. Buna ek olarak, KAR₁ ve siyanür ile indüklenen çimlenmede rol aldıkları düşünülen GA₃ ve ROT da deneylere dâhil edilmiştir. Çalışma kapsamında aşağıdaki araştırma soruları ele alınmıştır. (1) *L. orientalis* tohumları dumana karşı duyarlı mıdır? (2) KAR₁ ve diğer duman kimyasalları çimlenmeyi uyarabilir mi? (3) *L. orientalis* tohumları KAR₁ ve siyanüre karşı hassas ise GA₃ ve ROT'a olan çimlenme yanıtları nedir? (4) Işığın çimlenme üzerinde bir rolü var mıdır? (5) Tohumların oda koşullarında kısa süreli muhafazası dormansi kaybına neden olur mu? Bu araştırma soruları doğrultusunda, *L. orientalis*'de tohum çimlenmesinin en az bir duman bileşiği tarafından tetiklenebileceği ve GA₃ veya ROT'un çimlenmeye dâhil olabileceği varsayılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma Bölgesi, Bitki Materyali ve Tohumların Toplanması

Bu araştırmanın arazi çalışmaları, 2 Kasım 2017 tarihinde Köyceğiz ilçesi Toparlar mevkiindeki Sıgla ormanında gerçekleştirilmiştir. Çalışma bölgesinde Akdeniz iklimi görülmekte olup, yıllık ortalama sıcaklık ve toplam yağış miktarı sırasıyla 16,43 °C ve 861 mm'dir. *Liquidambar orientalis* Mill. meyveleri, aralarında en az 50 m mesafe bulunan 15 farklı bireyden toplanmış ve kâğıt zarflara yerleştirilmiştir. Meyveler laboratuvara getirildikten sonra oda koşullarında 3 hafta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, tohumlar ayıklanmış ve deneyler başlayana kadar kapalı cam şişelerde muhafaza edilmiştir. Bir tohumun ortalama ağırlığını belirlemek için 300 adet tohumun 4 farklı örneği tartılmış ve elde edilen veriler kullanılarak ortalama ve standart hata hesaplanmıştır (2.56 ± 0.08 mg, Pérez-Harguindeguy ve ark., 2013).

Çimlenme Protokolü

Dumanla uyarılan tohum çimlenmesi ile ilişkili mekanizmalara daha fazla ışık tutmak için bu çalışmada üç farklı deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, aksi belirtilmedikçe aşağıdaki çimlenme protokolü uygulanmıştır. Sıgla ağacı tohumları, %1 (a/h) NaClO ve birkaç damla Tween-20 içeren 200 mL solüsyonla 10 dk boyunca sterilize edilmiş ve distile su (dH₂O) ile durulanmıştır. Tohumlar daha sonra 2 adet Whatman No. 1 filtre kâğıdı ile 4 mL dH₂O (kontrol) veya uygulama çözeltisi içeren steril petri kaplarına (60 mm) aktarılmıştır. Petri kapları parafilm ile kaplanarak, 20.0 °C'ye ayarlanmış 2 farklı inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu inkübatörlerden biri daimî karanlık diğeri ise 16/8 fotoperiyot (75 µmol m⁻² s⁻¹) olacak şekilde programlanmıştır. Çimlenme kontrolleri haftada bir loş ışık altında yapılmış ve her bir kontrolde çimlenmiş tohumlar petri kaplarından çıkarılmıştır. 0.5 cm'den büyük

radikula çıkışı çimlenme kriteri olarak belirlenmiştir (ISTA, 1996). Deneyler başlangıç tarihlerinden 7 hafta sonra sonlandırılmıştır (Tavşanoğlu ve ark., 2017). Çimlenmeyen tohumların canlı olup olmadıklarını tespit etmek için kesme testi uygulanmıştır (Çatav ve Akbaş, 2021).

Çimlenme Deneyleri

Duman suyu, Çatav ve ark. (2018) tarafından belirtilen protokole göre buğday samanı yakılarak hazırlanmıştır. Çimlenme deneylerinde kullanılan kimyasallara ait genel bilgiler (kimyasalın kısaltması, seçilen konsantrasyonlar için referans makaleler vb.) ise Çizelge 1'de gösterilmiştir. Birinci deneyde, duman ve duman kökenli bileşiklerin çimlenme üzerindeki etkileri test edilmiştir. Bu kapsamda, DS (%2.5 ve %5), KAR₁ (0.01 ve 0.1 µM), MAN (10 ve 50 µM) ve KAT (10 ve 50 µM) solüsyonları kullanılmıştır. İkinci deneyde, *L. orientalis* tohumlarının GA₃ çözeltilerine (10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ ve 10⁻³ M) olan çimlenme yanıtları belirlenmiştir. Üçüncü deneyde, H₂O₂ (1 ve 5 mM) ve MV (0.1 ve 1 mM) çözeltilerin çimlenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. MV uygulamaları için tohumlar öncelikle 3 saat boyunca ilgili çözeltilerde bekletilmiş ve daha sonra dH₂O içeren petri kaplarına aktarılmıştır. Çimlenme deneylerinde gerçekleştirilen tüm uygulamalar için 20 tohumun 4 farklı örneği kullanılmıştır. Birinci deneye 11 Ocak 2018, ikinci ve üçüncü deneylere ise 9 Mart 2018 tarihinde başlanılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan kimyasalların genel özellikleri

Çözelti veya bileşik	Kısaltma	Özellik	Referans çalışma
Duman suyu	DS	Duman ile hazırlanan bir çözelti	Çatav ve ark. (2018)
Karrikinolid	KAR ₁	Dumanın yapısında bulunan bir bileşik	Çatav ve Akbaş (2021)
Mandelonitril	MAN	Bir siyanohidrin	Çatav ve Akbaş (2021)
Katekol	KAT	Dumanın yapısında bulunan bir bileşik	Wang ve ark. (2017)
Metil violojen	MV	ROT üreten bir bileşik	Cembrowska-Lech ve ark. (2015)
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Önemli bir ROT	Cembrowska-Lech ve ark. (2015)
Giberellik asit	GA ₃	Çimlenmede rol alan bir fitohormon	Rudus ve ark. (2019)

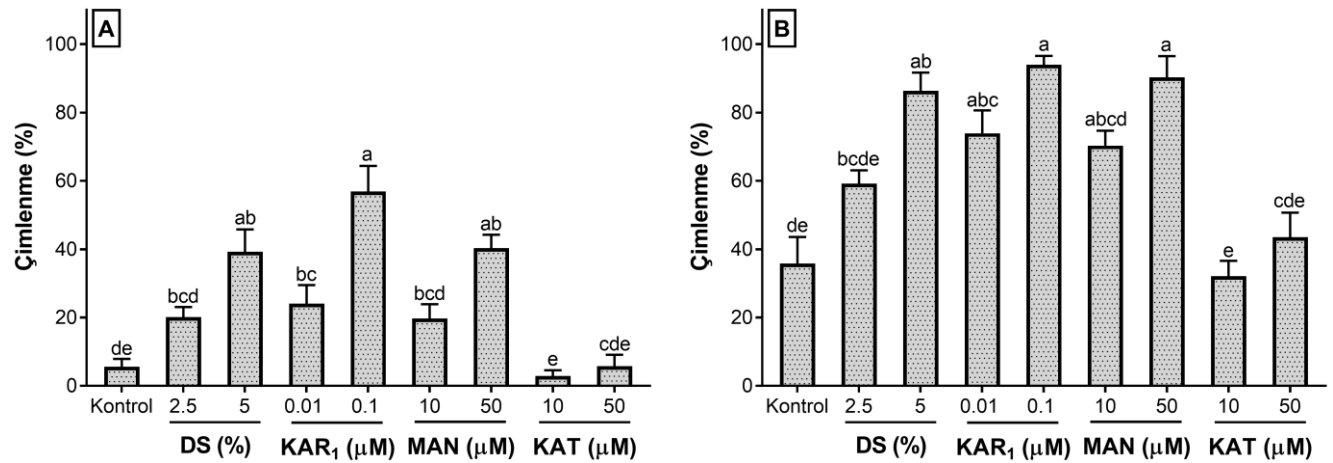
Data Analizi

İstatistiksel analizler öncesinde, çimlenme yüzdeleri 0 ile 1 arasındaki değerlere çevrilmiş ve arcsin-karekök dönüşümüne tabi tutulmuştur (Downes ve ark., 2013). Her bir çimlenme deneyi ve ışık koşulu için uygulamalar arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey'in HSD testi kullanılmıştır. Buna ek olarak, uygulama ve ışık etkileşiminin çimlenme üzerindeki etkisini belirlemek için iki yönlü varyans analizinden faydalanılmıştır. Tüm analizler için anlamlılık seviyesi 0.05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki kökenli dumanın, tohum çimlenmesi, köklenme, çiçeklenme ve somatik embriyogenez gibi süreçleri uyarabildiği bilinmektedir (Light ve ark., 2007; Keęczyński, 2020; Martinez ve ark., 2022). Dumanla indüklenen tohum çimlenmesinde karrikinler ve gliseronitril etkin bir rol oynamaktadır (Cao ve ark., 2023). Dumanın önemli bir bileşeni olan katekolün ise 0.5-500 µg/mL (4.54 ila 4540 µM) konsantrasyon aralığında çimlenmeyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Baldwin vd., 1994). Bunlara ek olarak, duman ve KAR₁'in bazı türlerde çimlenme için ışığa olan gereksinimi de kısmen karşılayabildikleri gösterilmiştir (Merritt ve ark., 2006; Abu ve ark., 2016). Bu çalışma kapsamında, duman ve dumanın yapısında bulunan bazı bileşiklerin *L. orientalis*'in çimlenmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. DS, KAR₁ ve MAN uygulamaları konsantrasyona bağlı olarak hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında çimlenmeyi teşvik etmiştir (Şekil 1). KAT uygulamaları ise çimlenme

üzerinde negatif veya pozitif bir etkiye yol açmamıştır. Elde edilen bu sonuç, Baldwin ve ark. (1994)'nin bulgularıyla uyuşmamaktadır. İlgili çalışmada, 4.54 μM ve üzeri katekol konsantrasyonlarının *Nicotiana attenuata*'da çimlenmeyi baskıladığı rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada ise 10 ve 50 μM katekolün *L. orientalis*'de tohum çimlenmesini etkilemediği ortaya konulmuştur. Bu çelişkiye, test edilen türlerin katekole karşı tolerans seviyelerindeki farklılıklar neden olabilir. Bu araştırmanın bir diğer önemli bulgusu da ışığın çimlenme üzerindeki uyarıcı etkisidir (Çizelge 2). *L. orientalis*'de karanlık koşullar altında uygulamalara ait ortalama çimlenme yüzdesi 23.8 iken, 16/8 (aydınlık/karanlık) fotoperiyot altında bu değer 65.1 olarak tespit edilmiştir.



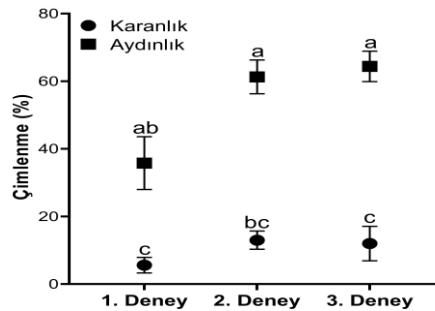
Şekil 1. Duman ve dumanın yapısında bulunan bazı bileşiklerin *L. orientalis*'de tohum çimlenmesi üzerine etkileri. A) Karanlık koşullar - B) 16/8 fotoperiyot. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir

Çizelge 2. İki yönlü varyans analizinin sonuçları. %, toplam varyasyon yüzdesini temsil etmektedir.

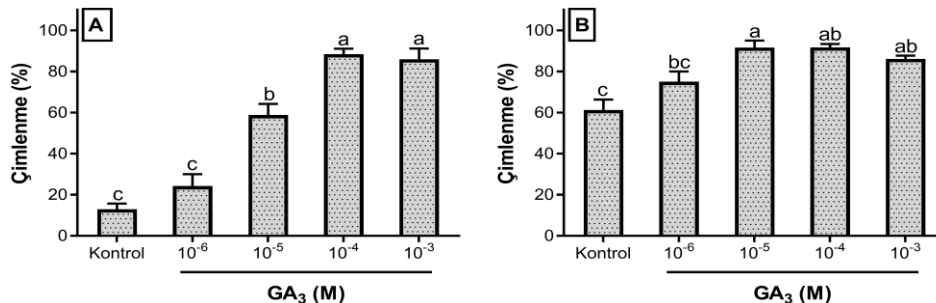
Deney	Uygulama		Işık		Uygulama x Işık		Kalıntı (Hata)
	%	p	%	p	%	p	
1. Duman ve bileşenleri	43.64	< 0.0001	44.73	< 0.0001	0.67	0.908	10.96
2. Giberellik asit	54.47	< 0.0001	22.47	< 0.0001	13.67	< 0.0001	9.39
3. ROT	3.09	0.095	81.78	< 0.0001	4.47	0.028	10.65

Tohumlarda olgunlaşma sonrası dönemde (after-ripening period), oda koşullarında muhafazanın dormansi kaybına yol açabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kępczyński ve ark., 2013; Tavşanoğlu ve ark., 2017; Nguyen ve ark., 2022). Örneğin, dormant *Avena fatua* tohumlarında 2, 4, 8 ve 12 haftalık kuru muhafaza sonrasında çimlenme testleri gerçekleştirmiştir. Dört haftalık kuru muhafazanın tohum dormansisini azalttığı belirlenmiştir. On iki haftalık kuru muhafaza sonrasında ise tohumların tamamı çimlenmiştir (Kępczyński ve ark., 2013). Atay (1985), *L. orientalis* tohumlarında hafif bir çimlenme engelinin olduğunu ve dormansi kaybına uğramış tohumlarda ortalama %70 çimlenme görüldüğünü rapor etmiştir. Mevcut çalışmada, oda koşullarında 70 ve 127 gün boyunca muhafaza edilen *L. orientalis* tohumların çimlenme yüzleri karşılaştırılmıştır. Karanlık koşullar altında %5.6 ila %13.0, aydınlık koşullar altındaysa %35.8 ila %64.4 çimlenme gözlemlenmiştir (Şekil 2). Her bir inkübasyon koşulu için 70 ve 127 günlük tohumlar arasında çimlenme yüzdesi açısından kayda değer bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Öte yandan, 127 gün boyunca muhafaza edilen tohumların ışığa olan hassasiyeti kısmen artmıştır. Sonuçlarımız, *L. orientalis* tohumlarında hafif-orta düzey bir dormansi olduğunu ve tohumların uzun süreli muhafazasının çimlenme engelini giderebileceğini göstermektedir.

Giberellinler (GA), tohum dormansisi ve çimlenmenin düzenlenmesinde yer alan önemli bir fitohormon grubudur. Su alımı sonrasında, tohumlarda GA biyosentezinden sorumlu genlerin (örneğin, *GA3ox1* ve *GA3ox2*) ekspresyonu artmakta ve embriyoda *de novo* GA sentezi gerçekleşmektedir (Yan ve Chen, 2020). Dumanla indüklenen çimlenmede, GA'nın bir rolünün olup olmadığı çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Bu kapsamda, eksojen GA_3 uygulamalarının KAR_1 'e duyarlı birçok türün çimlenmesini tetiklediği gösterilmiştir (Nelson ve ark., 2012; Cembrowska-Lech ve ark., 2015). Buna ek olarak, paclobutrazol ve ancymidol gibi GA biyosentez inhibitörlerinin KAR_1 ile uyarılan çimlenmeyi baskıladıkları belirlenmiştir (Kępczyński, 2018). KAR_1 'in ayrıca *A. thaliana* tohumlarındaki *GA3ox1* ve *GA3ox2* genlerinin ifadelerini arttırdığı bildirmiştir (Nelson ve ark., 2009). Öte yandan, duman ve KAR_1 'in endojen GA seviyeleri üzerindeki etkilerine yönelik farklı sonuçlar bulunmaktadır (Schwachtje ve Baldwin, 2004; Nelson ve ark., 2009; Sami ve ark., 2021). Bu çalışmada, KAR_1 'e duyarlılık gösteren *L. orientalis* tohumlarının GA_3 'e olan çimlenme yanıtı da test edilmiştir. 10^{-6} M hariç tüm GA_3 konsantrasyonları hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında çimlenmeyi teşvik etmiştir (Şekil 3). 10^{-5} M GA_3 ile muamele edilen *L. orientalis* tohumlarında aydınlık koşullarda %91.7 çimlenme elde edilmiştir. İki yönlü varyans analizinin sonuçları, "uygulama x ışık" etkileşiminin anlamlı olduğunu göstermiştir (Çizelge 2). Örneğin, 10^{-4} ve 10^{-3} M GA_3 uygulamaları ışığa olan gereksinimi neredeyse ortadan kaldırmıştır (Şekil 3A). Mevcut bulgular, önceki çalışmalarla uyumlu olup, KAR_1 'e duyarlılık ve GA_3 'e yanıt arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu vurgulamaktadır.



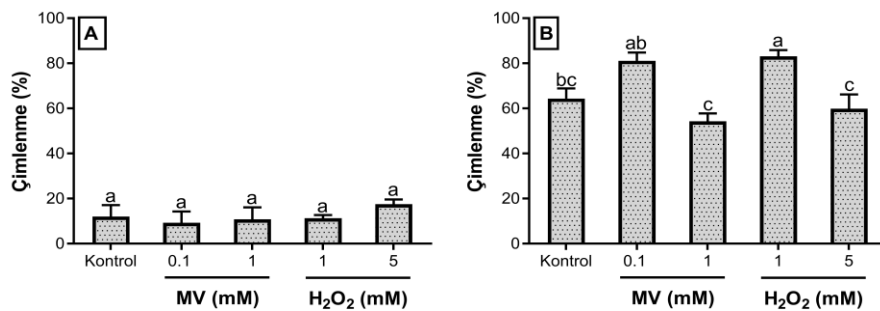
Şekil 2. 70 ve 127 gün boyunca kuru muhafaza edilen *L. orientalis* tohumlarının kontrol koşullarındaki çimlenme yüzdeleri. 1. deneyde 70 günlük, 2. ve 3. deneylerde ise 127 günlük tohumlar kullanılmıştır. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir.



Şekil 3. Farklı GA_3 uygulamalarının *L. orientalis*'de tohum çimlenmesi üzerine etkileri. A) Karanlık koşullar - B) 16/8 fotoperiyot. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir.

Hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROT'lar, "oksidatif pencere" olarak da tanımlanan statik ve toksik seviyeler arasındaki bir konsantrasyon aralığında, tohum dormansisinin ve çimlenmenin düzenlenmesinde görev alırlar (Bailly ve Merendino, 2021). Su alımı sonrasında, metabolik aktivitenin artması nedeniyle tohumların ROT içeriğinde belirgin bir yükselme

gözlenmektedir. NADPH oksidazlar, mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve peroksizomlar çimlenmekte olan tohumlarda ROT'un ana kaynaklarıdır (Gomes ve Garcia, 2013). ROT'un çimlenme sırasında nükleer gen ifadesi, protein oksidasyonu, ABA ve GA sinyalizasyonu, hücre duvarının gevşemesi, aleuron tabakasında programlanmış hücre ölümü ve mikropilar endospermin zayıflatılması gibi süreçler üzerinde doğrudan veya dolaylı bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Oracz ve Karpiński, 2016; Bailly, 2019). ROT'un siyanürün aracılık ettiği dormansi kırılmasında da yer aldığı gösterilmiştir (Puglia ve ark., 2022). Örneğin, siyanürün ROT oluşumu ve sinyalizasyonu ile ilişkili genleri (*NADPHox*, *POX*, *SerThrPK* vb.) regüle ettiği ve H_2O_2 ile süperoksit anyonu içeriklerini arttırdığı belirlenmiştir. Dahası, metil violojen ve H_2O_2 'nin siyanüre duyarlı ayçiçeği tohumlarında çimlenmeyi indüklediği ortaya konulmuştur (Oracz ve ark., 2009; Yu ve ark., 2022). Tüm bu bulgular doğrultusunda, siyanohidrine hassas olan *L. orientalis* tohumlarında da ROT ile uyarılan çimlenmenin görülebileceğini varsaydık. Sonuçlarımız, H_2O_2 ve MV uygulamalarının karanlık koşullar altında çimlenmeyi etkilemediklerini göstermiştir (Şekil 4A). Öte yandan, 1 mM H_2O_2 aydınlık koşullar altında çimlenme yüzdesini önemli ölçüde ($p < 0.05$) arttırmıştır (Şekil 4B). 0.1 mM MV ile muamele edilen tohumların çimlenme yüzdesinde de kontrole göre anlamlı olmayan bir artış kaydedilmiştir ($p = 0.084$). ROT uygulamalarının karanlık koşullar altında çimlenmeyi arttırmamasının sebebi test edilen H_2O_2 ve MV konsantrasyonlarıyla ilişkili olabilir. Limitli tohum sayısı nedeniyle bu çalışmada ROT uygulamaları için sadece 2 farklı H_2O_2 ve MV konsantrasyonu kullanılmıştır. Bununla birlikte, bazı araştırmalar, ROT'un çimlenmeyi ışığa bağımlı bir şekilde düzenleyebileceğini öne sürmektedir. Örneğin, H_2O_2 'nin farklı ışık dalga boylarına maruz kalan *A. thaliana* tohumlarında çimlenmeyi teşvik veya inhibe edebileceği gösterilmiştir (Lariguet ve ark., 2013). ROT'un siyanohidrinle uyarılan tohum çimlenmesindeki rolünü daha iyi kavramak için farklı ışık koşulları altında kapsamlı deneylerin yapılması gerekmektedir.



Şekil 4. H_2O_2 ve MV uygulamalarının *L. orientalis*'de tohum çimlenmesi üzerine etkileri. A) Karanlık koşullar - B) 16/8 fotoperiyot. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir

SONUÇ

Bu çalışmada, *L. orientalis*'in duman, duman bileşikleri (KAR₁, MAN ve KAT), GA₃ ve ROT'a olan çimlenme cevabı incelenmiştir. Sonuçlarımız, *L. orientalis* tohumlarının %5'lik duman suyuna karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, KAT dışındaki duman bileşikleri çalışma türünün çimlenmesini tetiklemiştir. KAR₁ ve siyanohidrine hassas olan *L. orientalis* tohumları hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında GA₃'e pozitif bir çimlenme yanıtı vermiştir. Öte yandan, ROT'la uyarılan çimlenme sadece aydınlık koşullarda gözlemlenmiştir. Işığın çimlenme üzerindeki etkisinin ise pozitif olduğu tespit edilmiştir. Son olarak, tohumların oda koşullarında kısa süreli muhafazasının ışığa olan duyarlılığı arttırdığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmadan elde edilen bulgulardan, ekonomik

ve ekolojik açıdan önemli bir bitki olan *L. orientalis*'in çimlenme başarısını arttırmak için yararlanılabilir.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, bu çalışmaya olan desteğinden ötürü Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür eder.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abu, Y., Romo, J. T., Bai, Y., & Coulman, B. (2016). Priming seeds in aqueous smoke solutions to improve seed germination and biomass production of perennial forage species. *Canadian Journal of Plant Science*, 96(4), 551-563.
- Arslan, M., & Şahin, H. (2016). Unutulan Bir Orman Ürünü Kaynağı: Anadolu Sığıla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller). *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 18(1), 103-117.
- Atay, İ. (1985). Sığıla Ağacı (*Liquidambar orientalis* L.) nin önemi ve silvikültürel özellikleri. *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, 35(1), 15-21.
- Bailly, C. (2019). The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal*, 476(20), 3019-3032.
- Bailly, C., & Merendino, L. (2021). Oxidative signalling in seed germination and early seedling growth: an emerging role for ROS trafficking and inter-organelle communication. *Biochemical Journal*, 478(10), 1977-1984.
- Baldwin, I. T., Staszak-Kozinski, L., & Davidson, R. (1994). Up in smoke: I. Smoke-derived germination cues for postfire annual, *Nicotiana attenuata* torr. Ex. Watson. *Journal of Chemical Ecology*, 20(9), 2345-2371.
- Cao, D., Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, D.-Z. (2023). Burning lignin: overlooked cues for post-fire seed germination. *Trends in Plant Science*, 28(4), 386-389.
- Çatav, Ş. S., & Akbaş, K. (2021). Yedi Akdeniz Lamiaceae Türünün Duman ve Duman Kökenli Bileşiklere Olan Çimlenme Tepkisi. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 7(4), 478-485.
- Çatav, Ş. S., Küçükakyüz, K., Tavşanoğlu, Ç., & Pausas, J. G. (2018). Effect of fire-derived chemicals on germination and seedling growth in Mediterranean plant species. *Basic and Applied Ecology*, 30, 65-75.
- Cembrowska-Lech, D., Koprowski, M., & Kępczyński, J. (2015). Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR₁ and GA₃ involving the control of reactive oxygen species (H₂O₂ and O₂⁻) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. *Journal of Plant Physiology*, 176, 169-179.
- Downes, K. S., Light, M. E., Pošta, M., Kohout, L., & van Staden, J. (2013). Comparison of germination responses of *Anigozanthos flavidus* (Haemodoraceae), *Gyrostemon racemiger* and *Gyrostemon ramulosus* (Gyrostemonaceae) to smoke-water and the smoke-derived compounds karrikinolide (KAR₁) and glyconitrile. *Annals of Botany*, 111(3), 489-497.
- Flematti, G. R., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2015). What are karrikins and how were they 'discovered' by plants? *BMC Biology*, 13(1), 108.
- Gniazdowska, A., Krasuska, U., & Bogatek, R. (2010). Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232, 1397-1407.
- Gomes, M., & Garcia, Q. (2013). Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia*, 68(3), 351-357.

- Gupta, S., Plačková, L., Kulkarni, M. G., Doležal, K., & Van Staden, J. (2019). Role of smoke stimulatory and inhibitory biomolecules in phytochrome-regulated seed germination of *Lactuca sativa*. *Plant Physiology*, 181(2), 458-470.
- ISTA (International Seed Testing Association). (1996). International rules for seed testing: The germination test. *Seed Science and Technology*, 24, 155-202.
- Keçyczyński, J. (2018). Induction of agricultural weed seed germination by smoke and smoke-derived karrikin (KAR₁), with a particular reference to *Avena fatua* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 87.
- Keçyczyński, J. (2020). Progress in utilizing plant-derived smoke water and smoke-derived KAR₁ in plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140, 271-278.
- Keçyczyński, J., Cembrowska-Lech, D., & Van Staden, J. (2013). Necessity of gibberellin for stimulatory effect of KAR₁ on germination of dormant *Avena fatua* L. caryopses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2), 379-387.
- Keskin, D., & Güvensen, N. C. (2022). Investigation of antimicrobial properties and chemical composition of different extracts of sweet gum leaves (*Liquidambar orientalis*). *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 6(1), 13-18.
- Lariguet, P., Ranocha, P., De Meyer, M., Barbier, O., Penel, C., & Dunand, C. (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta*, 238, 381-395.
- Lee, I., Kim, E., Choi, S., Kim, D., Hong, W., Choi, J., et al. (2021). A Raf-like kinase is required for smoke-induced seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(14), e2020636118.
- Light, M. E., Kulkarni, M. G., Ascough, G. D., & Van Staden, J. (2007). Improved flowering of a South African *Watsonia* with smoke treatments. *South African Journal of Botany*, 73(2), 298-298.
- Martinez, S. E., Conn, C. E., Guercio, A. M., Sepulveda, C., Fiscus, C. J., Koenig, D., et al. (2022). A *KARRIKIN INSENSITIVE2* paralog in lettuce mediates highly sensitive germination responses to karrikinolide. *Plant Physiology*, 190(2), 1440-1456.
- Merritt, D. J., Kristiansen, M., Flematti, G. R., Turner, S. R., Ghisalberti, E. L., Trengove, R. D., & Dixon, K. W. (2006). Effects of a butenolide present in smoke on light-mediated germination of Australian Asteraceae. *Seed Science Research*, 16(1), 29-35.
- Nalbantsoy, A., Kariş, M., Karakaya, L., & Akgül, Y. (2016). Antioxidant, cytotoxic and iNOS activity of *Liquidambar orientalis* Mill. resin extracts. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3), 198-205.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012). Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 107-130.
- Nelson, D. C., Riseborough, J.-A., Flematti, G. R., Stevens, J., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2009). Karrikins discovered in smoke trigger *Arabidopsis* seed germination by a mechanism requiring gibberellic acid synthesis and light. *Plant physiology*, 149(2), 863-873.
- Nguyen, T.-N., Tuan, P. A., & Ayele, B. T. (2022). Jasmonate regulates seed dormancy in wheat via modulating the balance between gibberellin and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 73(8), 2434-2453.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., & Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology*, 150(1), 494-505.
- Oracz, K., & Karpiński, S. (2016). Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 7, 864.
- Öztürk, M., Çelik, A., Güvensen, A., & Hamzaoğlu, E. (2008). Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. forests. *Forest Ecology and Management*, 256(4), 510-518.

- Perez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., & ve ark. (2016). Corrigendum to: New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 64(8), 715-716.
- Puglia, G. D., Balestrasse, K., Bustos, J. S., & Huarte, H. R. (2022). New insights into the role of alternating temperatures and cyanide in the ROS-mediated cardoon seed dormancy termination. *Horticulturae*, 8(10), 960.
- Ruduś, I., Cembrowska-Lech, D., Jaworska, A., & Kępczyński, J. (2019). Involvement of ethylene biosynthesis and perception during germination of dormant *Avena fatua* L. caryopses induced by KAR₁ or GA₃. *Planta*, 249, 719-738.
- Sami, A., Rehman, S., Tanvir, M. A., Zhou, X. Y., Zhu, Z. H., & Zhou, K. (2021). Assessment of the germination potential of *Brassica oleracea* seeds treated with karrikin 1 and cyanide, which modify the ethylene biosynthetic pathway. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1257-1269.
- Sarac, N., & Şen, B. (2014). Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products*, 53, 60-64.
- Schwachtje, J., & Baldwin, I. T. (2004). Smoke exposure alters endogenous gibberellin and abscisic acid pools and gibberellin sensitivity while eliciting germination in the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Science Research*, 14(1), 51-60.
- Scott, A. C., & Glasspool, I. J. (2006). The diversification of Paleozoic fire systems and fluctuations in atmospheric oxygen concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 10861-10865.
- Suzek, H., Celik, I., Dogan, A., & Yildirim, S. (2016). Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharmaceutical biology*, 54(3), 451-457.
- Tavşanoğlu, Ç., Ergan, G., Çatav, Ş. S., Zare, G., Küçükakyüz, K., & Özüdoğru, B. (2017). Multiple fire-related cues stimulate germination in *Chaenorhinum rubrifolium* (Plantaginaceae), a rare annual in the Mediterranean Basin. *Seed Science Research*, 27(1), 26-38.
- Ürker, O., Yılmaz, T., Öztürk, Ş., & Çobanoğlu, N. (2014). Anadolu Sığla Ormanları'nın Çevre Sosyolojisi Kapsamında İncelenmesi. *Sosyoloji Araştırmaları Dergisi*, 17(2), 152-187.
- Wang, M., Schoettner, M., Xu, S., Paetz, C., Wilde, J., Baldwin, I. T., & Groten, K. (2017). Catechol, a major component of smoke, influences primary root growth and root hair elongation through reactive oxygen species-mediated redox signaling. *New Phytologist*, 213(4), 1755-1770.
- Wang, Q., Smith, S. M., & Huang, J. (2022). Origins of strigolactone and karrikin signaling in plants. *Trends in Plant Science*, 27(5), 450-459.
- Waters, M. T., & Nelson, D. C. (2023). Karrikin perception and signalling. *New Phytologist*, 237(5), 1525-1541.
- Yan, A., & Chen, Z. (2020). The control of seed dormancy and germination by temperature, light and nitrate. *The Botanical Review*, 86, 39-75.
- Yao, J., Scaffidi, A., Meng, Y., Melville, K. T., Komatsu, A., Khosla, A., et al. (2021). Desmethyl butenolides are optimal ligands for karrikin receptor proteins. *New Phytologist*, 230(3), 1003-1016.
- Yao, J., & Waters, M. T. (2020). Perception of karrikins by plants: a continuing enigma. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1774-1781.
- Yu, L.-L., Liu, C.-J., Peng, Y., He, Z.-Q., & Xu, F. (2022). New insights into the role of cyanide in the promotion of seed germination in tomato. *BMC Plant Biology*, 22(1), 28.

Atf İçin: Ergöz Azizoğlu, B. ve Oğuz, A. R.. (2023). Van Balığı (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814))'nın Sindirim Kanalı Üzerinde Histomorfolojik Çalışma. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2403-2414.

To Cite: Ergöz Azizoğlu, B. & Oğuz, A. R. (2023). Histomorphological Study on Digestive Tract of Van Fish (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814)). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2403-2414.

Van Balığı (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814))'nın Sindirim Kanalı Üzerinde Histomorfolojik Çalışma

Burcu ERGÖZ AZİZOĞLU^{1*}, Ahmet Regaib OĞUZ¹

Öne Çıkanlar:

- Morfometrik
- Van balığı
- Sindirim kanalı

Anahtar Kelimeler:

- Histoloji
- Morfoloji
- Üreme Göçü
- Van Gölü

ÖZET:

Van balığı, Van Gölü havzasına endemik Cyprinidae familyasında yer alan anadrom bir balıktır. Balık beslenme ve büyümesini gerçekleştirdiği Van Gölü'nden nisan-temmuz aylarında göle dökülen akarsulara giriş yapar. Bu sucul ortamlarda balığın beslenme davranışlarında farklılık gözlenir. Bu çalışmada nisan ve temmuz ayları arasında Van Gölünden ve Karasu Çayı'ndan örneklenen 30 adet Van balığı sindirim kanalı morfometrik ve histolojik olarak incelendi. Van balığı sindirim kanalı incelendiğinde belirgin bir mide yapısının olmadığı gözlemlendi. Sindirim kanalı özofagus, mide görevini üstlenen mide benzeri yapı, anterior bağırsak, posterior bağırsak ve anüsten meydana geldiği belirlendi. Van balığının sindirim kanalının en dıştan içe doğru seröz, muskularis, submukoza ve lümeneye doğru kıvrımlardan oluşan mukoza tabakalarından oluştuğu gözlemlendi. Bu tabaka kalınlıklarının göl ve akarsudan örneklenen balıklar arasında değiştiği belirlendi. Morfometrik olarak çap, mukoza genişliği, mukoza uzunluğu, mukoza kıvrımları, muskularis kalınlığı, submukoza kalınlığı ve uzunluğu ölçüldü. Bu değerlerin, gölden örneklenen balıklarda akarsulardan örneklenen balıklara göre daha büyük olduğu belirlendi. Van balığı sindirim kanalında ölçümler ilk defa bu çalışma ile belirlendi. Bu ölçülen değerlerin balığın beslenme, stres ve suyun fizikokimyasal yapısı ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Histomorphological Study on Digestive Tract of Van Fish (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814))

Highlights:

- Morphometric
- Van Fish
- Digestive tract

Keywords:

- Histology
- Morphology
- Reproductive Migration
- Lake Van

ABSTRACT:

Van fish is an anadromic fish in the family Cyprinidae, endemic to the Lake Van basin. Fish feeding and care enters the streams flowing into the lake from Lake Van in April-July. In these aquatic environments, differences are observed in the feeding behavior of the fish. In this study, the digestive tract of 30 Van fish sampled from Lake Van and Karasu Stream between April and July were examined morphometrically and histologically. When the digestive tract of the Van fish was examined, it was observed that there was no obvious stomach structure. It was determined that the digestive tract consists of the esophagus, stomach-like structure that serves as the stomach, anterior intestine, posterior intestine and anus. When the digestive tract of Van fish is examined, it consists of the outermost serous layer, the muscularis layer, the submucosa layer and the innermost mucosa layer consisting of folds towards the lumen. It was determined that these layer thicknesses varied between fish sampled from lakes and streams. Diameter, mucosal width, mucosal length, mucosal folds, muscularis thickness, submucosa thickness and length were measured morphometrically. It was determined that these values were higher in the fish sampled from the lake compared to the fish sampled from the rivers. Measurements in the digestive tract of van fish were determined for the first time in this study. These measured values are thought to be related to the nutrition, stress and physicochemical structure of the water.

¹Burcu ERGÖZ AZİZOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-7002-3801](https://orcid.org/0000-0002-7002-3801)), Ahmet Regaib OĞUZ ([Orcid ID: 0000-0001-6431-0508](https://orcid.org/0000-0001-6431-0508)), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Burcu ERGÖZ AZİZOĞLU, e-mail: burcu_ergoz@hotmail.com

Bu çalışma Burcu ERGÖZ AZİZOĞLU'nun Doktora tezinden üretilmiştir.

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Bu makalede yer alan hayvan deneyi için "Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2019/12) sayılı kararı ile Etik Kurul Onayı alınmıştır.

GİRİŞ

Van Gölü, kapalı havza ve volkanik bir set gölüdür. Göl, Nemrut Yanardağı'nın devam eden püskürmeleriyle, lavların Bitlis Vadisini doldurması sonucu meydana gelmiştir. Nemrut Dağı'ndan akan lavlar, Buzul Çağın ortalarında yaklaşık 200 bin yıl önce bir akım oluşturmuştur. Oluşan akım sonucunda Van Çukuru ve Muş Çukuru arasındaki su akımı engellenmiştir (Sumita ve Schmincke, 2013). Bu su birikimi sonucu volkanik bir set gölü oluşmuştur. Van Gölü, oluşumunun farklılığından dolayı denizler gibi su seviyesi alçalıp yükselebilen yapıya sahiptir. Bu yapısı nedeniyle iklim değişikliklerinden etkilenmektedir (Sumita ve Schmincke, 2013; Şen ve ark., 2015).

Van Gölü, Türkiye'nin en büyük gölü olup, Dünya'nın sayılı sodalı gölleri arasındadır. Gölün yüz ölçümü 3713 km², derinliği maksimum 451 m, rakımı ise 1648 m'dir. Van Gölü yüksek pH (9.8), acı su (% 22) ve yüksek alkalinite (153 mEq/L) özelliğine sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı gölde yaşam oldukça sınırlı olup zooplankton, fitoplankton ve iki omurgalı türü (*Alburnus tarichi*, *Oxynoemacheilus ercisianus*) yaşamaktadır (Danulat ve Selçuk, 1996, Akkuş ve ark., 2021).

Van Gölü'ne dökülen birçok küçük akarsu vardır. Bunlardan Bendimahi Çayı, Zilan Suyu, Hoşap Suyu, Arpak Çayı, Menedik Çayı ve Karasu Çayı göle dökülen önemli akarsulardır. Bu akarsularla birlikte göl, Nisan ve Mayıs aylarında yağmur suları ve yoğun kar ile de beslenmektedir (Çetinkaya ve ark., 1994). Bu akarsular bazik özelliğe sahip olup, ortalama pH 8,23'tür. Çevresel koşullardan dolayı bölgesel olarak pH değerlerinde değişiklikler gerçekleşmektedir. Van Gölü'ne göre bu akarsuların tuzluluk oranları da farklılık göstermektedir. Karasu Çayı'nın tuzluluk oranı % 8 olarak hesaplanmıştır (Ebrahim, 2015).

Endemik bir sazan türü olan Van balığı (*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814), Van Gölü'nde ve göle dökülen tatlı su kaynaklarında yaşar. Balığın ortalama boy uzunluğu 19,5 cm, ortalama ağırlığı ise 80 gramdır. Van balığı bitkisel ve hayvansal planktonlarla beslenen omnivor bir canlıdır. Hayatta kalma süreleri en fazla 7 yıldır. Balık üreme yeteneğine üçüncü yaşında başlamaktadır. Balık anadrom bir canlı olup, ömrünün çoğunu gölde geçirirken, su sıcaklığının 13 °C'ye ulaştığı nisan ayından itibaren yumurtalarını bırakmak üzere akarsuya geçmektedir. Van balığı yumurtalarını akarsuların sığ ve kayalık diplerine bırakarak göle dönüş yapmaktadır (Elp ve Şen, 2009).

Besin değeri yüksek olan bu balık yöre halkının önemli bir protein kaynağıdır. Yaklaşık olarak yılda 10000 ton kadar avlanan bu balık, iç su balık üretiminin üçte birini oluşturur. Balık göl etrafındaki insanların hem besin kaynağı olarak hem de ekonomik olarak oldukça önemlidir (Bilgili ve ark., 1995).

Van balığı diğer türlerden farklı olarak Van Gölü'nün ekstrem şartlarına adapte olan tek omurgalı türüdür. Balık bu adaptasyon sürecinde solungaç, böbrek, deri ve sindirim kanalında hücresel ve moleküler bazı değişimler sonucunda hayatta kalır. Balığın göl ve tatlı suya adaptasyonlarında solungaç, deri ve böbrekler üzerine detaylı çalışmalar bulunurken (Oğuz, 2013; Oğuz, 2015; İribüğday ve Oğuz, 2020), sindirim kanalı üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (Ünal ve ark., 2001; Ergöz ve Oğuz, 2018).

Balıklardaki gastrointestinal kanal, vücut içerisinde kuyruğa kadar uzanan tüp şeklinde bir yapıdan oluşur. Balıkların yaşam tarzları ve beslenme şekillerinin (herbivor, karnivor ve omnivor gibi) sindirim sisteminin anatomisi, morfolojisi ve fizyolojisinde farklılıklara neden olduğu bilinmektedir (dos Santos ve ark., 2011). Bu farklılıklar midenin büyüklüğü ve bağırsak uzunluğu üzerine ekilidir. Sindirim kanalı uzunluğunun herbivor balık türlerinde karnivor ve omnivor balık türlerine göre daha uzun olduğu ifade edilmiştir (Buddington ve ark., 1987; Kramer ve Bryant, 1995). Balıklarda beslenme şekilleri aynı zamanda karbonhidrat ve protein taşınımı, bağırsağın mukoza tabakası

kalınlığında etkili olmaktadır (Buddington ve ark., 1987). Bu nedenle, sindirim kanalında bulunan enzim ve hücre gruplarının yoğunluğunda ve dağılımında da sindirim kanalı boyunca farklılıkların olduğu bilinmektedir (Jönsson ve Holmgren, 2011).

Omurgalı canlıların tamamında olduğu gibi balıklarda da gastrointestinal kanal özofagustan başlayıp anüse kadar uzanmaktadır. Sindirim kanalı özofagus, mide, bağırsak ve anüs kısımlarından oluşmaktadır. Bazı araştırmacılar bağırsak kısmını aynı zamanda anterior ve posterior olmak üzere iki kısımda incelemektedir (Ostaszewska ve ark., 2008). Sindirim kanalı histolojik olarak incelendiğinde ise mukoza, submukoza, muskularis ve seröz tabakalarından meydana geldiği görülmektedir (Park ve ark., 2001; Timur, 2008; Formicki ve Kirschbaum, 2019). Bu kısımlar ise; mukoza tabakası, sindirim borusunun lümenini kaplar ve iç epitel hücrelerinden oluşur. Mukozal epitel, bazal lamina üzerine oturur ve lamina propria içerir. Submukoza tabakası, lenfosit doku, kan damarları ve daha az hücresel bağ dokusu içermektedir. Bu tabaka, stratum granulozum, stratum kompaktum kısımlarına ayrılmaktadır. Muskularis tabakası, kas tabakasından oluşmaktadır, iç dairesel ve dış uzunlamasına kas hücreleri mevcuttur. Seröz, basit skuamöz periton epiteli ile çevrili olup, seröz membrane ve tella subseröz kısımlarından oluşur (Takashima ve Hibiya, 1995; Genten ve ark., 2009).

Özofagus, sindirim kanalının en kısa ve dar kısmını oluşturmaktadır (Faccioli ve ark., 2014). Balıkların özofagusu “U” ve “J” şeklinde olup, türden türe farklılık göstererek mideye açılmaktadır (Timur, 2008). *Hypsobias antenori* balığında özofagus, küçük çapa sahip, kalın duvarları olan ve kısa silindirik yapıdadır. Özofagus histolojik olarak incelendiğinde, muskularis ile örtülü yalancı epitel ve lamina propria'dan oluşur ve epitel hücreleri diğer kısımlar ile kıyaslandığında daha az alanı kaplar (Nascimento ve ark., 2015).

Sindirim kanalında, özofagustan sonra mide yapısı bulunmaktadır. Mide, balıkların beslenme şekline göre türden türe farklılık göstermektedir. Mide omnivor balıklarda keseye benzer yapıda iken, karnivor balıklarda ise uzun tüp şeklindedir (Hossain ve Dutta, 2017). Tilapiaların midesi küçük ve kese benzeri bir yapıda olup, işlevsel olarak mideye benzememektedir (Morrison ve Wright, 1999). Sazan balıklarında gerçek bir mide bulunmaz. Bu balıklarda özofagustan sonra yapısal olarak genişlemiş olan ve asit salgılayabilen kısım midenin görevi üstlenir. Bazı karnivor balıklarda (Zurna balıkları (Scomberesocidae) gibi) gerçek bir midenin olmadığı görülmektedir (Timur, 2006). Bazı balıklarda ise mide pilorik fundus, korpus kısım olmak üzere üç ayrı bölgeden oluşur (Hernandez ve ark., 2009). Özofagustan mideye geçişte ilk bölge olan korpus bölgesi, doğrudan yemek borusu ile bağlantılı ve gıda sindiriminde sorumlu ilk aşamadır (Canan ve ark., 2012). Korpus bölgesinin devamında ise fundus bölgesi bulunur. Gıdaların yutulması sırasında alınan hava, midenin bu bölgesinde toplanır (Grosell ve ark., 2010). Midenin en son bölgesi olan pilorik bölge ise basit ve silindirik epitel tabakasından oluşur. Mukus hücreleri bu bölgede bol miktarda bulunmaktadır (Canan ve ark., 2012).

Midenin bitiminde bulunan bağırsak, sindirim kanalının en uzun alanını oluşturmaktadır (Timur, 2008). Balıklarda bağırsak, midenin bitiminden başlayıp anüse kadar uzanır (Hernandez ve ark., 2009). Beslenme alışkanlığına göre balıklardaki bağırsak yapısı da türden türe değişiklik göstermektedir. Herbivor balıklarda genel olarak orta uzunlukta, karnivor türlerde ise ince ve dar yapıdadır (Fugi ve ark., 2001). Balıklarda bağırsak, anterior ve posterior olarak iki kısma ayrılır. Anterior bağırsak, tek katlı silindirik epitel ile örtülüdür (Chatchavalvanich ve ark., 2006). Posterior bağırsakta ise, kıvrımlar küçük ama kas tabakası kalındır (Canan ve ark., 2012).

Sindirim kanalında gerçekleşen metabolik olaylar türlere ve gelişim aşamalarına göre değişmektedir (Buddington ve Krogdahl, 2004). Aç kalma veya beslenme sırasında omurgalıların sindirim kanalında gerçekleşen fonksiyonel faaliyetler enterik sinirlerle ya da nöroendokrin sistem

tarafından gerçekleştirilmektedir (Palmer ve Meerveld, 2001). Çim sazani (*Ctenopharyngodon idella*) ve Yayın balığın (*Silurus glanis*) (etçil balık) özofagusları incelendiğinde, çim balığı özofagusunda mukozanın daha kıvrımlı olduğu belirtilmiştir (Abd El Hafez ve ark., 2013). Gökkuşluğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yapılan çalışmada balığa yüksek enerjili diyetler uygulanarak sindirim kanalı histolojisi incelenmiş ve sindirim kanalının histolojisinde, diyete bağlı bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir (Escaffre ve ark., 2007).

Sindirim sistemi anüs açıklığı ile son bulmaktadır. Anüs sindirim artıklarının dışarı atılması ile beraber bazı balık türlerinde eşey belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Örneğin sazan balığında anüs konveks veya kabarık durumda ise dişi, konkav yani çukur ise erkek bireydir (Grosell ve ark., 2010).

Van balığının sindirim kanalı üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (Ünal ve ark., 2001; Ergöz ve Oğuz, 2018). Bu çalışmada Van balığının üreme göçü sırasında sindirim kanalındaki değişimler morfometrik ve histolojik olarak incelendi.

MATERYAL VE METOT

Balık

Van balığı üreme göçü olan 15 nisan-15 temmuz dönemi tarihleri arasında Van Gölü ve Karasu Çayı'ndan 15'er adet balık örneği alındı. Balıklar uzatmalı fanyalı ağlar ve serpm ağlar ile yakalandı. Örnekleme Karasu Çayı'nda 40-50 cm, Van Gölü'nde 0-80 metre derinlikleri arasında gerçekleştirildi. Örnekleme yapılan bölgelerden alınan su örneklerinden sıcaklık, pH, tuzluluk, iletkenlik, çözülmüş oksijen ve doymuş oksijen değerleri Multimetre cihazı (HACH HQ 40d) kullanılarak ölçüldü (Çizelge 1). Yakalanan balık örnekleri aynı gün içerisinde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarına getirildi ve balık örneklerine anestezi (Fenoksi etanol 320µl/L) uygulandı. Balıkların total ağırlık (g) ve çatal boyları (cm) ölçüldü. Daha sonra diseksiyon ile balıkların sindirim kanalı (özofagus, mide benzeri yapı, anterior bağırsak, posterior bağırsak) çıkartılarak farklı kısımların uzunlukları (cm) cetvel yardımıyla ölçüldü.

Çizelge 1. Van Gölü ve Karasu Çayı'na Ait Bazı Fizikokimyasal Parametreler

	Göl	Akarsu
Sıcaklık (°C)	12.1	19.9
Tuzluluk (‰)	16.97	0.29
İletkenlik (µS/cm)	24.2	49.83
pH	9.66	8.96
ÇO (mg/L)	9.1	9.68

Balıklara uygulanan işlemler, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2019/12) tarafından onaylanan hayvan çalışma protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Histoloji

Balıklar, Fenoksi Etanol (320 µg/L) ile anestezi edildikten sonra disekte edildi ve diseksiyonundan sonra çıkartılıp ölçümü yapılan sindirim kanalının kısımları histolojik ve morfolojik çalışmalar için Bouin fiksatifine kondu. Sindirim kanalı kısımlarından alınan doku parçaları 4°C'de buzdolabında 24 saat bekletildi. Dokular 24 saat bekletildikten sonra %70'lik etil alkol içerisinde alındı. Uygulanan rutin histolojik işlemlerden sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (HM 325, Micron, Walldorf, Almanya) yardımıyla 5 µm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler, Hematoksilen-Eosin ve Masson Trichrom boyaları ile boyandı (Bancroft ve Gamble, 2002). Boyanan kesitler lamel ile kapatılarak, ışık mikroskobu (Leica DMI 6000B, Almanya) ile incelendi ve dijital kamera (DFC 490, Leica Microsystems, Germany) ile görüntüleri alındı.

İstatistik

Veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edildi. Ham veriler SPSS (V 11.5, SPSS Company, Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak analiz edildi. Göl ve akarsudan örneklenen gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için t-testi ile kullanıldı. Araştırmada önem seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

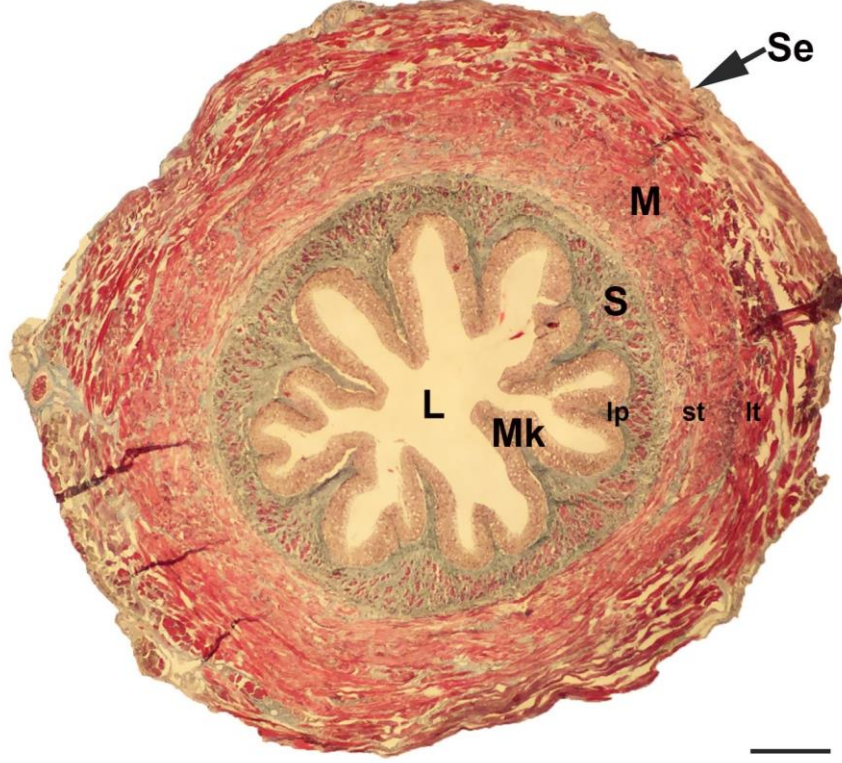
BULGULAR VE TARTIŞMA

Van Gölü'nden örneklenen Van balığına ait bireylerin total ağırlıkları 95-135 g ve çatal boyları 19-21 cm iken, Karasu Çayı'ndan örneklenen balıkların ağırlıkları 90-148 g ve boyları 18-21 cm olarak belirlendi. Göl ve Karasu Çayı'ndan alınan 7'şer adet balığın sindirim kanal uzunlukları sırasıyla $20 \pm 0,15$ cm ve $13,9 \pm 1,08$ cm ölçüldü. Göl ortamında bulunan balıkların sindirim kanalı, akarsu ortamındaki balıklara göre daha uzun olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Çizelge 2). Daha önce yapılan çalışmalarda, balığın üreme göç mevsiminde gölün; ortalama sıcaklığı 19°C , pH 9.6, tuzluluk % 22, çözülmüş oksijen 7.9 mg/L, iletkenlik 26,432 $\mu\text{S/cm}$ olarak tespit edilmiştir (Çiftçi ve ark., 2008). Karasu Çayı'nın ise ortalama sıcaklığı $14,3^{\circ}\text{C}$, pH 8.54, tuzluluk % 0.2, çözülmüş oksijen 10.45 mg/L ve iletkenlik 0.478 $\mu\text{S/cm}$ olarak belirlendiği ifade edildi (Alkan ve Oğuz 2021). Bu çalışmada, Van Gölü ve Karasu Çayı'ndan alınan su örneklerindeki fizikokimyasal parametreler daha önceki çalışmalara benzerlik göstermektedir. İki ortam arasında sıcaklık, pH, tuzluluk, iletkenlik ve çözülmüş oksijen değerleri karşılaştırıldığında farklılıkların olduğu belirlendi. Bu farklılıkların mevsimsel değişimlerden ve örnekleme yapılan alanlardaki iyon değişimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada, disekte edilerek çıkartılan sindirim kanalı morfolojik yapısına göre sırasıyla özofagus, mide, anterior bağırsak, posterior bağırsaktan ve anüsten oluştuğu gözlemlendi. Diğer balıklarda da sindirim kanalının aynı kısımlardan oluştuğu bildirilmiştir (Timur, 2008; Ebrahimi, 2015). Fakat Van balığının sindirim kanalında belirgin bir mide yapısı gözlenmedi. Balıklardaki sindirim kanalı her ne kadar diğer omurgalılarda olduğu gibi temel bir yapıya sahip olsa da filogenik, ontogenik, beslenme ve çevresel şartlardan etkilenecek şekilde değişim gösterebilir (Wilson ve Castro, 2010). Van balığı da midesiz balıkların bulunduğu sazangiller familyasının morfolojik olarak tüm özelliklerini içermektedir.

Van balığının sindirim kanalının histolojik yapısı diğer omurgalı canlılarda olduğu gibi dört farklı tabakadan meydana gelmektedir. En dışta ince zar şeklinde seröz tabakası, onun hemen altında ise kas dokusundan oluşan muskularis mukoza tabakası mevcuttur. Bu tabakanın bazı kısımlarda iç ve dış muskularis olarak ikiye ayrıldığı belirlendi. İç muskularis, dairesel yapıda düz kastan oluşurken, dış muskularis ise boyuna düz kastan oluşmaktadır. Muskularis tabakasının hemen altında ise gevşek bağ dokusundan oluşan submukoza tabakası yer alır. En iç kısımda lümeni çevreleyen, tek katlı basit silindirik epitel hücrelerden oluşan, goblet hücrelerini ve yer yer endokrin hücrelerini barındıran mukoza tabakası belirlendi (Şekil 1). Sindirim kanalı çalışılan diğer balıklarla benzerlik göstermektedir (Takashima, 1995; Cao ve Wang, 2009). Bu kısımlar Van balığı sindirim kanalında olduğu gibi en dışta kanalı saran seröz tabakası, onun hemen altında kas dokusundan oluşan muskularis tabakası, bol miktarda kan damarı içeren ve hücresel bağ dokudan oluşan submukoza tabakası ve iç kısımda lümeni çevreleyen, goblet hücrelerinin yoğun olarak bulunduğu ve kıvrımlardan oluşan mukoza tabakasından meydana gelmektedir (Genten ve ark., 2009; Ofelio ve ark., 2019). Ancak göl ve akarsudan örneklenen Van balıklarında bu kısımların morfolojik ölçümlerinin değişim gösterdiği belirlendi. Balıklarda bu histolojik farklılıkların besin, yaş, vücut şekli, ağırlık ve beslenme habitatlarından kaynaklı olduğu ifade edilmiştir (Murray ve ark., 1994; Morrison ve Wright, 1999; Mokhtar, 2017). Van Gölünün ekstrem şartları nedeni ile balık belirli omurgasız canlılarla beslenmektedir. Tatlı suya geçtiğinde ise

akıntıya karşı sürüler halinde yüzme, mikrobiyal ve parazitik maruziyet, predator baskısı gibi stress faktörleri yüzünden besin alımını azaltmakta veya tamamen kesmektedir. Van balığı sindirim kanalında gözlenen histolojik farklılıkların da Van Gölü'nün ekstrem şartlarından ve beslenme tarzından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 1. Van Balığı Sindirim Kanalının Enine Kesitinde Histolojik Kısımlar (Se: Seröz tabakası, M: Muskularis tabakası, S: Submukoza tabakası, Mk: Mukoza tabakası, L: Lümen, st: Sirküler kas tabakası, lt: Longitudinal kas tabakası, lp: Lamina propria) (Masson Goldner Trikrom boyası, Bar 200 µm)

Sindirim kanalının ağızdan sonra gelen bölümü olan özofagus, kanalın en kısa kısmını oluşturmaktadır. Bu kısım besinlerin ağızdan mide benzeri yapıya iletiminin sağlandığı yerdir. Özofagusu histolojik olarak incelendiğinde seröz, geniş bir muskularis, submukoza ve mukoz tabakaları görülmüştür. Özofagusa ait muskularis tabakası çizgili kas hücrelerinden oluştuğu belirlendi (Şekil 2A). Gölden ve akarsulardan alınan örneklerde, özofagusta ayırt edilen bu dört tabakanın da mevcut olduğu ancak bu tabakaların kalınlık ve hacimlerinde farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 2A-B).

Balıklarda mukoz tabakasında bulunan kıvrımların direkt olarak besinlerin sindirimi ile ilişkili olduğu görüldü. Mukoz kıvrım hacimlerinin ve kıvrım sayısındaki artışın daha verimli sindirime yol açtığı bildirilmiştir (Humbert ve ark., 1984; Vieira-Lopes ve ark., 2013). Yaptığımız çalışmada da Van balığının maruz kaldığı açlık ve beslenme durumlarına bağlı olarak sindirim kanalı mukoz tabakasında meydana gelen mukoz genişliği, mukoz uzunluğu ve mukoz kıvrım sayılarında farklılıklar belirlendi. Göl ve akarsu örneklerinde ölçülen ortalama özofagus çapları Çizelge 2.'de gösterilmiştir. Buna göre ortalama özofagus çapları gölden alınan örneklerde akarsudan alınan örneklere göre uzun olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Özofagus mukoz genişliğinin gölden alınan örneklerde akarsu örneklerinden daha fazla olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Göl ve akarsu ortamından alınan örneklerde özofagusa ait ortalama mukoz uzunluklarını değerlendirildiğinde, özofagus çapı ve mukoz genişliğinde olduğu gibi göl ortamından alınan örneklerde daha fazla olduğu görüldü. Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örneklerin özofagusuna ait ortalama muskularis kalınlıkları ölçülmüştür. Özofagus çapı, mukoz genişliği ve mukoz uzunluklarından farklı olarak,

özofagusa ait ortalama muskularis kalınlığının akarsu ortamında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Her iki ortamdaki balıkların özofagusuna ait submukoza kalınlıkları incelendiğinde özofagusa ait muskularis kalınlığında olduğu gibi akarsu ortamındaki balıklarda daha kalın olduğu görüldü. Göl ve akarsu ortamlarından alınan Van balığına ait özofagus kısımlarının uzunlukları ölçüldü (Çizelge 2). Göl ortamında bulunan balıkların özofagus uzunluklarının akarsu ortamında bulunan balıkların ortalama özofagus uzunluklarından daha fazla olduğu belirlendi.

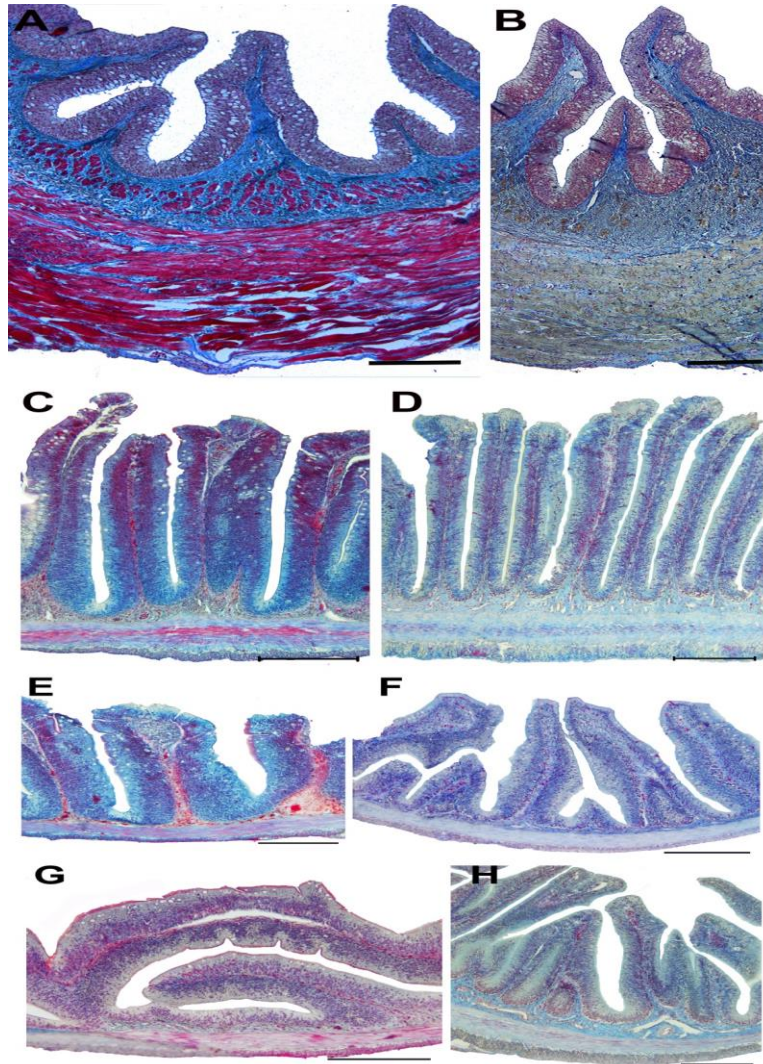
Van balığının sindirim kanalında belirgin bir mide yapısı mevcut değildir. Kanalin özofagus bitiminde yapısal olarak genişlemiş, sitolojik, histolojik ve hormonal olarak farklılaşmış bir yapıya sahiptir. Van balığında fundus, pilorik ve korpus kısımlarının bulunduğu mide yapısı bulunmamaktadır. Mide benzeri yapı da histolojik olarak seröz, diğer sindirim kanallarına kıyasla ince bir muskularis, submukoza ve mukoza tabakalarından oluştuğu belirlenmiştir. Balığın histolojik yapısı diğer kısımlarla benzer şekilde olup, katman kalınlıkları hem kısımlar arasında hem de göl ve akarsu gibi farklı ortamlarda farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 2). Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örnekler mide benzeri yapılarının çapları incelenmiştir. Özofagus kısmında da olduğu gibi mide benzeri yapının çapında göl ortamından daha geniş olduğu görüldü. Göl ve akarsu ortamlarından alınan balıkların mide benzeri yapılarına ait ortalama mukoza genişliklerine bakıldığında göl ortamdaki balıklara ait değerlerin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Mide benzeri yapıdaki mukoza genişliğini özofagusa ait mukoza genişliğine benzer şekilde göl ortamında fazla olduğu görülmüştür. Mide benzeri yapıya ait mukoza uzunluğunun göl ortamında akarsu ortamına göre daha uzun olduğu belirlenmiştir. Hem mide benzeri yapıya ait mukoza uzunluğunun hem de özofagusa ait mukoza uzunluğunun göl ortamında daha fazla olduğu görüldü. Mide benzeri yapının mukoza kıvrımları, mukoza genişliği ve mukoza uzunluğundan farklı olarak akarsu ortamında bulunan örneklerde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Mide benzeri yapıya ait mukoza kıvrımları akarsu ortamında göl ortamına oranla daha fazla olması özofagusa ait mukoza kıvrımları ile benzerlik göstermektedir. Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örneklerde mide benzeri yapıya ait ortalama muskularis kalınlığı ölçüldüğünde akarsu ortamındaki balıklardan daha fazla olduğu belirlendi. Bu sonuç özofagusa ait muskularis kalınlığı ile benzerlik göstermektedir. Mide benzeri yapıya ait mukoza genişliği ve mukoza uzunluğu ile farklılık görülmektedir ($p<0,05$) Ancak mide benzeri yapıya ait mukoza kıvrımlarında da olduğu gibi akarsu ortamında farklılık mevcuttur. Balık göl ve akarsu ortamlarında incelendiğinde, mide benzeri yapının submukoza kalınlığı akarsu ortamında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Özofagus submukoza kalınlığında olduğu gibi mide benzeri yapıda da akarsu ortamında daha geniş olduğu gözlemlendi. Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örneklerin mide benzeri yapıları ölçüldüğünde göl ortamında bulunan balıklarda daha uzun olduğu tespit edildi. Van balığının mide benzeri yapının uzunluğu da özofagus uzunluğunda olduğu gibi göl ortamlarında daha fazladır.

Van balığının sindirim kanalında mide benzeri yapıyı takip eden ve rektuma kadar uzanan yapıyı bağırsak oluşturmaktadır. Bu kısımda morfolojik ve histolojik olarak farklılar görülmektedir ($p<0,05$). Van balığında bu farklılıklar sonucunda bağırsak iki kısımdan oluştuğu belirlendi. İlk kısım anterior bağırsak, rektuma yakın olan ikinci kısım ise posterior bağırsak olarak adlandırıldı. Anterior bağırsağın daha kalın bir yapıda olduğu görüldü.

Anterior bağırsak, Van balığının sindirim kanalında mide benzeri yapıdan hemen sonra gelen kısımdır. Morfolojik olarak mide benzeri yapıdan daha ince iken mukoza kıvrımları olarak da farklılık göstermektedir. Mukoza kıvrımları basit silindirik hücrelerden oluşmaktadır ve çoğunlukla goblet hücrelerinin yoğun olarak bulunduğu kısımdır. Bu histolojik tabakaların ise göl ve akarsu ortamlarından alınan balıklarda farklılıkların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Van balığında anterior bağırsak çapının göl ortamında buluna balıklarda, akarsu ortamında bulunan balıklara göre daha geniş

olduğu görülmüştür. Göl ve akarsu ortamlarında anterior bağırsağa ait mukoza genişliği, özofagus ve mide benzeri yapıda olduğu gibi göl ortamında daha geniş olduğu belirlendi. Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örneklerin anterior bağırsağına ait mukoza uzunlukları ölçüldü. Akarsuda bulunan balıklarda daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Özofagus ve mide benzeri yapıya ait mukoza uzunlukları göl ortamında uzun olduğu görülmesine rağmen anterior bağırsak da akarsu ortamında uzun olduğu belirlendi. Anterior bağırsağa ait mukoza kıvrımları göl ortamında bulunan balıklarda daha fazla olduğu görülmüştür. Özofagus ve mide benzeri yapıda bulunan mukoza kıvrımlarının ise anterior bağırsaktan farklı olarak akarsu ortamındaki balıklarda daha fazla olduğu gözlemlendi. Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örneklerin anterior bağırsağına ait muskularis tabakası kalınlıkları incelenmiştir. Muskularis kalınlığı akarsu ortamında bulunan balıklarda daha kalın olduğu gözlemlendi. Van balığının anterior bağırsağına ait submukoza kalınlığının göl ortamında akarsu ortamına göre daha kalın olduğu görülmüştür. Submukoza kalınlığı özofagus ve mide benzeri yapıda ise anterior bağırsaktan farklı olarak akarsu ortamında kalındı. Anterior bağırsak uzunluğunun göl ortamındaki balıklarda akarsu ortamındaki balıklara oranla daha uzun olduğu belirlendi.

Posterior bağırsak, Van balığının sindirim kanalının son kısmını oluşturmaktadır. Anterior bağırsaktan daha ince yapıdadır. Mukoza kıvrımları da diğer bölgelere göre farklılık göstermektedir. Posterior bağırsak, anüs boşluğuna açılarak sonlanmaktadır. Posterior bağırsak da histolojik olarak seröz, muskularis, submukoza ve mukoza olmak üzere dört tabakadan meydana gelmektedir. Bu tabakalar incelendiğinde göl ve akarsu ortamlarından alınan balıklarda farklılıklar gözlemlendiği belirlendi ($p<0,05$) (Çizelge 2). Posterior bağırsağın çapı diğer tüm kısımlarda olduğu gibi göl ortamında akarsu ortamına göre daha geniş olduğu gözlemlendi. Göl ve akarsu ortamlarında bulunan örneklerin posterior bağırsağına ait mukoza genişliklerine bakıldığında göl ortamında bulunan balıklarda daha geniş olduğu belirlendi. Sindirim kanalı boyunca mukoza genişliğinin göl ortamında bulunan balıklarda akarsu ortamında bulunan balıklara oranla daha geniş olduğu belirlendi. Balık posterior bağırsağına ait mukoza uzunluğu göl ve akarsu ortamlarında incelendiğinde akarsu ortamında bulunan balıklarda daha uzun olduğu görülmüştür. Sindirim kanalı boyunca mukoza uzunluğu incelendiğinde özofagus ve mide benzeri yapıda göl ortamında bulunan balıklarda daha uzun iken, anterior ve posterior bağırsaklarda ise akarsu ortamında bulunan örneklerin daha uzun olduğu tespit edilmiştir. Posterior bağırsak mukoza kıvrımları göl ortamında bulunan örneklerde daha fazla olduğu görülmüştür. Sindirim kanalı boyunca mukoza kıvrımları incelendiğinde özofagus ve mide benzeri yapıda göl ortamında bulunan örneklerde daha fazla iken, anterior ve posterior bağırsaklarda ise akarsu ortamında bulunan balıklarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Posterior bağırsağına ait muskularis kalınlığı iki ortamda da ölçüldüğünde akarsu ortamında bulunan balıklarda daha kalın olduğu gözlemlendi. Sindirim kanalı boyunca muskularis kalınlığının göl ortamında bulunan örneklerde daha kalın olduğu tespit edildi. Göl ve akarsu ortamında bulunan örneklerin posterior bağırsağına ait submukoza tabakası kalınlığının akarsu ortamında bulunan balıklarda daha kalın olduğu görüldü. Sindirim kanalı boyunca ise özofagus, mide benzeri yapı ve posterior bağırsakta akarsu ortamında bulunan balıklarda submukoza tabakası daha kalın iken anterior bağırsakta ise göl ortamında bulunan balıklarda daha kalın olduğu belirlendi. Her iki ortamda bulunan örneklerin posterior uzunlukları ölçüldüğünde göl ortamında bulunan örneklerin daha uzun olduğu tespit edildi. Sindirim kanalı kısımlarının göl ortamında bulunan örneklerin daha uzun olduğu belirlendi (Çizelge 2).



Şekil 2: Van Balığının Sindirim Kanalı Kısımları (A-B: Özofagus, C-D: Mide benzeri yapı, E-F: Anterior bağırsak, G-H: Posterior bağırsak) (A-C-E-G: Göl ortamı, B-D-F-H: Akarsu ortamı) (Masson Trikróm Boyama 100µm)

Çizelge 2. Van Balığı Sindirim Kanalı Dokusunun Histolojik Katmanlarının Ölçümü

Değer	n	Özofagus		Mide Benzeri Yapı		Anterior Bağırsak		Posterior Bağırsak	
		Göl	Akarsu	Göl	Akarsu	Göl	Akarsu	Göl	Akarsu
Çap (µm)	7	2272.29 ± 92.02*	2211.86 ± 159.93	4972.13 ± 330.76*	4933.05 ± 476.41	2585.97 ± 176.53*	2145.00 ± 152.17	2314.85 ± 193.25*	1922.25 ± 211.89
Muskularis Kalınlığı (µm)	7	471.96 ± 38.03	558.97 ± 46.68*	74.07 ± 5.17	161.03 ± 12.89*	6375 ± 4.87	104.49 ± 8.03*	50.46 ± 2.52	99.12 ± 7.64*
Submukoza Kalınlığı (µm)	7	144.72 ± 21.43	178.88 ± 32.46*	55.85 ± 5.17	57.89 ± 4.57*	43.02 ± 3.47*	41.75 ± 4.37	40.10 ± 1.85	49.14 ± 4.31*
Mukoza Uzunluğu (µm)	7	422.14 ± 35.85*	325.81 ± 29.09	664.64 ± 63.25*	588.32 ± 28.07	476.96 ± 43.54	548.10 ± 29.40*	475.95 ± 28.90	502.56 ± 41.20*
Mukoza Genişliği (µm)	7	160.71 ± 17.75*	118.40 ± 3.59	183.40 ± 17.23*	135.11 ± 9.91	163.73 ± 10.94*	115.84 ± 9.57	137.65 ± 7.18*	117.12 ± 5.90
Mukoza Kıvrımları (µm)	7	9.00 ± 1.19	10.71 ± 0.47*	31.42 ± 1.1	32.28 ± 0.94*	28.00 ± 1.81*	21.28 ± 0.56	29.85 ± 1.42*	21.57 ± 1.28
Uzunluk (cm)	5	1.06 ± 0.04	1.02 ± 0.02	5.98 ± 0.33*	4.88 ± 0.33	6.42 ± 0.28*	4.60 ± 0.43	7.28 ± 0.36*	4.80 ± 0.60

Ölçülen değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. n: 7, *:değerler arasındaki istatistiksel farklılığı gösterir (p<0.05).

SONUÇ

Sonuç olarak, Van balığı üreme göçü sırasında sindirim kanalındaki histolojik ve morfometrik değişimlerin balığın osmoregülasyonu ve beslenmesi ile ilgili olduğu belirlendi. Tatlı sudan örneklenen balıkların mide içeriğinin az miktarda veya boş olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, histolojik ve morfometrik değişimler üzerinde en etkili faktör besinle birlikte sindirim kanalına giren alkalın, acı suyun da olabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Balık temininde yardımını esirgemeyen Doktor Ahmet SEPİL'e teşekkür ederim. Bu araştırma Van yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığı (FDK-2020-8918) tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Abd El Hafez, E.A., Mokhtar, D.M., Abou-Elhamd, A.S. & Hassan, A.H.S. (2013). Comparative histomorphological studies on oesophagus of catfish and grass carp. *Journal of Histology*, 20-13. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/858674>
- Akkuş, M., Sarı, M., Ekmekçi, F. G. & Yoğurtçuoğlu, B. (2021). The discovery of a microbialite-associated freshwater fish in the world's largest saline soda lake, Lake Van (Turkey). *Zoosystematics and Evolution*, 97(1): 181-189. <http://dx.doi.org/10.3897/zse.97.62120>
- Alkan, Z. & Oğuz, A. R. (2021). Investigation of gill mucus cells of Lake Van fish (*Alburnus tarichi*) during reproductive migration. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(2): 409-419. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00921-6>
- Bancroft, J.D. & Gamble, M. (2002). Theory and practice of histological techniques. 5th. Edinburgh. Churchill Livingstone Pub, 172(5): 593-620
- Bilgili, A. (1995). Van Gölü suyunun doğal kalitesi ve buradan avlanan inci kefalı (*chalcalburnus tarichi*, *Pallas 1811*) örneklerinde bazı ağır metal düzeyleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42(04). https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000000753
- Buddington, R. K., Chen, J. W. & Diamond, J. (1987). Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *The Journal of Physiology*, 393(1): 261-281. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016823>
- Buddington, R. K. & Kroghdahl, Å. (2004). Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 139(3): 261-271. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.09.007>
- Canan, B., Nascimento, W. S., Silva, B. N. & Chellappa S., (2012). Morphohistology of the digestive tract of the damselfish *Stegastes fuscus* (Osteichthyes: Pomacentridae). *The Scientific World Journal*. 2012:787316. <https://doi.org/10.1100/2012/787316>
- Cao, X. J. & Wang, W. M. (2009). Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38 (4): 254-261. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2009.00932.x>
- Chatchavalvanich, K., Poonpirom, R. M. J. & Rocha, T. E. (2006). Histology of the digestive tract of the fresh stingray *Himantura signifer* Compagno and Roberts, 1982 (Elasmobranchii, Dasyatidae). *Anatomy and Embryology*, 211: 507-518. <https://doi.org/10.1007/s00429-006-0103-3>

- Çetinkaya, O., Mustafa, S., Fazıl, Ş., Arabacı, M. & Duyar, H. (1994). Van Gölüne Dökülen Karasu Çayının Limnolojik Özellikleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 4(1): 151-168.
- Çiftçi, Y., Işık, M. A., Alkeveli, T. & Yeşilova, Ç. (2008). Van Gölü havzasının çevre jeolojisi. *Jeoloji Mühendisliği Dergisi*, 32(2): 45-77.
- Danulat, E. & Selçuk, B. (1996). Life history and environmental conditions of the anadromous *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae) in the highly alkaline Lake Van, Eastern Anatolia, Turkey. *Archiv fur Hydrobiologie* 126:105–125. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/126/1992/105>
- Ebrahim, A. (2015). Study of the digestive tract of a rare species of Iranian blind cave fish (Iranocypris typhlops). *Biodiversitas*: 6 (16), 173-178. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d160212>
- Elp, M. & Şen, F. (2009). Biological properties of *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1773) population living in Karasu Stream (Van, Turkey). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(1), 139-142.
- Ergöz, B. & Oğuz, A. R. (2018). Comparison of the histological changes in the digestive tract of Lake Van Fish (*Alburnus tarichi* Güldenstädt, 1814) during reproductive migration. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Journal of Agricultural Sciences*, 28 (Special Issue): 125-134.
- Escaffre, A. M., Kaushik, S. & Mambrini, M. (2007). Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. *Aquaculture*, 273(1): 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.028>
- Faccioli, C. K., Chedid, R. A., do Amaral, A. C., Vicentini, I. B. F. & Vicentini, C. A. (2014). Morphology and histochemistry of the digestive tract in carnivorous freshwater *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes: Pimelodidae). *Micron*, 64, 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.03.011>
- Formicki, K. & Kirschbaum, F. (Eds.). (2019). *The Histology of Fishes*. CRC Press.
- Fugi, R., Agostinho, A. & Hahn, N. S. (2001). Trophic morphology of five benthic feeding fish species of a tropical floodplain. *Brazilian Journal of Biology*, 61: 27-33. <https://doi.org/10.1590/S0034-71082001000100005>
- Genten, F., Terwinghe, E. & Danguy, A. (2009). *Atlas of Fish Histology*. Science Publishers, Endfield, NH, USA.
- Gonzalez Neves dos Santos, A. F., Neves dos Santos, L. & Gerson Araújo, F. (2011). Digestive tract morphology of the Neotropical piscivorous fish *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae) introduced into an oligotrophic Brazilian reservoir. *Revista de Biología Tropical*, 59(3):1245-1255. <https://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3395>
- Grosell, M., Farrell, A. P. & Brauner, C. J. (2010). *Fish physiology: The multifunctional gut of fish*. Academic Press.
- Hernández, D. R., Pérez Gianceselli, M. & Domitrovic, H. A. (2009). Morphology, Histology and Histochemistry of the Digestive System of South American Catfish (*Rhamdia quelen*). *International Journal of Morphology*, 27(1): 105-111. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022009000100019>
- Hossain, A. M. & Dutta, H. M. (2017). Phylogeny, ontogeny, structure and function of digestive tract appendages (caeca) in teleost fish. *Fish Morphology*, 59-76. <https://doi.org/10.1201/9780203755990>
- Humbert, W., Kirsch, R. & Meister, M. F. (1984). Scanning electron microscopic study of the oesophageal mucous layer in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, 25(1): 117-122. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04856.x>
- İribüğday, F. & Oğuz, A. R. (2020). Van Balığı [*Alburnus tarichi* (Güldenstädt, 1814)] Derisindeki Mukus Hücrelerinin Tatlı Su Adaptasyonu Sırasında Değişimi. *Commagene Journal of Biology*, 4(2): 86-90. <https://doi.org/10.31594/commagene.751122>
- Jönsson, E. & Holmgren, S. (2011). Integrated Function and Control of the Gut Endocrine Systems of the Gut. *Encyclopedia of Fish Physiology*, 1341-1347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00070-8>
- Kramer, D. L. & Bryant, M. J. (1995). Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet the long and short of a convoluted issue. *Environmental Biology of Fishes*, 42(2): 129-141. <https://doi.org/10.1007/BF00001991>

- Mokhtar, D. M., (2017). Fish histology: from cells to organs. Apple Academic Press. New York. <https://doi.org/10.1201/9781315205779>
- Morrison, C. M. & Wright Jr, J. R. (1999). A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*, 54(3): 597-606. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00638.x>
- Murray, H. M., Wright, G. M. & Goff, G. P. (1994). A comparative histological and histochemical study of the stomach from three species of pleuronectid, the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 1199-1210. <https://doi.org/10.1139/z94-161>
- Nascimento, W. S., Silva, N. B., Yamamoto, M. E. & Chellappa, S. (2015). Anatomy and histology of the digestive tract of a rare annual fish *hypsolebias antenori* (Rivulidae) from Brazil. *Animal Biology Journal*. 4:1. 1949-498. <https://doi.org/10.15406/jamb.2018.07.00181>
- Ofelio, C., Cohen, S., Adriaens, D., Radaelli, G. & Díaz, A. O. (2019). Histochemistry of goblet cells and micro-computed tomography to study the digestive system in the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, 502: 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.048>
- Oğuz, A. R. (2013). Environmental regulation of mitochondria-rich cells in *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) during reproductive migration. *The Journal of Membrane Biology*. 246: 183-188. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9518-3>
- Oğuz, A. R. (2015). Histological changes in the gill epithelium of endemic Lake Van Fish (*Chalcalburnus tarichi*) during migration from alkaline water to freshwater. *North-Western Journal of Zoology*. 11:51-57.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Hliwa, P., Gomółka, P. & Kwasek, K. (2008). Nutritional regulation of intestine morphology in larval cyprinid fish, silver bream (*Vimba vimba*). *Aquaculture Research*, 39(12): 1268-1278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01989.x>
- Palmer, J. M. & Greenwood-Van Meerveld, B. (2001). Integrative neuroimmunomodulation of gastrointestinal function during enteric parasitism. *Journal of Parasitology*, 87(3): 483-504. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0483:INOGFD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0483:INOGFD]2.0.CO;2)
- Park, J. Y. & Kim, I. S. (2001). Histology and mucin histochemistry of the gastrointestinal tract of the mud loach, in relation to respiration. *Journal Fish Biology*, 58:861-872. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00536.x>
- Sumita, M. & Schmincke, H. U. (2013). Impact of volcanism on the evolution of Lake Van II: temporal evolution of explosive volcanism of Nemrut Volcano (eastern Anatolia) during the past ca. 0.4 Ma. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 253: 15-34. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2012.12.009>
- Şen, F., Paruğ, Ş. Ş. & Elp, M. (2015). İnci Kefali'nin (*Alburnus tarichi*, Güldenstädt, 1814) dünü, bugünü ve geleceği üzerine projeksiyonlar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(3): 347-356. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.236420>
- Takashima, F. & Hibiya, T. (1995). An atlas of fish histology normal and pathological features second edition. *The University of Tokyo*. 112: 88-106.
- Timur, G. (2008). *Balık Anatomisi*. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:33. Nobel Yayın No:1332. 1. Basım. Ankara. 75-76.
- Timur, M. (2006). Balık Fizyolojisi. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü. İstanbul Üni. Nobel Yayın No:957. 1. Basım., Ankara. 10-11.
- Ünal, G., Çetinkaya, O., Kankaya, E. & Elp, M. (2001). Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811 (Cyprinidae). *Turkish Journal of Zoology* (1300-0179), 25: 217-228.
- Vieira-Lopes, D. A., Pinheiro, N. L., Sales, A., Ventura, A., Araújo, F. G., Gomes, I. D. & Nascimento, A. A. (2013). Immunohistochemical study of the digestive tract of *Oligosarcus hepsetus*. *World Journal of Gastroenterology*, 19(12): 1919-1929. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i12.1919>
- Wilson, J. M. & Castro, L. F. C. (2010). Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. In *Fish physiology*, 30: 1-55. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)

Evaluation of Uses of Some Enzymes in Removal of Plant Impurities from Raw Wool Fabrics

Elif DEMİRKAN^{1*}, Dilek YAŞAR KUT², Nilay ALADAĞ TANIK¹

Highlights:

- The efficiency of cellulase and phytase enzyme obtained from new *Bacillus* isolates and commercial acid pectinase were determined.
- Enzymes were applied alone and in mixtures at different pHs, volumes and incubation times.
- Enzymatic effect was demonstrated by light microscopy

ABSTRACT:

In this study, phytase from *Bacillus megaterium* EBD9-1 and cellulase from *Bacillus subtilis* 171ES obtained from isolated from different provinces soils, and commercial pectinase enzymes were investigated for the removal potential of plant impurities from raw wool fabrics. Enzymatic removal of plant impurities is usually carried out at pH 4.0. The efficiency of the enzyme was shown at pH 7.0, but the best effect was obtained with pH 4.0. Enzymes were effective alone, but the effects of double and triple enzyme mixtures on plant impurities were more. It was determined that the effect decreased in case the enzyme amount was used low, and the effect increased even more in the presence of the concentrated enzyme. With this study, which was carried out for the first time with local isolate, the operability of more environmentally friendly enzymes in carbonization processes traditionally performed with chemical substances was demonstrated.

Keywords:

- Cellulase
- Phytase
- Pectinase
- Plant impurities
- Wool fabric

¹Elif DEMİRKAN (Orcid ID: 0000-0002-5292-9482), Nilay ALADAĞ TANIK (Orcid ID: 0000-0002-4370-111X), Bursa Uludag University, Faculty of Arts and Science, Department of Biology, Bursa, Türkiye

²Dilek YAŞAR KUT (Orcid ID: 0000-0002-9059-0838), Bursa Uludag University, Faculty of Engineering, Department of Textile Engineering, Bursa, Türkiye

*Corresponding Author: Elif DEMİRKAN, e-mail: edemirkan@uludag.edu.tr

INTRODUCTION

Enzymes are biological catalysts that catalyze biochemical reactions that occur in living things and are generally protein-based. Enzymes, which have important metabolic functions in cells, have now entered daily and economic life to be used for different purposes in many fields. They are used in many industrial areas such as food, textile, medicine, cosmetics, animal feed, waste treatment, agriculture, and detergent, etc. (Sharma et al., 2020). Because, they have many advantages such as being economically produced, being biodegradable, being specific, not creating unwanted by-products, producing less waste than conventional methods, and being safe for employee and environmental health (Choi et al., 2015, Seager et al., 2018). Enzymatic treatments have gained popularity in the textile industry due to their environmentally friendly and energy-saving alternatives.

Enzymatic processes have gained popularity in the textile industry due to their environmental, water, and energy-saving alternatives, and nowadays enzymes have become an integral part of the textile process. Enzymes are a sustainable alternative to harsh toxic chemicals in the textile industry. Many enzymes such as cellulases, laccases, amylases, catalases, and peroxidases are used in various stages of textile processing such as desizing, biostoning of denim and non-denim, biological polishing, peroxide removal, bio-carbonization of wool and waste treatment, etc. (Chelikani et al., 2004; Cavaco-Paulo & Gubitz, 2003; Barrett et al., 2012). The use of enzymes in the textile industry is one of the fastest-growing areas of industrial enzymology.

Raw wool, which has an important place in textiles, is a truly impure component, often contaminated with 40% to 70% of unnecessary matter (Fong et al., 1951). These pollutants found in wool are mostly plant-derived impurities consisting of thorns, straw, grasses, leaves, burrs, branches, seeds, and forage residues. (El-Sayed et al., 2010). These impurities must be removed efficiently for the wool to be processed.

Traditionally, a chemical method called carbonization is used to remove plant impurities. The most commonly used chemical for this purpose is acid sulfuric acid, which is a strong acid. However, this method causes weakening and discoloration of the fibers, weight loss during subsequent processes, and negatively affect dye uptake, a lot of water is used in this process, and it is laborious and time-consuming. Due to these disadvantages, various environmentally friendly methods such as the use of plasma, ultrasound, and enzymes have been studied in various studies (Sun & Stylios, 2004; Das & Ramaswamy, 2006; Zheng et al., 2012; Bahtiyari & Duran, 2013). Enzymes gained importance from these methods and plant impurities content of wool fiber was removed at various rates with cellulase, pectinase, or xylanase enzymes (Rahman & Nur, 2014). The first attempts to carbonize wool with the use of enzymatic preparations in the process of removing from the wool of plant impurities were made in Poland in the 1980s. This process is known as "BIOCARBO of wool" or bio-carbonization (Sedelnik, 1993; El-Sayed et al., 2010).

Although enzymes are also produced by animals and plants, microorganisms are the main source of enzyme production because they are obtained in a short time under controlled conditions. Approximately 96% of enzymes used for industrial purposes are produced from microorganisms (Lowe, 2001). The main sources of microbial enzymes are fungi such as *Aspergillus* and *Trichoderma* and bacteria such as *Streptomyces* and *Bacillus* (Fersht, 2007; Mojssov, 2011).

In this study, the efficiency of *Bacillus subtilis* 171ES cellulase, *Bacillus megaterium* EBD9-1 phytase, previously isolated from different provincial soils, and commercial pectinase enzymes in removing plant impurities from untreated raw wool fabric at pH 4.0 and pH 7.0 were investigated.

Enzymes were tested alone or in mixtures. The effect of enzymatic incubation time, enzyme amount, and lyophilized enzyme were also tested.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The microbial phytase and cellulase used in this study were produced from *Bacillus megaterium* EBD9-1 and *Bacillus subtilis* 171ES isolated from the soils and identified in our previous studies. GenBank accession numbers for *Bacillus megaterium* EBD9-1 and *Bacillus subtilis* 171ES was OM004562 and OM00456, respectively. The commercial pectinase used in the study was obtained from NUY Kimya company. 100% wool fabrics contaminated with plant impurities were obtained from YÜNSA A.Ş (Türkiye). The fabric properties are given in Table 1.

Table 1. Raw Wool Fabric Properties

Raw Material	Weight (g/m ²)	Thread Density		Yarn Count	
		Warp Thread Density (thread/cm)	Weft Thread Density (thread/cm)	Warp Yarn Count (Ne)	Weft Yarn Count (Ne)
100% Wool Fabric	321	16	14	6/1	6/1

Methods

Cultivation and media

For cellulase production, medium containing (%w/v) 1 CMC (Carboxymethyl cellulose), 1.6 skim milk powder, 1 maltose, 0.03 LiSO₄, 0.2 K₂HPO₄ was used. Bacteria growth conditions were temperature 37°C, pH 7.0, incubation time 40 h, aeration 150 rpm and inoculation size of 1% (Msanki, 2020).

The growth medium used for phytase production was composed of 5 g/L lactose, 8 g/L meat extract, 1 g/L CaCl₂·2H₂O, and 5 g/L Na-phytate, and the sample was rotated at 150 rpm for 48 h at 37°C, pH 7.5 and inoculation size of 1% (Demirkan et al., 2017).

Enzyme activity assays of cellulase and phytase

Since the activity of commercial acid pectinase enzyme is known, only the activity values of cellulase and phytase enzymes obtained from new isolates were determined.

Cellulase

The method by Miller (1959) was used for the determination of cellulase enzyme activity. 0.5 mL of 1% carboxyl methyl cellulose substrate solution was added to 0.5 mL of crude enzyme solution and was incubated at 37 °C for 30 minutes in a water bath. To stop the reaction, 1 mL of dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (Garriga et al., 2017) was put and tubes were incubated in boiling water for 5 min., the absorbance was measured at 540 nm after cooling. One unit (U) of enzyme activity was defined as the enzyme amount that releases 1 μmol glucose per minute. The glucose standard curve was obtained by preparing glucose at different concentrations.

Phytase

Phytase activity was assayed according to the method described by Choi et al. (2001). 0.1 mL of crude enzyme solution and 0.9 mL of 2 mM Na-phytate was mixed in the test tubes containing 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). The reaction mixture were incubated in a water bath at 37 °C for 10 min and then the reaction was stopped by adding 0.75 mL of 5% (w/v) TCA. Freshly prepared 1,5 mL of color reagent [four volumes of 2.5% (w/v) ammonium molybdate in 5.5% (v/v) sulfuric acid and one volume of 2.5% ferrous sulfate (w/v)] was added to the test tube and the released phosphate was

measured at 700 nm. One enzyme unit was defined as the amount of phytase liberating 1 μmol of inorganic phosphate in a minute under the assay conditions. A phosphate calibration curve was made by treating standard phosphate solutions of 0-100 μM KH_2PO_4 .

Lyophilization of enzymes

Cellulase and phytase crude enzymes produced in 1 liter of medium were lyophilized. The lyophilization process was performed with the LAB312 brand TOPT-10 Model brand at -55°C for 48 hours. Lyophilized enzymes were stored in sterile falcon tubes at $+4^\circ\text{C}$. Commercial pectinase enzyme is not lyophilized because it has high activity.

The removal of the cellulosic or plant impurities in wool fabrics

Crude cellulase, phytase, and commercial pectinase enzymes were applied to raw wool (100%) alone or in combination. For this purpose, 5 cm diameter wool fabric pieces were placed in sterile Petri dishes and incubated with 15 mL enzymes (alone and mixed enzyme treatment) at pH 4.0 and 7.0 at 37°C for 1 hour (pH 7.0 was not tested for the enzyme since acid pectinase was used in the study). After incubation, the fabric pieces were dried at room temperature. Whether or not the cellulosic or plant impurities in wool fabrics were removed was determined by light microscope (Nikon Eclipse E1000) imaging and photographing. It was compared with the plant impurities on the fabrics photographed under the light microscope before being treated with the enzyme (control). In addition, 5 and 10 mL of each enzyme and enzymes concentrated by lyophilization (10 mL of each) were also included in the experiment. The size of the wool fabric containing plant impurities not treated with the enzyme used in the experiments is given in Figure 1.



Figure 1. 100% Wool Fabric Containing Cellulosic or Plant Impurities

RESULTS AND DISCUSSION

Raw wool fabrics contain high levels of plant impurities as well as some impurities. These impurities are removed by a process called “wool carbonization” in the industry. This process is based on the principle of converting cellulose into an easily removable hydro cellulose using a strong acid, sulfuric acid. Instead of processing using strong and dangerous chemicals, the use of enzymes reduces wool fiber damage, waste load, and energy consumption (Gouveia et al., 2008).

In this study, the effects of crude cellulase from the new isolate *Bacillus subtilis* 171ES and crude phytase enzymes from *Bacillus megaterium* EBD9-1 and commercial pectinase enzyme on the removal of cellulosic or plant impurities in wool fabrics were investigated.

The activities of all enzymes used in the study were adjusted to 445 U/mL. Enzymes were used singly or in enzyme combination. The effects of enzymes on the removal of plant impurities from fabrics were evaluated by light microscopy (10x100 magnification), and compared with the control. The enzymes were effective on the impurities when used alone, but it was observed that the effect increased when used in combination. In industrial carbonization applications, plant impurities are generally removed at pH 4.0. In this study, better results were obtained at pH 4.0. However, cellulase and phytase were effective in removing plant impurities at an acceptable level at pH 7.0.

While cellulase and phytase enzymes were effective in the breakdown of plant impurities at pH 4.0 and 7.0, cellulase and phytase were more effective at 4.0. Commercial pectinase alone was also effective (Figure 2).

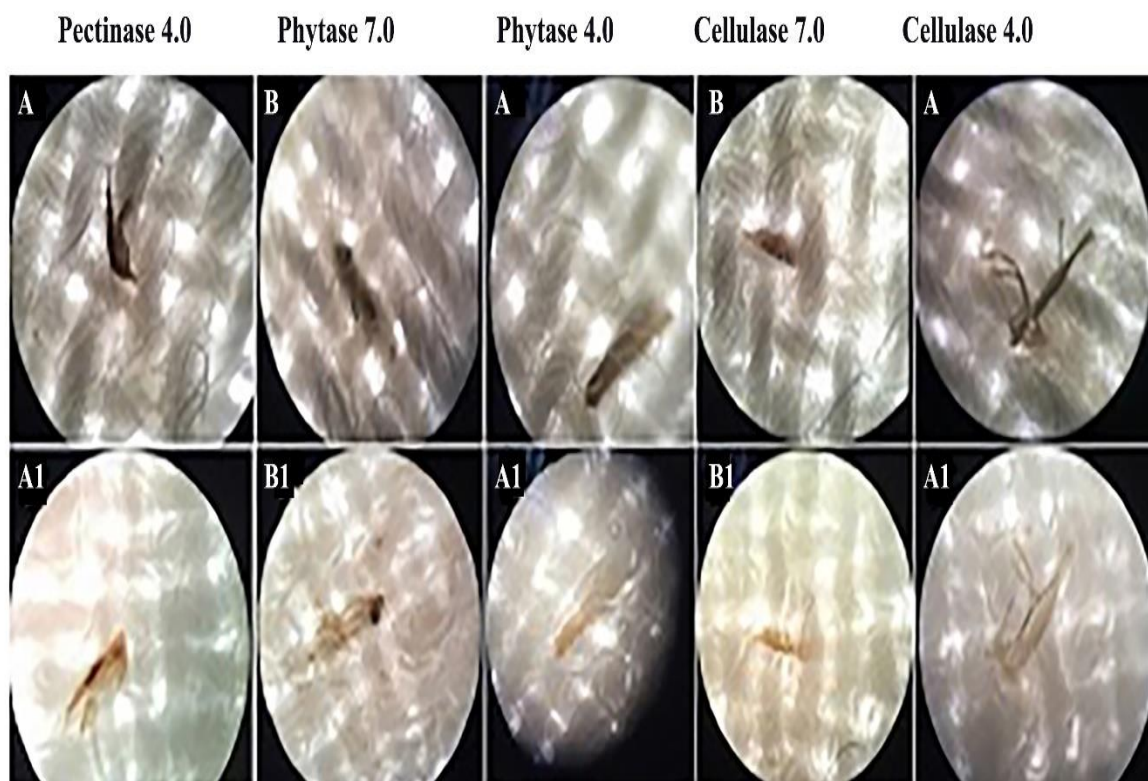


Figure 2. Light Microscope Images Taken After Working with Different Enzyme Structures at and at Different pH on the Wool Fabric. A and B: Without Applying Enzyme (Control), A1: Incubation with Enzyme at pH 4.0, B1: Incubation with Enzyme at pH 7.0. 15 mL Crude Enzyme, 1 h Incubation at 37°C

The effect of treating the wool with the enzyme mixture was also examined. Since cellulase is an important enzyme in biocarbonization, in experiments with cellulase + pectinase and cellulase + phytase in the dual enzyme combination, cellulase + pectinase media had a greater effect on plant impurities (Figure 3). In the study made with a triple enzyme mixture, woolen fabrics were treated with cellulase + pectinase + phytase.

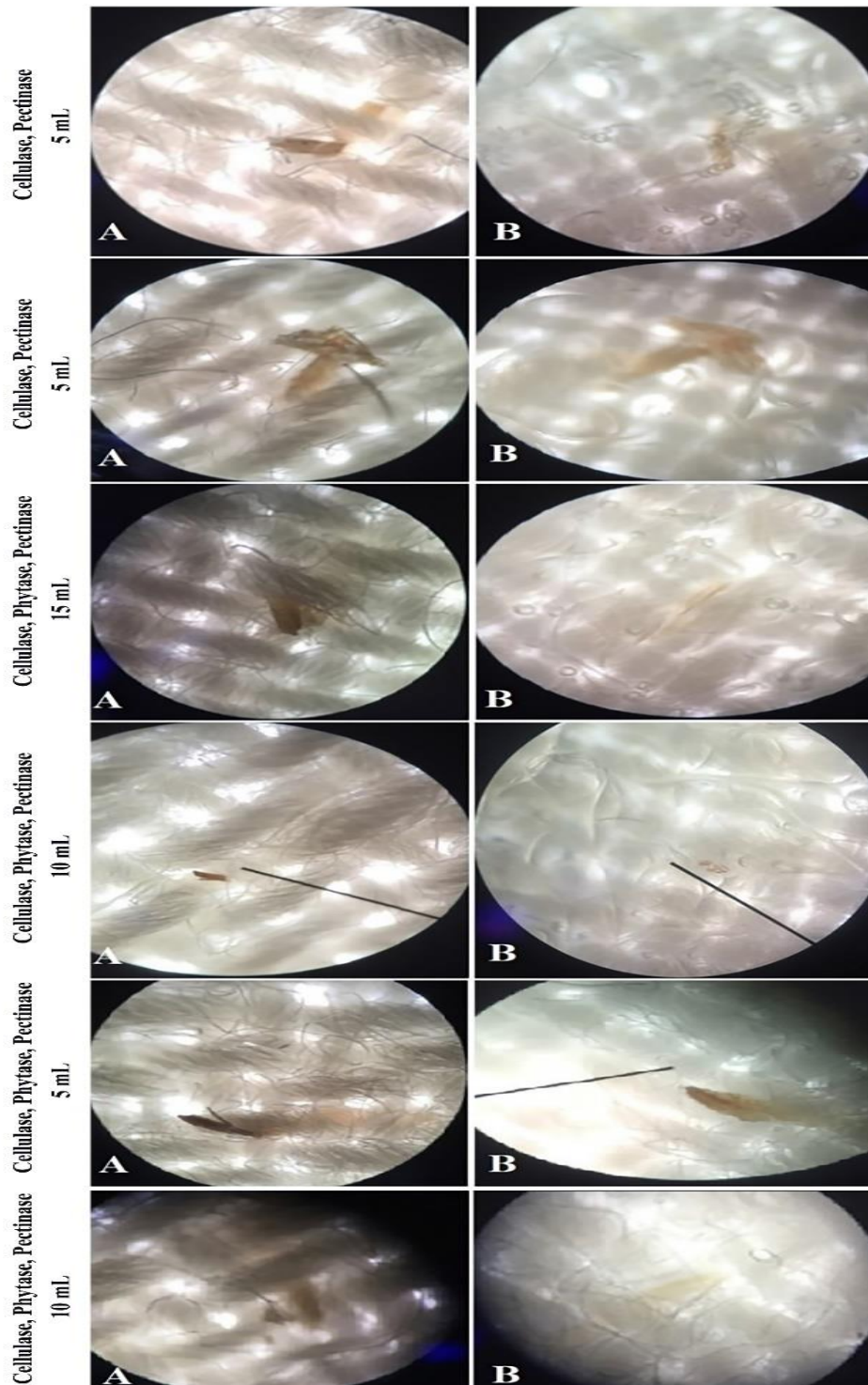


Figure 3. Light Microscope Images of Wool Fabrics After Combined Enzyme Use on Plant Impurities. A: Without Applying Enzyme (control), B: Incubation with Enzymes at pH 4.0, 37°C for 1h

When cellulase and phytase enzymes obtained from local isolates were concentrated by lyophilization and treated with commercial pectinase on raw wool fabric, the effect on plant impurities was better than in other experiments. This showed that the enzyme density was quite effective.

On the other hand, the amount of enzyme can also be effective. In the study for this purpose, in the case of using less amount of raw enzyme (5 mL), the enzyme had a small effect, but it was observed that the effect increased as the amount of enzyme increased (10 mL). Even more efficient

results were obtained in the amount of 15 mL enzyme used in the experiments. However, it was determined that it was better to apply the enzyme in concentrated form.

As a result of the studies, in all experiments, as seen in the controls, the colors of the plant impurities, which were dark in color, showed a clear opening, fragmentation and deformation with enzymatic treatment. The synergistic effect of the three enzymes mixture was found to be much more effective at removing cellulosic or plant impurities from raw wool than using an individual or dual enzyme system. Cellulase enzyme hydrolyzes cellulose and hemicellulose, pectinase enzyme hydrolyzes pectin, phytase enzyme hydrolyzes phytate. The effect of phytase enzyme on plant impurities was reported for the first time with this study. Enzyme treatment of woolen fabrics removes plant impurities from wool to varying degrees depending on the activity of the enzyme used.

On the other hand, it has been observed that enzymes break down small particles more easily. Therefore, the shape, thickness and size of the wastes are important. For thick and large wastes, a chemical treatment may need to be applied beforehand.

There are not enough studies in the literature on the removal of plant impurities from wool by using only enzymes. El-Sayed has been reported that a mixture of acid cellulase, acid pectinase and xylanase has been utilized for removing plant impurities from lightly contaminated Egyptian wool fleece (El-Sayed et al., 2010). On the other hand, the pretreatment of wool with an enzyme bath in the carbonization process has been reported to help reduce the sulfuric acid concentration from 6% to 1.5% (Sedelnik et al., 2003).

CONCLUSION

In this study, the effects on the removal of plant impurities by using enzymes were investigated and it was determined that the enzymes were effective alone, but the concentrated enzyme mixtures were more effective on plant impurities. Since the size and thickness of the plant impurities are very effective, the enzyme incubation period may need to be extended. It is thought that after 1 hour of enzymatic incubation, plant impurities are weakened by breaking down by enzymes, but weakened wastes can be removed as a result of mechanical rubbing. The potential power of enzymes will be revealed with detailed studies on this subject. Since enzymatic removal is new, there is not much study in the literature. This study will shed light on the scientific literature.

ACKNOWLEDGEMENTS

The researchers would like to thank YÜNSA for supplying the experimental fabrics used in the study.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

Author E. Demirkan and D.Kut: The study was planned and designed.

Author E.Demirkan, D.Kut and N.Aladağ Tanik: Collected and analyzed data.

Author E.Demirkan, D.Kut and N.Aladağ Tanik: Wrote the article.

REFERENCES

- Bahtiyari, M. I. & Duran, K. (2013). A Study on the usability of ultrasound in scouring of raw wool. *Journal of Cleaner Production*, 41, 283–290.
- Barrett, A. J., Woessner, J. F., & Rawlings N. D. (Eds.). (2012). *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (Vol. 1) Elsevier.
- Cavaco-Paulo, A., & Gubitiz, G. (Eds.). (2003). *Textile processing with enzymes* (Vol. 29). Woodhead publishing.

- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61 (2), 192–208.
- Choi, J. M., Han, S. S. & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33, 1443–1454.
- Choi, Y. M., Suh, H. J. & Kim, J. M. (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20, 287–292.
- Das, T. & Ramaswamy, G. N. (2006). Enzyme treatment of wool and specialty hair fibers. *Textile Research Journal*, 76(2), 126–133.
- Demirkan, E., Sevgi, T., Akcakoca, D. & Ersoy, F. (2017). Partial purification, characterization and wheat bran degradation studies of a new phytase from the *Bacillus megaterium* EBD 9-1 strain. *Turkish Journal of Biochemistry*, 42, 329–337.
- El-Sayed, H., El-Gabry, L. K. & Kantouch F. (2010). Effect of bio-carbonization of coarse wool on its dyeability. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 35, 330–336.
- Fersht, A. (2007), Enzyme structure and mechanism, San Francisco: Brenda, WH, *The comprehensive enzyme information system*, 50(2).
- Fong, W., Yeiser, A. & Lundgren, H. (1951). A new method for raw-wool scouring and grease recovery. *Textile Research Journal*, 21, 540–555.
- Garriga, M., Almaraz, M. & Marchiaro, A. (2017). Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas de Ingeniería*, 3, 173–179.
- Gouveia, I. C., Fiadeiro, J. M. & Queiroz, J. A. (2008). Combined bio-carbonization and dyeing of wool: a possibility using cell wall-degrading enzymes and 1:1 metal–complex dyes. *Engineering in Life Sciences*, 8, 250–259.
- Lowe, D. A. (2001). Production of Enzymes. In C. Ratledge & B. Kristionsen (Eds.), *Basic Biotechnology* (2 ed., pp. 679). Cambridge University Press.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mojsov, K. (2011, March 09-11) Application of enzymes in the textile industry: a review. *II International Congress Engineering/Ecology and Materials in the Processing Industry*, Jahorina, Bosnia and Hercegovina.
- Msanki S. (2020). Screening of cellulase enzyme production by *Bacillus* sp. isolated from Turkish soils, nutritional optimization, partial purification of enzyme, characterization and effectiveness of plant waste removal in wool fabric. Master Thesis. Bursa Uludag University, Institute of Science, Department of Biology, Bursa
- Rahman, M. & Nur, G. (2014). Feasible application of modern eco-friendly treatment of wool fabric before coloration. *International Journal of Science Research Publication*, 4(7), 1–7.
- Seager, S. L., Slabaugh, M. R. & Hansen, M. S. (2018). *Chemistry for Today: General, Organic, and Biochemistry* (9 ed., pp. 886). Cengage Learning.
- Sedelnik, N. (1993). BIOCARBO-Method of removal of plant impurities from the carded woollen textiles. *Textile Overview*, 12, 294–97.
- Sedelnik, N. (2003), Biotechnology to improve the quality of wool. *Research Journal of Textile and Apparel*, 7(2), 1–10.
- Sharma, N., Angural, S., Rana, M., Puri, N., Kondepudi, K. K. & Gupta, N. (2020). Phytase producing lactic acid bacteria: Cell factories for enhancing micronutrient bioavailability of phytate rich foods, *Trends in Food Science & Technology*, 96(2020), 1–12.
- Sun, D. & Stylios, G. K. (2004). Effect of low temperature plasma treatment on the scouring and dyeing of natural fibers. *Textile Research Journal*, 74(9), 751–756.
- Zheng, L., Du, B. & Wang L. (2012). Bio-scouring process optimization of wool fiber and wastewater utilization. *The Journal of Textile Institute*, 103(2), 159–165.

Atf İçin: Kaya, M. (2023). Istranca (Yıldız) Dağları, Kırklareli / Dereköy Bölgesinde Ornitolojik Gözlemler. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2423-2436.

To Cite: Kaya, M. (2023). Ornithological Observations in Strandzha Mountains, Kırklareli-Dereköy. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2423-2436.

Istranca (Yıldız) Dağları, Kırklareli / Dereköy Bölgesinde Ornitolojik Gözlemler

Mustafa KAYA^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Istranca Dağları kuş türleri belirlendi
- Göçmen kuşların uçuş güzergahları ve yükseklikleri tespit edildi
- Bölge kuşlarının statüleri belirlendi

Anahtar Kelimeler:

- Kuş
- Göç
- Istranca Dağı
- Kırklareli

ÖZET:

Bu araştırma, Kırklareli'ne bağlı Dereköy ve Karadere Köyü sınırları içerisinde kalan ve Bulgaristan sınırında yer alan Istranca (Yıldız) Dağları'nda yapılan bu çalışmada, Istranca Dağlarının Ornitofaunasının ve Göç hareketliliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla bölgede Mart 2020 – Şubat 2021 tarihleri arasında aylık periyotlar halinde nokta gözlem ve hat boyu gözlem yöntemi kullanılarak 60 günlük gözlem yapılmıştır. Gözlemler sonucu 134 kuş türü tespit edilmiştir. Tespit edilen 99 türe üreme kodu verilmiştir. Tespit edilen 134 kuş türünden süzülen göçmen türlerden 22'sinin Mart 2020 – Haziran 2020 tarihleri arasında, 23'ünün ise Ağustos 2020 – Kasım 2020 tarihleri arasında araştırma sahası ve yakın çevresi üzerinden göç ettikleri tespit edilmiştir. Tespit edilen türlerde 62 tür (%46.26) yerli tür (Y), 48 tür (% 35.82) YG yaz göçmeni (YG), 14 tür (% 10.44) kış göçmeni (KG), 10 tür (% 7.46) ise transit geçen tür (T) olarak tespit edilmiştir. Kuşların statüleri IUCN, CITES, BERN, MAK'a göre değerlendirilmiştir. Tespit edilen bu kuş türlerine ait detaylı bilgiler bir tablo halinde verilmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalışma alanının kuşlar için üreme, barınma, beslenme alanı ve önemli kuş göç yolları üzerinde olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Ornithological Observations in Strandzha Mountains, Kırklareli-Dereköy

Highlights:

- Bird species in Strdzha Mountains were determined
- Migration routes and altitudes of migratory birds were determined
- Statues of birds in the region were determined

ABSTRACT:

This study was performed on Strandzha (Yıldız) Mountains along Bulgarian border including the area within the borders of Dereköy and Karadere of Kırklareli province. A total of 134 bird species were recorded during 60 days observation study carried monthly from March 2020 to February 2021. Among the recorded species, 134 (73.88%) were determined to breed in the region. 22 species were observed to migrate over and near the study region between March 2020 and June 2020 and 23 species from August 2020 to November 2020. Among the recorded species, 62 (%46.26) were native, 48 (35.82%) were summer migrant, 14 (10.44%) were winter migrant, and 10 (7.46%) were transit. Detailed information about the recorded species are presented as a data table. The results showed that the study area, lying over important bird migration routes, served as an important breeding, nesting and feeding area for birds.

Keywords:

- Bird
- Migration
- Strdzha Mountains
- Kırklareli

¹ Mustafa KAYA ([Orcid ID: 0000-0002-2106-1991](https://orcid.org/0000-0002-2106-1991)), Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Edirne, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mustafa KAYA, e-mail: mustkaya22@hotmail.com

GİRİŞ

Batı Palearktık zoocoğrafik bölge içinde yer alan Türkiye, Avrupa, Asya ve Afrika kıtaları arasındaki kuş göç yolları üzerinde köprü görevi yapması nedeniyle biyolojik çeşitlilik açısından da önemli bir konuma sahip olarak değerlendirilmektedir. Aynı zamanda coğrafi konumundan dolayı farklı iklim koşullarına ve değişik yaşama ortamlarına sahip olması nedeniyle de Skuş faunası (barınma, beslenme, üreme, göç yolu) bakımından bir öneme sahiptir (Kaya, 2015).

Türkiye'nin Avrupa kıtasında yer alan Trakya Bölgesi 23.500 km²'lik alana sahip, üç tarafı denizlerle çevrili (Ege, Marmara ve Karadeniz) ve karadan da Bulgaristan ve Yunanistan ile sınır olan bir bölgedir. Trakya Bölgesi'nin en yüksek noktası Mahyadağ'dır (1035 m) ve bölgenin ortalama yüksekliği 180 m civarında olup kuzeyde Istranca (Yıldız) Dağları güneyde ise Ganos ve Kuru Dağları ile Saroz Körfezi civarındaki tepelik alanlar Trakya Bölgesi'nin yüksek kısımlarını teşkil eder. Bu alanların ortasında Ergene ve alt Meriç Havzası bulunmakta ve bu bölgelere antropojen step karakterindedir (Dönmez, 1968; Duman, 2005; Özhatay ve ark., 2005).

Trakya vejetasyonuna bakıldığında iki orman tipi görülmektedir. Nemli ormanlar Istranca (Yıldız), Belgrat ve Ganos Dağlarında görülürken kuru ormanlar ise bunun dışında kalan bölgelerde yer alır. Nemli orman formasyonu Istranca (Yıldız) Dağları'nda doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky) ve altında yer alan orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) ile karakterizedir. Trakya Bölgesi'nde kuru ormanların baskın türü olan meşe (*Quercus* sp.) dışında Kuru Dağları ve Gelibolu Yarımadası'nda Kızılcım (*Pinus britia* Ten.) ve Kasatura civarında ise Karaçam (*Pinus nigra* J.F. Arnold) iğne yapraklı ormanları oluşturur. Bunlar içinde en önemlisi İğneada civarında yer alan longoz ormanlarıdır (Dönmez, 1968; Duman, 2005; Özhatay ve ark., 2005, Özhatay ve ark., 2011).

Bir diğer vejetasyon tipi olan maki ise özellikle Trakya'nın güneyinde baskındır. Yaklaşık 300 m yüksekliğe kadar bu formasyon görülebilir. Karadeniz kıyılarında ise maki yaprak döken elemanların karışmasıyla pseudomakiye dönüşür ve yaklaşık 100 m yüksekliğe kadar çıkar (Dönmez, 1968).

Kıyı kumulları ve alandaki su basar ormanları bölgenin en hassas ekosistemlerini oluşturmaktadırlar. Trakya Bölgesi'ndeki kıyı kumulları çevre şartlarından fazlaca etkilenmeden günümüze kadar büyük oranda korunmuş nadir kumul ekosistemlerdendir (Dönmez, 1968; Duman, 2005; Özhatay ve ark., 2005).

Trakya Bölgesi Asya, Avrupa arasında göç eden kuş türleri için önemli bir kara köprüsü oluşturmaktadır. İlkbahar aylarında ülke sınırlarına güney yönlerden giren göçmen kuşların az bir kısmı Türkiye'de kalırken önemli bir kısmı kuzeye doğru olan göç yolculuklarına devam ederek kuzeybatıda, Trakya Bölgesi üzerinden geçerek ülke sınırlarını terk ederler. Sonbahar döneminde ise bu durumun tam tersi yönde yaşanan bir göç hareketliliği görülmektedir (Erciyas, 2014).

Trakya Bölgesi, özellikle Istranca Dağları, coğrafi konumuna da bağlı olarak farklı iklimsel koşullara ve çeşitli yaşam ortamlarına sahip olması nedeniyle de kuş faunası bakımından önemli bir ekosistemdir (Kaya 2015).

Türkiye'de gözlenen kuş türlerine ilişkin Kirwan ve ark. (2008) 460, Şekercioğlu ve ark. (2011) 468, Sözen ve ark. (2015) 478 ve Trakuş (2022) 497 sayısını bildirmişlerdir.

Trakya Bölgesi'nde kuşlarla yapılan araştırmalarla ilgili birçok makale Kumerloeve (1970), Kaya (1998, 2004a, 2004b, 2010, 2012, 2015, 2016), Kaya ve Kurtonur (1989, 1994, 2000), Kaya, Yurtsever, & Kurtonur (1999), Kaya (2012), Güngör ve ark. (2020), kitap, tez ve raporlar Hasbenli (2006), Özkan (2010), Simeonov ve ark. (1990), Sözen ve Karataş (2010), Udgp (2004), Urban (2014), Yarar ve Magnin (1997), Zal (2006), YMBP (2010), Uysal (2016), Bacak ve ark. (2019), Güngör (2020) tarafından hazırlanmıştır. Ancak Istranca Dağları kuşları ile kapsamlı yapılmış araştırma çok azdır.

Yapılan araştırmalar da Istranca Dağları'nın genelini kapsamamaktadır. Kaya & Kurtonur (1994) 179 tür, Kaya (1998) 89 tür, Kaya (2012) 227 tür, Hasbenli (2006) 194 tür, Sözen (2010) 260 tür, Özkan (2010) 259 tür, Urban (2014) 266 tür ve Kaya (2015) 227 tür (İğneada-Longoz Ormanları) vermişlerdir. Bu araştırma sonuçlarına göre Trakya Bölgesinde 312 tür görülmektedir.

Bu çalışmada, Istranca Dağları'nın kuzey batısında bulunan Dereköy yöresinde ayrıntılı bir ornitolojik araştırma olmadığı için, bu bölge araştırma sahası olarak seçilmiştir. Bu araştırma ile bu bölgede görülen kuşları tespit etmek, yerli-göçmen türleri belirlemek, statülerini ortaya çıkarmak, ilkbahar ve sonbaharda göç eden türlerin uçuş yükseklikleri ve göç etme zamanlarını belirleyerek öncelikle Trakya kuş faunasının güncel durumunun ortaya çıkarılmasına ve aynı zamanda Türkiye kuş dağılım ve üreme atlasının oluşturulmasına katkı sağlamak amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırma Sahasının Tanımı ve Arazi Takvimi

Bu araştırma, Kırklareli'ne bağlı Dereköy ve Karadere Köyü sınırları içerisinde kalan ve Bulgaristan sınırında yer alan Istranca (Yıldız) Dağları'nda yapılmıştır (Şekil 1). Yapılan araştırma bir yıl süreyle aylık periyotlar halinde Mart 2020 – Şubat 2021 tarihleri arasında yapılmıştır (Mart, Nisan, Mayıs, Ağustos, Eylül ve Ekim ayları göç dönemi olması nedeniyle her ay 6'şar günlük gözlem, Haziran, Temmuz, Kasım, Aralık, Ocak ve Şubat aylarında ise her ay 4'er günlük olmak üzere toplam 60 gün gözlem gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1).



Şekil 1. Araştırma Sahası

Çizelge 1. Arazi Çalışma Takvimi

Yıllar	Aylar	Gözlem Gün Sayısı
2020	Mart	6 gün
	Nisan	6 gün
	Mayıs	6 gün
	Haziran	4 gün
	Temmuz	4 gün
	Ağustos	6 gün
	Eylül	6 gün
	Ekim	6 gün
	Kasım	4 gün
	Aralık	4 gün
2021	Ocak	4 gün
	Şubat	4gün

Kuş gözlem metodolojisi

Arazi çalışmaları süresince kuşların tespitinde ve sayımlarında nokta sayım ve hat boyu gözlem yöntemleri kullanılmıştır (Bibby, 2004). Arazi çalışmaları araştırma sahasında belirlenen 3 gözlem noktası ve 5 gözlem hattında gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Gözlemler gözlem hatlarında sabah erken

saatlerde başlamış ve gün batımına kadar devam etmiştir. Kuşların daha aktif oldukları gün doğumu ve batımında gözlemler daha yoğun bir şekilde yapılırken göç izlemeleri araştırma sahasında belirlenen üç gözlem noktasında sabit olarak gün boyu yapılmıştır. Kuşların göç sırasında uçuş yükseklikleri Bushnell Truth 4x20 Laser marka mesafe ölçer ile otomatik ölçülmüştür. Göçmen kuşların uçuş yükseklikleri, araştırma sahası ve yakın çevresinde kurulması planlanan Rüzgâr Enerji Santrallerine (RES) ön kaynak oluşturması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Kuş sayımlarında Bibby ve ark. (2000) ve Sutherland (2006)'den yararlanılmıştır.

Bu yöntemlerde kuşlara genellikle yaklaşılması zor olduğundan gözleme için dürbün ve teleskop gibi araçlardan yararlanılmaktadır. Bu amaçla, 10X10 Soligor, 10X40 Nikon Monarch, 12X42 DCF Nikon marka dürbünler, Leica Televid 82 W.25-50XWW ve 20-60X100 Konus marka teleskoplar, 400 mm. teleobjektife sahip DSLR Canon 7D fotoğraf makinası ve Aden Fx 67 Fly More Combo Drone kamera kullanılmıştır.

Kuş türlerinin teşhislerinde çeşitli kaynaklardan yararlanılmıştır (Bruun ve ark. 1990; Gooders, 1995; Heinzel ve ark. 2002; Simenov ve ark. 1990). Gözlemlerin gerçekleştirilmesinde, araştırma alanındaki tür çeşitliliği ve türlerinin habitat tercihleri dikkate alınmıştır.

Tür tespiti ve üreme çalışmaları ise araştırma alanının tamamını kapsamaktadır. Gözlemler hava koşullarına göre gün boyu yapılmaya çalışılmıştır (Uygun hava koşullarında, sabah 07.00 – 11.00 arası, öğleden sonra 14.00 – 18.00 arası).

Bu yöntemlerle; araştırma alanını kullanan kuş türleri ve tehlike kategorileri, sayıları, bulunma durumları (yaz göçmeni, kış göçmeni, yerli, ürüyor, geçit kuşu, rastlantısal gibi) tespit edilmesi planlanmıştır.

Kuşların statüleri IUCN, CITES, BERN, MAK 'a göre değerlendirilmiştir (Iucn, 2022; Cites, 2014; Bern, 2016; Mak, 2022).

Çalışma süresince üreme dönemi boyunca gerçekleştirilen gözlemlerde, Avrupa Kuş Sayımları Konseyi (EBCC) tarafından kabul gören ve 16 maddeden oluşan üreme kodları listesi indirgenerek kullanılmıştır (Hagemeijer ve Blair, 1997) (Çizelge 2).

Hagemeijer ve Blair (1997)'den yararlanılarak araştırma sahası ve çevresindeki türlerin üreme davranışları da incelenmiş ve çift oluşturma, kur yapma, besin taşıma, genç birey besleme gibi çeşitli davranış modelleriyle ve direk yuva gözlemleriyle üreme kayıtları alınmıştır.

Çizelge 2. Araştırma Sahasında Üreyen Kuş Türlerinin Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Üreme Kodları Listesi (Hagemeijer& Blair (1997)'den uyarlanmıştır)

0	0	Gözlemci türün gözlem yerinde ve zamanında üremediğine emin	Üreme Kanıtı yok
1	1	Tür, üreme döneminde olası üreme habitatında gözlendi	Üreme mümkün
2	1	Üreme döneminde öten (ya da üreme çağrıları duyulan) erkek(ler) gözlendi	Üreme mümkün
3		Üreme döneminde uygun üreme habitatında bir çift gözlendi	
4		En az iki farklı günde territoryum belirleme davranışları ile belirgin bir territoryum gözlendi	
5		Çiftleşme ve kur davranışı	
6	2	Muhtemel bir yuvayı ziyaret	Üreme olası
7		Erişkinlerin heyecanlı davranışları ve endişeli ötüşleri	
8		Erişkinlerde kuluçkaya yatma açıklığı belirlendiği (elde gözlem)	
9		Yuva yapımı ya da yuva deliği açma	
10		Erişkin ilgiyi kendine çekiyor ya da yaralı taklidi yapıyor	
11		Kullanılan yuva ya da yumurta kabukları bulundu (çalışma süresinde yapılmış ya da kullanılmakta olan)	
12		Yeni uçmaya başlamış (ötlücü kuşlar gibi) ya da tüysüz yavru (tavukgiller ve şu kuşları gibi)	
13	3	Kullanılan Yuva Olduğunu Gösteren: Yuvaya giren ya da çıkan bireyler (içerişi görülmeyen yüksekteki yuvalar ve yuva delikleri de dahil) ya da kuluçkaya yatan birey gözlendi	Üreme kesin
14		Erişkin yuvadan atık taşıyor ya da yuvaya yemek getiriyor	
15		Yumurta içeren yuva	
16		İçinde yavru olan ya da yavru sesi gelen yuva	
99		Üreme kodu kontrol edilmedi	

BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma sahasında Mart 2020 – Şubat 2021 tarihleri arasında yapılan 60 günlük gözlemler sonucu 134 kuş türü tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Bu kuş türlerinin Türkçe ve Latince adları, koruma statüleri ve bölgesel statüleri gözlem sonuçlarına göre Çizelge 3’de topluca verilmiştir. Gözlemler sonucu tespit edilen 134 kuş türünden 22’sinin Mart 2020 – Haziran 2020 tarihleri arasında (Çizelge 4), 23’ünün ise Ağustos 2020 – Kasım 2020 tarihleri arasında yapılan gözlemler sonucu araştırma sahası ve yakın çevresi üzerinden göç ettikleri tespit edilmiştir (Çizelge 5). Tespit edilen 134 kuş türünden 99 (%73.88) türün araştırma sahasında üredığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 3. Araştırma Sahası ve Yakın Çevresinde Yayılış Gösteren Kuş Türlerine Ait Envanter Bilgileri, Korunma Statüleri ve Bölgesel Statüleri

SIRA NO	LATİNCE TÜR ADI	TÜRKÇE TÜR ADI	BERN	CITES	IUCN	MAK	GD	Ü	NBD	E	İG	SG	TÜR Kodu
1.	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-	X	X	1340
2.	<i>Ciconia nigra</i>	Karaleylek	EK-II	EK-2	LC		YG	3	Y	-	X	X	1310
3.	<i>Platalea leucorodia</i>	Kaşıkçıl	EK-II	EK-2	LC		T	0	N	-	X		1440
4.	<i>Pernis apivorus</i>	Arı Şahini	EK-II	EK-2	LC		YG	2	O	-	X	X	2310
5.	<i>Haliaeetus albicilla</i>	Akkuyruklu Kartal	EK-II	EK-1	LC		Y	0	N	-	-		2430
6.	<i>Milvus migrans</i>	Karaçaylak	EK-II	EK-2	LC		T	0	O	-	-		2380
7.	<i>Milvus milvus</i>	Kızıl Çaylak	EK-II	-	LC		T	0	O	-			2390
8.	<i>Circus macrourus</i>	Bozkır Delicesi	EK-II	-	LC		T	0	N				2620
9.	<i>Accipiter nisus</i>	Atmaca	EK-II	EK-2	LC		Y	2	Y	-	X	X	2690
10.	<i>Accipiter gentilis</i>	Çakırkuşu	EK-II	EK-2	LC		Y	1	Y	-	X	X	2670
11.	<i>Accipiter brevipes</i>	Yaz Atmacası	EK-II	EK-2	LC		YG	1	Y	-			2730
12.	<i>Circus gallicus</i>	Yılan Kartalı	EK-II	EK-2	LC		YG	0	O	-	X	X	2560
13.	<i>Circus cyaneus</i>	Gökçe Delice	EK-II	EK-2	LC		KG	0	O	-	X	X	2610
14.	<i>Circus pygargus</i>	Çayır Delicesi	EK-II	EK-2	LC		T	0	O	-			2630
15.	<i>Buteo buteo</i>	Şahin	EK-II	EK-2	LC		Y	3	Y	-	X	X	2870
16.	<i>Buteo rufinus</i>	Kızıl Şahin	EK-II	EK-2	LC		Y	2	Y	-		X	2880
17.	<i>Clanga pomarina</i>	Küçük Orman Kartalı	EK-II	EK-2	LC		YG	0	O	-	X	X	2920
18.	<i>Clanga clanga</i>	Büyük Orman Kartalı	EK-II	EK-2	VU		T	0	N	-	X	X	2930
19.	<i>Hieraetus pennatus</i>	Küçük Kartal	EK-II	EK-2	LC		T	0	N	-	X	X	
20.	<i>Aquila heliaca</i>	Şah Kartal	EK-II	EK-1	LC		Y	2	O	-			2950
21.	<i>Aquila chrysaetos</i>	Kaya Kartalı	EK-II	EK-2	LC		Y	0	N	-			2960
22.	<i>Hieraetus pennatus</i>	Küçük Kartal	EK-II	EK-2	LC		T	0	O	-			2980
23.	<i>Pandion haliaetus</i>	Balık Kartalı	EK-II	EK-2	LC		YG	0	N	-			3010
24.	<i>Falco naumanni</i>	Küçük Kerkenez	EK-II	-	LC		YG	0	N	-			3030
25.	<i>Falco tinnunculus</i>	Kerkenez	EK-II	EK-2	LC		Y	2	Y	-	X	X	3040
26.	<i>Falco vespertinus</i>	Ala Doğan	EK-II	EK-1	VU		T	0	N			X	3070
27.	<i>Falco peregrinus</i>	Gökdoğan	EK-II	EK-1	LC		Y	0	O	-	X	X	3200
28.	<i>Falco subbuteo</i>	Delice Doğan	EK-II	EK-2	LC		YG	2	O	-	X	X	3100
29.	<i>Coturnix coturnix</i>	Bıldırcın	EK-III	-	NT	EK-2	YG	0	Y	-			3700
30.	<i>Scolopax rusticola</i>	Çulluk	EK-II	-	LC	EK-2	KG	0	O	-			5290
31.	<i>Columba livia</i>	Şehir Güvercini	EK-III	-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			6650
32.	<i>Columba oenas</i>	Gökçe Güvercin		-	LC	EK-1	Y	1	O	-			6680
33.	<i>Columba palumbus</i>	Tahtalı		-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			6700
34.	<i>Streptopelia decaocto</i>	Kumru	EK-III	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			6840
35.	<i>Streptopelia turtur</i>	Üveyik	EK-III	-	VU	EK-2	YG	3	Y	-	X	X	6870
36.	<i>Cuculus canorus</i>	Gugukkuşu	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			7240
37.	<i>Bubo bubo</i>	Puhu	EK-II	EK-2	LC		Y	3	N	-			7440
38.	<i>Asio otus</i>	Kulaklı Orman Baykuşu	EK-II	EK-2	LC		Y	3	O	-			7670
39.	<i>Athena noctua</i>	Kukumav	EK-II	EK-2	LC		Y	3	Y	-			7570
40.	<i>Strix aluco</i>	Alaca Baykuş	EK-II	EK-2	LC		Y	2	N	-			7610
41.	<i>Caprimulgus europaeus</i>	Çobanaldatan	EK-II	-	LC		YG	2	Y	-			7780
42.	<i>Apus apus</i>	Ebabil	EK-III	-	NT		YG	3	Y	-	X	X	7950
43.	<i>Tachymarptis melba</i>	Akkarınlı Ebabil	EK-II	-	LC		YG	2	Y	-			7980
44.	<i>Merops apiaster</i>	Arikuşu	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-	X	X	8400
45.	<i>Coracias garrulus</i>	Gökuzgun	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			8410
46.	<i>Upupa epops</i>	İbibik	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			8460

Istranca (Yıldız) Dağları, Kırklareli / Dereköy Bölgesinde Ornitolojik Gözlemler

SIRA NO	LATİNCE TÜR ADI	TÜRKÇE TÜR ADI	BERN	CITES	IUCN	MAK	GD	Ü	NBD	E	İG	SG	TÜR Kodu
47	<i>Picus canus</i>	Küçük Yeşil Ağaçkakan	EK-II		LC		Y	2	Y				8550
48	<i>Picus viridis</i>	Yeşil Ağaçkakan	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			8560
49	<i>Dryocopus martius</i>	Kara Ağaçkakan	EK-II	-	LC		Y	3	N	-			8630
50	<i>Dendrocopos major</i>	Orman Ağaçkakanı	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			8760
51	<i>Dendrocopos syriacus</i>	Alaca Ağaçkakan	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			8780
52	<i>Dendrocopos medius</i>	Ortanca Ağaçkakan	EK-II	-	LC		Y	3	N	-			8830
53	<i>Dryobates minor</i>	Küçük Ağaçkakan	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			8870
54	<i>Galerida cristata</i>	Tepeli Toygar	EK-III	-	LC	EK-1	Y	1	Y	-			9720
55	<i>Lullula arborea</i>	Orman Toygarı	EK-III	-	LC	EK-1	YG	3	Y	-			9740
56	<i>Alauda arvensis</i>	Tarla Kuşu	EK-III	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			9760
57	<i>Riparia riparia</i>	Kum kırlangıcı	EK-III	-	LC		YG	0	O	-		X	9810
58	<i>Hirundo rustica</i>	Kır Kırlangıcı	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-	X	X	9920
59	<i>Cecropis daurica</i>	Kızıl Kırlangıç	EK-II	-	LC		YG	3	O	-	X	X	9950
60	<i>Delichon urbicum</i>	Ev Kırlangıcı	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-	X	X	10010
61	<i>Anthus campestris</i>	Kır İncirkuşu	EK-II	-	LC		YG	1	O	-			10050
62	<i>Anthus trivialis</i>	Ağaç İncirkuşu	EK-II	-	LC		YG	0	O	-			10090
63	<i>Anthus pratensis</i>	Çayır İncirkuşu	EK-II	-	LC		KG	0	O	-			10110
64	<i>Anthus spinoletta</i>	Dağ İncirkuşu	EK-II	-	LC		KG	0	O	-			10140
65	<i>Motacilla flava</i>	Sarı Kuyruksallayan	EK-II	-	LC		Y	1	Y	-			10170
66	<i>Motacilla cinerea</i>	Dağ Kuyruksallayanı	EK-II	-	LC		Y	1	O	-			10190
67	<i>Motacilla alba</i>	Akkuyruksallayan	EK-II	-	LC		Y	1	Y	-			10200
68	<i>Troglodytes troglodytes</i>	Çit Kuşu	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			10660
69	<i>Erithacus rubecula</i>	Kızılgöğüs	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			10990
70	<i>Luscinia megarhynchos</i>	Bülbül	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			11040
71	<i>Phoenicurus ochruros</i>	Kara Kızılkuyruk	EK-II	-	LC		KG	0	Y	-			11210
72	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	Kızılkuyruk	EK-II	-	LC		YG	2	Y	-			11220
73	<i>Saxicola rubetra</i>	Çayır Taşkuşu	EK-II	-	LC		YG	0	O	-			11370
74	<i>Saxicola rubicola</i>	Taşkuşu	EK-II	-	LC		Y	2	O	-			11393
75	<i>Oenanthe oenanthe</i>	Kuyrukkakan	EK-II	-	LC	EK-2	YG	2	Y	-			11460
76	<i>Oenanthe isabellina</i>	Boz Kuyrukkakan	EK-II	-	LC	EK-2	YG	2	Y	-			11440
77	<i>Oenanthe hispanica</i>	Karakulaklı Kuyrukkakan	EK-II	-	LC		YG	2	Y	-			11480
78	<i>Turdus merula</i>	Karatavuk	EK-III	-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			11870
79	<i>Turdus pilaris</i>	Tarla Ardıcı	EK-III	-	LC	EK-1	KG	0	Y	-			11980
80	<i>Turdus philomelos</i>	Öter Ardiç	EK-III	-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			12000
81	<i>Turdus viscivorus</i>	Ökse Ardiç	EK-III	-	LC	Ek-1	KG	0	O	-			12020
82	<i>Iduna pallida</i>	Ak Mukallit	EK-II	-	LC		YG	2	O	-			12550
83	<i>Hippolais icterina</i>	Sarı Mukallit	EK-II	-	LC		YG	1	O	-			12590
84	<i>Curruca melanocephala</i>	Maskeli Ötleğen	EK-II	-	LC		Y	3	O	-			12670
85	<i>Curruca curruca</i>	Küçük Akgerdanlı Ötleğen	EK-II	-	LC		YG	1	Y	-			12740
86	<i>Curruca communis</i>	Akgerdanlı Ötleğen	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			12750
87	<i>Sylvia borin</i>	Boz Ötleğen	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			12760
88	<i>Sylvia atricapilla</i>	Karabaşlı Ötleğen	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			12770
89	<i>Phylloscopus collybita</i>	Çıvgın	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			13110
90	<i>Regulus regulus</i>	Çalikuşu	EK-II	-	LC		KG	0	N	-			13140
91	<i>Regulus ignicapilla</i>	Sürmeli Çalikuşu	EK-II	-	LC		KG	0	N	-			13150
92	<i>Muscicapa striata</i>	Benekli Sinekkapan	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			13350
93	<i>Ficedula parva</i>	Küçük Sinekkapan	EK-II	-	LC		YG	1	O	-			13430
94	<i>Ficedula semitorquata</i>	Alaca Sinekkapan	EK-II	-	LC		YG	1	O	-			13470
95	<i>Aegithalos caudatus</i>	Uzunkuyruklu Baştankara	EK-III	-	LC		Y	3	Y	-			14370
96	<i>Poecile palustris</i>	Kayın Baştankarası	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			14400
97	<i>Poecile lugubris</i>	Akyanaklı Baştankarası	EK-II	-	LC		Y	Y	N				14410
98	<i>Periparus ater</i>	Çam Baştankarası	EK-II	-	LC		KG	0	Y	-			14610
99	<i>Cyanistes caeruleus</i>	Mavi Baştankarası	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			14620
10	<i>Parus major</i>	Büyük Baştankarası	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			14640
10	<i>Sitta europaea</i>	Sıvacı	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			14790
10	<i>Certhia brachydactyla</i>	Bahçe Tırmaşığı	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			14870
10	<i>Cerhetia familiaris</i>	Orman Tırmaşığı	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			14860

Istranca (Yıldız) Dağları, Kırklareli / Dereköy Bölgesinde Ornitolojik Gözlemler

SIRA NO	LATİNCE TÜR ADI	TÜRKÇE TÜR ADI	BERN	CITES	IUCN	MAK	GD	Ü	NBD	E	İG	SG	TÜR Kodu
10	<i>Oriolus oriolus</i>	Sarıasma	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			15080
10	<i>Lanius collurio</i>	Kızılsırtlı Örümcekkuşu	EK-III	-	LC	EK-2	YG	3	Y	-			15150
10	<i>Lanius minor</i>	Karaalınlı Örümcekkuşu	EK-II	-	LC		YG	2	Y	-			15190
10	<i>Lanius senator</i>	Kızılbaşlı Örümcekkuşu	EK-II	-	NT		YG	2	Y	-			15230
10	<i>Lanius excubitor</i>	Büyük Örümcek Kuşu		-	LC		KG	0	O	-			15200
10	<i>Lanius nubicus</i>	Maskeli Örümcek Kuşu	EK-III	-	LC		YG	1	O	-			15240
11	<i>Garrulus glandarius</i>	Kestane Kargası		-	LC	EK-2	Y	3	O	-			15390
11	<i>Pica pica</i>	Saksağan		-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			15490
11	<i>Corvus monedula</i>	Cüce Karga		-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			15600
11	<i>Corvus frugilegus</i>	Ekin Kargası		-	VU	EK-2	Y	3	Y	-			15630
11	<i>Corvus corone</i>	Leşkargası		-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			15673
11	<i>Corvus corax</i>	Kuzgun	EK-III	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			15720
11	<i>Sturnus vulgaris</i>	Sığırcık	EK-III	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			15820
11	<i>Pastor roseus</i>	Alasığırcık	EK-II	-	LC		T	0	N	-			15840
11	<i>Passer domesticus</i>	Ev Serçesi		-	LC	EK-2	Y	3	Y	-			15910
11	<i>Passer hispaniolensis</i>	Söğüt Serçesi	EK-III	-	LC	EK-1	YG	3	Y	-			15920
12	<i>Passer montanus</i>	Ağaç Serçesi	EK-III	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			15980
12	<i>Fringilla coelebs</i>	İspinoz	EK-III	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			16360
12	<i>Fringilla montifringilla</i>	Dağ İspinozu	EK-III	-	LC	EK-1	KG	0	Y	-			16380
12	<i>Serinus serinus</i>	Küçük İskete	EK-II	-	LC		KG	0	Y	-			16400
12	<i>Chloris chloris</i>	Florya	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			16490
12	<i>Carduelis carduelis</i>	Saka	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			16530
12	<i>Spinus spinus</i>	Karabaş İskete	EK-II	-	LC		KG	0	O	-			16540
12	<i>Linaria cannabina</i>	Ketenkuşu	EK-II	-	LC		YG	1	N				16600
12	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	Kocabaş	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			17170
12	<i>Emberiza citrinella</i>	Sarı Kirazkuşu	EK-II	-	LC		Y	3	Y	-			18570
13	<i>Emberiza cirrus</i>	Bahçe Kirazkuşu	EK-III	-	LC		Y	3	Y	-			18580
13	<i>Emberiza cia</i>	Kaya Kirazkuşu	EK-II	-	LC		Y	3	O	-			18600
13	<i>Emberiza hortulana</i>	Kirazkuşu	EK-III	-	LC	EK-1	YG	3	Y	-			18660
13	<i>Emberiza melanocephala</i>	Karabaşlı Kirazkuşu	EK-II	-	LC		YG	3	Y	-			18810
13	<i>Emberiza calandra</i>	Tarla Kirazkuşu	EK-II	-	LC	EK-1	Y	3	Y	-			18820

GD: Göç Durumu (Y: Yerli, KG: Kış Göçmen, YG: Yaz Göçmeni, T: Transit), Ü: Üreme, E: Endemizm, NBD: Nispi Bolluk Derecesi (N: Nadir, O: Orta, Y: Yaygın). İG: İlkbahar Göçü, SG: Sonbahar Göçü. Tür kodları trakus.org'a göre verilmiştir.

Çizelge 4. Türlerin Statüleri

IUCN		
IUCN: Uluslararası Doğal Hayatı ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği	VU (Vulnerable) (Hassas, zarar görebilir): Vahşi yaşamda soyu tükenme tehlikesi büyük olan türler.	4
	NT (Near Threatened)	3
	LC (Least Concern) (En düşük derecede tehdit altında): Yaygın bulunan türlerdir	131
BERN		
BERN: Avrupa'nın Yaban Hayatı ve Yaşama Ortamlarını Koruma Sözleşmesi.	EK: II (Mutlak koruma altında olan türler)	100 Kuş türü
	EK: III (Koruma altında olan türler)	24 Kuş türü
	Kapsam Dışı Türler	10 Kuş türü
CITES		

Çizelge 4. Türlerin Statüleri (Devamı)

CITES: "Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme"	EK-I (Ticaretten etkilenen veya etkilenebilen ve nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya bulunan bütün türleri kapsar.	4 Kuş türü
	EK II (Halen nesilleri mutlak olarak tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olmamakla birlikte, nesillerinin devamıyla bağdaşmayan kullanımları önlemek amacıyla, örneklerinin ticareti sıkı mevzuata tabi tutulmadığı takdirde soyu tükenebilecek olan türleri kapsar.)	24 Kuş türü
MAK		
MAK: (Merkez Av Komisyonu Kararı (2022-2023 Av Dönemi)	Ek liste I: Merkez Av Komisyonunca koruma altına alınan av hayvanları:	15 Kuş türü
	Ek liste II: Merkez Av Komisyonu'na avına belirli dönemlerde izin verilen türler	16 Kuş türü
	MAK Komisyonunca kapsam dışındaki türler:	43 Kuş türü
GÖÇ DURUMU		
GÖÇ STATÜSÜ	Y (Yerli türler): Yıl boyu görülen türler.	62 Kuş türü.
	YG (Yaz Göçmeni): Mart – Eylül arası görülen türler.	48 Kuş türü.
	KG (Kış Göçmeni): Ekim – Şubat ayları arası görülen türler.	14 Kuş türü.
	T (Transit geçen türler):	10 Kuş türü.
	ÜREME	
ÜREME	0 Üreme kanıtı yok	35 Kuş türü
	1 Üreme mümkün	14 Kuş türü
	2 Üreme olası	19 Kuş türü
	3 Üreme kesin	66 Kuş türü
NBD		
NBD (Nisbi Bolluk Derecesi)	Y Bir gözlem gününde bir türe ait 1 ya da iki birey gözlenen	82 Kuş türü
	O Bir gözlem gününde bir türe ait 2 - 10 birey gözlenen türler	34 Kuş türü
	N Bir gözlem gününde bir türe ait 10'dan fazla birey gözlenen türler	18 Kuş türü

Çizelge 3 ve 4 incelendiğinde;

IUCN:(Iucn 2022) (Güncelleme: 24.08.2023, Avrupa Ölçeğinde), (Çizelge 3,4).

VU (Vulnerable) 4 (%2.98) kuş türü *Clanga clanga*, Büyük orman kartalı, *Falco vespertinus* Aladoğan ve *Streptopelia turtur*, Üveyik ve *Corvus frugilegus*, Ekin kargası bulunmaktadır.

NT (Near Threatened) 3 kuş türü (% 2.23) *Coturnix coturnix*, Bildircin, *Apus apus*, Ebabil ve *Lanius senatör*, Kızılbaşlı örümcekkuşu bu kategoriye dahildir.

LC (Least Concern): 126 (%94.02) kuş türü bu kategoriye dâhildir.

Bir tür değerlendirme dışıdır.

CITES: (Güncelleme 31.01.2021), (Çizelge 3.4).

EK I: 4 tür (%2.98)

Ek II: 24 tür (%17.91).

Kapsamda Değil: 106 kuş türü (%79.10)

BERN: (2016 yılı verilerine göre.), (Çizelge 3.4).

EK II : 100 (%74.62) kuş türü dâhildir.

EK III : 24 (%17.91) tür girmektedir.

Kapsamda Değil: 10 kuş türü.

MAK: (2020-2021 Av Dönemi), (Çizelge 3.4).

Ek liste I: 15 (%11.19) kuş türü dâhildir.

Ek liste II 16 (%11.94) kuş türü dâhildir.

MAK Komisyonunca kapsam dışındaki türler: 103 (%76.86) kuş türü.

Ü (Üreme): (Çizelge 3.4).

0: 35 kuş türü (%26.11).

1: 14 Kuş türü (%10.44)

2: 19 Kuş türü (%14.17)

3: 66 Kuş türü (%49.25)

NBD Nisbi Bollok Derecesi (Çizelge 3,4)

Y (Yaygın): 28 Kuş türü (%20.89).

O (Orta): 34 Kuş türü (%25.37).

N (Nadir): 18 Kuş türü (%13.43).

GD (Göç Durumu)₂ (Çizelge 3,4).

Y (Yerli türler): 62 (%46.26) kuş türü.

YG (Yaz Göçmeni) 48 (%35.82) kuş türü.

KG (Kış Göçmeni): 14 (%10.44) kuş türü.

T (Transit geçen türler): 10 (%7.46) kuş türü.

Araştırma sahasında Mart 2020 - Haziran 2020 tarihleri arasında yapılan 22 günlük gözlemler sonucunda 22 (%16.41) kuş türünün araştırma sahası üzerinden göç ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5’de bu kuş türlerine ait göç eden birey sayısı, uçuş yüksekliği ve göç ettiği aylar ayrıntılı olarak verilmiştir. Çizelge 5’e göre uçuş yüksekliği bakımından değerlendirildiğinde C kategorisinde 10 tür (%7.46), BC kategorisinde 11 tür (%8.20) ve AB kategorisinde de 1 tür (0.74) belirlenmiştir. Kuşların, Çizelge 5’e göre İlkbahar göçlerinde göç zamanı olarak genellikle Mart, Nisan ve Mayıs aylarını kullandıkları tespit edilmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. Araştırma Sahası ve Yakın Çevresinde Mart 2020 – Haziran 2020 Tarihleri Arasındaki Gözlemlerde Tespit Edilen Göç Eden Kuş Türlerine Ait Göç Bilgileri

SIRA NO	Latince Tür Adı	Türkçe Tür Adı	Birey Sayısı	Uçuş Yüksekliği	Uçuş Yönü	Uçuş zamanı	TÜR Kodu
1.	<i>Platalea leucordia</i>	Kaşıkçıl	11	C	G-K	5	1440
2.	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	42	C	G-K	3,4,5	1340
3.	<i>Ciconia nigra</i>	Karaleylek	5	C	G-K	4-5	1310
4.	<i>Pernis apivorus</i>	Arı Şahini	31	B-C	G-K	3,4,5,6	2310
5.	<i>Accipiter nisus</i>	Atmaca	2	B-C	G-K	4,5	2690
6.	<i>Accipiter gentilis</i>	Çakırkuşu	2	B-C	G-K	4,5	2670
7.	<i>Circaetus gallicus</i>	Yılan Kartalı	15	B-C	G-K	3,4,5	2560
8.	<i>Circus cyaneus</i>	Gökçe Delice	3	B-C	G-K	4	2610
9.	<i>Buteo buteo</i>	Şahin	38	C	G-K	3,4,5,6	2870
10.	<i>Buteo rufinus</i>	Kızıl Şahin	3	C	G-K	4	2880
11.	<i>Clanga pomarina</i>	Küçük Orman Kartalı	6	C	G-K	4	2920
12.	<i>Hieraaetus pennatus</i>	Küçük Kartal	5	C	G-K	5	2980
13.	<i>Clanga clanga</i>	Büyük Orman Kartalı	5	C	G-K	5	2930
14.	<i>Falco tinnunculus</i>	Kerkenez	6	B-C	G-K	4,5	3040
15.	<i>Falco peregrinus</i>	Gökdoğan	5	C	G-K	4,5	3200
16.	<i>Falco subbuteo</i>	Delice Doğan	6	C	G-K	5	3100
17.	<i>Streptopelia turtur</i>	Üveyik	23	A-B	G-K	4,5	6870
18.	<i>Apus apus</i>	Ebabil	39	B-C	G-K	4,5	7950
19.	<i>Merops apiaster</i>	Arıkuşu	51	B-C	G-K	4,5	8400
20.	<i>Hirundo rustica</i>	Kır Kırlangıcı	74	B-C	G-K	3,4,5	9920
21.	<i>Cecropis daurica</i>	Kızıl Kırlangıç	12	B-C	G-K	5	9950
22.	<i>Delichon urbicum</i>	Ev Kırlangıcı	66	B-C	G-K	3,4,5	10010

Birey sayısı: Gözlem süresince gözlemlenen türe ait birey sayısı. Uçuş Yüksekliği: Kuşun hangi yükseklikte göç ettiği A: A: 0-50 metre B: 50 – 150 metre, C: 150 m metre ve üstü Uçuş Zamanı. Kuşun hangi aylarda göç ettiği (rakamlar ayları temsil etmektedir). Uçuş Yönü: Kuş uçuş istikameti G: Güney, K: Kuzey.

Ağustos 2020 – Ekim 2020 tarihleri aylarında yapılan 18 günlük gözlemler sonucu 23 (%17.16) kuş türünün araştırma sahası ve yakın çevresi üzerinden göç ettiği tespit edilmiştir. Çizelge 6’ya göre uçuş yüksekliği bakımından değerlendirildiğinde A kategorisinde 3 tür (%2.23), B kategorisinde 4 tür (%2.98), C kategorisinde 10 tür (%7.46), BC kategorisinde 2 tür (%1.49) ve AB kategorisinde de 3 tür (%2.23) belirlenmiştir. Çizelge 6’ya göre Sonbahar göçlerinde genellikle Ağustos, Eylül ve Ekim aylarını kullandıkları tespit edilmiştir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Araştırma Sahası ve Yakın Çevresinde Ağustos 2020 – Ekim 2020 Tarihleri Arasındaki Gözlemlerde Tespit Edilen Göç Eden Kuş Türlerine Ait Göç Bilgileri

SIRA NO	Latince Tür Adı	Türkçe Tür Adı	Birey Sayısı	Uçuş Yüksekliği	Uçuş Yönü	Uçuş zamanı	TÜR Kodu
1.	<i>Ciconia ciconia</i>	Akleylek	4550	C	K-G	8,9	1340
2.	<i>Ciconia nigra</i>	Karaleylek	5	C	K-G	10	1310
3.	<i>Pernis apivorus</i>	Arı Şahini	376	B-C	K-G	8,9,10	2310
4.	<i>Accipiter nisus</i>	Atmaca	12	A-B	K-G	8,9,10	2690
5.	<i>Accipiter gentilis</i>	Çakırkuşu	5	B	K-G	9	2670
6.	<i>Circaetus gallicus</i>	Yılan Kartalı	8	C	K-G	9,10	2560
7.	<i>Circus cyaneus</i>	Gökçe Delice	6	B-C	K-G	9	2610
8.	<i>Buteo buteo</i>	Şahin	154	A	K-G	8,9,10	2870
9.	<i>Buteo rufinus</i>	Kızıl Şahin	15	C	K-G	9,10	2880
10.	<i>Clanga pomarina</i>	Küçük Orman Kartalı	24	C	K-G	9	2920
11.	<i>Hieraaetus pennatus</i>	Küçük Kartal	21	C	K-G	9	2980
12.	<i>Clanga clanga</i>	Büyük Orman Kartalı	12	B	K-G	9	2930
13.	<i>Falco tinnunculus</i>	Kerkenez	13	C	K-G	9	3040
14.	<i>Falco vespertinus</i>	Ala Doğan	8	C	K-G	9,10	3070
15.	<i>Falco peregrinus</i>	Gökdoğan	17	C	K-G	9	3200
16.	<i>Falco subbuteo</i>	Delice Doğan	15	C	K-G	10	3100
17.	<i>Streptopelia turtur</i>	Üveyik	22	A-B	K-G	8	6870
18.	<i>Apus apus</i>	Ebabil	140	C	K-G	9	7950
19.	<i>Merops apiaster</i>	Arıkuşu	316	B	K-G	8,9	8400
20.	<i>Riparia riparia</i>	Kum kırlangıcı	123	B	K-G	9	9810
21.	<i>Hirundo rustica</i>	Kır Kırlangıcı	507	A	K-G	9	9920
22.	<i>Cecropis daurica</i>	Kızıl Kırlangıç	135	A	K-G	8	9950
23.	<i>Delichon urbicum</i>	Ev Kırlangıcı	408	A-B	K-G	8,9	10010

Birey sayısı: Gözlem süresince gözlemlenin türe ait birey sayısı. **Uçuş Yüksekliği:** Kuşun hangi yükseklikte göç ettiği **A:** 0-50 metre **B:** 50 – 150 metre, **C:** 150 m metre ve üstü **Uçuş Zamanı.** Kuşun hangi aylarda göç ettiği (rakamlar ayları temsil etmektedir). **Uçuş Yönü:** Kuş uçuş istikameti **G:** Güney, **K:** Kuzey

Bu araştırmada tespit edilen göçmen kuşların genellikle İlkbahar döneminde özellikle gündüz yarıtcıları dağınık, düzensiz ve küçük gruplar halinde göç ettikleri görülmüştür.

Araştırma sahasında 99 türün ürediği tespit edilmiştir. Verilere göre toplamda 14 türün bölgedeki üreme durumu üreme mümkün, 19 türün bölgedeki üreme durumu üreme olası ve 66 türün de bölgedeki üreme durumu üreme kesin kategorisinde olarak kaydedilmiştir (Çizelge 2,3).

Kış aylarında (Aralık, Ocak, Şubat) yapılan gözlemlerde, özellikle ötücü kuşların sayısında bir yoğunluk gözlemlenmiştir. Birey sayıları yüksek olan ötücüler düzensiz, dağınık ve genellikle bireysel hareket eden formlardan oluşmaktadır. Kış aylarında sayısal olarak yoğunluğu oluşturan kuş türleri Büyük Baştankara, İspinoz, Karatavuk, Dağ ispinozu, Mavi baştankara, Sıvacı, Kızıl gerdan ve Tahtalı güvercin sayılabilir. Bu türlerin birey sayıları ilkbahar ve sonbahar dönemine göre en az on kat arttığı görülmüştür.

Araştırma sahasında yapılan 60 günlük gözlem sonucunda tespit edilen 134 kuş türünün (Çizelge 3) Türkçe ve Latince adları, korunma statüleri ve bölgesel statüleri gözlem sonuçlarına göre topluca verilmiştir (Çizelge 3). Tespit edilen 134 kuş türünden 99 (%73.88) tür araştırma sahasında ürediği gözlemlenmiştir.

Bugün dünyada 249 familyaya ait 10.906 kuş türü yaşamaktadır (Birdsoftheworld, 2023). Türkiye kuşları ile ilgili TRAKUŞ'un yayınladığı eserde Türkiye kuş türü sayısı 497'dir (Trakuş 2022). Kaya (2015)'e göre Trakya'da görülen kuş Sayısı 312'dir. Bizim araştırma sahamızda tespit ettiğimiz 134 kuş türü, Türkiye kuş türü sayısının %26,96'sına, Trakya kuş tür sayısının ise %42,94'üne tekabül

etmektedir. Bu sonuç çalışılan alan büyüklüğü ve habitat özelliği bakımından kıyaslandığında normal sonuç olarak kabul edilebilir.

Istranca Dağlarında yapılan bazı araştırmalara göre Kaya ve Kurtonur (1994) 179 tür, Kaya (1998) 89 tür, Kaya (2012) 227 tür, Hasbenli (2006) 194 tür, Sözen (2010) 259 tür ve Özkan (2010) 259 tür vermişlerdir. Bizim bulgularımız bu suçlarla karşılaştırıldığında farklılıklar görülmektedir. Bu farkın sebebi araştırma alanının büyüklüğü, habitat yapısı ve ekosistem çeşitliliğinin farklı olmasındandır. Bizim araştırma sahamız bu araştırmaların yapıldığı alanlara göre daha küçük ve habitat ve ekosistem çeşitliliği daha az olan bir sahadır. Örneğin Kaya (2012)'de İğneada Longoz Ormanları ve yakın çevresinde araştırma yapılmış ve bu araştırma alanında 5 adet sulak alan ormanlık alan ve tarım arazileri gibi çeşitli habitatlar bulunmaktadır. Istranca Dağlarında yapılan diğer araştırmalarda da habitat benzerliği bulunmaktadır. Bizim araştırma alanımız orman habitatı ve küçük 2b arazilerinden oluşmaktadır (Şekil 1). Bu nedenlerle de bu tür sayısı farklılığı normal kabul edilebilir düzeydedir.

Kış aylarında (Aralık, Ocak, Şubat) yapılan gözlemlerde, özellikle ötücü kuşların sayısında bir yoğunluk gözlemlenmiştir. Birey sayıları yüksek olan ötücüler düzensiz, dağınık ve genellikle bireysel hareket eden formlardan oluşmaktadır. Kış aylarında sayısal olarak yoğunluğu oluşturan kuş türleri Büyük Baştankara, İspinoz, Karatavuk, Dağ ispinozu, Mavi baştankara, Sıvacı, Kızıl gerdan ve Tahtalı güvercin sayılabilir. Bu türlerin birey sayıları İlkbahar ve Sonbahar dönemine göre en az on kat arttığı görülmüştür. Özellikle Tahtalı güvercinin birey sayısı 150-200'lük sürülere ulaşmaktadır. Bu sonuçlar Kaya ve Kurtonur (1994) 179 tür, Kaya (2012) 227 tür, Hasbenli (2006) 194 tür, Sözen (2010) 259 kıyaslandığında benzerlik göstermektedir.

IUCN kriterlerine göre araştırma sahasında görülen kuşlardan bazılarının nesilleri tehlike altındadır. VU (Vulnerable) 2(%2.98) kuş türü *Clanga clanga*, Büyük orman kartalı, *Falco vespertinus* Aladoğan, *Streptopelia turtur*, Üveyik ve *Corvus frugilegus*, Ekin kargası bulunmaktadır. NT (Near Threatened) 3 kuş türü *Coturnix coturnix*, Bildircin, *Apus apus*, Ebabil ve *Lanius senatör*, Kızılbaşlı örümcekkuşu bulunmaktadır. VU ve Nt kategorisine giren bu türlerin araştırma bölgesindeki popülasyon yoğunluk yoğunlukları ayrıntılı bir araştırmayla ortaya konmalıdır. LC (Least Concern): 126 (%94.02) kuş türü bu kategoriye dâhildir (Çizelge 3, 4).

İlkbahar döneminde araştırma sahasından göç eden türlerle ilgili Çizelge 4 incelendiğinde uçuş mesafesi bakımından C kategorisinde 10 tür (%7.46), BC kategorisinde 11 tür (%8.20) ve AB kategorisinde de 1 tür (0.74) belirlenmiştir. Sonbahar döneminde göç eden türlerle ilgili Çizelge 5'e göre uçuş yüksekliği bakımından değerlendirildiğinde A kategorisinde 3 tür (%2.23), B kategorisinde 4 tür (%2.98), C kategorisinde 10 tür (%7.46), BC kategorisinde 2 tür (%1.49) ve AB kategorisinde de 3 tür (%2.23) belirlenmiştir (Çizelge 5,6). Tespitlerimize göre araştırma sahasında 14 türbinlik bir rüzgâr enerji santrali projesi (RES) düşünülmektedir. Bu veriler yapılacak olan bu projenin planlamasında temel kaynak oluşturacaktır. Rüzgâr Enerji Santralleri (RES) ülkemiz enerji açığını kapatmada önemli rol oynamaktadır. Ancak uygun alanlara uygun sayıda yapılmalıdır. Aksi takdirde hem biyolojik çeşitlilik açısından hem de bitki ve hayvanların yaşam alanı olan ekosistem kayıpları açısından zararlı olabilir. Özellikle kuş göç yolları üzerine yapılması planlanan RES'ler yapılmadan önce kuş göçlerinin izlenmesi zorunlu olmalıdır. Bu nedenle de bu araştırma bu bölgede yapılacak RES'lere tesis öncesi bir kaynak oluşturması açısından önemlidir.

Araştırma sahasını İlkbahar döneminde göç güzergâhı olarak kullanan kuşların hepsi güney – kuzey, Sonbahar döneminde ise kuzey – güney rotasını kullanmaktadırlar. Hem İlkbahar hem de Sonbahar döneminde göç eden kuşların proje sahasından geçmektedir. Leylekler (*Ciconia ciconia*) İlkbahar döneminde göç hareketlerini daha dağınık ve seyrek (40-50-60'lı gruplar) geniş zaman aralığında araştırma sahasını kullanmalarına karşın, Sonbahar döneminde Dereköy Sınır Kapısı -

Dereköy yerleşim alanı istikametinde çok kalabalık (1.500-3.000 adet) sürüler halinde ve daha az zaman aralığında göç ettikleri gözlenmiştir.

Kuşların bölgede İlkbahar göçlerinde uçuş zamanı olarak genellikle Mart, Nisan ve Mayıs aylarını kullandıkları, Sonbahar göçlerinde ise genellikle Ağustos, Eylül ve Ekim aylarını kullandıkları tespit edilmiştir (Çizelge 5).

Araştırma sahasında, Mart 2020 - Şubat 2021 tarihleri arasında tarafımızdan yapılan 60 günlük gözlem çalışmasına göre, İlkbahar göçleri Mart başında başlamış Haziran ortalarında sonlanmıştır. Sonbahar göçleri Ağustos ortalarında başlamış Ekim sonu tamamlanmıştır. İlkbahar döneminde göç eden kuşlara ait toplam birey sayısı 450'dir. En çok bireye sahip olanlardan ilk üçü *Hirundo rustica*, Kır kırlangıcı (74 birey), *Delichon urbicum*, Ev kırlangıcı (66 birey) ve *Merops apiaster*, Arıkuşudur (51). Sonbahar döneminde ise 6892 birey sayılmıştır. İlk üç tür *Ciconia ciconia*, Leylek (4550 birey), *Hirundo rustica*, Kır kırlangıcı (507 birey) ve *Delichon urbicum*, Ev kırlangıcıdır (408 birey) (Çizelge 4).

Araştırma sahasında 99 kuş türünün ürediğinin tespit edilmesi, kuşlar için sahanın önemli bir üreme alanı olduğunu da ortaya koymaktadır. Bu nedenle araştırma sahasında daha sonra yapılacak aktiviteler planlanırken bu durum da mutlaka dikkate alınarak planlama yapılmalıdır.

Araştırma sahası ornitolojik olarak değerlendirildiğinde, hem tür sayısı bakımından hem de türlere ait birey sayısı bakımından ornitolojik öneme sahip bir bölge olarak değerlendirilebilir. Göç izlemesi sonuçlarına göre de araştırma sahasının kuş göç yolları üzerinde olduğu söylenebilir.

Daha önceki araştırmalarda (Kaya ve Kurtonur, 1994; Kaya, 1998, 2015; Hasbenli, 2006) genellikle Demirköy ve İğneada ilçe sınırları içerisinde bulunan ormanlarda yaygın olan Kara ağaçkakan (*Dryocopos martius*) ve Gri ağaçkakan (*Picus canus*) bu araştırmada araştırma alanımızda da yaygın olarak görülmesi bu türlerin dağılımları açısından çok önemli bir bulgudur. Bu kuşların dağılım alanlarının genişlediği görülmektedir.

SONUÇ

Araştırma sahası ornitolojik açıdan önemli bir ekosistem olmakla birlikte birçok çevre sorunlarıyla da karşı karşıyadır. Ekonomik öneme sahip orman olması nedeniyle gençleştirme adı altında sürekli ağaç kesimi yapılmaktadır. Bu işlemler kuşların üreme döneminde de devam etmektedir. Kesim sırasında kuşlarla birlikte birçok canlı türünün de zarar görmesine neden olmaktadır. Kesim işlemleri başta kuşlar olmak üzere birçok canlının üreme dönemi olan Mart, Nisan Ve Mayıs aylarının dışındaki zamanlarda yapılması gerekmektedir. Son zamanlarda Istranca Dağları'nda yeterli araştırmalar yapılmadan ya da eksik yapılan araştırmalar sonucuna göre tesis edilmeye çalışılan başta rüzgâr enerji santralleri olmak üzere taş ocakları ve maden arama faaliyetleri gibi aktiviteler gerek habitat kaybı açısından gerek göçmen kuşlar üzerinde bir tehdit olarak görülmektedir (Erciyas, 2014).

TEŞEKKÜR

Çalışma boyunca kuş gözlemlerinde yardımcı olan Osman Özmen YELTEKİN'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Bacak, B., Güngör, U., & Arslangünoğdu, Z. (2019). Gala Gölü Kuşları. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, I. Bölge Müdürlüğü, Edirne Şube Müdürlüğü – Edirne. ISBN: 978-605-7599-27-8. 296s.
- Bern, (2016). Avrupa'nın Yaban Hayatı ve Yaşama Ortamlarını Koruma Sözleşmesi. http://www.uhdigm.adalet.gov.tr/sozlesmeler/coktaraflioz/ak/turkce/104_tur.pdf
- Bibby, C.J., Burgess, N.D., David, A., Hill, H. A., & Mustoe, S. (2000). Bird Census Techniques. Academic Press; 2nd Edition. 302s. ISBN-13 : 978-0120958313.

- Bibby, C. J. (2004). Bird diversity survey methods. *Bird Ecology and Conservation: A handbook of techniques*, 11.
- Birdsoftheworld (2023). *Birds of the World - Cornell Lab of Ornithology*. (<https://birdsoftheworld.org>, ulaşım tarihi 25.01.2023)
- Bruun, B., Delin, H., & Svenson, L. (1990). *Der KosmosVogelführer. Die Vögel Deutschlands und Europas*. Franckh'sche Verlagshandlung, W.Keller Co., Stuttgart, 1- 319s.
- Cites, (2014). *The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Appendices I, II and III*. (<http://www.cites.org/eng/app/index.php> Erişim tarihi: 14 Eylül 214).
- Dönmez, Y. (1968). *Trakya'nın Bitki Coğrafyası*, İstanbul Üniversitesi Yayınları No:1321, Taş Matbaası, İstanbul.
- Duman, H. (2005). *İğneada Flora ve Vejetasyonu Kesin Raporu*, T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, Biyolojik Çeşitlilik ve Doğal Kaynak Yönetimi Projesi (GEF-II), Ankara.
- Erciyas, K. (2014). *Türkiye'deki Kuş Hareketliliği Haritaları Kitabı*. Orman ve Su İşleri Bakanlığı. Gökçe Ofset Matbaacılık, 218s.
- Gooders, J. (1995). *Larousse Field Guide to the Birds of Britain and Europe (Larousse Field Guides)*.
- Güngör, U. (2020). *Trakya Yarımadası'nda Kışlayan Su Kuşlarının Tür Çeşitliliğinin ve Popülasyon Değişimlerinin Araştırılması*. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü. Yüksel Lisans Tezi. 163s.
- Güngör, U., Bacak, E., & Beşkardeş, V. (2020). *Short-eared Owl (Asio flammeus)'s winter diets in northwestern Turkey (Thrace)*.
- Hagemeyer, W., Blair, M., & Loos, W. (1997). *The EBCC Atlas of European Breeding Birds: Their Distribution and Abundance (Poyser)*. Academic Press (October 14, 1997). 903s. ISBN-13 : 978-0856610912
- Hasbenli, A. (2006). *İğneada Faunası Kesin Rapor*. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, Biyolojik Çeşitlilik ve Doğal Kaynak Yönetimi Projesi, Ankara, 39 s.
- Heinzel, H., Fitter, R., & Parslow, J. (1995). *Türkiye ve Avrupa'nın Kuşları*. Kuzey Afrika ve Ortadoğu Dâhil. Doğal Hayatı Koruma Derneği. *Pocket Guide to Birds of Britain&Europe with North Africa & the Middle East*.
- Iucn, (2022). *The IUCN Red List of Threatened Species*. (<http://www.iucnredlist.org/> (04.09.2022, Avrupa ölçeğinde).
- Kaya, M., & Kurtonur, C. (1989). *Bird Species (Aves) of Edirne*. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi. 38 (3): 105-115.
- Kaya, M., & Kurtonur, C. (1994). *Bird Species (Aves) of Mert and Erikli Lakes (Kırklareli-İğneada)*. XII. Ulusal Biyoloji Kongresi Tebliğleri, Edirne 1994. Cilt IV, 252-258.
- Kaya, M., & Kurtonur, C. (2000). *The Importance of Gala Lake of Surrounds Regarding Ornitho – Fauna and Some Ecological Problems*. XV.Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Çevre ve Ekoloji Sektörünü. 5-9 Eylül 2000, Ankara.
- Kaya, M. (1998). *The Importance of Mert and Erikli Lakes (Kırklareli-İğneada) Regarding Bird Fauna and Some Ecological Problems*. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 7(27), 15-18.
- Kaya, M. (2004a). *First Record of the White-headed Duck (Oxyura leucocephala) from European Part of Turkey*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(6): 1076-1077.
- Kaya, M. (2004b). *The Importance of Meric Delta (Edirne) Regarding to Ornithofauna and Some Ecological Problems*. 1st International Eurasian Ornithology Congress, 8-11 April 2004 Antalya /Turkey.
- Kaya, M. (2010). *Yıldız Dağları Biyosfer Projesi. Fauna Başlangıç Raporu*. (European Union Support /125289/D/SER/TR).
- Kaya, M. (2012). *İğneada Longoz Ormanları (Yıldız Dağları) Milli Parkı'nda Ornitolojik Gözlemler*. 21.Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, Ege Üniv. İzmir, Türkiye
- Kaya, M. (2015). *İğneada longoz Ormanları ve Çevresinin Kuşları*. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 16(1), 31-43

- Kaya, M. (2016). A Research on Birds of Süloğlu Dam Lake and Environment (Edirne). *Trakya University Journal of Natural Sciences*. Cilt 16, Sayı 1, 1 - 7,
- Kaya, M., Yurtsever, S., & Kurtonur, C. (1999). Trakya Ornitofaunası Üzerine Araştırmalar I. *Turkish Journal of Zoology*. 23. 781-790.
- Kaya, M., Yurtsever, S., & Kurtonur, C. (1999). Investigations on the Ornitho-Fauna of Turkish Thrace I. *Turkish Journal of Zoology*, 23(7), 781-790.
- Kızılocak, D. H. (2017). Ganos Dağı (Tekirdağ) Kuş Faunasının Araştırılması. (Master's Thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Kirwan, G.M., Boyla, K.A., Castell, P., Demirci, B., Özen, M., Welch, H., & Marlow, T. (2008). The birds of Turkey: a study of the distribution, taxonomy and breeding of Turkish Birds, Christopher Helm, London, 512 pp.
- Kumerloeve, H. (1970). Zur Kenntnis der Avifauna Kleinasiens und der europäischen Türkei. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası Seri B, 35(3-4), 85-160.
- Makk, (2022). 2022-2023 Av Dönemi "Merkez Av Komisyonu" Kararı. Orman ve Su İşleri Bakanlığının 17.05.2022 tarih ve 21 no'lu kararı.
- Özhatay, F. N., Kültür, Ş., & Gürdal, B. H. (2011). Check-list of Additional Taxa to The Supplement Flora of Turkey V. *Turk J. Bot.* 35, 589-624.
- Özhatay, N., Byfield, A., & Atay, S. (2005). Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı, WWF Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı) yayını, İstanbul, 88 s.
- Özkan, K. (2010). Yıldız Dağları'nda Kuş Çeşitliliği ve Dağılımı. AGRER-Agriconsulting-Agrin, Çevre ve Orman Bakanlığı (Ankara). Yıldız Dağları Biyosfer Projesi Rapor Serisi No.6. 64 s.
- Simenov, S. D., Micev, T. M., & Nankiniv, D. N. (1990). Fauna Bulgarica. 20. Aves. Part 1. In *Aedibus Academiae Scientiarum Bulgarica*. Sofia 350 pp.
- Sözen, M., & Karataş, A. (2010). Yıldız Dağları'nın Faunası (YMBP). AGRER-Agriconsulting-Agrin Çevre ve Orman Bakanlığı (Ankara). Yıldız Dağları Biyosfer Projesi Rapor Serisi No.4, 147 s.
- Sözen, M., Erturhan, M., Boyla, K. A., Tozsin, T., ve Soydaş, M. (2015). Zonguldak kuşları. OSB.
- Sutherland, W. J. (2006). *Ecological Census Techniques*. Cambridge University Press. 446s. ISBN: 978-0521606363.
- Şekercioğlu, Ç. H., Anderson, S., Akçay, E., Bilgin, R., Can, Ö. E., Semiz, G., ... & Dalfes, H. N. (2011). Turkey's Globally Important Biodiversity in Crisis. *Biological Conservation*, 144(12), 2752-2769.
- Şirin, D., & Kızılocak, D. H. (2016). A Research on Birds of Ganos Mountain in Tekirdağ. *Tabiat ve İnsan (Nature and Man)*. 18-25.
- Trakuş, (2022). Türkiye'nin Kuşları. Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları. İstanbul. 413 sayfa. 3.Basım. ISBN: 978-625-405-476-1.
- Udgp, (2004). Gala Gölü Milli Parkı, Analitik Etüt Raporu. 561 sayfa. Doğa Koru ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Urban, (2014). Kırklareli İlinin Karasal ve İç Su Ekosistemleri Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme İşleri Sonuç Raporu. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü I. Bölge Müdürlüğü / Kırklareli Şube Müdürlüğü. 663 sayfa. Kırklareli.
- Uysal, İ. (2016). Gelibolu Yarımadası'ndaki (Çanakkale-Türkiye) Kuş Göç Rotaları'nın İncelenmesi ve Rüzgar Enerji Santralleri'nin (Res) Kuş Popülasyonları Üzerine Etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 215s.
- Yarar, M., & Magnin, G. (1997). Türkiye'nin Önemli Kuş Alanları. DHKD Yayınları, İstanbul, 313 s.
- Ymbp, (2010). Diversity and distribution of birds in the Yıldız Mountains. Report prepared on behalf of AGRER-Agriconsulting-AGRIN by Korhan Özkan for the Ministry of Environment and Forestry, Ankara. Yıldız Mountains Biosphere Project Report Series No.6.
- Zal, N. (2006). Aşağı Meriç Taşkın Ovası'nın Biyosfer Rezervi Olarak Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, yayınlanmamış doktora tezi,173s.

Atf İçin: Akyalçın, H. ve Uçan K. (2023). *Picris* L. (Asteraceae) Cinsine Ait Beş Türün Polen Morfolojisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2437-2449.

To Cite: Akyalçın, H. & Uçan K. (2023). Pollen Morphology of Five Species of *Picris* L. (Asteraceae). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2437-2449.

***Picris* L. (Asteraceae) Cinsine Ait Beş Türün Polen Morfolojisi**

Hanife AKYALÇIN^{1*}, Kadir UÇAN²

Öne Çıkanlar:

- Türkiye'de *Picris* L. cinsi polen morfolojisi ile ilgili çalışmadır
- *Picris* cinsi ait 5 türün polen morfolojisi belirlenmiştir

Anahtar Kelimeler:

- Asteraceae
- *Picris* L
- Polen morfolojisi
- Türkiye

ÖZET:

Türkiye'deki *Picris* L. cinsinin polen morfolojisi ile ilgili ayrıntılı ilk araştırma bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Işık (LM) ve elektron mikroskobu (SEM) ile *Picris* L. cinsine ait 5 tür çalışılmıştır. Cinsin polen morfolojisi ışık mikroskobu incelemelerinde radyal simetrik, monad ve izopolardır. Polenler prolat sferoidal şeklinde olup amb interhegzagonal-subtriangulardır. Ornamentasyon ekinulofattır. Elektron mikroskobu mikrograflarında yapılan incelemelerde ornamentasyon ekinulofat-perforat, *Picris cyprica* Lack. ve *Picris strigosa* Bieb. türlerinde paraboral lakunalarda tectum yüzey ornamentasyonu retikül, iki farklı lokaliteden toplanan *Picris altissima* Delile. türleri ve *Picris kotschy* Boiss. polenlerinde ise paraboral lakunadaki tectum yüzey ornamentasyonu mikroperforat olarak gözlenmiştir. Abporal lakunalarda tectum yüzeyinde gözlenen ornamentasyon tüm polenlerde psilattır. Polenlerde spinül boyları, spinül taban genişliklerinden daha uzundur. Spinüllerin uçları obtus-akut olarak sonlanmaktadır. Polenler 3 poral, 6 abporal, 6 paraboral olmak üzere 15 lakunaya sahiptir. Polenlerin elektron mikrograflarında polar bölgelerinde çökme olduğu bariz olarak gözlenmiştir.

Pollen Morphology of Five Species of *Picris* L. (Asteraceae)

Highlights:

- This is a study on pollen morphology of the genus *Picris* L. in Turkey
- The pollen morphology of 5 species belonging to the genus *Picris* L. was determined

Keywords:

- Asteraceae
- *Picris* L
- Pollen morphology
- Türkiye

ABSTRACT:

The first detailed research on the pollen morphology of the *Picris* L. genus in Turkey was carried out in this study. Light (LM) and electron microscopy (SEM) studied five species of the genus *Picris* L. The pollen morphology of the genus is radial symmetrical, monad and isopolar in light microscopy examinations. Pollens are in prolate spheroidal shape, and amb is inter-hexagonal-subtriangular. Ornamentation is echinulophate. In the examinations made in electron microscope micrographs, ornamentation is echinulophate-microperforate, and tectum surface ornamentation is reticulate in paraboral lacunae in *Picris cyprica* Lack. and *Picris strigosa* Bieb. species. In the pollen of *Picris altissima* Delile. species and *Picris kotschy* Boiss. collected from two different localities, the tectum surface ornamentation in the paraboral lacunae was observed as microperforate. The ornamentation observed on the tectum surface in abporal lacunae is psilate in all pollens. Spinule lengths in pollen are longer than spinule base widths. The ends of the spines terminate obtus-acute. Pollen has 15 lacunae, 3 poral, 6 abporal, 6 paraboral. In the electron micrographs of the pollen, it was clearly observed that there was precipitation in the polar regions.

¹ Hanife AKYALÇIN ([Orcid ID: 0000-0001-8020-6372](https://orcid.org/0000-0001-8020-6372)), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye.

² Kadir UÇAN ([Orcid ID: 0009-0004-4355-9282](https://orcid.org/0009-0004-4355-9282)), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilin Dalı, Çanakkale, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hanife AKYALÇIN, e-mail: hakyalcin@comu.edu.tr

Bu çalışma Kadir UÇAN'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

Makale 29-30 Nisan 2016 tarihlerinde Çanakkale'de düzenlenen "1.TÜB Lisansüstü Öğrenci Kongresi'nde" poster/özet metin olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Dünya üzerinde kozmopolit bir yayılış gösteren Asteraceae familyası 11.000'den fazla cins ve 20.000'den fazla tür içeren çiçekli bitkilerin en büyük familyasıdır. Özellikle çayırılık alanlarda, orman içerisindeki açıklık alanlarda ve çok dağlık bölgelerde görülen familya nemli tropikal bölgelerde ise daha az görülmektedir (Kadereit ve Jeffrey, 2007). Asteraceae familyasının en belirgin özelliği kapitulum adı verilen çiçek durumu olup hem tek yıllık hem de çok yıllık türleri bulunmaktadır (Yıldız ve Aktoklu, 2010). Türkiye florasında 9 tür ile temsil edilen *Picris* L. cinsi Asteraceae familyasında 107 numaralı cinstir (Matthews ve ark., 1975).

Picris cinsinin polen morfolojisi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bunlar Türkiye florası dışından toplanan örnekleri içeren çalışmalardır. Wang ve ark. (2018) *Picris japonica* Thunb. türüne ait poleni kanarya sarısı olarak belirterek dikenimsi ornamentasyon ve gelişiminin farklı aşamalarında farklı şekilde olduğunu belirtmişlerdir. Jafari ve Ghanbarian (2007) araştırmalarında *Picris* cinsinden sadece *Picris strigosa* Bieb. türünün polen morfolojisini ışık mikroskobu ile çalışmışlardır. Osman (2006) ise Mısır'da yetişen *Picris* cinsine ait 3 türün polenlerinin Launee tip içinde değerlendirmişlerdir. Erdtman ve ark. (1961) İskandinav Florasında bulunan 400 kadar türün polen morfolojisi ile ilgili yaptıkları çalışmalarında *Picris* cinsi polenlerinin *Helianthus* polen tipi olarak tanımlamışlar.

Türkiye'de geniş bir alanda yayılış göstermesine rağmen *Picris* cinsinin polen morfolojisi ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Türkiye'deki çalışmalar *Picris* cinsine en yakın cins olan *Leontodon* cinsi ile ilgilidir (Matthews ve ark., 1975). Konu ile ilgili İnceoğlu ve Karamustafa (1977) Ankara'daki Asteraceae familya üyesi *Leontodon* cinsi polenlerini ışık mikroskobu ile incelemişler ve *Leontodon asperrimus* (Willd.) J. Ball poleninin şekli oblat sferoidal ve polen triporat olarak tanımlanmıştır. El-Ghazaly (1982) ise *Leontodon autumnalis* L. türünün ışık ve elektron mikroskobu (taramalı ve geçirimli) ile polen duvarının ontogenezini araştırmıştır. Araştırmacı, *L. autumnalis* polenlerinin trikolporat, ekinulofat olduğunu ve tektum yapısında farklılıklar bulunduğunu belirtmiştir.

Türkiye'de *Picris* cinsi üzerine yapılmış bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, farklı bölgelerden toplanan bu cinse ait taksonlar arasındaki polen morfolojik özelliklerinin benzerlik ve farklılıklarını ortaya konulması amaçlanmış, *Picris* cinsine ait polenlerin morfolojisi ışık ve taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal Temini

Çalışmada kullanılmış olan polen örnekleri Prof. Dr. Bayram YILDIZ tarafından (Emekli öğretim üyesi) Balıkesir Üniversitesi herbaryumunda bulunan *Picris* cinsine ait beş bitki örneğinden temin edilmiştir. Elde edilen örneklerin tür isimleri, toplandığı tarih ve lokasyonlarla ilgili bilgiler Çizelge 1'de verilmiştir. Elde edilen örnekler Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu ve çalışmanın gerçekleştirildiği Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Palinoloji Laboratuvarında saklanmaktadır.

Çizelge 1. *Picris* örneklerinin lokalite bilgileri

TAKSON	TOPLANDIĞI YER	TOPLANDIĞI TARİH	TOPLAYAN KİŞİLER	TEŞHİS EDEN
<i>P. altissima</i> Delile. (A*)	C3 Antalya; Akseki-Seydişehir arası, orman açıklığı, 10-12 km.	11.06.2013	Bayram YILDIZ Berna SANÖN	Bayram YILDIZ İzmir
<i>P. altissima</i> Delile. (Ç**)	A1 Çanakkale; Çınarlı Köyü- Çanakkale Fen Lisesi lojmanları, orman açıklığı, 98 m.	18.06.2015	Sunay ALTAN	Bayram YILDIZ İzmir

Çizelge 1. *Picris* örneklerinin lokalite bilgileri (devamı)

<i>P. campylocarpa</i> Boiss. & Heldr.	C3 Antalya, Akseki-Seydişehir arası, orman açıklığı, 10-12 km arası.	11.06.2013	Bayram YILDIZ Berna SANÖN	Bayram YILDIZ İzmir
<i>P. cyprica</i> Lack.	C3 Akseki çıkışı, orman açıklığı	11.06.2013	Bayram YILDIZ Berna SANÖN	Bayram YILDIZ İzmir
<i>Picris kotschyi</i> Boiss.	C6 Osmaniye; Nur Dağı Geçidi, Orman açıklığı, 500 m.	19.05.2014	Bayram YILDIZ Berna SANÖN	Bayram YILDIZ İzmir
<i>P. strigosa</i> Bieb.	B6 Kahramanmaraş, Göksun, Yiricek köyü çevresi, step, 1300 m.	07.09.2013	Bayram YILDIZ Berna SANÖN	Bayram YILDIZ İzmir

*A:Antalya, **Ç:Çanakkale.

Yöntem

Picris cinsinin polen preparatları ışık mikroskobu (LM) için Wodehouse (1935) yöntemine göre hazırlanmış ve incelenmiştir. Polenler, bazik fuksinli gliserin-jelatin ile boyandıktan sonra (Brown, 1960; Aytuğ, 1967). Preparatlar hafifçe ısıtıldıktan sonra lamel ile kapatılmıştır. Hazır hale gelen preparatların polen ölçümleri Leica DM 2500 ışık mikroskobunda immersiyon yağı, oküler 10X, objektif 100X ile incelenmiştir. LM'de her takson için ölçümler ortalama 50 örnek üzerinden alınmış olup polenlerin ışık mikroskop fotoğrafları ise Cence 2.0 MP mikroskop kamerası ile çekilmiştir. LM 'de her takson için ölçümü yapılan özelliklerin kısaltmaları /açık adlandırmaları aşağıda alfabetik olarak sıralanmıştır: All (Abporal lakuna uzunluk), Alw (Abporal lakuna genişlik), amb (Polenin kutup görünüşündeki çap uzunluğu), E (Ekvatorial eksen), Icr1 (Kolpuslar arası sırt uzunluğu), Icsn (Kolpuslar arası sırtta spinül sayısı), Ilgl (İnterlakunal boşluklar uzunluk), Ilgw (İnterlakunal boşluklar genişlik), meso (Mezokolpium), P (Polar eksen), Pasn (Polar alan spin sayısı), Pbl1 (Paraboral lakuna boy), Pblw (Paraboral lakuna genişlik), P/E oranı, Pl (Por uzunluğu), Pl1 (Poral lakuna boy), Plw (Poral lakuna genişlik), Pw (Por çapı), Sekzin, Slbp (Spinül taban uzunluğu kutup görünüşü), Slbwe (Spinül taban genişliği ekvatorial görünüş), Sll1 (Spinül uzunluğu ekvatorial görünüşte), Sllp (Spinül uzunluğu kutuptan görünüşte).

Elektron mikrografları ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOBİLTUM)'ndeki JEOL SM 7100F taramalı elektron mikroskobu (SEM) gerçekleştirilmiştir. Elektron mikroskobu için preparatlar Asetoliz (Erdtman, 1960) yöntemine göre hazırlanmıştır. SEM fotoğrafları ölçümü ImageJ Launcher programı ile gerçekleştirilmiştir ve her polen için ortalama 20 fotoğraf üzerinden Sllp (Spinül uzunluğu kutup görünüş), Sll1 (Spinül uzunluğu ekvator görünüş), Sldp (Spinüller arası mesafe kutup görünüşü), Slde (Spinüller arası mesafe ekvator görünüşü), Slbwp (Spinül taban genişliği kutup görünüşü) ve Slbwe (Spinül taban genişliği ekvator görünüş) ölçümleri yapılmıştır.

Tüm ölçümlere ait veriler IBM SPSS Statistics 22 programında hesaplanarak ortalama (M), standart sapma (S) ve varyasyon (V) değerleri olarak verilmiştir. Polen terminolojisinde Erdtman (1943, 1960, 1969), Skvarla ve Turner (1966, 1971), Moore ve Webb (1983), Faegri ve Iverson (1992), Punt ve ark. (2007) ile Punt ve Hoen (2009) referans alınmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada incelenen *Picris* cinsine ait polenler; radyal simettrili, monad ve izopolardır. LM gözlemleri için Wodehouse yöntemi ile hazırlanan preparatlarda taksonların prolat sferoidal şeklinde apertür trikolporat, amb görünüşü ise interhegzagonal-subtriangulardır. Polenlerin ekvatoryal görünüşü ise sirküler ve ornamentasyon ekinulofattır. Polenler 3 poral, 6 abporal, 6 paraboral olmak üzere 15 lakunaya sahiptir.

Polenlerin her takson için tanımlamalarında kullanılan LM ölçümleri P ve E değerleri hariç ortalama değer olarak Çizelge 2’de verilmiştir. LM ölçümleri sonucunda polar ve ekvatorial eksen ortalama değeri sırasıyla minimum 32.1 μm ve 29.4 μm (*P. cyprica*) ve maksimum ise 36.26 μm (*P. kotschyi*) ve 33.9 μm (*P. campylocarpa*) olarak hesaplanmıştır. En kısa polar ve ekvatorial eksen değeri sırasıyla 30 μm ile 27 μm *P. cyprica* poleninde ölçülmüştür. En uzun polar eksen ise 39 μm ile *P. campylocarpa* poleninde ve en uzun ekvatorial eksen ise 37 μm *P. kotschyi* poleninde ölçülmüştür. Polenlerde por genişliği ve por uzunluğunun sırasıyla 5.56 ile 7.8 μm ve 5.34 ile 7.78 μm arasında değiştiği belirlenmiştir. Polenlerin polar alandaki ortalama spinül sayısının ise 3 ile 9 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ekvatorial ve polar bölgedeki spinül uzunluklarının minimum ortalama değerleri sırasıyla 1.65 μm ve 1.61 μm (*P. strigosa*) iken, maksimum değerleri ise 1.77 μm (*P. altissima. Ç*) ve 1.73 μm (*P. altissima. A*) olarak hesaplanmıştır. Kolpuslar arası spinül sayısı minimum 5.32 (*P. altissima. Ç*), maksimum ise 5.76 (*P. campylocarpa*)’dır. *P. cyprica* poleni kolpuslar arası sırt uzunluğunda ortalama 10.44 μm ile minimum *P. campylocarpa* poleninde ortalama 12.74 μm ile maksimum değer olarak belirlenmiştir. Polenin kutupsal görünüşteki çapı ortalama değerleri minimum 27.64 μm (*P. cyprica*) ve maksimum 30.5 μm (*P. kotschyi*) olarak hesaplanmıştır. Mezokolpium ortalama değeri ise sırasıyla minimum ve maksimum olmak üzere 17.64 μm (*P. cyprica*) ve 20.48 μm (*P. kotschyi*)’dur. Ortalama sekzin kalınlığı değerleri ise minimum 2.58 μm (*P. altissima. A*) ve maksimumu 3.04 μm (*P. kotschyi*)’dir.

Abporal ve paraboral lakuna boyu için minimum ortalama değerlerinin sırasıyla 6.64 μm ve 7.04 μm (*P. cyprica*), maksimum değerinin ise 8.78 μm (*P. campylocarpa*) ve 9.32 μm (*P. altissima. Ç*) olarak saptanmıştır. Abporal ve paraboral lakuna eni için ortalama minimum değerinin 5.84 μm ve 11.42 μm (*P. cyprica*), maksimum ortalama değerleri ise 7.58 μm ve 13.9 μm (*P. campylocarpa*)’dır. Türlerin por eni ve boyu ortalama değerleri minimum *P. cyprica* türünde sırasıyla 5.56 μm ve 5.34 μm , maksimum ise *P. campylocarpa* 7.8 μm ve *P. kotschyi* 7.78 μm ’dir. İnterlakunal boşluklar en ve boy ortalama değerleri ise sırasıyla minimum 1.16 μm (*P. cyprica*) ve 2.41 μm (*P. altissima. A*) ve maksimum değerleri ise sırasıyla 1.74 μm ve 2.79 μm (*P. kotschyi*) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 2. *Picris* cinsi örneklerinin LM değerleri

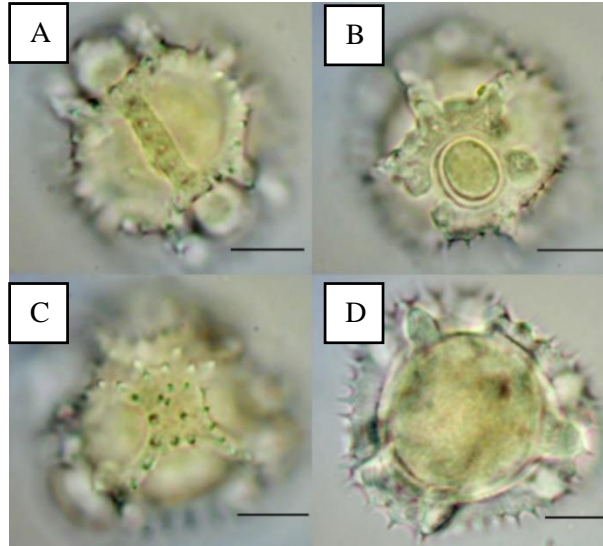
Takson	<i>P. altissima (A)</i>	<i>P. altissima (Ç)</i>	<i>P. campylocarpa</i>	<i>P. cyprica</i>	<i>P. kotschyi</i>	<i>P. strigosa</i>
Yöntem	W	W	W	W	W	W
Polen Şekli	Prolat sferoidal	Prolat sferoidal	Prolat sferoidal	Prolat sferoidal	Prolat sferoidal	Prolat sferoidal
P	M	34.3	34.8	36.1	32.1	36.26
	S	1	1.04	1.17	1.09	1.79
	Min-maks değer	32-37	32-38	34-39	30-35	31-38
E	M	31.84	32.82	33.9	29.4	33.78
	S	0.95	1.17	1.14	1.24	1.75
	Min-maks değer	30-35	30-36	32-36	27-33	29-37
Ölçümler	Meso	18.42	19.32	19.9	17.64	20.48
	Sekzin	2.58	2.83	2.99	2.91	3.04
	Amb	29.9	29.9	30.32	27.64	30.5
	Icrl	11.64	12.06	12.74	10.44	12.46
	Icsn	5.5	5.32	5.76	5.56	5.72
	Ilg	2.41	2.72	2.75	2.69	2.79
	Ilgw	1.44	1.6	1.66	1.16	1.74
	Alw	6.76	7.44	7.58	5.84	7.5
	All	7.58	8.06	8.78	6.64	8.02
	Pw	7.16	6.46	7.8	5.56	7.38
	Pl	6.34	6.46	7.64	5.34	7.78
	Pblw	12.44	13.38	13.9	11.42	13.34
	Pbll	8.86	9.32	8.9	7.04	8.72

Çizelge 2. *Picris* cinsi örneklerinin LM değerleri (devamı)

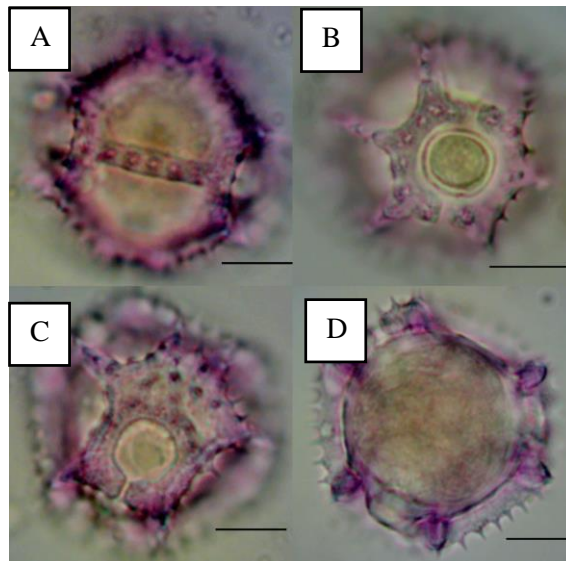
Plw	8.2	7.49	8.5	6.58	8.4	7.45
Pll	6.3	7.5	8.86	6.2	8.82	7.1
Pasn	4.56	3.56	3.74	5.88	5.38	9.0
Slle	1.73	1.77	1.72	1.67	1.74	1.65
Sllp	1.73	1.7	1.71	1.63	1.72	1.61
Slbl	0.95	1.0	0.96	0.95	0.88	1.05
Slblp	0.97	0.98	0.93	1.04	0.9	0.98
An	3	3	3	3	3	3

Min: minimum, Maks: maksimum, P (polar eksen); E (Ekvatrola eksen); Alw (Abporal lakuna genişliği); All (Abporal lakuna uzunluğu); An (Apertür sayısı); Amb (Polenin kutup bölgesindeki çapın uzunluğu); Icr1 (Kolpuslar arası sırt uzunluğu); Icsn (Kolpuslardaki spin sayısı); Ilgl (Interlakunal boşluklar uzunluğu); Ilgw (Interlakunal boşluklar genişliği); Meso (mezokolpium); Pasn (Polar alandaki spin sayısı); Pblw (Paraboral lakuna genişliği); Pbl (Paraboral lakuna uzunluğu); Pl (Por uzunluğu); Pll (Poral lakuna genişliği); Plw (Poral lakuna genişliği); Pw (Por genişliği); Slblp (Polar görünümde spin taban genişliği); Sblle (Ekvatorial görünümde spin taban uzunluğu); Sllle (Ekvatorial görünümde spin uzunluğu); Sllp (Polar görünümde spin genişliği)

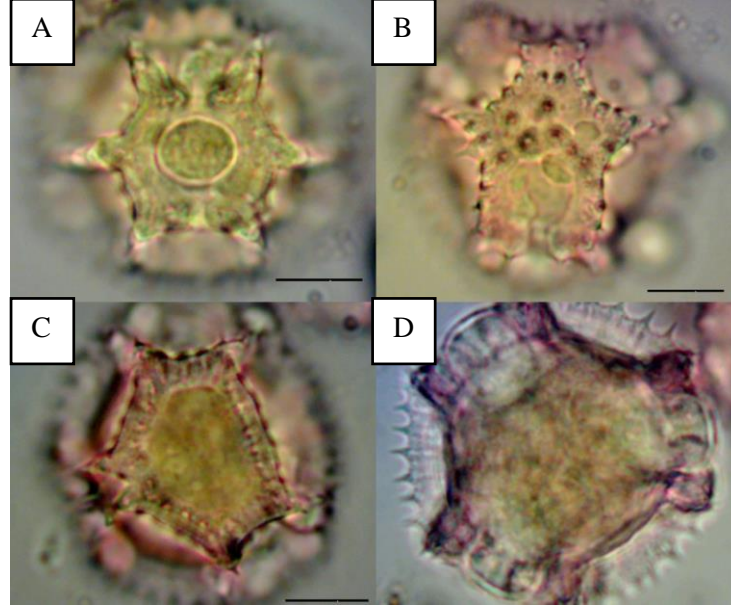
Woodhouse yöntemine göre hazırlanan preparatların Şekil 1’de *P. altissima* (A) ve Şekil 2’de *P. altissima* (Ç), Şekil 3’de *P. campylocarpa*, Şekil 4’te *P. cyprica*, Şekil 5’de *P. kotschy* ve Şekil 6’da *P. strigosa* türlerinin ışık mikroskobu fotoğrafları verilmiştir.



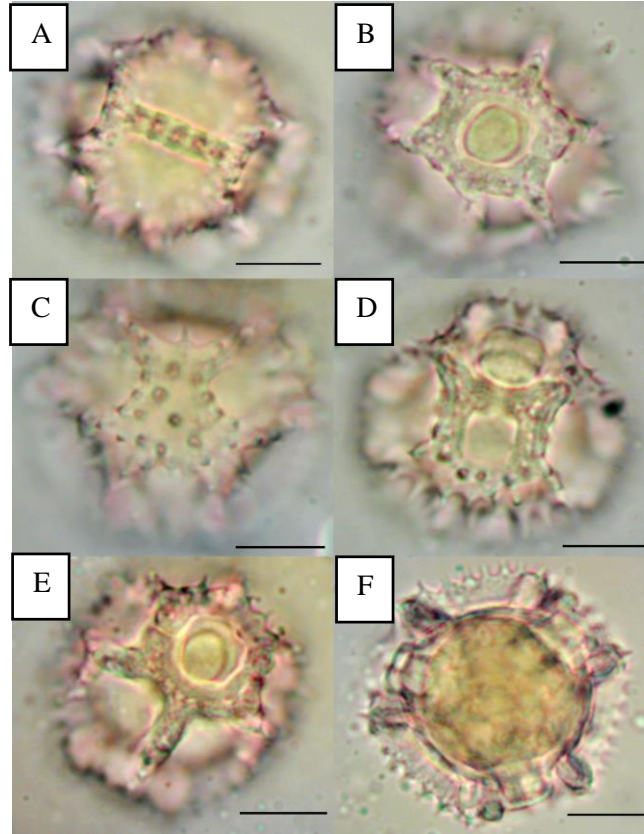
Şekil 1. *Picris altissima* (A) LM görüntüsü. A. Paraboral lakuna ve Ekvatordan görünüm, B. Poral lakuna, interlakunal ve pora ait boşluklar C. Kutupsal görünüşte spinüller, D. Ekvatorial görünüşte ekzin. Skala 10 µm



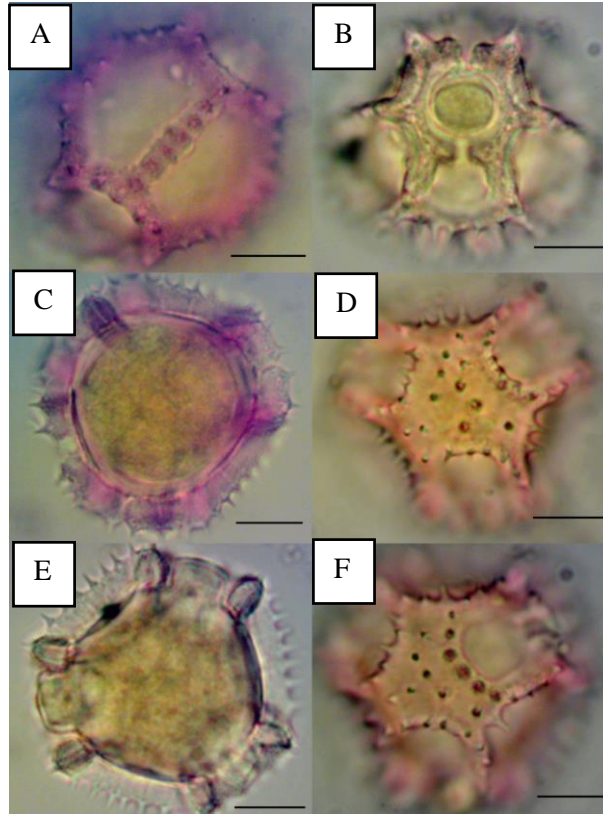
Şekil 2. *Picris altissima* (Ç) LM görüntüsü. A. Paraboral lakuna ve Ekvatordan görünüm, B. Por ve poral lakuna, C. Abporal lakuna, D. Ekvatorial görünüşte ekzin. Skala 10 µm



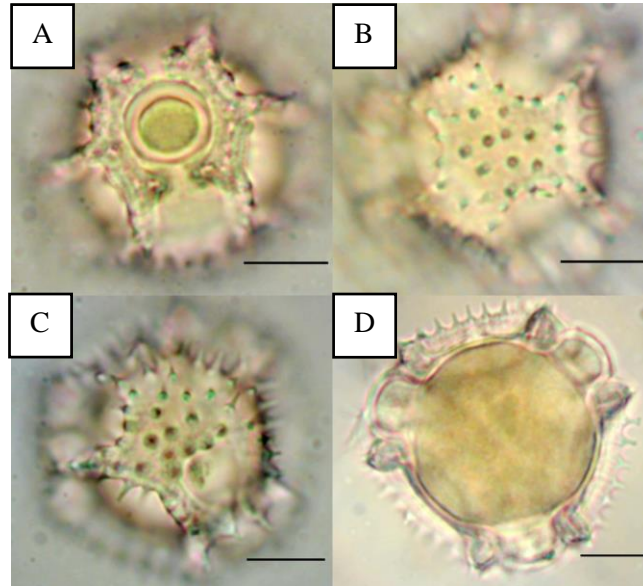
Şekil 3. *Picris campylocarpa* LM görüntüsü. A. Por ve poral lakuna, B. Kutupsal görünüş, C. Paraboral lakuna, D. Ekvatorial görünüşte ekzin. Skala 10 μ m



Şekil 4. *Picris cyprica* LM görüntüsü. A. Paraboral lakuna ve Ekvatordan görünüm, B. Por ve poral lakuna, C. Kutupsal görünüş, D. Abporal lakuna, E. Por görünüşü, F. Ekvatorial görünüşte ekzin. Skala 10 μ m



Şekil 5. *Picris kotschy* LM görüntüsü. A. Ekvatorial görünüş, B. Por ve poral lakuna, C. Ekvatorial görünüşte ekzin, D. Kutupsal görünüş, E. Ekvatorial görünüşte ekzin, F. Kutupsal görünüş ve abporal lakuna. Skala 10 µm



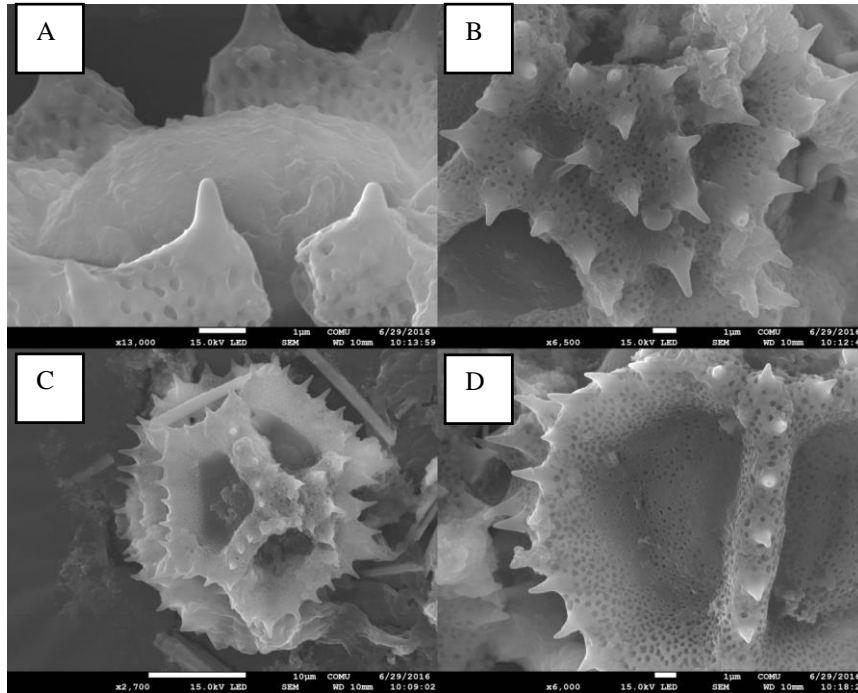
Şekil 6. *Picris strigosa* LM görüntüsü. A. Por ve poral lakuna, B. Kutupsal görünüş, C. Kutupsal görünüş, D. Ekvatorial görünüşte ekzin. Skala 10 µm

Polenlerin her takson için tanımlamalarında kullanılan SEM ölçümleri ise Çizelge 3'te verilmiştir. SEM mikrograflarındaki incelemelere göre polar bölgede bariz çöküntüler gözlemlenmiştir. Spinüller dik ya da farklı yönlerde eğimli veya kıvrık olup spinül uçları obtus-akut sonlanmaktadır. Polenlerde lakuna içlerindeki tektum yüzeyi psilat, retikülat ve mikroperforat olup ornamentasyon ekinulofattır. Abporal ve paraboral lakuna arasında bulunan spinüllerin paraboral lakunaya doğru eğimli olduğu gözlemlenmiştir.

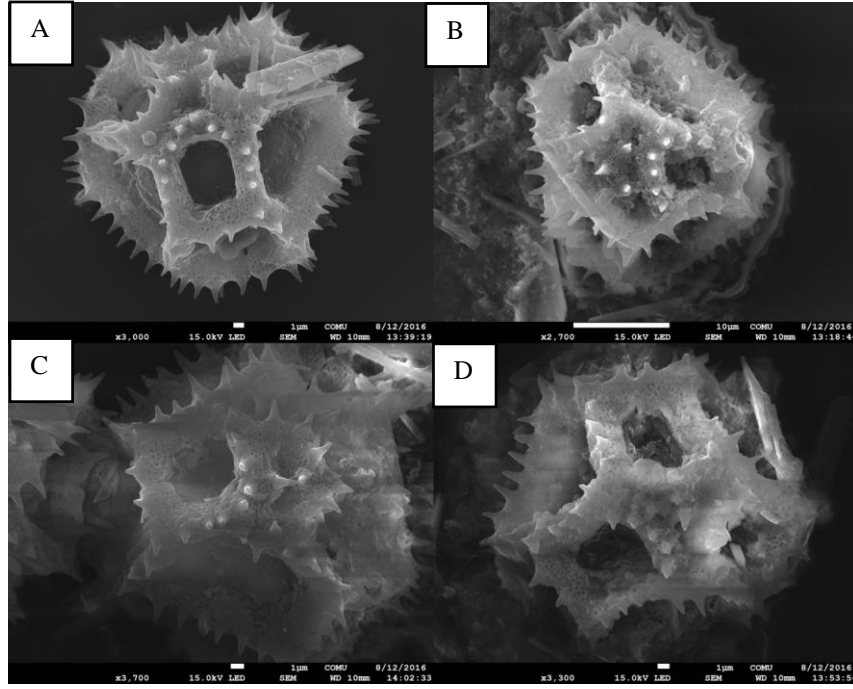
Çizelge 3. *Picris* cinsi örneklerinin SEM değerleri

Takson		<i>P. altissima</i> (A)	<i>P. altissima</i> (Ç)	<i>P. campylocarpa</i>	<i>P. cyprica</i>	<i>P. kotschy</i>	<i>P. strigosa</i>
Yöntem		E	E	E	E	E	E
Polen Şekli		Ekinulofat	Ekinulofat	Ekinulofat	Ekinulofat	Ekinulofat	Ekinulofat
Slle	M	1.43	1.34	1.4	1.55	1.51	1.62
(Ekvatorial	S	0.4	0.46	0.44	0.48	0.36	0.35
görünümde	Min-						
spin	maks	0.39-2.5	0.31-2.47	0.4-3.05	0.36-2.58	0.42-2.68	0.85-2.78
uzunluğu)	değer						
Sllp	M	1.62	1.45	1.69	1.53	1.38	1.49
(Polar	S	0.46	0.46	0.62	0.49	0.55	0.47
görünümde	Min-						
spin genişliği)	maks	0.39-2.91	0.51-2.46	0.45-3.41	0.53-2.37	0.6-2.62	0.63-2.31
değer	değer						
Slbwe	M	1.12	0.97	1.15	1.17	1.09	1.24
(Ekvatorial	S	0.29	0.25	0.29	0.3	0.24	0.29
görünümde	Min-						
spin taban	maks	0.12-2.18	0.12-1.75	0.51-2.34	0.42-2.05	0.52-1.74	0.64-2.15
genişliği)	değer						
Slbwp	M	1.24	0.99	1.28	1.19	0.95	1.26
(Polar	S	0.35	0.176	0.36	0.3	0.33	0.28
görünümde	Min-						
spin taban	maks	0.08-2.19	0.63-1.55	0.46-2.08	0.64-1.99	0.51-1.75	0.75-1.93
genişliği)	değer						
Sldc	M	1	0.86	0.87	1.05	0.91	0.86
(Ekvatorial	S	0.38	0.32	0.27	0.43	0.3	0.3
görünümde	Min-						
spinler arası	maks	0.37-2.75	0.25-2.85	0.31-2.23	0.26-2.7	0.38-2.09	0.44-2.06
mesafe)	değer						
Sldp	M	1.47	1.43	1.6	1.39	1.38	1.28
(Polar	S	0.82	0.44	0.67	0.78	0.55	0.54
görünümde	Min-						
spinler arası	maks	0.31-4.05	0.51-2.47	0.54-3.59	0.39-3.06	0.52-2.56	0.33-2.83
taban mesafe)	değer						

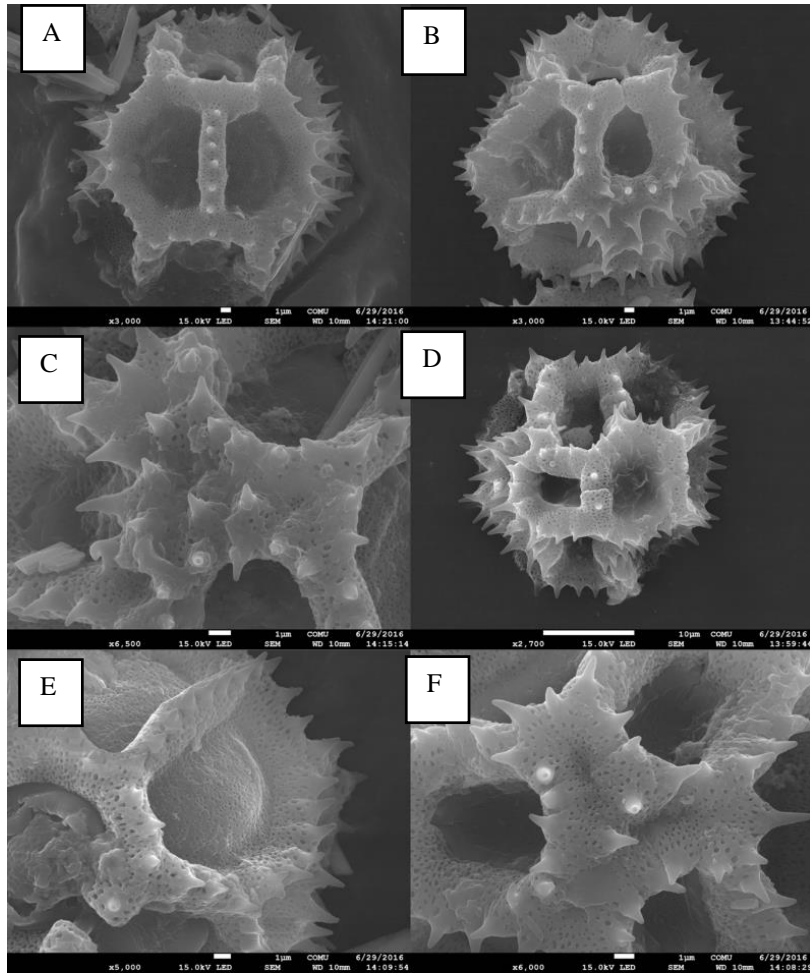
Erdtman yöntemine göre hazırlanan preparatların Şekil 7'e *P. altissima* (A) ve Şekil 8'de *P. altissima* (Ç), Şekil 9'da *P. campylocarpa*, Şekil 10'da *P. cyprica*, Şekil 11'de *P. kotschy* ve Şekil 12'de *P. strigosa* türlerinin SEM mikrografları verilmiştir.



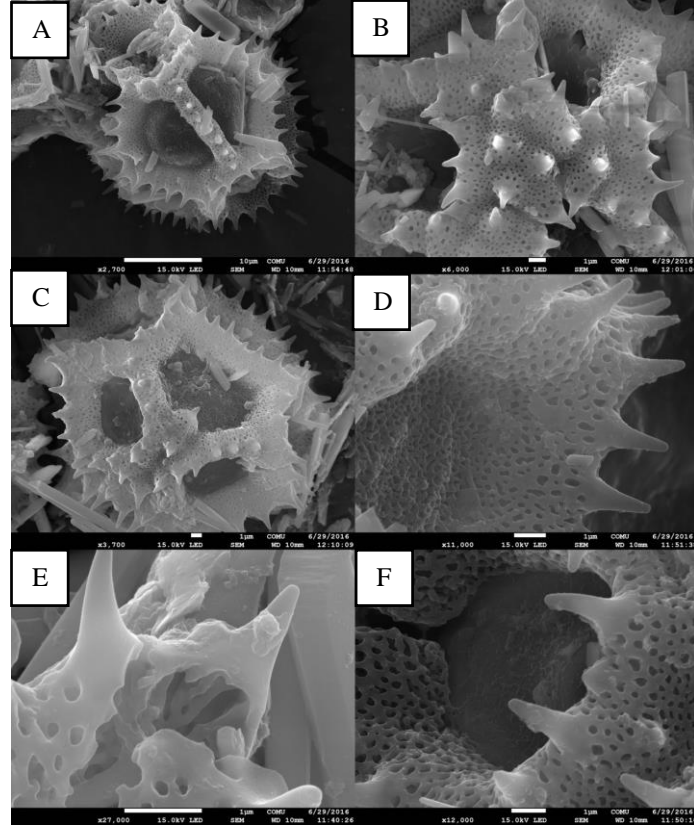
Şekil 7. *Picris altissima* (A) SEM görüntüsü A. Por ve interlakunal boşluklar görünüşü, B. Kutupsal görünüşte spinül yapısı, C. Kutupsal görünüş, D. Paraboral lakunanın görünüşü



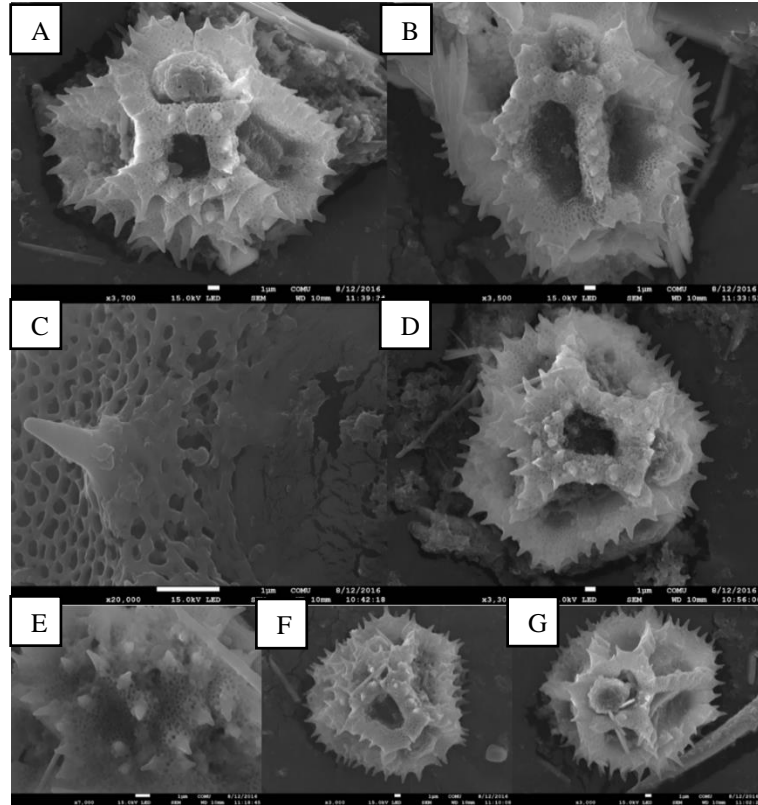
Şekil 8. *Picris altissima* (Ç) SEM görüntüsü A. Abporeal lakuna ve paraboral lakuna, B. Kutupsal görünüş, C. Kutupsal görünüş, D. Kutupsal görünüş ve abporeal lakunalar



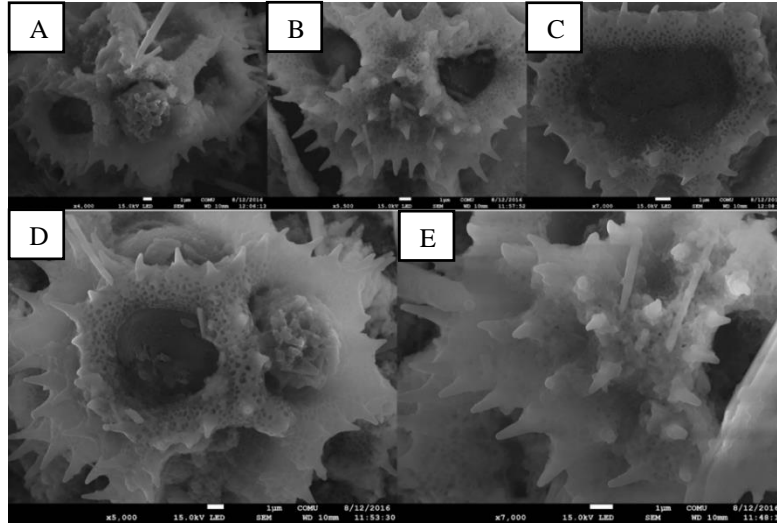
Şekil 9. *Picris campylocarpa* SEM görüntüsü A. Paraboral lakunaların görünüşü, B. Abporeal lakuna, C. Kutupsal görünüş ve spinüller, D. Ekvatorial görünüş E. Paraboral lakunaların görünüşü ve Por, F. Kutupsal görünüş.



Şekil 10. *Picris cyprica* SEM görüntüsü A. Ekvatorial görünüş ve paraboral lakuna, B. Kutupsal görünüş, C. Abporal lakuna ve paraboral lakuna, D. Spinül yapısı, E. Abporal lakunada bulunan spinler, F. Paraboral lakunadaki ornamentasyon



Şekil 11. *Picris kotschy* SEM görüntüsü A. Abporal-paraboral lakuna ve por, B. Paraboral lakunalar ve por, C. Spinül görünüşü, D. Abporal lakuna E. Kutupsal görünüş, F. Abporal lakuna, G. Ekvatorial görünüşte por, poral lakuna ve paraboral lakuna



Şekil 12. *Picris strigosa* SEM görüntüsü A. Ekvatorial görünüş ve por, B. Kutupsal görünüş ve abporal lakunalar, C. Paraboral lakuna, D. Abporal lakuna ve por E. Kutupsal görünüş.

Bu çalışma *P. altissima*, *P. campylocarpa*, *P. cyprica*, *P. kotschy* ve *P. strigosa* türlerine ait plalinolojik özellikler tanımlanmıştır. Çalışma, Türkiye’de cins ile ilgili ilk ayrıntılı araştırmadır. Dünya literatüründe de *Picris* cinsine ait polen morfolojisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Konu ile ilgili literatürde rastlanan ilk çalışma Erdtman ve ark. (1961) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, *Picris* cinsini *Helianthus* polen tipine dahil etmişler ve polen boyutlarının 40-65 x 45-70 µm, oblat sferoidal ve trikolporat olduğunu rapor etmişlerdir. Polenleri *Helianthus* polen tipine dahil edilen *Taraxacum vulgare* türünün polenlerinde ekzin spinüloz, spinler dahil 9-11 µm kalınlıkta, sekzin 7-9 µm kalınlıkta ve kutuplarda daha kalındır. Ek olarak polenler trikolporoidat, ora lalongat (3-7µm) ve sferoidal (33µm) özelliklerde olup, 5 sırt çevrili paraapertüral lakunalar ve 6 apertüral lakunalıdır. Erdtman ve ark. (1961) polenleri sadece apertür sayısı, apertür lakuna sayısı ve tipi bakımından *Helianthus* tip içerisinde sınıflandırmıştır. Fakat *Picris* cinsi spin ve sekzin kalınlıklarına açısından değerlendirildiğinde *Taraxacum vulgare* polenlerinin yer aldığı *Helianthus* tip içerisinde dahil edilmemelidir.

Osman (2006) yaptığı çalışmada *Picris* türlerini polar, ekvatorial, apertür sayısı, ornamentasyon, spin boyları, polen şekli, lakuna yapısı özelliklerine göre *Launaea* polen tip içerisinde sınıflandırmış ve *P. strigosa* türü hakkında bilgi vermiştir. Laktuka polen tipinin geniş kutup bölgesine ve belirli sayıda spinüllerinin olması nedeniyle *Launaea* polen tipinden ayrılır. Bu nedenle çalışılan beş *Picris* taksonu *Launaea* polen tipi içerisinde değerlendirilebilir. Bu çalışmada *Picris* polenlerinin prolat sferoidal olduğu belirlenirken Osman (2006) ise oblat sferoidal polen şekline sahip olduğunu ve polen boyutlarının büyük ve spin boylarının uzun olduğunu bildirmiştir. *P. strigosa* ile ilgili diğer bir çalışma Jafari ve Ghanbarian (2007) tarafından gerçekleştirilmiş ve türün polen şekli, polar ve ekvatorial eksen özelliklerini belirlemişler. Araştırmacıların belirledikleri polar ve ekvatorial eksen ile ilgili ölçümleri bu çalışmanın sonuçlarından farklı (daha uzun) olup, iki çalışmada belirlenen polen şekli benzerdir. Wang ve ark. (2018) *P. japonica* türünün polenlerinin bu çalışmadaki polen boyutlarına göre geniş bir varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar polenlerin ornamentasyonunun spin benzeri poligon gridolduğunu ifade etmişlerdir. Al-Fredan (2019) tarafından incelenen *Picris abyssinca* L. polenlerinin P ve E değerlerine ait ölçümlerin bu çalışmadaki P ve E değerlerine ait ölçüm sonuçlarından daha küçük polen şekli oblat-sferoidal ve spinler arası ornamentasyon rugulat-perforat olarak belirlemiştir. Bu özellikler bakımından bu araştırmada elde edilen sonuçlardan farklılık göstermektedir.

Picris L. cinsine filogenetik olarak yakın olan *Leontodon* L. cinsidir. İnceoğlu ve Karamustafa (1977) *Leontodon asperrimus* türü polenleri ile ilgili elde ettikleri palinolojik sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda değerlendirilen *Picris* cinsinin polenleri ile apertür yapısı ve polen şekli hariç diğer palinolojik özelliklerin benzer olduğu belirlenmiştir. Asteraceae familyası *Scorzonera* cinsi polenleri P-E değerlerinde çok geniş varyasyon göstermekte ve kendi taksonları arasında lakunal ornamentasyonunda farklılıklar mevcuttur (Türkmen ve ark., 2010; Pınar ve ark., 2016) bu nedenle *Picris* cinsinden palinolojik özellikleri oldukça farklıdır.

SONUÇ

Bu araştırma ile Asteraceae familyasına ait *Picris* cinsi polenlerinde morfolojik özellikleri Türkiye florası için ilk kez çalışılmıştır. All, Alw, Amb, E, Icrl, Ilgl, Meso, P, Pbl, Pblw, Pl, Pll, Plw ve Pw değerlerinin LM ile incelenmesi sonucunda *P. campylocarpa* ile *P. kotschy* türlerinin polenleri çalışılan türler arasında en büyük değerlere sahip olduğu belirlenirken, *P. cyprica* polenlerinin de en küçük değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Spinül sayısı *P. strigosa* poleninde çalışılan diğer türlere göre fazladır. Genel olarak tüm ölçümlerde polenler arasında çok büyük farklılıklar gözlemlenmemiştir.

Picris cinsi ile yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında polene ait boyut, şekil ve spin boyları farklılık göstermektedir. SEM görüntülerinde saptanan önemli bir farklılık da çalışılan türlerin kutup bölgeleri oldukça belirgin ve geniştir. Ayrıca kutup bölgesinde değişik sayılarda ve bariz çöküntüler mevcuttur.

Bu çalışma ileride planlanacak bu cins ve yakın türlerle ilgili yapılacak araştırmalarda temel oluşturacaktır. Sonuç olarak *Picris* cinsine ait bütün taksonların polen morfolojik özelliklerinin çalışılmayan diğer türlerle birlikte daha ayrıntılı çalışılarak karşılaştırılması sistematik alandaki araştırmalara yararlı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bitkilerin temini ve teşhisi ile ilgili Prof. Dr. Bayram YILDIZ'a teşekkür ederiz. SEM mikrografları ile ilgili olarak yardımlarından dolayı Nilay TEZEL'te teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Hanife Akyalçın: proje yönetimi, laboratuvar analizi, makale yazımı. Kadir UÇAN laboratuvar analizi, makale yazımı.

KAYNAKLAR

- Al-Fredan, M. A. (2019). Pollen Morphology of Seven Plant Species of the Asteraceae (Compositae) Family Naturally Growing in The Kingdom of Saudi Arabia. *International Journal of Current Research*, 11(4), 3227–3230. <https://doi.org/10.24941/ijcr.35183.04.2019>
- Aytuğ B., 1967. *Polen Morfolojisi ve Türkiye'nin Önemli Gymnospermleri Üzerinde Palinolojik Araştırmalar*. İstanbul, Kutulmuş: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları. 89 p.
- Brown, C. A. (1960). *Palynological Techniques*. Louisiana, Baton Rouge: Louisiana State University. 188 p.
- Matthews, V. A., Kupicha, F. K., & Parris, B. S. (1975). *Compositae (Asteraceae)* (Vol. 5). In P. H. DAVIS (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburg: Edinburg at the University Press. 890 p.
- El-Ghazaly, G. (1982). Ontogeny of pollen wall of *Leontodon autumnalis* (Hypochoeridinae, Compositae). *Grana*, 21(2), 103–113. <https://doi.org/10.1080/00173138209427686>

- Erdtman, G. (1960). The acetolysis method—a revised description. *Sven Bot Tidskr*, 54, 516–564.
- Erdtman, G. (1969). *Handbook of Palynology: Morphology, Taxonomy, Ecology. An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores*. Munksgaard, Copenhagen: Scandinavian university books. 486 p.
- Erdtman, G. (1943). *An introduction to pollen analysis*. Waltham: Chronica Botanica Company. 239 p.
- Erdtman, G., Berglund, B., ve Pragłowski, J. (1961). An Introduction to a Scandinavian Pollen Flora. *Grana Palynol.*, 2(2), 3–92. <https://doi.org/10.1080/00173136109428945>
- Fægri, K., ve Iversen, J. (1992). *Textbook of Pollen Analysis*. New York: Haffner Press. 328 p.
- İnceoğlu, Ö., ve Karamustafa, F. (1977). The Pollen Morphology of Plants in Ankara Region I. Compositae. *Ankara Üniversitesi Basımevi Fen Fakültesi Tebliğler Dergisi*, 21, 77–105. <https://kitaplar.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/62027/16313.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jafari, E., ve Ghanbarian, G. (2007). Pollen Morphological Studies on Selected Taxa of Asteraceae. *Journal of Plant Sciences*, 2(2), 195–201. <https://doi.org/10.3923/jps.2007.195.201>
- Kadereit, J. W., ve Jeffrey, C. (eds), (2007). *Flowering Plants. Eudicots: Asterales (Vol 8)*. In Kubitzki K (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants*. Verlag Berlin Germany: Springer. 62 p.
- Moore, P. D., ve Webb, J. A. (1983). *An Illustrated. Guide To Pollen Analysis*. London, UK: Hodder and Stoughton. 131 p.
- Osman, A. K. E. (2006). Pollen types of the Egyptian species of tribe Lactuceae (subfamily Cichorioideae-Compositae). *Acta Bot. Croat.*, 65 (2), 161–180. <https://hrcak.srce.hr/4789>
- Pinar, N. M., Coskuncelebi, K., Simsek, D., Okur, S., Makbul, S., ve Acar, A. (2016). Pollen morphology of *Scorzonera* (Asteraceae) in Turkey. *Phytotaxa*, 252(4), 233–262. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.252.4.1>
- Punt, W., ve Hoen, P. P. (2009). The Northwest European Pollen Flora, 70: Asteraceae—Asteroideae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 157(1-2), 22–183. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2008.12.003>
- Punt, W., Hoen, P. P., Blackmore, S., Nilsson, S., ve Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of palaeobotany and palynology*, 143(1-2), 1–81. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2006.06.008>
- Skvarla, J. J., ve Turner, B. L. (1966). Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen—a review. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 53(2), 220–256. <https://doi.org/10.2307/2394944>
- Skvarla, J. J., ve Turner, B. L. (1971). Fine structure of the pollen of *Anthemis nobilis* L. (Anthemideae-Compositae). *In Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 51, 61–62. <file:///C:/Users/COMU/Downloads/4774-Article%20Text-9724-1-10-20150205.pdf>
- Türkmen, Z., Makbul, S., Çoşkuncelebi, K., ve Beyazoğlu, O. (2010). Palynological observations on the genus *Scorzonera* L. (Asteraceae) from north-east Anatolia (Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 34(6), 495–512. <http://dx.doi.org/10.3906/bot-0909-17>
- Wang, Y., Wen, Y., ve Gao, J. (2018). Anatomy and microscopic characteristics of *Picris japonica*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28, 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.07.004>
- Wodehouse, R.P. (1935). *Pollen Grains. Their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine*. New York: Mc. Graw-Hill. 574 p.
- Yıldız, B., ve Aktoklu, E. (2010). *Bitki Sistematiği İlkın Karasal Bitkilerden bir Çeneklilere*. Ankara: Palme Yayıncılık, 396 p.

Atf İçin: Tel, A. Z., Ortaç, İ., Özuslu, E. ve İlçim, A. (2023). Anamur, Bozyazı ve Aydıncık (Mersin-Türkiye)'daki Bazı Doğal Sit Alanlarının Flora ve Genel Vejetasyon Yapısının İncelenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2450-2466.

To Cite: Tel, A. Z., Ortaç, İ., Özuslu, E. & İlçim, A. (2023). Investigation of Flora and General Vegetation Structure of Some Natural Protected Areas in Anamur, Bozyazı and Aydıncık (Mersin-Türkiye). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2450-2466.

Anamur, Bozyazı ve Aydıncık (Mersin-Türkiye)'daki Bazı Doğal Sit Alanlarının Flora ve Genel Vejetasyon Yapısının İncelenmesi

Ahmet Zafer TEL¹, İshak ORTAÇ², Ergün ÖZUSLU^{3,4*}, Ahmet İLÇİM⁵

Öne Çıkanlar:

- Alanın flora yapısı belirlendi
- Genel vejetasyon yapısı ortaya konuldu
- Endemik ve nadir türler belirlendi

Anahtar Kelimeler:

- Flora
- Vejetasyon
- Doğal sit
- Mersin
- Türkiye

ÖZET:

Bu araştırma Mersin (Türkiye) ili Anamur, Bozyazı ve Aydıncık ilçelerinde bulunan Anamur - Melleç Kaledranı, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi, Arsinoe Antik Kenti, Bozyazı Melenia ve Tekeli Bozyazı doğal sit alanlarının floristik ve genel vejetasyon yapısını belirlemek amacıyla 2014-2016 yıllarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada toplam 53 familya ve 117 cinse ait 135 takson tespit edilmiş olup toplam 221 lokalitede temsil edildiği görülmüştür. Tespit edilen bitkilerin alanlara göre dağılımı; Anamur - Melleç Kaledran 50, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi 88, Arsinoe Antik Kenti 41, Bozyazı Melenia 15, Tekeli Bozyazı'da 27 takson tespit edilmiştir. Bu araştırmada 3 adet endemik bitki taksonu tespit edilmiştir. IUCN kriterlerine göre, "nesli tehlike altında" şeklinde değerlendirilen endemik taksonlar: *Aristolochia brevibrabis* Bornm., *Muscari babachii* Eker & Koyuncu (Kritik- CR), *Onopordum boissierianum* Raab-Straube & Greuter'dir. Alanda bulunan nadir bitki türleri; *Dianthus polycladus* Boiss. ve *Panocratium maritimum* L. türleridir. Endemizm oranı 2.22'dir. Bitkilerin fitocoğrafik bölgelere göre dağılımı: 1 takson Avrupa-Sibirya (%0.70), 4 takson İran-Turan (%2.96), 26 takson Geniş Yayılışlı (%19.25), 54 takson fitocoğrafik bölgesi bilinmeyen (%40.00) ve 50 takson Akdeniz (Doğu Akdeniz dahil) (%37.03) elementi olduğu belirlenmiştir. İlgili alanların sintaksonomik karakter türleri belirtilmiştir. Çalışma alanlarının tamamında *Quercetea İlicis*, *Cisto-Micromerietea* ve *Quercetea Pubescentis* sınıflarının karakter türlerine rastlanılmış olup, sadece Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesinde diğerlerinden farklı olarak *Quercetea-Fagetea* vejetasyon sınıfına ait karakter türlerin olduğu belirlenmiştir.

Investigation of Flora and General Vegetation Structure of Some Natural Protected Areas in Anamur, Bozyazı and Aydıncık (Mersin-Türkiye)

Highlights:

- Flora structure of the area determined
- General vegetation structure revealed
- Endemic and Rare species identified

Keywords:

- Flora
- Vegetation
- Natural site
- Mersin
- Türkiye

ABSTRACT:

This research was carried out between 2014 and 2016 in order to determine the floristic and general vegetation structure of Anamur - Melleç Kaledranı, Dragon Çayı - Pullu Forest Camp and Mamure Castle, Arsinoe Ancient City, Bozyazı Melenia and Tekeli Bozyazı which is located in Anamur, Bozyazı and Aydıncık districts of Mersin (Türkiye). In this study, a total of 135 taxa belonging to 53 families and 117 genera were identified and it was seen that they were represented in a total of 221 localities. Distribution of the detected plants according to the fields; in Anamur - Melleç Kaledran 50, Dragon Çayı - Pullu Forest Camp ve Mamure Castle 88, Arsinoe Ancient City, Bozyazı Melenia 15, Tekeli Bozyazı 27 taxa were detected. In this study, tree endemic plant taxa were identified. Endemic taxa considered as "Threatened" according to IUCN criteria: *Aristolochia brevibrabis* Bornm. (Data Deficient-DD), *Muscari babachii* Eker & Koyuncu (Critically Endangered-CR), *Onopordum boissierianum* Raab-Straube & Greuter (Near Threatened-NT) were determined. Rare plant species found in the area; *Dianthus polycladus* Boiss. (Vulnerable-VU) and *Panocratium maritimum* L. (Endangered-EN). Distribution of plants by phytogeographic regions; 50 taxa were found to be the Mediterranean (37.03%), one taxon were Europe-Siberia (0.70%), four taxa were Iran-Turan (2.96%) element, 26 taxa Widespread (19.25%) and 54 taxa were unknown (40.00%). Character types of *Quercetea İlicis*, *Cisto-Micromerietea* and *Quercetea Pubescentis* classes were found in all of the study areas, and it was determined that there were character species belonging to the *Quercetea-Fagetea* vegetation class, unlike the others, only between Dragon Çayı - Pullu Forest Camp and Mamure Castle.

¹Ahmet Zafer TEL ([Orcid ID: 0000-0002-1204-3839](https://orcid.org/0000-0002-1204-3839)), Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 76000 Iğdır, Türkiye

²İshak ORTAÇ ([Orcid ID: 0000-0002-5880-8438](https://orcid.org/0000-0002-5880-8438)), Adıyaman Çocuk Evleri Sitesi Müdürlüğü, 02040 Adıyaman, Türkiye

³Ergün ÖZUSLU ([Orcid ID: 0000-0002-4480-8365](https://orcid.org/0000-0002-4480-8365)), Iğdır Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarım Bilimleri Bölümü, 76000, Iğdır, Türkiye. ⁴Gaziantep İslam Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, 27010 Gaziantep, Türkiye

⁵Ahmet İLÇİM ([Orcid ID: 0000-0001-8169-2472](https://orcid.org/0000-0001-8169-2472)), Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hatay, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ergün ÖZUSLU., e-mail: ergun.ozuslu@gibtu.edu.tr

Bu çalışma İshak ORTAÇ'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Anamur, Bozyazı ve Aydıncık ilçeleri Mersin ilinde yer alır. Akdeniz bölgesinde birçok floristik çalışma yapılmasına rağmen Mersin ilinde doğal sit alanlarının floristik ve genel vejetasyon yapısının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar çok azdır. Bu nedenle, bu çalışma doğal yapısı az tahrip görmüş araştırma alanlarının flora ve genel vejetasyon yapıları ve endemik bitkilerin IUCN tehlike kategorilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Anamur ilçesinin doğusunda Gülnar ve Bozyazı, batısında Gazipaşa (Antalya) ilçesi, kuzeyinde Ermenek'in Kazancı bucağı, güneyde ise Akdeniz ile kıyısı bulunmaktadır (Şen, 2019). Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde yer alan Mersin ilindeki doğal sit alanlarının florası çalışılmamıştır. Anamur ilçesinde Yıldıztuğay ve Küçüködük (2010a; 2010b) ve Şen (2019) tarafından floristik çalışmalar yapılmıştır. Bozyazı ilçesi Mersin'in batısında yer alır.

Alanın doğusunda Aydıncık, batısında Anamur, kuzeyinde Gülnar ve Ermenek, güneyinde ise Akdeniz bulunur. Mersin il merkezine 220 km uzaklıktadır. Aydıncık ilçesi Mersin merkeze 173 km uzaklıktadır. Bozyazı, "Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası" adlı eserde kullanılan kareleme sistemine göre C4 karesinde yer alır. Çalışma alanında maki, kaya ve çayır vejetasyonları dikkat çekmektedir. Bozyazı'da Sargin (2019) tarafından etnobotanik çalışma yapılmıştır. Mersin ilinde, Tezcan (1995), Düzenli ve ark. (1996a; 1996b), Savran ve ark. (1999), Ekim ve ark. (2000), Zeren ve İspirgil (2001), Uçar (2002), Everest ve Rauss (2004), Orcan ve ark. (2004), Aksay (2006), Dinç (2008), Yıldızbakan ve ark. (2010), Yıldıztuğay ve Küçüködük (2010a), Yıldıztuğay ve Küçüködük (2010b), Şirin (2012), Soylu (2014), Şirin ve Ertuğrul (2015), Göktürk ve Sümbül (2016), Güner (2016), Savran ve Paksoy (2016), Ortaç (2017), Sargin ve Büyükcengiz (2019), Şen (2019), Topal ve ark. (2022) tarafından floristik çalışmalar yapılmıştır. Bunlara ilave olarak yakın bölgelerdeki doğal ve kültürel sit alanlarında Tel ve Tatlı (2004), Tel (2009), Tel ve ark. (2010), Tel ve Tak (2012), Tel ve Tak (2015), Tel ve Şahin (2016), Tel ve İlçim (2016), Eğilmez ve Tel (2016), Tel ve ark. (2018), Tel ve Tak (2018), Ortaç ve Tel (2021), Tel ve ark. (2019), Tel ve ark. (2021), Tel ve ark. (2022a; 2022b), Tel ve ark. (2023) tarafından araştırmalar yapılmıştır. Türkiye florası üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Ancak, Mersin ilindeki doğal sit alanlarında floristik çalışmalar son derece sınırlı kalmıştır (Abay ve Kılıç, 2001; Akaydın ve ark., 2003; Everest ve Öztürk, 2005; Sağıroğlu ve ark., 2013; Sargin, 2015; Sargin ve ark., 2015). Dolayısıyla bu çalışma Mersin ili florasının belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

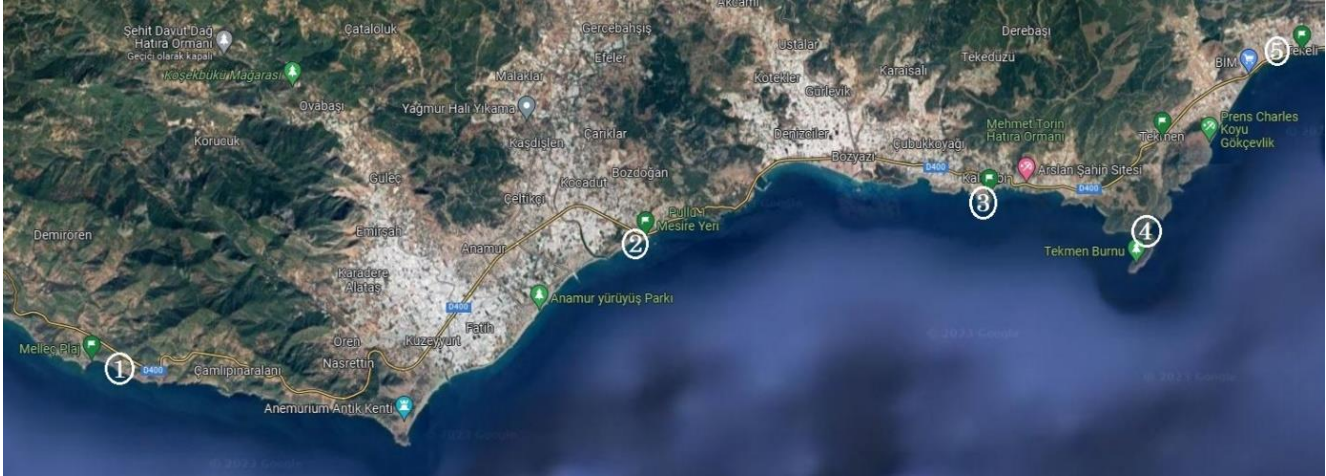
Bu araştırmada Mersin ili Anamur ve Bozyazı ilçelerinde bulunan, doğal sit özelliği taşıyan Anamur - Melleç Kaledranı, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi, Arsinoe Antik Kenti, Bozyazı Melenia ve Tekeli Bozyazı'nın floristik özellikleri ve genel vejetasyon yapısını belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırmanın materyalini 2014-2016 yılları arasında çalışma alanlarından toplanan bitkiler oluşturmaktadır. Çalışma alanlarında bazı bitkiler gözleme dayalı teşhis edilmiş, tekniğine uygun olarak kurutulmuş ve herbaryum örneği haline getirilmiştir. Bitkilerin teşhis ve tayinlerinde Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası adlı eser kullanılmıştır (Davis, 1965-1985; Davis ve ark., 1988). Tayininde zorluk yaşanan bazı bitkileri Prof. Dr. Ahmet İlçim ve Ergün Özuslu teşhis etmiştir. Bitki örnekleri Adıyaman Üniversitesi Herbaryumunda muhafaza edilmektedir. Bitki isimleri verilirken Türkiye Bitkileri Listesi (Güner ve ark., 2012), The International Plant Names Index (Anonim, 2023a) ve The Plant List (Anonim, 2023b) ve www.bizimbitkiler.org (Anonim, 2023c)'e göre geçerli olanlar kullanılmıştır. Çalışmada alanların genel vejetasyon yapısı gözlemsel olarak incelenmiş, genel bir değerlendirme yapılmış, bitki topluluklarının formasyon tipleri belirlenmiş ve dominant ve karakter türleri verilmiştir. Taksonların

IUCN tehlike kategorileri Ekim ve ark. (2000) ve Güner ve ark. (2012)'na göre belirlenmiştir. Mersin il sınırları içerisinde bulunan çalışma alanlarında tespit edilen bitkilerin toplandığı alanlar Şekil 1'de sunulmuş ve Çizelge 1'de alanların büyüklük ve koordinatları verilmiştir.

Flora listesinde ve çizelgelerde kullanılan kısaltmalar ve açıklamaları şöyledir: Akdeniz Elementi (Akd.); Doğu Akdeniz Elementi (D. Akd.); Avrupa-Sibirya Elementi (Av.-Sib.); İran-Turan Elementi (İr.-Tur.); Geniş Yayılışlı (Ge. Yay.); Endemik (End.); Tehlikede (EN); Zarar görebilir (VU); Kritik (CR); Tehdit altına girebilir (NT); En az endişe verici (LC); Veri yetersiz (DD).



Şekil 1. Çalışma alanlarının uydu haritasında yer gösterimi (Anonim, 2023d) [1] Anamur - Melleç Kaledran, [2] Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi, [3] Arsinoe Antik Kenti, [4] Bozyazı Melenia, [5] Tekeli Bozyazı

Araştırma Alanı ve Genel Özellikleri:

Araştırma alanları Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'nde Mersin ili Anamur, Bozyazı ve Aydıncık ilçelerinde bulunan ve doğal sit özelliği taşıyan Anamur - Melleç Kaledran, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi, Arsinoe Antik Kenti, Bozyazı Melenia ve Tekeli Bozyazı olmak üzere beş lokaliteyi kapsamaktadır. Çalışma alanları Türkiye florasında verilen kareleme sistemine göre C4 karesinde yer almaktadır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Araştırma sahalarının koordinat ve büyüklükleri

No	Araştırma sahası	Büyüklük (hektar)	Koordinatlar
1	Anamur - Melleç Kaledran	559.72	36° 02' 29. 46" Kuzey 32° 40' 51. 93" Doğu
2	Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi	17.44	36° 04' 55. 28" Kuzey 32° 53' 42. 72" Doğu
3	Arsinoe Antik Kenti	24.84	36° 08' 48. 08" Kuzey 33° 19' 31. 66" Doğu
4	Bozyazı Melenia	414.53	36° 06' 15. 40" Kuzey 32° 58' 24. 79" Doğu
5	Tekeli Bozyazı	181.07	36° 08' 18. 20" Kuzey 33° 08' 41. 68" Doğu

Anamur - Melleç Kaledranı

Anamur ve Melleç Kaledranı Anamur ilçesinde bulunmakta olup I. Derece doğal sit alanıdır. Alan yaklaşık 19.5 km'lik bir kıyı şeridinde sahiptir. Doğal Sit alanı toplam 559.72 hektar olup, 33.22 hektarda kuru tarım arazisi, 526.5 hektarı ise orman vasfı taşımaktadır. Araştırma sahasının rakımı 200 metredir (Ortaç, 2017).

Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi

Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi, Anamur ilçesinde yer almakta olup I. Derece Doğal Sit alanıdır. Alanda deniz kaplumbağaları açısından önemli bir kumsal bulunmaktadır. Kalenin etrafı hendek ile çevrili olup içi su ile doludur. Akdeniz'e 2.9 km uzunluğunda kıyısı vardır.

Mersin-Antalya Karayolu üzerinde bulunan alan bünyesinde Anamur Kalesi, konaklama tesisleri ve plajlar yer almaktadır. Alan 17.44 ha büyüklüğe sahip olup, 0.43 ha kuru tarım, 2.76 ha sulu tarım ve 14.25 ha kıyı kumuluna sahiptir (Ortaç, 2017).

Arsinoe Antik Kenti

Arsinoe Antik Kenti, Mersin ili Bozyazı ilçesinde bulunmaktadır. I. ve II. Derece Doğal Sit alanıdır. Deniz seviyesinden ani bir şekilde yükselen sarp bir arazi üzerinde kuruludur. Etekleri *Pinus brutia* Ten. (Kızılçam) ormanlarıyla kaplıdır. Arsinoe Antik Kenti 24.84 ha alan kaplamakta olup, 15.52 ha fundalık ve 9.32 ha alan sulu tarım arazisi olarak kullanılmaktadır (Ortaç, 2017). Çalışma alanı 0-60 metre arasında yükseltiyeye sahip Toros Kuşağı üzerindeki kıyı oluşumlarından meydana gelmiştir. Arsinoe kalıntıları, Bozyazı'nın 2 km doğusunda Çubukkoyağı Köyü sınırları içinde denize doğru burun biçiminde uzanan tepe üzerinde bulunmaktadır. Alan kültürel sit özelliği de göstermektedir. Alanın Toslaklar koyu sahil bölümü, kuzey ve kuzey batısında seralarla tarım faaliyetleri yürütülmektedir.

Bozyazı Melenia

Bozyazı Melenia, Mersin ili Bozyazı ilçesinde bulunmakta olup I. Derece doğal sit alanıdır. Deniz seviyesinden ani bir şekilde yükselen sarp bir arazi üzerinde yer alır. Bozyazı Melenia, Doğal sit alanı 414.53 ha alan kaplamakta olup, 13.65 ha alan kuru tarım ve 400.88 ha alan ise orman vasfı taşımaktadır (Ortaç, 2017). Çalışma alanının rakımı 30-150 m arasındadır.

Tekeli Bozyazı

Aydıncık ilçesinde yer almakta olup I. Derece Doğal Sit alanıdır. Alan kıyı şeridini ve seraların bulunduğu kayalık alanları kapsamaktadır. Deniz seviyesinden ani bir şekilde yükselen sarp bir arazi üzerinde kuruludur. Tekeli Bozyazı doğal sit alanı 181.07 ha alan kaplamakta olup, 21.66 ha alan fundalık ve 159.41 ha ise orman vasfı taşımaktadır (Ortaç, 2017).

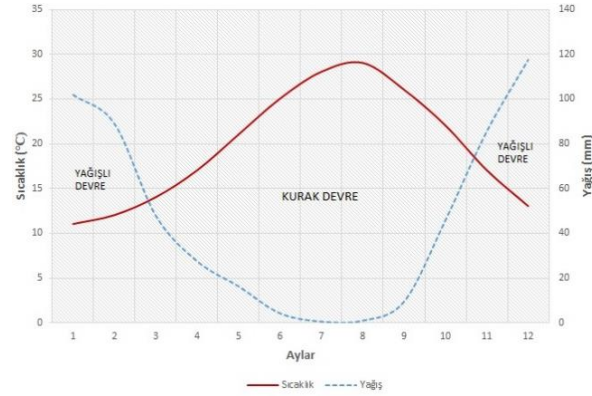
Çalışma Alanının İklim Özellikleri:

Anamur

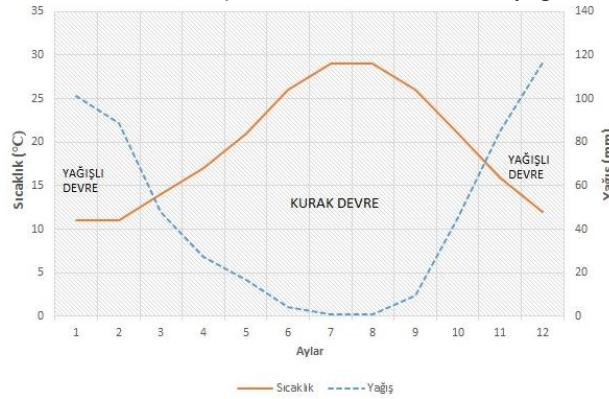
Ombro-termik iklim diyagramına göre Anamur ilçesinde kurak dönemin Mart ayının ilk haftasında başladığı görülür. Kurak devre yaklaşık sekiz ay sürer. Kasım ayının başında kurak devre son bulur. Ekim ayının sonlarında başlayan yağış Aralık ayında en yüksek seviyeye ulaşır. Günlük ortalama sıcaklık 29°C üzerindedir. Anamur bölgesindeki en sıcak ay Ağustos ayıdır. Bu ayda ortalama yüksek sıcaklık 33°C iken düşük sıcaklık 24°C'dir. Anamur ilçesinde en soğuk ay Ocak ayıdır. Bu ayda ortalama düşük sıcaklık 7°C, yüksek sıcaklık 15°C'dir. Anamur bölgesinde en az yağmurlu gün Temmuz ayında görülür. Anamur bölgesinde en yağmurlu ay Aralık olup, ortalama yağış 117 milimetre düzeyindedir (Anonim, 2023e). Anamur ilçesinin Ombro-termik iklim diyagramı Şekil 2'de verilmiştir.

Bozyazı

Bozyazı bölgesinde kurak dönem mart ayında başlar. Yazlar sıcak ve nemli, kışlar uzun, soğuk, yağışlı, rüzgârlı ve az bulutludur. Yıl içerisinde sıcaklık normalde 6 °C ile 34 °C arasında değişiklik gösterir. Kurak devre yaklaşık yedi ay sürer. Kasım ayının başında kurak devre son bulur. Ekim ayının sonlarına doğru başlayan yağış aralık ayında en yüksek değere ulaşır. Bozyazı bölgesinde ağustos en sıcak aydır. Ortalama yüksek sıcaklık 33°C, düşük sıcaklık 24°C'dir. Ortalama yağış 116 mm düzeyindedir (Anonim, 2023f). Bozyazı ilçesinin Ombro-termik iklim diyagramı Şekil 3'de verilmiştir. Bozyazı bölgesindeki en soğuk ay Ocak ayıdır. Bozyazı'da en çok yağmur aralık ayında yağarken en az yağmur temmuz ayında görülür (Anonim, 2023f).



Şekil 2. Anamur ilçesi Ombro-termik iklim diyagramı



Şekil 3. Bozyazı ilçesi Ombro-termik iklim diyagramı

BULGULAR VE TARTIŞMA

Araştırma alanlarında toplam 53 familya ve 117 cinse ait 135 takson tespit edilmiştir. Bu taksonların toplam 221 lokalitede temsil edildiği görülmüştür. Tespit edilen bitkilerin alanlara göre dağılımına bakıldığında; Anamur - Melleç Kaledran'da 50, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi'nde 88, Arsinoe Antik Kenti'nde 41, Bozyazı Melenia'da 15 ve Tekeli Bozyazı'da 27 takson tespit edilmiştir. Belirlenen bitkilerin fitocoğrafik bölgelere göre dağılımı ve oranları Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Taksonların bitki coğrafyası bölgeleri ve dağılım oranları

Bölge	Takson Sayısı	Oran (%)
Akdeniz	50	37.03
İran – Turan	4	2.96
Avrupa – Sibiryia	1	0.70
Geniş Yayılışlı	26	19.25
Bilinmeyen	54	40

Çalışma alanlarının floristik bakımdan değerlendirilmesi sonucunda, Anamur - Melleç Kaledranında 28 familya ve 44 cinse ait 50 bitki bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Bitkilerin fitocoğrafik bölgelere göre dağılımına bakıldığında 24 taksonun Akdeniz, 11 Geniş Yayılışlı, 15 fitocoğrafik bölgesi bilinmeyen olduğu, İran-Turan ve Avrupa- Sibiryia elementinin bulunmadığı belirlenmiştir. Ençok takson içeren familyalar Asteraceae 7, Brassicaceae 3, Fabaceae 5, Asparagaceae 3, Lamiaceae 1 şeklinde sıralanmaktadır (Çizelge 4). Genel vejetasyon yapısına bakıldığında; Kıyılarda kumul, çalı ve orman formasyonu gözlemlenmiştir. *Pinus brutia* Ten. baskın tür durumundadır. Kumul vejetasyon tipinin hâkim olduğu Melleç sahillerinde yaygın olarak yer alan türlerden bazıları; *Pancratium maritimum* L., *Limonium angustifolium* (Tausch) Turrill, *Medicago marina* L., *Cakile maritima* Scop., *Crithmum maritimum* L., *Eryngium maritimum* L. 'dur. Maki formasyonu içinde;

Quercus coccifera L., *Olea europaea* L., *Laurus nobilis* L., *Arbutus andrachne* L., *Cistus salvifolius* L., *Ceratonia siliqua* L., *Nerium oleander* L., *Cercis siliquastrum* L. subsp. *siliquastrum*, *Styrax officinalis* L., *Myrtus communis* L. subsp. *communis* ve *Pistacia terebinthus* L. subsp. *terebinthus* 'tur. Alanda iki adet endemik takson gözlenmiştir. Bunlar; *Muscari babachii* Eker & Koyuncu ve *Aristolochia brevibris* Bornm. türleridir.

Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesinde, 45 familya ve 79 cinse ait 88 bitki taksonu belirlenmiştir (Çizelge 3). Bu bitkilerin fitocoğrafik bölge dağılımları 28 Akdeniz, 1 Avrupa-Sibirya, 17 Geniş Yayılışlı, 4 İran-Turan elementi ve 28 bilinmeyen şeklinde dağıldığı belirlenmiştir. En çok takson içeren familyalar Asteraceae 11, Fabaceae 10, Poaceae 6, Lamiaceae 4, Anacardiaceae 3 şeklinde sıralanmaktadır (Çizelge 4). Kalenin yakın çevresinde *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. topluluğu vardır. Diğer türler, *Cakile maritima* Scop., *Salsola kali* L., *Salsola tragus* L. subsp. *tragus*, *Daucus litoralis* Sibth. & Sm., *Euphorbia peplis* L., *Echium angustifolium* Miller, *Beta* sp., *Myrtus communis* L., *Rhamnus lycioides* ssp. *oleoides* (L.) Jahandiez & Maire, *R. alaternus* L., *Ephedra campylopoda* C.A. Mey., *Pistacia lentiscus* L., *P. terebinthus* L., *Quercus coccifera* L., *Cistus* sp., *Osyris alba* L. ve *Lactuca saligna* L. taksonlarıdır. Alanda nadir bitki türlerinden olan *Pancreatum maritimum* L. (Kum zambağı) bulunmakta olup bu takson Tehlikede (EN) kategorisinde yer almaktadır (Demir & Çelikel 2020). Kum tepeleri halindeki alanın arkasında ise *Phragmites australis* ve *Arundo donax* türlerinden oluşan kamışlıklar bulunmaktadır. Kumul bitki formasyonlarının tahrip edildiği alanlarda ot vejetasyonunda *Plantago afra* L., *Echium angustifolium* Miller, *Bromus* sp. ve *Verbascum* sp. taksonları tespit edilmiştir. Alanda bir adet endemik takson gözlenmiştir: Bu tür *Onopordum boissierianum* Raab – Straube & Greuter (Tehdit altına girebilir-NT) kategorisinde yer almaktadır. Genel vejetasyon yapısına bakıldığında alanda kumul ve maki formasyonu yer aldığı belirlenmiştir.

Arsinoe Antik Kentinde 26 familya 40 cinse ait toplam 41 bitki belirlenmiştir (Çizelge 3). Fitocoğrafik bölgelerine göre dağılımı 15 Akdeniz, 1 İran-Turan, 5 Geniş Yayılışlı ve 20 bilinmeyen şeklindedir. Avrupa-Sibirya elementi bulunmamaktadır. Çalışma alanında takson sayısına göre familyalar Asteraceae 5, Fabaceae 4, Lamiaceae 3 ve Asparagaceae 3'tür (Çizelge 4). Alanda nadir bir bitki türü olan *Dianthus polycladus* Boiss. bulunmaktadır. Alanda Kızılcım, kaya ve maki orman vejetasyonu gözlemlenmiştir.

Çizelge 3. Alanda belirlenen bitkilerin takson, familya, nadir ve endemik takson sayıları

Araştırma sahası	Familya sayısı	Takson sayısı	Endemik takson sayısı	Nadir takson
1 Anamur - Melleç Kaledran	28	50	2	-
2 Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi	45	88	1	1
3 Arsinoe Antik Kenti	26	41	-	1
4 Bozyazı Melenia	11	15	-	-
5 Tekeli Bozyazı	17	27	-	-

Bozyazı Melenia'da 11 familya 14 cinse ait 15 bitki bulunduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Taksonların fitocoğrafik bölgelerine göre dağılımı 9 Akdeniz, 1 takson Geniş Yayılışlı ve 5 bilinmeyen şeklindedir. İran-Turan ve Avrupa-Sibirya elementleri bulunmamaktadır. Bu veriye göre Akdeniz kökenli bitki elemanlarının sayısının fazla olduğu görülmektedir. Familyaların en çok takson sayısına göre sıralaması Asteraceae 2, Lamiaceae 2, Cistaceae 2 ve Ericaceae 2 şeklindedir (Çizelge 4). Alanın, etekleri *Pinus brutia* (kızılcım) ormanlarıyla kaplıdır.

Tekeli Bozyazı'da 17 familya 26 cinse ait 27 takson belirlenmiştir (Çizelge 3). Bitki coğrafyası bölgelerine göre taksonların dağılımı 14 takson Akdeniz, 2 Geniş Yayılışlı ve 11 bilinmeyen olduğu

belirlenmiştir. İran-Turan ve Avrupa-Sibirya elementi bulunmamaktadır. Familyaların takson sayısına göre dağılımı Fabaceae 4, Asparagaceae 3, Asteraceae 2, Lamiaceae, 2, Cistaceae 2'dir (Çizelge 4).

Bu araştırmada 3 adet endemik bitki taksonu belirlenmiştir. IUCN kategorilerine göre "Nesli tehlike altında" olan türler: *Aristolochia brevibris* Bornm. (Veri yetersiz -DD), *Muscari babachii* Eker & Koyuncu (Kritik- CR), *Onopordum boissierianum* Raab–Straube & Greuter (Tehdit altına girebilir-NT)'dir. Alanda bulunan nadir bitki türleri; *Dianthus polycladus* Boiss. (Zarar görülebilir- VU) ve *Pancreatum maritimum* L. (Tehlikede-EN) türleridir (Çizelge 5). Endemizm oranı 2.22'dir.

Çizelge 4. Araştırma sahalarının en fazla takson içeren familyaları

Alanlar	En fazla bitki içeren familyalar		
	Familya	Takson	Oran (%)
1 Anamur - Melleç Kaledran	Asteraceae	7	14.00
	Fabaceae	5	10.00
	Brassicaceae	3	6.00
	Lamiaceae	3	6.00
	Anacardiaceae	3	6.00
	Diğerleri	29	58.00
2 Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi	Asteraceae	11	12.50
	Fabaceae	10	11.36
	Poaceae	6	76.81
	Lamiaceae	4	4.54
	Anacardiaceae	3	3.40
3 Arsinoe Antik Kenti	Diğerleri	54	61.36
	Asteraceae	5	12.19
	Fabaceae	4	9.75
	Asparagaceae	3	7.31
	Lamiaceae	3	7.31
4 Bozyazı Melenia	Diğerleri	26	63.41
	Asteraceae	2	13.33
	Lamiaceae	2	13.33
	Cistaceae	2	13.33
	Ericaceae	2	13.33
5 Tekeli Bozyazı	Diğerleri	7	46.66
	Fabaceae	4	14.81
	Lamiaceae	2	7.40
	Asteraceae	2	7.40
	Asparagaceae	2	7.40
	Cistaceae	2	7.40
Diğer	15	55.55	

Çizelge 5. Alanda bulunan endemik ve nadir bitkiler

Familya	Bitki Adı	Fitocoğrafik Bölge	Tehlike Kategorisi	Alan
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia brevibris</i> Bornm.	Akd. Elm.	DD (Endemik)	1
Asparagaceae	<i>Muscari babachii</i> Eker & Koyuncu	Akd. Elm.	CR (Endemik)	1
Asteraceae	<i>Onopordum boissierianum</i> Raab–Straube & Greuter	D. Akd. Elm.	NT (Endemik)	2
Caryophyllaceae	<i>Dianthus polycladus</i> Boiss.	D. Akd. Elm.	VU (Nadir)	3
Amaryllidaceae	<i>Pancreatum maritimum</i> L.	Akd. Elm.	EN (Nadir)	2

Çalışma sahasında takson sayısına göre en büyük familyaların Anamur - Melleç Kaledran, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı-Mamure Kalesi ve Arsinoe Antik Kentinde Asteraceae familyası olduğu tespit edilmiştir. Türkiye florasının en fazla cinse sahip familyası Poaceae olmasına rağmen (Davis, 1965-1988), bu çalışmada en yüksek sayıda takson içeren familyalar Asteraceae ve Fabaceae'dir. Bu durum araştırılan sahanın Akdeniz bölgesinde yer almasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Endemizm oranları bakımından çalışma alanı ile yakın çevresinde yapılmış floristik çalışmalar karşılaştırıldığında, en yüksek endemizm oranının %18.60 ile Tel ve ark. (2018) tarafından Kahramanmaraş'ta yapılan çalışmada, en düşüğün ise %1.30 ile Tel ve ark. (2022a) tarafından Adana'da yapılan çalışmada olduğu görülmüştür. Tel ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada endemizm oranının yüksek olması bölgenin farklı rakım, habitat ve mikro iklim çeşitliliğine sahip olmasıyla açıklanabilir. Tel ve ark. (2022a) tarafından yapılan çalışmada endemizm oranının en düşük oranda çıkması ise alanda sulak alan habitatları bulunması ile açıklanabilir. Çalışma alanı ve yakın bölgelerdeki çalışmalarda Akdeniz fitocoğrafik bölge elementinin yüksek olduğu görülmüştür (Yıldızıtugay ve Küçüködük, 2010b; Tel ve ark., 2018; Tel ve ark., 2019; Tel ve ark., 2021; Tel ve ark., 2022a; 2022b). Bu sonuç çalışma alanının Akdeniz bölgesinde yer almasıyla açıklanabilir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Araştırma sahası ve yakın bölgelerdeki çalışmaların fitocoğrafik bölgelere göre karşılaştırması (%)

Alan	Akdeniz Elementi	Avrupa-Sibirya	İran-Turan	Geniş Yayılışlı ve Bilinmeyen	Endemizm
Araştırma sahası	37.03	0.70	2.96	59.25	2.22
Kaş Yaylası ve çevresinin (Anamur) florası (Yıldızıtugay ve Küçüködük, 2010b)	33.60	4.30	10.20	51.90	13.20
Anamur (Mersin) ve yaylalarının florası (Şen, 2019)	51.21	3.60	6.21	54.17	13.25
Anamur Antik Kenti ve Çevresinin Florası (Yıldızıtugay ve Küçüködük, 2010a)	35.10	3.10	4.90	56.90	3.70
Kahramanmaraş İlinin Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanları Florası Üzerine Bir Çalışma (Tel ve ark., 2018)	23.20	6.90	10.50	59.30	18.60
Karatepe-Aslantaş Milli Parkı ve Bazı Doğal/Kültürel Koruma Alanları Üzerine Floristik Bir Araştırma (Tel ve ark., 2019)	38.40	6.10	4.30	51.20	9.10
Hatay İlinin Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanları Florası Üzerine Bir Çalışma (Tel ve ark., 2021)	36.80	3.90	4.50	54.80	4.50
Adana İlinin Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanları Üzerine Floristik Bir Çalışma (Tel ve ark., 2022a)	34.60	4.50	5.00	55.90	1.30
Bazı mağara ve obrukların (Mersin/Türkiye) flora ve genel vejetasyon yapıları üzerine bir araştırma (Tel ve ark., 2022b)	48.69	1.73	6.08	43.47	2.60

En çok takson içeren familyalar yakın bölgelerde yapılan araştırmalarla karşılaştırıldığında Şen (2019), Yıldızıtugay ve Küçüködük (2010a), Tel ve ark. (2018; 2022a)'nın çalışmalarında Asteraceae familyasının birinci sırada; Bu çalışma, Yıldızıtugay ve Küçüködük (2010b), Tel ve ark. (2019), Tel ve ark. (2021; 2022b)'nin çalışmalarında ise Fabaceae familyasının birinci sırada olduğu görülmüştür. Türkiye florasında da takson sayıları bakımından Asteraceae ve Fabaceae familyalarının ön sıralarda bulunması yayılma ve tohum yayma kabiliyetinin gelişmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Çizelge 7).

İklim verileri değerlendirildiğinde, alanın Akdeniz iklimine sahip olduğu (Anonim, 2023e; Anonim, 2023f) ve buna bağlı olarak alanda Akdeniz fitocoğrafik bölge elemanlarının sayısının yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun çalışma alanına yakın bölgelerdeki araştırma sahalarında da aynı olduğu görülmektedir (Şen, 2019; Yıldızıtugay ve Küçüködük, 2010a; Tel ve ark., 2018; 2022a; Yıldızıtugay ve Küçüködük, 2010b; Tel ve ark., 2019; 2021; 2022b).

Çizelge 7. Çalışma sahası ve yakın alanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda en fazla bitki ihtiva eden familyalar (%)

Alan	Fabaceae	Lamiaceae	Asteraceae
Araştırma sahası	17	8	15
Kaş Yaylası ve çevresinin (Anamur) florası (Yıldıztuğay ve Küçüködük, 2010b)	59	31	58
Anamur (Mersin) ve yaylalarının florası (Şen, 2019)	42	47	54
Anamur Antik Kenti ve Çevresinin Florası (Yıldıztuğay ve Küçüködük, 2010a)	35	15	40
Kahramanmaraş İlinin Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanları Florası Üzerine Bir Çalışma (Tel ve ark., 2018)	5	4	13
Karatepe-Aslantaş Milli Parkı ve Bazı Doğal/Kültürel Koruma Alanları Üzerine Floristik Bir Araştırma (Tel ve ark., 2019)	26	13	13
Hatay İlinin Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanları Florası Üzerine Bir Çalışma (Tel ve ark., 2021)	22	15	13
Adana İlinin Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanları Üzerine Floristik Bir Çalışma (Tel ve ark., 2022a)	15	10	33
Bazı mağara ve obrukların (Mersin/Türkiye) flora ve genel vegetasyon yapıları üzerine bir araştırma (Tel ve ark., 2022b)	17	12	5

Genel vejetasyon yapısına bakıldığında; Anamur - Melleç Kaledranında, Cisto-Micromerietea sınıfına ait Cisto-Micromerietalia ordosunun *Cistion Orientale* alyansının karakter türleri olan *Cistus creticus*, *Cistus salviifolius*, *Lavandula stoechas* ve *Erica manipuliflora* ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfına ait Pistacio-Rhamnetalia ordosunun, Andrachno-Quercion Cocaterae alyansının karakter türleri olan *Arbutus andrachne* ve *Quercus coccifera* ile, Ceratonio-Rhamnion Oleoides alyansı karakter türü olan *Ceratonia siliqua* ile temsil edilmektedir. Yine aynı sınıfın Quercetalia İlicis ordosu, Quercion İlicis alyansının karakter türleri olan *Arbutus unedo*, *Quercus coccifera* ve *Phillyrea latifolia* ile; Olea- Ceratonion alyansının karakter türleri *Ceratonia siliqua*, *Myrtus communis* ve *Clematis cirrhosa* ile temsil edildiği, Cisto-Micromerietea sınıfına bağlı Cisto-Micromerietalia ordosu *Cistus creticus* ve *Sarcopoterium spinosum* karakter türleri ile; Quercetalia İlicis ordosu *Phillyrea latifolia* ve *Vitis vinifera* karakter türleri ile; Pistacio-Rhamnetalia ordosu *Myrtus communis* ve *Clematis cirrhosa* karakter türleri ile temsil edilmektedir. Alanda Cisto-Micromerietea sınıfı *Calicotome villosa* karakter türü ile, Quercetea İlicis sınıfı *Olea europae* ve *Smilax aspera* karakter türleri ile temsil edildiği halde herhangi bir ordo ya da alyans karakter türüne rastlanmamıştır. Quercetea Pubescentis sınıfı ait Querco-Cedretalia Libani ordosu karakter türü ise alanda *Pinus brutia* ile temsil edilmektedir.

Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesinde; Cisto-Micromerietea sınıfına ait Cisto-Micromerietalia ordosunun *Cistion Orientale* alyansının karakter türü olan *Cistus creticus* ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfına ait Pistacio-Rhamnetalia ordosunun Andrachno-Quercion Cocaterae alyansı karakter türü olan *Quercus coccifera* ile, Ceratonio-Rhamnion Oleoides alyansı karakter türü olan *Ceratonia siliqua* ile temsil edilmektedir. Yine aynı sınıfın Quercetalia İlicis ordosu, Quercion İlicis alyansının karakter türleri olan *Quercus coccifera*, *Pistacia terebinthus* ve *Asparagus acutifolius* ile, Olea-Ceratonion alyansının karakter türleri *Pistacia lentiscus*, *Capparis spinosa*, *Ceratonia siliqua* ve *Myrtus communis* ile, Quercion Calliprini alyansının karakter türü *Pistacia terebinthus* ile temsil edilmektedir. Querco-Fagetea sınıfı, Populetales alba ordosu, Alneto-Ulimion alyansının karakter türü olan *Alnus glutinosa* ile temsil edilmektedir. Alanda Cisto-Micromerietea sınıfı *Calicotome villosa* karakter türü ile, Quercetea İlicis sınıfı *Smilax aspera*, *Asparagus acutifolius*, *Osyris alba*, *Olea europae* ve *Rhamnus alaternus* karakter türleri ile temsil edildiği halde herhangi bir ordo ya da alyans karakter türüne rastlanmamıştır. (Barkman, 1976; 1986; Weber ve ark., 2000; Theurillat ve ark., 2020). Quercetea Pubescentis sınıfı, Querco-Cedretalia Libani ordosu karakter türü ise alanda *Pinus*

brutia ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfı, Pistacio-Rhamnetalia ordosu, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Capparis spinosa*, *Myrtus communis*, *Rhamnus alaternus* ve *Osyris alba* karakter türleri ile temsil edilmektedir.

Arsinoe Antik Kentinde; Quercetea İlicis sınıfına ait Quercetalia İlicis ordosunun, Quercion İlicis alyansının karakter türleri olan *Quercus coccifera*, *Phillyrea latifolia* ve *Asparagus acutifolius* ile, Oleo-Ceratonion alyansının karakter türü *Capparis spinosa*; Quercion Calliprini alyansının karakter türü *Cyclamen persicum* ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfına ait Pistacio-Rhamnetalia ordosunun, *Andrachno-Quercion Cocaterae* alyansının karakter türü olan *Quercus coccifera* ile temsil edilmektedir. Alanda Quercetea İlicis sınıfı *Asparagus acutifolius*, *Geranium purpureum*, *Smilax aspera* ve *Olea europae* karakter türleri ile; Cisto-Micromerietea sınıfı *Calicotome villosa* karakter türü ile temsil edildiği halde herhangi bir ordo ya da alyans karakter türüne rastlanmamıştır. Quercetea Pubescentis sınıfına ait Querco-Cedretalia Libani ordosunun karakter türü ise alanda *Pinus brutia* ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfına ait Pistacio-Rhamnetalia ordosunun *Capparis spinosa* karakter türü ile temsil edilmektedir.

Bozyazı Melenia'da; Quercetea İlicis sınıfına ait Quercetalia İlicis ordosunun Quercion İlicis alyansının karakter türleri olan *Quercus coccifera* ile; *Andrachno-Quercion Cocaterae* alyansının karakter türleri olan *Arbutus andrachne* ve *Quercus coccifera* ile temsil edilmektedir. Cisto-Micromerietea sınıfına ait Cisto-Micromerietalia ordosunun Cistion orientale alyansının karakter türleri *Lavandula stoechas*, *Cistus creticus*, *Cistus salviifolius* ve *Erica manipuliflora* ile temsil edilmektedir. Alanda Quercetea İlicis sınıfı *Olea europae* karakter türü ile; Cisto-Micromerietea sınıfı *Erica manipuliflora* karakter türü ile temsil edildiği halde herhangi bir ordo ya da alyans karakter türüne rastlanmamıştır. Quercetea Pubescentis sınıfına ait Querco-Cedretalia Libani ordosunun karakter türü ise alanda *Pinus brutia* ile temsil edilmektedir.

Tekeli Bozyazıda; Quercetea İlicis sınıfına ait Quercetalia İlicis ordosunun, Quercion İlicis alyansının karakter türleri olan *Asparagus acutifolius*, *Quercus coccifera* ve *Phillyrea latifolia* ile; Oleo-Ceratonion alyansının karakter türü *Ceratonia siliqua*, *Capparis spinosa* ve *Teucrium creticum* ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfı, Pistacio-Rhamnetalia ordosu, *Andrachno-Quercion Cocaterae* alyansının karakter türleri olan *Arbutus andrachne* ve *Quercus coccifera* ile; Ceratonio-Rhamnion Oleoides alyansının karakter türü *Ceratonia siliqua* ile temsil edilmektedir. Cisto-Micromerietea sınıfına ait olan Cisto-Micromerietalia ordosu, Cistion Orientale alyansının karakter türleri olan *Cistus creticus*, *Cistus salviifolius* ve *Erica manipuliflora* ile temsil edilmektedir. Alanda Quercetea İlicis sınıfı *Olea europae* karakter türü ile; Cisto-Micromerietea sınıfı *Calicotome villosa* ve *Genista acanthoclada* karakter türleri ile temsil edildiği halde herhangi bir ordo ya da alyans karakter türüne rastlanmamıştır. Quercetea Pubescentis sınıfına ait Querco-Cedretalia Libani ordosunun karakter türü ise alanda *Pinus brutia* ile temsil edilmektedir. Quercetea İlicis sınıfına ait Pistacio-Rhamnetalia ordosu, *Capparis spinosa* karakter türü ile; Cisto-Micromerietea sınıfına ait Cisto-Micromerietalia ordosu karakter türü olan *Sarcopoterium spinosum* türü ile temsil edilmektedir.

Çalışma alanlarımızın vejetasyon yapısı Braun-Blanquet metodu ile ayrıntılı çalışılmadığından bitki birlikleri oluşturulmamış ve bu yüzden yakın çevredeki benzer vejetasyon çalışmalarlarıyla karşılaştırma imkanı bulunamamıştır.

Çalışma alanının Akdeniz bölgesinde bulunması ve kurak devrenin uzun olması, araştırma alanındaki genel vejetasyon yapısının kserofit karakterli bitkilerden oluşmasına neden olmuştur. Araştırma alanında tespit edilen taksonlar Çizelge 8'de verilmiştir.

Anamur, Bozyazı ve Aydınçık (Mersin-Türkiye)'daki Bazı Doğal Sit Alanlarının Flora ve Genel Vejetasyon Yapısının İncelenmesi

Çizelge 8. Araştırma alanlarında tespit edilen bitki taksonları

Familya Adı	Takson Adı	Fitocoğrafik Bölge	Tehlike Kategorisi	Bulunduğu Sit Alanı	Bitki Toplama Tarihi	Bitki Toplayıcı Numarası
Amaranthaceae	<i>Beta lomatogona</i> Fisch. & Mey.	-	-	2	22.03.2016	Ortaç 1143
Amaranthaceae	<i>Salsola kali</i> L.	-	-	2	03.04.2016	Ortaç 1149
Amaranthaceae	<i>Salsola tragus</i> L. subsp. <i>ragus</i>	-	-	2	22.03.2016	Ortaç 1150
Amaryllidaceae	<i>Pancreatium maritimum</i> L.	Akd. Elm.	-/EN	2	22.07.2016	Ortaç 1424
Amaryllidaceae	<i>Allium neapolitanum</i> Cyr.	Akd. Elm.	-	3	03.04.2016	Ortaç 1439
Anacardiaceae	<i>Pistacia palaestina</i> Boiss.	D.Akd. Elm.	-	1,2,3,4,5	07.04.2016	Ortaç 1017
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Akd. Elm.	-	2	07.05.2016	Ortaç 1016
Anacardiaceae	<i>Pistacia terebinthus</i> L. subsp. <i>terebinthus</i>	Akd. Elm.	-	2	07.05.2016	Ortaç 1018
Apiaceae	<i>Eryngium maritimum</i> L.	-	-	2	07.04.2016	Ortaç 1023
Apiaceae	<i>Daucus littoralis</i> Sibth. & Sm.	D.Akd. Elm.	-	2	22.03.2016	Ortaç 1020
Apiaceae	<i>Eryngium campestre</i> L. var. <i>virens</i> Link	Gen. Yay.	-	5	03.04.2016	Ortaç 1021
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i> L.	Akd. Elm.	-	1,2,3,5	08.05.2016	Ortaç 1026
Aristolochiaceae	<i>Aristolochia brevibrabis</i> Bornm.	Akd. Elm.	End./DD	1	22.03.2016	Ortaç 1030
Asparagaceae	<i>Muscari babachii</i> Eker & Koyuncu	Akd. Elm.	End./CR	1	22.03.2016	Ortaç 1447
Asparagaceae	<i>Muscari comosum</i> (L.) Miller	Akd. Elm.	-	1	23.07.2016	Ortaç 1448
Asparagaceae	<i>Drimia maritima</i> (L.) Stearn	-	-	1,2,3,4,5	23.10.2016	Ortaç 1456
Asparagaceae	<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Akd. Elm.	-	2,3,5	24.10.2016	Ortaç 1441
Asparagaceae	<i>Prospero autumnale</i> (L.) Speta	Akd. Elm.	-	3	22.07.2016	Ortaç 1453
Asteraceae	<i>Onopordum boissierianum</i> Raab – Straube & Greuter	D.Akd. Elm.	End./NT	2	22.03.2016	Ortaç 1064
Asteraceae	<i>Xanthium spinosum</i> L.	-	-	2	03.04.2016	Ortaç 1078
Asteraceae	<i>Xanthium papposa</i> L. subsp. <i>italicum</i>	Gen. Yay.	-	2	07.04.2016	Ortaç 1079
Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertner subsp. <i>antitaurica</i> Yalt.	D.Akd. Elm.	-	2	07.05.2016	Ortaç 1083
Boraginaceae	<i>Echium angustifolium</i> Miller	D.Akd. Elm.	-	2	07.04.2016	Ortaç 1092
Boraginaceae	<i>Heliotropium europaeum</i> L.	İr.-Tur. Elm.	-	2	08.05.2016	Ortaç 1094
Brassicaceae	<i>Sinapis arvensis</i> L.	Gen. Yay.	-	1,3	03.04.2016	Ortaç 1119
Brassicaceae	<i>Microthlaspi perfoliatum</i> (L.) F.K.Mey.	Gen. Yay.	-	1	05.04.2016	Ortaç 1121
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Gen. Yay.	-	1	08.05.2016	Ortaç 1117
Brassicaceae	<i>Cakile maritima</i> Scop.	-	-	2	08.05.2016	Ortaç 1105
Brassicaceae	<i>Biscutella didyma</i> L.	-	-	3	04.05.2016	Ortaç 1104
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-barbarica</i> A. Berger	-	-	5	22.03.2016	Ortaç 1122
Capparaceae	<i>Capparis spinosa</i> L.	-	-	2,3,5	08.05.2016	Ortaç 1129
Caryophyllaceae	<i>Silene colorata</i> Poiret,	-	-	2,3	08.05.2016	Ortaç 1138
Caryophyllaceae	<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke. var. <i>commutata</i> (Guss.) Coode & Cullen	-	-	1	23.07.2016	Ortaç 1140
Caryophyllaceae	<i>Dianthus polycladus</i> Boiss.	Akd. Elm.	-/VU	3	08.05.2016	Ortaç 1132
Cistaceae	<i>Cistus creticus</i> L.	Akd. Elm.	-	1,2,4,5	08.05.2016	Ortaç 1152
Cistaceae	<i>Cistus salviifolius</i> L.	Gen. Yay.	-	1,4,5	08.05.2016	Ortaç 1153
Colchicaceae	<i>Colchicum cilicicum</i> (Boiss.) Dammer	D.Akd. Elm.	-	1	26.10.2016	Ortaç 1444
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Gen. Yay.	-	2	22.03.2016	Ortaç 1158
Convolvulaceae	<i>Ipomoea imperati</i> (Vahl) Griseb.	Akd. Elm.	-	2	08.05.2016	Ortaç 1160
Crassulaceae	<i>Umbilicus luteus</i> (Huds.) Webb & Berthel.	-	-	1	03.04.2016	Ortaç 1165
Ephedraceae	<i>Ephedra foeminea</i> Forssk.	-	-	2	03.04.2016	Ortaç 1008
Ephedraceae	<i>Ephedra major</i> Host	-	-	2,3	04.04.2016	Ortaç 1009
Equisetaceae	<i>Equisetum hyemale</i> L.	-	-	2	06.04.2016	Ortaç 1002
Ericaceae	<i>Arbutus andrachne</i> L.	-	-	1,4,5	22.07.2016	Ortaç 1171

Çizelge 8. Araştırma alanlarında tespit edilen bitki taksonları (devamı)

Familiya Adı	Takson Adı	Fitocoğrafik Bölge	Tehlike Kategorisi	Bulunduğu Sit Alanı	Bitki Toplama Tarihi	Bitki Toplayıcı Numarası
Ericaceae	<i>Arbutus unedo</i> L.	-	-	1	22.03.2016	Ortaç 1172
Ericaceae	<i>Erica manipuliflora</i> Salisb.	D.Akd. Elm.	-	1,4,5	08.05.2016	Ortaç 1173
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i> L.	Gen. Yay.	-	2	22.03.2016	Ortaç 1180
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia peplis</i> L.	Akd. Elm.	-	2	22.03.2016	Ortaç 1177
Fabaceae	<i>Calicotome villosa</i> (Poiret) Link	Akd. Elm.	-	1,2,3,5	22.07.2016	Ortaç 1189
Fabaceae	<i>Ceratonia siliqua</i> L.	Akd. Elm.	-	1,2,5	04.05.2016	Ortaç 1190
Fabaceae	<i>Lathyrus aphaca</i> L. var. <i>modestus</i> P. H. Davis	D.Akd. Elm.	-	1,3,4	04.04.2016	Ortaç 1209
Fabaceae	<i>Trifolium purpureum</i> Lois. var. <i>purpureum</i>	D.Akd. Elm.	-	1	08.05.2016	Ortaç 1233
Fabaceae	<i>Trifolium stellatum</i> L. var. <i>stellatum</i>	-	-	1	04.05.2016	Ortaç 1236
Fabaceae	<i>Anagyris foetida</i> L.	Akd. Elm.	-	2	04.05.2016	Ortaç 1183
Fabaceae	<i>Lotus edulis</i> L.	Akd. Elm.	-	2	08.05.2016	Ortaç 1214
Fabaceae	<i>Lupinus pilosus</i> L.	Akd. Elm.	-	2	23.07.2016	Ortaç 1216
Fabaceae	<i>Melilotus albus</i> Desr.	Gen. Yay.	-	2	08.05.2016	Ortaç 1220
Fabaceae	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Desr.	Gen. Yay.	-	2	03.04.2016	Ortaç 1221
Fabaceae	<i>Onobrychis caput-galli</i> (L.) Lam.	Akd. Elm.	-	2	06.04.2016	Ortaç 1222
Fabaceae	<i>Ononis spinosa</i> L. subsp. <i>antiquorum</i> (L.) Briq.	Akd. Elm.	-	2	04.04.2016	Ortaç 1225
Fabaceae	<i>Vicia sativa</i> L. subsp. <i>sativa</i>	-	-	2	22.07.2016	Ortaç 1242
Fabaceae	<i>Anthyllis vulneraria</i> L. subsp. <i>boissieri</i> (Sag.) Bornm.	Gen. Yay.	-	3	22.07.2016	Ortaç 1184
Fabaceae	<i>Astragalus hamosus</i> L.	-	-	3	04.05.2016	Ortaç 1187
Fabaceae	<i>Genista acanthoclada</i> DC.	D.Akd. Elm.	-	5	25.10.2016	Ortaç 1200
Fabaceae	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	-	-	5	03.04.2016	Ortaç 1230
Fagaceae	<i>Quercus coccifera</i> L.	Akd. Elm.	-	1,2,3,4,5	22.07.2016	Ortaç 1246
Geraniaceae	<i>Geranium molle</i> L.	-	-	2,3	22.07.2016	Ortaç 1256
Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Herit subsp. <i>cicutarium</i>	-	-	2	07.04.2016	Ortaç 1249
Geraniaceae	<i>Geranium dissectum</i> L.	-	-	2	08.05.2016	Ortaç 1253
Geraniaceae	<i>Geranium purpureum</i> Vill.	-	-	3	22.07.2016	Ortaç 1257
Iridaceae	<i>Gladiolus italicus</i> Miller	-	-	1	22.03.2016	Ortaç 1429
Iridaceae	<i>Iris germanica</i> L.	Gen. Yay.	-	2	07.05.2016	Ortaç 1430
Juncaceae	<i>Juncus maritimus</i> Lam.	-	-	2	22.07.2016	Ortaç 1436
Lamiaceae	<i>Lavandula stoechas</i> L. subsp. <i>stoechas</i>	Akd. Elm.	-	1,4	22.03.2016	Ortaç 1273
Lamiaceae	<i>Ajuga chamaepitys</i> (L.) Schreber subsp. <i>chia</i> (Schreber) Arcangeli	Gen. Yay.	-	1	22.03.2016	Ortaç 1264
Lamiaceae	<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Akd. Elm.	-	1,2,5	08.05.2016	Ortaç 1419
Lamiaceae	<i>Lamium amplexicaule</i> L.	-	-	2	27.10.2016	Ortaç 1268
Lamiaceae	<i>Phlomis viscosa</i> Poiret	D.Akd. Elm.	-	2,3,4	04.05.2016	Ortaç 1286
Lamiaceae	<i>Salvia verticillata</i> L. susp. <i>amasiaca</i> (Freyn & Bornm.) Bornm.	İr.-Tur. Elm.	-	2,3	25.10.2016	Ortaç 1296
Lamiaceae	<i>Ballota nigra</i> subsp. <i>ruderalis</i> (Sw.) Briq.	Akd. Elm.	-	3	22.07.2016	Ortaç 1266
Lamiaceae	<i>Teucrium creticum</i> L.	Akd. Elm.	-	5	22.03.2016	Ortaç 1309
Malvaceae	<i>Malva sylvestris</i> L.	-	-	2,3	22.07.2016	Ortaç 1316
Moraceae	<i>Ficus carica</i> L. subsp. <i>carica</i>	Akd. Elm.	-	1	27.10.2016	Ortaç 1317
Moraceae	<i>Ficus carica</i> L. subsp. <i>rupestris</i> (Hauuskn.) Browicz.	İr.-Tur. Elm.	-	2	23.10.2016	Ortaç 1318
Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L. subsp. <i>communis</i>	Akd. Elm.	-	1,2	07.04.2016	Ortaç 1322
Myrtaceae	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.	-	-	2	22.07.2016	Ortaç 1321
Oleaceae	<i>Olea europaea</i> L.	-	-	1,2,3,4,5	23.10.2016	Ortaç 1329
Oleaceae	<i>Phillyrea latifolia</i> L.	Akd. Elm.	-	1,3,5	22.07.2016	Ortaç 1330

Çizelge 8. Araştırma alanlarında tespit edilen bitki taksonları (devamı)

Familiya Adı	Takson Adı	Fitocoğrafik Bölge	Tehlike Kategorisi	Bulunduğu Sit Alanı	Bitki Toplama Tarihi	Bitki Toplayıcı Numarası
Papaveraceae	<i>Papaver rhoeas</i> L.	Gen. Yay.	-	2	26.10.2016	Ortaç 1336
Papaveraceae	<i>Fumaria asepalae</i> Boiss.	İr.-Tur. Elm.	-	2	04.05.2016	Ortaç 1333
Pinaceae	<i>Pinus brutia</i> Ten.	-	-	1,2,3,4,5	07.04.2016	Ortaç 1011
Plantaginaceae	<i>Veronica cymbalaria</i> Bodard.	Akd. Elm.	-	1,3	27.10.2016	Ortaç 1401
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Gen. Yay.	-	2	23.07.2016	Ortaç 1340
Plantaginaceae	<i>Plantago afra</i> L.	-	-	2	23.07.2016	Ortaç 1338
Platanaceae	<i>Platanus orientalis</i> L.	Gen. Yay.	-	1,2	27.10.2016	Ortaç 1343
Poaceae	<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers. var. <i>muticum</i> (Hackel) <i>Grossh.</i>	Gen. Yay.	-	1,2	25.10.2016	Ortaç 1478
Poaceae	<i>Arundo donax</i> L.	-	-	2,3	26.10.2016	Ortaç 1462
Poaceae	<i>Briza maxima</i> L.	-	-	2	25.10.2016	Ortaç 1464
Poaceae	<i>Bromus commutatus</i> Schrader	Gen. Yay.	-	2	25.10.2016	Ortaç 1465
Poaceae	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. var. <i>dactylon</i>	Gen. Yay.	-	2	25.10.2016	Ortaç 1466
Poaceae	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steudel	Av.-Sib. Elm.	-	2	08.05.2016	Ortaç 1474
Polygonaceae	<i>Polygonum maritimum</i> L.	-	-	2,3	22.07.2016	Ortaç 1346
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Gen. Yay.	-	2	25.10.2016	Ortaç 1350
Primulaceae	<i>Anagallis arvensis</i> L. var. <i>arvensis</i>	-	-	1,2,3	22.07.2016	Ortaç 1351
Primulaceae	<i>Cyclamen persicum</i> Miller	D.Akd. Elm.	-	3	24.10.2016	Ortaç 1355
Ranunculaceae	<i>Ranunculus asiaticus</i> L.	-	-	1,3	25.10.2016	Ortaç 1366
Ranunculaceae	<i>Clematis cirrhosa</i> L.	Akd. Elm.	-	1	26.10.2016	Ortaç 1361
Rhamnaceae	<i>Rhamnus lycioides</i> subsp. <i>oleoides</i> (L.) Jahandiez & Maire	-	-	2	08.05.2016	Ortaç 1371
Rhamnaceae	<i>Rhamnus alaternus</i> L.	Akd. Elm.	-	2	25.10.2016	Ortaç 1370
Rosaceae	<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L.) Spach	D.Akd. Elm.	-	1,4,5	22.07.2016	Ortaç 1383
Rosaceae	<i>Rubus sanctus</i> Schreber	Gen. Yay.	-	2	08.05.2016	Ortaç 1381
Salicaceae	<i>Populus tremula</i> L.	-	-	2	25.10.2016	Ortaç 1388
Santalaceae	<i>Osyris alba</i> L.	Akd. Elm.	-	2	22.07.2016	Ortaç 1391
Scrophulariaceae	<i>Verbascum sinuatum</i> L. subsp. <i>sinuatum</i> var. <i>sinuatum</i>	Akd. Elm.	-	2	22.07.2016	Ortaç 1399
Smilacaceae	<i>Smilax aspera</i> L.	-	-	1,2,3	22.07.2016	Ortaç 1454
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill.	-	-	2	22.07.2016	Ortaç 1405
Styracaceae	<i>Styrax officinalis</i> L.	-	-	3,5	27.10.2016	Ortaç 1406
Tamaricaceae	<i>Tamarix smyrnensis</i> Bunge	-	-	2,3,5	22.07.2016	Ortaç 1407
Thymelaeaceae	<i>Daphne sericea</i> Vahl	-	-	1	22.07.2016	Ortaç 1410
Thymelaeaceae	<i>Daphne oleoides</i> Schreber subsp. <i>oleoides</i>	-	-	1,2,3	24.10.2016	Ortaç 1409
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> L.	-	-	1	25.10.2016	Ortaç 1421
Zygophyllaceae	<i>Tribulus terrestris</i> L.	-	-	2	25.10.2016	Ortaç 1422

SONUÇ

Bu araştırmada, çalışma sahalarında 221 farklı lokaliteden 53 familiya, 117 cinse ait 135 takson belirlenmiştir. Bu bitkilerin alanlara göre dağılımı; Anamur - Melleç Kaledranında 50, Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesi 88, Arsinoe Antik Kenti 41, Bozyazı Melenia 15 ve Tekeli Bozyazı 27 takson şeklindedir. Toplam üç endemik tür belirlenmiştir. Bu taksonlar: *Aristolochia brevibras* Bornm. (Veri yetersiz -DD), *Muscari babachii* Eker & Koyuncu (Kritik- CR), *Onopordum boissierianum* Raab–Straube & Greuter (Tehdit altına girebilir-NT)'dir. Alanda bulunan nadir türler; *Dianthus polycladus* Boiss. ve *Panocratium maritimum* L.'dir. Araştırma alanın endemizm oranı %2.22'dir. Belirlenen endemik taksonlar Akdeniz fitocoğrafik bölgesi elementidir.

Bitkilerin fitocoğrafik bölgelere göre dağılımının; 1 takson Avrupa-Sibirya (%0.70), 4 takson İran-Turan (%2.96), 26 takson Geniş Yayılışlı (%19.25), 54 takson fitocoğrafik bölgesi bilinmeyen (%40.00) ve 50 takson Akdeniz (Doğu Akdeniz dahil) (%37.03) elementi olduğu belirlenmiştir.

Alanın genel vejetasyon yapısına bakıldığında, Anamur - Melleç Kaledranında Kıyı şeridinde orman ve maki formasyonu, Melleç sahilllerinde kumul vejetasyonu hakimdir. Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesinde kumul vejetasyonu ve Kumulların ardında ise *Phragmites australis* ve *Arundo donax* kamış türleri bulunmaktadır. Arsinoe Antik Kentinde Kızıllçam, kaya ve maki orman vejetasyonu gözlenmiştir. Bozyazı Melenia alanın etekleri *Pinus brutia* (kızıllçam) ormanlarıyla kaplıdır. Genel vejetasyon yapısına bakıldığında; Kıyılarda kumul, çalı ve orman formasyonu gözlemlenmiştir. Çalışma alanlarının tamamında *Quercetea İlicis*, *Cisto-Micromerietea* ve *Quercetea Pubescentis* sınıflarının karakter türlerine rastlanılmış olup, sadece Dragon Çayı - Pullu Orman Kampı arası ve Mamure Kalesinde diğerlerinden farklı olarak *Quercus-Fagetea* vejetasyon sınıfına ait karakter türlerin olduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

This research is a part of second author's master's thesis, which is carried out at Firat University, Turkey.

Çıkar Çatışması

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Yazar Katkısı

The authors declare that they have contributed equally to the article.

KAYNAKLAR

- Abay, G., & Kılıç, A. (2001). Pürenbeleni ve Yanıktepe (Mersin) yörelerindeki bazı bitkilerin yöresel adları ve etnobotanik özellikleri. *The Herb Journal of Systematic Botany*, 8(2), 97-104.
- Akaydın, G., Şimşek, I., Arıtuluk, Z.C., & Yeşilada, E. (2013). An ethnobotanical survey in selected towns of Mediterranean subregion (Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 37(2), 230-247. doi: 10.3906/biy-1010-139.
- Aksay, C. S. (2006). *Pusat Dağı flora ve vejetasyonu (Silifke-Mersin-Türkiye)* (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Anonim. (2023a). Bitki isimleri kontrol, Erişim adresi: <https://www.ipni.org> (Erişim tarihi: 30.01.2023).
- Anonim. (2023b). Bitki isimleri kontrol, Erişim adresi: <https://www.theplantlist.org> (Erişim tarihi: 30.01.2023).
- Anonim. (2023c). Bitki isimleri kontrol, Erişim adresi: www.bizimbitkiler.org (Erişim tarihi: 30.01.2023).
- Anonim. (2023d). Mersin ili haritası, Erişim adresi: <https://www.google.com/maps/@36.1117777,32.8998242,28898m/data=!3m1!1e3> (Erişim tarihi: 30.01.2023).
- Anonim. (2023e). İklim verileri, Erişim adresi: <https://tr.weatherspark.com/y/97302/Anamur-T%C3%BCrkiye-Ortalama-Hava-Durumu-Y%C4%B1l-Boyunca> (Erişim tarihi: 30.01.2023).
- Anonim. (2023f). İklim verileri, Erişim adresi: <https://tr.weatherspark.com/y/97300/Bozyaz%C4%B1-T%C3%BCrkiye-Ortalama-Hava-Durumu-Y%C4%B1l->

- Sargin, S. A. (2015). Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazı district of Mersin, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 105-126. doi: 10.1016/j.jep.2015.07.009
- Sargin, S.A., Selvi, S., & Büyükcengiz, M. (2015). Ethnomedicinal plants of Aydıncık district of Mersin, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 200-216.
- Sargin, S.A. & Büyükcengiz, M. (2019). Plants used in ethnomedicinal practices in Gulnar district of Mersin, Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, 15, 100224.
- Sargin, S.A. (2019). Mersin'in Bozyazı İlçesinde Gıda Olarak Tüketilen Yabani Bitkiler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(3), 152-169.
- Savran, A., Dural, H., & Bağcı, Y. (1999). Türkiye florasında C5 karesi için yeni floristik kayıtlar. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 6(1): 67 – 74.
- Savran, A. & Paksoy M. Y. (2016). Gülek Boğazı'nın (Mersin-Adana) florası. *Biological Diversity and Conservation*, 9(2), 131-146.
- Şen, A. N. (2019). *Anamur (Mersin) ve yaylalarının florası*. (Doktora tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Şirin, E. (2012). *Büyükeğri Dağı (Mut, İçel) ve çevresinin florası*. (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Şirin, E. & Ertuğrul, K. (2015). Büyük eğri dağı (mut, içel) ve çevresinin endemik bitkileri. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 40, 50-58.
- Tel, A. Z. & Tatlı, A. (2004). C7 karesi için (Nemrut Dağı-Adıyaman-Türkiye) yeni floristik kayıtlar. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7, 113-128.
- Tel, A. Z. (2009). Contributions to the flora of Nemrut Mountain (Adıyaman/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 2(1), 36-60.
- Tel, A. Z., Tatlı, A., & Varol, Ö. 2010: Phytosociological structure of Nemrut Mountain (Adıyaman/Turkey). *Türk Journal of Botany*, 34: 417-434.
- Tel, A. Z. & Tak, M. (2012) Perre (Pirin) Antik Şehri (Adıyaman) Vegetasyonu. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 5 (2), 45-62.
- Tel, A. Z. & Tak, M. (2015). Çelikhhan Çat barajı Adıyaman havzası'nın bazı endemik bitkileri. *Adyütayam*, 3(2), 1-6.
- Tel, A. Z. & İlçim, A. (2016). Doğu Akdeniz bölgesinde bulunan bazı doğal ve kültürel sit alanlarındaki bazı endemik ve nadir bitkiler. *Adyütayam*, 4(2), 1-7.
- Tel, A. Z., & Şahin, M. S. (2016). Ali Dağı ve Ziyaret Tepesi (Adıyaman/Türkiye) Vegetasyon Tiplerinin Kompozisyonu üzerine Bir Araştırma. *Adyütayam*, 4(1), 1-19.
- Tel, A. Z., Ortaç, İ. & İlçim, A. (2018). Kahramanmaraş ilinin bazı doğal ve kültürel sit alanları florası üzerine bir çalışma. *Commagene Journal of Biology*, 2(2), 43-47.
- Tel, A. Z. & Tak, M. (2018). A research on the flora of Karagöl (Sülüklü Lake) basin (Gerger/Adıyaman). *Adyütayam*, 6(1), 40-53.
- Tel, A. Z., Ortaç, İ. & İlçim, A. (2019). Karatepe-Aslantaş milli parkı ve bazı doğal/kültürel koruma alanları üzerine floristik bir araştırma (Osmaniye, Türkiye). *Commagene Journal of Biology*, 3(2), 103-109.
- Tel, A. Z., Ortaç, İ. & İlçim, A. (2021). Hatay ilinin bazı doğal ve kültürel sit alanları florası üzerine bir çalışma. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 22(1), 9-18.
- Tel, A. Z., Ortaç, İ. & Özuslu, E. (2022a). A floristic study on some natural and cultural sites of Adana (Türkiye) province. *Anatolian Journal of Botany* 6(2): 92-103. doi:10.30616/ajb.1152708

- Tel, A.Z., Ortaç, İ. & Özuslu, E. (2022b). Bazı mağara ve obrukların (Mersin/Türkiye) flora ve genel vejetasyon yapıları üzerine bir araştırma, *Biological Diversity and Conservation*, 15(3): 356-368. doi: 10.46309/biodicon.2022.1180111
- Tel, A.Z., Ortaç, İ., İlçim, A., & Özuslu, E. (2023). Mersin İlindeki (Türkiye) Bazı Doğal ve Kültürel Sit Alanlarının Floristik Yapısı Üzerine Bir Çalışma. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 26(5), 1056-1065. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoga.vi.1196119>
- Tezcan, F. (1995). *Ekşiler Köyü'nün (Silifke) Florası*. (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Theurillat, J.P., Willner, W., Fernandez-Gonzalez, F., Bültmann, H., Carni, A., Gigante, D., Mücina, L., & Weber, H. (2020). International Code of Phytosociological Nomenclature 4th edition, *Applied Vegetation Science*, doi: 10.1111/avsc.12491
- Topal, A., Palabaş Uzun, S. & Uzun, A. (2022). Mersin ili geofit bitki zenginliği. *Turkish Journal of Forest Science*, 6(1), 229-254.
- Uçar, A. H. (2002). *Balandız Yaylasının Florası ve Genel Vejetasyon Yapısı*. (Yüksek lisans tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Yıldızbakan, A., Gündoğdu, E., Fakir, H., Akgün, C. & Ulusoy, H. (2010). *Cehennemdere yaban hayatı geliştirme sahası'nda Yaban Keçisi Capra aegagrus Erxleben 1777'nin yayılışı ve habitat kullanımı*. Ankara: Çevre ve Orman Bakanlığı yayınları.
- Yıldıztugay, E. & Küçüködük, M. (2010a). The flora of Anamur antique city and its surroundings (Mersin-Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 3(3), 46-63.
- Yıldıztugay, E. & Küçüködük, M. (2010b). Kaş Yaylası ve çevresinin (Anamur - Mersin) florası, *Biological Diversity and Conservation*. 3(2), 170-184.
- Weber, H.E., Moravec, J. & Theurillat, J.P. (2000). International Code of Phytosociological Nomenclature. *Journal of Vegetation Science*, 11, 739-768.
- Zeren, O., & İspirgil, Y. (2001). Mersin Üniversitesi kampüs alanı florasının tespiti. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 10(40), 12-16.

To Cite: Karakuş, S., Suyurdu, T. N., Köksal, E. & Alp, C. (2023). Antifungal activity of extracts from the *Ferulago pauciradiata* in vitro against *Botrytis cinerea* Pers. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2467-2475.

Antifungal Activity of Extracts From the *Ferulago pauciradiata* in Vitro Against *Botrytis cinerea* Pers

Sinem KARAKUŞ^{1*}, Tuba Nur SUYURDU², Ekrem KÖKSAL², Cemalettin ALP³

Highlights:

- *Ferulago pauciradiata*'nın antifungal özellikleri ilk kez belirlendi
- *Ferulago pauciradiata*'nın metanol, etanol ve heksan özleri, *Botrytis cinerea*'nın miselyum büyümesini, tohum tüpünün uzamasını ve spor çimlenmesini önemli ölçüde engellemiştir

ABSTRACT:

This is the first study to reveal the antifungal properties of *Ferulago pauciradiata* plant. In this context investigated the effects of methanol (FPM), ethanol (FPE), hexane (FPH) and water (FPW) extracts of the *F. pauciradiata* plant on the prevention of losses caused by gray mold (*Botrytis cinerea* Pers) *in vitro*. The effects of FPM, FPE, and FPH 10, 25, 50, 100, 300, 500, 1000, and 2000 µL doses were determined by mycelium growth, germ tube elongation, and spore germination *in vitro*. The water extract didn't show antifungal activity against *B. cinerea*. Compared to the control, both FPM and FPH caused 100% inhibition at the dose of 2000 µL by suppressing mycelial growth due to dose increases, while FPE had a 97.3% effect on the same parameter at the dose of 2000 µL. While there was no elongation at the 2000 µL dose of FPM and FPH, there was an elongation of 8.4 µm at the same dose of FPM. In spore germination, 0% germination was observed in FPM and FPH 2000 µL dose, while 17.5% germination was observed in FPE. These results show that *F. pauciradiata* extracts, which are of biological origin and are not environmentally toxic, are a good alternative for use in the control of *B. cinerea*.

Keywords:

- Biocontrol
- Antifungal effect
- Gray mold
- Plant extract

¹Sinem KARAKUŞ ([Orcid ID: 0000-0002-6698-153X](https://orcid.org/0000-0002-6698-153X)), Hakkâri University, Çölemerik Vocational School, Hakkâri, Türkiye

²Tuba Nur SUYURDU ([Orcid ID: 0009-0003-4772-7581](https://orcid.org/0009-0003-4772-7581)), Ekrem KÖKSAL ([Orcid ID: 0000-0003-0853-566X](https://orcid.org/0000-0003-0853-566X)), Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Erzincan, Türkiye

³Cemalettin ALP ([Orcid ID: 0000-0001-6213-7297](https://orcid.org/0000-0001-6213-7297)), Erzincan Binali Yıldırım University, Çayırılı Vocational School, Department of Medical Services and Techniques, Erzincan, Türkiye

INTRODUCTION

Gray mold (*Botrytis cinerea* Pers) is one of the fungal pathogens that cause significant losses in many plants (Šernaitė et al., 2020). This pathogen, which infects many plant species before and after harvest, causes severe economic losses in the agricultural sector (Elad et al. 2016; Pañitrur-De La Fuente et al. 2018). Various methods have been developed to combat this pathogen. At the beginning of these methods are fungicides used in chemical control. (Singh and Sharma, 2007). The applied fungicides have teratogenic, carcinogenic, and highly acute toxigenic effects. These chemicals are used to cause environmental pollution as they have long corruption times. In addition, many phytopathogenic fungi are gaining resistance to synthetic insecticides (Lingk, 1991; Unnikrishnan and Nath, 2002; Gisi and Sierotzki, 2008). Various synthetic chemicals such as sterol, benzimidazoles, aromatic hydrocarbons, and biosynthesis inhibitors have long been used as antifungal agents to inhibit the growth of phytopathogenic fungi (Pavela, 2007). Secondary metabolites produced naturally in plants that can replace these synthetic insecticides have been identified. In recent years, researchers have been examining wild or cultivated plants that breed varieties of compounds and investigating ways to obtain and apply these natural secondary compounds in plants. These metabolites are known to be healthier for both consumers and the environment as they are easily biodegraded by natural processes (Vyvyan 2002; Weston and Duke 2003).

Plants in the *Apiaceae* family have been used medicinally for thousands of years as a natural product (Evergetis and Haroutounian, 2015). A significant part of this family is rich in phenolic compounds, essential oils, and coumarins (Cavanagh, 2007; Ntalli et al., 2010; Dorman and Deans, 2000; Lang and Buchbauer, 2012; Siddiqui and Zaki, 2017). *Ferulago*, which belongs to the *Apiaceae* family, is known as "Çağşir" and "Çakşir" in the local language, and it is also known as coriander, lamb's head, lamb gnaw (Kürkçükoğlu et al., 2010). *Ferulago* species are used in the treatment of spleen, headache, and ulcer diseases (Baser et al., 2002; Reza et al., 2007). In addition, *Ferulago* species are known for their antioxidant, antimicrobial (Maggi et al., 2009), cytotoxic, and immunomodulatory (Maxia et al., 2009) effects (Karabulut Uzuncakmak et al., 2023).

This species *Ferulago pauciradiata* Boiss & Heldr is a perennial rhizome endemic plant (Cumhur, 2019). Despite intensive studies on the biological activity of *F. pauciradiata*, no information was found about the antifungal activity of *F. pauciradiata* extract. This study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activities of extracts prepared from the aerial part of *F. pauciradiata* using different solvents.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Plant

Plant samples were collected on the Erzincan-Kemah road in June 2023. The species was identified by Prof. Dr Ali Kandemir, and it was deposited in Erzincan Binali Yıldırım University Herbarium with the collector number TKS1.

Preparation of plant extract

The plant samples, which were dried at room temperature without sunlight, were turned into powder with a herb grinder. 10 g of plant material was extracted with 50 mL each of methanol, ethyl acetate, water, and hexane in an ultrasonic bath for 30 minutes x2 at room conditions. Solvents were removed by evaporator and stock solution was prepared from the extracts with a final concentration of 50 mg/mL.

Determination of antifungal effect on mycelial growth inhibitions and minimum inhibitory concentration

B. cinerea was isolated from infected grapes (*Vitis vinifera* cv. Karaerik). The strain isolates numbered MF7413141, MH997908, MK562062, and MH782039 obtained from the Genbank (GenBank; <http://ncbi.nlm.nih.gov>) database were used for molecular identification in this study. The fungus was grown on potato dextrose agar (PDA) medium at 25 °C in the dark. The water (FPW), methanol (FPM), ethanol (FPE), and hexane (FPH) extracts of *F. pauciradiata* were mixed with sterile molten PDA to obtaining the final concentrations (10, 25, 50, 100, 300, 500, 1000, and 2000 µL). 20 mL of each medium was poured into 90 mm Petri plates and then were inoculated with 4 mm plugs from 7-day-old cultures. From the second day of incubation, the petri dishes were checked daily, and the diameters of fungal mycelium were measured and recorded daily. The experiment was performed in triplicate, and percentage mycelial growth inhibitions (MGI) were calculated using the following formula (Yahyazadeh et al., 2008).

$$\text{MGI (\%)} = [(dc-dt)/dc] \times 100$$

MGI-inhibition (%), dc-mycelium diameter in the control Petri dish (mm), dt-mycelium diameter in the experimental Petri dish (mm). Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the minimum concentration that completely inhibits *B. cinerea* (Talibi et al., 2012).

Spore germination and germ tube elongation

The effects of FPW, FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* on *B. cinerea* spore germination and germ tube elongation were determined as described by Qin et al. (2010). After ten days of incubation at 25°C, spores from the fungal cultures were collected, and 5 mL of sterilized pure water was added to the culture. The suspension was passed through 3-layer cheesecloth, and the mycelial particles were removed. Pathogen suspension at 1×10^5 conidial/mL was prepared. The resultant suspensions were shaken using a vortex mixer for 30 s before inoculation. 10 µL of spore suspension was spread in the petri plates containing different concentrations (10, 25, 50, 100, 300, 500, 1000, and 2000 µL) of plant extract. The Petri were incubated in the dark at 25 ± 1 °C for 24 h. After incubation, spore germination was determined microscopically (40×10) by counting 100 spores, and the length of germ tubes was measured with an ocular micrometer.

RESULTS AND DISCUSSION

B. cinerea is one of the most harmful pathogens worldwide, causing economic losses in fresh and post-harvest fruits and vegetables (Yan et al., 2010). Although chemical fungicides are thought to be the most effective treatment method against the pathogen, their long-term toxicity to the environment and human health causes great harm. Therefore, the search for new environmentally friendly alternatives has increased (Contreras et al., 2022). Recently, researchers have focused on the development of other natural chemicals such as essential oil, plant extracts, and natural preservatives for the safe control and management of gray mold (Zhao et al., 2021). We, therefore, investigated the effect of antifungal activities of FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* against *B. cinerea* infections. In the literature, no findings were found on the antifungal properties of *F. pauciradiata* extracts used in the study. However, there are studies showing that different plant extracts have antifungal effects against *B. cinerea* (Dène and Valiuškaitė, 2021; Hadadi et al., 2020; Karakuş et al., 2021; Latinović et al., 2019; Šernaitė et al., 2020). According to our results, it was determined that FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* plant had a significant antifungal activity on the mycelial growth of *B. cinerea*. FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* plant (10, 25, 50, 100, 300, 500, 1000, and 2000 µL) inhibited the mycelial growth of *B. cinerea* in a dose-dependent manner

(Table 1). The FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* plant MIC values were determined as 10 μ L and 25 μ L, respectively. FPM and FPH application resulted in a reduction in *B. cinerea* diameter compared with the control group, and mycelium growth, germ tube elongation, and spore germination were completely inhibited at the highest concentrations of FPM and FPH tested (2000 μ L) (Table 1-3-4). We indicated that growth inhibition was dependent on plant extract concentrations and that the antifungal activity of plant extract was dose-dependent. In the literature, no findings were found on the antifungal properties of *F. pauciradiata* extracts used in the study. However, studies are showing that some *Ferulago* species, such as *Ferulago longistylis*, *Ferulago asparagifolia*, *Ferulago galbanifera*, *Ferulago angulata* subsp. *carduchorum*, *Ferulago thyrsoiflora*, *Ferulago bernardii*, *Ferulago nodosa*, *Ferulago sylvatica*, and *Ferulago humilis* have antibacterial and antifungal activity of plant essential oil (Khalighi-Sigaroodi et al., 2005; Taran et al., 2010). Therefore, our study is the first to investigate the antifungal properties of plant extracts of *Ferulago* species.

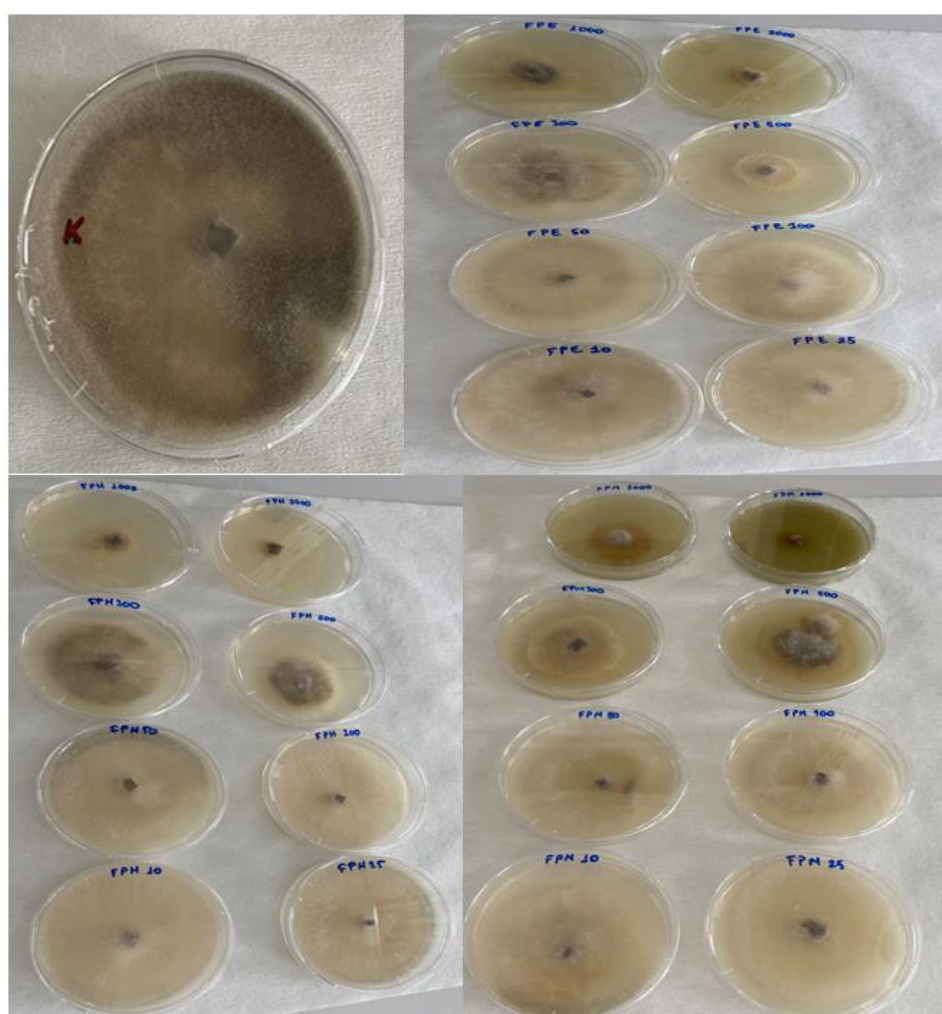


Figure 1. Control and Effects of the FPM, FPE, and FPH Extracts of the *F. Pauciradiata* Plant on the Mycelial Growth of Pathogen

When the effect of FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* plant on the mycelial growth of *B. cinerea* in vitro was appraised, FPM, FPE, and FPH extracts, in addition to inhibiting mycelial growth in connection with the rise in concentration, 2000 μ L doses of FPM and FPH extracts inhibited mycelial growth by 100% (Table 1). FPE extract inhibited the pathogen growth by 97.3% at 2000 μ L concentration (Table 1). At 1000 μ L concentration, FPH was 96.7% inhibited, whereas FPM was 90.6%, and FPE was 82.7% inhibition (Table 1). At the lowest concentrations (10 μ L) of the extracts,

FPH, FPM, and FPE showed inhibition of 19.8%, 19.7%, and 17.3%, respectively. The results are shown in Figure 1, where, FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* showed antifungal activity against *B. cinerea* at different concentrations. FPM, FPE, and FPH extracts of *F. pauciradiata* (>500 µL) considerably inhibited the mycelial growth of *B. cinerea* in vitro. The findings in this work were similar to those of Šernaitė et al. (2020), who reported that separately mixing plant extracts of the *Syzygium aromaticum* L., *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. inhibited the *B. cinerea* growth 100% at 600–2000 µL concentration. Moreover, it was also similar to the findings of other studies confirming that the plant extracts showed antifungal activity against *B. cinerea* (Hadizadeh et al., 2009; Hammani et al., 2011; Vio-Michaelis et al., 2012). Moghaddam et al. (2018) stated that the essential oils (with 20 µL mL⁻¹ MIC and 30< MBC) of *Ferulago angulata* have antifungal effects against *Fusarium oxysporum* (100.0 ± 0.00) and *Colletotrichum trichellum* (52.50 ± 1.67%) fungi. The antifungal effect of the extract obtained from the same plant is lower than the essential oil. This is believed to be due to the effect level of the active ingredient stability and the amount that is included in the extract (Tripathi et al., 1985).

Table 1. Inhibitory effects of Extracts of *F. Pauciradiata* on Mycelial Growth Inhibitions (MGI)

Application dose (µL/Petri dish)	FPE MGI (%)	FPH MGI (%)	FPM MGI (%)
10	17.3	19.8	19.7
25	18.9	24.3	21.5
50	23.2	26.1	38.6
100	36.7	38.9	43.7
300	44.5	42.4	63.7
500	72.3	84.7	68.2
1000	82.7	96.7	90.6
2000	97.3	100	100

Besides, the inhibitory effects of the extracts of the *F. pauciradiata* plant on spore germination and germ tube elongation were consistent with those on mycelial growth (Table 2-4). Likewise, FPH and FPM were more successful in the inhibition of spore germination and germ tube elongation of pathogens, compared to those of FPE, FPH and FPM at concentrations of 2000 µL completely inhibited germ tube elongation and spore germination. For example, the control group germinated 100%, while at the concentration of 1000 µL, the spores germinated of FPM, FPH, and FPE were %11.8, %14.6, and %27.8, respectively (Table 2-4). Moreover, at 10 µL of the concentration, FPE, FPH, and FPM indicated spore germination of 91.2%, 90.2%, and 84.4%, respectively (Table 2-4). The germ tube elongation was also determined as 119.8 µm in the control group, while there was no elongation of FPH and FPM at 2000 µL (Table 3-4). At the concentration of 1000 µL, the germ tube elongation of FPE, FPH, and FPM was 12.1, 7.1, and 15.2 µm, respectively. Likewise, the germ tube elongation decreased significantly compared to the control group depending on the concentration ratio. FPM demonstrated the best results compared to the two other applications. According to our results, FPM, FPH, and FPE have high antifungal effects. In another study examining the effectiveness of polar extracts of the plant of *Colobanthus quitensis* Kunth. (Bartl) against *B. cinerea*, they showed that the conidia density of the extract was strongly inhibited (Contreras et al., 2022). Moreover, it has been stated that some plant extracts do not inhibit the growth of microorganisms (Singh et al., 1980). Investigations with different plants show that the effects of extracts on the type and target organism may differ (Karakuş et al., 2021).

Table 2. Inhibitory Effect of FPE Extracts of *F. Pauciradiata* on the Germ Tube Elongation and Spore Germination of Pathogen

Application dose (µL/Petri dish)	Germ tube elongation (µm)	Spore germination (%)
Control	119.8	100
10	101.3	91.2
25	94.6	90.3
50	75.8	84.5
100	58.7	78.9
300	41.3	64.7
500	24.6	48.7
1000	12.1	27.8
2000	8.4	17.5

Table 3. Inhibitory Effect of FPH Extracts of *F. Pauciradiata* on the Germ Tube Elongation and Spore Germination of Pathogen

Application dose (µL/Petri dish)	Germ tube elongation (µm)	Spore germination (%)
Control	119.8	100
10	98.7	90.2
25	90.1	86.4
50	89.6	78.9
100	70.3	69.7
300	61.4	54.6
500	24.6	39.7
1000	7.1	14.6
2000	0	0

Table 4. Inhibitory Effect of FPM Extracts of *F. Pauciradiata* on the Germ Tube Elongation and Spore Germination of Pathogen

Application dose (µL/Petri dish)	Germ tube elongation (µm)	Spore germination (%)
Control	119.8	100
10	98.9	84.4
25	85.4	78.6
50	74.1	62.1
100	64.7	55.7
300	50.1	47.8
500	41.7	22.5
1000	15.2	11.8
2000	0	0

Since the water extract of the *F. pauciradiata* plant did not show antifungal activity, the results are not given in the text. In a similar study, in which the effect of different extracts of *Nepeta meyeri* plant against *B. cinerea* was investigated, it indicated that EOs showed high antifungal activity on the other, and water, methanol, and hexane extracts did not show antifungal effect (Karakuş et al., 2021). Other studies showed that the boiling water extraction of *Urtica dioica* L was effective against *B. cinerea*, however, *Apium graveolens* Mill and *Sinapis arvensis* L did not have any effect on *B. cinerea* (Torun et al., 2018). As a result of using different extracts of the same plant in our study, while water extract was not effective, ethanol, methanol, and hexane extracts were effective. We think that this difference is due to the different concentrations of the antifungal substances contained in the extracts.

CONCLUSION

In recent years, researchers have turned to developing safer antifungals instead of chemicals against plant pathogens. The plant extracts are promising natural ingredients that can be applied in agricultural systems against phytopathogenic microorganisms. The study presented here on the effect

of FPM, FPE, and FPH extracts of the *Ferulago pauciradiata* plant on *B. cinerea* antifungal activity is the first antifungal study with *F. pauciradiata*. This study revealed that FPM, FPE, and FPH extracts inhibited the mycelial growth of *B. cinerea*. The results of our investigation indicated that extracts of the *F. pauciradiata* plant have promising antifungal agent properties. It can be used to control *B. cinerea* caused by *F. pauciradiata* gray mold, and it is environmentally friendly and could be a potential alternative to synthetic pesticides.

Additionally, further studies are needed to investigate the effects of *F. pauciradiata* plant extracts against other major bacteria and fungi to develop new natural antibacterial and antifungal agents to prevent fungal and bacterial diseases in plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors give special thanks to Prof. Dr. Ali Kandemir (Erzincan Binali Yıldırım University, Biology Department) for the identification of plant materials

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Baser, K. H. C., Demirci, B., Özek, T., Akalin, E., & Özhatay, N. (2002). Micro-distilled volatile compounds from *Ferulago* species growing in western Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 40(6), 466-471.
- Cavanagh, H. M. (2007). Antifungal activity of the volatile phase of essential oils: a brief review. *Natural Product Communications*, 2(12), 1934578X0700201222.
- Contreras, R. A., Pizarro, M., Peña-Heyboer, N., Mendoza, L., Sandoval, C., Muñoz-González, R., & Zúñiga G. E., (2022). Antifungal activity of extracts from the Antarctic plant *Colobanthus quitensis* Kunth. (Bartl) cultured in vitro against *Botrytis cinerea* Pers. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(5), 615-635.
- Cumhur, B. *Ankara civarında yetişen ferulago aucheri boiss. ve ferulago pauciradiata boiss. & heldr.(apiaceae) türleri üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Dene, L., & Valiuškaite, A., (2021). Sensitivity of *Botrytis cinerea* Isolates Complex to Plant Extracts. *Molecules*, 26, 4595.
- Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Elad, Y., Vivier, M., & Fillinger, S. (2016). Botrytis, the good, the bad and the ugly. Botrytis–The fungus, the pathogen and its management in agricultural systems, 1-15.
- Evergetis, E., & Haroutounian, S. A. (2015). The Umbelliferae (Apiaceae) of Dioscorides annotated in codex Neapolitanus Graecus# 1. *Journal of ethnopharmacology*, 175, 549-566.
- Gisi, U, Sierotzki, H. (2008). Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122(1), 157–167.
- Hadadi, Z., Nematzadeh, G. A., & Ghahari, S., (2020). A study on the antioxidant and antimicrobial activities in the chloroformic and methanolic extracts of 6 important medicinal plants collected from North of Iran. *BMC Chemistry*, 14, 33.

- Hammami, I., Kamoun, N., & Rebai, A., (2011). Biocontrol of *Botrytis cinerea* with essential oil and methanol extract of *Viola odorata* L. flowers. Archives of Applied Science Research, 3(5), 44-51.
- Karabulut Uzunçakmak, S., Halıcı, Z., Karakaya, S., Kutlu, Z., Sağlam, Y. S., Bolat, İ., & Kılıç, C. S. (2023). Suberosin Alleviates Sepsis-Induced Lung Injury in A Rat Model of Cecal Ligation and Puncture. Journal of Investigative surgery, 36(1), 2136802.
- Karakuş, S., Atıcı, Ö., Köse, C., & Tiryaki, D. (2021). Antifungal effect of essential oil and different extracts obtained from *Nepeta meyeri* on *Botrytis cinerea*. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus, 20(1), 111–122.
- Khalighi-Sigaroodi, F., Hadjiakhoondi, A., Shahverdi, H. R., Mozaffarian, V. A., Shafiee, A. (2005). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Ferulago bernardii* Tomk. And M. Pimen. DARU Journal of Pharmaceutical Science, 13, 100–104.
- Kürkçüoğlu, M., İşcan, G., Demirci, F., Başer, K. H. C., Malyer, H., & Erdoğan, E. (2010). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ferulago confusa* Velen. Journal of Essential Oil Research, 22(6), 490-492.
- Lang, G., & Buchbauer, G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal, 27(1), 13-39.
- Latinović, N., Sabovljević, M. S., Vujičić, M., Latinović, J., & Sabovljević, A., (2019). Bryophyte extracts suppress growth of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. Botanica Serbica, 43(1), 9-12.
- Ling, W. (1991). Health risk evaluation of pesticide contamination in drinking water. Gesunde Pflanzen., 43:21–25.
- Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M. M., Tirillini, B., Sagratini, G., & Papa, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy). Fitoterapia, 80(1), 68-72.
- Maxia, A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Tuveri, E., Gonçalves, M. J., & Salgueiro, L. (2009). Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. Fitoterapia, 80(1), 57-61.
- Moghaddama, M., Mehdizadeha, L., Najafgholib H. M., Pirbalouti A. G. (2018). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. International Journal of Food Properties, 21(1), 158–170.
- Ntalli, N. G., Ferrari, F., Giannakou, I., & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010). Phytochemistry and nematocidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. Journal of agricultural and food chemistry, 58(13), 7856-7863.
- Pañitrur-De La Fuente, C., Valdés-Gómez, H., Roudet, J., Acevedo-Opazo, C., Verdugo-Vásquez, N., Araya-Alman, M., & Fermaud, M. (2018). Classification of winegrape cultivars in Chile and France according to their susceptibility to *Botrytis cinerea* related to fruit maturity. Australian Journal of Grape and Wine Research, 24(2), 145-157.
- Pavela, R. (2007). Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. Pest Technology, 1(1), 47-52.
- Reza, G. H., Ebrahim, S., & Hossien, H. (2007). Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of essential oil from seeds and aerial parts of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss gathered in Nevakoh and Shahoo, Zagross Mountain, West of Iran. Pakistan journal of biological sciences: PJBS, 10(5), 814-817.

- Šernaitė, L., Rasiukevičiūtė, N., Dambrauskienė, E., Viškelis, P., & Valuškaitė, A., (2020). Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. *Zemdirbyste-Agriculture*, 107(2), 147–152.
- Siddiqui, A., & Zaki, M. J. (2017). Efficacy of some seeds of family apiaceae against root knot Nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. *Int. J. Biol. Biotech*, 14(1), 89-94.
- Singh, D., Sharma, R.R. (2007). Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.). *sustainable Pest Management*, Daya Publishing House, New Delhi, India.
- Talibi, I., Askarne, L., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Msanda, F., Saadi, B., & Ait Ben Aoumar, A., (2012). Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 155–161.
- Taran, M., Ghasempour, H. R., Shirinpour, E. (2010). Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Ferulago angulate* Subsp. *carduchorum*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 3, 10–14.
- Torun, B., Biyik, H. H., Ercin, Z., & Poyrazoglu, Coban, E. (2018). Antifungal activities of *Urtica dioica* L., *Sinapis arvensis* L. and *Apium graveolens* Mill. leaves on *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Phytomedicine*, 7(2), 94-97.
- Tripathi, S. C., Singh, S. P., Dube, S. (1985). Studies on antifungal properties of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) *Sprague*. *Journal of Phytopathology*, 116, 113-120.
- Unnikrishnan, V., Nath, B.S. (2002). Hazardous chemical in foods. *Indian Journal of Dairy and Biosciences*, 11:155-158.
- Vio-Michaelis, S., Apablaza-Hidalgo, G., Gómez, M., Peña-Vera, R., & Montenegro, G., (2012). Antifungal activity of three Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Sciences*, 90(2),179-183.
- Vyvyan, J. R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58(9), 1631-1646.
- Weston, L. A., & Duke, S. O. (2003). Weed and crop allelopathy. *Critical reviews in plant sciences*, 22(3-4), 367-389.
- Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., & Taheri, H., (2008). Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1445–1450.
- Yan, J., Wu, H., Chen, K., Feng, J., & Zhang, Y., (2021). Antifungal Activities and Mode of Action of *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, and *Origanum heracleoticum* Essential Oil Vapors against *Botrytis cinerea* and Their Potential Application to Control Postharvest Strawberry Gray Mold. *Foods*, 10, 2451.
- Qin, G., Zong, Y., Chen, Q., Hua, D., & Tian, S., (2010). Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), 145-50.
- Zhao, S., Guo, Y., Wang, Q., & An, B., (2021). Antifungal effects of lycorine on *Botrytis cinerea* and possible mechanisms. *Biotechnology Letters*, 43, 1503–1512.

Atf İçin: Ozkoc, I., Bilgi, M., Gurkanli, C. T., ve Mustafa, L. B. (2023). Bazı Orkide Türlerinde Ekim Öncesi Tohum Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Tohum Çimlenme ve Gelişmesine Olan Etkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2476-2484.

To Cite: Ozkoc, I., Bilgi, M., Gurkanli, C. T., & Mustafa, L. B. (2023). Pre-Sowing Seed Applications in Some Orchid Species and The Effect of These Applications on Seed Germination and Development. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2476-2484.

Bazı Orkide Türlerinde Ekim Öncesi Tohum Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Tohum Çimlenme ve Gelişmesine Olan Etkisi

İbrahim Özkoç¹, Mustafa Bilgili¹, Cem Tolga Gürkanlı², Luay Burhan Mustafa^{1,3*}

Öne Çıkanlar:

- Bu çalışmada orkide tohumları *in-vitro* olarak başarıyla çimlenmiştir
- Tohumları laboratuvar ortamında endofitik bakteri ve mantarlarla başarıyla kaplanmıştır
- Orkide tohumlarının çimlenmesinde bakteriyel ve fungal endofitlerin sinerjistik etkisi gösterilmiştir

ÖZET:

Bitkilerin gelişimi söz konusu olduğunda öncelikle ilk aşama bitki tohumunun sağlıklı bir şekilde çimlenmesidir. Bu durumun gerçekleşmesi orkideler söz konusu olduğunda diğer bitki türlerine göre daha zor olabilmektedir. Bu çalışmamızda elimizde bulunan orkide tohumlarının *in-vitro* olarak çimlenmesi gözlemlenmiştir. Sıcaklık, kuraklık, Ph gibi abiyotik faktörler, tohum çimlenmesine karşı stres oluşturabilmektedir ve tohumun çimlenmesini engelleyici etkiye sahip olmaktadır. Bu durumu engelleyebilmek için tohumların bazı yöntemlerle biyolojik ajanlarla kaplanması sağlanmıştır. Bu çalışmamızda, daha önceki çalışmalarımızda izole ettiğimiz endofitik bakteri ve fungal izolatlar kullanılarak, laboratuvar ortamında tohumlar biyoprimum uygulamalara tabii tutularak kaplanmış ve orkide tohumlarının çimlenmelerine olumlu bir etkisi olup olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan değerlendirmede özellikle hem endofitik fungal ve bakteri örneklerini içeren karışımların en etkili işlemler olduğu görülmüştür. Bu çalışma orkidelerde hem fungal hem de bakteriyel probiyotik denemesinin ilk örneğini oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler:

- PGPR
- Bio-priming
- Çimlenme
- Endofitik Bakteri ve Fungus

Pre-Sowing Seed Applications in Some Orchid Species and The Effect of These Applications on Seed Germination and Development

Highlights:

- In this study, orchid seeds were successfully germinated *in-vitro*
- Its seeds have been successfully coated with endophytic bacteria and fungi in the laboratory environment
- The synergistic effect of bacterial and fungal endophytes on the germination of orchid seeds has been demonstrated

ABSTRACT:

When it comes to the development of plants, the first step is the healthy germination of the plant seed. The realization of this situation can be more difficult when it comes to orchids compared to other plant species. In this study, *in-vitro* germination of orchid seeds was observed. Abiotic factors such as temperature, drought and Ph can create stress against seed germination and have an inhibitory effect on seed germination. In order to prevent this situation, the seeds are covered with biological agents by some methods. In this study, by using endophytic bacteria and fungal isolates isolated in our previous studies, the seeds were covered with bioprimum applications in the laboratory and it was observed whether there was a positive effect on the germination of orchid seeds. In the evaluation, it was observed that the mixtures containing both endophytic fungal and bacterial samples were the most effective treatments. This study constitutes the first example of both fungal and bacterial probiotic testing in orchids.

Keywords:

- PGPR
- Bio-priming
- Germination
- Endophytic Bacteria and Fungi

¹İbrahim Özkoç ([Orcid ID: 0000-0001-8179-0961](https://orcid.org/0000-0001-8179-0961)), ¹Mustafa Bilgili ([Orcid ID: 0009-0000-9000-9663](https://orcid.org/0009-0000-9000-9663))^{1,3*}Luay Burhan MUSTAFA ([Orcid ID: 0000-0001-8197-4357](https://orcid.org/0000-0001-8197-4357)), ¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye / ³Tikrit Üniversitesi, Temel Bilimler Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tikrit, Irak

²Tolga Cem Gürkanlı ([Orcid ID: 0000-0001-8378-7109](https://orcid.org/0000-0001-8378-7109)), Ordu Üniversitesi, Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği, Ordu, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Luay MUSTAFA, e-mail: luayburhan25@gmail.com

Bu çalışma Ad Soyad'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

Makale 6-7 Kasım 2018 tarihlerinde İğdır'da düzenlenen "İğdır 1. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi'nde" poster/sözlü olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Çiçekli bitkiler denildiğinde genellikle aklımıza ilk gelen ve geniş bir tür çeşitliliğine sahip olan bitki familyalarından biri *Orchidaceae* familyasıdır. Gezegenimizde yaklaşık olarak 18.000-23.000 türü olduğu tahmin edilen orkideler, ülkemizde çeşitli bölgelerde yetiştirilmektedir. Estetik açıdan çok güzel görünmesi yanında, “Salep” adını verdiğimiz orkide ürünü, dondurma, bitkisel ilaç ve yiyecek- içeceklerde kullanılmaktadır. Ülkemizde en çok yetiştirilen orkideler, salep ve dondurma yapımında kullanılan, *Orchis*, *Serapias* cinsi orkidelerdir (Sezik, 1984).

Orkide tohumlarının çimlenmesinin diğer çiçekli bitkilerle karşılaştırıldığında daha zor olduğu görülmektedir, ayrıca çiçeklenmesinin yıllar alması ve tozlaşmada böceklere olan bağımlılığı gibi nedenler, orkidelerin doğadaki konumlarını oldukça hassas bir konuma getirmektedir (Özkoç ve Dalcı 1993). Çoğalma kapasiteleri son derece sınırlı olan ve endosperm taşımayan salep orkide tohumlarının çimlenebilmesi için uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanısıra, ortamda uygun bir mikorizal fungus ile mikorizal bir ilişki oluşturabilme gereği vardır (Özkoç ve Özden, 1997). Orkidelerin bu zorlu şartları göz önünde bulundurulduğunda orkide metabolizmasını olumsuz olarak etkileyerek büyüme ve gelişmesine engel olan durumlara “stres” denildiğini bilmekteyiz. Orkide fizyolojik ve kimyasal yapısı gereği bu stres durumuna karşı gelmeye çalışsa da bir süre sonra stresle olan mücadelesinde güçsüz düşer ve ölüm ile sonuçlanır. Bitkilerde stres faktörü, kaynağına göre farklılık göstermektedir. Abiyotik ve biyotik stresle mücadele ettiği durumlarda bitkiler hayatta kalma, biyokütlesini artırma ve besin ürünlerinin önemli ölçüde veriminin azalmasına neden olmaktadır (Kaur ve ark., 2008; Abd El Baky ve ark., 2016). Bunun yanında farklı stres mekanizmalarıda bitkilerin büyümesine ve çimlenmesine olumsuz etki yapabilmektedir.

Bitkiler ve mikroorganizmalar yaşamları boyunca sürekli bir etkileşim ağına dahil olmaktadır ve bunlardan bazıları bitkiler için yararlıdır ve bazıları zararlı olarak karşımıza çıkmaktadır. Tarımsal açıdan yararlı mikroorganizmaların kullanılması, tarımsal ekosisteme ciddi şekilde zarar veren geleneksel tarım tekniklerine potansiyel bir alternatiftir (Abhilash ve ark., 2016). Tohum, tarımda sürdürülebilir büyüme için hayati bir kaynaktır, çünkü gıda mahsullerinin yüzde doksanı tohumdan yetiştirilmektedir. Tohum muamelesi yoluyla kimyasal kontrol, yüksek kimyasal ürün maliyeti, hedef olmayan organizma üzerindeki etkiler, seçicilik, haşere direnci şansı, gıdanın kontaminasyonu, bitkiler için toksisite vb. dahil olmak üzere belirli sınırlamalara sahiptir.

Tohum ve fide hastalıklarının kontrolüne yönelik biyolojik tohum uygulamaları, yetiştiriciye biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı, ayrıca tohumların çimlenmesine fayda sağlayıcı alternatif yollar sunmaktadır. Bitki gelişimini teşvik ettiği bilinen mikroorganizmalar kullanılarak tohumların bu mikroorganizmalarla buluşturulması şeklinde yapılan işleme bio-priming denilmektedir. (Nancy ve ark., 1997). Bu işlemin kullanım amacının temelinde stres faktörleri vardır. Priming uygulamaları ise mevcut çeşitlerin potansiyel dayanıklılığını arttırmak için yapılan bazı ön uygulamaları içermektedir. Priming, normal ve stresli koşullar altında çimlenmeyi artırır. Çimlenme ile ilgili metabolitlerin artan sentezine bağlı olarak erken ve tek tip çimlenmeye neden olur. Bu uygulamalar hem tohum hem de fide aşamasında gerçekleştirilebilmektedir (Saboor ve ark., 2019). Tohum biyopriminginin birincil amaçları arasında tohumların uygun şekilde çimlenmesi, toprak kaynaklı patojenlerin yönetimi, kök rizosferinin kolonizasyonu yer almaktadır (Keswani ve ark., 2014).

Yaşamlarının en azından bir kısmını bitki gövdesi içinde hastalık belirtisi göstermeden geçiren ve çok sayıda mekanizma ile bitkilerin daha iyi büyümesine yardımcı olan mikroplara endofitler denilmektedir. Endofitler, bitki büyümesini destekleyen endofitik bakteriler (PGPEB) ve bitki büyümesini destekleyen endofitik mantarlar (PGPEF) olarak kategorize edilmektedir. Endofitler

doğada her yerde bulunur ve her tür bitki üzerinde kolonileşmektedir (Santoyo ve ark., 2016; Tsavkelova ve ark., 2016). Endofitler, üretim ve rekabeti kapsayan çeşitli mekanizmalar yoluyla bitkinin rizosfer mikroorganizmaları tarafından daha iyi büyümesine yardımcı olmaktadır. Yaygın olarak kabul edilen bu mekanizmalar arasında belirli hormonların salınması, azot fiksasyonu, fosforun çözüldürülmesi ve demirin tutulması yer almaktadır.

Dolaylı mekanizmalar arasında patojenik mikroplarla fiziksel ve kimyasal rekabet, indüklenmiş sistemik direnç, 1-aminosit klopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz ve siderofor üretimi (Santoyo ve ark., 2016; Altınkaynak ve Özkoç, 2020) bildirilebilir. Geleneksel yöntemler genellikle bakterilerin ekimden önce tohuma girmesi için uygun koşullar sunmamaktadır. Mikrobiyal tohum hazırlama, bio-priming, potansiyel olarak istenen mikropların tohumlara olası uygulaması için araştırılmış ve olumlu sonuçlanmıştır (Mahmood ve Kataoka, 2019). Eşitken ve ark. (2004), *Orchis palustris* tohumlarının simbiyotik çimlenmesi üzerine priming işleminin etkilerini araştırmış ve düşük su potansiyellerinin olumlu etkisi olduğunu tesbit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise, daha önceki çalışmalardan farklı olarak *Orchis sancta* L. tohumları kullanılarak daha önce farklı orkide tohumlarından izole ettiğimiz hem endofitik bakteri ve hem de endofitik fungusları ile bunların biyopriming işleminin sonuçlarının değerlendirilmesi ve tohum çimlenme ve gelişme sürecinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada *Orchis sancta* L. tohumları bitki materyali olarak kullanılmış ve söz konusu tohumlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Mikroorganizmaların kültürünün yapılması ve tohum çimlendirme çalışmaları sırasında Patates Dektroz Broth (PDB), Patates Dektroz Agar (PDA), Nutrient Agar (NA) ve Modifiye Yulaf Ortamı (MYO) gibi bazı kültür ortamları kullanılmıştır (Samson ve ark., 1995; Ogoshi ve ark., 1990; Çebi Kılıçoğlu, 2009).

Deneylerde kullanılacak olan *Orchis sancta* tohumlarına canlılık (Tetrazolium) testi (Acemi ve Özen, 2019) uygulamış ve tohumların canlılık durumları tesbit edilmiştir. Tohumlara biyopriming işlemi uygulanmadan önce, yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. İşlem sırasında ependorf tüplerindeki tohumlara, önce 1 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek 1 dakika vortekslenmiş ve 6750 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 1 ml 1/5 çamaşır suyu ve üzerine 1 veya 2 damla Tween 80 ilave edildikten sonra tekrar vortekslenerek 5 dk 6750 rpm'de santrifüj edilmiştir. Her bir ependorftaki tohum örneğini birkaç dakika olacak şekilde üç kez steril saf sudan geçirmek suretiyle tohum sterilizasyonu tamamlanmıştır.

Daha sonra sterilizasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını test etmek için steril PDA ve NA besi ortamlarına ekilmiş ve 35°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Birkaç gün sonra kontaminasyon olup olmadığı gözlemlenmiştir (Acemi ve Özen, 2019).

Çalışmada kullanılmış olan bakteri ve funguslar daha önceki laboratuvar çalışmalarında kullanılmış olan stok besiyerlerinde muhafaza edilen fungus ve bakterilerden seçilmiştir. Öncelikle funguslar PDA ortamına, bakterilerde NA ortamına aktarılmış ve mikroorganizmaların saflıkları test edilmiştir. Daha sonra saflıkları kontrol edilen kültürlerin, bakteriler için Nutrient Broth, Funguslar için PDB besi ortamlarında üretilmesi sağlanmıştır. Tohumların çimlenmesine katkı sağlaması düşünülen bakteri ve fungus örneklerini belirleyebilmek için 5 çeşit bakteri örneği ve 3 çeşit fungus örneği kullanılmıştır (Çizelge 1).

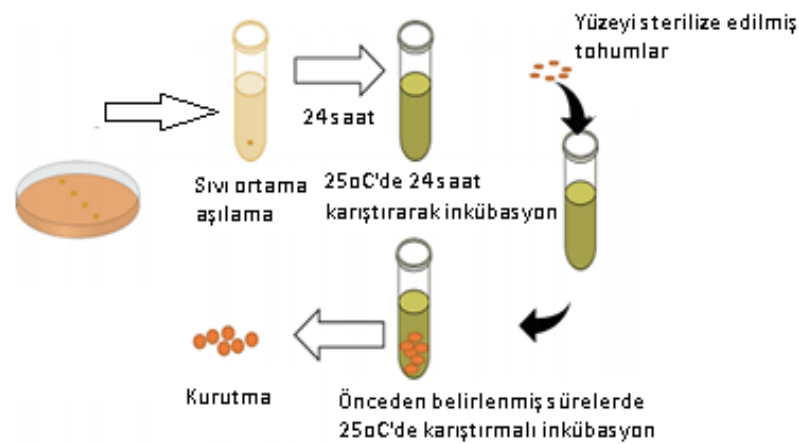
Çizelge 1. Çalışmada kullanılan bakteri ve funguslar

Organizma	Türü	Özellikleri			IAA µg/ml	Literatür
		ACC	Fosfat	Çöz.		
Bakteriler	Endofit					
1	HA13	<i>Bacillus toyonensis</i>	-	-	17.1	(Altınkaynak ve Özkoç, 2020)
2	HA25	-	+	+	18.4	(Altınkaynak ve Özkoç, 2020)
3	HA29	-	-	+	10	(Altınkaynak ve Özkoç, 2020)
4	HA47	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	<10	(Altınkaynak ve Özkoç, 2020)
5	HA112	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	17.1	(Altınkaynak ve Özkoç, 2020)
6	HA116	-	-	-	15.2	(Altınkaynak ve Özkoç, 2020)
Funguslar						
7	VY13	<i>Ceratobasidium</i> sp.	Endofit			(Özkoç ve ark., 2015)
8	VY14	<i>Epulorhiza</i> sp.	Endofit			

Her bir mikroorganizma ayrı ayrı steril ependorf tüplerinde tohumlarla buluşturulmuştur. Daha sonra sıvı bakteri kültürleri kendi aralarında kombinasyonlarla Şekil 1 karıştırılarak, sıvı fungus kültürleri kendi aralarında kombinasyonlarla Şekil 2 karıştırılarak ve en son bakteri-fungus karışımları yapılarak steril ependorf tüplerinde tohumlarla buluşturularak hibrit bir tohum kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Kontrol grubu olması açısından bir grup tohuma mikroorganizma kaplama işlemi uygulanmamıştır. Oluşturulan tüpler 1 gün süreyle ependorf tüplerinde inkübasyona bırakılmış ve tohumların mikroorganizmalarla kaplanması sağlanmıştır. Kaplama işlemi yapılırken tohumların mikroorganizmalarla ependorf tüplerinde buluşturulması steril kabin içerisinde aseptik kurallara uyularak yapılmıştır.

Ependorf tüplerinde 1 gün inkübe edilerek kaplanması sağlanan tohumların laboratuvar ortamında çimlenmesinin kontrol edilebilmesi için modifiye yulaf ortamına aşılama yapılmış ve 25°C ve 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlığa ayarlanmış iklim odasında 60 gün boyunca inkübe edilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış olup elde edilen çimlenme değerlerinin aritmetik ortalaması alınmıştır.

Tohumlar, 45 günlük bir inkübasyon süresinin sonunda, 20 kat büyütme altında stereo mikroskop ile gözlemlenerek sayılmıştır. Petri kapları, saymayı kolaylaştırmak için 2x2 cm boyutlarında karelere bölünmüştür. Tohumların çimlenme aşamaları Yamazaki ve Miyoshi 2016'ya göre değerlendirilmiştir. Çimlenme yüzdeleri, her ortam için aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. Tohum hazırlama yoluyla laboratuvar ölçekli endofitik bakteri uygulamasının şematik gösterimi



Şekil 2. Laboratuvar ölçekli endofitik mantar uygulamasının şematik gösterimi

Büyük ölçekli uygulama için sıvı süspansiyon salin tamponu veya su içerebilir.

Çimlenme yüzdesi (%) = $\frac{\Sigma \text{Tohum sayısı (Aşama 2-5)}}{\Sigma \text{Tohum sayısı (Aşama 0-5)}} \times 100$

Petri kabı başına bir miligram tohum ($\approx 180-200$ tohum) kullanılmıştır. Her deney, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Tohum çimlenme ve canlılık verileri ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. Ortalamalar Duncan'ın Çoklu Aralık Testi (DMRT) kullanılarak $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics yazılımı, versiyon 21 kullanılmıştır (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, ABD).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim, bitki için tarımsal ürünlerin, sürdürülebilir bir şekilde üretilmesine yardımcı olan çeşitli hizmetler sunmaktadır. Bitki ve mikrobiyom arasındaki rizosferik etkileşimler, toprağın verimliliğini, bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve verimini etkiler. Tüm faktörler arasında, bitki mikrobiyom etkileşimini artırabilecek en etkili faktör, toprak mikroorganizmalarının, toprağın ve bitki köklerinin birbirleriyle etkileştiği "rizosferin" toprak mikrobiyal topluluğudur. Tohum, tarımın ve diğer tüm tarımsal girdilerin etkinliğinin artırılmasında itici güçtür, sulama, gübreler ve bitki koruyucu maddeler ve insan emeği kaliteli tohum kullanımına bağlıdır. Tohum, gelişmiş teknolojilerin sağlanması için bir araçtır ve çeşitli hibritlerin, doğal genetik potansiyellerini tasvir etmek için bir aynadır (Gosal ve Kaur, 2017).

Tohumu geliştirmek, "çimlenme veya fide büyümesini artıran veya ekim sırasında gerekli tohum ve diğer malzemelerin verilmesini kolaylaştıran hasat sonrası işlemler" olarak tanımlanabilir. Tohum hazırlama, tohumlar geri verildiğinde daha hızlı çimlenmeye neden olan kontrollü bir hidrasyon (suya batırma) ve kurutma tekniğidir.

Tohum hidrasyonu ve tohumların faydalı mikroorganizmalar ile aşılması kombinasyonunu ifade eden, bir biyolojik tohum muamelesi işlemidir. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler ve mantarlar zirai kimyasalların kullanımını azaltabilir ve bitki verimini, beslenmesini, biyotik-abiyotik streslere karşı toleransı ve tohumların çimlenme potansiyelini artırabilir. Biyoprimer tohumları korumak için tohumların aşılması gibi biyolojik yönleri, hastalıkları kontrol altına almak için yararlı organizma ve hidratlandırılan tohum gibi fizyolojik yönleri birleştiren ekolojik bir yaklaşımdır. Bu yeni tohum muamelesi trendi, faydalı mikroorganizmalar ile kontrollü hidrasyonu ve çimlenme öncesi hazırlık süreçlerinin geliştirilmesini içerir (Sukanya ve ark., 2018).

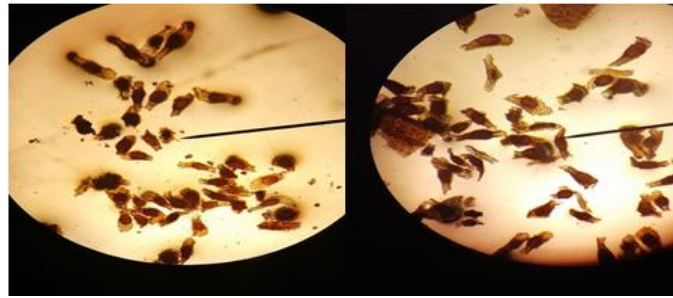
Çalışmada kullanılan tohumlar *Orchidaceae* familyasına ait *Orchis sancta* türünden seçilmiştir. Tohumlar canlılık testine geçmeden önce bu tip çalışmalarda olduğu gibi yüzeysel dezenfeksiyon işlemleri yapılmış ve tohumların yüzeysel dezenfeksiyonu için en uygun işlemin % 70'lik etil alkolde 1 dakikalık % 1'lik NaHCl solüsyonunda da 5 dakikalık işlem olduğu tesbit edilmiştir. Bu işlemleri

uygularken Acemi ve Özen, (2019)'in yüzeysel dezenfeksiyon uygulamaları kullanılmıştır. Yüzeysel dezenfeksiyonu yaptıktan sonra, tohumlar öncelikle canlılık değerlendirmesi açısından Tetrazolium testine tabii tutulmuş (Pradhan ve ark., 2022) ve tohum canlılığının % 98 olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 3).

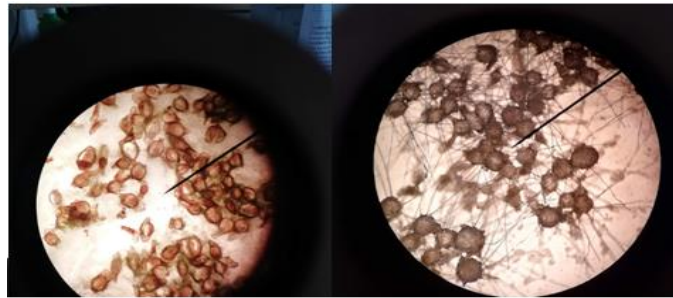
Tohumların yüzeysel dezenfeksiyonu ve canlılık oranlarını belirledikten sonra, bu çalışmanın hipotezini oluşturan biyopriming (Biyönhazırlama) işlemlerine geçilmiştir. Tohum hazırlama (Seed priming), çimlenmeden önce tohumlara doğal ve sentetik bileşiklerin işlenmesiyle bitkilerde belirli bir fizyolojik durumun indüklenmesidir. "Biyopriming" olarak adlandırılan mikrobiyal aşılama ile tohum hazırlama, çeşitli mahsullerin tekdüzeliğini, oluşumunu ve büyümesini artıran tohumlara bakteriler, mantarlar aktinomisetler gibi faydalı mikropların uygulanmasını içerir (Kumar ve ark., 2020).

Çalışmada kullanılan bakteri ve fungusların sıvı kültürleri yapılmış ve bunlar steril tohumlara uygulanarak bu şekilde 1 gece inkübe edildikten sonra tohumların bir gün boyunca kuruması ve bu şekilde tohumların kurutulması sağlandıktan sonra bu tohumlar MYO'na aşılanmıştır.

Tohumların çimlenmesine katkı sağlayacağı düşünülen endofitik bakteri ve fungus örnekleri daha önceki çalışmalardan (Altınkaynak ve Özkoç, 2020 ve Yayınlanmamış veri) seçilerek kullanılmıştır. Bu amaçla 5 bakteri ve 3 fungus izolatu kullanılmış ve bu organizmalar tek tek ve kombinasyonlar halinde uygulanmıştır. Bakteriler tohumlara uygulandıktan sonra, 2. ve 5. haftada çimlenme oranları (%) belirlenmiştir (Çizelge 2; Şekil 4).



Şekil 3. Tohumların canlılık testi



Şekil 4. Çimlenmiş *O.sancta* tohumları

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan bakteri ve funguslar

Tohumlara kaplanan bakteriler	Çimlenme oranları (%)	
	2.Hafta	5.Hafta
1 Kontrol	19.33±2.31 c	69.33±2.31 b
2 <i>Bacillus toyonensis</i> HA13	30.33±6.30 ab	70.00±3.46 b
3 <i>Pseudomonas</i> sp. HA47	30.33±3.51 ab	78.66±3.05 a
4 <i>Bacillus thuringiensis</i> HA112	28.67±5.51 ab	78.00±4.00 a
5 HA 116	25.66±3.05 bc	69.00±5.57 b
6 <i>B. thuringiensis</i> H112+ <i>B.toyonensis</i> H13	35.00±2.64 a	81.00±4.58 a
7 <i>B. thuringiensis</i> HA112+ <i>B.toyonensis</i> HA13+ <i>Pseudomonas</i> sp. HA 47	33.33±1.15 a	79.67±2.51 a

Diğer bir çalışma grubunda ise bakteri ve funguslar ve bunların kombinasyonları denenmiştir (Çizelge 3). Fungus karışımı ve bakteri-fungus karışımı ile bazı bakteri uygulamalarının kontrole göre

daha etkili olduğu tesbit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 3,4,6 ve 7 bakteri uygulamalarının kontrole göre farklı (daha iyi) olduğu görülmektedir. Bu organizmaların özellikleri incelendiğinde bunların ACC, Fosfat çözünürlüğü ve IAA sonuçlarının daha iyi olduğu görülmektedir. Biyotohum hazırlama işleminin, birçok bitki ve süs bitkisinde, özellikle bitki patojenleri ile istila edilmiş topraklarda, özellikle elverişsiz toprak koşullarında, çimlenmeyi hızlandırmaya ve fide oluşumunu iyileştirmeye yardımcı olan bir işlemdir (Taylor ve Harman, 1990; Rush, 1991; Halmer, 2000).

Bazı endofitik bakteri ve fungusların tek tek ve birlikte tohum hazırlama işlemine katıldığında, işlemlerin tümünde çimlenme değerleri kontrole göre farklı yani daha iyi olduğu tesbit edilmiştir.

Çizelge 3. Çimlenme Üzerine Endofitik Bakteri ve Fungus Etkileşimlerinin Etkisi

	Mikroorganizmalarla kaplanan tohumlar	Çimlenme oranları (%)			
		1.Hafta	2.Hafta	4. Hafta	5. Hafta
1	Kontrol	6.00±2.00 b	23.67±1.53 d	59.67±2.08 c	68.00±3.61 d
2	VY13 endofitik fungus- <i>Ceratobasidium</i> sp.	9.67±2.52 ab	30.33±2.52 bc	72.00±4.58 b	80.00±1.00 bc
2	VY14 endofitik fungus <i>Rhizoctonia</i> sp.	12.00±2.00 a	35.00±1.00 ab	73.67±5.51 b	84.00±2.65 ab
3	HA25 endofitik bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.	10.67±2.52 a	24.67±3.06 d	69.33±2.31 b	81.00±3.61 bc
4	HA29 endofitik bakteri	10.33±2.08 a	28.00±4.00 cd	70.00±4.00 b	77.33±3.06 c
6	Fungus karışımı	10.33±1.53 a	36.00±2.00 a	75.33±2.52ab	84.33±4.04 ab
7	Bakteri + Fungus karışımı	10.67±2.31 a	32.33±4.51 abc	81.33±4.16 a	88.67±4.16 a

VY14 nolu izolatin daha etkili olduğu, karışımların etkisini değerlendirdiğimiz de ise, bakteri+fungus karışımının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Eşitken ve ark, (2004), *Orchis palustris* tohumlarının sadece fungal izolatlarla simbiyotik çimlenmesi üzerine priming işleminin etkilerini araştırmış ve düşük su potansiyellerinin olumlu etkisi olduğunu tesbit etmişlerdir.

SONUÇ

Bu çalışmada, *Orchis sancta* tohumlarına daha önceki çalışmalarımızda izole ettiğimiz endofitik bakteri ve endofitik funguslar biyoprimering (tohum hazırlama) amaçlı olarak uygulanmıştır. Bakteriyel izolatlardan PGPR özellikleri fazla olan ile funguslardan VY 14 nolu izolatin daha etkili olduğu, ancak en etkili işlemin bakteri ve fungus karışımıyla elde edildiği tesbit edilmiştir. Bu sonuçlardan bitkinin daha sağlıklı gelişimi açısından uygun mikrobiyomun belirlenmesinin önemi de ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, hem endofitik fungus hem de endofitik bakterilerin priming yoluyla uygulanması ve bu uygulamaların sinerjistik etkileriyle ilgili ilk yayındır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma OMÜ BAPKOP PYO.FEN.1904.21.008 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlardan İbrahim Özkoç ve Mustafa Bilgi'nin katkısı daha fazladır.

KAYNAKLAR

Abd El Baky, H., A Nofal, O., & S El Baroty, G. (2016). Enhancement of antioxidant enzymes activities, drought stress tolerances and quality of potato plants as response to algal foliar application. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 8(1), 70-77.

- Abhilash, P. C., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 847-850.
- Acemi, A., & Özen, F. A. Z. I. L. (2019). Optimization of *in vitro* asymbiotic seed germination protocol for *Serapias vomeracea*. *Eurobiotech Journal*, 3.
- Altinkaynak, H., & Ozkoc, I. (2020). Isolation and molecular characterization of plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of orchids in Turkey. *Rhizosphere*, 16, 100280.
- Çebi Kılıçoğlu M 2009. Karadeniz Sahil Şeridinde Fasulye Bitkisi ve Rizosfer Bölgesinden İzole Edilen Multinükleat *Rhizoctonia spp*'nin Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Eşitken, A., Ercişli, S., Eken, C., & Tay, D. (2004). Seed priming effect of sybiotic germination and seedling development of *Orchis palustris* Jack. *Hortscience*, 39(7), 1700-1701.
- Gosal, S. K., & Kaur, J. (2017). Microbial inoculants: a novel approach for better plant microbiome interactions. *Probiotics in agroecosystem*, 269-289.
- Halmer, P. (2000). Commercial seed treatment technology. *Seed Technology and Its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, England, 257-286.
- Kaur, S., Dhaliwal, L., & Kaur, P. (2008). Impact of climate change on wheat disease scenario in Punjab. *Journal of Research*, 45(3-4), 161-170.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma spp*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 533-544.
- Kumar, A., Droby, S., White, J. F., Singh, V. K., Singh, S. K., Zhimo, V. Y., & Biasi, A. (2020). Endophytes and seed priming: agricultural applications and future prospects. In *Microbial endophytes* (pp. 107-124). Woodhead Publishing.
- Mahmood, A., & Kataoka, R. (2019). Application of endophytes through seed priming. *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings: Implication in Plant Stress Tolerance and Enhancing Productivity in Crop Plants*, 509-521.
- Nancy, KB., Vavrina, CS., & Kloepper, JW. (1997). Amendment of Muskmelon and Watermelon Transplant Media with Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Effects on Seedling Quality, Disease and Nematode Resistance, *Hort technology*, 13(3): 476-482
- Ogoshi, A., Cook, R. J., & Bassett, E. N. (1990). *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80(9), 784-788.
- Özkoç, I., & Dalcı, M. (1993). Germination of the seeds *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo') Gölz et. Reinhard (Orchidaceae) through asymbiotic culture techniques. *Turkish Journal of Biology*, 17, 5-11.
- Özkoç, İ., & Özdener, Y. (1997). Bazı Orkidelerde Mikrorizal Fungusların (*Rhizoctonia Spp.*) Tesbiti.
- Özkoç, İ., Kömpe Özdener, Y., & Mutlu Akın, V. (2015). *Spiranthes spiralis* Funguslarının Moleküler Tekniklerle Tanımlanması ve Tohum Çimlenmesi Üzerine Bu Fungusların Etkileri, Tubitak 1002 Projesi, Proje No: 113Z849.
- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical studies*, 63(1), 1-14.
- Rush, C. M. (1991). Comparison of seed priming techniques with regard to seedling emergence and Pythium damping-off in sugar beet. *Phytopathology*, 81(8), 878-882.

- Saboor, A., Mustafa, G., Arshad, M., Ahmad, M., Hussain, S., Ahmed, N., ... & Ali, M. A. (2019). Seed priming and metal/metalloid stress tolerance in plants. *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings: Implication in Plant Stress Tolerance and Enhancing Productivity in Crop Plants*, 287-311.
- Samson, A. R., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1995). Introduction to Food-Borne Fungi p. 64. *CBS, The Netherlands*.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.
- Sezik, E. (1984). Orkidelerimiz Türkiye'nin Orkideleri, Sandoz Kültür Yayınları No 6, Güzel Sanatlar Matbaası AS. *Istanbul. Tekinşen, KK, Güner, A.(2010). Chemical Composition And Physicochemical Properties Of Tubera Salep Produced From.*
- Sukanya, V., Patel, R. M., Suthar, K. P., & Singh, D. (2018). An overview: Mechanism involved in biopriming mediated plant growth promotion. *Int. J. Pure Appl. Biosci*, 6(5), 771-783.
- Taylor, A. G., & Harman, G. E. (1990). Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annual review of phytopathology*, 28(1), 321-339.
- Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Leontieva, M. R., Malakho, S. G., Kolomeitseva, G. L., & Netrusov, A. I. (2016). *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant Growth Regulation*, 80, 79-91.

Atf İçin: Karaismailoğlu, M.C. (2023). *Thlaspi harungalipii* (Brassicaceae), Türkiye'den Yeni Bir Tür. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4): 2485-2494.

To Cite: Karaismailoğlu, M.C. (2023). *Thlaspi harungalipii* (Brassicaceae), A New Species from Türkiye. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4): 2485-2494.

Thlaspi harungalipii (Brassicaceae), Türkiye'den Yeni Bir Tür

Mehmet Cengiz KARAİSMAİLOĞLU^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Türkiye'nin güneyinden yeni bir bitki türü keşfedilmiştir.
- Yeni türün cins içerisindeki filogenetik ilişkileri tartışılmıştır.
- Yeni türün IUCN kategorisi belirlenmiştir.

ÖZET:

Thlaspi harungalipii sp. nova (Brassicaceae) Türkiye'nin güneyinden betimlenmiş ve resimlenmiştir. Bu takson, çiçek ve meyve karakterlerinde açıkça farklılık gösterdiği *T. violascens* ile benzerdir. Bu çalışmada, yeni türün nükleer kodlu ribozomal iç transkripsiyonlu ayırıcı bölgesine dayalı olarak cins içindeki filogenetik ilişkileri ve tohum mikromorfolojik ve anatomik karakterleri belirlenmiştir. Ayrıca, yeni türün IUCN kategorisi tartışılmış ve dağılımı haritalanmıştır.

Anahtar Kelimeler:

- Brassicaceae
- Cruciferae
- ITS
- *Thlaspi*
- Taksonomi

Thlaspi harungalipii (Brassicaceae), A New Species from Turkey

Highlights:

- A new plant species has been discovered from southern Turkey.
- The phylogenetic relationships of the new species within the genus are discussed.
- The IUCN category of the new species has been determined.

ABSTRACT:

Thlaspi harungalipii sp. nova (Brassicaceae) is described and illustrated from Southern of Turkey. This taxon is similar to *T. violascens*, from which it clearly differs in flower and fruit characters. In this study, the seed micromorphological and anatomical characters, and phylogenetic relations within the genus based on the nuclear-encoded ribosomal internal transcribed spacer region of the new species are determined. Furthermore, the IUCN category of the new species is discussed, and its distribution is mapped.

Keywords:

- Brassicaceae
- Cruciferae
- ITS
- *Thlaspi*
- Taxonomy

¹ Mehmet Cengiz KARAİSMAİLOĞLU ([Orcid ID:0000-0002-6856-2742](https://orcid.org/0000-0002-6856-2742)), Bartın University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Bartın, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Cengiz KARAİSMAİLOĞLU, e-mail: mkaraismailoglu@bartin.edu.tr

INTRODUCTION

The genus *Thlaspi* L. sensu lato (s. lato) is one of the biggest genera of the family Brassicaceae, and is represented by 75 taxa worldwide (Appel & Al-Shehbaz, 2003). Problems with the classification of *Thlaspi* s. lato continue to persist. The 12 genera separation of *Thlaspi* s. lato was suggested (Meyer, 1973; Meyer, 1979) (*Thlaspi* F.K. Mey. sensu stricto, *Callothlaspi* F.K. Mey., *Kotschyella* F.K. Mey., *Neurotropis* (DC.) F.K. Mey., *Microthlaspi* F.K. Mey., *Noccaea* Moench, *Thlaspiceras* F.K. Mey., *Syrenopsis* Jaub. & Spach, *Atropatenia* F.K. Mey., *Vania* F.K. Mey. *Noccidium* F.K. Mey., and *Masmenia* F.K. Mey.), which was mostly based on seed-coat anatomy. As a result, only 6 taxa were stated within the genus (sensu stricto).

Meyer's classification was not accepted by many researches because of limited taxonomical use (Greuter & Raus, 1983; Greuter et al., 1986; Al-Shehbaz, 1986; Appel & Al-Shehbaz, 2003). Some molecular phylogenetic research have shown that the generic restriction in *Thlaspi* previously (Meyer, 1973) was obviously unusual (Mummenhoff & Zunk, 1991; Mummenhoff & Koch, 1994; Mummenhoff et al., 1997a; Mummenhoff et al., 1997b; Koch et al., 1998; Koch & Mummenhoff, 2001; Koch & Al-Shehbaz, 2004; Al-Shehbaz et al., 2006; Koch et al., 2007). As the result of family-wide molecular phylogenetic studies (Khosravi et al., 2009; Warwick et al., 2010), it was reported that 10 genera were separated from *Thlaspi* s. lato (Meyer, 1973) and added to *Noccaea*. Subsequently, these genera were reduced as the synonymy of *Noccaea* (Al-Shehbaz, 2014). Notwithstanding numerous studies on the infrageneric and interspecific taxonomy of the genus, problems with classification have not yet been clarified.

In this controversial case, most of the performed molecular phylogenetic studies were based on herbarium materials, which usually consisted of incomplete samples or a single repeatless sample, and these investigations were sufficiently deprived of fieldwork. However, the main priority in systematics has exactly followed the developmental stages of plants and a perfect diagnosis. In addition, the research performed contained few samples from Turkey, which is a diversity center for the genus. Moreover, the presence of many endemic taxa is in doubt because of the unknown ripe fruit or flowering cases in Turkey. Hence, all assessments made on the genus must be renewed in line with detailed field work, especially those in Turkey (Karaismailoğlu, 2018).

Al-Shehbaz (2014) performed a synopsis of the genus *Noccaea* having transferred many *Thlaspi* taxa to this genus. However, successive comprehensive studies on the genus in Turkey including morphological, anatomical, palynological, cytological and molecular data have showed that taxa in the sections *Nomisma*, *Thlaspi* and *Pterotropis* should be considered under the genus *Thlaspi* (Karaismailoğlu, 2018; Karaismailoğlu & Erol, 2018; Karaismailoğlu & Erol, 2019; Karaismailoğlu & Erol, 2020; Karaismailoğlu & Fidan, 2021; Karaismailoğlu et al., 2022).

In this paper, the specimens of *Thlaspi* taken from Dumanlı Mountain (Province of Osmaniye, southern Turkey) were analyzed by utilizing the extensive literature (Post, 1893; Hedge, 1965; Meyer, 1973; Meyer, 1979; Meyer, 1991; Meyer, 2001; Meyer, 2003; Meyer, 2006; Greuter & Raus, 1983; Greuter et al., 1986; Davis et al., 1988; Clapham & Akeroyd, 1993; Artelari, 2002; Al-Shehbaz, 2012; Al-Shehbaz, 2014; Özgüşi et al., 2018; Güzel et al., 2018). The investigation revealed that the specimens have unique features and are therefore suggested by the author as a new species, *T. harungalipii*.

MATERIALS AND METHODS

The specimens were collected by the author in April 2015 and May, Jun, and July 2016-2019 during field trips to Dumanlı Mountain in the province of Osmaniye, in southern Turkey. The

specimens of the assumed new taxon were collected from 2 areas near each other and stored in the SUFAF herbarium and M.C. Karaismailoğlu collection. At first sight, due to resemblances in the overview, like the stems, basal and cauline leaves, and some flower characters, the specimens appeared to be similar to *Thlaspi violascens*. The collected specimens were compared with the key supplied by Hedge (1965) (Table 1). They were crosschecked with the related taxon (*T. violascens*) deposited in the ISTE, ISTF, ISTO, and ANK herbaria (Thiers, 2016). Images of the live material in nature were taken with a Canon EOS 650d digital camera (Figure 1).

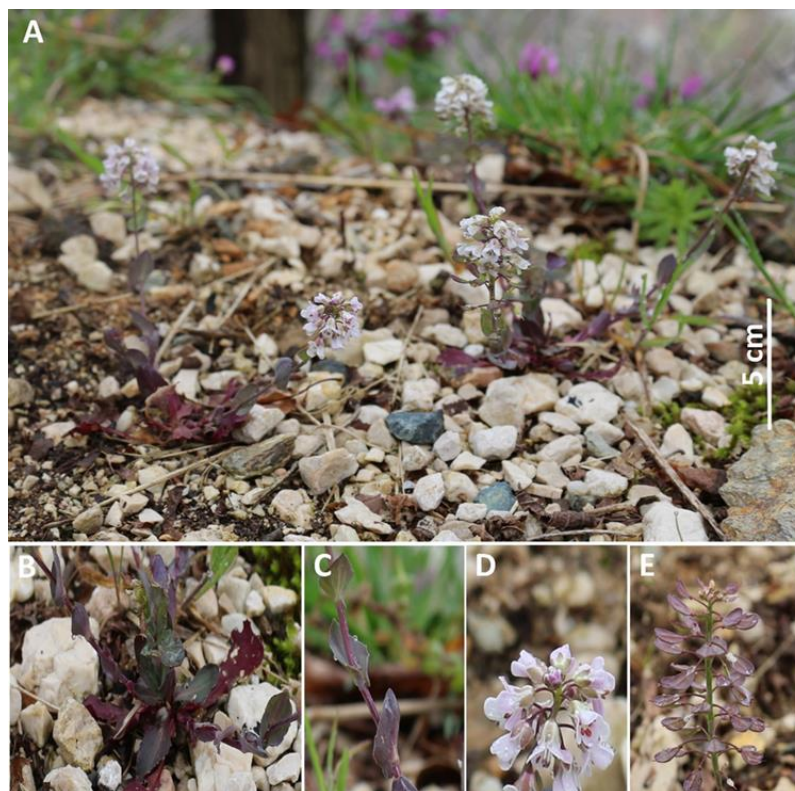


Figure 1. *Thlaspi harungalipii*; **A:** Habitat, **B:** Basal leaves, **C:** Cauline leaves, **D:** Flowers, **E:** Siliculae and pedicels

Macromorphological examinations, such as fruit and seed features, were performed using an Olympus ZS51 stereomicroscope and Kameram Imaging Software (Figure 2).

For the micromorphological examinations, seeds obtained from the specimens were analyzed using a scanning electron microscope (JEOL Neoscope-5000) by mounting them to a table with silver adhesive, and covering them with gold (Karaismailoğlu, 2016) (Figure 3).

For the anatomical investigations, cross sections of the seeds were taken using a fully automatic microtome (Thermo Shonda Met Finesse). Next, they were passed through a variety of alcohol and xylene series, dyed with hematoxylin and Eosin-Y in a staining device (ASC 720 Medite), and covered with Entellan to observe the anatomical structures (Karaismailoğlu, 2015) (Figure 4). The anatomical characters were observed using an Olympus CX21FS1 microscope and Kameram Imaging Software.

DNA extractions, ITS region amplification and sequencing process and bioinformatic analysis of sequences of the new species have been performed according to Karaismailoğlu et al. (2022) (Sequence of the ITS region of *Thlaspi harungalipii*:
 CTTGGTTCCAAACAGAACGACCCGAGAACGATTGATCATCACTCTCGGCGGGCCGGTTTC
 TTATCCGATTCTGTGCCCGCCGATTCCGTGGTTTTGCGAGTGGTTCGATCAAGATTTTAA
 TCCTGATTGGGCTATGAGCTTAGCTTTCGGAAATTCACAAAACCACGGCACGATAAAGTG
 TCAAGGAACATGCAACTAAACAGCCTGCTTCCGCCGCCCTGGAAACGGTGAGTGTGCGGG

ATGCTGTGCTGCGATCTAAAGTCTAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGC ATCGATGAAGAACGCAGCACAG). Total genomic DNA was acquired from leaves in accordance with the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method advanced by Karaca et al. (2005). The amount of DNA was made utilizing a Thermo NanoDrop® Spectrophotometer. The ITS2 region sequences were gained from the genomic DNA was utilized as a template to intensify the ITS region with a MiniAmp Plus. Thermal Cycler device utilizing the primer pairs UniPlantF (5'-TGTGAATTGCARRATYCMG-3') and UniplantR (5'-CCCGHYTGAYYTGRGGTDC-3') (Moorhouse-Gann et al., 2018). PCR was organized in 25 µL volumes using the following reaction fundamentals: 3 µL template DNA, 11.25 µL water, 2.5 µL 10X buffer, 1 µL each of primers (50 ng µL⁻¹), 4 µL MgCl₂ (2.5 mM), 1 µL dNTP mix (0.25 mM), 0.25 µL Taq DNA polymerase and 1 µL bovine serum albumin (BSA). Purification and sequencing were outsourced to Genoks. Also, the ITS sequences of 22 *Thlaspi* s.lato taxa belonging to the sections *Nomisma*, *Thlaspi* and *Pterotropis* were taken from Karaismailoğlu et al. (2022)'s results. Afterward, the first and last 30 bases were detached owing to poor quality by means of the BioEdit program (Hall, 2011) and these sequences were not included in the main analysis. The sequences were examined with the Ncbi-Blast algorithm to approve they belong to the examined material. After, it was utilized Mega X version 10.0.05 (Kumar et al., 2018) to perform phylogenetic analyses. The sequences were first loaded and then aligned with the out group, *Aethionema speciosum subsp. compactum*, which included using the base sequence, and Clustal W (Larkin et al., 2007). Bootstrap values for 1000 replicates were obtained in accordance with the maximum likelihood (ML) phylogenetic method (Figure 5).

The geographical locations of the new species were recorded by utilizing a GPS and the distribution in Turkey was mapped according to the grid system (Davis, 1965) (Figure 6). The conservation status of the new taxon was evaluated according to IUCN (2022).

RESULTS AND DISCUSSION

Taxonomic treatment of the new species

Thlaspi harungalipii KARAİSMAİLOĞLU, sp. nova.

Type

Turkey; Osmaniye, Düziçi, Haruniye, Dumanlı Mountain, roadsides, stony slopes, 1200–1300 m, 19. iv. 2015, N 37°16.03, E 036°30.81, Karaismailoğlu 128a (holotype: SUFAF)

Diagnosis

Thlaspi harungalipii clearly differs from *T. violascens* by its stem 8–20 cm tall (vs. 20–30 cm tall), sepals 1–2 mm in length (vs. 2–2.1 mm in length), petals 4–5 mm in length (vs. 3–4 mm in length), anthers reddish or violet, 0.3–0.5 mm in length (vs. black, 0.7–0.9 mm in length), pedicels spreading-descending, 4–6 mm in length (vs. spreading, 7–10 mm in length), siliculae obcordate, 6–7 mm in length (vs. obtriangular, 8–10 mm in length), apical sinus 0.5–1.5 mm in length, style exceeding sinus (vs. 1.5–2 mm in length, stilus not exceeding sinus), septums 0.5–1.5 mm in width (vs. 1.5–2 mm in width), seeds 2–4 in each loculus, ovate, 1.2–1.5 mm in length, surface clearly striped (vs. 4–5 in each loculus, elliptical, 1.5–1.7 mm in length, slightly striped).

Description

Annual or biannual, with slender tap root, herb, single or several-stemmed, 8–20 cm, glabrous, glaucescent. Basal leaves rosette-forming, ovate-oblong, apex obtuse or acute, leaf margins dentate or cuneate, petiolate, 10–30 mm (length) × 5–12 mm (width). Caulin leaves ovate or lanceolate, amplexicaul, with 2 obtuse or acute auricles, apex acute, leaf margin entire or dentate, 8–28 mm × 5–10 mm. Inflorescence raceme or capitate-corymbose, elongating in fruit, raceme length 4–15 cm.

Sepals not saccate, ovate-oblong, apex rotund, broadly membranous-margined green or violet, 1–2 mm × 0.8–1.2 mm. Petals white, ovate or spatulate, apex rotund, 3–5 veins, with an indistinct claw and blade, 4–5.5 mm × 0.8–1.2 mm. Anthers reddish or blackish, elliptic, 0.3–0.5 mm. Filament narrow and linear, 1.2–2 mm. Stigma capitate. Ovary elliptic, 2–3 mm × 0.8–1 mm. Fruiting pedicels 4–6 mm, spreading-descending. Fruit a compressed silicula. Siliculae strongly glaucous, occasionally flushed purplish, narrowly obcordate, 6–7 mm × 3–5 mm. Fruit wings narrow, 0.5–1.5 in width, apex rotund or obtuse. Apical sinus narrow and shallow, 0.5–1.5 mm. Style exceeding sinus, 1–2.5 mm. Septum 5–7 mm × 0.5–1.5 mm. Seeds 2–4 in each loculus. Seeds ovate, brown, 1.2–1.5 mm × 0.8–1.1 mm, striped, not mucilaginous (Figure 2).



Figure 2. Fruit, seed number in loculus and seed of *Thlaspi harungalipii*

Phenology

Flowering from March to April.

Etymology

The name of this new species is given in honor of Harun Galip KARAİSMAİLOĞLU, who is the father of the author, retired worker, farmer, and amateur botanist.

Seed micromorphology

Seed surface ornamentation of the new taxon is reticulate-areolate. Furthermore, seeds have a striped surface. While the anticlinal cell walls are sunken, the periclinal cell walls have a concave structure. Epidermal cells consist of polygonal cells (irregularly penta-hexagonal) (Figure 3). However, *T. violascens* is of the reticulate ornamentation, sunken anticlinal cell wall, concave periclinal cell wall and polygonal epidermal cells (Karaismailoğlu and Erol, 2018).

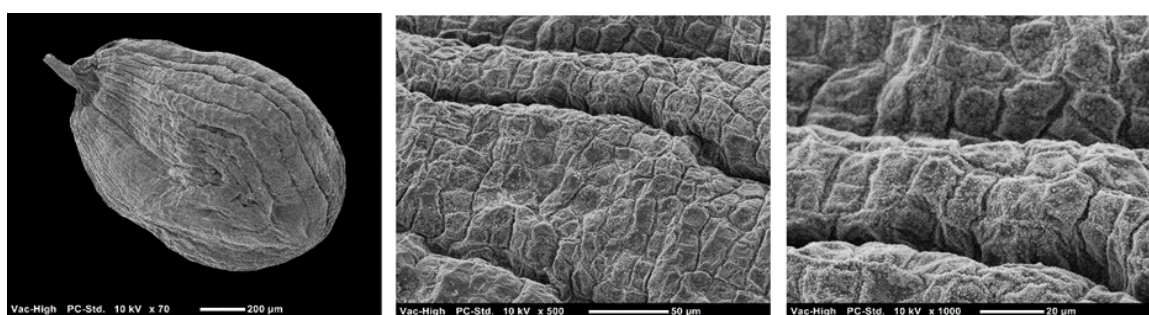


Figure 3. SEM microphotographs of the seed of *Thlaspi harungalipii*

Seed testa anatomy

The seed coat has 2 layers, an outer testa consisting of the outer and inner epidermis layers, and an inner testa consisting of compressed tissue that contains no specialized structures like mucilage cells or protrusions (Figure 4). The outer epidermis consists of flat cells; however, cells in inner epidermis are oblong. The outer testa has a thickness of $48.79 \pm 3.26 \mu\text{m}$. Moreover, there is a parenchyma layer consisting of single flat cells in the innermost part.

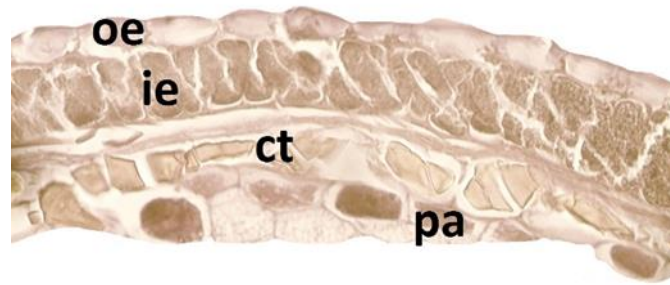


Figure 4. Cross section of *Thlaspi harungalipii* seed coat (**oe**: outer epidermis, **ie**: inner epidermis, **ct**: compressed tissue, **p**: parenchyma, scale bar: 100 µm)

Molecular phylogenetic outcomes

The aligned ITS dataset involved 35 sequences belonging to 24 taxa and was 324 bp long, of which 95 were potentially parsimony informative. The phylogenetic backbone of the ITS tree corresponds to former phylogenetic study dealing with genus (Karaismailoğlu et al., 2022) (Figure 5).

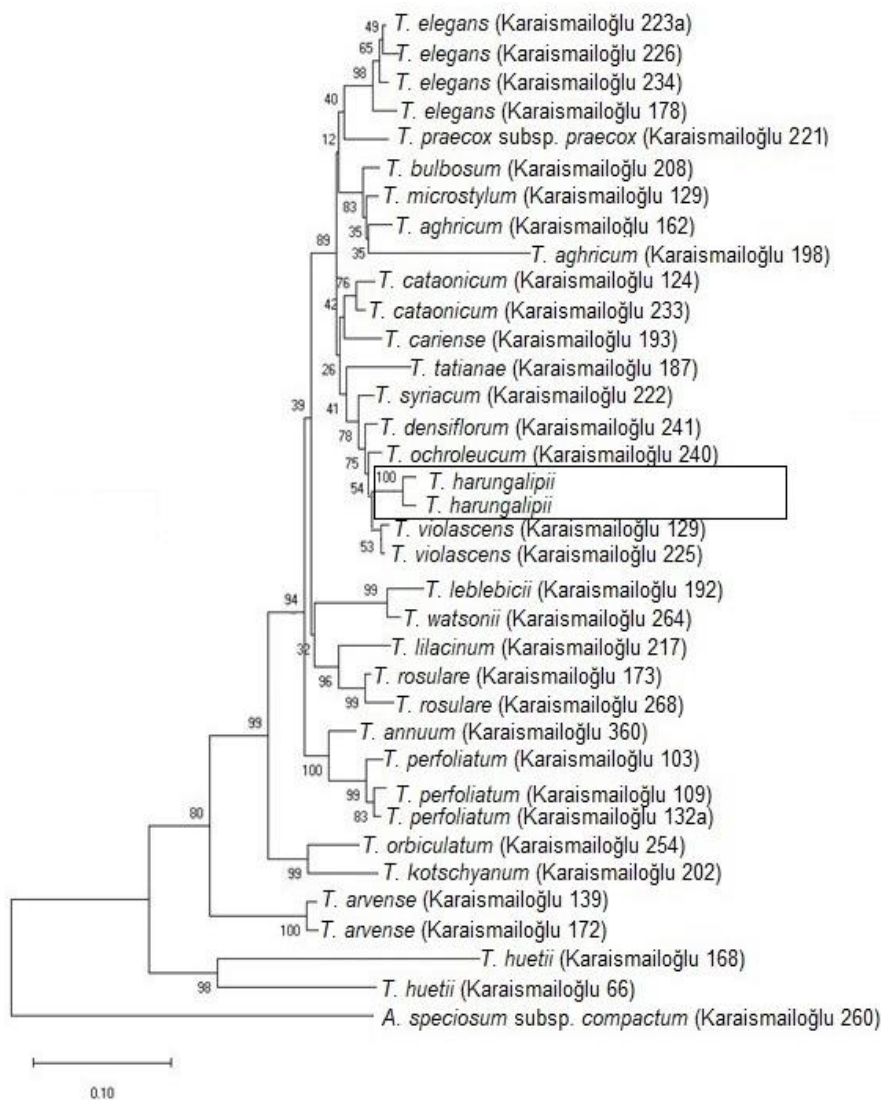


Figure 5. Phylogenetic tree for representatives of the new taxon based on ITS region data. Numbers at nodes show the bootstrap values (The phylogenetic backbone of the ITS tree corresponds to former phylogenetic study dealing with genus (Karaismailoğlu et al., 2022)

All of the samples of *T. violascens* and *T. harungalipii* comprised of a monophyletic group and positioned a sister location to *T. ochroleucum*, *T. densiflorum* and *T. syriacum* concordantly with Karaismailoğlu et al. (2022) (Figure 5).

Distribution

Thlaspi harungalipii shows a very limited distribution in 2 locations from Dumanlı Mountain in the province of Osmaniye (Figure 6). The species was taken from 2 localities on stony slopes and in meadows.

Recommended IUCN category

The spread area of *Thlaspi harungalipii* is less than 2 km². In the occurrence range, approximately 650 individuals were numbered. The grazing influences on the population were not monitored. In the direction of this information, the category of threat for *T. harungalipii* is recommended as 'Critically Endangered' (CR) [criteria B2b] (IUCN, 2022).

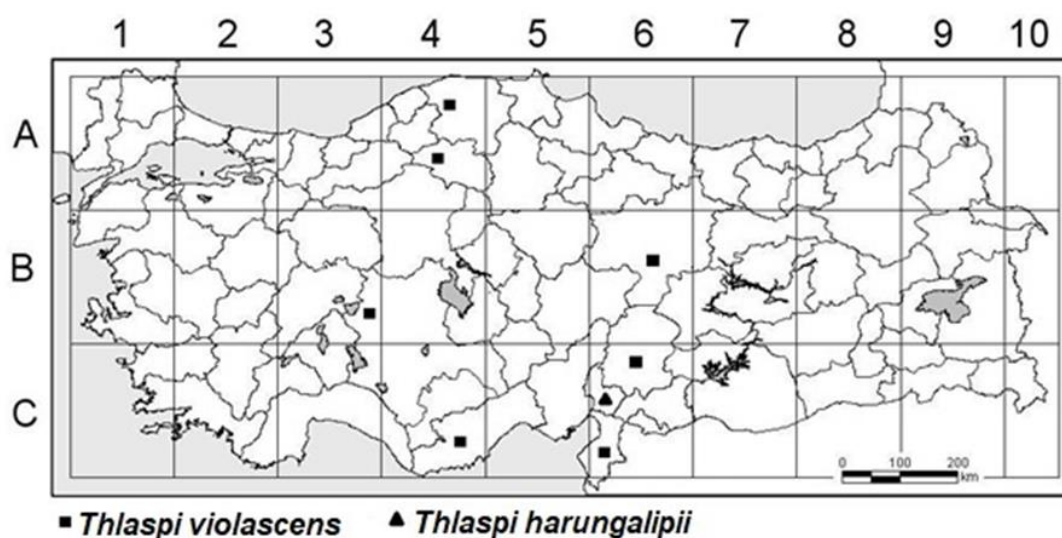


Figure 6. Dispersion map of *Thlaspi harungalipii* and closely related *T. violascens* in Turkey

The new species is placed in the genus *Thlaspi* because of its annual life form, with small herb stems, petiolate and denticulate basal leaves, auriculate cauline leaves, ascending or descending fruit pedicels, ovate or oblong sepals, white, ovate or spatulate petals, wingless filaments, obcordate silicula, style and apical sinus presence in fruit, capitate and unappendaged stigma, uniseriate, and wingless and non-mucilaginous seeds, as defined by Hedge (1965), Al-Shehbaz (2014) and Karaismailoğlu (2018).

In their studies, a similar seed testa anatomy was detected by Meyer (1979) and Aytac et al. (2006) in the genus *Thlaspi* s. lato. The outer integument consisted of 2 different epidermis layers, the outer and inner epidermis. Epidermis cells were flat, regular, simple, and of an unspecialized form in the outer layer, which most commonly originate in the basic group *N. cilicica* (Schott & Kotschy ex Boiss.) Al-Shehbaz and *N. sintenisii* F. K. Mey. (Meyer 1991).

Thlaspi harungalipii and *T. violascens* appear to be sister species in the maximum likelihood phylogenetic method of the ITS region (Figure 5). The ITS sequences of the samples taken from the two locations of the new taxon are exactly the same (BS value:100)

With the addition of *T. harungalipii*, the number of taxa appointed to the genus *Thlaspi* is increased to 76 species, 37 of which are distributed in Turkey. *Thlaspi harungalipii* is very different from the other species of the genus *Thlaspi*. The differences between the new species and the most similar taxon (*T. violascens*) are presented in Table 1.

Table 1. Diagnostic characters of *Thlaspi harungalipii* compared with the related *T. violascens*.

Characters	<i>Thlaspi harungalipii</i>	<i>Thlaspi violascens</i>
Life form	Annual or biannual	Annual or biannual
Root	Slender tap root	Swollen tap root
Stem	Single or several stemmed, 8-20 cm	Single or several stemmed, 20-30 cm
Basal leaves	Loose rosette forming	Dense rosette forming
Cauline leaves	Loose ovate or lanceolate	Dense ovate or lanceolate
Sepals	Green or violet, 1-2 mm in length	Violet, 2-2.1 mm in length
Petals	4-5.5 mm in length	3-4 mm in length
Anters	Reddish or violet, 0.3-0.5 mm in length	Black, 0.7-0.9 mm in length
Pedicels	Spreading-descending, 4-6 mm in length	Spreading, 7-10 mm in length
Siliculae	Obcordate, 6-7 mm in length, wings narrow, 0.5-1.5 mm in width, apex rotund or obtuse	Obtriangular, 8-10 mm in length, wings 1-2 mm in width, apex rotund
Apical sinus	Narrow and shallow, 0.5-1.5 mm in length, style exceeding sinus	Narrow, 1.5-2 mm in length, style not exceeding sinus
Septums	0.5-1.5 mm in width	1.5-2 mm in width
Seeds	(2-) 3 (-4) seeds in each loculus, ovate, 1.2-1.5 mm in length, striped	4 (-5) seeds in each loculus, elliptical, 1.5-1.7 mm in length, slightly striped

CONCLUSION

This investigation including morphological, anatomical, and molecular data has revealed that the specimens have unique features and are therefore suggested by the author as a new species, *T. harungalipii*

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank the curators of the herbaria of ISTF, ISTE, ISTO, and ANK for providing the opportunity to observe herbarium specimens.

REFERENCES

- Al-Shehbaz, I. A. (1986). The genera of Lepidieae (Cruciferae; Brassicaceae) in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 67, 265-311.
- Al-Shehbaz, I. A. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61, 931-954.
- Al-Shehbaz, I. A. (2014). A synopsis of the genus *Noccaea* (Brassicaceae: Coluteocarpeae). *Harvard Papers in Botany*, 19, 25-51.
- Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A. and Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae: An overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259, 89-120.
- Appel, O. and Al-Shehbaz, I. A. (2003). *Brassicaceae*. In: Kubitzki, K. and C. Bayer. (Eds). *The Families and Genera of Vascular Plants*, Vol. 5. Berlin: Springer.
- Artelari, R. (2002). *Thlaspi*. In: Strid, A. and K. Tan. (Eds), *Flora Helenica*, Vol. 2. Ruggell: Gantner Verlag.
- Aytac, Z., Nordt, B. and Parolly, G. (2006). A new species of *Noccaea* (Brassicaceae) from South Anatolia, Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150, 409-416.
- Clapham, A. R. and Akeroyd, J. R. (1993). *Thlaspi*. In: Tutin, T.G. (ed), *Flora Europaea*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Davis, P. H. (1965). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 1. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Davis, P. H., Mill, R. R. and Tan, K. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 10. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Greuter, W. and Raus, T. (1983). *Med-Checklist Notulae*, 7. *Willdenowia*, 13, 79-96.
- Greuter, W., Burdet, H. M. and Long, G. (1986). *Med-Checklist*. Vol. 3. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève.
- Güzel, Y., Özüdoğru, B., Kayıkçı, S. and Özgüşi, K. (2018). *Noccaea ali-atahanii* (Brassicaceae): a new species from southern Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 42, 780-789.
- Hall, T. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2, 60-61.

- Hedge, I. C. (1965). *Thlaspi*. In: Davis, P. H. (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol. 1, pp. 330-341. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- IUCN. (2022). *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria, Version 15.1*, Cambridge: IUCN species Survival Commission.
- Karaca, M., İnce, A. G., Elmasulu, S. Y., Onus, A. N. and Turgut, K. (2005). Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochemistry*, 343, 353-355.
- Karaismailoğlu, M. C. (2015). Morphological and anatomical features of seeds of Turkish *Romulea* taxa (Iridaceae) and their taxonomic significance. *Acta Botanica Croatica*, 74, 31-41.
- Karaismailoğlu, M. C. (2016). Addition to characters of endemic *Aubrieta canescens* subsp. *canescens* Bornm. (Brassicaceae) from Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 45, 509-515.
- Karaismailoğlu, M. C. (2018). *Systematic investigations on some taxa of genus Thlaspi L. (Brassicaceae); sections Nomisma DC., Thlaspi L., Pterotropis DC.* PhD Thesis. Institute of Science and Technology, İstanbul University, İstanbul.
- Karaismailoğlu, M. C. and Erol, O. (2018). Seed structure and its taxonomic implications for genus *Thlaspi* sensu lato sections *Nomisma*, *Thlaspi*, and *Pterotropis* (Brassicaceae). *Turkish Journal of Botany*, 42, 591-609.
- Karaismailoğlu, M. C. and Erol, O. (2019). Pollen morphology of some taxa of *Thlaspi* L. sensu lato (Brassicaceae) from Turkey, and its taxonomical importance. *Palynology*, 43, 244-254.
- Karaismailoğlu, M. C. and Erol, O. (2020). Notes on leaf and stem anatomy of *Thlaspi* sensu lato. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 21, 139-150.
- Karaismailoğlu, M. C. and Fidan, M. (2021). Cytotaxonomy of eight *Thlaspi* L. sensu lato (Brassicaceae) species endemic to Turkey. *Cytologia*, 86, 345-349.
- Karaismailoğlu, M. C., İnal, B. and Erol, O. (2022). A systematic study of *Thlaspi* s.l. taxa in the sections *Nomisma*, *Thlaspi* and *Pterotropis* from Turkey based on fruit morphological and molecular data. *Acta Botanica Croatica*, 81, 197-205.
- Khosravi, A. R., Mohsenzadeh, S. and Mummenhoff, K. (2009). Phylogenetic relationships of Old World Brassicaceae from Iran based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 106-115.
- Koch, M., Hurka, H. and Mummenhoff, K. (1998). Molecular biogeography and evolution of the *Microthlaspi* perfoliatum s.l. polyploid complex (Brassicaceae. chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA restriction site variation. *Canadian Journal of Botany*, 76, 382-396.
- Koch, M. and Mummenhoff, K. (2001). *Thlaspi* s.str. (Brassicaceae) versus *Thlaspi* s.l.: Morphological and anatomical characters in the light of ITS nrDNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 227, 209-225.
- Koch, M. and Al-Shehbaz, I. A. (2004). Taxonomic and phylogenetic evaluation of the American '*Thlaspi*' species: Identity and relationship to the Eurasian genus *Noccaea* (Brassicaceae). *Systematic Botany*, 29: 375-384.
- Koch, M., Dobeš, C., Keifer, C., Schmickl, R., Klimeš, L. and Lysak, M. A. (2007). Super network identifies multiple events of plastid trnF (GAA) pseudogene evolution in the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 63-73.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Meyer, F. K. (1973). Conspectus der "*Thlaspi*"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. *Feddes Repertorium*, 84, 449-470.
- Meyer, F. K. (1979). Kritische Revision der "*Thlaspi*"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. I. Geschichte, Morphologie und Chorologie. *Feddes Repertorium*, 90, 129-154.

- Meyer, F. K. (1991). Seed-coat anatomy as a character for a new classification of *Thlaspi*. *Flora et Vegetation Mundi*, 9, 9-15.
- Meyer, F. K. (2001). Kritische Revision der “*Thlaspi*”-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, II. *Thlaspi* L. *Haussknechtia*, 8, 3-42.
- Meyer, F. K. (2003). Kritische Revision der “*Thlaspi*”-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens, Spezieller Teil, III. *Microthlaspi* F.K. Mey. *Haussknechtia*, 9, 3-59.
- Meyer, F. K. (2006). Kritische Revision der “*Thlaspi*”-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens. Spezieller Teil. IX. *Noccaea* Moench. *Haussknechtia*, 12, 1-341.
- Moorhouse-Gann, R. J., Dunn, J. C., De Vere, N., Goder, M., Cole, N., Hipperson, H. and Symondson, W. O. C. (2018). New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Scientific Reports*, 8, 8542.
- Mummenhoff, K. and Zunk, K. (1991). Should *Thlaspi* (Brassicaceae) be split? Preliminary evidence from isoelectric focusing analysis of Rubisco. *Taxon*, 40, 427-434.
- Mummenhoff, K. and Koch, M. (1994). Chloroplast DNA restriction site variation and phylogenetic relationships in the genus *Thlaspi* sensu lato (Brassicaceae). *Systematic Botany*, 19, 73-88.
- Mummenhoff, K., Franzke, A. and Koch, M. (1997a). Molecular data reveal convergence in fruit characters used in the classification of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 125, 183-199.
- Mummenhoff, K., Franzke, A. and Koch, M. (1997b). Molecular phylogenetics of *Thlaspi* s.l. (Brassicaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation and sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 75, 469-482.
- Özgişi, K., Ocak, A. and Ozudogru, B. (2018). *Noccaea birolmutlui*, a New Crucifer Species from South West Anatolia, Turkey. *Phytotaxa*, 345, 059-067.
- Post, G. (1893). *Plantae postianae. l'Herbier Boissier*, 1, 16.
- Thiers, B. (2016). *Index Herbariorum: A Global Directory of Public Herbaria and Associated Staff*. New York: Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>
- Warwick, S. I., Mummenhoff, K., Sauder, C. A., Koch, M. A. and Al-Shehbaz, I. A. (2010). Closing the gaps: phylogenetic relationships in the Brassicaceae based on DNA sequence data of nuclear ribosomal ITS region. *Plant Systematics and Evolution*, 285, 209-232.

To Cite: Yıldız Dalgınlı, K., Ozturkler, M., Beseren-Havadar, H., Adalı, Y. & Atakisi, O. (2023). Evaluation of Oxidative/Nitrosative Stress Parameters And Histopathological, Immunohistochemical Effects on Cisplatin-Induced Lung Toxicity in Rats. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2495-2504.

Ratlarda Sisplatin Kaynaklı Akciğer Toksikitesi Üzerine Oksidatif/Nitrozatif Stres Parametrelerinin ve Histopatolojik, İmmünohistokimyasal Etkilerin Değerlendirilmesi

Kezban YILDIZ-DALGINLI^{1*}, Melek OZTURKLER¹, Hatice BESEREN-HAVADAR³, Yasemen ADALI⁴, Onur ATAKISI²

Öne Çıkanlar:

- Sisplatin kaynaklı akciğer toksisitesi üzerine antioksidan/nitrozatif stres, histopatolojik ve immünohistokimyasal etkiler araştırıldı.
- Sisplatin uygulamasının sıçanların akciğer dokusunda NO düzeylerini arttırdığı saptanmıştır.
- p53, CD3, CD20, Bcl-2 ve Ki67'nin sisplatin kaynaklı akciğer toksisitesinin mekanizması üzerindeki etkileri belirlendi.

Anahtar Kelimeler:

- Sisplatin,
- oksidatif/nitrozatif stres,
- histopatoloji,
- immünohistokimya,
- rat

ÖZET:

Bu çalışmanın ana odak noktası, sisplatin kaynaklı akciğer toksisitesinde oksidatif/nitrozatif stres ve antioksidan etkiler ile immünohistokimyasal etkileri araştırmaktır. Çalışmada 2 aylık 12 Sprague Dawley erkek rat kontrol (n=6) ve sisplatin (n=6) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Kontrol grubuna izotonik solüsyon, sisplatin grubuna sisplatin 10 mg/kg tek doz intraperitoneal uygulandı. Alınan akciğer dokularında redukte glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Akciğer dokularından parafin bloklar yapıldı ve hematoxilen-eozin (HE) boyama ile boyandı. İmmünohistokimyasal olarak p53, CD3, CD20, Bcl-2 ve Ki67 değerlendirildi. Sıçanların akciğer dokusunda tek başına sisplatin uygulamasının MDA ve GSH değerleri üzerine etkisinin olmadığı, NO düzeylerinin anlamlı olarak arttığı bulundu (P<0.005). Akciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesinde HE boyama ile konjesyon-kanama bulguları, yoğun inflamasyon alanları, bronş ve bronşiyol çevresinde lenfoid foliküller görüldü. Alveoller arasında düşük yoğunluklu ödem ile hava yollarında kan-fibrin ve enflamatuvar hücreler ve fibroblastlardan oluşan konsantrik fibröz ve fibrinöz tıkaçlar gözlemlendi. Reaktif pan B hücre belirteçleri CD20, interstisyel bileşende T-hücre belirteci CD3 ve subepitelyal hücrelerde desmin immünohistokimyasal boyama ile pozitif boyanırken, bronşiyoller ve alveolar kanallara uygulanan reaktif germinal merkezler Bcl-2 ve p53 immünohistokimyasal olarak negatif boyandı. Ayrıca Ki67 immünohistokimyasal boyama ile düşük yoğunluklu nükleer boyanma saptandı. Sonuç olarak NO düzeyinde anlamlı artış ve immünohistokimyasal olarak yoğun inflamasyon, lenfoid foliküller, fibröz ve fibrinöz tıkaçlar sisplatin kaynaklı akciğer hasarı başlangıcının bir ifadesidir.

Evaluation of Oxidative/Nitrosative Stress Parameters and Histopathological, Immunohistochemical Effects on Cisplatin-Induced Lung Toxicity in Rats

Highlights:

- Antioxidative/nitrosative stress, histopathological and immunohistochemical effects were investigated on cisplatin induced lung toxicity.
- It was found that cisplatin administration in the lung tissue of rats NO levels were increased.
- The effects of p53, CD3, CD20, Bcl-2 and Ki67 on the mechanism of cisplatin-induced lung toxicity were determined.

Keywords:

- Cisplatin,
- oxidative/nitrosative stress,
- histopathology,
- immunohistochem,
- rat

ABSTRACT:

The main focus of this study is to investigate oxidative/nitrosative stress and antioxidant effects and immunohistochemical effects in cisplatin-induced lung toxicity. In the study, 12 male Sprague Dawley rats, 2 months old, were divided into two groups: control (n=6) and cisplatin (n=6). Isotonic solution was administered to control and cisplatin 10 mg/kg single dose intraperitoneal to cisplatin group. Reducte glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels were determined by spectrophotometric method in the lung tissues taken. Paraffin blocks were made from lung tissues and stained with hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemically, p53, CD3, CD20, Bcl-2 ve Ki67 were evaluated. It was found that cisplatin administration alone had no effect on MDA and GSH values in the lung tissue of rats, and NO levels were significantly increased (P<0.005). In the histopathological evaluation of the lung tissue, congestion-bleeding findings, intense inflammation areas, lymphoid follicles around the bronchi and bronchioles were seen with HE staining. Concentric fibrous and fibrinous plugs consisting of blood-fibrin and inflammatory cells and fibroblasts in the airways were observed, with low-density edema between the alveoli. Reactive pan B cell markers CD20, T-cell marker CD3 in the interstitial component and desmin in sub-epithelial cells were stained positively by immunohistochemical staining, while reactive germinal centers Bcl-2 and p53 applied to the bronchioles and alveolarducts were immunohistochemically stained negative. In addition, low-intensity nuclear staining was found with Ki67 immunohistochemical staining. In conclusion, significant increase in NO level and immunohistochemically intense inflammation, lymphoid follicles, fibrous and fibrinous plugs are an expression of the onset of cisplatin-induced lung injury..

^{1*}Kezban YILDIZ-DALGINLI (Orcid ID: 0000-0002-1483-348X), Melek OZTURKLER (Orcid ID: 0000-0002-2917-6371), Kafkas University, Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies, Kars Vocational High School Kafkas University, Kars, Türkiye

²Onur ATAKISI (Orcid ID: 0000-0003-1183-6076), Kafkas University Department of Chemistry, Faculty Science and Letter, Kars, Türkiye

³Hatice BESEREN-HAVADAR (Orcid ID: 0000-0002-4780-540X), Kafkas University Department of Pathology Faculty of Medicine, Kars, Türkiye

⁴Yasemen ADALI (Orcid ID: 0000-0002-8004-7364), Izmir University of Economics, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Izmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Kezban YILDIZ-DALGINLI, e-mail: kezbandalginli@gmail.com

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: The required permission for the study was obtained by the Local Ethics Committee of Kafkas University Animal Experiments (Approval No: KAU-HADYK/2019-155).

INTRODUCTION

Cisplatin (cis-dichloro diammine platinum II), a platinum derivative, is a broad-spectrum antineoplastic drug used in the treatment of different types of cancer, including lung cancer (Rabik and Dolan, 2007; Waissbluth et al., 2017). Discovered by Michele Peyrone in 1845 and its chemical structure elucidated by Alfred Werner in 1893, cisplatin is one of the first metal-based chemotherapeutic drugs (Dasari and Tchounwou 2014). In the 1960s, Barnett Rosenberg reported that cisplatin could be used in cancer chemotherapy with his studies (Rosenberg et al., 1965). It has been reported that cisplatin causes serious side effects depending on the dose increase in its anticancer activity (Khan et al., 2012). Cisplatin causes oxidative stress by affecting the lungs, other tissues and organs. Side effects include renal toxicity, nausea, vomiting, as well as fibrosis, interstitial inflammation, structural pulmonary damage, and other serious complications (Leo et al., 2010; Iwasaki et al., 2005; Kosmas et al., 2001). The cis diammineaquachloroplatinum II metabolite is responsible for the toxic effects of cisplatin on the body (Kopke et al., 1997). Studies have suggested that cisplatin produces reactive oxygen species (ROS) and causes tissue damage by reacting with biological macromolecules (Weijl et al., 1997; Halliwell and Chirico, 1993). It has been stated that the antioxidant defense mechanism of cisplatin against oxidative damage is weak by causing a decrease in plasma antioxidant levels in chemotherapy applications. This is due to the consumption of antioxidants caused by oxidative stress in chemotherapy (Weijl et al., 1998).

It has been stated in studies that the use of cisplatin causes many toxic damages such as ototoxicity, nephrotoxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity. However, studies investigating its effects on the lungs are limited. In this context, our study was planned to investigate the effects of cisplatin, which is used as an antineoplastic agent, on oxidative/nitrosative stress due to fibrosis in the lungs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

The cisplatin was purchased from Kocak Farma (50mg/100mL CAS-No. 1923852, Istanbul, Turkey) and other chemicals used in the study were of analytical purity and were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Animals

The required permission for the study was obtained by the Local Ethics Committee of Kafkas University Animal Experiments (Approval No: KAU-HADYK/2019-155). Housing, maintenance, and experimental procedures were carried out at Kafkas University Experimental Animals Production and Experimental Research Center. The animals were kept in conventional rooms with controlled photoperiod (12:12 light:dark, lights on at 06:00 h, approximately 470 lx at 1 m above the floor), temperature (23 ± 2 °C), relative humidity (50-70%) and ventilation (18 air changes h⁻¹). The rats were housed per strain in groups of two animals in wire topped Macrolon type LF-3H cages (800 cm², Kobay Experimental Animals Laboratory, Ankara, Turkey) provided with sawdust bedding ((Tapvei 2H (2x2x1mm) Kobay Experimental Animals Laboratory, Ankara, Turkey), (low dust content in order not to harm the respiratory system of animals easy to remove from cages and it provide a large surface area that is absorbent and capable of taking up and binding both urine and faecal moisture for hygienic reasons)). Tap water and food-pellets (Bayramoglu Feed and Flour Industry and Trade Inc., Erzurum, Turkey) were provided ad libitum. The physical and chemical properties of feed are collectively presented in Table 1. The location of the objects remained the same throughout the experimental period without any contact between the groups. The tissues were renewed with daily cage cleaning.

Five days before the start of a test the mice were brought in their cages to the test room to acclimatise. The same conditions were applied to all groups during the experiment.

Table 1. Feed content

Feed content	
Humidity	12.80 %
Crude protein	23.00 %
Crude cellulose	3.70 %
Crude ash	8.30 %
Crude oil	1.70 %
Sodium	0.50 %
Manganese	96.00 mg/kg
Iron	31.00 mg/kg
Zinc	95.00 mg/kg
Cobalt	0.50 mg/kg
Selenium	0.30 mg/kg
Iodine	2.28 mg/kg
Vitamin A	12.000.000 IU/kg

Food-pellets (Bayramoglu Feed and Flour Industry and Trade Inc., Erzurum, Turkey) Experimental Design

Experimental Design

Twelve Sprague Dawley male 2 months old rats were used in the study. Subjects were randomly distributed to two groups and rats were weighed for dose calculations. The rats were as follows: Control (n=6) and Cisplatin (n=6) groups. During the experiment, saline was administered intraperitoneally (i.p) to the control group. Cisplatin group was given single dose cisplatin (10 mg/kg i.p). Twenty-four hours after the end of the study period, animals were decapitated under anesthesia with xylazine-ketamine combination (15mg / kg-50mg / kg) i.p was applied to rats and cervical dislocation was applied and the anterior abdominal door was opened with an incision and lung tissues were taken. One of the lungs were washed in cold physiological solution and then stored at -45 °C (deep-freeze) for biochemical analysis. The other lung tissues were taken into 10% buffered formaldehyde for immunohistochemical and pathological examinations.

Reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were determined by spectrophotometric method in the tissues taken (Bio-Tek Eon Winooski, VT, USA). In addition, paraffin blocks were made from lung tissues and stained with hematoxylin-eosin staining. Immunohistochemically, p53 CD3, CD20, Bcl-2 and Ki67 were evaluated.

Preparation of Tissue Homogenates

Fresh tissues were rinsed with ice-cold saline and immediately stored at -45 °C. The tissue specimens were weighed and then homogenized in a phosphate-buffered saline (PBS). Homogenized lung samples were then centrifuged at 10.000 rpm at +4 °C over 15 min to isolate the supernatant for subsequent analysis.

Biochemical Analysis

Determination of Reduced Glutathione Level

Lung tissue levels of GSH were evaluated by using spectrophotometric technique according to the method described by (Beutler et al., 1963). The method established on the reduction of 5, 5 dithiobis (2-nitrobenzoic acid) with GSH to yield a yellow compound. The reduced chromogen directly proportional to GSH concentration and its absorption was measured at 412 nm.

Determination of Malondialdehyde Level

Lipid peroxidation was determined by quantifying MDA content in the tissue supernatants. Thiobarbituric acid (TBA) was added in the reaction mixture after vortexing the contents of the tube. The tubes were kept in a boiling water bath for 1 h. MDA level was determined with the absorption coefficient of MDA–TBA complex at 532 nm using spectrophotometer (Yoshoiko et al., 1979).

Determination of Nitric Oxide Level

Nitric oxide concentrations in lung tissue were determined using a spectrophotometer by the method of (Miranda et al., 2001). The samples were de-proteinized with 10% zinc sulphate. Total NO (nitrate and nitrite) concentrations were measured colorimetrically by acidic Griess reaction via reaction involving reduction of nitrate to nitrite by vanadium (III) chloride.

Determination of Total Protein

Lung total protein concentration was determined by the Bradford method using bovine serum albumin (BSA) as the standard at 595 nm (Bradford, 1976).

Histopathological Analyses

Lung tissues taken for histopathological evaluation were kept in 10% formalin solution for 12 hours and then the tissue was followed up. Tissue follow-up was performed with a closed system Leica ASP300 S (Fully Enclosed Tissue Processor, US) device, and the standard tissue follow-up procedure was followed and embedded in paraffin blocks. Sections of 4 micron thickness were taken from each block with the microtome (Leica RM2255 Fully Automated Rotary Microtome, US). Hematoxylin-Eosin (HE) staining was performed on the sections taken. Sections were examined using a light microscope (Olympus BX46F, Tokyo, Japan).

Immunohistochemical Analysis

For immunohistochemical staining, sections were cut into 3-micron adhesive slides and kept in an oven at 56 °C for 1 night. Then the sections were deparaffinized and the avidin-biotinperoxidase method was used as an immunohistochemical method. Sections to be stained were kept in 3% hydrogen peroxide solution for 15 minutes to prevent endogenous peroxide activity after deparaffinization and dehydration. All tissues used in the study were processed in a microwave oven for 10 minutes in order to reveal antigen structures. After the sections were washed with phosphate buffer solution (PBS), the tissues were soaked in appropriate antibodies of p53, CD3, CD20, Bcl-2 and Ki67 for 2 hours. The sections were then incubated with biotin for 10 minutes at room temperature. All sections were washed with PBS and then incubated with peroxidase-conjugated streptavidin for 10 minutes. As the color revealing substrate, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution prepared at a ratio of 1/1 was applied to the sections for 5 minutes. Sections were stained with Harris Haematoxylin and washed for 5 minutes. It was then covered with entellan and examined under a light microscope.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the data obtained from the study was done using SPSS Windows 16.0 package program (SPSS Inc.). Mean values between groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between groups by Duncan test. Data are expressed as mean±SD values.

RESULTS AND DISCUSSION

Biochemical Findings

It was determined that there was a significant increase in NO levels in the lung tissue of rats with a single dose of cisplatin ($P < 0.005$), and there was no significant difference in MDA and GSH levels (Table 2).

Table 2. Effects of control and cisplatin groups on MDA, GSH and NO levels in lung tissues

Parameters	Control	Cisplatin	P
NO (nmol/mg protein)	301.62±12.11 ^b	427.82±33.65 ^a	0.005
MDA (nmol/mg protein)	4.52±0.18	4.04±0.25	Ns
GSH (µg/mg protein)	25.54±0.14	25.20±0.25	Ns

*: a, b: Significant differences in values between cisplatin and control groups are indicated by different superscript letters, Ns: Not significant.

Histopathological Findings

In the histopathological evaluation of the lung tissue, histological structure was observed in morphological limits with HE staining. In addition, the structure of bronchi and bronchioles, vascular structures and air spaces, inflammation, edema and congestion were evaluated. Statistical analysis was not performed because there was no histopathologically abnormal finding in the lung tissue of rats with a single dose of cisplatin administration (Figure. 1a). When the histopathological sections of the lung tissue of 12 animals given cisplatin were examined under light microscopy; signs of congestion-bleeding were observed intensely (Figure. 1b). When evaluated in terms of inflammation; intense areas of inflammation are present and lymphoid follicle formations are noted. Numerous lymphoid follicles containing reactive germinal centers were seen around the bronchi and bronchioles. The hyperplastic follicular is often located between the arteries and the bronchi/bronchioles, and mild compressions of the bronchiole lumen have been observed in some sections. Lymphocytes often show intense permeation in the adjacent bronchi and bronchiole epithelium. In addition, low-intensity edema secondary to inflammation was noted in the sections. Edema was usually seen in the lumens and sometimes between the alveoli (Figure. 1c). The presence of blood-fibrin and inflammatory cells in the edematous areas was noted. In addition, concentric fibrous and fibrinous plugs consisting of fibroblasts embedded in a loose myxoid matrix were observed in the airways (Figure. 1d).

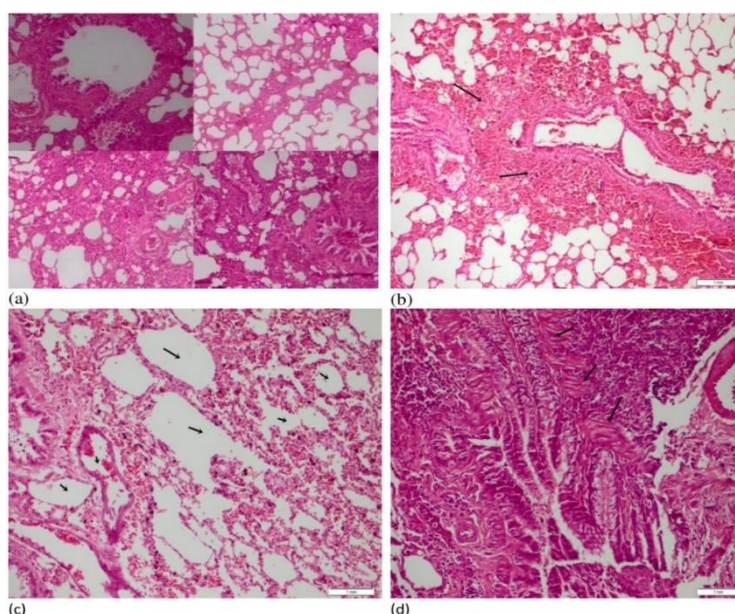


Figure 1. Bronchi and bronchioles, vascular structures and structure of air spaces and signs of inflammation, edema and congestion (HEX40) (a); In the area indicated by the black arrow, the area of intense (3+) bleeding-congestion (HEX400)(b); Intense blood-fibrin formations (black arrows) in areas of edema (HEX200)(c); Fibroblastic plug formation extending into the bronchiolar lumen secondary to intense inflammation (HEX200)(d)

Immunohistochemical Findings

When immunohistochemical data are evaluated; reactive pan B-cell markers CD20 showed positive staining (Figure. 2a). The T-cell marker CD3 in the interstitial component was stained positive by immunohistochemical staining. Reactive germinal centers were stained negatively by Bcl-2 immunohistochemical staining (Figure 2b). Extralobar sequestration areas were noted, and uniform dilated bronchioles and alveolar ducts were noted. The p53 immunohistochemical staining applied to these areas was negative (Figure. 2c, 2d). In p53 immunohistochemistry, stainings below 1% were considered negative, and stainings of 2% and above were considered positive. Evaluations were made in 10 selected high-magnification fields across the entire tissue. Desmin immunohistochemical staining applied to the proliferating areas showed positive staining in the cells under the epithelium (Figure. 2c,d-Figure 3a,b). In addition, low-intensity nuclear staining with Ki67 immunohistochemical staining and cytoplasmic staining in general attracted attention (Figure. 3c).

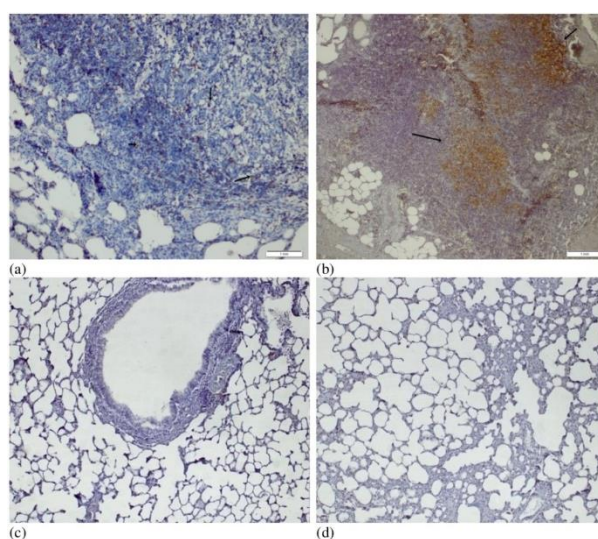


Figure 2. Positive staining of B-lymphocytes by CD20 immunohistochemical staining (black arrows)(CD20X400) (a); It showed a moderate positive reaction especially around the lymphoid formation with CD3 immunohistochemical staining (black arrows) (CD3X200) (b); P53 immunohistochemical negative staining findings (p53X40) (c, d).

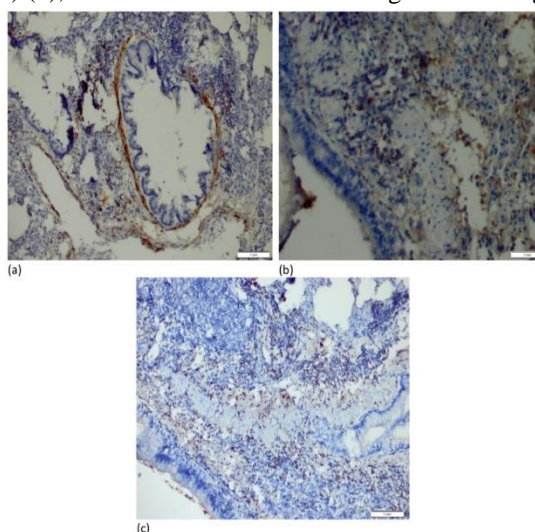


Figure 3. Desmin positive cells under the epithelium (Desminx400)(a); Desmin positive cells under the epithelium (Desminx400)(b); Ki67 immunohistochemical staining of proliferating areas (Ki67X200) (c).

In this study, we reported that cisplatin causes oxidative stress as a result of increasing the NO level of the lung and disrupting the nitrosative balance, and that it causes lung cell damage as a result

of intense inflammation and secondary lymphoid formations. In addition, we demonstrated that the immunohistochemically reactive pan B-cell markers CD20 positive staining, p53, desmin and Ki67 staining, and intense inflammatory cells suppressed neoplastic formation by activating the defense mechanism of the chemical.

It has been proven that various agents increase oxidative/nitrosative levels by showing toxic effects in the cell (Atakisi et al., 2022; Yildiz Dalginli et al., 2022; Gulmez et al., 2020; Kart et al., 2016). Cisplatin, an important cytotoxic agent, triggers oxidative stress and causes damage to the lungs and other tissues and organs (Leo et al., 2010). It is reported that when cisplatin enters the cell, it leads to ROS production through DNA cross-linking, overproduction of oxidases, depletion of endogenous antioxidant systems such as glutathione, and dysfunction of cytoplasmic organelles (Yang et al., 2018). However, it has been shown that cisplatin administration causes local redox imbalance, increases the number of ROS and worsens oxidative stress in the lungs (Han et al., 2021). Studies are continuing on the production of less toxic and more effective analogues of cisplatin. In particular, Pt-based and non-toxic derivatives such as carboplatin are being studied (Ali and Al Moundhri, 2006; Hosseinian et al., 2016).

In previous studies, it was stated that administration of approximately similar doses (7 and 7.5 mg/kg) of cisplatin significantly increased the levels of various oxidative stress MDA, NO and hydrogen peroxide (H₂O₂) markers in the lung tissue, decreased the levels of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), quinone reductase (QR), glutathione peroxidase (GPx), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), and decreased glutathione (GSH)) and caused severe tissue damage (Afsar et al., 2018; Geyikoglu et al., 2017). It has been stated that free radicals play an important role in cisplatin-induced pulmonary toxicity. Cisplatin administration has also been reported to cause severe degenerations histopathologically, including inflammatory cell infiltrates, changes in the alveolar septum, disruption of connective tissue and elastic fibers, blood vessel occlusion, pulmonary edema, irregular inner epithelium of alveolar bronchioles, fibroblast aggregations, and interstitial hemorrhages (Afsar et al., 2018). In present study, it can be said that the potential of a single dose of cisplatin to affect lung tissue oxidative stress parameters is low. However, a significant increase in NO level is an expression of the onset of cisplatin-induced damage to the lung. Moreover, positive staining of cells under the epithelium was observed with desmin immunohistochemical staining applied to the proliferating areas. Low-intensity nuclear staining with Ki67 immunohistochemical staining, and cytoplasmic staining in general was noted. In addition, lymphoid formations that were formed secondary to intense inflammation, which were warning to chronic antigen, were observed.

Recently, cisplatin-induced lung injury was investigated in rats given 2.5 mg/kg cisplatin for 14 days. It has been reported that cisplatin increases the levels of MDA, myeloperoxidase (MPO) and 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG), which are markers of oxidative DNA damage, and decreases the amount of total glutathione (tGSH) in the lung tissue. It was stated that in the cisplatin group, infiltration of polymorphic nuclear leukocytes and hemorrhagic foci, as well as severe alveolar damage such as edema and diffuse alveolar septal fibrosis occurred (Unver et al., 2019). Similarly, the presence of edema and fibrosis supports our study. Unlike our study, this change in oxidant and antioxidant parameters can be associated with the duration and dose of the experiment. In another study, tissue lipid peroxidation, protein carbonyl modification and pathohistological and biochemical changes in xanthine oxidase, caspase-3 and DNAase activities in lung tissues were investigated in rats administered 10 mg/kg cisplatin. In his histopathological examination, it was reported that he was edematous and there were significant deteriorations in the alveolar epithelium. In addition to oxidative

stress parameters, it has been stated that there is a significant increase in the activity of enzymes related to apoptosis (Ristić, et al., 2020). Edema was observed similarly in the histopathological examination of our study. Edema was generally seen in the lumens and sometimes between the alveoli. The presence of blood-fibrin and inflammatory cells in edematous areas and lymphoid follicle formations in areas of intense inflammation were recorded.

Faid (2020) injected rats with 5 mg/kg cisplatin intraperitoneally every 2 days for a total of 8 days. As a result, it was seen that cisplatin administration increased the lung MDA level and decrease the GSH content significantly. At the same time, histopathological examinations observed widespread severe alveolar damage in the lungs of the cisplatin group with diffuse alveolar edema and alveolar septal fibrosis, infiltration of polymorphic nuclear leukocytes, and hemorrhagic foci (Faid, 2020).

CONCLUSION

In the current study, it can be said that the potential of a single dose of cisplatin to affect lung tissue oxidative stress parameters is low. However, a significant increase in NO level is an expression of the onset of cisplatin-induced damage to the lung. It shows that cisplatin induces lung cell damage of blood-fibrin and inflammatory cells and lung lymphoid follicles in areas with edema, and these results may be useful in determining lung damage. Moreover, positive staining of cells under the epithelium was observed with desmin immunohistochemical staining applied to the proliferating areas. In addition, lymphoid formations that were formed secondary to intense inflammation, which were warning to chronic antigen, were observed. This information may be useful for understanding the mechanism of cisplatin toxicity. The presence of dense inflammatory cells suggests that the chemical activates the defense mechanism and suppresses neoplastic formation, and it should be strengthened by further histopathological studies.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., & Khan, M.R., (2018). Acacia hydasypica R. Parker ameliorates cisplatin induced oxidative stress, DNA damage and morphological alterations in rat pulmonary tissue. *BMC Complement. Altern. Med.*, 18(1): 49. [https://doi: 10.1186/s12906-018-2113-0](https://doi.org/10.1186/s12906-018-2113-0)
- Ali, B.H., & Al Moundhri, M.S., (2006). Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chem. Toxicol.*, 44(8): 1173-1183. [https://doi: 10.1016/j.fct.2006.01.013](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.013).
- Atakisi, O., Dalginli, K. Y., Gulmez, C., Kalacay, D., Atakisi, E., Zhumabaeva, T. T., Aşkar, T. K., & Demirdogen, R. E. (2022). The role of reduced glutathione on the activity of adenosine deaminase, antioxidative system, and aluminum and zinc levels in experimental aluminum toxicity. *Biological trace element research*, 10.1007/s12011-022-03503-0. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03503-0>.
- Beutler, E., Duron, O., & Kelly, B.M., (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61: 882-888.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254. [https://doi: 10.1006/abio.1976.9999](https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999)

- Dasari, S., & Tchounwou, P.B., (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 5(740): 364-378. [https://doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025).
- Faid, S.M., (2020). Potential protective role of *Melilotus officinalis* extract against Cisplatin-induced cardiac and pulmonary toxicities in rats. *African J. Biol. Sci.*, 16(1): 233-244.
- Geyikoglu, F., Isikgoz, H., Onalan, H., Colak, S., Cerig, S., Bakir, M., Hosseinigouzdagani, M., Koc, K., Erol, H.S., Saglam, Y.S., & Yildirim, S., (2017). Impact of high-dose oleuropein on cisplatin-induced oxidative stress, genotoxicity and pathological changes in rat stomach and lung. *J. Asian Nat. Prod.Res.*, 19(12): 1214–1231. [https://doi: 10.1080/10286020.2017.1317751](https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1317751)
- Gulmez, C., Dalginli, K.Y., Atakisi, E., & Atakisi, O., (2020). the protective effect of lactoferrin on adenosine deaminase, nitric oxide and liver enzymes in lipopolysaccharide-induced experimental endotoxemia model in rats. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 26(6): 801-806. doi:10.9775/kvfd.2020.24504
- Halliwell, B., & Chirico, S., (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(5): 715S-725S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>
- Han, Y.K., Kim, J.S., Jang, G.B., & Park, K.M., (2021). Cisplatin induces lung cell cilia disruption and lung damage via oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 177:270-277. [https://doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.032](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.032)
- Hosseinian, S., Rad, A.K., Mousa-Al-RezaHadjzadeh, N.M., Roshan, S.H., & Shafiee, S., (2016). The protective effect of *nigella sativa* against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Avicenna J. Phytomed.*, 6(1): 44.
- Iwasaki, Y., Nagata, K., Nakanishi, M., Natuhara, A., Kubota, Y., Ueda, M., Arimoto, T., & Hara, H., (2005). Double-cycle, high-dose ifosfamide, carboplatin, and etoposide followed by peripheral blood stem-cell transplantation for small cell lung cancer. *Chest.*, 128(4): 2268-2273.
- Kart, A., Koc, E., Dalginli, KY., Gulmez, C., Sertcelik, M., & Atakisi, O., (2016). The therapeutic role of glutathione in oxidative stress and oxidative DNA damage caused by hexavalent chromium. *Biol. Trace Elem. Res.*, 174(2): 387-391. [https://doi: 10.1007/s12011-016-0733-0](https://doi.org/10.1007/s12011-016-0733-0)
- Khan, R., Khan, A.Q., Qamar, W., Lateef, A., Ali, F., Rehman, MU., Tahir, M., Sharma, S., & Sultana, S., (2012). Chrysin abrogates cisplatin-induced oxidative stress, p53 expression, goblet cell disintegration and apoptotic responses in the jejunum of Wistar rats. *Br. J. Nutr.*, 108(9): 1574-1585. [https://doi: 10.1017/S0007114511007239](https://doi.org/10.1017/S0007114511007239)
- Kopke, R.D., Liu, W., Gabaizadeh, R., Jacono, A., Feghali, J., Spray, D., Garcia, P., Steinman, H., Malgrange, B., Ruben, R. J., Rybak, L., & Van de Water, T.R., (1997). Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am. J. Otol.*, 18(5): 559-571.
- Kosmas, C., Tsavaris, N.B., Malamos, N.A., Vadiaka, M., & Koufos, C., (2001). Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin as second-line treatment in relapsed small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19(1): 119-126. [https://doi: 10.1200/JCO.2001.19.1.119](https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.1.119)
- Leo, F., Pelosi, G., Sonzogni, A., Chilosi, M., Bonomo, G., & Spaggiari, L., (2010). Structural lung damage after chemotherapy: fact or fiction? *Lung Cancer*, 67(3): 306-310. [https://doi: 10.1016/j.lungcan.2009.04.013](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.04.013)
- Miranda, K.M., Espey, M.G., & Wink, D.A., (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5:62-71. [https://doi: 10.1006/niox.2000.0319](https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319)
- Rabik, C.A., & Dolan, M.E., (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.*, 33(1): 9-23. [https://doi: 10.1016/j.ctrv.2006.09.006](https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006)
- Ristić, L., Rančić, M., Radović, M., Krtinić, D., Pavlović, M., Ilić, B., Milojković, M., Živković, N., Turković, K., & Sokolović, D., (2020). Melatonin inhibits apoptosis and oxidative tissue damage in cisplatin-induced pulmonary toxicity in rats. *Arch. Med. Sci.*, <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.95952>
- Rosenberg, B., Vancamp, L., & Krigas, T., (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205: 698-699. [https://doi: 10.1038/205698a0](https://doi.org/10.1038/205698a0)

- Unver, E., Tosun, M., Olmez, H., Kuzucu, M., Cimen, F. K., & Suleyman, Z., (2019). The effect of taxifolin on cisplatin-induced pulmonary damage in rats: a biochemical and histopathological evaluation. *Mediators Inflamm.*, 3740867. [https://doi: 10.1155/2019/3740867](https://doi.org/10.1155/2019/3740867). eCollection 2019
- Waissbluth, S., Peleva, E., & Daniel, S.J., (2017). Platinum-induced ototoxicity: a review of prevailing ototoxicity criteria. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 274(3): 1187-1196. [https://doi: 10.1007/s00405-016-4117-z](https://doi.org/10.1007/s00405-016-4117-z)
- Weijl, N.I., Cleton, F.J., & Osanto, S., (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev.*, 23:209-240. [https://doi: 10.1016/s0305-7372\(97\)90012-8](https://doi.org/10.1016/s0305-7372(97)90012-8)
- Weijl, N.I., Hopman, G.D., Wipkink-Bakker, A., Lentjes, E.G., Berger, H.M., Cleton, F.J., & Osanto, S., (1998). Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients, *Ann. Oncol.*, 9(12): 1331-1337. [https://doi: 10.1023/a:1008407014084](https://doi.org/10.1023/a:1008407014084)
- Yang, Q. Sun. G., Yin, H., Li H., Cao, Z., Wang, J., Zhou M., Wang, H., & Li J., (2018). PINK1 protects auditory hair cells and spiral ganglion neurons from cisplatin-induced ototoxicity via inducing autophagy and inhibiting JNK signaling pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 120:342-355, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.025>
- Yildiz Dalginli K., Gulmez, C., Atakisi, E., & Atakisi, O., (2022). Lactoferrin modulates increased liver DNA damage by reducing serum cytokine, hepcidin and iron levels in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in rats. *Studia Univ. Babeş-Bolyai. Chemia.*, 67(1): 165-176.
- Yoshoiko, T., Kawada, K., Shimada, T., & Mori, M., (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135: 372-376. [https://doi: 10.1016/0002-9378\(79\)90708-7](https://doi.org/10.1016/0002-9378(79)90708-7).

Atıf İçin: Erdoğan, S.F., Durmuş, Ş.N. ve Özdemir S. (2023). *Cistus creticus* ekstrelerinin kontrollü salımını gerçekleştiren katı lipid nanopartiküllerin (KLN) geliştirilmesi ve antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2505-2515.

To Cite: Erdoğan, S.F., Durmuş, Ş.N. & Özdemir S. (2023). Development of controlled release of *Cistus creticus* extracts loaded solid lipid nanoparticles (SLN) and investigation their antimicrobial activities. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2505-2515.

***Cistus creticus* Ekstrelerinin Kontrollü Salımını Gerçekleştiren Katı Lipid Nanopartiküllerin (KLN) Geliştirilmesi ve Antimikrobiyal Etkinliklerinin Araştırılması**

Sevim Feyza ERDOĞMUŞ^{1*}, Şerife Nur DURMUŞ¹, Saniye ÖZDEMİR¹

Öne Çıkanlar:

- Bitki ekstresi
- Mikroorganizma
- Nanopartikül

Anahtar Kelimeler:

- Antimikrobiyal aktivite
- *Cistus creticus*
- Katı lipid nanopartikül (KLN)

ÖZET:

Bu çalışmanın amacı, tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan *Cistus creticus* ekstreleri yüklü kontrollü salım yapabilen katı lipid nanopartikül sistemleri geliştirmek ve bu sistemlerin patojen test mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğini araştırmaktır. Çalışma kapsamında *C. creticus* yapraklarından etanol ve su ekstresi ultrasonik yöntem kullanılarak elde edilmiştir. Bu ekstrelerinin yüklü olduğu katı lipid nanopartiküllerin karakterizasyonu SEM, DLS analizleri ve zeta potansiyelleri, in vitro salım profilleri ile değerlendirilmiştir. Etanol ve su ekstreleri yüklü katı lipid nanopartiküllerin boyutları sırasıyla 40-90 nm, zeta potansiyelleri -35.5 ve -30.7 mV ve PDI değerleri 0.455 ve 0.475 olarak saptanmıştır. Elde edilen katı lipid nanopartiküllerin patojen test mikroorganizmaları (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51289, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) üzerindeki MİK değerleri 1.56-25 mg/mL aralığında değişiklik göstermektedir. Kuyu difüzyon testi sonuçlarına göre ekstre yüklü katı lipid nanopartiküllere karşı mikroorganizmalar, duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak belirlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal etki etanol ekstresi yüklü nanopartiküller için zon çapı 19±0.75 olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115'e karşı tespit edilmiştir.

Development of Controlled Release of *Cistus creticus* Extracts Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Investigation of Their Antimicrobial Activities

Highlights:

- Microorganism
- Nanoparticle
- Plant extract

Keywords:

- Antimicrobial activity
- *Cistus creticus*
- Solid lipid nanoparticle (SLN)

ABSTRACT:

This study aims to investigate the development extracts of *Cistus creticus* which is among medicinal and aromatic plants loaded with controlled delivery solid lipid nanoparticle systems and to investigate the antimicrobial activity of these systems against pathogen test microorganisms. Within the scope of this study, ethanol and water extracts from *Cistus creticus* leaves were obtained by using the ultrasonic method. The characterization of plant extracts loaded with solid lipid nanoparticles was evaluated by SEM, DLS analyses, and zeta potentials, in vitro release profiles. The sizes of ethanol and water plant extracts loaded solid lipid nanoparticles are respectively 40-90 nm, zeta potentials -35.5 and -30.7 mV and PDI values 0.455 and 0.475 were determined. The MIC values of the obtained solid lipid nanoparticles on pathogenic test microorganisms (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51289, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) were determined as in the range of 56-25 mg/mL. According to the results of the good diffusion test, microorganisms were determined as susceptible, moderately sensitive, and resistant to the extract-loaded solid lipid nanoparticles. The highest antimicrobial effect was determined against *L. monocytogenes* ATCC 19115 with a zone diameter of 19±0.75 for ethanol extract-loaded nanoparticles.

¹ Sevim Feyza ERDOĞMUŞ (Orcid ID: 0000-0002-4319-7558), Şerife Nur DURMUŞ (Orcid ID: 0009-0004-3790-9952), Saniye ÖZDEMİR (Orcid ID: 0009-0006-7890-1177), Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sevim Feyza ERDOĞMUŞ, e-mail: feyza.erdogmus@afsu.edu.tr

GİRİŞ

Türkiye kuzey yarım kürenin ılıman kuşağında yer almakta olup üç farklı coğrafi bölgenin (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz) kesişme noktasında konumlanır (Davis, 1965). Ülkemizin bu jeopolitik konumu çok sayıda bitki gen kaynağına ev sahipliği yapmasına, floristik açıdan zengin ve değişik vejetasyon tiplerinin varlığına olanak sağlar. Tıbbi ve aromatik bitkiler, sahip oldukları biyoaktif bileşenler sayesinde sadece gıda ve kozmetik amaçlı olarak değil aynı zamanda hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılırlar (Velsankar ve ark., 2020; Bhatia ve ark., 2020; Mokhtari ve ark., 2023). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılır fakat antibiyotiklerin yanlış ve aşırı kullanımları sonucunda mikroorganizmalarda antibiyotik direnci gelişebilir (Liu ve ark., 2017). Tıbbi ve aromatik bitkiler, içerdikleri biyoaktif bileşenler ve sentetik ilaçların yan etkilerinin fazla olması sebebiyle antibiyotiklere alternatif antimikrobiyal etkili maddeler aranması ve geliştirilmesi amacıyla araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (Ho ve ark., 2010; Saddiqa ve ark., 2010; Dash ve ark., 2011; Liu ve ark., 2017; Bouarab-Chibane ve ark., 2019; Ganaie 2021; Fierascu ve ark., 2021; Bakrim ve ark., 2022; Sarıkürkcü ve Tilili, 2022; Snoussi ve ark., 2022). Yapılan çalışmalarda, tek bir antibiyotikle tedavi edilmesi zor olan mikroorganizmaların antibiyotik dirençliliğine karşı bitki içeriğindeki çok sayıda bileşenin sinerjik etkisinden dolayı bitkilerin tedavi amaçlı olarak kullanılabilmesi rapor edilmiştir (Shanthi-Sree ve ark., 2010). Bugüne kadar tıbbi ve aromatik bitkilerin ekstrelerinin antimikrobiyal etkinliğine yönelik çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen ekstreler ile yüklenmiş nanopartiküllerin patojen mikroorganizmalar üzerine olan etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan, *Cistus creticus*, Cistaceae (Ladengiller) familyası içinde yer alır, bodur ve çalı biçimindedir ve çiçeğinin rengine göre tanımlanır. Türkiye’de genellikle halk arasında tüylü laden, pembe laden olarak isimlendirilen, *C. creticus* türü halk arasında peptik ülser, diyare, yüksek ateş, romatizmal hastalıklar, idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (Şükran, 2021).

Nanopartiküller, çözünürlüğü düşük olan ilaç/etken maddelerin çözünürlüğünü arttıran, hedeflendirebilen ve biyoyumluluğunu geliştiren akıllı ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılır. Ekstrelerinin nanopartikül taşıma sistemlerine yüklenmesi onların etkinliğini arttırmada ve kontrollü salınım yapılmasına imkân sağlaması bakımından önemlidir. Konvansiyonel ilaç salım sistemleri vücutta belirli bir etkinliğe sahip olmakla beraber bazı durumlarda yan etkilere sebep olması, biyolojik parçalanmalarının düşük ve etkinliklerinin geçici olması sebebiyle verimli olamayabilir (Liechty ve ark., 2010). Bu gibi sorunların çözümünde nanoteknolojik yöntemler oldukça avantajlıdır. Kontrollü salım gerçekleştiren akıllı ilaç taşıma sistemleri arasında yer alan nanopartikül sistemler ilaç sektöründe oldukça önemli rol oynamaktadır (Gürsoy, 2002; Wickham, 2003; Soloviev, 2007; Değim, 2011). Nanopartiküller; boyutları 10-1000 nm aralığında değişen etken maddelerin partikül içinde çözündüğü ve hapsedildiği, doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak elde edilebilen sistemlerdir. Bu sistemlerin, küçük partikül boyutlarına sahip olmaları sayesinde etken maddenin hedef bölgede birikmesini sağlamaları ve küçük partiküllerin hazırlanmasında biyoçözünür materyallerin kullanılarak uzun süre kontrollü etken madde salınımını sağlayabilmeleri, kolay sterilize edilebilmeleri gibi avantajları bulunur (Derman ve ark., 2013).

Katı lipid nanopartiküller (KLN), oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanan ve emülgatörler ile kararlı hale getirilen yapılardır (Wissing ve ark., 2004). Lipidler, GRAS (Generally Recognized As Safe) özelliğine sahip olan bileşiklerdir, trigliseridler, kısmi gliseridler, yağ asitleri, steroidler ve mumlar bu grupta yer alır. Lipid dispersiyonu stabilize etmek için, molekül ağırlıkları ve yüklerine göre lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbaterler gibi

farklı emülgatör tipleri kullanılabilir. KLN'ler lipozom, emülsiyon ve katı partiküllerin sağladığı avantajlara sahip olması bakımından avantajlıdır. Düşük sitotoksisteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretilibilmeleri ve dokulara etken madde hedeflenebilmesi gibi lipozomların avantajlarına sahipken, katı lipid matriksleri, kontrollü etken madde salımı ve kimyasal bozulmaya karşı etken maddelerin koruyarak katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarını sağlar (Mehnert ve Madern, 2001; Numanoglu ve ark., 2006).

Bu çalışmanın amacı, tıbbi öneme sahip olan *C. creticus* bitki ekstreleri yüklü kontrollü salım yapabilen KLN sistemleri geliştirmek ve onların patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini ortaya çıkarmaktır.

MATERYAL VE METOT

Bitki ekstrelerinin ultrasonik yöntem kullanılarak hazırlanması

C. creticus bitkisi Ağva-Şile/İstanbul bölgesinden haziran (2022) ayında toplanmış ve laboratuvara getirilerek teşhis edilmiştir (Herbaryum numarası: AKU-10384). Bitkinin yapraklı sürgünleri kurutulup öğütülerek toz haline getirilmiştir. Etanol ve distile su ekstraktlarının (Cc-ETOH, Cc-dH₂O) hazırlanmasında ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Duman ve ark., 2017). Toz halindeki her 30 g numune, 400 mL çözücü içerisine alınarak 25-37 °C sıcaklıkta ultrasonikasyon ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve ardından filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüştür. Daha sonra kullanılan çözücüler rotary evaporatör (Heidolph)'de 40 °C'nin altında ve düşük basınçta tamamen uçurulmuştur. Liyofilizasyon işlemi sonucunda elde edilen toz halindeki ekstreler kullanılmaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Bitki Ekstrelerinden Nanopartikül Eldesi ve Karakterizasyonu

Nanopartikül dispersiyonları %0.5 (w/v) bitki ekstresi, %5.0 (w/v) gliserol monosterat ve % 0.1 (w/v) lesitin içerecek şekilde 55-60 °C'de eritilerek hazırlanmıştır. Bu karışıma %0.3 (w/v) bitki ekstresi ilave edilmiştir. Elde edilen erime fazı bu sıcaklıklarda tutularak % 0.4 (w/v) polisorbata 80 içeren sulu surfaktan çözelti içine karıştırılarak dağıtılmıştır. Daha sonra sonikasyon probu ön emülsiyon çözeltisi içerisine yerleştirilerek nanopartikül oluşumu sağlanmıştır (Lima ve ark., 2013). Nanopartiküllerin karakterizasyonu, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Dinamik Işık Saçılım Spektrofotometresi (DLS) kullanılarak yapılmış ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Cc-ETOH, Cc-dH₂O yüklü katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutlarını belirleyebilmek için SEM görüntüleri imageJ programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Nanopartiküle yüklenen ekstre miktarının saptanması

Katı lipid nanopartikül (KLN) yapılaraya yüklenen ekstre miktarının belirleyebilmek için modifiye santrifüj yöntemi kullanılmıştır (Khoshraftar ve ark., 2020). İlk olarak Cc-ETOH, Cc-dH₂O ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının absorpsiyon değerleri UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 520 nm'de ölçülerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Liyofilize haldeki boş ve Cc-ETOH, Cc-dH₂O yüklü KLN yapılar (Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN) PBS içerisinde karıştırılmıştır ve 30 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantdaki serbest Cc-ETOH, Cc-dH₂O ekstrelerinin miktarlarını belirleyebilmek için 520 nm'de absorpsiyon ölçümü yapılmıştır. % Yükleme etkinliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. AEa; santrifüj sonrası KLN'lerdeki ekstre miktarı (Cc-ETOH, Cc-dH₂O). AEb; santrifüj öncesi KLN'lerdeki ekstre miktarı (Cc-ETOH, Cc-dH₂O). Çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Yükleme etkinliği (\%)} = (AEa/AEb) \times 100$$

(1)

In Vitro Nanopartikül Salınım Çalışmaları

Nanopartiküllerden bitki ekstralarının in vitro salım profillerini belirleyebilmek için bitki ekstraları PBS tamponu içerisinde çözülerek farklı konsantrasyonlar elde edilmiş olup UV spektrofotometre kullanılarak 520 nm'de absorbansları ölçülmüş ve standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Bütün çalışmalar 37 °C'de ve pH 7.4±0.2'de gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller yapıardan in vitro etken madde salım profilinin tayin etmek için pH'sı 7.4 olan 10 mL'lik PBS tampon çözeltisine aktararak 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0. 3, 5, 15, 20. 30. 40. 50. 60. 80. 100. dakika) salım ortamından 1.5 mL çözelti alınarak eppendorf tüplerine alınmış ve UV-spektrofotometre kullanılarak 520 nm dalga boyunda örnekler için absorbanslar ölçülerek in vitro salım profili oluşturulmuştur (Kim ve ark., 2017). Deneysel süreç üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

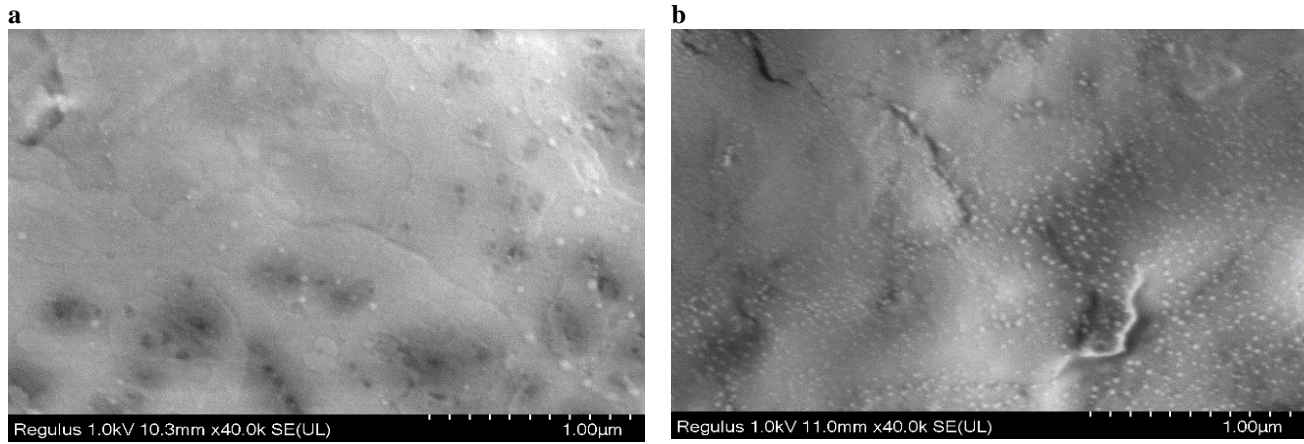
Nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için kültür koleksiyonumuzda mevcut olan patojen test mikroorganizmaları (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 51289, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Mikroorganizmalar 0.5 Mc Farland'a eşit türbidite oluşana kadar Müeller Hinton Broth (MHB) sıvı besi ortamında 37 °C'de inkübe edilmiştir. MHA besiyeri içeren petrilere steril agar delici yardımıyla 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Mac Farland bulanıklığına getirilen kültürden 0.1 mL alınarak MHA katı besiyerine yayma ekim yapılmıştır. KLN'lerin antimikrobiyal etkinliklerini belirleyebilmek için her birinden 10 µL olacak şekilde açılan kuyucuklara yerleştirilmiştir. Petriler +4 °C'de 2 saat bekletildikten sonra 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona alınmıştır. İnhibisyon zon çapları ölçülerek kontrol grubuna göre değerlendirme yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak geniş spektrumlu antibiyotikler olan penisilin (10 mg/ml), amikasin (30 mg/mL) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır (Magaldi ve ark., 2004, Valgas ve ark., 2007).

Bitki ekstralarının mikroorganizmaların gelişiminin inhibisyonuna yol açan minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2009; Günter ve ark., 2020). Patojen test mikroorganizmaların 37°C'de bir gecelik kültürleri yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarına her bir test mikroorganizmasından 100 µL (10⁵-10⁶ kob/mL) ve seyreltilen bitki ekstraktlarının ikişer kat artan konsantrasyonlarından (0.097-100 mg/mL) 100 µL eklenmiştir. Ardından mikropalakalar kapatılarak 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin olmadığı en son kuyucuk MİK değeri olarak belirlenmiştir. Çalışmada, besiyer, %0.1 penisilin kontrol olarak kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında önemli bir yere sahip olan *Cistus* spp.'ler, flavanoidler, fenolik ve terpenoidler gibi biyokatif bileşikler bakımından zengindir (Küpeli ve ark., 2007; Stepien ve ark., 2018; Zalegh ve ark., 2021). Bu bileşiklerin anti-inflamatuvar (Demetzos ve ark., 2001. antibakteriyel (Güvenç ve ark., 2005; Benali ve ark., 2020), antifungal (Ehrhardt ve ark., 2007), antiviral (Barros ve ark., 2013), analjezik (Sayah ve ark., 2017), antitumoral (Dimas ve ark., 2000) etkileri vardır. *Cistus* spp.ekstreleri kullanılarak yapılan bazı nanoteknolojik çalışmalar mevcuttur. Düz ve Yakut (2022), *C. creticus* yaprak ekstresi kullanarak mikrodalga destekli tek adımlı fitosentez ile gümüş nanoparçacıkları sentezlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Florkiewicz ve arkadaşları (2021), *C. creticus* yaprak

ekstrelerinden yeşil biyosentez yöntemiyle gümüş nanopartiküller sentezleyerek antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışma kapsamında *C. creticus* bitki yapraklarından elde edilen etanol ve su özütleri yüklü KLN yapıları ultrasonik yöntem kullanılarak başarılı bir şekilde yüklenmiştir. Cc-ETOH, Cc-dH₂O ekstreleri sırasıyla %11.2 ve %10.9 verimlilikte ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin yüklendiği KLN yapıları elde edilerek karakterizasyonları için SEM, DLS analizleri yapılmış, zeta potansiyelleri ve PDI değerleri belirlenmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN'lerin SEM görüntüleri imageJ programında analiz edilmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapılarının SEM analiz görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN partikül boyutları ortalama 40-90 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Cc-ETOH-KLN (a), Cc-dH₂O-KLN (b) yüklü KLN'lerin SEM görüntüleri

Nanopartikül sistemlerinin en önemli özellikleri partikül boyutu ve dağılımıdır. Bu özellikler nanopartikül sistemlerin hedeflenebilme özelliği, toksisitesi, kararlılığı, ilaç yükleme kapasitesi ve ilaç salımı gibi özellikleri üzerinde etkilidir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, koloidal dağılımların kararlılığının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Yapılan çalışmalar, zeta potansiyel değeri ne kadar yüksek ise koloidal dağılımların kararlılığında o derece iyi olduğunu göstermiştir. Koloidal partiküller dispersiyon ortamında pozitif veya negatif yüklü olmalarına göre zıt yüklü iyonlarla yüklenirler. Yüksek zeta potansiyeline sahip sistemlerde agregatlar daha zor oluşur. Elektriksel iletkenlikleri, -31 ile -60 mV aralığındaki yapılar orta dereceli, -61 ile -80 mV aralığındaki yapılar iyi ve -81 ile -100 mV aralığındaki yapılar ise mükemmel elektrostatik kararlılığa sahip sistemler olarak bilinir (Muller ve Keck 2004). Heterojenlik dağılımı anlamına gelen polidispersite indeksi (PDI) saptanmıştır. In vitro ekstre salım testleri Cc-dH₂O-KLN'lerin Cc-ETOH-KLN'lere göre daha yüksek salım yaptığını göstermiştir. Bu durumun Cc-dH₂O-KLN'lerin suda çözünürlüğünün daha fazla olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Cc-ETOH-KLN'lerin zeta potansiyeli -35.5 mV, Cc-dH₂O-KLN'lerin zeta potansiyeli -30.7 mV olarak belirlenmiştir. Heterojenlik dağılımı anlamına gelen polidispersite indeksinin (PDI) belirlenmiştir. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapılarının partikül büyüklüğü, PDI değeri ve zeta potansiyeli Çizelge 1'de gösterilmiştir.

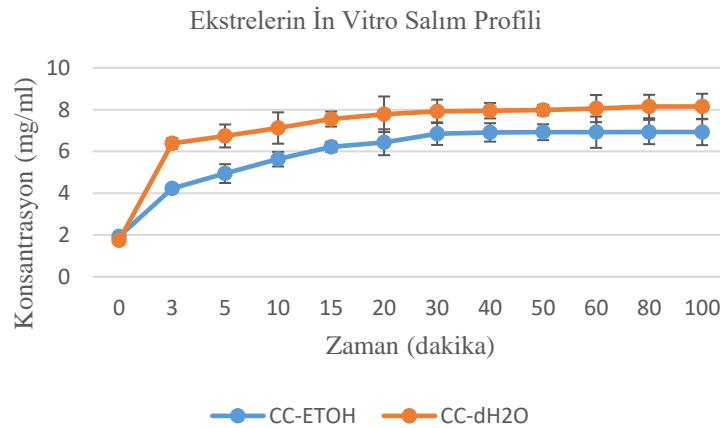
Çizelge 1. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapılarının partikül büyüklüğü, PDI değeri ve zeta potansiyeli

Ekstre Yüklü KLN Yapılar	Ortalama partikül büyüklüğü ortalama (nm)	PDI değeri	Zeta potansiyeli (mV)
Cc-ETOH-KLN	72	0.455	-35.5
Cc-dH ₂ O-KLN	69	0.475	-30.7

Poudel ve ark. (2019) yaptığı bir çalışmada, elde ettikleri lipozomların zeta potansiyelinin -9.8 ile -14 mV arasında değiştiği raporlanmıştır. Parçacık boyutu dağılımı, bakıldığında ise 186 ila 260 nm boyutları arasında değiştiği belirlenmiştir. KLN yapılarına ekstre yükleme oranı >80% olarak tespit

edilmiştir. Çalışmamıza benzer olarak Lima ve ark. (2013), hiperisin yüklü KLN yapıları ultrasonik yöntem ile elde etmişlerdir. KLN'lerin partikül çaplarını 153 nm ve PDI değerini ise 0.30 olarak belirlemişlerdir. Zeta potansiyel değeri ise yaklaşık olarak -18.5 mV olarak saptanmıştır. Hiperisin yükleme oranı >80% olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, Haghghi ve ark. (2018) *Ginkgo biloba* ekstresi yüklü KLN yapıları basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanarak sentezlemişlerdir. Fizikokimyasal, sitotoksik ve antimikrobiyal özelliklerini belirlemişlerdir. Farklı formülasyonlar kullanarak elde ettikleri KLN büyüklüklerini 104-621 nm aralığında olduklarını saptamışlardır. Sonuç olarak KLN yapıların uygun şekil ve büyüklükte, biyoaktif maddelerin yüklenebileceği, antimikrobiyal etkili ve sitotoksik olmayan yapılar olarak elde edilmiştir.

Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapıların ekstre yükleme etkinliği ve in vitro salınım testi profillerinin tayininde bitki ekstrelerinin kalibrasyon grafiklerinden yararlanılmıştır ($R^2=0.9612$, $R^2=0.9728$). KLN yapıları Cc-ETOH, Cc-dH₂O yüklemeye etkinliği yaklaşık olarak sırasıyla %84.76 ± 2.67 ve % 83.50 ± 3.43 olarak belirlenmiştir. Bu değerler Cc-ETOH, Cc-dH₂O ekstrelerinin KLN yapılarına yükleme etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bitki ekstresi yüklü nanopartiküllerin nanolif yapılardan kümülatif salımı (mg/mL) zamanın fonksiyonu olarak elde edilmiştir (Şekil 2). Elde edilen in vitro salım profiline göre bitki ekstresi yüklü nanopartiküllerin nanolif yapılardan sürekli salımı doğrulamıştır. İlk 5 dakika içinde gerçekleşen hızlı ekstre salımını takiben daha yavaş ve kontrollü bir salım hızı gözlenmiştir. Cc-dH₂O salımı Cc-ETOH salım profiline göre daha yüksek değerler göstermiştir.



Şekil 2. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapıların in vitro salım profili

C. creticus'un biyolojik aktivitesinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışma mevcuttur (Maggi ve ark., 2016; Stepien ve ark., 2019; Lahcen ve ark., 2020). Mastino ve ark. (2018), *C. creticus*'un farklı ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Ekstreler, antimikrobiyal aktivitelerinde herhangi bir belirgin farklılık göstermemiştir ancak gram-pozitif bakterilerin ekstrelerle karşı gram-negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin hiçbiri *Candida* türlerine karşı gözle görülür bir etki göstermemiştir. Bazı çalışmalarda, nanoteknolojik yöntemler kullanılarak bileşiklerin MİK ve MBEK değerlerinin azaltılabileceğini belirtilmiştir (Ghaffari ve ark., 2011).

Bitki ekstresi yüklü KLN yapıların mikroorganizmaların gelişiminin inhibisyonuna yol açan minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi için mikrodilüsyon test yöntemi kullanılmıştır. Bitki ekstrelerinin patojen test mikroorganizmaları üzerindeki MİK değerleri Çizelge 2'de gösterilmiştir. Cc-ETOH-KLN yapıları için en yüksek MİK değeri 25 mg/mL olarak *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 35218 ve *E. coli* ATCC 35218 mikroorganizmaları için belirlenmiştir. En düşük MİK değeri ise 3.12 olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115 için tespit edilmiştir. Cc-dH₂O-KLN yapıları

için ise en yüksek MİK değeri 25 mg/mL olarak *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizması için belirlenmiştir. En düşük MİK değeri ise 1.56 mg/mL olarak *L. monocytogenes* ATCC 19115 için tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapıların patojen test mikroorganizmaları üzerindeki MİK değerleri

Test Mikroorganizmaları	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) (mg/mL)	
	Cc-ETOH-KLN	Cc-dH ₂ O-KLN
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	3.12	1.56
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25	25
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	12.5	12.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	6.25	12.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	6.25	6.25
<i>E. coli</i> ATCC 35218	25	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	12.5

Bitki ekstresi yüklü KLN yapıların antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için ayrıca kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. 50 mg/mL Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapıların patojen test mikroorganizmaları üzerindeki etkileri Çizelge 3’de gösterilmiştir. Kuyu difüzyon sonuçları; Cc-dH₂O-KLN’lerin Cc-ETOH-KLN’lere göre patojen test mikroorganizmaları üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Cc-ETOH yüklü KLN yapılar en yüksek antimikrobiyal etkiyi *L. monocytogenes* ATCC 1911 (16±1.20) üzerinde gösterirken en düşük etkiyi *K. pneumoniae* NRRLB 4420 (12±0.90), *P. aeruginosa* ATCC 11778 (12±0.70) mikroorganizmalarına karşı göstermiştir. Cc-dH₂O-KLN ise en yüksek antimikrobiyal etkiyi *L. monocytogenes* ATCC 1911 (19±0.75) en düşük etkiyi ise *P. aeruginosa* ATCC 11778 (13±0.25) üzerinde göstermiştir.

Çizelge 3. Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN yapıların antimikrobiyal etkinliği

Patojen Test Mikroorganizmaları	Zon Çapı (mm)				
	NK	Penisilin G	Amikasin	Cc-ETOH-KLN (25 mg/mL)	Cc-dH ₂ O-KLN (25 mg/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	-	24±1.00	14±0.75	16±1.20	19±0.75
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	29±1.25	13±1.00	14±1.25	15±1.50
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	-	28±1.25	15±0.50	12±0.90	16±1.35
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	-	28 ±1.45	14±0.50	12±0.70	13±0.25
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	-	23±0.85	15±1.00	13±1.45	15±1.25
<i>E. coli</i> ATCC 35213	-	30±1.62	13±0.75	15±0.55	17±1.85
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	27±1.56	14±0.50	15±0.35	17±0.90

Penisilin G (10 mg/mL), amikasin (30 mg/mL) NK: dH₂O, SS: standart sapma

Cc-ETOH-KLN ve Cc-dH₂O-KLN’ler en çok *L. monocytogenes* ATCC 1911 üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Cc-ETOH-KLN patojen test mikroorganizmaları üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin, ekstre hazırlarken kullanılan çözücülerin içerisindeki etken maddelerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, bitki ekstrelerinin içerisindeki polifenolik bileşenler ile anti-inflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, hücre canlılığı gibi biyolojik aktiviteler arasında ilişkili olduğu gösterilmiştir (Handoussa ve ark., 2013; Fernandes ve Salgado, 2016; Sallah ve ark., 2016; Vittorazzi ve ark., 2016). Ayrıca, bitki ekstrelerinin fenolik içeriklerinin bitkilerin türü, kullanılan ekstraksiyon yöntemi, kullanılan çözücü gibi parametrelere bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Barrajon-Catalan ve ark., 2011; Jeszka-Skowron ve ark., 2018; Mastino ve ark., 2018). Diaz-Gomez ve arkadaşları (2013), fenolik bileşenler arasında yer alan gallik asit ve kateşinin *Helicobacter pylori*’nin gelişimini inhibe edici rol oynadıklarını rapor etmişlerdir. Bu inhibe edici etkinin ise penolik içeriğin çeşidine ve dozuna bağlı olarak değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Chen ve arkadaşları

(2018), *Cistus* türlerinden elde ettikleri hesperidin, hesperetin antioksidan, anti-inflamatuvar ve antikanserojenik etkinliği olduğunu belirlemiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada ilk kez *C. creticus* bitki ekstreleri nanoteknolojik yöntemle kullanılarak patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinlik değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, Cc-ETOH, Cc-dH₂O ekstreleri yüklenmiş katı lipid nanopartiküller ultrasonik yöntem kullanılarak başarılı bir şekilde uygun büyüklük ve yapıda elde edilebilmiştir. Bu KLN yapıların ekstre yükleme etkinliğinin yüksek olduğu ve kontrollü salım yapabildikleri belirlenmiştir. Ekstre yüklü katı lipid nanopartikül yapılarına karşı patojen test mikroorganizmaları; duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençlilik göstermişlerdir. Sonuç olarak, Cc-ETOH-KLN, Cc-dH₂O-KLN'lerin sağlık sektöründe antibiyotiklere alternatif biyoteknolojik ürün olarak kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmalar devam ettirilerek biyoteknolojik bir ürün geliştirilebilme potansiyeli vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209A I. Dönem Üniversite Öğrencileri Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Roldan, C., Guillen, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., & Micol, V. (2011). A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochemical Analysis*, 22(4), 303-312.
- Barros, L., Duenas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Journal of Crops and Products*, 41, 41-45.
- Bhatia, N., Kumari, A., Chauhan, N., Thakur, N., & Sharma, R. (2023). *Duchsnea indica* plant extract mediated synthesis of copper oxide nanomaterials for antimicrobial activity and free-radical scavenging assay. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102574.
- Bakrim, B. W., Aghraz, A., Hriouch, F., Larhsini, M., Markouk, M., Bekkouche, K., Costa, R., Arrigo, S., Cicero, N. & Dugo, G. (2022). Phytochemical study and antioxidant activity of the most used medicinal and aromatic plants in Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 1-12.
- Benali, T., Bouyahya, A., Habbadi, K., Zengin, G., Khabbach, A., Achbani, E.H., & Hammani, K. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101696.
- Bouarab Chibane, L., Forquet, V., Lanteri, P., Clement, Y., Akkari, L. L. & Oulahal, N. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models. *Frontiers Microbiology*, 10.829.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial standards institute susceptibility testing, 26 th Edition. CLSI supplement M100S. Wayne PA: Clinical and Laboratory, 2016.

- CLSI (2009). (Clinical and Laboratory Standard Institute). Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard- Seventh Edition. M07- A7, Villanova, PA, USA.
- Dash, B. K., Sultana, S. & Sultana, N. (2011). Antibacterial activities of methanol and acetone extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). *Life Sciences and Medicine Research*, 27:1-8.
- Davis, P. (1965). Introduction in Flora of Turkey and the East Aegean Islands.
- Değim, İ. & Mised, S. (2011). Farmasötik Nanoteknoloji. 8(13), 198-205.
- Demetzos, C., Dimas, K., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T., & Angelopoulou, D. (2001). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. *Planta Medica*, 67(7), 614-618.
- Derman, S., Kızılbey, K. & Akdeste, Z. (2013). Polymeric nanoparticles. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31. 109-122.
- Duman, R., Dogan, H. H. & Tuncer, P. (2017). Evaluation of the in vitro antiviral activity of *Salvia halophila* and *Salvia sclarea* extracts against human respiratory syncytial virüs (HRSV). *International Journal of Science and Technology Research*, 3 (7), 44-59.
- Dimas, K., Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolokouris, A., & Mavromoustakos, T. (2000). Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmaceutical Research*, 42(5), 475-478.
- Düz, M., & Yakut, Ö. (2022). Microwave-assisted green synthesis, characterization, and antioxidant activity of silver nanoparticles using the aqueous extract of *Cistus creticus*. *Particulate Science and Technology*, 41. 589 -599.
- Ehrhardt, C., Hrcinius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., & Ludwig, S. A. (2007). Polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Research*, 76(1), 38-47.
- Fierascu, R. C., Fierascu, I., Baroi, A. M. & Ortan, A. (2021). Selected aspects related to medicinal and aromatic plants as alternative sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1521.
- Günter, Ü., Maçin, S., & Tuncer, E. İ. (2020). Çeşitli bitki ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*, 30(3), 184-189.
- Florkiewicz, W., Pluta, K., Malina, D., Rudnicka, K., Zywicka, A., Duarte Guigou, M., Tyliczszak, B., & Sobczak-Kupiec, A. (2021). Investigation on green synthesis, biocompatibility, and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared using *Cistus incanus*. *Materials*, 14 (7), 5028.
- Ghaffari, S., Varshosaz, J., Saadat, A., & Atyabi, F. (2011). Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 35-43.
- Ganaie, H. A. (2021). Review of the active principles of medicinal and aromatic plants and their disease fighting properties. *Medicinal and Aromatic Plants*, 1-36.
- Gürsoy, A. Z. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri: İlaç Taşıyıcı Partiküller Sistemler. *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, 7, 3-102.
- Güvenç, A., Yıldız, S., Özkan, A.M., Erdurak, C.S., Coşkun, M., Yılmaz, G., Okuyama, T., & Okada, Y. (2005). Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharmaceutical Biology*, 43(2), 178-183.
- Ho, C., Ismai, N., Shaida, F. S. & Ahmad, R. (2010). In vitro antibacterial and antioxidant activities of *Orthosiphon stamineus* benth. extracts against food-borne bacteria. *Food Chemistry*, 122(4), 1168-1172.
- Jeszka-Skowron, M., Zgoła-Grześkowiak, A., & Frankowski, R. (2018). *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids-A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 74, 71-81.

- Khoshraftar, Z., Shamel, A., Safekordi, A. A., Ardjmand, M., & Zaefizadeh, M. (2020). Natural nanopesticides with origin of *Plantago major* seeds extract for *Tribolium castaneum* control. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 10, 255-264.
- Kim, J. H., Baek, J. S., Park, J. K., Lee, B. J., Kim, M. S., Hwang, S. J., Lee, J. Y. & Cho, C. W. (2017). Development of *Houttuynia cordata* extract-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery: high drug loading efficiency and controlled release. *Molecules*, 22 (12), 2215.
- Küpeli, E., & Yesilada, E. (2007). Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 524-530.
- Lahcen, S. A., El Hattabi, L., Benkaddour, R., Chahboun, N., Ghanmi, M., Satrani, B., ... & Zarrouk, A. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antifungal activity of Moroccan *Cistus creticus* leaves. *Chemical Data Collections*, 26, 100346.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 149-173.
- Lima, A. M. Pizzol, D. C. Monteiro, B. F. F., Creczynsk-Pasa, B. T., Andrade, P. G., Ribeiro, O. A. & Perussi, R. T. (2013). Hyperin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125,146-154.
- Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Xu, J. (2017). Antimicrobial resistance and cytotoxicity of *Citrobacter* spp. in Maanshan Anhui Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1357.
- Poudel, A., Gachumi, G., Wasan, K. M., Dallal Bashi, Z., El-Aneed, A., & Badea, I. (2019). Development and characterization of liposomal formulations containing phytosterols extracted from canola oil deodorizer distillate along with tocopherols as food additives. *Pharmaceutics*, 11(4), 185.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45.
- Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., & Dall'Acqua, S. (2016). Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66, 50-57.
- Mastino, P. M., Mauro, M., Jean, C., Juliano, C., & Marianna, U. (2018). Analysis and potential antimicrobial activity of phenolic compounds in the extracts of *Cistus creticus* subspecies from Sardinia. *The Natural Products Journal*, 8(3), 166-174.
- Mehnert, W., & Mader, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83-101.
- Muller, R. H., & Keck, C. M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3), 151-170.
- Nazri, N. M., Ahmat, N., Adnan, A., Mohamad, S. S., & Ruzaina, S. S. (2011). In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5728-5735.
- Mastino, P. M., Mauro, M., Jean, C., Juliano, C., & Marianna, U. (2018). Analysis and potential antimicrobial activity of phenolic compounds in the extracts of *Cistus creticus* subspecies from Sardinia. *The Natural Products Journal*, 8(3), 166-174.
- Mokhtari, R., Kazemi Fard, M., Rezaei, M., Moftakharzadeh, S. A., & Mohseni, A. (2023). Antioxidant, antimicrobial activities, and characterization of phenolic compounds of thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and thyme-sage mixture extracts. *Journal of Food Quality*,
- Numanoğlu, U. & Tarımcı, N. (2006). Kati lipid nanopartiküllerin özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35 (3) 211-235.
- Saddiqe, L. Z., Naeem, I. & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 511-521.

- Sarıkürkcü, N. & Tilili, N. (2022). *Onosma inexpectata* and *Onosma armenum* novel sources of phytochemicals with determination by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with evaluation of the antioxidant and enzyme inhibitory capacities. *Analytical Letters*, 55 (7), 1068-1079.
- Sayah, K., Chemlal, L., Marmouzi, I., El Jemli, M., Cherrah, Y., & Faouzi, M.E.A. (2017). In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts. *South African Journal of Botany*, 113, 160-163.
- Shanthi Sree, K. S., & Yasodamma, N. (2010). Paramageetham CH, phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamaelea* Müell. *The Bioscan*, 5, 173-175.
- Snoussi, M., Ahmad, I., Aljohani, A., Patel, H., Abdulhakeem, M. A., Alhazmi, Y. S., Ahazmi, S., Tepe, B., Adnan, M., Sarıkürkcü, C., Riadh, B., Feo, V., Alreshidi, M. & Noumi, E. (2022). Phytochemical analysis, antioxidant, and antimicrobial activities of *Ducrosia flabellifolia*: A combined experimental and computational approaches. *Antioxidants*, 11(11), 2174.
- Soloviev, M. (2007). Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 5(1), 1-3.
- Stepien, A., Aebisher, D., & Bartusik Aebisher, D. (2018). Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, (2), 27-132.
- Stepien, A. E., Gorzelany, J., Matlok, N., Lech, K., & Figiel, A. (2019). The effect of drying methods on the energy consumption, bioactive potential and colour of dried leaves of Pink Rock Rose (*Cistus creticus*). *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2386-2394.
- Şükran, A. M. A. Ç. *Cistus creticus* (Pembe Laden) Türünün Farmakolojik Özellikleri. *Medical Records*, 3(2), 161-163.
- Uchegbu, I. F., & Schatzlein, A. G. (Eds.). (2006). *Polymers in Drug Delivery*. CRC Press.
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Velsankar, K., RM, A. K., Preethi, R., Muthulakshmi, V., & Sudhakar, S. (2020). Green synthesis of CuO nanoparticles via *Allium sativum* extract and its characterizations on antimicrobial, antioxidant, antilarvicidal activities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104123.
- Wickham, T. J. (2003). Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nature Medicine*, 9(1), 135-139.
- Wissing, S. A., Kayser, O., & Müller, R. H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257-1272.
- Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., Alkaltham, M. S., Khalil Alyahya, H., & Mhand, R. A. (2021). A review on *Cistus* sp.: Phytochemical and antimicrobial activities. *Plants*, 10(6), 1214.

To Cite: Özbakır, O. (2023). Analysis of Reports on The Occupational Health and Safety in The Agricultural Industry: A Bibliometrix-Aided Approach. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2516-2531.

Analysis of Reports on the Occupational Health and Safety in The Agricultural Industry: A bibliometrix-Aided Approach

Okan ÖZBAKIR^{1*}

Highlights:

- Occupational health and safety in agriculture has increased after 1990.
- Ergonomic hazards are increasing in agricultural industry
- The rate of cooperation between countries quite low

Keywords:

- Bibliometrics
- Occupational Risk
- Thematic map
- Co-occurrence networks

ABSTRACT:

Agricultural activities are fundamental to societies, including the planting, growing, harvesting and processing of agricultural crops. However, there are a large number of occupational risks that can arise during the course of agricultural activities. These risks could result in serious injury or even death. This requires introducing and providing the relevant bodies and workers with knowledge, perception and awareness of the risk. The present study assessed the available reports on occupational health and safety using a bibliometric analysis and dimension reduction approach. Briefly, the reports were extracted from SCOPUS database. We identified 943 relevant and available peer-reviewed publications from the Scopus database. These were published between 1956 and 2022. The retrieved documents were analysed with the R-studio based software Bibliometrix. For the analysis, co-occurrences of networks, thematic maps and trending topics were analyzed. The results of the present study show that the time span of the documents ranges from 1956 to 2022 and these documents, including journals, books, book chapters and conference papers, were disseminated in 313 different sources. The estimated annual growth rate of these documents is 6.35%. Even the first paper dates back to the 1950s, the average age of the documents are 10.7. Considering the spatial distribution of the documents, USA topped at the list and was followed by Australia, Brazil, Italy, Canada, UK, and China. It is interesting to note that 'confined spaces' were found to be the trending topic according to the trend topic analysis of the keywords. Also, after the basic keywords (occupational health and safety and agriculture) of the study, ergonomics was the core keyword of the relevant analysis. Critically, the level of co-operation between countries was very low, with a rate of 0.025-0.207 for co-operation between countries (MCPs). For Turkey, the MCP was found to be 0.000. According to the thematic map, the motor theme is composed of two major clusters. One relates to food safety, risk analysis, knowledge and awareness and hygiene. To the best of our knowledge, this is the first study of its kind to identify the key issues in occupational health and safety in the agricultural industry. Therefore, the study has potential to contribute to the field.

¹ Okan ÖZBAKIR ([Orcid ID: 0000-0001-8997-9451](https://orcid.org/0000-0001-8997-9451)), Iğdır University, Vocational School of Technical Sciences, Iğdır, Türkiye

*Corresponding Author: Okan ÖZBAKIR, e-mail: okan.ozbakir@igdir.edu.tr

INTRODUCTION

In the context of occupational safety and health, the term "agriculture" is generally used in a broad sense to include all directly related activities such as planting, growing, harvesting and processing of agricultural products, animal husbandry, aquaculture and forestry, regardless of the size of the operation. However, some sources do not consider subsistence farming to be part of agriculture. For example, subsistence farming is not included in agriculture by the International Labour Organisation (ILO). However, the International Social Security Association (ISSA) includes almost all agricultural activities within the scope of agriculture (Asher, 2009). Agriculture is one of the most dangerous industries in the world, with some 1.3 billion workers employed in agricultural production, or half the world's workforce, according to the ILO. The majority of agricultural workers are employed as wage labourers in developing countries.

According to the World Health Organization (WHO), around 170,000 people die or are seriously injured each year as a result of accidents in the agricultural sector (Vetrivel and Manigandan, 2013). This figure indicates that the agricultural sector is more exposed to risks compared to other industries (Ovchinnikova et al., 2016). Therefore, taking measures to keep agricultural workers healthy and protected is extremely important (McLaughlin et al., 2014). In addition to agriculture, work-related fatalities are higher than in other sectors in forestry, fishing and hunting. In 2008, 661 occupational fatalities were reported on US farms. Due to the variability of working conditions, occupational risks in these sectors are very different (Pyykkönen and Aherin, 2012). A major factor that increases the risk of occupational accidents is the variable working conditions in agriculture. For example, work is carried out in the open air and workers are exposed to climatic conditions. The work is seasonal in nature, and certain tasks become urgent during certain periods. There are significant differences in work positions and job durations. Workers are exposed to bites, infections, allergies and other health problems from contact with animals and plants. Workers come into contact with chemical and biological products. Different types of machinery are used. Work is usually carried out alone, away from other businesses, and emergency services may be delayed due to the distance between work areas. The risk of farming-related accidents for children is also increased by the fact that the worker's home is part of the farm population. A high proportion of young and older people in the workforce also increases the risk factor (Yalcin, et al., 2016).

The widespread use of pesticides worldwide to increase crop yields and control pests has increased the negative impact of these substances on human health and the environment. Therefore, from an occupational health and safety perspective, the use of pesticides is an issue that requires special attention.

Despite the banning of some products due to their acute and chronic effects, pesticide applicators often fail to recognize the significant toxicological profile of modern pesticides, resulting in a global health burden. Most of the existing research on the knowledge, attitudes, and practices of pesticide applicators focuses on workers in high or relatively poor socio-economic environments. Studies on modern pesticide practices are therefore more common among low-income workers. It should be noted that two-thirds of the 350,000 pesticide-related deaths that occur each year occur in developing countries, although they are also significant in high-income countries. In Italy, between 2005 and 2011, approximately 2,500 cases of acute pesticide poisoning were identified as occupational incidents, representing 5% of all poisonings (Ricco et al., 2018). In addition to facing a range of hazards such as tractor accidents, exposure to chemicals, and injuries from animal bites and farm equipment, agricultural workers are also exposed to various occupational disease risks. Many chemicals used in agriculture can cause respiratory and skin diseases in addition to those caused by pesticides. Musculoskeletal problems

can result from heavy physical work related to the characteristics of the work (Durczak and Jurek, 2017). Therefore, measures such as the use of appropriate equipment, providing suitable training to workers, ensuring the proper use of harmful substances, appropriate working hours and rest periods must be taken to protect the health and safety of agricultural workers. With the help of these measures, employees can be more efficient in their work and at the same time be in good health.

Due to its multidisciplinary structure, it is expected that the number of reports published on agriculture and occupational health and safety will be high. In general, these reports are published as review articles that are recognized in each field of work. These review articles serve as a source of inspiration for researchers, suggesting new avenues for future research or highlighting gaps in the literature. They offer the most up-to-date knowledge on the subject and provide information on the latest technologies. Bibliometric analyses have recently become popular in order to reduce the dimension of the reports disseminated (Rejeb et al., 2022; Malanski et al., 2019; Luo et al., 2020). There are a number of tools available for bibliometric analysis. However, the use of several tools is recommended, as each tool has its advantages and disadvantages (Choudhri et al., 2015; Karanatsiou et al., 2017, Lin, 2020; Markscheffel and Schröter, 2021). CiteSpace, VOSviewer and R-bibliometrix are the most commonly used software packages for bibliometric and visualized analysis. The basic information contained in the included publications could be extracted and retrieved using these tools. Information includes countries/regions, institutions, authors, journals, keywords and citations. These programs can identify the authors, institutions, and countries/regions that contribute the most from collaboration networks and select relevant publications.

Bibliometric analysis is a method based on the use of statistics and visualization tools. It aims to show how information works and how it evolves in a particular field (Devos and Menard, 2019; Ma et al., 2021). This method makes it possible to objectively identify research trends and emerging topics, evaluate the performance of authors and organisations, and map international collaborations and geographical distribution networks (Ou et al., 2022).

The basis of the study is to find answers to questions such as changes in studies related to agriculture and occupational health and safety over time and spatial distribution, popular terms and topics, the relationship between the country's agricultural development and effectiveness and the number of studies and whether studies conducted in different countries differ in terms of the subject.

- How does the temporal and spatial distribution of studies related to agriculture and occupational health and safety change? Using bibliometric analyses, the present study addressed the issues such as when studies were carried out in agriculture and occupational health and safety, and in which geographical areas they were concentrated.

- What are the most popular terms and topics in agriculture and occupational safety and health? Within this framework, the most frequently used terms and topics were identified as a result of the analyses carried out using the Bibliometrix programme.

- Is there a relationship between the number of studies related to agriculture and occupational health and safety and the country's agricultural development and effectiveness? Analyses conducted on this issue revealed the relationship between the level of agricultural development of different countries and the number of studies carried out.

MATERIALS AND METHODS

Data source and search strategy

The SCOPUS database contains approximately 14.359 documents with a broad scope in the field of occupational health and safety. However, the search was limited to "occupational accident and occupational disease" category, particularly for studies on topics such as work accidents and occupational diseases. Accordingly, 943 documents were recorded after the following criteria (TITLE-ABS-KEY (occupational AND health AND safety) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA,"AGRI"))) (on May 26, 2023). Subsequently, the relevant documents were downloaded in BibTex format and were then analysed using R studio-based Bibliometrix program (Fig 1).

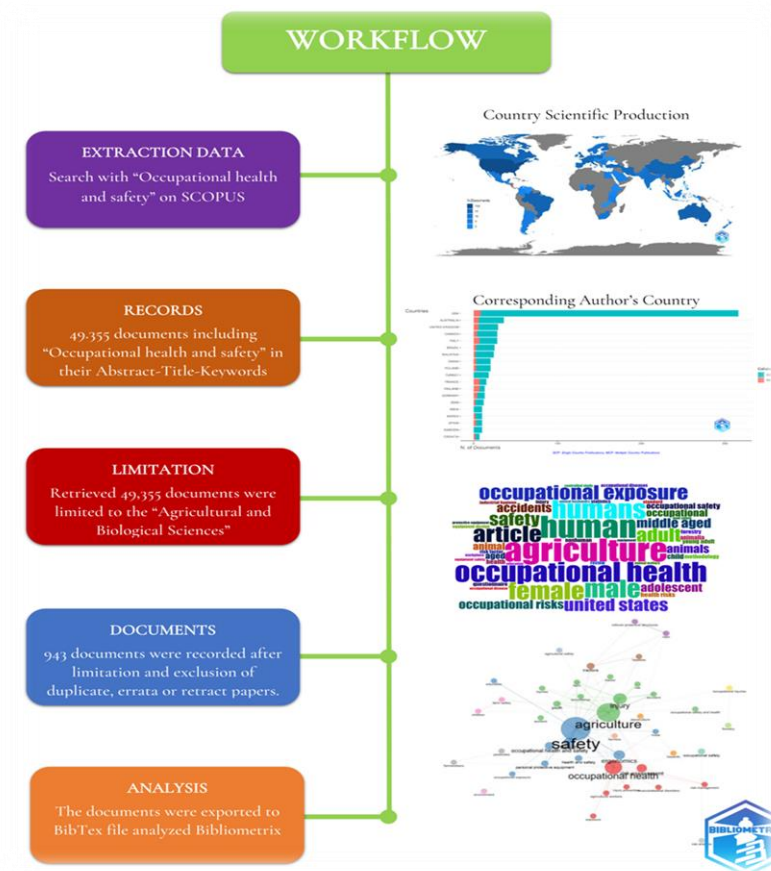


Figure 1. Work flow of the study.

RESULTS AND DISCUSSION

Descriptive findings of the 943 documents were collectively presented in Table 1, indicating that the time-span of the documents range from 1956 to 2022. These papers have been disseminated in 313 different sources. These include journals, books, book chapters and conference papers. These are estimated to be growing at an annual rate of 6.35%. The average age of the documents is 10.7 years, with the first document dating back to the 1950s. Such a low age suggests that occupational safety and health reports related to the agricultural sector are very recent. Time trending of the documents (Fig 1) clearly indicates that the majority of the documents has been reported after 1990s and peaked in the late decade. The number of citations per document was found to be 12.83. Of the 943 documents, 680 were published as original research papers and the rest were chapters, books and conference proceedings. Overall, those documents were 2827 co-authored documents (Table 1). For the following sections of the

current study, those documents were subjected to a series of analysis for the sources and their impacts, productivity of countries, co-occurrence of keywords, thematic maps, word clouds, conceptual structure maps, and topic dendrogram. The study was designed as a comprehensive approach to reveal the core theme of the documents considered for analysis in agriculture and occupational safety.

Table 1. Descriptive findings and details of the retrieved documents

Description	Results
Time-span	1956-2022
Sources (journals, books, etc)	326
Documents	943
Annual growth rate	% 6,55
Document average age	11,6
Average citation per doc	13,42
Keyword plus	5870
Author keywords	2511
Authors	2865
Authors of single-authored documents	175
Articles	686
Book	5
Book chapter	28
Conference paper	75
Review	98
Editorial	24
Erratum	2
Letter	5
Note	11
Short survey	9

Annual scientific production of documents

Concerning the annual production of the documents (Fig 2), it has been observed that the first examples of publications in the relevant field date back to the 1950s, but a significant trend started in the 1990s and continued with increasing momentum. The increased interest and number of documents might be attributed to the factors, viz. serious diseases in the health sector (Kanvermez and Sumer, 2021), increased work accidents (Bakırcı, 2011), and laws and regulations introduced in the field of occupational health and safety (Özkan et al., 2019). Additionally, technological developments and easier access to information can also be considered among the factors supporting the increase in the number of publications in this field (Gugercin and Baytorun, 2018).

Most Relevant Sources

As mentioned in the previous section (Table 1), the relevant publications are included in 313 different sources. These journals have been categorized in accordance with Bradford's law on the basis of their importance (Figure 3). This categorization is related to relevance. As seen in Figure 4, the top three journals are Journal of Agricultural Safety and Health (N=187), Journal of Loss Prevention in the Process Industries (N=55), and Annals of Agricultural and Environmental Medicine (N=28).

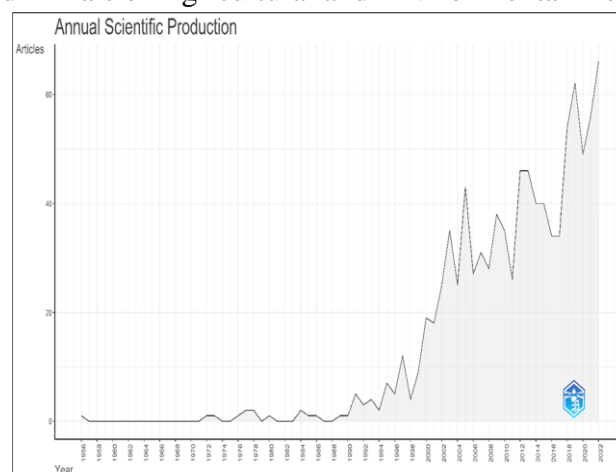


Figure 2. Annual scientific production of documents

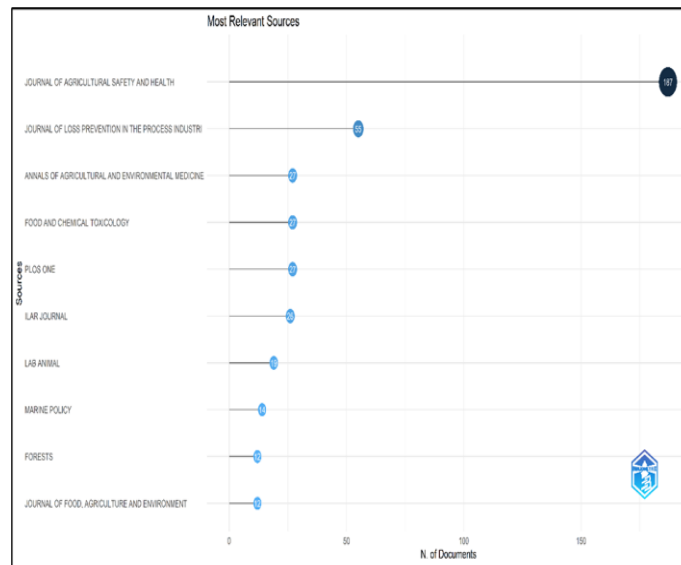


Figure 3. Most relevant sources for publications

Country Scientific Production and affiliations

Considering the number of documents, United States topped at the list (N=759) and was followed by Australia (N=90), Brazil (N=73), Italy (N=69), Canada (N=65), UK (N=65), China (N=64), Malaysia (N=62), France (N=61), and Poland (N=57) (Fig 4). Of the most productive institutions of those countries, National Institute for Occupational Safety and Health (N=43), the University of Kentucky (N=25), and Purdue University (N=24) ranked in the top three institutions (Fig 5). Being consistent with the time-trends of the disseminated documents (Fig 2), the number of publications from these institutions has shown a significant increase after the 1990s (Fig 6). Of the countries we have analysed here, the United States is one of the leading countries, as it has a significant share of employment in the agricultural sector compared to the other countries. As of 2021, approximately 2,188,200 million people work in this sector. While the agricultural industry is inherently fraught with potential hazards and risks, workplace accidents are common in the US because the majority of workers are immigrants who often lack sufficient education about workers' rights and safety, or access to legal resources to protect their rights. This situation can make them more vulnerable to accidents at work (Pawlak et al., 2021). The USA is followed by Australia in terms of the number of documents. According to report of foreign economic relations board of Turkey (2014), approximately 3% of all work-related accidents occurred in the agricultural sector in Australia between 2019 and 2020. However, as the likelihood of fatal accidents in agriculture is higher than in other sectors, this rate is still concerning. In the countries topped at the list of documents, approximately 11% of all work-related accidents in Brazil occur in the agricultural sector. This rate is considerably high and indicates that those who work in the agricultural industry are at greater risk. Such a high rate of accidents in Brazil has been attributed to the exposure to toxic chemicals, tractor accidents, animal attacks, falls, and the use of cutting tools (Cavalli et al., 2020).

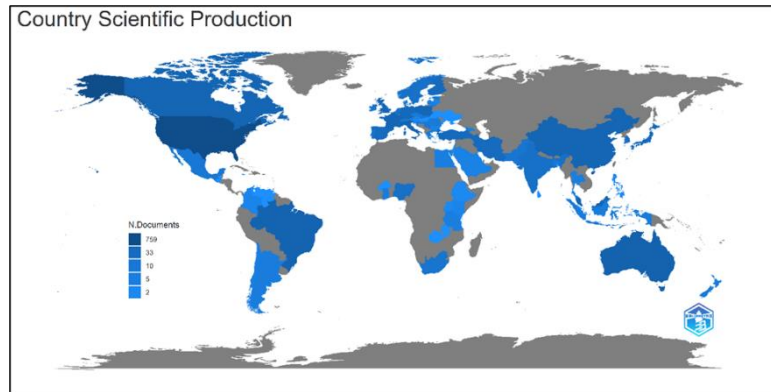


Figure 4. Country scientific production

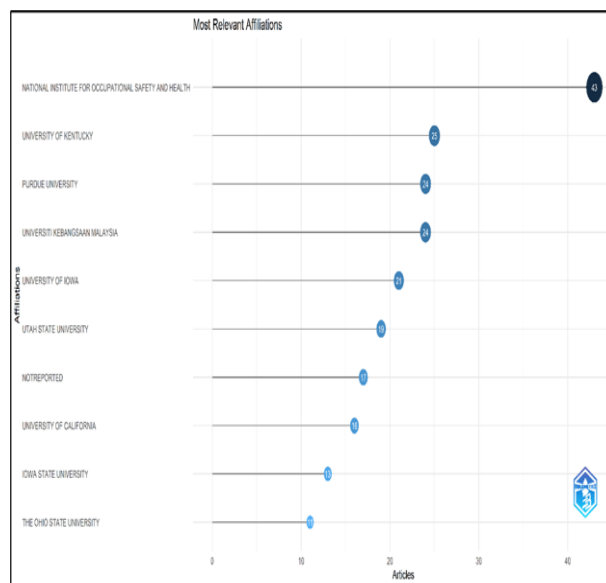


Figure 5. Most relevant affiliations

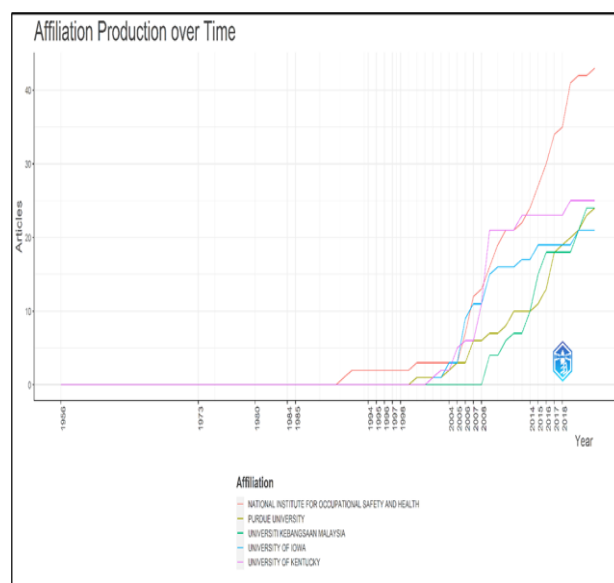


Figure 6. Affiliations' production over time

Corresponding author (Intra-country (SCP) and inter-country (MCP) collaboration)

Figure 7 shows the authors' countries, and the potential for each country to collaborate, either individually or collectively. For this purpose, we assessed the Intracountry (SCP) and inter-country (MCP) collaboration of each country for the period of 1956-2022. The figure 7 depicts the first twenty countries. Accordingly, USA ranks at the first by its high number of documents but the number of collaborations was relatively very low (MCP ratio: 0.025). However, the same low ratio was also recorded for Australia (MCP ratio: 0.114), United Kingdom (MCP ratio: 0.167) and Canada (MCP ratio: 0.207). Concerning our country (Türkiye-Turkey), MCP ratio was found to be 0.000 (SCP: 18; MCP:0.00). MCP ratio might not reflect the collaboration in fields and topics since certain topics might be interest of the locals but might not be interest of our regions or countries. For each topic, collaboration may not be possible. For that reason, the low MCP ratio may be explained with the locality and specificity. Considering the reports from Turkey, Australia and the United States are among the most active countries in occupational health and safety. According to the ILO, the rate of fatal accidents at work per 100,000 workers in agriculture, forestry and fishing is 33.52 in Australia and 57.70 in the United States, while it is around 2.00 in our country. However, the number of accidents in Turkey is quite high. The number of studies that were carried out in Turkey and are included in the Scopus data is 11, as also can be seen from Figure 7. Agricultural workers make up a large part of Turkey's economically active population. However, they do not have healthy and safe working conditions (Oktay et al., 2018). In the agricultural sector, it is quite difficult to maintain standardisation in occupational health and safety. Compared to other sectors, it has different working areas, duration and conditions (Bahşi and Kendi, 2019). In occupational accidents in this sector, injuries and cuts are mostly observed in the hands and feet of workers (Gümüş et al., 2020). There is a need to raise awareness of occupational health and safety culture among employees (İnanç and Ağyürek, 2019), increase awareness through education and keep risk perception fresh (Şen and Güngör, 2019).

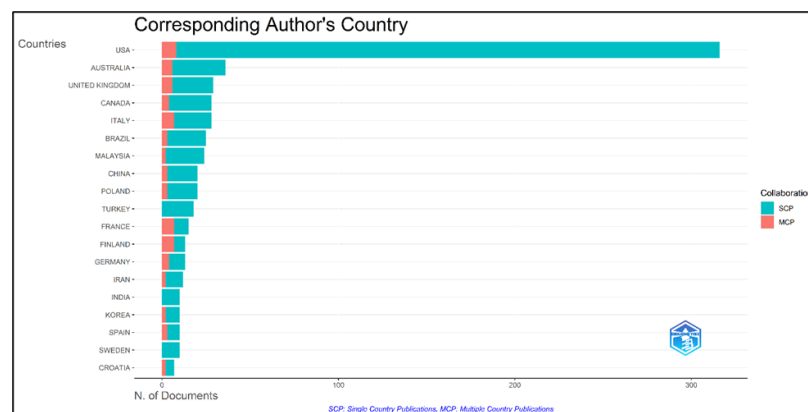


Figure 7. Countries conducting studies in agriculture and occupational health and safety (Intra-country (SCP) and inter-country (MCP) collaborations)

Word cloud analysis of the retrieved documents

We have further extended our insights towards to the content of the documents considered for analysis. In this context, we constructed three Word Clouds using Author Keywords, Keyword Plus and Titles (Fig 8-10). As well-reported by Zhang et al (2016); author keywords, the traditional ones, are provided by the authors of the relevant reports, whereas Keyword Plus are retrieved/extracted from the

titles of cited references by Thomson Reuters. In addition, Title is of the critical indicators in reaching to the relevant audiences. For each analysis, the most frequently used 50 words were used for the construction of Word Cloud (Kulak et al., 2019; Kulak and Kilic, 2020). Considering the words, safety (N=81), agriculture (N=60), occupational health (N=45), occupational health and safety (N=30), ergonomics (N=29), injury (N=26), risk assessment (N=26) etc, refer to Fig 8. As deduced from the Fig 8, “ergonomics” has been core-keyword of the relevant analysis after basic keywords (occupational health and safety and agriculture) of the study. Ergonomics is of the critical issues to be considered for workers in agricultural industry since workers in this field are particularly exposed to ergonomic risks such as musculoskeletal disorders. In this regard, a plethora of documents clearly revealed that farmers and farm laborers experience high rates of musculoskeletal disorders such as back pain, shoulder pain, and upper extremity discomfort. These types of conditions are especially prevalent among young farmers and migrant workers depending on the type of farm task (Davis and Kotowski, 2007). As expected, For the reasons mentioned above, ergonomics has been one of the priority topics in the relevant reports and in the following areas.



Figure 8. WordCloud of author’s keyword (number of words: 50)

Keyword Plus words were as agriculture (N = 400), human (N = 387), occupational health (N=348), humans (N=324), male (N=311), female (N=302), occupational exposure (N=252) etc, refer to Fig 9. Regarding title, safety (N=256), health (N=190), occupational (N=155), risk (N=71), workers (N=68), exposure (N=67), agricultural (N=66), farm (N=49) etc. are of the most pronounced words in the title section, refer to Fig 10.

As also seen in the country analysis (Fig 4-7), the United States is the country with the highest number of publications. Due to its frequent use as a keyword, in the word cloud analysis, it appears as the USA (United States). In terms of agricultural occupational health and safety, both female and male are reported with similar frequencies. Additionally, distinctions were made between child, adolescent, and adult. These results demonstrate that the concept of occupational health and safety can affect all members of society. The potential negative effects of chemical pesticides (herbicides, insecticides, and conventional fertilizers) used in agricultural fields on human health are determined experimentally in vitro or in vivo (animals). Therefore, it is an expected outcome to see terms such as animals and experimental design (Forget,1993).



Figure 9. WordCloud of Keyword Plus (number of words: 50)



Figure 10. WordCloud of Title (number of words: 50)

Trending topics

Depending on the time and place, the subjects of scientific studies can vary considerably. As seen in Figure 8, there have been significant changes over time in the most popular occupational safety and health topics in agriculture. According to Keyword Plus analysis, mercury use, noise pollution, and fishing activities were of the most pronounced topics (Fig 11). On the other hand, ‘confined space’, ‘occupational safety and health’, ‘workers’, ‘aquaculture’, ‘risk management’, ‘personal protective equipment’ are of the trending topic for the authors’ keywords. Being very different from trend topics of Keyword Plus, we noted “confined space” words in Keyword analysis (Fig 12). ‘Agricultural confined space’ refers to grain bins, silos, and fertilizer storage facilities which injuries and deaths frequently occur in. In this regard, Riedel and Field (2011) reported 1,255 incidents in confined spaces in the agricultural sector in the United States between 1964 and 2010. Of these incidents, 71% occurred in grain storage facilities, 10.5% in fertilizer storage structures, 9.2% in agricultural transportation vehicles, and 5.7% in feed storage structures (Riedel and Field, 2011). In this case, appropriate engineering standards and practices should be developed to increase the safety of agricultural facilities and equipment. There is a need for standardization of working practices in common ‘agricultural confined spaces’ such as grain stores, fertilizer stores and others. This includes providing instructions and warnings, taking measures to prevent falls, maintaining access points, designing components to minimize the need for service or repair access, providing locking/tagging facilities and finding suitable anchorage points for ‘confined spaces’.

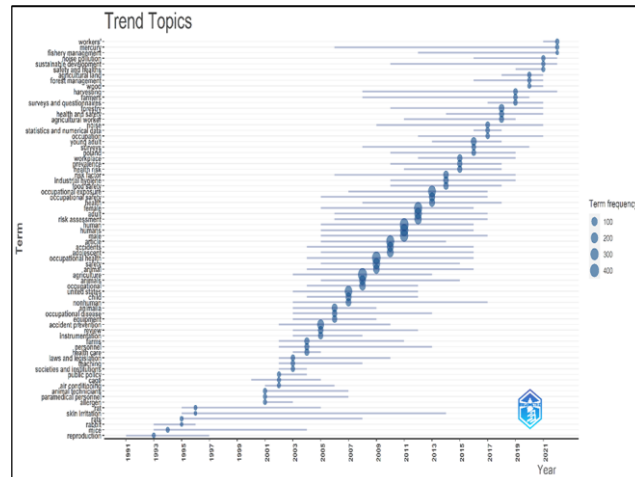


Figure 11. Trend topics according to the Keyword Plus

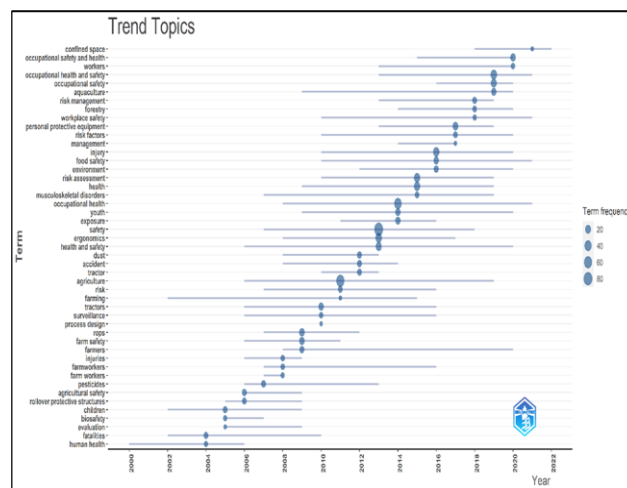


Figure 12. Trend topics according to the Authors' Keywords

Co-occurrence Network

In order to understand the relationship between the terms used in the reports, the co-occurrence of words is the most important analysis. For example, a high level of co-occurrence between words reflects a high level of relationships between them. We hereby constructed co-occurrence networks of authors' keywords and Keyword Plus (Fig 13-14). Accordingly, Fig 13 depicts very narrow clusters. Of the major clusters, the green one includes the risk-linked words, viz. injury, tractor, risk, accident etc. other major cluster (blue) contains the protection-related words such as equipment, safety. However, the co-occurrence network of Keyword Plus was more organized, in comparison to Fig 13, Figure 14 includes two major networks. Accordingly, three different clusters emerged from the relevant publications included in the analysis. The first cluster (green) includes topics related to human and occupational health and safety under the groups of males, female, and adult workers in the agricultural sector. The second cluster (red) consists of terms related to risk assessment, prevention, and safety in livestock farming. The third cluster (blue) focuses on risks related to the work environment in general (Fig 14).

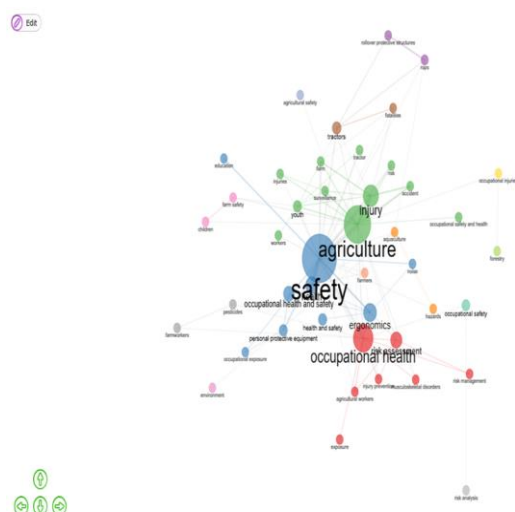


Figure 13. Co-occurrence Network of authors' keywords

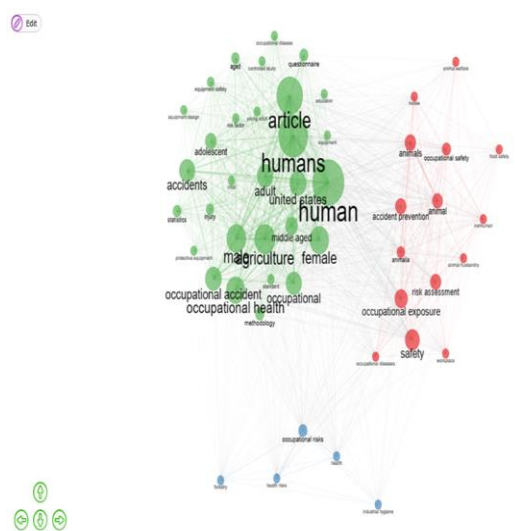


Figure 14. Co-occurrence Network of Keyword Plus

Thematic map of hotspots

Thematic mapping, which has become popular in recent years, is important for identifying main and general topics in a field. Thematic maps consist of four quadrants. The motor theme (1st quadrant) consists of the most relevant and evolving terms related to the analysed topic. The niche theme (2nd quadrant) consists of terms that are not directly related to the topic. The emerging or decline theme (3rd quadrant) comprises terms with low development or marginal relevance to the topic. The last quadrant (base theme) consists of general terms rather than specific terms unique to the analysed topic. Therefore, the same terms can be encountered in other fields as well. As the case of co-occurrence of networks, we also constructed thematic maps for authors' keywords (Fig 15). The Figure 15 displays the thematic map of author keywords. The first quadrant (motor themes) is composed of two major clusters. One is related to the food safety, risk analysis, knowledge and perception and occupational hygiene. The second major cluster is associated with the occupational injuries, farmworkers, pesticides and questionnaire. Considering all clusters considered here, we should note that all clusters are either directly or indirectly intertwined to each other. For instance, questionnaires, in general, estimate the knowledge, perception,

attitude and awareness of the human beings with respect to a certain topic. The high level of knowledge and perception is generally manifested as reduced frequency/incidence of hazard, risk or injury, in the case of occupational health and safety. As observed in motor theme, COVID-19 and knowledge/perception are linked each other for occupational hygiene. Being very similar to this approach, we have recently carried out a study with 320 female employees in Iğdir during the Covid-19 pandemic, reporting that female employees with higher education levels and who participated in continuous education programs (associate degree, undergraduate, graduate, and on-the-job training) had a higher perception level regarding Covid-19 and occupational health and safety issues, especially in workplaces where they were employed. A participation rate of 67% was achieved in the implementation of measures, and it was determined that there is an important correlation between this situation and the education level (Özbakır and Bakkıran, 2023). The second quadrant (niche theme) was linked to the irrelevant topics such as mining, explosion and particle size. Interestingly, confined space has been included into the category of niche themes. However, the Figure 12 referring to the trending topics clearly depicts and tops the “confined space” at the list of trending topics. We should utter that explosion or particle size terms are directly/indirectly associated with “confined space”. The reports concerned with “confined space” are relatively low, in comparison to the other aforementioned topics but it has gained a significant attention in the recent decade. Corresponding to the intensive works or time-span, the categorization of the topics of the quadrants might change (well and critically reviewed by Di Cosmo et al., 2021). In the third quadrant, the words including “occupational exposure, human health, workplace safety, fire and human factors” exhibit a trend towards high centrality and density. Those might suggest that the relevant topics might move to the motor theme and basic themes. Interestingly, we have noted “animal welfare” in the 3rd quadrant. As well-depicted from the analysis of word cloud topic (Fig 8-10), trend topics (Fig 11-12) and co-occurrences of networks topic (Fig 13-14) of keywords or keyword plus, “human/human beings” has been the hotspots or core-content of occupational health and safety. In this approach, the effects of chemicals on “human” are the main interest of this subject. However, animals are under investigation but not very common as research interest. The present observation does not reflect that animal and their welfare are not the out of scopes of this subject. In the future, this topic might emerge and then become the motor theme of this subject. The last quadrant (Basic Theme) identifies the general topics which are transversal/ common to the different research areas, including the words, viz. risk assessment, safety, health hazards.

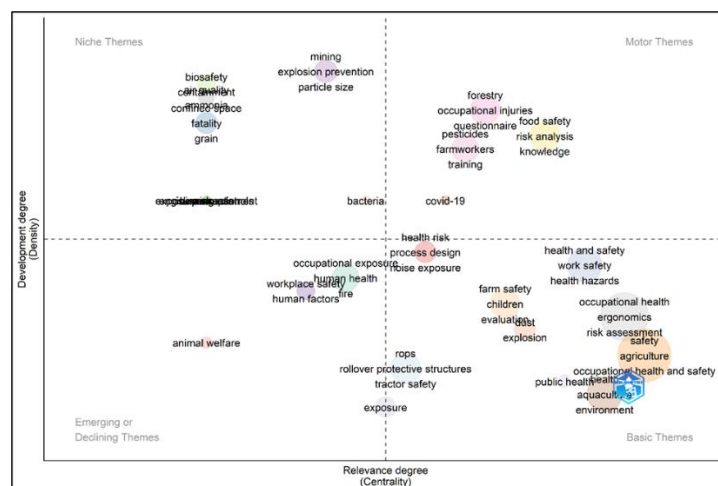


Figure 15. Thematic map of keywords

CONCLUSION

This study represents the first bibliometric analysis of worldwide research patterns in occupational health and safety within the agricultural industry, spanning from 1956 to 2022. Among the most significant results of this study are:

Between 1956 and 2022, 943 scientific documents were found in the area of occupational health and safety in the agricultural sector. Time-trend analysis has shown a consistent change in annual growth of documents; however, the annual publication of articles began to show a significant increase after 1990.

(1) The United States was the leading country in the publication of these documents, followed by Australia, the UK, Canada, and Italy

(2) The Journal of Agricultural Safety and Health has the highest number of publications with 187 articles. Almost a third of all publications were published in four journals: the Journal of Agricultural Safety and Health, the Journal of Loss Prevention in the Process Industry, the Annals of Agricultural and Environmental Medicine and Food and Chemical Toxicology. These journals are considered to be the main journals in the field of occupational health and safety in agriculture.

(3) In addition to the ‘ergonomic risks’ that need to be considered in the agricultural sector, it has also been observed that ‘confined space’ activities have increased in importance.

(4) The level of collaboration between countries is quite low in the analysis of studies on health and safety in the agricultural sector. The United States, Australia and the United Kingdom also have very low rates, while in Turkey the rate is zero.

Up to our best knowledge and survey, this is the first study regarding comprehensive and specific view of available research on occupational health and safety in agriculture industry. For this reason, the study has the potential to contribute to the relevant field. However, the present study has some limitations. For instance, (I) The reports were only extracted data from SCOPUS and so documents in non-indexed plant journals were not included for the analysis, (II) The search was then restricted for publications that contain the words “occupational health and safety” in the title-abstract-keywords, (III) Along with the study, some publications might not contain occupational health and safety in in the title-abstract-keywords, it is therefore possible that not all occupational safety and health publications in the agricultural sector have been reported and analysed.

Conflict of Interest

The author declares that she has no conflict of interest.

REFERENCES

- Asher, M. (2009). Extending social security coverage in Asia-Pacific: A review of good practices and lessons learnt. International social security association working paper No, 6.
- Bahşi, N., & Kendi, O. (2019). Farmers’ approaches on occupational health and safety: the case of city of Osmaniye and Konya, Turkey. *Ciência Rural*, 49.
- Bakırcı, N. (2011). Tarımda Çalışanların Sağlığı ve Güvenliği. *TTB Mesleki Sağlık ve Güvenlik Dergisi*, 11(39), 7-13.
- Cavalli, L. S., Marques, F. B., & Watterson, A. (2020). A critical overview of work-related injury and illness in aquaculture workers from Brazil. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 1157-1164.
- Choudhri, A. F., Siddiqui, A., Khan, N. R., & Cohen, H. L. (2015). Understanding bibliometric parameters and analysis. *Radiographics*, 35(3), 736-746.

- Davis, K. G., & Kotowski, S. E. (2007). Understanding the ergonomic risk for musculoskeletal disorders in the United States agricultural sector. *American journal of industrial medicine*, 50(7), 501-511.
- Devos, P., & Menard, J. (2019). Bibliometric analysis of research relating to hypertension reported over the period 1997–2016. *Journal of hypertension*, 37(11), 2116.
- Di Cosmo, A., Pinelli, C., Scandurra, A., Aria, M., & D’Aniello, B. (2021). Research trends in octopus biological studies. *Animals*, 11(6), 1808.
- Durczak, K., & Jurek, P. (2017). Safety and ergonomics as important criteria of quality of agricultural machinery. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 62(2), 27-31.
- Forget, G. (1993). Balancing the need for pesticides with the risk to human health. In *Impact of pesticide use on health in developing countries: proceedings of a symposium held in Ottawa, Canada, 17-20 Sept. 1990*. IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Güğercin, Ö., & Baytorun, A. N. (2018). Tarımda İş Kazaları ve Gerekli Önlemler. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(2), 157-168.
- Gümüş, S., Okan, S. Ü., & Hatay, T. Y. (2020). Analysis of work accidents in wood harvesting: a case study of the East Black Sea region. *Forestist*, 70(1), 1-7.
- ILO (International Labour Organization) (2021): [<https://www.ilo.org/shinyapps/bulkexplorer31/>; Access date: July 14, 2023]
- İnanç, S., & Ağyürek, C. (2019). Effects of occupational health and safety law on forestry employees.
- Kanvermez, Ç., & Sümer, S. K. (2021). Türkiye’de Tarım Sektöründe Çalışanların İş Sağlığı ve Güvenliğinin Kanun ve İş Hukuku Kapsamında Değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi SBF Dergisi*, 76(2), 575-596.
- Karanatsiou, D., Li, Y., Arvanitou, E. M., Misirlis, N., & Wong, W. E. (2019). A bibliometric assessment of software engineering scholars and institutions (2010–2017). *Journal of Systems and Software*, 147, 246-261.
- Kulak, M., & Kılıç, N. (2020, May). A bibliometric analysis: How important is salicylic in response to the salinity from NaCl?. In *EGU General Assembly Conference Abstracts* (p. 1302).
- Kulak, M., Ozkan, A., & Bindak, R. (2019). A bibliometric analysis of the essential oil-bearing plants exposed to the water stress: How long way we have come and how much further?. *Scientia horticulturae*, 246, 418-436.
- Lin, M., Chen, Y., & Chen, R. (2021). Bibliometric analysis on Pythagorean fuzzy sets during 2013–2020. *International Journal of Intelligent Computing and Cybernetics*, 14(2), 104-121.
- Luo, J., Han, H., Jia, F., & Dong, H. (2020). Agricultural Co-operatives in the western world: A bibliometric analysis. *Journal of Cleaner Production*, 273, 122945.
- Ma, D., Yang, B., Guan, B., Song, L., Liu, Q., Fan, Y., ... & Xu, H. (2021). A bibliometric analysis of pyroptosis from 2001 to 2021. *Frontiers in immunology*, 12, 731933.
- Malanski, P. D., Schiavi, S., & Dedieu, B. (2019). Characteristics of “work in agriculture” scientific communities. A bibliometric review. *Agronomy for Sustainable Development*, 39, 1-16.
- Markscheffel, B., & Schröter, F. (2021). Comparison of two science mapping tools based on software technical evaluation and bibliometric case studies. *COLLNET Journal of Scientometrics and Information Management*, 15(2), 365-396.
- McLaughlin, J., Hennebry, J., & Haines, T. (2014). Paper versus practice: occupational health and safety protections and realities for temporary foreign agricultural workers in Ontario. *Perspectives interdisciplinaires sur le travail et la santé*, (16-2).

- Okyay, R. A., Tanır, F., & Ağaoğlu, P. M. (2018). Occupational health and safety characteristics of agricultural workers in Adana, Turkey: a cross-sectional study. *PeerJ*, 6, e4952.
- Ou, Z., Qiu, L., Rong, H., Li, B., Ren, S., Kuang, S., ... & Li, J. (2022). Bibliometric analysis of chimeric antigen receptor-based immunotherapy in cancers from 2001 to 2021. *Frontiers in Immunology*, 1333.
- Ovchinnikova, E., Shkrabak, R., & Shkrabak, V. (2016). Current status and prospective aspects of labor safety in agriculture. *Verun Deutsheringenieure Universitet Hohenheim Institute fur Agrartechnik.-Heft4*. 01-02 Marz, 171.
- Özbakır, O. & Bakkıran, H. (2023). İğdır ilinde pandemi döneminde çalışan kadınların çalışma hayatında karşılaştıkları sorunlar. *Doğal ve Beşeri Bilimler Açısından İĞDIR-II*,173-196.
- Özkan, A., Dilay, Y., & Mehmetbey, K. (2019). Tarım Kesiminde Meydana Gelen Bazı Kazaların İş Güvenliği Açısından Değerlendirilmesi. *CİLT* 3, 40.
- Pawlak, K., Smutka, L., & Kotyza, P. (2021). Agricultural potential of the EU countries: how far are they from the USA?. *Agriculture*, 11(4), 282.
- Pyykkönen, M., & Aherin, B. (2012). 53 Occupational Health and Safety in Agriculture.
- Rejeb, A., Abdollahi, A., Rejeb, K., & Treiblmaier, H. (2022). Drones in agriculture: A review and bibliometric analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*, 198, 107017.
- Report of foreign economic relations board of Turkey, Deik, (2014).
- Riccò, M., Vezzosi, L., & Gualerzi, G. (2018). Health and safety of pesticide applicators in a high income agricultural setting: a knowledge, attitude, practice, and toxicity study from North-Eastern Italy. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 59(3), E200.
- Riedel, S. M., & Field, W. E. (2013). Summation of the frequency, severity, and primary causative factors associated with injuries and fatalities involving confined spaces in agriculture. *Journal of agricultural safety and health*, 19(2), 83-100.
- Şen, G., & Güngör, E. (2019). Local Perceptions of Forest Certification in State-Based Forest Enterprises. *Small-scale Forestry*, 18(1), 1-19.
- Vetrivel, V., & Manigandan, R. (2013). An empirical study of agricultural labour in India. *Journal of exclusive management science*, 2(12), 1-6.
- Yalçın, G. E., Yazıcı, E., Kara, F. Ö., İpekçioğlu, Ş., & Yalçın, M. (2016) Tarımda iş kazaları ve hastalıkları.
- Zhang, J., Yu, Q., Zheng, F., Long, C., Lu, Z., Duan, Z. Comparing keywords plus of WOS and author keywords: A case study of patient adherence research. *Journal of the Association for Information Science and Technology* 2016, 67(4), 967–972.

Atf İçin: Tırınk, S. ve Aykaç Özen, H. (2023). Yükseköğretim Kurumlarında Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi: İğdır Üniversitesi Örneği. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2532-2545.

To Cite: Tırınk, S. & Aykaç Özen, H. (2023). Determination of Carbon Footprint at Institutions of Higher Education: The Case of the İğdır University. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2532-2545.

Yükseköğretim Kurumlarında Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi: İğdır Üniversitesi Örneği

Sevta TIRINK^{1*}, Hülya AYKAÇ ÖZEN²

Öne Çıkanlar:

- Üniversite emisyonlarının en büyük kaynağını elektrik ve doğalgaz tüketiminin oluşturduğu tespit edildi.
- Sera gazı emisyonları 2022 yılında 3679.66 tCO₂e/yıl olarak hesaplandı.
- Kampüs karbon ayak izi 1.27x10⁻³ tCO₂e/m² olarak hesaplandı.

Anahtar Kelimeler:

- Karbon Ayak İzi
- Sera Gazı Emisyonları
- İklim Değişikliği
- Doğrudan Emisyon
- Dolaylı Emisyon

ÖZET:

Üniversite yerleşkeleri, bünyesinde her türlü sosyokültürel faaliyetin gerçekleştiği ve öğrencilerin eğitim hayatları boyunca zamanlarının büyük bölümünü geçirdikleri bir yaşam merkezidir. Bu faaliyetler sonucunda yerleşkelerdeki atmosferik sera gazı seviyelerinin artması kaçınılmazdır. Ortaya çıkan sera gazı emisyonlarının belirlenmesinde en yaygın yaklaşımların başında "karbon ayak izi" gelmektedir. Karbon ayak izi, bir organizasyon veya bireyin yaptığı faaliyetler sonucu atmosfere salınan karbon dioksit ve diğer sera gazlarının dolaylı gösterimidir. Bu makale, İğdır Üniversitesi Şehit Bülent Yurtseven yerleşkesindeki faaliyetlerinden kaynaklanan karbon ayak izi hesaplama aşamalarını ve azaltmaya yönelik önerileri ele almaktadır. Yapılan hesaplamalar, yerleşkenin çeşitli faaliyetlerini kapsamakta ve genel olarak kabul gören emisyon kapsamlarını içermektedir. Yerleşkenin karbon ayak izi hesaplamasında DEFRA kılavuzu kullanılmış ve hesaplama için temel yıl 2022 seçilmiştir. İğdır Üniversitesi'nin 2022 yılındaki toplam karbon ayak izi yıllık ve alansal bazda, sırasıyla, 3679.66 tCO₂e/yıl ve 1.27x10⁻³ tCO₂e/m² olarak hesaplanmıştır. Bu emisyonlar doğalgaz kullanımı, elektrik tüketimi, ulaşım, su tüketimi ve atık miktarı gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. En büyük emisyon kaynağı doğalgaz tüketimi (%37) olurken, minibüs taşımacılığı kaynaklı emisyonlar (%31) ikinci sırada yer almaktadır. Sonuç olarak, üniversiteler, farklı yetenek ve deneyimlere sahip insanları, gelişmiş araştırma olanakları ve kaynakları bir araya getirerek karbon ayak izinin ölçülmesi, kontrolü ve azaltmasına yönelik yenilikçi yaklaşımların belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu makale İğdır Üniversitesi örneği üzerinden, bir üniversitenin sera gazı envanteri hazırlama sürecini, üniversitenin karbon nötrlüğe ulaşma olasılıklarını ve emisyon azaltma stratejilerini belirlenmesinde literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Determination of Carbon Footprint at Institutions of Higher Education: The Case of the İğdır University

Highlights:

- The use of natural gas and electricity was shown to be the main contributor to emissions at university.
- Greenhouse gas emissions were calculated at 3679.66 tCO₂e/year in 2022.
- The campus carbon footprint was calculated as 1.27x10⁻³ tCO₂e/m².

Keywords:

- Carbon Footprint
- Greenhouse Gas Emissions
- Climate Change
- Direct Emission
- Indirect Emission

ABSTRACT:

University campuses are centers of living where all kinds of sociocultural activities take place and where students spend most of their time throughout their education life. As a result of these activities, it is inevitable that atmospheric greenhouse gas levels in campuses will increase. One of the most common approaches for determining greenhouse gas emissions is the "carbon footprint". Carbon footprint is an indirect representation of the carbon dioxide and other greenhouse gases released into the atmosphere as a result of the activities of an organization or individual. This article deals with the calculation stages of the carbon footprint resulting from the activities of İğdır University Şehit Bülent Yurtseven campus and suggestions for reducing it. The calculations include various activities of the campus, and they contain generally accepted emission scopes. DEFRA guidance was used in the carbon footprint calculation of the campus and the base year for the calculation was 2022. The carbon footprint of İğdır University in 2022 was calculated as 3679.66 tCO₂e/year and 1.27x10⁻³ tCO₂e/m² on annual and area basis, respectively. These emissions are caused by factors such as natural gas consumption, electricity consumption, transport, water consumption and waste amount. The largest emission source is natural gas consumption (37%), followed by emissions from minibüs transportation (31%). In conclusion, universities have an important role to play in identifying innovative approaches to measuring, controlling, and reducing carbon footprints by bringing together people with different skills and experience, advanced research facilities and resources. This article is thought to contribute to the literature in determining the process of preparing a university's greenhouse gas inventory, the possibilities of the university to achieve carbon neutrality and emission reduction strategies through the example of İğdır University.

¹ Sevta TIRINK ([Orcid ID: 0000-0003-0123-0054](https://orcid.org/0000-0003-0123-0054)), İğdır University, Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, İğdır, Türkiye

² Hülya AYKAÇ ÖZEN ([Orcid ID: 0000-0003-4990-6682](https://orcid.org/0000-0003-4990-6682)), Ondokuz Mayıs University, Department of Environmental Engineering, Samsun, Türkiye

***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Sevta TIRINK, e-mail: sevtaptirink@gmail.com

INTRODUCTION

The rapid increase in the world's population, industrialization, urbanization, and the increase in production and consumption as a result of urbanization has led to a rise in environmental problems, and today climate change and sustainability are at the top of the agenda of societies and governments (Truong & Saunders, 2022). These problems, which are caused by the rapid increase in the number of gases that cause the greenhouse effect in the atmosphere, pose a global threat such as the destruction of natural resources, desertification and reduction of biodiversity. Carbon dioxide (CO₂) gas, which is emitted into the atmosphere by human activities and especially by the use of fossil fuels (oil, coal, natural gas), is the leading greenhouse gas (Martínez-Zarzoso et al., 2007; Dewi et al., 2018). For this reason, studies on the calculation of the amount of CO₂ gas emitted have increased in recent years. One of the concepts of these issues is "carbon footprint". The term of carbon footprint has emerged as a tool developed to assess the environmental impacts of greenhouse gases and to reduce their amount (Wiedmann & Minx, 2008). Firstly, in the 1970s, scientists and environmental activists realized that fossil fuel consumption increased carbon dioxide levels in the atmosphere (Broecker, 1975). This realization increased further in the late 1980s when many countries started to monitor and report their greenhouse gas emissions (IPCC, 2007).

Carbon footprint calculation methods and standards started to develop in the mid-1990s and early 2000s (IPCC, 2006). During this period, many international organizations and research institutions conducted studies to standardize the calculation of carbon footprint (Wiedmann and Lenzen, 2018). For the first time in 2001, the International Standards Organization (ISO) defined carbon footprint calculation processes with ISO 14040 and ISO 14044 standards (ISO, 2006).

The concept of "footprint", developed by environmental scientists in the last decade, generally aims to quantify how much natural resources are used by humans (Gökçek et al., 2019). Environmental scientists measure footprints in three categories, namely, ecological footprint, carbon footprint and water footprint (Toröz, 2015). The carbon footprint concept was adopted by many commercial organizations and governments in the early 21st century, with many companies supporting sustainability efforts by calculating the carbon footprint of their products and services (Girod and De Haan, 2018). At the same time, international agreements and government policies have started to use carbon footprint data to set and monitor greenhouse gas emissions reduction targets (UNFCCC, 2015).

Carbon footprint is an indicator of environmental sustainability that measures the impact of humans on nature with quantitative data. This concept helps to understand the relationship between the resources consumed and the wastes produced by people throughout their lives and their relationship with natural resources. Due to climate change concerns, the assessment of emissions and calculation of carbon footprint is gaining interest, especially as a first point of action to reduce one's impact on CO₂ generation and ultimately achieve carbon neutrality. Efforts to reduce emissions and achieve carbon neutrality are being rapidly implemented by many organizations, institutions, countries and other associations at national and international level. The European Union has committed to decarbonization covering all sectors in the European Green Deal, with a commitment to achieve net zero emissions by 2050 (European Union, 2019). The United Nations Development Programmer (UNDP) and Turkey's Ministry of Environment, Urbanization, and Climate Change have started developing a long-term climate change strategy and action plan in accordance with this commitment.

There are various studies in the literature on carbon dioxide emissions and footprint change, which represent the effects of climate change and global warming. Smith et al. (2022) examined the effects of the use of renewable energy sources in the energy sector on carbon emissions. The study addressed how

the use of renewable energy sources instead of fossil fuel-based energy sources can reduce greenhouse gas emissions. Jones et al. (2021) evaluated various strategies aimed at reducing carbon emissions in the transport sector. Solutions such as the use of electric vehicles and optimizing public transport systems were presented. Williams et al. (2020) examined the impact of industrial processes on carbon footprint and investigated how improvements can be made through energy efficiency. Brown et al. (2019) addressed the impact of the agricultural sector on greenhouse gas emissions and discussed how sustainable agricultural practices can reduce these emissions. Chang et al. (2018) provided a critique of the methodologies and standards used in carbon footprint calculations and aimed to guide future research in this field. There are also studies that emphasize cooperation between companies, universities and governments for carbon footprint calculations (Wiedmann & Minx, 2008).

There are also a number of studies in the literature on the change in the institutional carbon footprint of universities. Davis et al. (2022) examined the energy use and carbon footprint reduction strategies of universities. The study addressed the feasibility of energy efficiency and renewable energy projects on campus. Thompson et al. (2021) investigated the impact of green construction projects on carbon emissions on university campuses. The study discussed how sustainable design can reduce energy consumption. Wang et al. (2020) evaluated the carbon footprint awareness of university students and the importance of education on this issue. The study conducted a series of surveys and experiments to understand whether educational programmes are effective. Kim et al. (2019) analyzed the impact of universities' transport systems on carbon footprint. In particular, the effects of cycling and public transport use were examined. Lee et al. (2018) analyzed the impact of university catering and waste management practices on carbon emissions. Food waste and waste minimization strategies are presented.

Carbon footprint is a fundamental identification tool for higher education institutions aiming for carbon neutrality. However, due to the lack of specific guidelines addressing the characteristics of universities, case studies are an important resource when deciding which methodology to use. A general methodology for assessing the emissions of higher education institutions is probably fairly well researched, but applied case studies accessible worldwide would help to further develop the methods and make the calculations clearer. They will also offer a new perspective beyond existing studies, thanks to discussions on appropriate effective mitigation measures, taking into account the characteristics of the institution. Higher education institutions in Turkey have published several studies, including the recommendation to act as pioneers for a sustainable future and realize carbon neutrality in 2053 (Yaka et al., 2015; Günerhan & Günerhan, 2016; Başoğul, 2018; Binboğa & Aylin, 2018; Ömer et al., 2017; Yüksel, 2017; Kumaş, et al., 2019a; Kumaş, et al., 2019b; Doğancılı et al., 2019; Gökçek et al, 2019; Karakaya, 2019; Seyhan & Çerçi, 2022; Sileybi, 2023; Yavuz et al., 2023). Universities are educational and research institutions that offer appropriate ways to adopt new technologies and practices supported by their research and to raise awareness of younger generations on sustainability and climate-friendly actions.

The purpose of this paper includes the calculation and assessment of the carbon footprint at Iğdır University in Turkey. The carbon footprint of the university has been calculated for the base year, which includes various activities of the institution and is determined as the first step towards carbon neutrality. The assessment is based on common calculation methods and includes generally accepted emission scopes. Following the results obtained, the best options for mitigation measures and the possibilities for the campus to achieve carbon neutrality are discussed.

MATERIALS AND METHODS

The following topics are discussed in this section: (1) the definition of the study location, (2) the methodology applied to calculate the carbon footprint of the institution as a result of activities.

Material

Description of the study area

Iğdır University established on 22 May 2008 and located within the borders of Iğdır (Figure 1) in the Eastern Anatolia Region of Turkey. It continues its activities with 11 faculties, 1 institute, 4 vocational schools and 23 application and research centers. As of the 2022-2023 academic year, it has 13190 students, including 5415 associate degree, 5914 undergraduate, 1861 graduate students, 198 administrative staff, 464 academic staff and 188 auxiliary staff. Although Iğdır University has 3 campuses, education and training activities are carried out in two campuses. These campuses are Şehit Bülent Yurtseven Campus and Karaağaç Campus (Figure 2). Şehit Bülent Yurtseven Campus stands out as the largest campus of the university with an area of 2907 km². The campus, which is approximately 14 km away from the city center, is located overlooking the Ağrı Mountain. Most of the university activities are carried out in this campus.



Figure 1. Map of Turkey (Iğdır is shown in green color)



Figure 2. Şehit Bülent Yurtseven campus (Anonymous, 2023a) (a) and Karaağaç campus (Anonymous, 2023b) (b) at Iğdır University

Method

Carbon footprint calculation methodology

There are many regulatory frameworks and international guidelines for calculating institutional carbon footprints, and documents such as the Greenhouse Gas (GHG) Protocol (WRI & WBCSD, 2004),

ISO 14064-1 Greenhouse gases — Part 1: Specification with guidance at the organization level for quantification and reporting of greenhouse gas emissions and removals (ISO, 2018) and Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA) are used quite frequently (Kiehle, 2021; Valls-Val & Bovea, 2021). In this research, DEFRA conversion emissions were used to calculate the carbon footprint of the university. The base year for all data required for the calculation of greenhouse gas emissions in Şehit Bülent Yurtseven campus, the largest campus of Iğdır University, was chosen as 2022. The study boundaries of Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven campus were determined includes the area from the main gate entrance of the campus to the last unit of the campus (Figure 3).

In order to calculate the greenhouse gas emissions associated with the activities of Iğdır University, direct or indirect emissions are taken into account. GHG emissions from activities on the campus are called direct emissions include emissions that are under the control of the university. Indirect emissions include emissions that are not under the control of the university, but are caused by its activities. In this study, direct and indirect GHG inventory was determined in four categories as follows.



Figure 3. Boundaries of the study area

Category 1 - Direct greenhouse gas emissions: It refers to direct greenhouse gas emissions (direct emissions resulting from heating and/or production activities) resulting from activities within the boundaries of the campus.

Category 2 - Energy-related indirect greenhouse gas emissions: It refers to the greenhouse gas emissions resulting from the electricity purchased and consumed by the campus.

Category 3 – Indirect greenhouse gas emissions: It refers to the fuels used by the university's rental vehicles and all emissions resulting from the commuting of employees.

Category 4 - Indirect GHG emissions resulting from purchased services.

Using these methodologies, the carbon footprint of Iğdır University was calculated, and the results were evaluated.

All data required for the calculation were obtained from the administrative offices of Iğdır University. In light of these definitions, the activities needed to determine the carbon footprint of Iğdır University are given in Table 1. The natural gas used by the university for heating purposes and the emissions generated by the vehicles belonging to the university were evaluated under Category 1, and the emissions arising from the electricity consumption of the university were evaluated under Category 2. Emissions from the transport of staff and students are considered under Category 3, emissions from water use and emissions from waste are considered under Category 4.

Table 1. A detailed categorization of emissions caused by IU Activity data source

Scope	Source	Emission	Source activity data
Category 1	Fuel	Natural gas emission used by the buildings in the campus for heating	Serhat Natural Gas Distribution Company
	Vehicles	Emissions from the use of vehicles owned by the university	Department of Administrative and Financial Affairs
Category 2	Electricity	Emissions from the consumption of electricity purchased by the University	Department of Administrative and Financial Affairs
Category 3	Transport vehicle	Emissions caused by personal car	Department of Administrative and Financial Affairs Security Department
	Transport vehicle	Emissions caused by minibus	Iğdır Chamber of Minibus Drivers
Category 4	Medical Waste	Emissions from medical waste generated at the university	Department of Construction and Technical Affairs
	Water	Emissions from water use	Department of Construction and Technical Affairs

Natural gas consumption data: Natural gas consumption includes the consumption of all units in Şehit Bülent Yurtseven campus such as the Rectorate, all faculties, vocational schools, and residences. The total amount of natural gas consumed in Şehit Bülent Yurtseven campus in 2022 is 678510 Sm³.

University vehicle fleet consumption data: The emissions created by the university's vehicle fleet are one of the leading activities that cause greenhouse gas emissions. In this context, vehicle data of the university were obtained in order to calculate greenhouse gas emissions. The total km driven by the university vehicles in 2022 is 255400 km.

Electricity consumption data: The electricity consumption data required for the calculation of greenhouse gas emissions from electricity consumption includes all units in Şehit Bülent Yurtseven campus, and the total electricity consumption of the campus in 2022 was determined as 3366070.74 kWh.

Transportation data: The numbers of personal vehicles and motorcycles driving in Iğdır University were determined at the Şehit Bülent Yurtseven main gate on a day when the student population is high. In 2022, the data required for emission calculation from personal vehicles and motorcycles are summarized in Table 2. It is assumed that vehicles travel an average of 6 km.

Table 2. Number of vehicles driving to Şehit Bülent Yurtseven campus and the distance travelled

Weekdays	Personal Vehicles	Number	124100
		Total km	744600
	Motorcycle	Number	3650
		Total km	21900
Weekend	Personal Vehicles	Number	40150
		Total km	240900
	Motorcycle	Number	1095
		Total km	6570

Minibus is another means of transport preferred by the passengers arriving at the campus. The number of trips and passenger capacities of minibus are based on the data obtained from Iğdır Minibus Chamber. The daily number of minibus vehicles in the campus is 55 and each minibus drives in and out of the campus 10 times a day. The distance taken by minibus within the campus is 14 km from the campus to the city center. The fuel type of the minibus is diesel.

Calculation

The greenhouse gas emission values of Şehit Bülent Yurtseven Campus were calculated using the data obtained from the university departments and foundation and the emission factors provided by international sources. The carbon footprint of the campus was calculated using the calculation methodology of the UK greenhouse gas conversion factors reports published by the UK Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA) in 2022. GHG emission calculations are based on the measured greenhouse gas activity data multiplied by greenhouse gas emission factors. Since the effect

of each of these gases on global warming is different from each other, the term Carbon dioxide equivalent (CO₂e) is used to indicate the effect of greenhouse gases on global warming in a single unit. The GHG emission values expressed in equivalent carbon dioxide constitute the carbon footprint of Şehit Bülent Yurtseven Campus.

The following formula was used for the calculation:

$$\text{Carbon Footprint} = \text{Activity data} \times \text{Emission factor} \quad (1)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Carbon footprint calculation caused by heating: The university uses natural gas as fuel for its heating system. The emission factors required for the carbon footprint calculation resulting from the use of natural gas were calculated using the DEFRA approach calculation methodology. During the calculation, emission values were calculated by multiplying the natural gas data with the emission factors selected for natural gas. The CO₂, CH₄, N₂O, and equivalent CO₂ emissions of the Şehit Bülent Yurtseven Campus resulting from natural gas consumption calculated according to DEFRA are given in Table 3.

Table 3. Annual emission values of Şehit Bülent Yurtseven Campus caused by natural gas consumption

Location	Activity data (m ³)	Emission value (tCO ₂ e)			Total carbon footprint
		tCO ₂	t CH ₄	tN ₂ O	tCO ₂ e
Mosque and Complex Building	29797	59.9495	0.0816	0.0319	60.0630
Animal Hospital	9263	18.6365	0.0254	0.0099	18.6718
Workshop Building	30302	60.9655	0.0830	0.0324	61.0810
Vocational School Dining Hall	67	0.1348	0.0002	0.0001	0.1351
Vocational School	44244	89.0158	0.1212	0.0473	89.1844
Laboratory Building	18255	36.7278	0.0500	0.0195	36.7973
Indoor Sports Hall	47974	96.5203	0.1314	0.0513	96.7031
Medico Social Dining Hall	6564	13.2063	0.0180	0.0070	13.2313
Medico Social Building	65336	131.4515	0.1790	0.0699	131.7004
A3 Lodging	50559	101.7212	0.1385	0.0541	101.9138
B3 Lodging	55759	112.1832	0.1528	0.0597	112.3956
C3 Lodging	58263	117.2211	0.1596	0.0623	117.4431
Rectorate Building	89723	180.5164	0.2458	0.0960	180.8582
Faculty of Agriculture	159925	321.7579	0.4382	0.1711	322.3672
Rectorate Residence	8468	17.0370	0.0232	0.0091	17.0693
Nizamiye Building	4011	8.0699	0.0110	0.0043	8.0851
Total		1365.1146	1.8591	0.7260	1367.6997

According to these calculations, the equivalent carbon dioxide value of CO₂, CH₄ and N₂O greenhouse gases were calculated as 1365.1146 tCO₂e, 1.8591 tCO₂e, and 0.7260 tCO₂e, respectively. As a result, the carbon footprint caused by natural gas consumption at Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven Campus is total 1367.6997 tCO₂e for the year 2022.

Carbon footprint calculation from transportation: In order to calculate the emissions from transportation at Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven Campus, it is important which means of transport are used by students, academic personal and staff. In this study, emission calculation from transport is analyzed in two categories as direct and indirect emission. The direct emission source is the emissions caused by the vehicle fleet of the university. The data belong to the university's cars were taken from the departments and the emission values were calculated by multiplying the appropriate emission factors taken from DEFRA (2022). Greenhouse gas emission values and carbon footprint amounts calculated for the cars in the university vehicle fleet are given in Table 4. For the calculation of the carbon footprint caused by vehicle owned by the university, the emission factor is selected according to the motor capacity and fuel type.

Table 4. Emission values and carbon footprint of the cars in the university vehicle fleet

No	Type	Fuel type	Average km	Emission value (tCO ₂ e)			Total carbon footprint
				t CO ₂	t CH ₄	tN ₂ O	tCO ₂ e
1	Car	Diesel	10000	1.3801	0.000041	0.0188	1.3989
2	Car	Diesel	10000	1.3801	0.000041	0.0188	1.3989
3	Car	Diesel	15000	2.07015	0.000062	0.0282	2.0984
4	Car	Diesel	15000	2.07015	0.000062	0.0282	2.0984
5	Car	Gasoline	10000	1.3801	0.000041	0.0188	1.3989
6	Car	Diesel	10000	1.6612	0.000041	0.0188	1.6800
7	Car	Diesel	7000	0.96607	0.000029	0.01316	0.9793
8	Car	Diesel	8000	1.32896	0.000033	0.01504	1.3440
9	Car	Diesel	25000	4.153	0.000104	0.047	4.2001
10	Car	Diesel	10000	1.6612	0.000104	0.0188	1.6800
11	Pickup	Diesel	15000	2.4918	0.000062	0.0282	2.5201
12	Pickup	Diesel	15000	2.4918	0.000062	0.0282	2.5201
Total				23.03463	0.000621	0.282000	23.3173

In the emission calculation of vehicles such as buses, minibus and vans, which are called large vehicles and are generally used for freight transport, in- and out-of-university transport and other activities, emission factors were selected by taking into account the maximum load weights of the vehicles. The selected emission factors were multiplied by the current km data of the vehicles and emission values were calculated. Greenhouse gas emission values and carbon footprint amounts calculated for large vehicles in the university vehicle fleet are given in Table 5.

Table 5. Emission values and carbon footprint of large vehicles in the university vehicle fleet

No	Type	Fuel Type	Average km	Emission value (tCO ₂ e)			Total carbon footprint
				t CO ₂	t CH ₄	tN ₂ O	tCO ₂ e
1	Bus	Diesel	12000	13.4496	0.0024	0.14292	13.59492
2	Bus	Diesel	12000	8.48904	0.00144	0.08748	8.57796
3	Bus	Diesel	12000	8.48904	0.00144	0.08748	8.57796
4	Bus	Diesel	1000	0.70742	0.00012	0.00729	0.71483
5	Truck	Diesel	10000	7.0742	0.0012	0.0729	7.1483
6	Truck	Diesel	10000	7.0742	0.0012	0.0729	7.1483
7	Truck	Diesel	15000	10.6113	0.0018	0.10935	10.72245
8	Minibus	Diesel	6000	1.3782	-	0.01116	1.38936
9	Minibus	Diesel	3000	0.6891	-	0.00558	0.69468
10	Minibus	Diesel	1000	0.2297	-	0.00186	0.23156
11	Minibus	Diesel	10000	2.5295	-	0.0186	2.5481
12	Minibus	Diesel	12000	3.0354	-	0.02232	3.05772
13	Tractor	Diesel	600 lt	1.596804	0.000156	0.02232	1.61928
14	Tractor	Diesel	800 lt	2.129072	0.000208	0.02976	2.15904
Total				67.482576	0.009964	0.69192	68.18446

Accordingly, the carbon footprint caused by vehicles in Category 1 emissions of Iğdır University in 2022 was found to be 91.50176 tCO₂e.

The calculation of emissions from electricity consumption is a significant category in determining the carbon footprint of the campus. The carbon footprint of the campus resulting from electricity consumption in 2022 was calculated (Table 6).

Table 6. Emission values and carbon footprint from electricity consumption

Electricity Consumption Amount (kWh)	Emission value (tCO ₂ e)			Total carbon footprint
	t CO ₂	t CH ₄	tN ₂ O	tCO ₂ e
3366070.74	643.62639	2.69286	4.61152	650.93076

Accordingly, the contribution of electricity consumed in 2022 to the carbon footprint of the university is 650.93076 tCO₂e.

The calculation of emissions from minibus, personal vehicles and motorcycles, which are the vehicles used by academic-administrative staff and students for transportation to the campus, is very important and is classified as an indirect emission source. In order to calculate the emissions generated by these vehicles, information such as vehicle characteristics, the distance travelled in 2022, the number of trips and the number of passengers are needed.

Personal vehicles in and out of Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven campus are important in the calculation of carbon footprint. The data were collected by determining the average number of vehicles at the main gate of Şehit Bülent Yurtseven by choosing a day with a high student density. In 2022, the number of personal vehicles on the campus on weekdays and weekends was obtained. After determining these data on an average annual basis, the carbon footprint resulting from the use of personal vehicles and motorbikes were calculated by multiplying the calculated km data with the emission factors from DEFRA (2022) (Table 7).

Table 7. Emission values and carbon footprint from personal vehicles

		Total km	Emission value (tCO ₂ e)			Total carbon footprint
			t CO ₂	t CH ₄	tN ₂ O	tCO ₂ e
Weekdays	Personal car	744600	126.1352	0.1266	0.8191	127.0809
	Motorcycle	21900	2.43922	0.03460	0.01292	2.48675
Weekend	Personal car	240900	40.8085	0.0410	0.2650	41.1144
	Motorcycle	6570	0.73177	0.01038	0.00388	0.74602
Total						171.42807

Transportation to the university by minibus is another emission source and is considered within the scope of indirect emissions. Table 8 shows the emissions emitted by minibus driving into the campus.

Table 8. Emission values and carbon footprint caused by minibus providing transportation to the university campus

	Total km	Emission value (tCO ₂ e)			Total carbon footprint
		t CO ₂	t CH ₄	tN ₂ O	tCO ₂ e
Weekdays	3819200	966.06664	0	7.103712	973.1704
Weekend	655200	165.73284	0	1.218672	166.9515
Total					1140.1219

The carbon footprint value caused by minibus, which are among the vehicles for transport in Şehit Bülent Yurtseven campus, at the university in 2022 was calculated as 1140.1219 tCO₂e.

Carbon footprint calculation from water consumption: The emission factor used for the calculation of the carbon footprint resulting from water consumption is multiplied by the water consumption data and the emission value and the carbon footprint resulting from water consumption are given in Table 9. The emission factor for water consumption is 0.149 kg of CO₂e per cubic meter (DEFRA, 2022).

Table 9. Carbon footprint of Şehit Bülent Yurtseven campus caused by water consumption

Water consumption (m ³)	Emission factor (kg CO ₂ e per unit)	Emission value (kg CO ₂ e)	Carbon footprint (tCO ₂ e)
314763.6	0.149	46899.78	46.8998

Carbon footprint calculation from wastes: For the determination of emissions from wastes, only the amount of medical waste of the campus in 2022 was obtained. The emission value used to calculate the carbon footprint resulting from medical waste is multiplied by medical waste data and the emission factor. In DEFRA's 2022 emission factors list, the emission factor of medical waste is 467.008 kg CO₂e per cubic meter (Defra, 2022). The quantity of medical waste generated and the carbon footprint resulting from the waste is given in Table 10.

Table 10. Carbon footprint of medical waste at Şehit Bülent Yurtseven Campus

Amount of waste (kg)	Emission factor (kg CO ₂ e per unit)	Emission value (kg CO ₂ e per unit)	Carbon footprint (tCO ₂ e)
452	467.008	211087.6160	211.0876

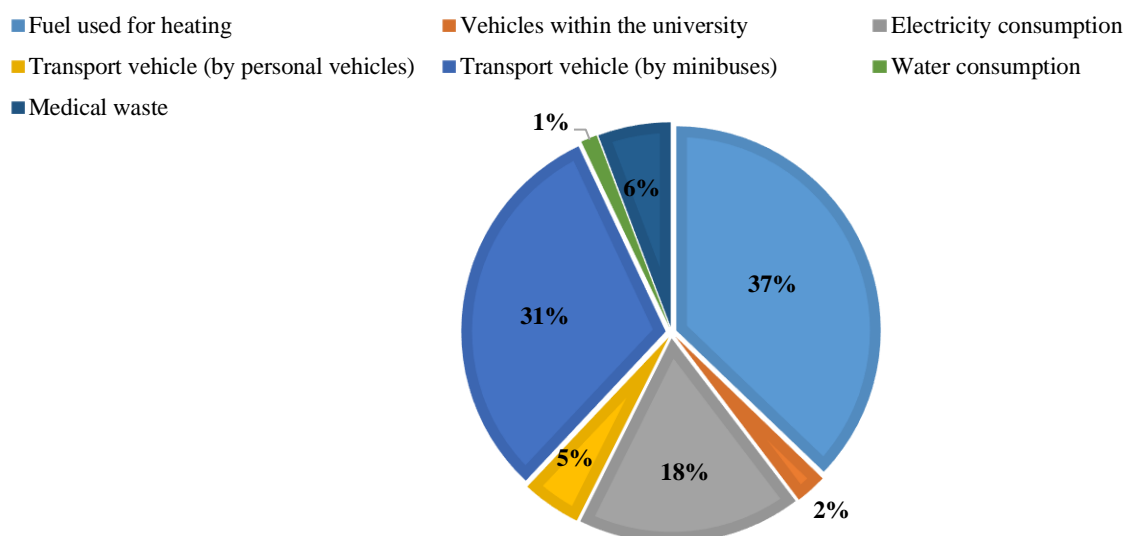
In 2022, the carbon footprint of the emission resulting from medical waste generated at the Şehit Bülent Yurtseven campus was calculated as 211.0876 tCO₂e.

This study under consideration focuses on the carbon footprint inventory of Iğdır University in Turkey and emphasizes the importance of reducing carbon footprint to mitigate the threats posed by global warming. It highlights that human-induced activities such as fossil fuel consumption, transportation, waste, water consumption increases greenhouse gas levels in the atmosphere, leading to global warming (Aladağ, 2023; Tırınk & Öztürk, 2023). The study, University Şehit Bülent Yurtseven Campus is calculated as 3679.66 tCO₂e/year in 2022. Considering the emissions of the university under categories-1,-2,-3, and-4 the following emission values are 1459.201 tCO₂e/year, 650.93076 tCO₂e/year, 1311.54997 tCO₂e/year, and 257.9864 tCO₂e/year, respectively.

Overall, the article provides valuable insights into the carbon footprint inventory of Iğdır University and the importance of reducing carbon footprint, aligning with existing literature on carbon footprint reduction, measurement methods, and the role of institutions in addressing carbon footprints.

CONCLUSION

In the carbon footprint calculation of Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven Campus, emission-emitting activities such as natural gas use, electricity consumption, transportation, water consumption and waste amount were examined under four categories for 2022. The calculation of the carbon footprint and the evaluation of the results are important in terms of identifying measures to reduce the carbon footprint of the campus. Accordingly, the greenhouse gas emissions caused by the activities of Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven Campus were calculated as 3679.66 tCO₂e/year in 2022. When the emissions of the university are analyzed as Category-1, Category-2, Category-3 and Category-4, 40% of the total equivalent CO₂ emissions are Category-1, 18% are Category-2, 35% are Category-3 and 7% are Category-4 emissions.

**Figure 4.** Carbon footprint of the activities performed at the university

Category 1 emissions occur from natural gas consumption and vehicles owned by the university. The total share of the carbon footprint resulting from natural gas consumption compared to other university-owned vehicles emission sources is 94%.

Category 2 emissions causing greenhouse gas emissions are emissions from electricity consumption. About 18% of the total greenhouse gas emissions produced by the Şehit Bülent Yurtseven campus come from the emission source of electricity usage.

Among the means of transport, the largest carbon footprint is caused by car transport. The carbon footprint from these vehicles' accounts for 13% of Category 3 emissions and 5% of the total carbon footprint. The main reason that individuals prefer personal vehicles instead of public transport. The total carbon footprint value from minibus that provide transportation on the campus is the second highest transportation emission source. The carbon footprint caused by the minibus used by the staff and students to reach the campus constitutes 31% of total emissions and 87% of Category 3 emissions. The study boundaries of Iğdır University Şehit Bülent Yurtseven campus were determined includes the area from the main gate entrance to the last unit of the campus. The amount of footprint per area was calculated by dividing the amount of carbon footprint by the area within the determined boundary. In 2022, the areal carbon footprint of Şehit Bülent Yurtseven campus is $1.27 \times 10^{-3} \text{ tCO}_2\text{e/m}^2$.

The calculation and evaluation of the carbon footprint are essential for determining measures to reduce the carbon footprint of the campus. In light of the findings from the carbon footprint calculation at Iğdır University's Şehit Bülent Yurtseven Campus, various mitigation strategies can be proposed to reduce the university's carbon footprint. These recommendations can be consolidated into energy efficiency measures, adoption of renewable energy, transportation optimization, waste reduction and management, water conservation, green infrastructure and land use, behavioral change and education, carbon offsetting, investment and financing for sustainability, and continuous monitoring and reporting.

- For energy efficiency measures, an energy management system should be implemented to optimize energy usage. Therefore, a transition to LED lighting and energy-efficient appliances should be facilitated. Insulation and the improvement of heating, ventilation, and air conditioning (HVAC) systems are required to reduce the use of natural gas, a significant source of emissions.
- To adopt renewable energy, solar panels should be installed on campus buildings to produce clean energy and reduce dependence on non-renewable energy sources. The university currently has a solar energy plant, however, there is a need for more renewable energy sources.
- For transportation optimization, a green transportation plan should be developed to encourage public transportation, car-sharing, and non-motorized transit (bicycling, walking). Electric vehicle charging stations should be installed on campus to encourage the use of electric vehicles by staff and students. Additionally, a transition to electric or hybrid vehicles could be made in the university fleet.
- To reduce and manage waste, comprehensive recycling and composting programs could be implemented to decrease emissions caused by waste. Education campaigns on waste reduction and proper separation practices could be initiated.
- For water conservation, investments in water-saving fixtures and devices could be made. Rainwater harvesting and greywater recycling systems could be implemented throughout the university to reduce the water footprint.
- With the aim of green infrastructure and land use, increasing green areas on campus, which serve as carbon sinks, could be facilitated. This could be supported by using sustainable landscaping practices that require less maintenance and water.

- To promote behavioral change and education, workshops and training for staff and students could be organized to encourage eco-friendly behaviors. Sustainability and climate change should be incorporated as an integral part of the curriculum in all departments.
- For carbon offsetting, participation in carbon offset programs, preferably local environmental projects that provide community benefits, could be facilitated to compensate for unavoidable emissions.
- Regarding investment and financing for sustainability, funds could be allocated for the research and implementation of sustainability projects. Partnerships and grants, especially for carbon reduction initiatives, should be explored.
- For continuous monitoring and reporting, the campus's carbon emissions should be regularly monitored and reported to track the progress of the implemented measures.

It is vital to continuously develop and improve sustainability strategies based on the data collected. These strategies should be part of a comprehensive, integrated plan that provides a collaborative and sustainable approach to reducing the carbon footprint, aligning with the university's mission and resources.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Agreement, P. (2015, December). Paris agreement. In report of the conference of the parties to the United Nations framework convention on climate change (21st session, 2015: Paris).
- Aladag, E. (2023). The Influence of Meteorological Factors on Air Quality in the Province of Van, Turkey. *Water, Air, & Soil Pollution*, 234(4), 259.
- Anonymous, (2023a). <https://eskisite.igdir.edu.tr/alb%C3%BCm/2023-%C3%BCniversitemizden-bahar-g%C3%B6r%C3%BCnt%C3%BCleri>. (Accessed on 10 October 2023).
- Anonymous, (2023b). <https://www.yurtlarburada.com/Igdir-universitesi-hakkinda/>. (Accessed on 10 October 2023).
- Baçoğul, Y. (2018). Akademisyen ve İdari Personelin Ekolojik Ve Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi: Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Örneği. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 6(3), 464-470.
- Binboğa, G., & Aylin, Ü. (2018). Sürdürülebilirlik Ekseninde Manisa Celal Bayar Üniversitesi'nin Karbon Ayak İzinin Hesaplanmasına Yönelik Bir Araştırma. *Uluslararası İktisadi ve İdari İncelemeler Dergisi*, (21), 187-202.
- Broecker, W. S. (1975). Climatic Change: Are We on the Brink of a Pronounced Global Warming? *Science*, 189(4201), 460-463.
- Brown, C., Lee, M., & Kim, J. (2019). Sustainable Agriculture and Its Impact on Carbon Emissions. *Agriculture and Environmental Science*, 17(1), 90-105.
- BSI, (2008). Publicly Available Specification PAS 2050:2008. Specification for the assessment of the life cycle greenhouse gas emissions of goods and services. British Standards Institution, London
- Chang, T., Wang, Y., & Lee, S. (2018). A Critique on Methodologies Used in Carbon Footprint Calculations. *Environmental Science & Technology*, 54(22), 13412-13420.
- Davis, J., Smith, L., & Roberts, N. (2022). Energy Use and Carbon Footprint Reduction Strategies in Universities. *Journal of Environmental Management*, 34(2), 200-215.

- DEFRA, (2022). Greenhouse gas reporting: conversion factors 2022. <https://www.gov.uk/government/publications/greenhouse-gas-reporting-conversion-factors-2022>. (Erişim tarihi 10.10.2023)
- Dewi, L., Wibowo, A., & Immanuel, N. (2018). E-census implementation: a case study in naikoten ii, kupang, indonesia. *Matec Web of Conferences*, 248, 05003. <https://doi.org/10.1051/matecconf/201824805003>
- Doğancılı, O. S., Karaçar, E., & Korkmaz, N. (2019). Sinop Üniversitesi'nin Karbon Ayak İzini Ölçme Üzerine Bir Araştırma. 8 th International Vocational Schools Symposium. UMYOS'19 SİNOP, 11-13 June 2019 Türkiye
- Eggleston, H. S., Buendia, L., Miwa, K., Ngara, T., & Tanabe, K. (2006). 2006 IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. <https://www.ipccnggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.html>
- European Union, (2019). European Union A European Green Deal. https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en
- Fetting, C. (2020). The European green deal. *ESDN report*, 53.
- Girod, B., & De Haan, P. (2018). Carbon Footprinting in Practice: Recent Trends and Insights. *Environmental Science & Technology*, 52(5), 2355-2366.
- Gökçek, B., Bozdağ, A., & Demirbağ, H. (2019). Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi örneğinde karbon ayak izinin belirlenmesi. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 721-730.
- Günerhan, S. A., & Günerhan, H. (2016). Türkiye için sürdürülebilir üniversite modeli. *Mühendis ve Makina*, 57(682), 54-62.
- IPCC, (2006). Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Volume 5 - Waste. Retrieved from <https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol5.html>
- IPCC, (2007). Climate Change 2007: Synthesis Report. Retrieved from <https://www.ipcc.ch/report/ar4/syr/>
- IPCC, I. (2014). Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.
- IPM, (2021). İstanbul Politikalar Merkezi (İPM) (2021). Türkiye'nin Karbonsuzlaşma Yol Haritası 2050'de Net Sıfır. <https://ipc.sabanciuniv.edu/Content/Images/CKeditorImages/20211026-23105368.pdf>
- ISO (2006). ISO 14040:2006 - Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework. Retrieved from <https://www.iso.org/standard/37456.html>
- ISO, (2018). International Organization for Standardization <https://www.iso.org/search.html?q=14067>. (Erişim 10.10.2023)
- ISO, (2019). International Organization for Standardization <https://www.iso.org/search.html?q=14064>. (Erişim 10.10.2023)
- Jones, L., Williams, M., & Gupta, R. (2021). Strategies for Reducing Carbon Emissions in Transportation. *Transportation Research*, 30(2), 150-167.
- Karakaya, H. (2019). Enerji kaynaklı karbon ayak izinin hesaplanması: Batman Üniversitesi örneği. I. Uluslararası Harran Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 8-10 Mart 2019, Şanlıurfa, Türkiye
- Kim, H., Choi, S., & Park, J. (2019). Impact of University Transportation Systems on Carbon Footprint. *Transportation Research Part D*, 28(3), 22-38.
- Kumaş, K., Akyüz, A. Ö., Zaman, M., & Güngör, A. (2019a). Sürdürülebilir bir çevre için karbon ayak izi tespiti: MAKÜ Bucak Sağlık Yüksekokulu örneği. *El-Cezeri*, 6(1), 108-117.
- Kumaş, K., Akyüz, A., & Güngör, A. (2019b). Burdur mehmet akif ersoy üniversitesi bucak yerleşkesi yükseköğretim birimlerinin karbon ayak izi tespiti. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 1277-1291.
- Lee, S., Kim, M., & Park, H. (2018). Carbon Emissions from University Food Services and Waste Management: A Case Study. *Journal of Waste Management*, 44(12), 2409-2420
- Martínez-Zarzoso, I., Bengochea-Morancho, A., & Morales-Lage, R. (2007). The impact of population on co2 emissions: evidence from european countries. *Environmental and Resource Economics*, 38(4), 497-512. <https://doi.org/10.1007/s10640-007-9096-5>

- Ömer, E., Parlakay, O. P., Hilal, M., & Bozhüyük, B. (2017). Ziraat Fakültesi akademisyenlerinin ekolojik ayak izinin belirlenmesi: Mustafa Kemal Üniversitesi örneği. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 34(2), 138-145.
- Protocol, G. G. (2011). Greenhouse gas protocol. Sector Toolsets for Iron and Steel-Guidance Document.
- Protocol, K. (1997). Kyoto protocol. UNFCCC Website. Available online: http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php (accessed on 1 January 2011).
- Protocol, M. (1987). Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer. Washington, DC: US Government Printing Office, 26, 128-136.
- Seyhan, A. K., & Çerçi, M. (2022). IPCC Tier 1 ve DEFRA Metotları ile Karbon Ayak İzinin Belirlenmesi: Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi'nin Yakıt ve Elektrik Tüketimi Örneği. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(3), 386-397.
- Sıleybi, L. (2023). Harran Üniversitesi Osmanbey Kampüsü Karbon Ayak İzinin Hesaplanması. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi). Şanlıurfa, Türkiye.
- Smith, J., Miller, K., & Johnson, S. (2022). Renewable Energy Transition in Energy Sector: Implications on Carbon Emissions. *Journal of Environmental Studies*, 25(4), 320-335.
- Thompson, M., Kelly, R., & Green, F. (2021). Green Construction in University Campuses and Its Impact on Carbon Emissions. *Journal of Sustainable Construction*, 19(1), 45-60.
- Tırınk, S., & Öztürk, B. (2023). Evaluation of PM10 concentration by using Mars and XGBOOST algorithms in Iğdır Province of Türkiye. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(5), 5349-5358.
- Toröz, A., (2015). Gemi Kaynaklı Atıkları Alan ve Atık kabul tesisinde karbon ayak izinin belirlenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.
- Truong, V. & Saunders, S. (2022). Guest editorial. *Journal of Social Marketing*, 12(1), 1-4. <https://doi.org/10.1108/jsocm-12-2021-246>
- UNDP, (2021). <https://www.undp.org/tr/turkiye/press-releases/undp-turkiyenin-2053-yilina-kadar-net-sifir-rotasi-cizmesine-destek-veriyor>
- UNFCCC (2015). Paris Agreement. Retrieved from <https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement/the-paris-agreement>
- UNFCCC, (1992). Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi, Rio de Janeiro, Brezilya
- Wang, Y., Lin, T., & Liu, Z. (2020). Carbon Footprint Awareness Among University Students: An Experimental Study. *Journal of Environmental Education*, 31(4), 350-364.
- Wiedmann, T., & Lenzen, M. (2018). Environmental and social footprints of international trade. *Nature Geoscience*, 11(5), 314-321.
- Wiedmann, T., & Minx, J. (2008). A Definition of 'Carbon Footprint'. In *Ecological Economics Research Trends*, 1-11. Nova Science Publishers.
- Williams, S., Clark, D., & Zhao, L. (2020). Industrial Processes and Carbon Footprint: An Efficiency Analysis. *Journal of Industrial Ecology*, 28(3), 410-422.
- Yaka, İ. F., Koçer, A., & Güngör, A. (2015). Akdeniz üniversitesi sağlık hizmetleri meslek yüksekokulu karbon ayak izinin tespiti. *Makine Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 12(3), 37-45.
- Yavuz, A. B., Osman, K., & Yaniktepe, B., (2023). Karbon ayak izi tespiti: Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi örneği. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 12(4), 1-1.
- Yüksel, Ş. B. (2017). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çalışanlarının Karbon Ayak İzi Saptanması. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi. Aile Hekimliği Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi. Ankara, Türkiye.

To Cite: Topal, M., Arslan Topal, E.I. & Öbek, E. (2023). Phycoremediation of Thallium Toxic Metal Present in Gallery Water of an Abandoned Mine Area by Algae *Cladophora fracta*. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2546-2554.

Phycoremediation of Thallium Toxic Metal Present in Gallery Water of an Abandoned Mine Area by Algae *Cladophora fracta*

Murat TOPAL^{1*}, E. Işıl ARSLAN TOPAL², Erdal ÖBEK³

Highlights:

- Uptake of thallium by *Cladophora fracta* in mine water was determined.
- The accumulation of thallium by *Cladophora fracta* was 900% at 120 min
- It was determined that *Cladophora fracta* can be used in phycoremediation

ABSTRACT:

In this study, phycoremediation of thallium toxic metal present in gallery water of an abandoned mine area was investigated by using *Cladophora fracta*. Within the scope of the study, a reactor containing *Cladophora fracta* was used and it was determined whether the *Cladophora fracta* accumulated thallium depending on time. Additionally, the bioconcentration factor was calculated. According to research findings; the accumulations of thallium by *Cladophora fracta*, compared with uncontaminated alga, were 225% at 5 min, 450% at 10 min, 550% at 20 min, 575% at 40 min, 700% at 60 min, and 900% at 120 min, respectively. BCF values were between 1000-5000. This indicated that *Cladophora fracta* had bioaccumulation potential. As a result, this research carried out in mining area has documented the phycoremediation of thallium in gallery water of an abandoned mine area.

Keywords:

- Algae
- Metal
- Phycoremediation
- Thallium
- Toxic

¹Murat TOPAL ([Orcid ID: 0000-0003-0222-5409](https://orcid.org/0000-0003-0222-5409)), Munzur University, Department. of Chemical and Chemical Process Technology, Tunceli, Türkiye

²E. Işıl ARSLAN TOPAL ([Orcid ID: 0000-0003-0309-7787](https://orcid.org/0000-0003-0309-7787)), Fırat University, Faculty of Engineering, Department of Environmental Engineering, Elazığ, Türkiye

³Erdal ÖBEK ([Orcid ID: 0000-0002-4595-572X](https://orcid.org/0000-0002-4595-572X)), Fırat University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Elazığ, Türkiye

Corresponding Author: Murat TOPAL, e-mail: murattopal@munzur.edu.tr

INTRODUCTION

Mining, which is an important industry branch worldwide, makes a significant contribution to economy of many countries as it generates billions of dollars annually. But mining is not considered an environmentally sustainable industry (Kamal et al., 2017). Increasing mining operations cause concern for the environment and health (Palmer et al., 2015). The mining industry affects the environment in the following ways: expose toxic elements, increase the risk of contamination of nearby ground and surface waters, remove topsoil, disrupt the existing ecosystems, damages landscapes by creating erosion and deplete surrounding freshwater sources (Kamal et al., 2017). Many of the concerns for health and environment are related to mine water issues (Palmer et al., 2015). Mining industry waters includes various heavy metals some has properties of toxicity/poisonous. Metals have become a dominant pollutant of water due to the continuous growth in industrialization and urbanization (Mwandira et al., 2020). Heavy metal pollution can have a negative effect on freshwaters (e.g. rivers, lakes, dams, and underground aquifers (Zvinowanda et al., 2009). Toxic heavy metals accumulate when they pass body and cause health problems (Mwandira et al., 2020). Heavy metal toxicity can lead to the following health problems: lower energy levels and central nervous function, reduced mental and lungs, kidneys damage to blood composition, and other vital organs (Amarasinghe and Williams, 2007; Zvinowanda et al., 2009).

Thallium (Tl) is a rare heavy metal. Tl averages 0.490 mg per kg in the Earth's crust (Peter and Viraraghavan, 2005). The USEPA guideline for Tl in drinking water are at 0.5 (objective) and 2.0 $\mu\text{g/L}$ (Belzile and Chen, 2017). Tl is emitted anthropogenically via the mining (Turner et al., 2013). Tl has been listed as a priority pollutant worldwide (Li et al., 2020a). It is more toxic than mercury, cadmium, and lead, even when present at very trace levels in waters (Liu et al., 2018; Liu et al., 2019). Tl is toxic to plants, animals and humans (Turner et al., 2013). Exposure to thallium can lead to acute or chronic poisoning (Peter and Viraraghavan, 2005). Thallium can affect the respiratory, cardiovascular and gastrointestinal (Wang et al., 2020). The use of thallium compounds in industrial activities can pose a threat to human health and the environment. Therefore, new technologies should be developed to control thallium pollution (Li et al., 2020b). The main thallium removal technologies reported includes solvent extraction (Chung et al., 2003; Rajesh and Subramanian, 2006; Hassanien et al., 2017), adsorption (Wan et al., 2014; Huangfu et al., 2017; Zhang et al., 2018), ion exchange (Li et al., 2017), coagulation (Huangfu et al., 2017), chemical oxidation and precipitation (Liu et al., 2017; Li et al., 2019; Li et al., 2020b; Li et al., 2020a; Wang et al., 2020). However, these technologies have various disadvantages. Among the treatment methods, biological technologies stand out with many advantages. A technique used in the removal of heavy metals in aquatic or terrestrial environments is bioremediation (Lovley and Coates, 1997; Malik, 2004; Li et al., 2015). Bioremediation is the process of reducing the concentration of pollutants by microorganisms or converting them into less hazardous products. Bioremediation technique uses natural biological mechanisms to destroy dangerous pollutants, using microorganisms and plants or their products to return contaminated environments to their original state (Ayangbenro et al., 2017). The availability of various organisms such as bacteria, fungi, algae and plants has been reported for the biological treatment of contaminants (Karigar et al., 2011). The conventional techniques are often more expensive and ineffective for removal of metal pollution (Ayangbenro et al., 2017).

Phycoremediation is used for the removal or biotransformation of pollutants, including heavy metals from wastewater (Podder and Majumder, 2016). While microalgae or macroalgae are growing they could able to remove heavy metals from wastewater (Ahmad et al., 2013; Samal et al., 2020).

Algae, due to their negatively charged cell surfaces and their large cell surface to volume ratio, display ideal properties for intra- and/or extra-cellular adsorption of heavy metals (Wilde and Benemann, 1993; Li et al., 2015). Live algae possess intracellular polyphosphates which participate in metal sequestration, as well as algal extracellular polysaccharides that serve to chelate or bind metal ions (Gardea-Torresdey et al., 1998). Leaching water containing thallium from both abandoned and operated mines must be rationally treated before reaching the environment. Ecofriendly and cost-effective technologies have to be developed for the removal of the poisonous heavy metal thallium. Therefore, in this study biotechnological application for remediation of poisonous metal thallium in an abandoned mine area gallery water (MAGW) is assessed by the usage of macroalgae *Cladophora fracta*.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

The study area is located in Elazig, Turkey (Figure 1). MAGWs are discharged to the Keban Dam Lake. The discharge of the MAGWs adversely affects water quality and causes environmental problems in Fırat River and Karakaya Dam Lake. Therefore, it is necessary to treat the MAGWs.



Figure 1. The Study Area

Sampling and analysis

Freshwater algae (*Cladophora fracta*) are collected from Lake Hazar (Elazig, Turkey). The reactors' size used in the study was 51x37x27cm (Figure 2). Algae were added to the reactors. The study period was 7 days. 100 gr algae was harvested first in minutes and then daily. MAGWs were taken as 250 ml. The reactors were put into the MAGWs in the real outdoor condition. Algae were dried and pulverized. The analysis procedure for algae as follows: the algae sample was cold leached with HNO₃. Aqua Regia solution of equal parts of concentrated HCl, HNO₃, and DI H₂O were added to each sample to leach in a heating block of the hot water bath. The sample was made up to volume with dilute HCl before being filtered. Then, algae and MAGWs were analyzed by ICP/MS (ICP/MS-Perkin-Elmer ELAN 9000) in a laboratory with ISO 9001:2008 accreditation. In algae and MAGWs, thallium concentrations were determined.

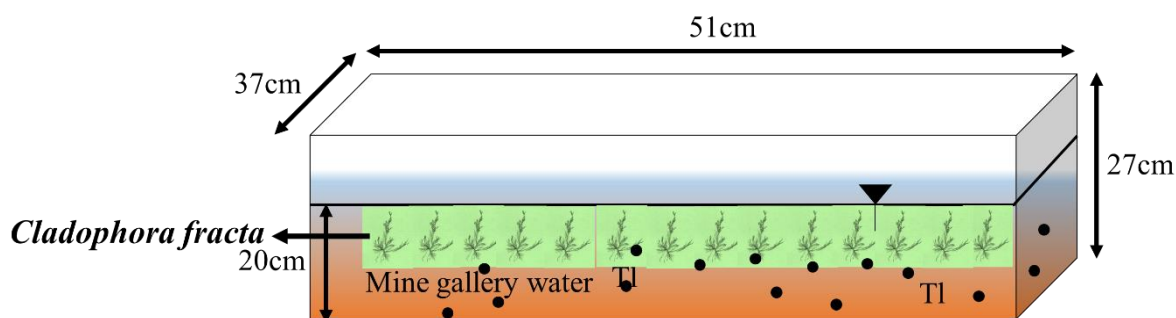


Figure 2. The Reactors

BCF (bioconcentration factor)

BCF is the rate of thallium value in algae to thallium value in MAGWs. It is an indicator of the bioaccumulation potential of thallium by *Cladophora fracta*. BCF is calculated as follows;

$$BCF = C_{CF}/C_{MW} \quad (1)$$

where C_{CF} is the thallium value in the *Cladophora fracta* and C_{MW} is the thallium value in mine gallery water.

Uptake of thallium by *Cladophora fracta*

The uptake of thallium by *Cladophora fracta* is calculated as follows;

$$AC (\%) = \frac{C-C_0}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

where, AC= accumulation capacity (%), C=thallium values in algae (mg/kg), and C_0 = uncontaminated algae (mg/kg)

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using IBM SPSS Statistics 21 program (USA). The results were analyzed by a Pearson test to determine the relationship between thallium in *Cladophora fracta* according to different times.

RESULTS AND DISCUSSION

EC and pH values, concentrations of Tl were determined in the MAGWs. The EC value ranged from 2.32 to 2.54 mS/cm (average EC=2.41 mS/cm). pH value of the gallery water ranged from 7.38 to 7.49 (average pH = 7.44). The average of Tl concentration in MAGWs was determined as 1.81 ± 0.09 $\mu\text{g/L}$. The *Cladophora fracta* was investigated for the bioaccumulation of thallium in MAGWs. The value of thallium in *Cladophora fracta* was determined in the uncontaminated area. The determined value was used as control values. Thallium accumulation by *Cladophora fracta* is shown in Figure 3.

Compared to control (0.04 ± 0.02 mg/kg), maximum value of thallium by *Cladophora fracta* in reactors was 900% (0.4 ± 0.02 mg/kg) for 120min and minimum accumulation of thallium was determined as 225% (0.13 ± 0.01 mg/kg) for 5 min.

The accumulation of thallium concentrations by *Cladophora fracta* increased continuously for 120 min. The concentrations of thallium by *Cladophora fracta*, compared with uncontaminated alga (0.04 mg/kg), were 3.25 times at 5 min, 5.5 times at 10 min, 6.5 times at 20 min, 6.75 times at 40 min, 8 times at 60 min and 10 times at 120 min, respectively. Thallium accumulation were 120 min > 60 min > 40 min > 20 min > 10 min > 5 min, respectively (Fig 3a). According to Figure 3b, compared to control (0.04 ± 0.02 mg/kg), maximum accumulation of thallium by *Cladophora fracta* in reactors was 5025% (2.05 mg / kg) for on 5 day and minimum accumulation was 3575% (1.47 mg/kg) for on 7 day.

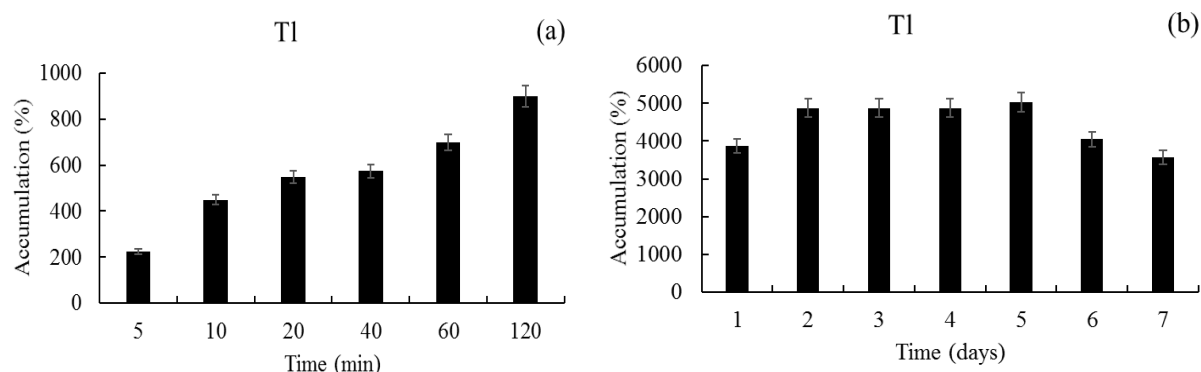
Phycoremediation of Thallium Toxic Metal Present in Gallery Water of an Abandoned Mine Area by Algae *Cladophora fracta*

Figure 3. Accumulations of Thallium by *Cladophora Fracta*

Accumulation of thallium concentrations by *Cladophora fracta* increased for the first day 5 and showed a decreasing trend from day 5. This showed that *Cladophora fracta* tends to accumulate the thallium in MAGWs for the first day 5. The concentration of thallium by *Cladophora fracta*, compared with uncontaminated alga (0.04 mg/kg) were 39.75 times on day 1, 49.75 times on days 2, 3, and 4, 51.25 times on day 5, 41.5 times on day 6 and 36.75 times on day 7, respectively. Thallium accumulation were 5 > 4 = 3 = 2 > 6 > 1 > 7 day (Fig 3b). Thallium accumulation was high by *C. fracta*. *Cladophora* sp. is known as a good scavenger of toxic metal ions in a short time (Michalak and Messyasz, 2021). Because, *Cladophora* species are characterized by a high tolerance to toxic metal ions (Zbikowski et al., 2017). Macroalgae have developed a number of defence mechanisms against high concentrations of toxic metals (Michalak and Messyasz, 2021). Zhang et al. (2019) reported that toxic metal ions can be accumulated in the cell wall of algae during accumulation. In the literature, different Tl concentrations from our results were reported in various algae species because of the different species and conditions. In the study of Queirolo et al. (2009) on the presence of Tl in the vicinity of a mining-impacted region in Chile, Tl varied from 0.295 to 8.3 $\mu\text{g/g}$ in algae (*Myriophyllum acuaticum*, *Zannichellia palustris* L.). Turner et al. (2013) reported Tl concentrations as $39.4 \pm 10.8 \mu\text{g/kg}$ and $19.4 \pm 2.1 \mu\text{g/kg}$ in macroalga *F. ceranoides* and *F. vesiculosus* from estuaries of southwest England, respectively. When Birungi and Chirwa (2015) used green micro-algae for adsorption and removal of Tl from eutrophic waters, the sorption capacity of algae was between 830 and 1000 mg/g. Furthermore, in the literature, high metal accumulations by various organisms were also reported. Lakra et al. (2017) reported heavy metal accumulations by *Salvinia molesta* and *Pistia stratiotes*. Topal et al. (2020) reported accumulation of precious metals by algae. Şentürk et al. (2023) reported effective bioaccumulation of heavy metals by *P. stratiotes*.

BCF values for *Cladophora fracta* are shown in Table 1.

Table 1. BCF Values of Thallium for *Cladophora Fracta*

BCF values			
Time (min)	BCF	Time (day)	BCF
5	71.8	1	878.4
10	121.5	2	1099.4
20	143.6	3	1099.4
40	149.1	4	1099.4
60	176.7	5	1132.5
120	221	6	917.1
		7	812.1

**Phycoremediation of Thallium Toxic Metal Present in Gallery Water of an Abandoned Mine Area by Algae
*Cladophora fracta***

BCF=1000-5000; bioaccumulation. BCF<1000; non-bioaccumulation. BCF>5000; very bioaccumulation (BA, 2019). When BCF given in Table 1 were examined, according to minutes, the highest BCF value was determined as 221 for 120 min while minimum BCF value was determined as 71.8 for 5 min. BCF values for 10, 20, 40 and 60 min were lower than 1000. This indicated that *Cladophora fracta* was non-bioaccumulation potential according to minutes. BCF values were 5 min < 10 min < 20 min < 40 min < 60 min < 120 min, respectively. According to days, the highest BCF value was determined as 1132.5 for day 5. Similar bioaccumulation was reported by Turner and Furniss (2012). They reported BCF for Tl accumulated under laboratory conditions by the green macroalga, *Ulva lactuca*, of about 10^3 in both sea water and estuarine water.

The minimum BCF value was determined as 812.1 for day 7. BCF values for 2, 3, 4, and 5 days were between 1000-5000. This indicated that *Cladophora fracta* had bioaccumulation potential according to days. BCF values were 7<1<6<2=3=4<5 days.

The relationship between thallium concentrations is given in Table 2 and 3.

Table 2. The Relationship Between Thallium Concentrations Detected in Algae According to Minutes

		min5	min10	min20	min40	min60	min120
min5	Pearson Correlation	1					
	Sig. (2-tailed)						
min10	Pearson Correlation	,655	1				
	Sig. (2-tailed)	,546					
min20	Pearson Correlation	-,866	-,189	1			
	Sig. (2-tailed)	,333	,879				
min40	Pearson Correlation	,961	,839	-,693	1		
	Sig. (2-tailed)	,179	,367	,512			
min60	Pearson Correlation	-,866	-,945	,500	-,971	1	
	Sig. (2-tailed)	,333	,212	,667	,154		
min120	Pearson Correlation	,961	,419	-,971	,846	-,693	1
	Sig. (2-tailed)	,179	,725	,154	,358	,512	

Table 3. The Relationship Between Thallium Concentrations Detected in Algae According to Days

		day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7
day1	Pearson Correlation	1						
	Sig. (2-tailed)							
day2	Pearson Correlation	-,786	1					
	Sig. (2-tailed)	,425						
day3	Pearson Correlation	-,189	,756	1				
	Sig. (2-tailed)	,879	,454					
day4	Pearson Correlation	-,839	,996	,693	1			
	Sig. (2-tailed)	,367	,058	,512				
day5	Pearson Correlation	,189	-,756	-1,000**	-,693	1		
	Sig. (2-tailed)	,879	,454	,000	,512			
day6	Pearson Correlation	,614	-,971	-,891	-,945	,891	1	
	Sig. (2-tailed)	,579	,154	,300	,212	,300		
day7	Pearson Correlation	,189	-,756	-1,000**	-,693	1,000**	,891	1
	Sig. (2-tailed)	,879	,454	,000	,512	,000	,300	

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

There was no important correlation between 10-120 min. Correlations between 20min-5min, 20min-10min, 40min-20min, 60min-5min, 60min-10min, 40min-60min, 120min-20min and 120min-60min were found to be negative. Correlation between 5min-40min ($r=0.961$) and 5min-120min ($r=0.961$) was observed to be positive and important (Table 2). There was no significant correlation between 5-1 and 7-1 days. Correlations between day2-day1, day3-day1, day4-day1, day5-day2, day5-day3, day5-day4, day6-day2, day6-day3, day6-day4, day7-day2, day7-day3, and day7-day4 were found to be negative. Correlation between day5-day3 ($r=-1.000$) and day7-day3 ($r=-1.000$) was

observed to be negative, but it was important (Table 3). Correlation between day5-day7 ($r=1.000$) was observed to be positive and important (Table 3). The fact that r values were close to 1 in the relationship between the TI in algae indicated a strong relationship between these times.

CONCLUSION

Contaminated waters leaching from abandoned mine without treatment may cause a negative impact on livings, resulting in disturbance of the ecosystems. Thallium present in the leaching waters from the abandoned mine poses a great threat to water safety and indirectly food chain. Therefore, leaching water containing thallium from both abandoned and operated mines must be rationally treated before reaching the environment. Ecofriendly and cost-effective technologies have to be developed for the removal of the poisonous metal thallium. In this study, to achieve this goal, the alga-mining water system in the natural environment was used. The outcome of the assessment of biotechnological application according to bioconcentration factors has indicated bioaccumulation potentials of *Cladophora fracta* for poisonous metal thallium. According to the data obtained as a result of the study, the remarkable part of the study is that the thallium in the gallery water was accumulated in very high concentrations by the algae. Additionally, the difference of the study from other studies is that it was carried out by placing the reactor in a real mining area. In future studies, it can be determined whether thallium accumulates in abandoned mine sites by using different algae species. The size or shape of reactors can be changed or improved. In this way, the findings can be improved by comparing them with the findings in this study.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article

REFERENCES

- Ahmad, F., Khan, A. U. and Yasar, A. (2013). Comparative phycoremediation of sewage water by various species of algae. *Proc. Pak. Acad. Sci.*, 50, 131-139.
- Amarasinghe, B. M. P. K. and Williams, R. A. (2007). Tea waste as a low adsorbent for the removal of Cu and Pb from wastewater. *Chem. Eng. J.*, 132, 299-309.
- Ayangbenro, A. S. and Babalola, O. O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International journal of environmental research and public health*, 14 (1), 94.
- BA, Bioaccumulation. (2019). Bio-concentration Criteria and Chemical Risk Assessment, https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Bioconcentration_Factor_BCF.html (Access: 20.12.2019)
- Belzile, N., Chen, Y.W. (2017). Thallium in the environment: A critical review focused on natural waters, soils, sediments and airborne particles. *Applied Geochemistry*, 84, 218-243.
- Birungi, Z.S., E M N Chirwa, E.M.N. (2015). The adsorption potential and recovery of thallium using green micro-algae from eutrophic water sources. *J Hazard Mater*, 299:67-77
- Chung, N. H., Nishimoto, J., Kato, O. and Tabata, M. (2003). Selective extraction of thallium (III) in the presence of gallium (III), indium (III), bismuth (III) and antimony (III) by salting-out of an aqueous mixture of 2-propanol. *Anal. Chim. Acta.*, 477, 243-249.

- Gardea-Torresdeya, J. L., Arenas, J. L., Francisco, N. M. C., Tiemann, K. J. and Webb, R. (1998). Ability of Immobilized Cyanobacteria To Remove Metal Ions From Solution And Demonstration of The Presence of Metallothionein Genes In Various Strains. *Journal of Hazardous Substance Research*, 1 (2), 1-18.
- Hassanien, M. M., Mortada, W. I., Kenawy, I. M. and El-Daly, H. (2017). Solid phase extraction and preconcentration of trace gallium, indium, and thallium using new modified amino silica. *Appl. Spectrosc*, 71 (2), 288-299.
- Huangfu, X., Ma, C., Ma, J., He, Q., Yang, C., Jiang, J., Wang, Y. and Wu, Z. (2017). Significantly improving trace thallium removal from surface waters during coagulation enhanced by nanosized manganese dioxide. *Chemosphere*, 168, 264-271.
- Kalpana, C. Lakra, B. Lal and T.K., Banerjee (2017). Decontamination of coal mine effluent generated at the Rajrappa coal mine using phytoremediation technology. *International Journal of Phytoremediation*, 19, 530-536.
- Kamal, O., Pochat-Bohatier, C. and Sanchez-Marcano, J. (2017). Development and stability of gelatin cross-linked membranes for copper (II) ions removal from acid waters. *Separation and Purification Technology*, 183, 153-161.
- Karigar, C. S. and Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, Article 805187.
- Li, H. S., Zhang, H. G., Long, J. Y., Zhang, P. and Chen, H.Y. (2019). Combined Fenton process and sulfide precipitation for removal of heavy metals from industrial wastewater: bench and pilot scale studies focusing on in-depth thallium removal. *Front. Environ. Sci. Eng*, 13, 49-61.
- Li, H., Chen, Y., Long, J., Jiang, D., Liu, J., Li, S., Qi, J., Zhang, P., Wang, J., Gong, J., Wu, Q. and Chen, D. (2017). Simultaneous removal of thallium and chloride from a highly saline industrial wastewater using modified anion exchange resins. *Journal of Hazardous Materials*, 333, 179-185.
- Li, H., Lin, M., Xiao, T., Long, J., Liu, F., Li, Y., Liu, Y., Liao, D., Chen, Z., Zhang, P., Chen, Y. and Zhang, G. (2020a). Highly efficient removal of thallium(I) from wastewater via hypochlorite catalytic oxidation coupled with adsorption by hydrochar coated nickel ferrite composite. *Journal of Hazardous Materials*, 388:Article 122016.
- Li, H., Xiong, J., Zhang, G., Liang, A., Long, J., Xiao, T., Chen, Y., Zhang, P., Liao, D., Lin, L. and Zhang, H. (2020b). Enhanced thallium(I) removal from wastewater using hypochlorite oxidation coupled with magnetite-based biochar adsorption. *Science of The Total Environment*, 698 : Article 134166.
- Li, T., Lin, G., Podola, B. and Melkonian, M. (2015). Continuous removal of zinc from wastewater and mine dump leachate by a microalgal biofilm PSBR. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 112-118.
- Liu, J., Li, N., Zhang, W., Wei, X., Tsang, D. C. W., Sun, Y., Luo, X., Bao, Z., Zheng, W., Wang, J., Xu, G., Hou, L., Chen, Y. and Feng, Y. (2019). Thallium contamination in farmlands and common vegetables in a pyrite mining city and potential health risks. *Environmental Pollution*, 248, 906-915.
- Liu, J., Wang, J., Tsang, D. C. W., Xiao, T., Chen, Y. and Hou, L. (2018). Emerging thallium pollution in China and source tracing by thallium isotopes. *Environ. Sci. Technol*, 52, 11977-11979.
- Liu, Y., Wang, L., Wang, X., Huang, Z., Xu, C., Yang, T., Zhao, X., Qi, J. and Ma, J. (2017). Highly efficient removal of trace thallium from contaminated source waters with ferrate: role of in situ formed ferric nanoparticle. *Water Research*, 124, 149-157.
- Lovley, D. R. and Coates, J. D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol*, 8, 285-289.
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int*, 30, 261-278.
- Michalak, I. and Messyasz, B. (2021). Concise review of *Cladophora* spp.: macroalgae of commercial interest. *Journal of Applied Phycology*, 33:133-166.

- Mwandira, W., Nakashima, K., Togo, Y., Sato, T. and Kawasaki, S. (2020). Cellulose-metallothionein biosorbent for removal of Pb(II) and Zn(II) from polluted water. *Chemosphere*, 246: Article 125733.
- Palmer, K., Ronkanen, A.-K. and Kløve, B. (2015). Efficient removal of arsenic, antimony, and nickel from mine wastewaters in Northern treatment peatlands and potential risks in their long-term use. *Ecological Engineering*, 75, 350-364.
- Peter, A. and Viraraghavan, T. (2005). Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environ. Int.*, 31, 493-501.
- Podder, M. S. and Majumder, C. B. (2016). Arsenic toxicity to *Chlorella pyrenoidosa* and its phycoremediation. *Acta Ecologica Sinica*, 36 (4), 256-268.
- Queirolo, F., Stegen, S., Contreras-Ortega, C., Ostapczuk, P., Queirolo, A., Paredes, B. (2009). Thallium levels and bioaccumulation in environmental samples of northern Chile: human health risks. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54(4), 464-469.
- Rajesh, N. and Subramanian, M. S. (2006). A study of the extraction behavior of thallium with tribenzylamine as the extractant. *J. Hazard. Mater.*, 135, 74-77.
- Samal, D. P. K., Sukla, L. B., Pattanaik, A. and Pradhan, D. (2020). Role of microalgae in treatment of acid mine drainage and recovery of valuable metals. *Materials Today: Proceedings*. 30, 346-350.
- Şentürk, İ., Eyceyurt Divarçı, N.S., Öztürk, M. (2023). Phytoremediation of nickel and chromium-containing industrial wastewaters by water lettuce (*Pistia stratiotes*). *International Journal of Phytoremediation*, 25, 550-561.
- Topal, M., Öbek, E., Arslan Topal, E.I. (2020). Phycoremediation of Precious Metals by *Cladophora fracta* From Mine Gallery Waters Causing Environmental Contamination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 105:134–138.
- Turner, A. and Furniss, O. (2012). An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of thallium in the coastal marine environment using the macroalga, *Ulva lactuca*. *Mar. Poll. Bull.*, 64: 2720-2724.
- Turner, A., Turner, D. and Braungardt, C. (2013). Biomonitoring of thallium availability in two estuaries of southwest England. *Marine Pollution Bulletin*, 69 (1–2), 172-177.
- Wan, S., Ma, M., Lv, L., Qian, L., Xu, S., Xue, Y., Ma, Z. (2014). Selective capture of thallium (I) ion from aqueous solutions by amorphous hydrous manganese dioxide. *Chem. Eng. J.*, 239, 200-206.
- Wang, N., Su, Z., Deng, N., Qiu, Y., Ma, L., Wang, J., Chen, Y., Hu, K., Huang, C. and Xiao, T. (2020). Removal of thallium(I) from aqueous solutions using titanate nanomaterials: The performance and the influence of morphology. *Science of The Total Environment*, 717, Article 137090.
- Wilde, E. W. and Benemann, J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 11, 781-812.
- Żbikowski, R., Szefer, P. and Latała, A. (2007). Comparison of green algae *Cladophora* sp. and *Enteromorpha* sp. as potential biomonitors of chemical elements in the southern Baltic. *Sci Total Environ* 387: 320–332.
- Zhang, G., Fan, F., Li, X., Qi, J. and Chen, Y. (2018). Superior adsorption of thallium(I) on titanium peroxide: performance and mechanism. *Chem. Eng. J.*, 331, 471-479.
- Zhang, H. M., Geng, G., Wang, J.J., Xin, Y., Zhang, Q., Cao, D.J. and Ma, Y.H. (2019). The remediation potential and kinetics of cadmium in the green alga *Cladophora rupestris*. *Environ Sci Pollut Res* 26:775–783.
- Zvinowanda, C. M., Okonkwo, J. O., Sekhula, M. M., Agyei, N. M. and Sadiku, R. (2009). Application of maize tassel for the removal of Pb, Se, Sr, U and V from borehole water contaminated with mine wastewater in the presence of alkaline metals. *Journal of Hazardous Materials*, 164 (2–3), 884-891.

Comparison of Ca-Based Commercial and Natural Catalysts Performance on Olive Pomace Pyrolysis Process

Gamze GÖKTEPELİ^{1*}, Esra YEL¹

Highlights:

- Catalytic effect of Ca(OH)₂ and marble sludges on pyrolysis process were compared
- Marble sludge showed a comparable catalytic effect with Ca(OH)₂
- Using marble sludges in olive pomace pyrolysis process contribute waste management with sustainable, zero waste and upcycling approaches

ABSTRACT:

Physicochemical treatment was applied with 20 mg/L alum to the marble processing effluents as 5 minutes 200 rpm mixing, 25 minutes 15 rpm mixing and 60 minutes settling and marble sludge (MS) was produced. Catalytic performance of MS in olive pomace (OP) pyrolysis process was evaluated and compared to commercial Ca(OH)₂ since it mainly comprises of different AAEMs (especially Ca and its forms such as CaCO₃, CaO) functioned as catalyst. Catalytic pyrolysis was conducted at 600°C and 5°C/min heating rate with 5% and 10% catalyst (MS or Ca(OH)₂) dosages. Although both catalysts had important effect on pyrolysis product yields, Ca(OH)₂ was found as good alternative for higher gas production and MS was introduced as better option for the higher char production comparing to the conventional OP pyrolysis. Pyrolysis biochars produced with MS were in higher thermal strength than the biochars generated with Ca(OH)₂. Moreover, biooils of OP+MS include different organic compounds, such as 9 heptadecanol, 1-eicosanol, ethyl linoleate, ethyl oleate, addition to the compounds observed in pyrolysis liquids of OP and OP+ Ca(OH)₂. All detected organic components have diverse usage areas. Ca(OH)₂ provided more decrement in the percentages of oxygenated compounds as compared to the MS. Consequently, it can be stated that MS can be used successfully as an alternative to Ca-based commercial catalyst in OP pyrolysis.

Keywords:

- Ca-based catalyst
- Marble waste
- Olive pomace
- Pyrolysis

¹Gamze GÖKTEPELİ ([Orcid ID: 0000-0003-2056-5845](https://orcid.org/0000-0003-2056-5845)), Esra YEL ([Orcid ID: 0000-0002-1019-4182](https://orcid.org/0000-0002-1019-4182)), Konya Technical University, Engineering and Natural Sciences Faculty, Environmental Engineering Department, Konya, Türkiye

* **Corresponding Author:** Gamze GÖKTEPELİ, e-mail: gdinc@ktun.edu.tr

This study was produced from the PhD thesis of Gamze GÖKTEPELİ.

INTRODUCTION

Olive pomace (OP) is the solid by-product of the olive oil extraction process. OP includes oil, pulps, pits and skin. Although characteristics of OP depend on many factors related to the conditions that olive tree has grown, such as topography, climate, soil types etc., polysaccharides, proteins, other pigments, lignocellulosic polyalcohol, polyphenols, and fatty acids are the main organic components of it. If it is not well managed, OP is a waste which may cause adverse effects on the environment because of its high moisture content, acidic pH and non-biodegradable organic components (Ayadi et al.,2021). In the case of land disposal, it can increase the soil hydrophobicity and infiltration rate because of its oil and polyphenols content (Ayadi et al.,2021). These problems can be prevented when OP is converted into economically valuable products and/or fuel with the thermochemical processes, such as pyrolysis.

Pyrolysis is one of the suggested methods in proper waste management in which the thermochemical fractioning of organic structures into solid, liquid and gas fractions provide recovery of economically valuable products. It has been widely used for lignocellulosic biomasses, such as OP, by researchers (Caglar et al.,2002; Kumar et al.,2017; Dinc et al.,2018). The end products of biomass pyrolysis, namely pyrolysis biochar, biooil and gas, can be evaluated in many different areas with diverse purposes. Pyrolysis biochar can be used as adsorbent, composite filler material, fuel, soil improver etc. (Kumar et al.,2017). Pyrolysis biooil and gases can be evaluated in recovering valuable compounds and/or in producing energy (Dinc et al.,2018).

Catalysts have been used in biomass pyrolysis process for several purposes, such as for the reduction in pyrolysis temperature, time and cost of achieving the same products; also for the production of the more value-added products. Alkaline earth metals (AAEMs) are one of the commonly used, effective, and attractive catalyst types. Cost is a very critical parameter for the catalyst selection since catalysts can easily be coked and cause to deactivation in pyrolysis process. Ca is cheaper and effective catalyst at lignocellulosic biomass pyrolysis as compared to other common catalysts Co and Ni (Luo et al.,2020). In a study conducted by Chen et al., (2017) pyrolysis biooil quality was enhanced with CaO catalyst by decreasing tar content and oxygenated compound quantity in fluid products. Similarly, Mohammed et al. (2017) indicated that the value-added chemicals in the pyrolysis liquids increased with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ usage in *Napier grass* pyrolysis. Zhang et al. (2022) emphasized that agglomeration in pyrolysis due to the lignin particles of lignocellulosic biomasses can be prevented with CaOH_2 and/or $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$ addition. Likewise, catalytic effect of CaO and/or CaCO_3 on pyrolysis tar via cracking, deoxygenation, deacidification reactions was emphasized in the literature (Zhao et al.,2019; Li et al., 2021). Furthermore, Ban et al., (2022) indicated that the distribution of the pyrolysis products, especially oxygenated compounds, considerably affected from Ca additives during coal pyrolysis. CaO/CaCO_3 can be used in catalytic pyrolysis in three forms: pure, modified and waste CaO/CaCO_3 (Li et al., 2021). Among these forms, waste CaO/CaCO_3 was highly recommended for catalytic pyrolysis when considered from economic aspects. Ca containing wastes that especially generated during the industrial applications can be evaluated as catalysts in biomass pyrolysis due to both their high production quantities and low costs. However, most of these wastes are just being landfilled, even disposed via simple dumping and they have not been efficaciously evaluated in large scale. In addition, Ca-based catalysts used in the pyrolysis were mostly commercial catalysts (Mutlu, 2012; Aysu et al., 2016; Yang et al., 2018) and there are very few studies that use the waste material in the Ca-based catalyst. In pyrolysis, catalytic effect varies based on the Ca form (such as oxides, hydroxides, phosphate etc.). For instance, Luo et al., 2020 emphasized that catalytic effect of

$\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , CaCl_2 , CaO , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ on municipal sludge during the pyrolysis differ based on bond energy and solubility in water. Therefore, it can be inferred that Ca-containing wastes have potential vital importance for catalytic pyrolysis process.

Marble sludges (MSs) are being produced at high quantity at the end of the physicochemical treatment process (coagulation-flocculation-sedimentation process) of marble processing effluents and they are accumulated mostly onto the land of the marble processing plant. Therefore, they cause pollution in the environment, agricultural lands, and water resources (Onen et al., 2022; Goktepelı, 2023). On the other hand, MSs contain different AAEMs (especially Ca and its forms such as CaCO_3 , CaO) that can function as catalyst for pyrolysis process depending on the marble structure and physicochemical process. It can be emphasized that these physicochemical treatment sludges can have a potential as being catalysts for agricultural biomass pyrolysis process. However, to the best of authors' knowledge there have not been any study evaluated the catalytic performance of these wastes in OP pyrolysis without any pre-treatment by investigating both yield and characteristics of pyrolysis end products. Therefore, in the presented study, catalytic performance of marble sludge, generated from physicochemical treatment of marble processing industry effluents with alum, in OP pyrolysis process were revealed by comparing with commercial $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Catalytic performances of both waste and commercial Ca-containing materials were compared in terms of pyrolysis product yields, thermal characteristics of pyrolysis biochars and valuable organic compounds in pyrolysis biooils. Ca-containing waste materials are environmental problems in the environment when disposed without control. However, by the suggested evaluation method in this study, it is aimed to introduce them as economical values and environmental solutions via proper waste management approach.

MATERIALS AND METHODS

Waste Materials

OP lignocellulosic biomass samples were obtained from a two-phase olive mill facility (Mersin/Türkiye) soon after olive picking season and they were stored in freezer.

Marble processing effluents were collected from a marble processing facility (Konya/Türkiye) and physicochemical treatment was applied to produce marble sludge (MS). In the process, coagulation-flocculation and sedimentation was applied by using alum ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$) as coagulant in VELP-FC6S model Jar test setup. Optimum conditions for physicochemical treatment process were selected based on the previous literature on the same wastewater as follows: 1.5 minutes rapid mixing with 200 rpm, 25 minutes slow mixing with 15 rpm and 60 minutes settling under 20 mg/L alum chemical dosage (Onen et al., 2018; Onen et al., 2022). After physicochemical treatment, the settled sludge was collected, dried at 40-50°C and sieved through 300-micron-sized sieve (Onen et al., 2018).

The catalytic effect of different types of Ca-based catalysts were compared at two different OP and MS/ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mixing ratios as 95:5 and 90:10 (w/w) respectively. Pyrolysis temperature and heating rate was set as 600°C and 5°C/min respectively, in the fixed bed batch pyrolysis system. Pyrolysis gas, biooil and biochar fractions were collected separately, quantified and characterized by analyses. TGA analyses for biochars were conducted with PerkinElmer - TGA4000 Model device at 20 mL/min nitrogen flow as carrier gas, 900°C target temperature and the heating rate was 20°C/min. Shimadzu QP2020 GC-MS device with DB-5MS capillary column with 30m x 0.25µm x 0.25µm (length x diameter x film thickness respectively) were used for GC-MS analyses of pyrolysis liquids.

RESULTS AND DISCUSSION

Pyrolysis Product Yields

Pyrolysis product yields of OP obtained with/without $\text{Ca}(\text{OH})_2$ or MS addition were given in Figure 1. Liquid decrement and char increment for both 5% and 10% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ were observed in catalytic OP pyrolysis with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. These results are comparable with the literature. For example, Aysu et al., (2016) emphasized that Na_2CO_3 , ZnCl_2 catalysts increased pyrolysis liquid quantities in *Anchusa azurea* pyrolysis, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ affected vice-versa. Similarly, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ resulted in biooil decrement and enhanced gas and biochar formation in sugarcane bagasse pyrolysis. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dehydration process caused changes in the product yields. Pyrolysis process and product yields are affected from the water released in Ca dehydration process (Wang et al.,2010). However, since this dehydration process is affected by both pyrolysis temperature and biomass type, reverse effects can also be seen when the pyrolysis conditions changed. For instance, biooil quantity of pine wood pyrolysis with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ firstly decreased at 350 and 400°C temperature and then started to increase after 700°C (Wang et al.,2010). Similar effects were observed in this study at MS addition for pyrolysis biochar and biooil. Encinar et al., (2009) indicated that biooil quantity decreased with increment in dolomite dosage in OP pyrolysis at 500°C-700°C temperatures. Pyrolysis gas percentages decreased with 10% MS as compared to non-catalyzed OP pyrolysis (Figure 1). The pyrolysis biochar and biooil quantities fractioned with MS were slightly higher than the quantities produced with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Increment in the pyrolysis biochar with MS addition can be attributed to the thermal resistance of the MS since its structure is similar to the dolomite ($\text{Ca}\cdot\text{Mg}(\text{CO}_3)_2$). It can be emphasized that instead of noncatalytic OP pyrolysis, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ can be used as catalyst if higher gas production was aimed. However, MS is better option for the higher biochar production.

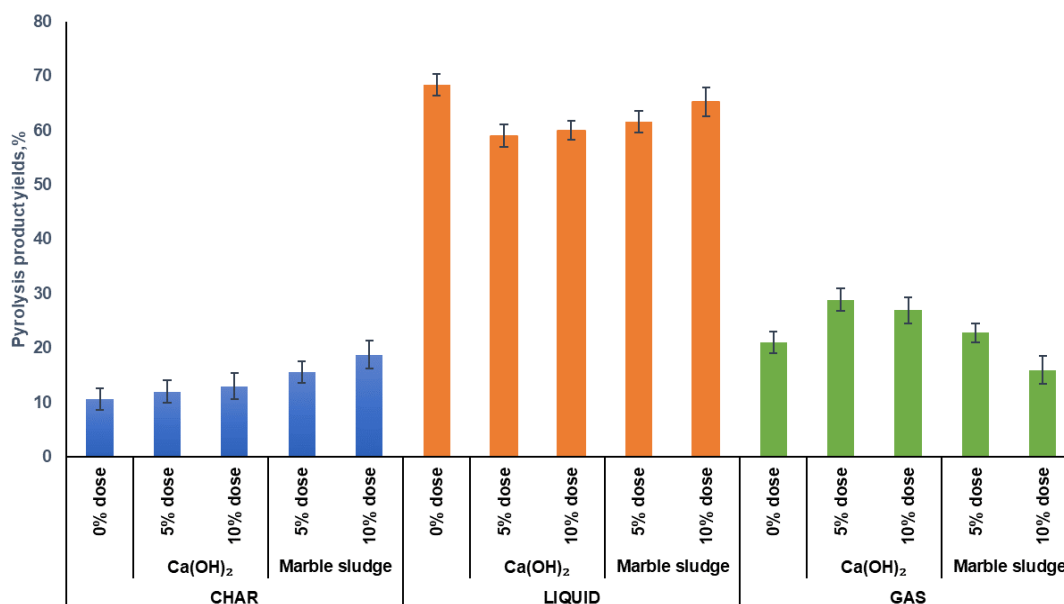


Figure 1. Comparison of Catalytic Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and Marble Sludges on OP Pyrolysis Product Yields (adapted from Goktepelı,2023)

Thermograms of pyrolysis biochars obtained with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and MS addition to the OP waste were indicated that the initial mass losses were observed at 400-450°C for all pyrolysis chars (Figure 2). However, mass loss in pyrolysis biochars obtained with MS were lower than others and the highest mass loss was detected with 10% $\text{Ca}(\text{OH})_2$. This result can be attributed to the thermal dehydroxylation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Khachani et al., (2014) indicated that around 476°C is the temperature which was observed thermal dehydroxylation of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and the maximum weight loss occurred at

$T_{max}=459.3^{\circ}\text{C}$ based on the DTG curves of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. The second mass losses were obtained at higher temperature ($>600^{\circ}\text{C}$) for all biochars (Figure 2). It can be stated that biochars fractionated with MS had higher thermal strength than the others since the temperature at which maximum second mass loss observed increased with the usage of MS instead of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. While second mass loss was observed at temperature between $600\text{--}650^{\circ}\text{C}$ for noncatalytic pyrolysis biochars and biochars obtained with $\text{Ca}(\text{OH})_2$, mass loss occurred at around 700°C for pyrolysis biochars with MS (Figure 2).

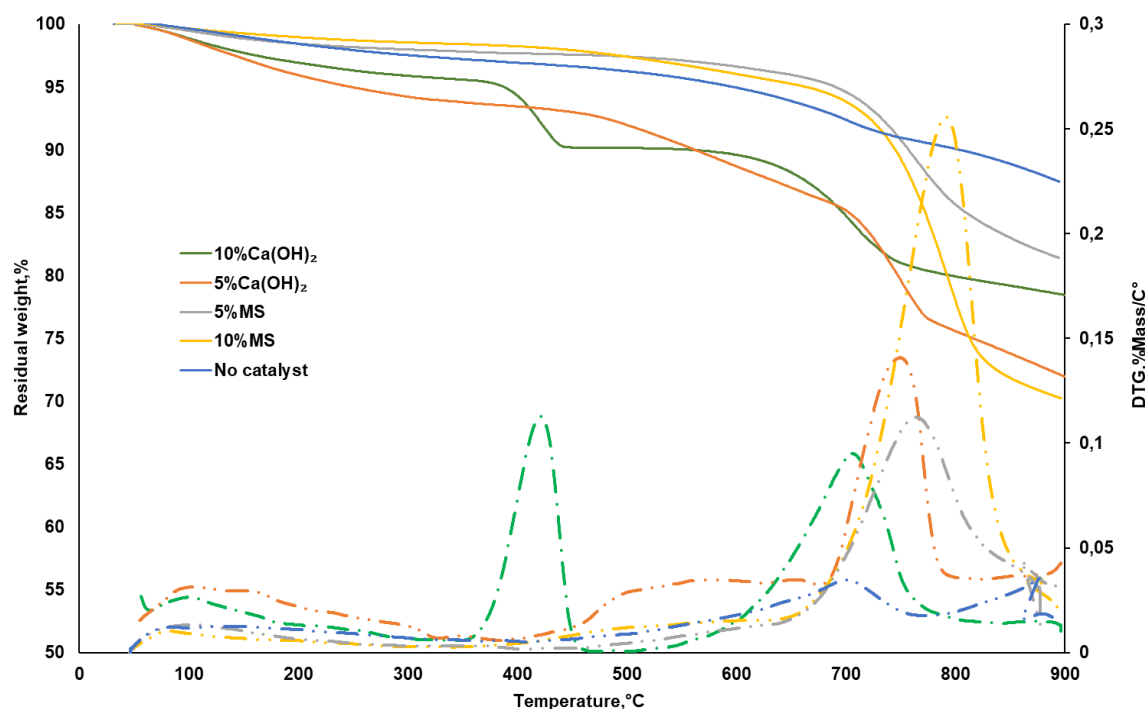


Figure 2. Thermal Behaviour of Noncatalytic and Catalytic Pyrolysis Biochars of OP

Fractions and types of organic compounds in the biooils were given in Figure 3 and Table 1, respectively. Aliphatic, oxygenated and aromatic compounds were observed in biooils of all conditions (Table 1). However, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and MS addition to the OP made a significant difference in the percentages of organic compounds in biooils (Figure 3). Pyrolysis biooils obtained with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and MS led to increment in the fractions of aliphatic compounds and decrement in fractions of oxygenated compounds prominently (Figure 3). These changes in oxygenated and aliphatic compounds in biooils were more as compared to the aromatic compounds in the presence of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Similarly, Wang et al., (2010) indicated that new aliphatic compounds were produced in the case of catalytic pyrolysis of pine wood with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Edeh et al., (2019) emphasized that dolomite type catalysts have an important effect on the decarboxylation and hydrocracking reactions which results in increment of aliphatic compounds during the lignocellulosic biomass pyrolysis. Furthermore, in *Anchusa azurea* and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ catalytic pyrolysis, the quantity of oxygenated compounds in the biooil decreased as compared to conventional pyrolysis process (Aysu et al.,2016). Therefore, although it can be emphasized that both $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and MS exhibited catalytic property during the OP pyrolysis, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ provided more decrement in the percentages of oxygenated compounds as compared to the MS (Table 1, Figure 3). It was investigated that pyrolysis biooils of lignocellulosic biomasses have mostly low H/C ratio, high viscosity and high oxygen content because of the large molecules and these properties were resulting in limitation to direct uses of pyrolysis biooils (Yel, 2022). Biooils with less oxygenated compounds and more aliphatic compounds have more stable characteristics (Liu et al.,2014). While some aliphatic compounds, such as nonane, decane, tetradecane, pentadecane, heptadecane etc., were

observed in all biooils; organic compounds, such as 9 heptadecanol, 1-eicosanol, ethyl linoleate, ethyl oleate etc., were found only in OP+MS biooils (Table 1). These organic compounds have diverse usage areas. For instance, ethyl linoleate is commonly used in cosmetic sectors due to its antibacterial and anti-inflammatory characteristics (Ko et al.,2018). Similarly, 1-Eicosanol can be used in lubricants, plastics, textiles, emulsion stabilizers etc. (URL 1). Therefore, it can be stated that in addition to the compounds observed in biooils of OP and OP+Ca(OH)₂, different organic compounds having wide usage area can also be produced from pyrolysis of OP+MS.

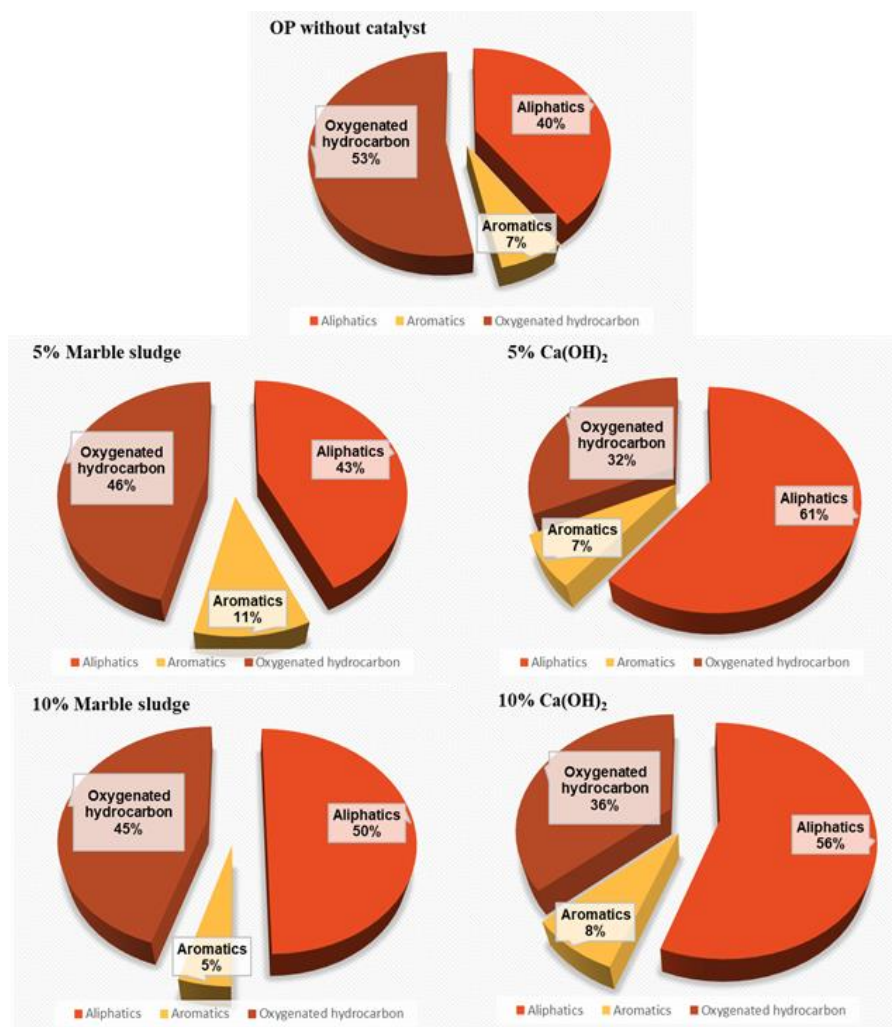


Figure 3. Fractions of Organic Compounds in OP Pyrolysis Oils Obtained with/without Catalyst

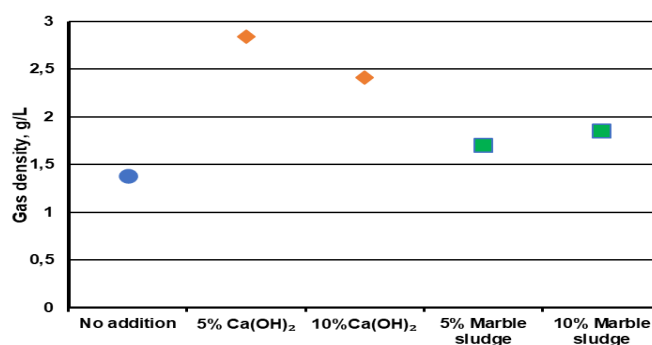
Pyrolytic gas densities of catalytic and conventional pyrolysis processes were compared in Figure 4. The pyrolytic gas densities were in the range of 1-1.5 g/L for conventional OP pyrolysis, 2-3 g/L for OP+Ca(OH)₂ and 1.5-2 g/L for OP+MS. The higher gas densities obtained in the presence of Ca-based catalysts. The compounds formed in fluid phase during the pyrolysis were more volatile and since the higher volatility cause less condensation, the condensed fractions were lower in catalytic pyrolysis compared to the conventional pyrolysis. Moreover, primary and secondary pyrolysis are the main stages of the pyrolysis process and catalysts have important effect on the secondary pyrolysis reactions. The oil compounds produced during primary pyrolysis process continue to thermally cracking in secondary pyrolysis process via catalyst, thereby gas and hydrocarbon products (C_nH_m) are generated. This results in change in the pyrolysis gas densities (Xu et al.,2022). Lu et al., (2022) emphasized that Ca, Ni, Fe catalysts promote combustible gas formation during biomass pyrolysis, and this can change catalytic pyrolysis densities as compared to the conventional pyrolysis.

Table 1. Organic Compounds in Catalytic OP Pyrolysis Oils at 600°C (+): Compounds Exist in Pyrolysis Oils; (-): Compounds Do Not Exist in Pyrolysis Oils

Compounds	Pyrolysis conditions					Compounds	Pyrolysis conditions				
	0%	5% Ca(OH) ₂	10% Ca(OH) ₂	5% MS	10% MS		0%	5% Ca(OH) ₂	10% Ca(OH) ₂	5% MS	10% MS
Alkanes						Alkenes					
Nonane	+	+	+	+	+	1-Nonene	+	+	+	+	+
Decane	+	+	+	+	+	1-Decene	+	+	+	+	+
Cyclopropane, 1-hexyl-2-methyl-	-	+	+	-	-	1-Nonadecene	-	-	-	+	-
Octane, 3,5-dimethyl-	+	+	+	-	-	1-Heptene	-	-	-	+	+
Cyclopropane, 1,2-dibutyl-	-	+	+	-	-	1-Undecene	+	+	+	+	-
Cyclopropane, 1-pentyl-2-propyl-	-	+	+	-	-	5-Undecene	-	+	+	-	+
Undecane	+	+	+	-	-	2-Dodecene, (Z)-	-	+	+	-	-
Nonane, 2,5-dimethyl	+	+	+	-	-	Cyclododecene	-	-	-	+	-
Cyclododecane	+	+	-	-	-	Cyclohexene, 1-octyl-	+	+	-	-	+
Tridecane	+	+	+	-	-	7-Tetradecene	+	+	-	-	-
Decane, 2,5,6-trimethyl	+	+	+	-	-	1-Hexadecene	+	+	+	+	+
Tetradecane	+	+	+	+	+	1-Heptadecene	+	+	+	+	+
Pentadecane	+	+	+	+	+	7-Heptadecene, 1-chloro-	+	-	+	-	+
Cyclododecane	-	-	-	+	+	1-Octadecene	+	+	+	-	-
Hexadecane	+	+	+	+	+	9-Eicosene, (E)-	+	-	-	-	+
Heptadecane	+	+	+	+	+	1-Docosene	+	-	-	-	-
Octadecane	+	+	+	-	-	9-Tricosene, (Z)-	+	-	+	-	-
Dodecylcyclohexane	-	+	+	-	-	Esters					
n-Pentadecylcyclohexane	+	+	+	-	-	Hexadecanoic acid, methyl ester	+	-	+	+	-
Heneicosane	+	-	+	-	-	Hexadecanoic acid, ethyl ester	+	+	+	+	+
Cyclohexane, nonadecyl-	-	+	+	-	-	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	+	+	+	-	+
Alcohols						9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	+	+	-	+	-
1-Nonanol	+	+	+	-	-	8-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	+	-	+	-	+
1-Decanol	-	-	+	+	+	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	+	+	+	-	-
1-Undecanol	+	+	+	-	-	Octadecanoic acid, methyl ester	-	+	+	+	-
1-Dodecanol	+	+	+	-	-	Ethyl linoleate	-	-	-	+	+
n-Tridecan-1-ol	+	+	+	-	-	Ethyl Oleate	-	-	-	+	+
1-Tetradecanol	+	+	+	-	+	Butanoic acid, ethenyl ester	-	-	-	+	+
9-Octadecen-1-ol, (E)-	+	-	+	-	-	Benzenes					
9-Heptadecanol	-	-	-	+	+	Ethylbenzene	+	+	+	-	-
1-Octadecanol	+	+	+	+	+	o-Xylene	+	+	+	-	-
n-Nonadecanol-1	+	+	+	-	+	Benzene, 1,4-dimethyl	+	+	+	-	-
2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol	-	-	-	+	+	Benzene, methyl	-	-	-	+	-
1-Eicosanol	-	-	-	+	+	Benzene, 1,3-dimethyl	+	+	+	-	-
Ketones						Phenols					
2-Heptadecanone	+	+	+	-	-	Phenol, 4-methoxy	-	+	+	-	-
3-Octadecanone	-	-	+	-	+	Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	+	+	+	+	+

Table 1. Organic Compounds in Catalytic OP Pyrolysis Oils at 600oC (+): Compounds Exist in Pyrolysis Oils; (-): Compounds Do Not Exist in Pyrolysis Oils (Devamı)

Compounds	Pyrolysis conditions					Compounds	Pyrolysis conditions				
	0%	5% Ca(OH) ₂	10% Ca(OH) ₂	5% MS	10% MS		0%	5% Ca(OH) ₂	10% Ca(OH) ₂	5% MS	10% MS
Cyclotridecanone	-	-	-	+	+	Phenol, 2-methoxy	+	+	+	-	-
2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl	-	-	-	+	+	Phenol, 2,6-dimethoxy	-	-	-	+	+
Cyclotridecanone	-	-	-	+	+	Acids					
2-Octanone	-	-	-	+	+	Pentadecanoic acid	+	+	-	+	+
Cyclopentadecanone, 2-hydroxy-	+	-	-	-	-	n-Hexadecanoic acid	+	+	-	+	-
						Oleic Acid	+	-	+	-	-

**Figure 4.** Comparison of conventional and catalytic pyrolysis gas densities (adapted from Goktepelı, 2023)

CONCLUSION

The use of waste material in another process to produce valuable resultant products can contribute waste management with sustainable upcycling with zero waste approaches. This study indicated that MS can be used as an alternative Ca-based catalyst in OP pyrolysis. OP catalytic pyrolysis applied with both MS and Ca(OH)₂ had some important advantages over conventional OP pyrolysis. Firstly, higher pyrolysis biochar and gas quantities were obtained with both MS and CaOH₂ catalysts. Secondly, characteristic of pyrolysis end products showed an explicit alteration with catalyst usage. For instance, thermal strength of biochars were increased, pyrolysis biooil qualities enhanced with decrement in oxygenated compounds etc. Moreover, the biooils produced with both MS and Ca(OH)₂ were including organic compounds having diverse usage areas. This means the produced biooils were new generation feedstock. If the biochar at higher quantity and higher thermal strength is aimed, MS catalyst should be preferred in OP pyrolysis. Ca(OH)₂ is a better catalyst option for obtaining more organic structures and better quality in pyrolysis fluid phase fractions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Bilateral Joint Research Project the Scientific and Technological Research Council of Turkey–TUBITAK with the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) under Grant Code in Turkish side: CAYDAG-118Y475.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Ayadi, M., Awad, S., Villot, A., Abderrabba, M., & Tazerout, M. (2021). Heterogeneous acid catalyst preparation from olive pomace and its use for olive pomace oil esterification. *Renewable Energy*, 165, 1-13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.11.031>.
- Aysu, T., Durak, H., Güner, S., Bengü, A. Ş., & Esim, N. (2016). Bio-oil production via catalytic pyrolysis of *Anchusa azurea*: Effects of operating conditions on product yields and chromatographic characterization. *Bioresource technology*, 205, 7-14. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.015>.
- Ban, Y., Jin, L., Liu, F., Zhu, J., Li, Y., Yang, H., & Hu, H. (2022). Pyrolysis behaviors of model compounds with representative oxygen-containing functional groups in coal over calcium. *Fuel*, 310, 122247.
- Çaglar, A., & Demirbaş, A. (2002). Hydrogen rich gas mixture from olive husk via pyrolysis. *Energy Conversion and Management*, 43(1), 109-117. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(01\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(01)00012-7).
- Dinc, G., & Yel, E. (2018). Self-catalyzing pyrolysis of olive pomace. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 134, 641-646. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.08.018>.
- Edeh, I., Overton, T., & Bowra, S. (2019). Catalytic hydrothermal deoxygenation of fatty acids over palladium on activated carbon catalyst (Pd/C) for renewable diesel production. *Biofuels*, 12(9), 1075-1082.
- Encinar, J., Gonzalez, J., Martínez, G., Roman, S. (2009). Catalytic pyrolysis of exhausted olive oil waste. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85 (1), 197-203.
- Goktepelı, G. (2023). Upcycling approaches with olive and marble processing wastes symbiosis. PhD Thesis, Konya Technical University, Institute of Graduate Studies, Department of Environmental Engineering.
- Khachani, M., El Hamidi, A., Halim, M., & Arsalane, S. (2014). Non-isothermal kinetic and thermodynamic studies of the dehydroxylation process of synthetic calcium hydroxide Ca (OH)₂. *J. Mater. Environ. Sci*, 5(2), 615-624.
- Ko, G. A., & Cho, S. K. (2018). Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 22(1), 53.
- Kumar, A., Chakraborty, J. P., & Singh, R. (2017). Bio-oil: the future of hydrogen generation. *Biofuels*, 8(6), 663-674. Doi: <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1141276>.
- Li, H., Wang, Y., Zhou, N., Dai, L., Deng, W., Liu, C., Cheng, Y., Liu, Y., Cobb, Y., Chen, P., Ruan, R. (2021). Applications of calcium oxide-based catalysts in biomass pyrolysis/gasification—a review. *Journal of Cleaner Production*, 291, 125826.
- Liu, C., Wang, H., Karim, A. M., Sun, J., & Wang, Y. (2014). Catalytic fast pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Society Reviews*, 43(22), 7594-7623.
- Lu, Q., Chen, X., Li, K., Meng, L., Xie, X., Yuan, S., Gao, Y., Zhou, X. (2022). Synergistic effect of volatile inherent minerals on catalytic pyrolysis of wheat straw over a Fe–Ca–Ni catalyst. *Energy*, 253, 124216.
- Luo, W., Su, Y. F., Hu, Q., Yin, H. L., Wang, S., Ao, L. J., Zhou, Z. (2020). Effect of calcium-based catalysts on pyrolysis liquid products from municipal sludge. *BioEnergy Research*, 13(3), 887-895. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10109-8>.

- Mohammed, I. Y., Abakr, Y. A., Kazi, F. K., & Yusuf, S. (2017). Effects of pretreatments of napier grass with deionized water, sulfuric acid and sodium hydroxide on pyrolysis oil characteristics. *Waste and biomass valorization*, 8(3), 755-773. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9594-1>.
- Mutlu, Ü. (2012). Pyrolysis of different biomass samples and characterisation of the products. Master of Science Thesis, Anadolu University.
- Onen, V., Beyazyuz, P., & Yel, E. (2018). Removal of turbidity from travertine processing wastewaters by coagulants, flocculants and natural materials. *Mine Water and the Environment*, 37(3), 482-492.
- Onen, V., Ozgan, A., Goktepe, G., Kalem, M., Ahmetli, G., Yel, E. (2022). Marble processing effluent treatment sludge in waste PET pyrolysis. *International Journal of Environmental Science and Technology*. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04262-0>.
- Osorio, J., & Chejne, F. (2016). Effect of calcium oxide on yield and composition of bio-oil obtained from sugarcane bagasse fast pyrolysis. 21st International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis PYRO.
- URL 1. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5364509, 1-Eicosanol. Retrieved March 14, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Eicosanol#section=Uses>.
- Wang, Z., Wang, F., Cao, J. and Wang, J. (2010). Pyrolysis of pine wood in a slowly heating fixed-bed reactor: potassium carbonate versus calcium hydroxide as a catalyst, *Fuel Processing Technology*, 91 (8), 942-950.
- Xu, T., Zheng, X., Xu, J., & Wu, Y. (2022). Hydrogen-rich gas production from two-stage catalytic pyrolysis of pine sawdust with nano-NiO/Al₂O₃ catalyst. *Catalysts*, 12(3), 256.
- Yang, H., Wang, D., Li, B., Zeng, Z., Qu, L., Zhang, W., & Chen, H. (2018). Effects of potassium salts loading on calcium oxide on the hydrogen production from pyrolysis-gasification of biomass. *Bioresource technology*, 249, 744-750. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.083>.
- Yel, E. (2022). Atık Mermer Çamuru, Plastikler ve Pirinadan Geliştirilmiş Geri Dönüşüm (Upgraded Recycle) ile Faydalı Ürünlerin Kazanılabilirliği. TÜBİTAK- Bilateral Cooperation Project.
- Zhang, H., Luo, B., Wu, K., Wu, H., Yu, J., & Wang, S. (2022). Enhancing aromatic yield from catalytic pyrolysis of Ca²⁺-loaded lignin coupled with metal-modified HZSM-5. *Applications in Energy and Combustion Science*, 9, 100049.
- Zhao, X., Liu, C., Wang, L., Zuo, L., Zhu, Q., & Ma, W. (2019). Physical and mechanical properties and micro characteristics of fly ash-based geopolymers incorporating soda residue. *Cement and Concrete Composites*, 98, 125-136.

Atf İçin: Demir, H. N., Korkmaz, M. S. ve Arıman, S. (2023). Akım Gözlem İstasyonlarında ANFİS Yöntemi ile Günlük Ortalama Debi Tahmini: Kızılırmak Örneği. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2565-2582.

To Cite: Demir, H. N., Korkmaz M. S., & Arıman, S. (2023). Daily Average Discharge Prediction of Stream Gages with ANFIS Method: A Case for Kızılırmak River. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2565-2582.

Akım Gözlem İstasyonlarında ANFİS Yöntemi ile Günlük Ortalama Debi Tahmini: Kızılırmak Örneği

Hilal Nur DEMİR¹, Mehmet Seren KORKMAZ^{2*}, Sema ARIMAN²

Öne Çıkanlar:

- ANFİS yöntemi ile akarsu debisi tahmini yapıldı.
- Günlük ortalama debi ANFİS yöntemi ile yüksek başarımla elde edildi.
- Havza yağışının nehir debisini etkilediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- ANFİS
- Debi
- Hidrolojik Analiz
- Kızılırmak
- Tahmin
- Yağış-Akış

ÖZET:

Akarsuların su potansiyelinin belirlenmesi için sezgisel tahmin modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu modellerden birisi olan Uyarlamalı Ağ Tabanlı Bulanık Mantık Çıkarım Sistemi (ing. kıs. ANFİS); yapay sinir ağlarının (YSA) öğrenme yeteneğini ve bulanık mantık (BM) yaklaşımının karar verme mekanizmasını kullanarak tahmin modeli geliştirmektedir. Bu çalışmada; Kızılırmak Nehri'nde yer alan iki adet Akım Gözlem İstasyonu'nda (AGİ) günlük ortalama debi, iki farklı ANFİS modeli ile tahmin edilmeye çalışılmıştır. AGİ'lere ait 2014-2021 yılları arasında gözlemlenmiş günlük ortalama debi verileri ile AGİ'lerin kurulu olduğu akarsu havzalarını temsil eden iki Meteoroloji Gözlem İstasyonu (MGI)'ye ait günlük toplam yağış verileri mekansallaştırılarak modellerde kullanılmıştır. Membadaki Kızılırmak-Ahmetacı AGİ-1 için, 2 giriş 1 çıkış yaklaşımı, bu AGİ'nin mansabında kalan Kızılırmak-Bulakbaşı AGİ-2 için ise 3 giriş 1 çıkış yaklaşımı ile ANFİS modelleri kurgulanmıştır. Giriş verilerinden günlük toplam yağış, zaman ölçeğinde (t-2). gün, günlük ortalama debi, (t-1). gün alınmış ve çıkış olarak (t). güne ait ortalama debi tahmin edilmiştir. Modellerde verilerin %75'i eğitim, %25'i test verisi olarak kullanılmıştır. Kurallar oluşturulurken 3 farklı kümeleme yapılmış ve hedef değerin üyelik fonksiyonu belirlenmiştir. Her iki AGİ için eğitim ve test verilerinde 3 ayrı kümelemeye ait sonuçlar elde edilmiş ve modellerin başarımları için determinasyon katsayısı (R^2) ve karekök ortalama hatası (RMSE) metrikleri kullanılmıştır. AGİ-1 için en iyi sonucu $R^2 = 0.9578$, RMSE = 1.49 ile 3 kümelemeli model verirken AGİ-2 için en iyi sonucu; $R^2 = 0.976$ ve RMSE = 2.20 ile yine 3 kümelemeli model vermiştir. Sonuç olarak ANFİS modeli, yüksek başarımla günlük ortalama debiyi tahmin etmiştir.

Daily Average Discharge Prediction of Stream Gages with ANFIS Method: A Case for Kızılırmak

Highlights:

- River discharge is estimated with ANFIS method.
- Daily average discharge is obtained with high success with ANFIS method.
- It is determined that precipitation in catchment affects the river discharge.

Keywords:

- ANFIS
- Discharge
- Hydrological Analysis
- Kızılırmak
- Prediction
- Rainfall-runoff

ABSTRACT:

Adaptive Network Based Fuzzy Logic Inference System (ANFIS); has been developed as a prediction model by using the learning ability of artificial neural networks (ANN) and the decision-making mechanism of fuzzy logic approach. Daily average discharges at two stream gages located in the Kızılırmak River is tried to be predicting with two different ANFIS models in this study. Daily average discharge of the river observed between 2014-2021 and daily total precipitation data of two Weather Stations (AWS) representing the river basins are used in the models. ANFIS models have been formed with 2 input and 1 output approach for SG-1 Stream Gage in the upstream, and with 3 input - 1 output approach for SG-2 Stream Gage which takes place at downstream. Total daily precipitation has two days lag time (t-2) and average daily discharge has one day lag time (t-1) taken as input data and (t) days as output. 75% of the data is used as training and 25% as test. While creating the rules, three different clusters have been made, and the membership function of the target value is obtained. Coefficient of determination (R^2) and root mean square error (RMSE) metrics are used for the performance of the models. The best results for both SG-1 and SG-2 are three clustered model with respectively, $R^2 = 0.9578$ and 0.976 , RMSE = 1.49 and 2.20. As a result, it was observed that the ANFIS model predicted the daily average discharge with high success.

¹ Hilal Nur DEMİR ([Orcid ID: 0009-0003-6893-1266](https://orcid.org/0009-0003-6893-1266)), DSİ Sivas 19. Bölge Müdürlüğü, Sivas, Türkiye

² *Mehmet Seren KORKMAZ ([Orcid ID: 0000-0001-8345-7265](https://orcid.org/0000-0001-8345-7265)), Sema ARIMAN ([Orcid ID: 0000-0001-7201-9243](https://orcid.org/0000-0001-7201-9243)), Samsun Üniversitesi, Özdemir Bayraktar Havacılık ve Uzay Bilimleri Fakültesi, Samsun, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Seren KORKMAZ, e-mail: mehmetkorkmaz@samsun.edu.tr

GİRİŞ

Büyük su havzalarının modellenmesi, topografya, iklim modelleri, arazi örtüsü, havza drenaj yoğunluğu, toprak drenaj kapasitesi ve diğer ilgili faktörlerdeki havza içi ve havzalar arası farklılıklar nedeniyle hidroklimatik rejimlerin karmaşıklığı nedeniyle oldukça zordur. Örneğin, soğuk mevsimlerde nehirlerin ana kolu boyunca simüle edilen akışlar genellikle iklimsel girdilere daha duyarlıyken, akış döngüsünün ara akış ağırlıklı olduğu diğer durumlarda bölgesel topoğrafyaya bağlı duyarlılık daha fazladır (Belvederesi ve ark., 2022).

Nehir akışlarını tahmin modelleri; süreç odaklı modeller ve veri odaklı modeller olarak iki ana kategoriye ayrılabilir (Fu ve ark., 2014; Devia ve ark., 2015; Hayat ve ark., 2019). Süreç odaklı modeller, ampirik ve fiziksel tabanlı yapıları ile süreçte etkili denklemlerden yararlanarak havza sistemi içindeki fiziksel süreçlerin matematiksel benzeşimini yapmaya çalışmaktadır (Bayazıt, 1998). Veri odaklı modeller ise doğal fiziksel süreçler hakkında bilgi ve tecrübe gerektirmedikleri için yalnızca saha verilerine göre kalibre edilmiş *ampirik* denklemlere dayanmaktadır (Kışı, 2003). Süreç odaklı ve veri odaklı modeller arasındaki temel fark, yöneten süreçlerin temsili ve veri gerekliliğidir (Şen, 2004a).

Fiziksel temelli hidrolojik modeller, hidrolojik çevrim elemanlarından hareketle havzayı bir bütün olarak yöneten ayrı hidrolojik süreçler hakkında daha geniş bir anlayış sağlayabilse de, gözlem ve ölçüm veri setleri yetersiz olabilmekte ya da bunun sağlanması pahalı ve zaman alıcı olabilmektedir. Öte yandan modelleri yöneten parametrelerin kestirimi için bazı değişkenlerin model kalibrasyonu yoluyla elde edilmesi gerekebilir (Bayazıt, 1998). Bu nedenle, fiziksel tabanlı hidrolojik modellerin uygulanması zor olabilir. Ayrıca, gerçek zamanlı operasyonel tahminlerin, veri odaklı modeller kullanılarak yönetilmesi daha pratik olabilir. Çünkü karmaşık fiziksel modeller genellikle büyük miktarda girdi verisine, model kalibrasyonu için potansiyel olarak uzun hesaplama sürelerine ve uygun yazılımı doğru şekilde kullanacak profesyonellere ihtiyaç duymaktadır (Şen, 2004b). Veri odaklı modeller, fiziksel temelli modeller tarafından tam olarak anlaşılamayan fiziksel mekanizmaları anlamak ve girdi-çıkı ilişkisini değerlendirmek için yeterince mevcut olduğu durumlarda daha uygun olabilir (Veiga ve ark., 2014; Belvederesi ve ark., 2020).

Hidrolojik çalışmalarda, akarsu havzalarının su potansiyelinin belirlenebilmesi için, anlık olarak geçen su miktarı olarak tanımlanan debinin belirlenmesi gerekmektedir. Her ne kadar, akarsuların debisi yer altı suyunun pınar veya kaynaklar yolu ile yeryüzüne çıkıp akışa geçmesinden dolayı oluşsa da, debinin zaman içerisinde artışında havza geneline düşen yağış miktarı veya mevsimsel kar erimesi temel etkenlerdir. Doğal olarak debi, havzada meydana gelen bütün meteorolojik ve hidrolojik oluşumların birlikte ortaya çıkardığı değişimi ifade etmektedir (Bayazıt, 2011).

Ülkemizdeki akarsularda debi ölçümlerinden sorumlu devlet kuruluşu olan Devlet Su İşleri (DSİ) tarafından işletilen yaklaşık 1340 adet Akım Gözlem İstasyonu (AGİ) bulunmaktadır (DSİ, 2023). Bu istasyonlarda başta bir referans düzlemine bağlı otomatik eşel seviyesi ölçümü ile beraber periyodik olarak debi ölçümleri yapılmaktadır. Bu hidrometrik faaliyetler sonucunda da işletilen her AGİ için yıllık olarak “AGİ Akım Gözlem Yıllıkları” çıkarılmaktadır (Teker, 1984). Ancak bazı durumlarda AGİ’lerde su seviyesi veya debi ölçümleri eksik veya hatalı olduğunda AGİ Akım Gözlem Yıllıkları çıkmamaktadır. Bu da ilerleyen dönemlerde akarsuya ait hem su potansiyelinin belirlenmesi hem de planlanan su yapılarının projelerindeki hidrolojik hesaplamalarda veri eksikliğine neden olmaktadır (Şahin, 2012). Farklı yöntemler kullanılarak eksik debi verileri tamamlanarak o su yılına ait Akım Gözlem Yıllığı elde edilebilmektedir.

Hem su potansiyelinin hesaplanması, hem de eksik verilerden kaynaklı hidrometrik değerlendirmelerdeki kayıpların giderilmesi için yağış-akış bağlantısı temeline dayanan hidrolojik

tahmin yaklaşımları kullanılabilir. Pratikte *regresyon analizi*, en çok kullanılan tahmin yöntemlerinin başında gelmektedir (Altunkaynak ve Başakın, 2018). Öte yandan Yapay Sinir Ağları (YSA), Otoregresif hareketli ortalamalar (ARIMA), Uyarlamalı Ağ Tabanlı Bulanık Çıkarım Sistemi (ANFIS) gibi yöntemlerle de debi tahmini yapılmaktadır. YSA, insan beynindeki nöronların çalışma prensiplerine dayanılarak modellenmiş bir sistemdir (Caner ve Akarşlan, 2009). Bu nöronların işleyiş şekli yeni bilgiyi kaydetme ve eski bilgi ile arasında ilişkiler kurmak şeklindedir. YSA’da, sistem; her yeni elde ettiği değerle kendisini eğitmektedir (Uzunali, 2019). ARIMA modeli, üç ayrı parçadan oluşan bir doğrusal denklem oluşturarak zaman serisi verilerini çözümler ve kestirimler yapar. ARIMA’da kullanılan doğrusal denklem, AR (otoregresyon), I (entegrasyon) ve MA (hareketli ortalama) olarak tanımlanabilen üç ayrı parça ile oluşturulur. AR, otoregresyon, geçmiş veri noktalarına dayalı denklem terimleri oluşturur. I, entegrasyon, verilerdeki genel “eğilimi” hesaba katar. MA, hareketli ortalama, geçmiş veri noktalarına dayalı hata veya gürültü denklem terimleridir. ARIMA modeli genellikle ARIMA (p, d, q) olarak gösterilir. Burada her bir harf yukarıda açıklanan üç parçaya karşılık gelir. Bu üç harf, sağlamanız gereken parametreleri temsil eder ve şu şekilde açıklanır: *p* otoregresif (AR) terimlerin sayısını belirler, *d* farklılaştırma derecesini belirler ve *q* hareketli ortalama (MA) terimlerin sayısını belirler (Storch ve Zwiers, 2003).

YSA’nın bulanık mantık ile birleşiminden oluşan ANFIS ise, YSA’nın öğrenme kabiliyetini artıran bulanık çok sayıda katmandan oluşan sinirsel bir yapıdır. Aynı zamanda içerisinde bulanık mantığın “eğer-ise” kurallarını da barındırmaktadır. ANFIS yöntemi, hidrolojik tahminlerde sıklıkla kullanılan ve istatistiksel başarımları yüksek bir modelleme yöntemi olduğundan literatürde de birçok çalışma yapılmıştır (Çizelge 1). Altunkaynak ve Başakın (2018); yaptıkları çalışmada Kuzey Amerika’da bulunan Columbia Nehri’nin 1950-1960 yılları arasında ölçülen günlük ortalama debi veri setini (iki gün önce, bir gün önce ve aynı gün) kullanarak matematik modeller geliştirmişlerdir. Modelleme aşamasında Yapay sinir ağları (YSA), bulanık mantık (ANFIS) ve otoregresif hareketli ortalama (ARIMA) yöntemleri ile çeşitli modeller oluşturmuşlardır. Modellerin tahmin performanslarını istatistiksel metriklerle değerlendirmişlerdir. ANFIS modelinin tahmin sonuçlarının NAR ve ARIMA model tahmin sonuçlarından daha iyi bir başarımları gösterdiğini görmüşlerdir. Asaad ve ark. (2022); Çok Katmanlı Algılayıcı (ÇKA, *ing. Multi Layer Perceptron-MLP*), derin öğrenme metodu olarak geliştirilen Uzun Kısa Süreli Bellek (LSTM), YSA ve ANFIS yöntemleri ile, Konya’daki Meram Çayı üzerinde kurulu Küçükmuhsine AGİ’de 1981-2017 yılları arasında gözlemlenen aylık ortalama debi verilerini kullanarak, gelecekteki 1 yıl, 2 yıl ve 3 yıl gibi uzun süreli olarak aylık ortalama debiyi tahmin etmeye çalışmışlardır. Sonuç olarak LSTM yönteminin, MLP ve ANFIS yöntemlerine göre istatistiksel olarak daha yüksek tahmin doğruluğu ve daha düşük hata verdiğini belirlemişlerdir. Arslan ve ark. (2020), ANFIS ve Destek Vektör Makineleri (SVM) yöntemlerini kullanarak Doğu Anadolu Bölgesi’nde yer alan Keban Barajı’nın rezervuarındaki su seviyesinin değişimini modelleyerek tahmin etmişlerdir. Yaygın kullanılan çoklu lineer regresyon (ÇLR) yöntemi ile de bu iki yöntemi karşılaştırmışlardır. Girdi verileri olarak; barajdan bırakılan su miktarı, günlük toplam akım ve toplam buharlaşma miktarı verilerini kullanmışlardır. Uygulanan üç yöntemle de Kızılırmak Nehri Havzasının memba bölgesinde Sivas ili sınırları içerisinde yer alan AGİ’deki günlük ortalama debiyi ve baraj su seviyesini çok yüksek bir istatistiksel başarımla tahmin ettiğini ortaya koymuşlardır (Arslan ve ark., 2020). Bir başka çalışmada; Sakarya Havzası’ndaki Kocasu Nehri’ndeki 1222 No’lu AGİ için günlük debi tahmininde 3 YSA yöntemi ile ÇLR yöntemi sınanmıştır. 21 yıllık periyottaki günlük debi ölçüm verileri kullanılarak beş gün gecikmeli olarak kurgulanan modellerden; üç katmanlı ileri besleme geri yayılım yapay sinir ağı yöntemi (İBGY-YSA), genelleştirilmiş regresyon yapay sinir ağları (GR-YSA) ve radyal tabanlı

işlevi yapay sinir ağları (RT-YSA) ile çoklu lineer regresyon (ÇLR) yöntemi karşılaştırıldığında Kocasu Nehri'ndeki AGİ'de günlük debi tahmini için istatistiksel başarımı en yüksek modelin, İBGY-YSA algoritması ile elde edildiği ortaya konulmuştur (Burgan, 2022). Türkiye'nin Fırat havzasında yer alan Murat ve Karasu alt havzalarında, drenaj alanı oranı (ing. Drainage Area Ratio) yöntemi, ortalama ile standartlaştırma (ing. Standardization with mean) yöntemi ve ters benzerlik ağırlıklandırma (ing. Inverse Similarity Weighting) yöntemi olarak üç istatistiksel yöntem ile farklı AGİ'lerde günlük ortalama debi tahmin edilmeye çalışılmıştır. Günlük debi tahmininin başarımını artırmak amacıyla, istatistiksel yöntemler ikili veya üçlü birleştirilerek 'ensemble yaklaşımlar' önerilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında önerilen birleşik yaklaşımların günlük debi tahmininde istatistiksel yöntemlerin performansını artırmak için faydalı olduğunu görülmüştür (Yılmaz ve Onoz, 2022). Özkan ve Haznedar (2023) yaptıkları çalışmada, Seyhan Havzası'ndaki 3 farklı AGİ'de uzun vadeli günlük debi gözlem kayıtlarını kullanarak; Adaptatif Nöro-Bulanık Çıkarım Sistemi (ANFIS) modelini, Geri Yayılım (BP), Hibrit Öğrenme (HB) ve Simüle Edilmiş Tavlama (SA) algoritmaları ile eğitmiş ve model tahmin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Ayrıca farklı giriş parametreleri kullanarak oluşturulan ANFIS modellerinin performansı, Izgara Bölütleme (Grid Partitioning) ve Bulanık C-Means Kümeleme (Fuzzy C-Means Clustering) yöntemleri ile de çalışılmıştır. Farklı istatistiksel değerlendirme ölçütlerine göre BP modelinin 3 farklı AGİ'de de en başarılı olduğu görülmüştür. BP algoritmasının, nonlinear problemlerde ANFIS parametrelerini eğitmek için diğer algoritmalarından daha başarılı ve etkili bir şekilde kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır (Özkan ve Haznedar, 2023).

Yukarıdaki çalışmalarda görüldüğü gibi hem ANFIS yöntemi hem de diğer veri temelli modelleme yöntemleri uygulanarak birçok hidrolojik değişken yüksek istatistiksel doğrulukla tahmin edilebilmektedir. Yağışa bağlı olarak meydana gelen akışın ölçüsü olarak akarsu debisi de üzerinde durulan önemli bir hidrolojik değişkendir. Havzanın su potansiyeli (Algancı ve ark., 2010), tekerrürlü taşkın debilerinin belirlenmesi (Özdemir, 1978), hidrolojik ve tarımsal kuraklık çalışmaları (Katipoğlu, 2022), genel olarak akarsu debisi verilerinden yararlanılarak yapılmaktadır. Bu çalışmada, Kızılırmak Nehri Havzasının memba bölgesinde Sivas ili sınırları içerisinde yer alan iki adet AGİ'nin günlük ortalama debisi, havzalarına düşen günlük yağış miktarı ve AGİ'lerde gözlemlenen günlük ortalama debi verileri yardımıyla ANFIS yöntemi kullanılarak modellenmiş ve günlük ortalama debi tahmin edilmeye çalışılmıştır. Her AGİ için, girdiler değiştirilerek 3 farklı kümeleme yaklaşımı ile ANFIS modelleri oluşturulmuştur. Her model yapılandırmasının gözlemlerle uyumuna bakılarak, elde edilen modellerin günlük ortalama debiyi tahmin performansı istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Çizelge 1. Literatür araştırması ve performans metrikleri (R^2 , RMSE)

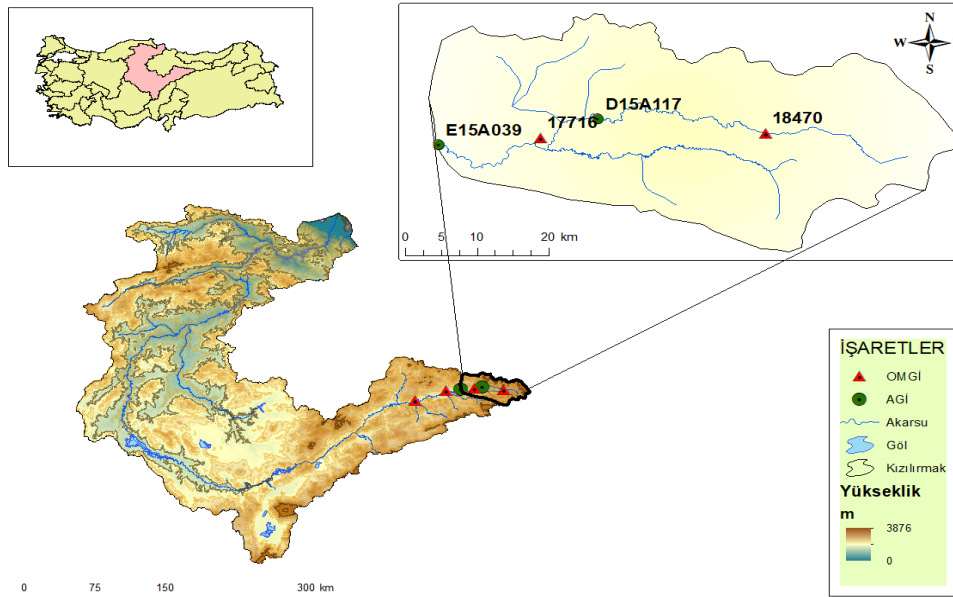
Referanslar	Model	R^2	RMSE
Fırat (2007)	ANFIS	0.964	6.03
Altunkaynak ve Başakın(2017)	ANFIS	0.987	-
Yıldırım ve Soklu (2008)	ANFIS	0.82	3,484
Taylan (2018)	ANFIS	0.91	12.2
Alzukraf ve Khalifa (2016)	ANFIS	0.9446	0.37
Arslan ve ark. (2020)	ANFIS	0.99	0.02
Şener ve Morova (2011)	Bulanık Mantık	0.899	-
Kumar ve Kyada, (2015)	ANFIS	-	0.034
Eryürük ve ark. (2021)	ANFIS	0.73	0.510
Patel ve Parekh (2014)	ANFIS	0.99	3.02

MATERYAL VE METOT

Çalışma Alanı

Kızılırmak Nehri havzası; 82221 km² yağış alanına sahiptir ve Türkiye'nin 2. büyük akarsu havzasıdır. Türkiye yüzölçümünün yaklaşık %10.49'unu kapsar (DSİ, 2020). Kızılırmak Nehri, mebadan mansaba 1355 km uzunluğu ile Türkiye'nin içinde doğup sınırları içerisinde denize dökülen en uzun akarsuyudur. Fırat Havzası'na komşu olarak Sivas'ın doğusundaki Kızıldağ'dan (3025 m) doğar, sırasıyla Sivas, Kayseri, Nevşehir, Kırşehir, Kırıkkale, Ankara, Çankırı, Çorum, Sinop ve Samsun il sınırları içerisinde geçerek Bafra ilçesi yakınlarından Karadeniz'e dökülür. Döküldüğü noktadaki su potansiyeli, uzun yıllar gözlemlerine dayanılarak 7004 hm³/yıl olarak hesaplanmıştır (DSİ, 2021). Kızılırmak Havzası, ülkemiz enerji üretiminde de önemli bir yere sahiptir. Nehir üzerinde kurulu 12 baraj ve hidroelektrik santrali bulunmaktadır. Ayrıca, Kızılırmak ve yan kollarından yararlanılarak, tarımsal sulama da yapılmaktadır (SYGM, 2019).

Bu çalışmada, Kızılırmak Havzasının membasındaki bir bölge, *çalışma alanı* olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Çalışma alanı, İç Anadolu Bölgesinde Sivas il sınırları içerisinde kalmaktadır. Çalışma alanı içinde iki adet Akım Gözlem İstasyonu (AGİ) ve iki adet Meteoroloji Gözlem İstasyonu (MGİ)'ye ait gözlem verileri kullanılarak AGİ enkesitlerindeki günlük ortalama debiler tahmin edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 1 Çalışma Alanındaki AGİ ve MGİ'lerin konumlarını gösteren lokasyon haritası

Veriler

Kızılırmak ana kolu ve bu nehri besleyen yan kollar üzerinde Devlet Su İşleri (DSİ) ve 2011 yılında kapatılan Elektrik İşleri Etüt İdaresi (EİEİ) tarafından kurulan çok sayıda AGİ bulunmaktadır. Aynı zamanda havza içerisinde ve çevresinde Meteoroloji Genel Müdürlüğü (MGM) tarafından işletilen MGİ'ler bulunmaktadır. Bu çalışmada, Ocak 2014–Eylül 2021 tarihleri arasında, Kızılırmak nehri ana kolu üzerinde bulunan D15A117 No'lu Kızılırmak - Ahmethacı (AGİ-1) ve E15A039 No'lu Kızılırmak – Bulakbaşı (AGİ-2)'ye ait günlük ortalama debi (m³/s) verileri ile, 18470 No'lu İmranlı (MGİ-1) ve 17716 No'lu Zara (MGİ-2)'ye ait günlük toplam yağış (mm/gün) verileri kullanılmıştır. Çizelge 2'de çalışmada kullanılan AGİ'lere, Çizelge 3'de çalışmada kullanılan MGİ'lere ait bilgiler verilmiştir. MGİ'lerde gözlemlerin noktasal olması nedeniyle, AGİ'lere ait havzaların yağış miktarının mekânsal temsiliyetinde yetersiz kalacağı için, mekânsal temsiliyetin artırılması amacıyla *ArcGIS for Desktop*

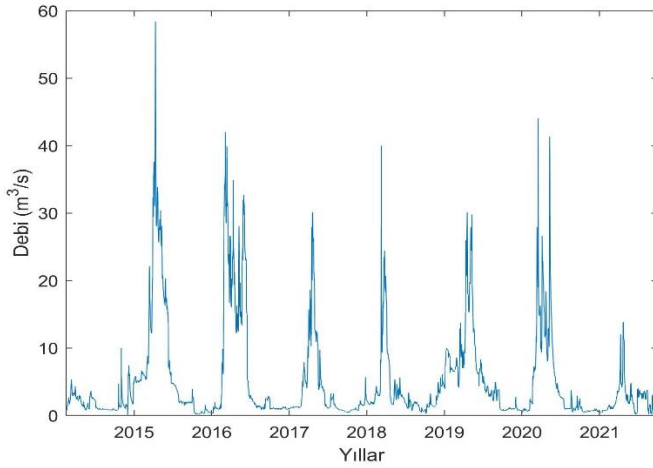
platformundaki çeşitli araçlar yardımıyla MGI'lerin çalışma alanı üzerindeki konumları göz önünde bulundurularak *thiessen poligonları* elde edilmiştir. Böylelikle her MGI'nin, havzaları ne kadar temsil ettiği ağırlıklı olarak hesaplanmıştır. Sonrasında bu oranlar ile istasyonlardan alınan günlük yağış verileri çarpılarak noktasal yağış verilerinden, mekansal havza yağış verileri elde edilmiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan Akım Gözlem İstasyon Bilgileri

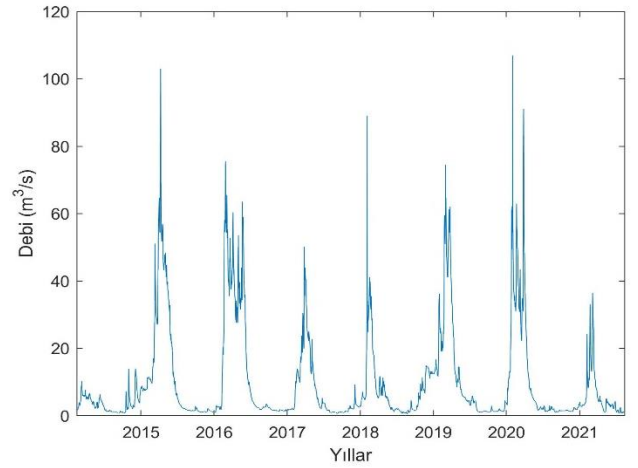
Çalışmadaki Kodu	İstasyon No	İstasyon Adı	Yağış Alanı (km ²)	Gözlem Periyodu	Enlem	Boylam
AGİ-1	D15A117	Kızılırmak - Ahmethacı	693.42	10.12.1966-29.09.2021	39°54'23" K	37°49'33" D
AGİ-2	E15A039	Kızılırmak - Bulakbaşı	1642.0	01.06.1971- 29.09.2021	39°52'41" K	37°33'47" D

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan Meteoroloji Gözlem İstasyon Bilgileri

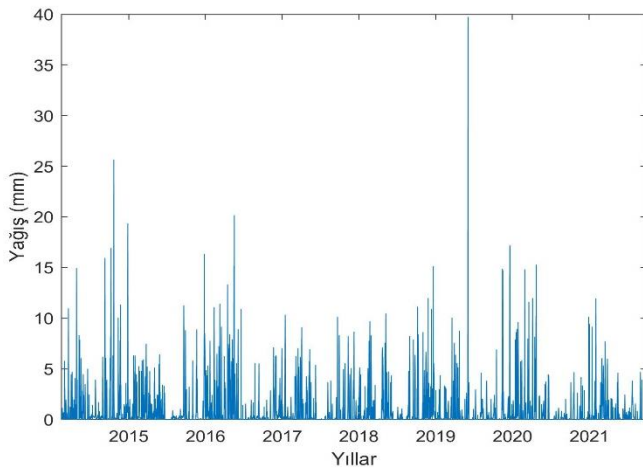
Çalışmadaki Kodu	İstasyon No	İstasyon Adı	Gözlem Periyodu	Enlem	Boylam
MGI-1	18470	İMRANLI	14.02.2014- 29.09.2021	39°52'32.90"K	38°05'53.90"D
MGI-2	17716	ZARA	10.09.2009 -29.09.2021	39°52'58.00"K	37°43'47.30"D



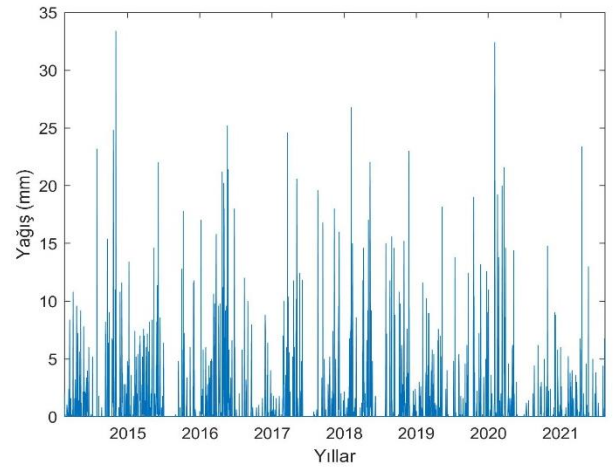
Şekil 2. AGİ-1 (D15A117)'e ait akım verilerinin 2014-2021 yılları arasındaki değişimi



Şekil 3. AGİ-2 (E15A009)'ye ait akım verilerinin 2014-2021 yılları arasındaki değişimi



Şekil 4. MGI-1 (18470)'e ait yağış verilerinin 2014-2021 yılları arasındaki değişimi



Şekil 5. MGI-2 (17162)'ye ait yağış verilerinin 2014-2021 yılları arasındaki değişimi

Çalışma sahasındaki AGİ'lerde ölçülen günlük ortalama debilere bakıldığında (Şekil 2 - Şekil 3); her iki AGİ'de de ortalama debinin kış ve ilkbahar aylarında fazla olduğu görülmektedir. MGI'lerde

ölçülen günlük toplam yağış miktarlarının zamana bağlı değişimlerine bakılırsa (Şekil 4 - Şekil 5); yağışın fazla olduğu mevsimlerin kış ve ilkbahar olduğu görülmüştür. Hem yağış hem de debi verileri incelendiğinde yağış ile debi arasında doğru orantı olduğu sonucuna ulaşılabilir. Kış aylarındaki kar yağışı sonucu havzaların yukarı bölgelerinde biriken kar ve ilkbahardaki mevsimsel şiddetli sağanak yağışların beraber akışa geçmesi buna neden olarak gösterilebilir.

Yöntem

Bulanık mantık (BM-*fuzzy logic*) yaklaşımı ilk kez Azerbaycan asıllı ABD’li matematikçi ve mühendis Lütfi Askerzade tarafından ortaya atılmıştır (Zadeh, 1965). BM, insanlara ait ifadelerin işlenerek, makinelere aktarılmasını amaçlayan yaklaşımdır. Girdi veya girdi gruplarının bulanık mantık kullanılarak bir çıktı ile ilişkilendirilmesine *bulanık çıkarım* adı verilir (Şen, 2004a). Bu çıkarım; bünyesinde üyelik fonksiyonları, mantıksal işlemler ve eğer-ise kurallarını içerir. Bu sistemler hidroloji, meteoroloji ve su kaynakları gibi alanlarda başarıyla uygulanmıştır (Altunkaynak, 2010).

Noktasal Yağış Gözlemlerinin Mekansallaştırılması

Yağışın noktasal olarak Meteoroloji Gözlem İstasyonlarında ölçülmesi, mekansal temsiliyetinin yetersiz olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle hidrolojik çalışmalarda yağışın havzalardaki miktarının belirlenmesi için thiessen polygon yöntemine sıklıkla başvurulmaktadır (Bayazıt, 2011). Bu yöntemde göre havza içerisindeki ve çevresindeki tüm MGİ’lerin havzanın içerisinde temsil ettiği alanlar belirlenip bu alanların o havzada ne kadar bir oransal yüzdeye karşılık geldiği hesaplanır. Böylelikle örneğin herhangi bir havzada memba bölgesindeki yağış miktarı fazla olan MGİ de, mansaptaki yağış miktarı az olan MGİ de havza içerisindeki konumuna göre yöntemin uygulanmasıyla elde edilen poligonlarla havza yağışına bir ‘katkı’ sunar. Benzer şekilde havzanın dışında olup havzaya yakın olan istasyonlarda bu sayede değerlendirilebilir ve havzanın yağışında onların temsil ettikleri oran kadar havza yağışına katkı sunabilirler. Mekansal olarak havzadaki yağış miktarı (toplam yağış, maksimum yağış, yinelenmeli yağış vb.) hesaplanmak istenildiğinde thiessen yöntemi pratik bir kullanıma sahiptir (Özdemir, 1978).

$$P_{ort} = \frac{\sum_{i=1}^N P_i A_i}{A} \quad (1)$$

P_{ort} : Thiessen poligonlarına göre havzanın ortalama yağış miktarı (mm/m²)

P_i : İstasyondaki yağış miktarı (mm/m²)

A_i : Yağış yüksekliği P_i olan gözlem istasyonunun thiessen poligon alanı (km²)

A : Havzanın toplam alanı (km²)

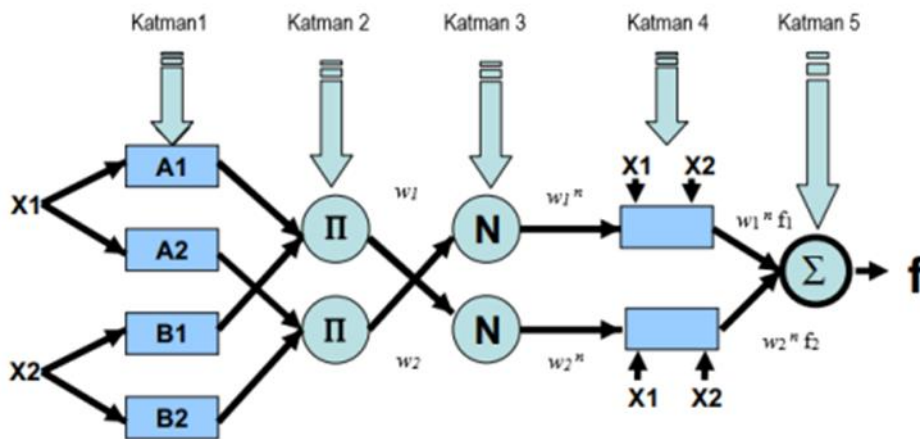
N : İstasyon sayısı olarak ifade edilmiştir.

Çalışma alanındaki her iki AGİ için de kesit yerlerine göre tespit edilen havzalarının içerisindeki ve etrafındaki meteoroloji gözlem istasyonlarının konumları göz önünde bulundurularak thiessen poligonları elde edilmiştir. Bunun için *ArcGIS for Desktop* CBS platformu ve araçları kullanılmıştır.

Uyarlamalı Ağ Tabanlı Bulanık Çıkarım Sistemi (ANFIS) Yöntemi

Uyarlamalı ağ tabanlı bulanık çıkarım sistemi (*ANFIS - Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System*). Takagi-Sugeno bulanık çıkarım sistemine dayanan yapay bir sinir ağı yöntemidir (Jang, 1993). Yöntemde, hem yapay sinir ağları hem de bulanık mantık ilkeleri beraber ele alınıp modelleme

yapıldığından bu iki yaklaşımın da faydalarını tek bir çerçevede yakalama potansiyeline sahiptir. ANFIS, beş katmandan oluşan bir mimariye sahiptir (Şekil 6). Birinci katman girdi değerlerini alır ve onlara ait üyelik fonksiyonlarını belirler. Bu katman genellikle *bulanıklaştırma katmanı* olarak adlandırılır. Her bir fonksiyonun üyelik dereceleri, $\{a, b, c\}$ olarak adlandırılan öncül parametre setini kullanarak hesaplanır. İkinci katman kurallar için *ateşleme güçlerini* üretmekten sorumludur. Görevi nedeniyle ikinci katman “kural katmanı” olarak adlandırılır. Üçüncü katmanda; önceki katmanda hesaplanan ateşleme güçleri normalleştirilmektir. Bunun için her bir değer, toplam ateşleme gücüne bölünür. Dördüncü katmanda girdi olarak normalize edilmiş değerleri ve $\{p, q, r\}$ sonuç parametre setini alır. Bu katman tarafından döndürülen değerler bulanıklaştırılmış olanlardır ve bu değerler beşinci yani son katmana geçirilerek nihai çıktıyı döndürür. ANFIS model yapısı, Sugeno tipi bulanık sistemlerin, sinirsel öğrenme kabiliyetine sahip bir ağ yapısı olarak temsilinden oluşmaktadır (Caner ve Akarlan, 2009). Her bir ağ katmanlar şeklinde yapılanmıştır (Şekil 6). ANFIS yönteminde hem yapay sinir ağları (YSA) hem de bulanık mantık (BM) kullanılır (Kosko, 1992). ANFIS, YSA'nın öğrenme yeteneğini ve kuralları belirlerken bulanık mantığın çıkarım yöntemini kullanarak çıkış verisi üretmektedir (Uzunali, 2019).



Şekil 6 ANFIS Yöntemi Model Mimarisi

İki girişli (x ve y) ANFIS yapısındaki bulanık kurallar (2) ve (3)'de verilmektedir (Jang ve Mizutani 1997).

$$EGER \ x = A_1 VE \ y = B_1 ISE \ z = p_1 x + q_1 y + r_1 \quad (2)$$

$$EGER \ x = A_2 VE \ y = B_2 ISE \ z = p_2 x + q_2 y + r_2 \quad (3)$$

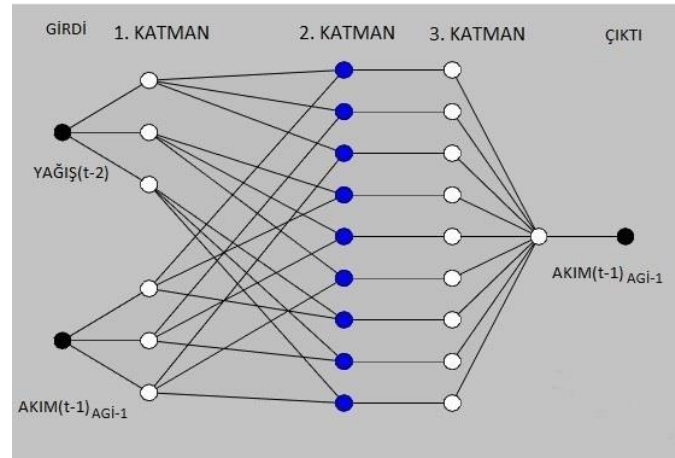
Burada, A_i ve B_i bulanık kümelerinin üyelik fonksiyonları; μ_{A_i} ve μ_{B_i} şeklindedir. p_1, q_1, r_1, p_2, q_2 ve r_2 ise çıkarım sisteminin çıkış parametreleridir.

ANFIS yöntemiyle modelleme yapmak için MATLAB platformunda bulunan “*Fuzzy toolbox*” araçları kullanılmıştır. Çalışma alanındaki memba bölgesindeki Kızılırmak - Ahmethacı (AGİ-1) AGİ için; 2 giriş 1 çıkışlı ANFIS modelleri, çalışma alanının mansap bölgesindeki Kızılırmak - Bulakbaşı AGİ (AGİ-2) için; 3 giriş 1 çıkışlı ANFIS modelleri oluşturulmuştur. AGİ-1 (t) debi tahmini için giriş değişkeni olarak MGİ-1' den elde edilen alansal yağış verileri akışa geçme süreleri göz önüne alınarak (t-2). gün değerleri, AGİ-1' den alınan debi verileri ise (t-1). gün değerleri olarak, çıkış değişkeni için ise AGİ-1 (t). güne ait ortalama debi değerleri modele giriş olarak verilerek ANFIS modeli oluşturulmuştur (Çizelge 4). Ayrıca AGİ-2 (t) debi tahmini için giriş parametreleri olarak MGİ-2 yağış verileri (t-2). AGİ-1 debi verileri (t-1) ve AGİ-2 debi verileri de (t-1) olarak, çıkış AGİ-2 (t) zamanlı debi verisi tahmin edilmiştir (Çizelge 5). AGİ'ler için 3 farklı kümeleme yapılarak ANFIS modeline girilmiştir ve debi

tahmini yapılmıştır. Şekil 9’da AGİ-2 için oluşturulmuş 3 kümelemeli modelin yapısı verilmiştir. Üyelik fonksiyonu olarak üçgen üyelik fonksiyonu (İng. kıs. triangular membership function-*trimf*) seçilmiştir. Gerçek ölçüm(gözlem) verileri ile model tahmin çıktı verileri karşılaştırılarak model performansı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4. AGİ – 1 için ANFIS Modeli Girdi ve Çıktıları

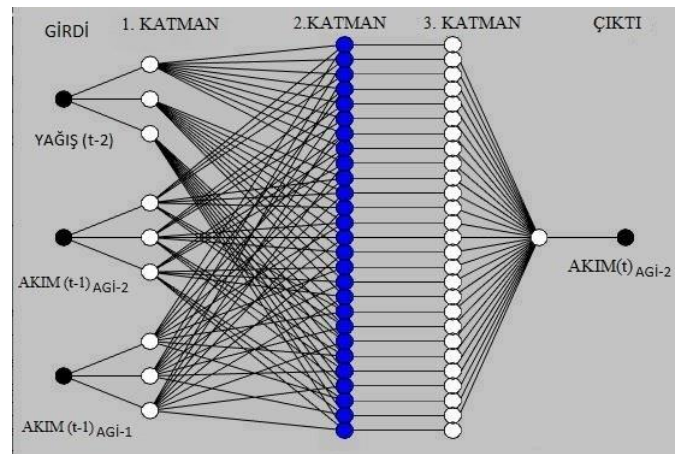
Kümeleme	Giriş Verisi	Çıkış Verisi
3 3	$Q_1(t-1)$ $P_1(t-2)$	$Q_1(t)$
4 4	$Q_1(t-1)$ $P_1(t-2)$	$Q_1(t)$
5 5	$Q_1(t-1)$ $P_1(t-2)$	$Q_1(t)$



Şekil 7 AGİ – 1 için kurulan ANFIS Model Mimarisi

Çizelge 5. AGİ – 2 için ANFIS Model Girdi ve Çıktıları

Kümeleme	Giriş Verisi	Çıkış Verisi
3 3 3	$Q_1(t-1)$ $Q_2(t-1)$ $P_2(t-2)$	$Q_2(t)$
4 4 4	$Q_1(t-1)$ $Q_2(t-1)$ $P_2(t-2)$	$Q_2(t)$
5 5 5	$Q_1(t-1)$ $Q_2(t-1)$ $P_2(t-2)$	$Q_2(t)$



Şekil 8 AGİ – 2 için kurulan ANFIS Model Mimarisi

Model Performans Metrikleri

ANFIS modeli sonucu elde edilen günlük ortalama debiler ile gerçekte ölçülen günlük ortalama debiler karşılaştırılarak modelin istatistiksel başarımı değerlendirilmiştir. Model performans metrikleri Korelasyon Katsayısı (R^2) ve Karesel Ortalama Hatanın Karekökü (İng. kıs. $RMSE$) olarak belirlenmiştir. Bu metriklerin hesaplanması için eşitlikler sırasıyla (4) ve (5)'de verilmiştir (Şen, 2002).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i^n (\psi_{ölçüm} - \psi_{model})^2}{\sum_i^n (\psi_{ölçüm} - \bar{\psi}_{ölçüm})^2} \quad (4)$$

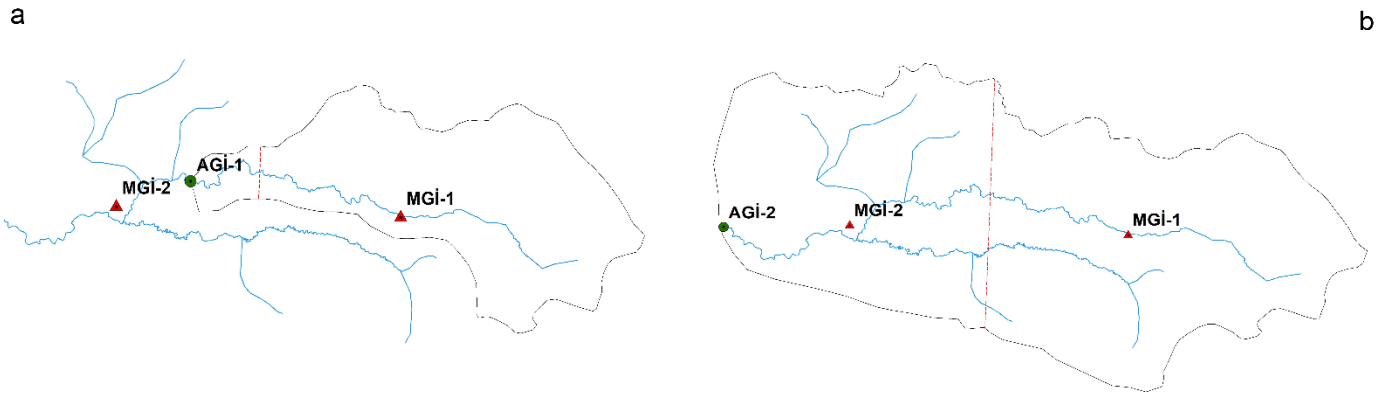
$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (\psi_{model} - \psi_{ölçüm})^2}{n}} \quad (5)$$

Eşitliklerde $\psi_{ölçüm}$ gerçek değer, ψ_{model} tahmin değeri, n ise toplam veri sayısını ifade etmektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma kapsamında ele alınan, Kızılırmak Nehri memba bölgesinde akarsu üzerinde kurulu AGİ-1 ve AGİ-2 için 2014-2021 tarihleri arasında gözlenen günlük ortalama debiler (m^3/s)'in tahmin edilmesi için her bir AGİ'ye özel olarak, ANFIS yöntemi ile tahmin modelleri oluşturulmuştur. Oluşturulan ANFIS modellerinde girdi katmanında havzanın günlük toplam yağış miktarı ve AGİ'de ölçülen günlük ortalama debi veri setlerinden yararlanılmıştır.

Havzalara ait günlük toplam yağış miktarlarını belirlemek için oluşturulan thiesen poligonları Şekil 9.a-b'de ve temsiliyetleri Çizelge 6 ve Çizelge 7'de verilmektedir.



Şekil 9. Çalışma Sahasındaki MGİ'lerin, AGİ-1(a) ve AGİ-2'ye (b) ait havzalarındaki thiesen poligonları (kesikli kırmızı çizgi temsiliyet sınırını göstermekte)

Çizelge 6. AGİ – 1 Havzası için MGİ noktalarının thiesen poligonları ve temsiliyetleri

MGİ Adı	Temsil ettiği poligon alanı (km^2)	Temsil ettiği oran (%)
MGİ - 1	577.7	94
MGİ - 2	39.2	6

Çizelge 7. AGİ – 2 Havzası için MGİ noktalarının thiesen poligonları ve temsiliyetleri

MGİ Adı	Temsil ettiği poligon alanı (km^2)	Temsil ettiği oran (%)
MGİ - 1	958.4	55
MGİ - 2	778.1	45

Her AGİ enkesitine göre havza büyüklükleri farklıdır. Bu sebeple hesaplanan thiessen poligonlarının havza alanını kesişimi ve buna bağlı oransal temsiliyeti de farklıdır. Elde edilen oranlar, istasyonlarda ölçülen günlük toplam yağış miktarları ile çarpılarak tüm MGİ'ler için (1)'de gösterilen eşitlik ile ağırlıklı yağış miktarları hesaplanmıştır. Ağırlıklı yağışların hesaplanması havzayı temsil eden tüm MGİ'ler için tekrarlanmıştır. Toplanan ağırlıklı yağışlar, ilgili AGİ kesiti için 'havzanın mekânsal yağışı' olarak ifade edilir.

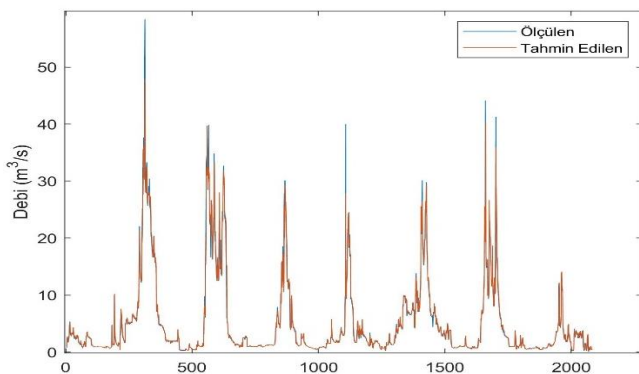
Model sonucunda çıktı olarak her AGİ için günlük ortalama debi (m^3/s) değerleri üretilmiştir. Çalışmada kullanılan AGİ'ler için ANFIS modelleri sonucunda elde edilen tahmin performans metrikleri hesaplanmış ve buna göre model başarımları değerlendirilmiştir

Çalışmada akarsuyun memba bölgesinde yer alan AGİ-1 (D15A117)'de 2014-2021 yılları arasında yapılmış ölçümler sonucu elde edilen günlük ortalama debiler ve thiessen poligonu ile belirlenen AGİ-1'in havzasındaki günlük toplam yağış miktarı verileri ile kurgulanan her bir ANFIS modelinin eğitim veri setleri; Şekil 10, Şekil 12 ve Şekil 14'de verilmiştir. Ayrıca her tahmin modeli için gözlemlerle karşılıklı uyumun gösterildiği saçılım grafikleri de Şekil 11, Şekil 13 ve Şekil 15'de verilmiştir. Modellerin gözlemlerle uyumuna bakıldığında AGİ-1 için tahmin modelleri arasında en yüksek uyumun 5 kümelemeli modelde olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 8).

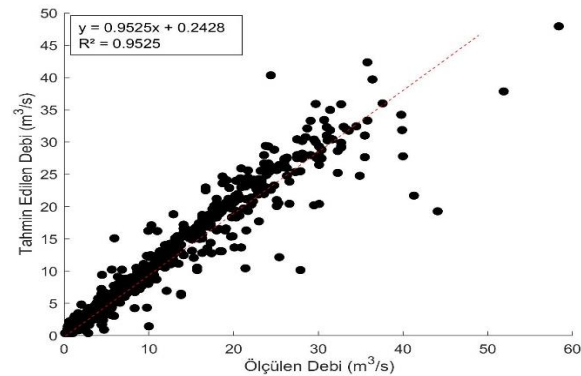
AGİ-1 için. eğitilen veri setlerinden oluşturulan modeller yardımıyla üretilen tahmin çıktıları, ANFIS modeli *test verisetleri* olarak. Şekil 16, Şekil 18 ve Şekil 20'de verilmektedir. AGİ-1 için test verilerinin gözlemlerle uyumunu gösteren saçılma grafikleri de Şekil 17, Şekil 19 ve Şekil 21'de verilmiştir. Model yapılandırılmalarına göre AGİ-1 için test verilerinin gözlemlerle uyumu en yüksek ANFIS modelinin, 3 kümelemeli model olduğu görülmektedir (Çizelge 8).

Çizelge 8. AGİ – 1 için oluşturulan eğitim ve test veri setinin farklı ANFIS modelleri ile eğitilmesinde elde edilen istatistiksel başarımlar

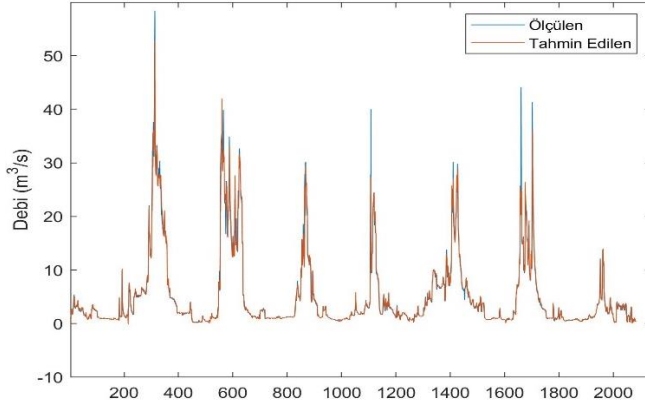
ANFIS Kümeleme Modelleri	Eğitim		Test	
	R ²	RMSE	R ²	RMSE
3 3 3	0.9525	1.57	0.9578	1.49
4 4 4	0.9561	1.51	0.9102	2.19
5 5 5	0.9567	1.50	0.9351	1.86



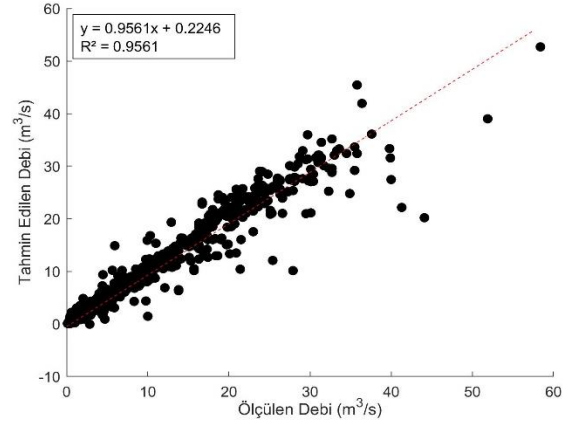
Şekil 10. AGİ – 1 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



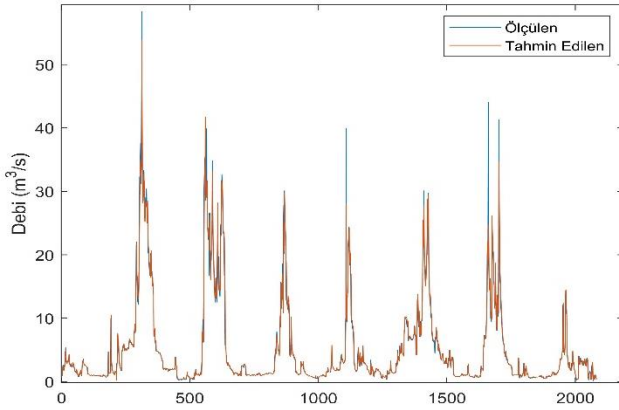
Şekil 11. AGİ – 1 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması



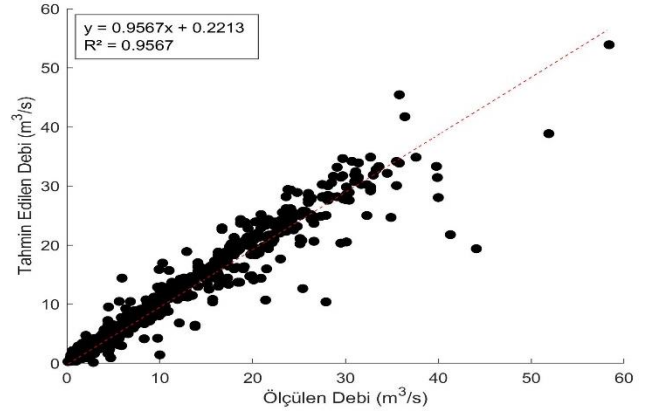
Şekil 12. AGİ - 1 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



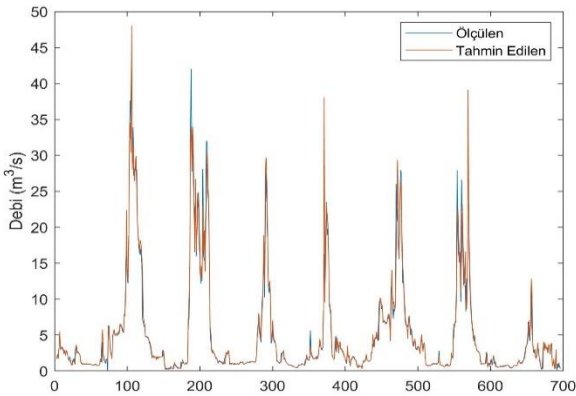
Şekil 13. AGİ - 1 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması



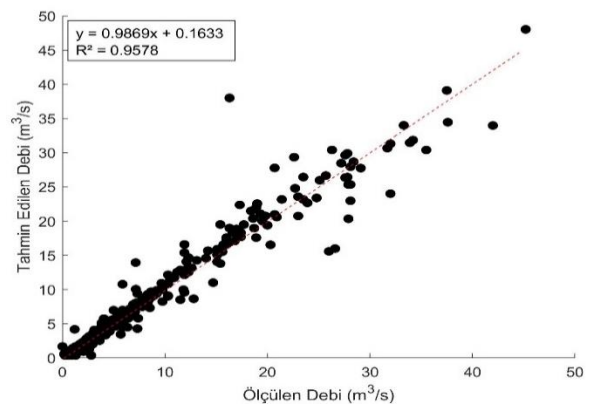
Şekil 14. AGİ - 1 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



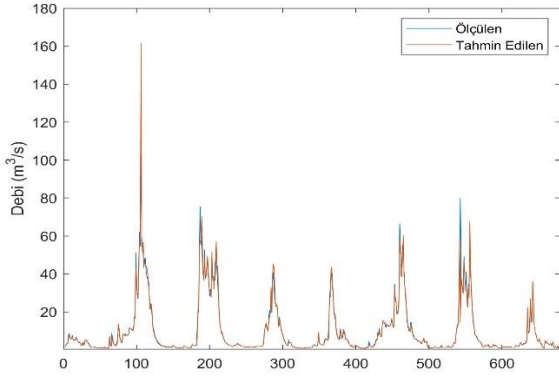
Şekil 15. AGİ - 1 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması



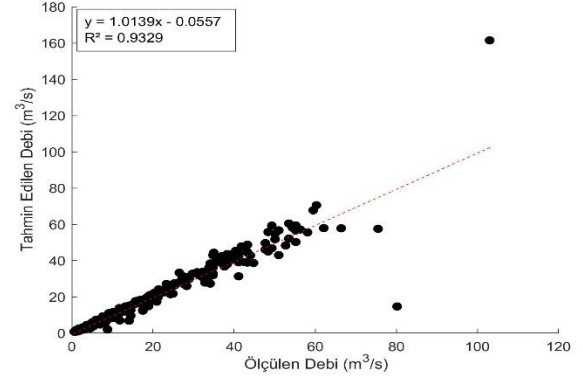
Şekil 16. AGİ - 1 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



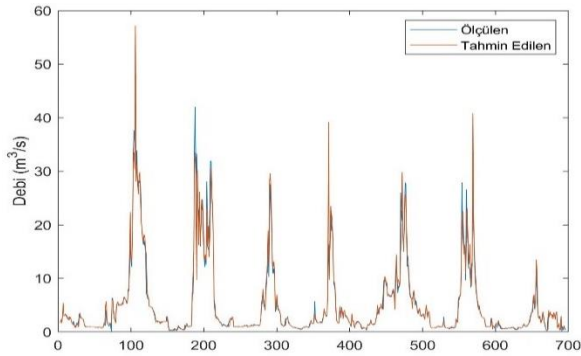
Şekil 17. AGİ - 1 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debiler için saçılma diyagramı



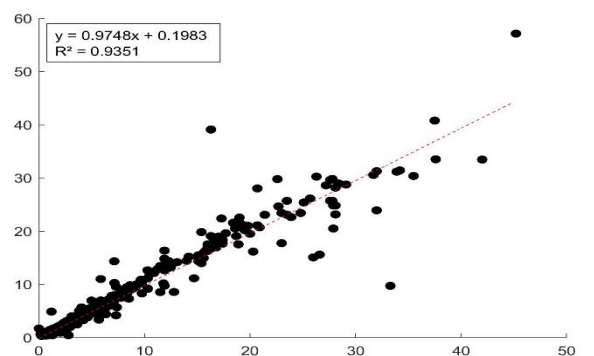
Şekil 18. AGİ – 1 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debiler



Şekil 19. AGİ – 1 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debiler için saçılma diyagramı



Şekil 20. AGİ – 1 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi

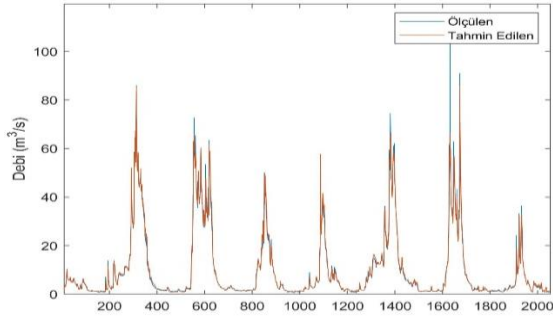


Şekil 21. AGİ – 1 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debiler için saçılma diyagramı

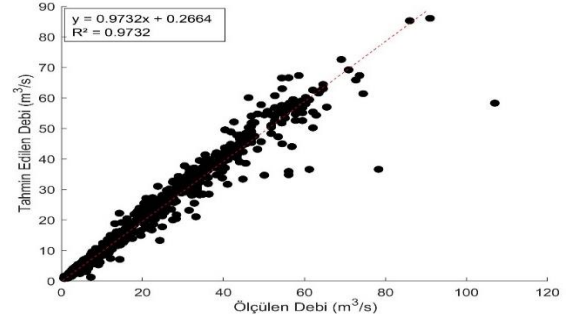
AGİ-1 için kurulan ANFIS modelleri gibi, mansaptaki AGİ-2 (E15A039) için de günlük ortalama debi tahmin modelleri yapılandırılmıştır. AGİ-1'den farklı olarak, AGİ-2'nin havzasına düşen yağış miktarı ile beraber, üstünde yer alan AGİ-1'de gözlenen günlük ortalama debi miktarı verileri, her modele *girdi* olarak tanımlanmıştır. AGİ-1'deki yaklaşıma benzer şekilde, verilerin %75'i eğitim, %25'i test verisi olarak ayrılmıştır. Yağış değerleri (t-2). gün, üstteki AGİ-1'e ait ortalama debi değerleri (t-1). gün değerleri *girdi* olarak alınmıştır. Çıktı katmanına AGİ-2 için günlük ortalama debi değerleri (t). gün zamanlı alınarak ANFIS yöntemi ile model mimarisi oluşturulmuştur. ANFIS model yapılandırmaları sırasıyla; 3'lü, 4'lü ve 5'li kümelerle ayrılarak hedef değerlerin üyelik fonksiyonu oluşturulmuştur.

Çalışmada akarsuyun mansap bölgesinde yer alan AGİ-2 (E15A039)'da 2014-2021 yılları arasında yapılmış ölçümler sonucu elde edilen günlük ortalama debiler ile, thiessen poligonu yardımıyla belirlenen AGİ-2'nin havzasındaki günlük toplam yağış miktarı ve membasındaki AGİ-1'e ait günlük ortalama debi verileri ile kurgulanan her bir ANFIS modelinin eğitim veri setleri; Şekil 22, Şekil 24 ve Şekil 26'da verilmiştir. AGİ-2 için eğitim verilerinin gözlemlerle uyumunu gösteren saçılma grafikleri de Şekil 23, Şekil 25 ve Şekil 27'de verilmiştir.

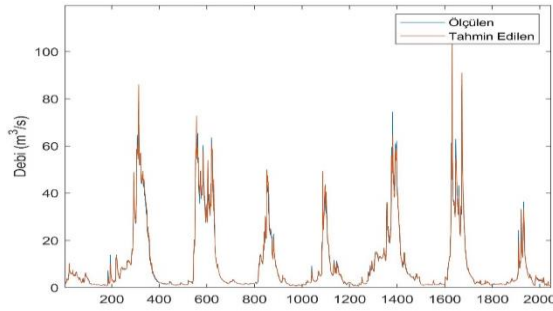
AGİ-2 için, eğitilen veri setlerinden oluşturulan modeller yardımıyla üretilen tahmin çıktıları. ANFIS modeli test veri setleri olarak Şekil 28, Şekil 30 ve Şekil 32'de verilmektedir. AGİ-2 için test verilerinin gözlemlerle uyumunu gösteren saçılma grafikleri de Şekil 29, Şekil 31 ve Şekil 33'de verilmiştir.



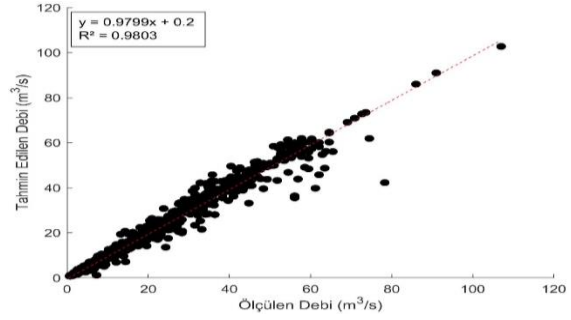
Şekil 22. AGİ – 2 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



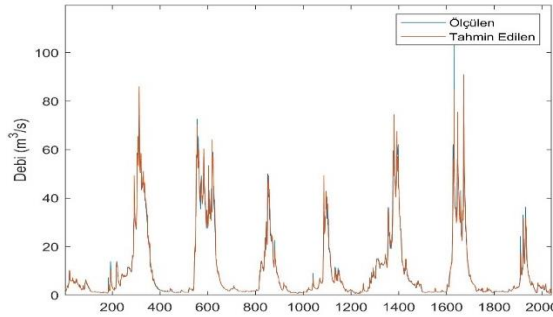
Şekil 23. AGİ – 2 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması



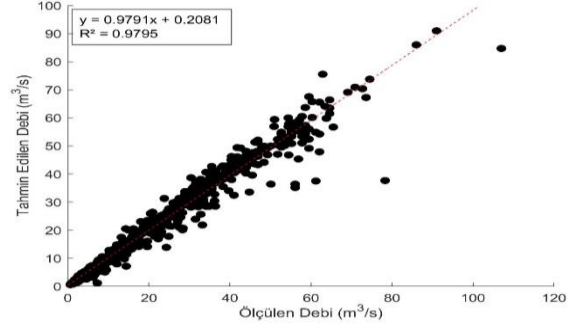
Şekil 24. AGİ – 2 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



Şekil 25. AGİ – 2 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması

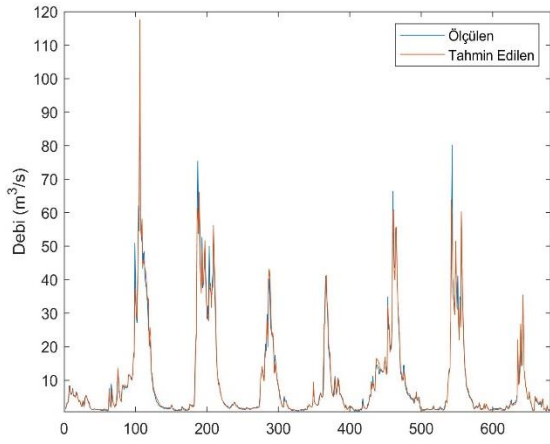


Şekil 26. AGİ – 2 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi

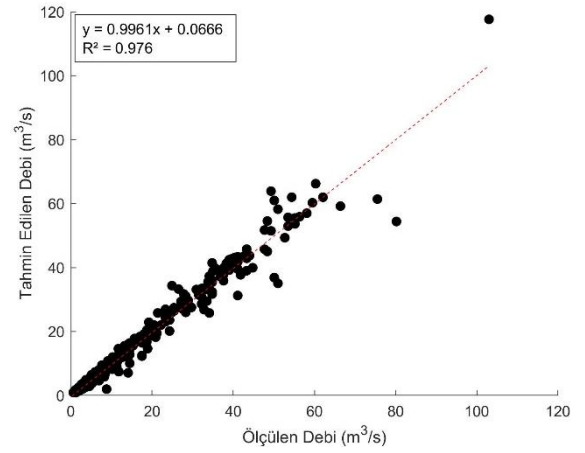


Şekil 27. AGİ – 2 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin eğitim verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması

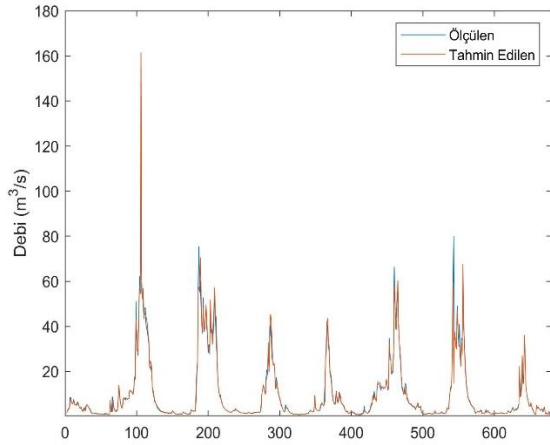
AGİ-2 için ANFIS modellerinde kümeleme sayısı arttıkça modellerin ürettikleri çıktıların gözlemlerle olan uyumlarının düştüğü de görülmüştür (Çizelge 9).



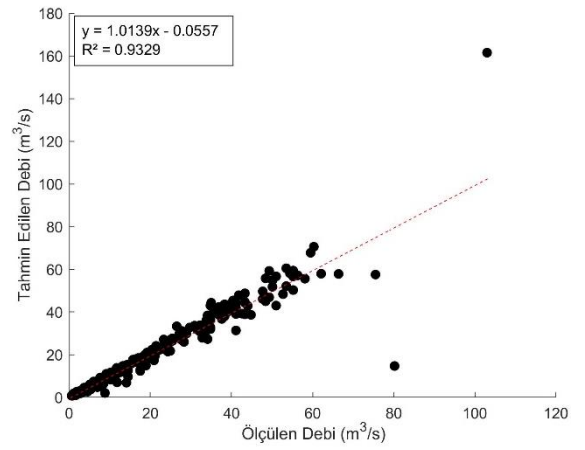
Şekil 28 AGİ – 2 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



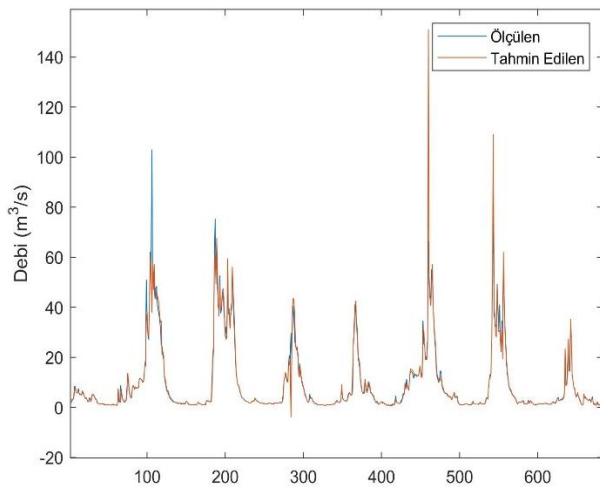
Şekil 29 AGİ – 2 için 3 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması



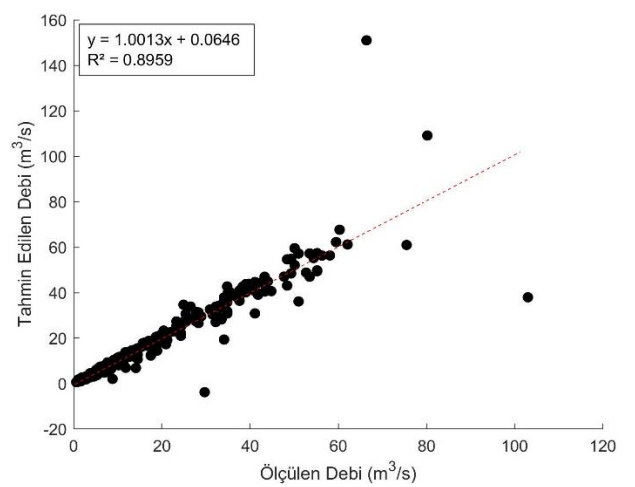
Şekil 30 AGİ – 2 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



Şekil 31 AGİ – 2 için 4 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması



Şekil 32 AGİ – 2 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilere ait zaman serisi



Şekil 33 AGİ – 2 için 5 Kümelemeli ANFIS modelinin test verilerine ait ölçülen ve tahmin edilen ortalama debilerin karşılaştırılması

Her kümelemeye ait çıkan tahmin sonuçları ile ölçüm(gözlem) değerleri karşılaştırılmıştır. Model yapılandırılmalarına göre AGİ-2 için de test verilerinin gözlemlerle uyumu en yüksek ANFIS modelinin 3 kümelemeli model olduğu görülmektedir (Çizelge 9).

Çizelge 9. AGİ-2 için oluşturulan eğitim ve test veri setinin farklı ANFIS modelleri ile eğitilmesinde elde edilen istatistiksel başarımları

ANFIS Kümeleme Modelleri	Eğitim		Test	
	R ²	RMSE	R ²	RMSE
3 3 3	0.9732	2.37	0.976	2.20
4 4 4	0.9803	2.03	0.9329	3.83
5 5 5	0.9795	2.07	0.8959	4.79

SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada ANFIS yöntemi ile Kızılırmak Havzasının memba bölgesinde iki farklı AGİ için günlük ortalama debi ve günlük toplam yağış değerleri kullanılarak debi tahmini yapılmıştır. Modelin girdi verileri, yağışın akışa geçiş süresi göz önüne alınarak (t-2). gün ve debi değerleri de (t-1). gün olarak düzenlenmiştir. Model çıktı verisi olarak, (t). gün debi değerleri tahmin edilmiştir. AGİ-1 için debi tahmininde 2 girdi ve 1 çıktı içeren bir model mimarisi oluşturulmuştur. AGİ-2 için debi tahmininde 3 girdi ve 1 çıktıya sahip bir model kurulmuştur. ANFIS modeli mimarisinde girdi verileri için birden fazla kümeleme işlemi yapılmıştır. Kümeleme modellerinin tahmin sonuçları ile ölçüm değerleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; 3'lü kümeleme modeli için AGİ-1 için en yüksek tahmin başarısı $R^2 = 0.9578$ ve AGİ-2 için ise en yüksek tahmin başarısı $R^2 = 0.976$ 'dır. Sonuç olarak bu çalışmada yağış ve akış arasındaki ilişki göz önünde bulundurularak ANFIS modeli ile debi tahmini yapılmış ve yüksek başarıma sahip sonuçlar elde edilmiştir. Aynı zamanda ANFIS modelinin akarsulardaki günlük ortalama debi tahminini yapmak için kullanılabilecek bir yöntem olduğu görülmüştür. Bununla beraber memba-mansap şeklinde sıralı olarak akarsularda kurulan AGİ'lerde memba istasyonuna ait günlük ortalama debi verileri de ANFIS modeline girdi olarak sunulmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma ile debi tahmini için havzaya düşen yağış miktarının etkisinin göz önüne alınması gerekliliğinin önemi ortaya konulmuştur.

Suyun yaşamın her alanında kullanılması nedeniyle kullanılabilir su kaynaklarındaki mevcut su miktarının bilinmesi, eksik veri olan Akım Gözlem İstasyonları'nda geçmişe dönük verilerin güvenilir yöntem ve araçlarla tahmin edilmesi, gelecek dönemlerde gerçekleştirilmesi planlanan su yapılarının hidrolojik planlamalarında önemli bir kazanım sağlayacaktır. Bununla birlikte çeşitli iklim projeksiyonlarıyla üretilen günlük toplam yağış ve günlük ortalama sıcaklık gibi meteorolojik değişkenleri, akarsu debisi veya baraj ortalama su seviyesi gibi hidrolojik değişkenlerle ilişkilendirecek çalışmalarla mevcutta işletilmekte olan baraj. gölet vb. su depolama yapılarının geleceğe yönelik su potansiyelinin belirlenmesi mümkün görünmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan meteorolojik ve hidrolojik verileri sağlayan Meteoroloji Genel Müdürlüğü'ne ve Devlet Su İşleri Sivas 19. Bölge Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları, aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

SA ve MSK çalışmanın yöntemini belirlemişlerdir, mantıksal akışını düzenlemişlerdir. Veri toplama; SA ve HND tarafından yapılmıştır. Analiz çalışması HND tarafından gerçekleştirilmiştir. Makalenin ilk taslağı SA ve MSK tarafından yazılmış ve SA makalenin önceki versiyonları hakkında yorum yapmıştır. Tüm yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

KAYNAKLAR

- Algancı, U., Coşkun, H. G., Eriş, E., Ağırlioğlu, N., Cığızoğlu, K., Yılmaz, L., & Toprak, F. (2010). Akım Ölçümleri Olmayan Akarsu Havzalarında Hidroelektrik Potansiyelin Belirlenmesine Yönelik Uzaktan Algılama ve CBS ile Hidrolojik Modelleme. *Jeodezi ve Jeoinformasyon Dergisi* (Sayı 101), TMMOB Harita ve Kadastro Mühendisleri Odası.
- Altunkaynak, A. (2010). A predictive model for well loss using fuzzy logic approach. *Hydrological Processes*, 24, 2400–2404. <https://doi.org/10.1002/hyp.7642>
- Altunkaynak, A., & Başakın, E. E. (2018). Zaman Serileri Kullanılarak Nehir Akım Tahmini ve Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(1), 92–101. <https://doi.org/10.18185/erzifbed.339781>
- Arslan, H., Üneş, F., Demirci, M., Taşar, B., & Yılmaz, A. (2020). Keban Baraj Gölü Seviye Değişiminin ANFIS ve Destek Vektör Makineleri ile Tahmini. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 71–77. <https://doi.org/10.47495/okufbed.748018>
- Asaad, M. N., Eryürük, Ş., & Eryürük, K. (2022). Forecasting of Streamflow and Comparison of Artificial Intelligence Methods: A Case Study for Meram Stream in Konya, Turkey. *Sustainability*, 14(10), 6319. <https://doi.org/10.3390/su14106319>
- Bayazıt, M. (1998). *Hidrolojik Modeller* (1.), İTÜ Rektörlüğü Yayınları.
- Bayazıt, M. (2011). *Hidroloji*, Birsen Yayınevi.
- Belvederesi, C., Zaghoul, M. S., Achari, G., Gupta, A. & Hassan, Q. K. (2022). Modelling river flow in cold and ungauged regions: a review of the purposes. methods. and challenges. *Environmental Reviews*, 30(1), 159–173. <https://doi.org/10.1139/er-2021-0043>
- Burgan, H. İ. (2022). Comparison of different ANN (FFBP. GRNN. RBF) algorithms and Multiple Linear Regression for daily streamflow prediction in Kocasu River, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(5), 4699–4708.
- Caner, M. & Akarslan, E. (2009). Mermer Kesme İşleminde Spesifik Enerji Faktörünün ANFIS ve YSA Yöntemleri ile Tahmini. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15(2), 221–226.
- DSİ, (2020). *Toprak Su Kaynakları*. <https://www.dsi.gov.tr/Sayfa/Detay/754#>
- DSİ, (2023). *DSİ AGİ Sayısı hakkında Bekir Ragıp Yurtseven (Rasatlar Şube Müdürü) ile Kişisel Görüşme*.
- Fistikoglu, O. & Okkan, U. (2011). Statistical Downscaling of Monthly Precipitation Using NCEP/NCAR Reanalysis Data for Tahtali River Basin in Turkey. *Journal of Hydrologic Engineering*, 16(2), 157–164. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)he.1943-5584.0000300](https://doi.org/10.1061/(asce)he.1943-5584.0000300)

- Jang, J. S. R. (1993). ANFIS: adaptive-network-based fuzzy inference system. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 23(3), 665–685. <https://doi.org/10.1109/21.256541>
- Jang, J. S. R., Sun, C. T. & Mizutani, E. (1997). *Neuro-Fuzzy and Soft Computing*. Pearson College Div; US Ed edition.
- Katipoğlu, O. M. (2022). Analyzing the trend and change point in various meteorological variables in Bursa with various statistical and graphical methods. *Theoretical and Applied Climatology*, 150(3–4), 1295–1320. <https://doi.org/10.1007/s00704-022-04231-0>
- Kişi, Ö. (2003). *Nehir Enkesitindeki Askı Malzemesi Miktarının Bulanık Mantık ile Modellenmesi (Yayınlanmış Doktora Tezi)*. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Kosko, B. (1992). *Neural Networks and Fuzzy Systems. A Dynamical Systems Approach to Machine Intelligence*.
- Özdemir, H. (1978). *Uygulamalı Taşkın Hidrolojisi*. DSİ Genel Müdürlüğü.
- Özkan, F.. & Haznedar, B. (2023). Comparative analysis of ANFIS models in Prediction of Streamflow: the case of Seyhan Basin. *International Journal of Applied Mathematics Electronics and Computers*, 11(2), 72–78.
- Şahin, Ş. (2012). *Büyük Menderes Nehri Üzerindeki Akım Gözlem İstasyonlarında eksik verilerinin tamamlanması (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi)*. Pamukkale Üniversitesi.
- Şen, Z. (2002). *İstatistik Veri İşleme Yöntemleri*. Su Vakfı Yayınları.
- Şen, Z. (2004a). *Mühendislikte Bulanık (Fuzzy) Mantık ile Modelleme Prensipleri (2. baskı)*. Su Vaktı Yayınları.
- Şen, Z. (2004b). *Yapay Sinir Ağları İlkeleri (2. baskı)*. Su Vakfı Yayınları.
- Storch, H. von & Zwiers, F. W. (2003). *Statistical Analysis in Climate Research (1. baskı)*. Cambridge University Press.
- SYGM, (2019). *Kızılırmak Havzası Taşkın Yönetim Planı Yönetici Özeti (Hidro dizayn A.Ş.)*. [https://www.tarimorman.gov.tr/SYGM/Belgeler/Taşkın Yönetim Planları/KIZILIRMAK HAVZASI TASHKIN YONETIM PLANI YONETICI ÖZETİ.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/SYGM/Belgeler/Taşkın_Yönetim_Planları/KIZILIRMAK_HAVZASI_TASHKIN_YONETIM_PLANI_YONETICI_OZETI.pdf)
- Teker, A. (1984). *Hidrometri (Teori - Tatbikat)*. DSİ Genel Müdürlüğü.
- Uzunali, A. (2019). *Yapay sinir ağlarına dayalı yağış tahmin ve analizi (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi)*. İstanbul Kültür Üniversitesi / Lisansüstü Eğitim Enstitüsü / Bilgisayar Mühendisliği Ana Bilim Dalı / Bilgisayar Mühendisliği Bilim Dalı.
- Yılmaz, M. U. & Onoz, B. (2022). Development of ensemble approaches based on performance of statistical methods for daily streamflow estimation. *Hydrological Sciences Journal*, 67(8), 1199–1215. <https://doi.org/10.1080/02626667.2022.2072735>
- Zadeh, L. A. (1965). Fuzzy Sets . *Information and Control*, 8, 338–353.

Atf İçin: Hayvaci, H. T. (2023). Çoklu Yansıma Ortamlarında Geniş Menzilli Hedeflerin Uyarlanabilir Radar Tespiti. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2583-2593.

To Cite: Hayvaci, H. T. (2023). Adaptive Radar Detection of Extended Targets in Diffuse Multipath Environments. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2583-2593.

Çoklu Yansıma Ortamlarında Geniş Menzilli Hedeflerin Uyarlanabilir Radar Tespiti

Harun Taha HAYVACI

Öne Çıkanlar:

- Karmaşık ve çoklu yansımaların bulunduğu ortamlarda geniş hedefler için sağlam ve güvenilir radar tespit algoritması
- Kontrol gözetim, güvenlik ve uzaktan algılama uygulamaları

Anahtar Kelimeler:

- Adaptif Radar Tespiti
- Çoklu Yol Kullanımı
- Geniş Menzilli Hedefler
- Kısıtlı Optimizasyon
- Genelleştirilmiş Olasılık Oranı Testi (GLRT)

ÖZET:

Bu makalede, Gauss gürültüsü altında gömülü geniş menzilli radar hedeflerinin uyumlu algılama problemi, dağınık çoklu yol ortamı varsayımı altında ele alınmıştır. Her aralık hücrelerinden hedef yankısı, doğrudan yol bileşenini hesaba katan bilinmeyen bir ölçek faktörüyle belirlenen belirli bir veri vektörü ve bir parlak yüzeyin çoklu yankılarını temsil eden bilinmeyen bir kovaryans matrisiyle Gaussian dağılımlı rastgele veri vektörünün toplamı olarak modellenmiştir. Tasarım aşamasında, her birincil veri kovaryans matrisi, ikincil veri seti ile elde edilen örnek bir kovaryans matrisi çevresinde yer aldığı varsayılır. Adaptif tespit problemi için bir kısıtlı Genelleştirilmiş Olasılık Oranı Testi (GLRT) ele alınmıştır. Geliştirilen algoritmanın, literatürdeki iyi bilinen adaptif dedektörlerle performans analizi yapılmıştır. Sunulan sonuçlar ve performans analizi, önerilen yaklaşımın yayılmış çoklu yol varlığı olan ortamlarda geniş menzilli radar hedeflerinin tespit performansını artırdığını vurgulamaktadır.

Adaptive Radar Detection of Extended Targets in Diffuse Multipath Environments

Highlights:

- Robust and reliable radar detection algorithm for extended targets in cluttered and multipath environments.
- Surveillance, security, and remote sensing applications.

Keywords:

- Adaptive Radar Detection
- Multipath Exploitation
- Range Extended Targets
- Constrained Optimization
- Generalized Likelihood Ratio Test (GLRT)

ABSTRACT:

This paper discusses the adaptive detection of extended radar targets buried in Gaussian clutter, assuming a diffuse multipath environment. The target return signal from each range cell is modeled as the sum of a deterministic data vector, which includes an unknown scaling factor representing the direct path component, and a randomly distributed data vector in a Gaussian distribution with unknown covariance matrix representing multipath echoes. During the design phase, it is assumed that the primary data covariance matrix falls within the vicinity of a sample covariance matrix that is devised from the secondary data set. The paper proposes a constraint Generalized Likelihood Ratio Test (GLRT) for the adaptive detection problem of extended radar targets in diffuse multipath environments, and conducts a performance analysis comparing the developed algorithm with well-known adaptive detectors in the literature. The results and performance analysis demonstrate that the proposed approach enhances the detection performance of extended radar targets in environments with diffuse multipath. Overall, this article provides valuable insights for improving the adaptive detection of extended targets in challenging environments, with potential applications in radar and sensing technologies.

INTRODUCTION

Radar systems are commonly used for remote sensing and detection of targets in various environments. However, in cluttered and multipath environments, the performance of radar detection algorithms can be significantly degraded due to interference and scattering from surrounding objects (Pamela et al, 1995; Richards et al, 2010; Fertig et al, 2012). In particular, detecting extended targets, such as vehicles or buildings, in diffuse multipath environments remains a challenging problem (Gerlach et al, 1999). To address this issue, adaptive radar detection algorithms have been developed to mitigate the effects of multipath interference and clutter (Fante et al, 1991; Fante et al, 1995). These algorithms employ adaptive signal processing techniques to estimate the interference statistics and adaptively suppress them, while preserving the target signals of interest. Adaptive detectors, which are proposed to detect extended (range spread) radar targets embedded in Gaussian clutter, experience performance degradation for several reasons (Aubry et al, 2016; Tang et al, 2017). Modern High-Resolution Radars (HRR's) may have range resolutions, which are smaller than the target to be identified, thus backscattered signals from the target can be received through not just one but more than one isolated point, which are considered as range cells (Bachman, 1965). Therefore, various techniques have been developed for adaptively detecting extended radar targets during the last decades.

Many studies in literature considering adaptive detectors for distributed targets have modeled target returns as known signals with unknown scaling factors (Conte et al, 2001; Conte at al, 2001; Aubry et al, 2013). It can be regarded as convenient when the target echoes consist only of a line-of-sight signal return. However, the received signals often contain multipath echoes along with line-of-sight echo, which distort the direct path returns and cause steering vector mismatch between the actual and nominal one (Hayvaci et al, 2013, Kumbul et al, 2019, Yilmaz et al, 2021). In this content, adaptive subspace detectors for both point-like and extended targets are devised to overcome steering vector mismatch related challenges by exploiting prior knowledge about the environment (Kraut et al, 2001; Bandiera et al, 2007). Though, it is not always easy or practical to predict target subspace particularly in glistening surfaces such as sea surface, which causes diffuse multipath (Fante et al, 1991). In such scenarios, the backscattered target echoes are reached to the radar receiver through many propagation paths. It is exceedingly difficult to predict the signal parameters of multipath components, such as direction of arrival, due to unpredictable dynamic behavior of the scene. A novel adaptive detection algorithm is developed for point-like targets, which models the multipath echoes via random variables with an unknown covariance matrix to tackle these challenges. The devised detector, referred to as T-AMF (Tunable-Adaptive Matched Filter), considers the radar signal return as the sum of direct and multipath returns from the target. The signal return is assumed to be buried in Gaussian noise with unknown covariance matrix (Aubry et al, 2015).

In this article, the author presents a novel adaptive radar detection algorithm for extended targets in diffuse multipath environments where geometry of the problem is depicted in Figure 1. The algorithm is based on a constrained Generalized Likelihood Ratio Test that models the target and interference signals using a joint probability density function. The author investigates the detection of radar signal returns from extended targets, which are buried in Gaussian clutter under the assumption of a radar-target environment with diffuse multipath. The target echo from each range cell is modeled as the sum of a deterministic data, which is direct path component, and a zero-mean complex Gaussian distributed random vector, which is diffuse multipath component, as in (Aubry et al, 2015). A suitable disturbance model involving the characteristics of multipath environment is critical for robust adaptive detection. Author designs Generalized Likelihood Ratio Test with the assumption of each data coming from

different range cell has a covariance matrix, which is in the restrained vicinity of the sample covariance matrix that is devised from the secondary data set. Thus, the author devises a set of constrained optimization problems with Maximum Likelihood (ML) estimate of the primary data covariance matrices by exploiting knowledge about the environment. The author derives the optimal detection criterion based on this model and proposes an efficient algorithm for its implementation. The performance of the proposed algorithm is evaluated using simulated data through Monte Carlo simulations, demonstrating its effectiveness in detecting extended targets in challenging environments.

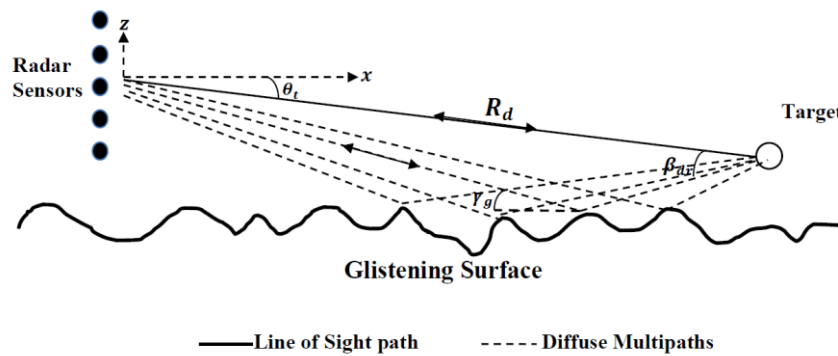


Figure 1. Geometry of the problem

Overall, this work contributes to the development of robust and reliable radar detection algorithms for extended targets in cluttered and multipath environments. The proposed algorithm has potential applications in various fields, including surveillance, security, and remote sensing.

The organization of the paper is as follows. In Problem Formulation section, the author describes the hypothesis-testing problem, and defines the parameters of target echo and disturbance model. In Detector Design section, the author devises the proposed detector to enhance detection of extended radar targets in diffuse multipath environments. In Performance Assessment section, the author presents the performance analysis and evaluation of the proposed detector along with well-known adaptive detectors, namely extended version of Kelly's receiver and Adaptive Matched Filter (AMF). Finally, the author addresses the concluding remarks in Conclusions.

MATERIALS AND METHODS

In this study, the author employs certain mathematical notation to denote vectors, matrices, and operations. Vectors are represented with boldface lowercase letters, such as \mathbf{a} , while boldface uppercase letters, such as \mathbf{A} , denotes matrices. The notation $(\cdot)^\dagger$ represents the conjugate transpose, and $\det(\cdot)$ denotes the determinant of a square matrix argument. The symbol \mathbf{I} represents the identity matrix, with its size determined by the context. The author uses \mathcal{C}^N , $\mathcal{C}^{N,K}$, and H^N respectively to represent the sets of N -dimensional vectors of complex numbers, $N \times K$ matrices of complex numbers, and $N \times N$ Hermitian matrices. The notation $\lambda(X) = [\lambda_1(X), \lambda_2(X), \dots, \lambda_N(X)]^T$ is used to represent the vector of eigenvalues of a Hermitian matrix $X \in H^N$, arranged in descending order, with $\lambda_i(X)$ representing the i -th ordered eigenvalue. The symbol \geq (and its strict form $>$) is used to denote generalized matrix inequality. For any $\mathbf{A} \in H^N$, $\mathbf{A} \geq 0$ denotes that \mathbf{A} is a positive semi-definite matrix (with $\mathbf{A} > 0$ representing positive definiteness). The author uses $\|\mathbf{x}\|$ to represent the Euclidean norm of \mathbf{x} . For any complex number x , $|x|$ represents the modulus of x . The symbol $\|\mathbf{A}\|_2$ denotes the spectral norm of the matrix $\mathbf{A} \in \mathcal{C}^{N,M}$. Finally, the notation $E[\cdot]$ is used to denote statistical expectation.

Problem Formulation

The author explores a set of radar sensors that gather data from N channels. These channels can be temporal, spatial, or a combination of the two (spatial-temporal). The author tackles the problem of detecting radar return signals from an extended radar target across H range cells. The primary data set, in other words data under test, is assumed to be a set of N -dimensional vectors of complex numbers, denoted by $\mathbf{r}_t \in \mathcal{C}^N$. The secondary data, denoted by \mathbf{r}_l , $l = 1, \dots, K$ ($K \geq N$), consists of vectors that are free of signal of interest. All data are obtained at the radar receiver. The radar receiver is operating in a diffuse multipath environment, which is caused by a glistening surface (Yilmaz et al, 2021). Thus, the detection problem is depicted as a binary hypothesis testing problem, where the goal is to determine whether a signal of interest is present or not. The relevant binary hypothesis testing problem is depicted as the following.

$$\begin{cases} H_0: \begin{cases} \mathbf{r}_t = \mathbf{n}_t, & t = 1, \dots, H \\ \mathbf{r}_l = \mathbf{n}_l, & l = 1, \dots, K \end{cases} \\ H_1: \begin{cases} \mathbf{r}_t = \alpha_t \mathbf{p} + \mathbf{s}_t + \mathbf{n}_t & t = 1, \dots, H \\ \mathbf{r}_l = \mathbf{n}_l & l = 1, \dots, K \end{cases} \end{cases} \quad (1)$$

where

- $\mathbf{p} \in \mathcal{C}^N$, $\|\mathbf{p}\|^2 = 1$, The target steering vector is denoted by the target steering $\mathbf{p} \in \mathcal{C}^N$, where \mathbf{p} has a Euclidean norm of 1, $\|\mathbf{p}\|^2 = 1$. This target's steering vector takes into account the line of sight component, which represents the direct path between the transmitter and the target.
- The parameter $\alpha_t \in \mathcal{C}$ is a deterministic quantity that encompasses the target reflectivity as well as the channel propagation effects for the line of sight component associated with each range cell.
- The author uses the notations $\mathbf{n}_t \in \mathcal{C}^N$, $t = 1, \dots, H$, and $\mathbf{n}_l \in \mathcal{C}^N$, $l = 1, \dots, K$, to represent the clutter interference and noise contributions for each range cell and the secondary data set, respectively. It is assumed that all \mathbf{n}_t and \mathbf{n}_l are independent and identically distributed (iid) complex normal random vectors, with a mean of zero and a positive definite covariance matrix $\overline{\mathbf{M}} > \mathbf{0}$.

$$E[\mathbf{n}_t \mathbf{n}_t^\dagger] = E[\mathbf{n}_l \mathbf{n}_l^\dagger] = \overline{\mathbf{M}}, \quad t = 1, \dots, H; \quad l = 1, \dots, K;$$

- The data vector, \mathbf{s}_t , with $t = 1, \dots, H$, represents the diffuse multipath phenomena for each range cell in an extended target scenario (Fante et al, 1991). In the current context, the signal of interest radiating from the target is received through many diverse propagation paths over a glistening surface. The data vector, therefore, models the sum of echoes from multiple spatially distributed reflectors. In this study, we assume that the data vector, \mathbf{s}_t , follows a complex, zero-mean, circularly symmetric Gaussian process with a covariance matrix, $\mathbf{\Sigma}_t$, which is unknown. This assumption is based on the Central Limit Theorem.

In the current context, the covariance matrix of the primary data is a key factor in testing the H_1 and H_0 hypotheses. Under the H_1 hypothesis, the covariance matrix is denoted as $\mathbf{M}_t = \mathbf{M} + \mathbf{\Sigma}_t$, where $t = 1, \dots, H$. In contrast, under the H_0 hypothesis, the covariance matrix is $\mathbf{M}_t = \mathbf{M}$, without any additional terms. Additionally, the term \mathbf{s}_t in this formulation is included to account for potential mismatches that may arise due to propagation effects in the environment.

In order to compare and assess performance, the author examines the widely-known Kelly's receiver and AMF among the available adaptive detection strategies, as given in (Kelly, 1986; Robey et al, 1992). However, in this study author use the extended target version of these receivers. Kelly's receiver is presented. The extended target version of Kelly's receiver is presented below.

$$t_{Kelly} = \sum_{t=1}^H \frac{|\mathbf{p}^\dagger \mathbf{S}^{-1} \mathbf{r}_t|^2}{(\mathbf{p}^\dagger \mathbf{S}^{-1} \mathbf{p}) \sum_{t=1}^H \mathbf{r}_t^\dagger \mathbf{S}^{-1} \mathbf{r}_t} \underset{H_0}{\overset{H_1}{\geq}} \eta_1, \quad (2)$$

and the extended target version of AMF is given as,

$$t_{AMF} = \sum_{t=1}^H \frac{|\mathbf{p}^\dagger \mathbf{S}^{-1} \mathbf{r}_t|^2}{\mathbf{p}^\dagger \mathbf{S}^{-1} \mathbf{p}} \underset{H_0}{\overset{H_1}{\geq}} \eta_2. \quad (3)$$

Detector Design

The author introduces a new adaptive detector, named extended T-AMF, by developing a constrained generalized likelihood ratio test (GLRT) in this section. The hypothesis testing that leads to the constrained GLRT is outlined below.

$$\frac{\max_{\{\alpha_1, \dots, \alpha_H \in \mathcal{C}, \mathbf{M}_1, \dots, \mathbf{M}_H \in \Omega_t^\epsilon\}} f_{1,H}}{\max_{\overline{\mathbf{M}} = \mathbf{S}} f_{0,H}} \underset{H_2}{\overset{H_1}{\geq}} \eta_3 \quad (4)$$

where $f_{1,H}$ and $f_{0,H}$ are defined as

$$\begin{aligned} f_{1,H} &= f_1(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_H; \alpha_1, \dots, \alpha_H, \mathbf{M}_1, \dots, \mathbf{M}_H) \\ &= \frac{1}{\prod_{t=1}^H \det(\pi \mathbf{M}_t)} e^{-\sum_{t=1}^H (\mathbf{r}_t - \alpha_t \mathbf{p})^\dagger \mathbf{M}_t^{-1} (\mathbf{r}_t - \alpha_t \mathbf{p})} \end{aligned} \quad (5)$$

and

$$f_{0,H} = f_0(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_H; \overline{\mathbf{M}}) = \frac{1}{\prod_{t=1}^H \det(\pi \overline{\mathbf{M}})} e^{-\sum_{t=1}^H \mathbf{r}_t^\dagger \overline{\mathbf{M}}^{-1} \mathbf{r}_t} \quad (6)$$

respectively. In addition, the constrained set for \mathbf{M}_t is defined as

$$\Omega_t^\epsilon = \left\{ \mathbf{M}_t > \mathbf{0}; \left\| \mathbf{S}^{\frac{1}{2}} \mathbf{M}_t^{-1} \mathbf{S}^{\frac{1}{2}} - \mathbf{I} \right\|_2 \leq \epsilon_t \right\} \quad \epsilon_t \geq 0, t = 1, \dots, H \quad (7)$$

The signal detection threshold, denoted as η_3 , is determined with respect to the desired probability of false alarm rate P_{fa} . In equation (7), a collection of positive-definite matrices $\mathbf{M}_t > \mathbf{0}$ is defined such that $\mathbf{S}^{1/2} \mathbf{M}_t^{-1} \mathbf{S}^{1/2}$ is ϵ_t -similar to the identity matrix \mathbf{I} , following the method described in (Aubry et al, 2015). In other words, the suitable neighborhood of \mathbf{S} for locating \mathbf{M}_t is defined as Ω_t^ϵ , with ϵ representing a parameter that controls the size of uncertainty region of the covariance matrix. Higher values of ϵ are recommended for environments with strong reflection contributions, while lower values of ϵ are more suitable for weak multipath returns.

In order to derive the extended T-AMF equation (4), the following substitution is required as a preliminary step.

$$\mathbf{X}_t = \mathbf{S}^{\frac{1}{2}} \mathbf{M}_t^{-1} \mathbf{S}^{\frac{1}{2}}, \quad t = 1, \dots, H$$

Therefore, equation (4) can be reformulated as follows:

$$\max_{\bar{\alpha}_t \in \mathbb{C}, \mathbf{X}_t \in \Omega_1^{\epsilon_t}} \left(\prod_{t=1}^H \det(\mathbf{X}_t) \right) e^{-\sum_{t=1}^H \bar{f}_t(\bar{\alpha}_t, \mathbf{X}_t; \bar{\mathbf{r}}_t)} \underset{H_0}{\overset{H_1}{\geq}} \eta_4 \quad (8)$$

where $\bar{f}_t(\bar{\alpha}_t, \mathbf{X}_t; \bar{\mathbf{r}}_t)$ and $\bar{\mathbf{r}}_t$ are defined respectively as

$$\bar{f}_t(\bar{\alpha}_t, \mathbf{X}_t; \bar{\mathbf{r}}_t) = (\bar{\mathbf{r}}_t - \bar{\alpha}_t \bar{\mathbf{p}})^\dagger \mathbf{X}_t (\bar{\mathbf{r}}_t - \bar{\alpha}_t \bar{\mathbf{p}}) - \|\bar{\mathbf{r}}_t\|^2$$

$$\Omega_1^{\epsilon_t} = \{\mathbf{X}_t > \mathbf{0}: \|\mathbf{X}_t - \mathbf{I}\|_2 \leq \epsilon_t\},$$

and

$$\bar{\mathbf{r}}_t = \mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{r}_t, \bar{\mathbf{p}} = \frac{\mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{p}}{\|\mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{p}\|}, \bar{\alpha}_t = \alpha_t \|\mathbf{S}^{-1/2} \mathbf{p}\|$$

where $t = 1, \dots, H$.

Once one takes the logarithm of (8), the original decision test depicted (4) can be formulated as

$$t_{\text{T-AMFI}}(\epsilon) = \max_{\bar{\alpha}_t \in \mathbb{C}, \mathbf{X}_t \in \Omega_1^{\epsilon_t}} \underset{H_0}{\overset{H_1}{\mathbf{A}}} \underset{H_0}{\geq} \eta \quad (9)$$

where

$$\mathbf{A} = \sum_{t=1}^H \left(\log \det(\mathbf{X}_t) - \bar{f}_t(\bar{\alpha}_t, \mathbf{X}_t; \bar{\mathbf{r}}_t) \right)$$

with η the modification of η_4 in (9). Later, one can observe that it is to maximize $\left[\sum_{t=1}^H \left(\log \det(\mathbf{X}_t) - (\bar{\mathbf{r}}_t - \bar{\alpha}_t \bar{\mathbf{p}})^\dagger \mathbf{X}_t (\bar{\mathbf{r}}_t - \bar{\alpha}_t \bar{\mathbf{p}}) \right) \right]$ with respect to $\bar{\alpha}_1, \dots, \bar{\alpha}_H \in \mathbb{C}$, and $\mathbf{X}_1, \dots, \mathbf{X}_H \in \Omega_1^{\epsilon_t}$, ($\|\bar{\mathbf{r}}_t\|^2$ are constant values). Constraint and objective functions are separable functions of \mathbf{X}_t , thus one can obtain the optimal solution by solving the optimization problem as the following.

$$\mathcal{P}_{\mathbf{y}_t} \begin{cases} \max_{\mathbf{X}_t} \log \det(\mathbf{X}_t) - \mathbf{y}_t^\dagger \mathbf{X}_t \mathbf{y}_t \\ \text{s.t. } \mathbf{X}_t \in \Omega_1^{\epsilon_t} \end{cases}, t = 1, \dots, H \quad (10)$$

where $\mathbf{y}_t \in \mathbb{C}^N$ is an N -dimensional complex vector and it stands for $(\bar{\mathbf{r}}_t - \bar{\alpha}_t \bar{\mathbf{p}})$.

Thus, based on Proposition III.1 in (Aubry et al, 2015), the decision test denoted as $t_{\text{T-AMF}}(\epsilon)$ in equation (10) can be expressed as following:

$$t_{\text{T-AMF}}(\epsilon) = \sum_{t=1}^H f_{\epsilon_t}(\gamma_t) + \sum_{t=1}^H \gamma_t^o \underset{H_0}{\overset{H_1}{\geq}} \eta \quad (11)$$

where

$$f_{\epsilon_t}(\gamma_t) = \log(\lambda_t^*) - \lambda_t^* \gamma_t + (N-1) \log(1 + \epsilon_t),$$

and $\gamma_t^o = \|\bar{\mathbf{r}}_t\|^2$ and $\gamma_t = \|\bar{\mathbf{r}}_t\|^2 - |\bar{\mathbf{p}}^\dagger \bar{\mathbf{r}}_t|^2$.

In this context, every λ_t^* , where $t = 1, \dots, H$, represents a distinct and optimal solution to a strictly concave optimization problem stated as follows:

$$\mathcal{P}_{\lambda_t} \begin{cases} \max_{\lambda_t} \log(\lambda_t) - \lambda_t \gamma_t \\ \text{s.t. } \|\lambda_t - 1\| \leq \epsilon_t \lambda_t \geq 0 \end{cases}, t = 1, \dots, H \quad (12)$$

Thus, the optimal solution for each optimization problem $\mathcal{P}_{\mathbf{y}_t}$ is obtained through

1) $0 \leq \epsilon < 1$.

$$\lambda_t^* = \begin{cases} 1 + \epsilon_t & \text{if } \gamma_t \leq \frac{1}{1 + \epsilon_t} \\ \frac{1}{\gamma_t} & \text{if } \frac{1}{1 + \epsilon_t} < \gamma_t \leq \frac{1}{1 - \epsilon_t} \\ 1 - \epsilon_t & \text{if } \gamma_t > \frac{1}{1 - \epsilon_t} \end{cases} \quad (13)$$

2) $\epsilon \geq 1$.

$$\lambda_t^* = \begin{cases} 1 + \epsilon_t & \text{if } \gamma_t \leq \frac{1}{1 + \epsilon_t} \\ \frac{1}{\gamma_t} & \text{if } \gamma_t > \frac{1}{1 + \epsilon_t} \end{cases}$$

Finally, the algorithm for computing decision statistics of the devised T-AMF for the extended target model is given as the following.

Algorithm 1 : T-AMF1 decision statistic computation for extended target model.

Input: $r_1, \dots, r_L, S, \epsilon_1, \dots, \epsilon_L$.

Output: the decision test $t_{\text{T-AMF1}}(\epsilon)$.

```

1: set  $t_{\text{T-AMF1}}(\epsilon) = 0$ 
2: for  $t=1:L$  do
3:   compute  $\bar{r}_t = S^{-1/2}r_t$ ,  $\bar{p} = \frac{S^{-1/2}p}{\|S^{-1/2}p\|}$ ,  $\gamma_t^o = \|\bar{r}_t\|^2$  and  $\bar{\gamma}_t = \|\bar{r}_t\|^2 - |\bar{p}^\dagger \bar{r}_t|^2$ .
4:   if  $0 \leq \epsilon_t < 1$  then
5:     case  $\bar{\gamma}_t \leq \frac{1}{1+\epsilon_t}$  :
6:        $f_{\epsilon_t}(\bar{\gamma}_t) = N \log(1 + \epsilon_t) - \bar{\gamma}_t(1 + \epsilon_t)$ 
7:     case  $\frac{1}{1+\epsilon_t} < \bar{\gamma}_t \leq \frac{1}{1-\epsilon_t}$  :
8:        $f_{\epsilon_t}(\bar{\gamma}_t) = -\log(\bar{\gamma}_t) - 1 + (N - 1) \log(1 + \epsilon_t)$ 
9:     case  $\bar{\gamma}_t > \frac{1}{1-\epsilon_t}$  :
10:       $f_{\epsilon_t}(\bar{\gamma}_t) = \log(1 - \epsilon_t) - \bar{\gamma}_t(1 - \epsilon_t) + (N - 1) \log(1 + \epsilon_t)$ 
11:   else
12:     case  $\bar{\gamma}_t \leq \frac{1}{1+\epsilon_t}$  :
13:        $f_{\epsilon_t}(\bar{\gamma}_t) = N \log(1 + \epsilon_t) - \bar{\gamma}_t(1 + \epsilon_t)$ 
14:     case  $\bar{\gamma}_t > \frac{1}{1+\epsilon_t}$  :
15:        $f_{\epsilon_t}(\bar{\gamma}_t) = -\log(\bar{\gamma}_t) - 1 + (N - 1) \log(1 + \epsilon_t)$ 
16:   end
17:   compute  $t_{\text{T-AMF1}}(\epsilon) = t_{\text{T-AMF1}}(\epsilon) + \gamma_t^o + f_{\epsilon_t}(\bar{\gamma}_t)$ 
18: end for
19: output  $t_{\text{T-AMF1}}(\epsilon)$ 

```

RESULTS AND DISCUSSION

In this section, the author evaluates the performance of a detector that has been developed by measuring its probability of detection P_d at a predetermined false alarm rate P_{fa} . To compare the performance of the developed detector with existing ones, extended versions of Kelly's receiver and the AMF, as shown in equations (2) and (3), respectively, are also evaluated.

Conventional Monte Carlo simulation methods are utilized to obtain the performance metrics. The false alarm rate P_{fa} is set to a nominal value of 10^{-4} to facilitate the computational process. To ensure that the assigned false alarm rate is achieved, the threshold value is determined through $100/P_{fa}$

independent trials. Furthermore, each value of P_d is estimated through 10^4 independent realizations of the decision statistics. The performance analysis simulations are carried out for $N = 16$ space channels, $K = 32$ secondary data, and $H = 10$ range cells.

In order to simulate the multipath environment, the author assumes $N_{ML} = 4$ mainlobe and $N_{SL} = 4$ sidelobe scatterers from glistening surface points for each range cell. The directions of arrival for both main lobe and side lobe scatterers are modeled as uniformly distributed independent random variables within the ranges of $[-2, 2]$ and $[8.5, 11.5]$ degrees, respectively. The complex amplitudes of the reflected multipaths, denoted as α_i for $i = 1, \dots, N_{ML} + N_{SL}$, are modeled as dependent on the useful signal power with a factor of path loss L associated with multipath.

$$\alpha_i = \alpha \frac{x_i}{\sqrt{L}}, \quad i = 1, \dots, N_{ML} + N_{SL} \quad (16)$$

In this context, the random variable x_i is an independent, circularly symmetric complex normal distribution with zero mean and a unit variance. The factor L , which is associated with the multipath, represents the path loss and is measured in decibels. In summary, the formulation of the primary data covariance matrix can be expressed as follows.

$$\mathbf{M}_t = \sigma_c^2 \overline{\mathbf{M}} + \sigma_n^2 \mathbf{I} + \boldsymbol{\Sigma}_t(\alpha_t, L), \quad (17)$$

where $t = 1, \dots, H$ and the entry located at row n and column m of $\overline{\mathbf{M}}$ is (Barbarossa et al, 1994)

$$\overline{\mathbf{M}}(n, m) = e^{-(n-m)^2/(2\sigma_d^2)} \quad (18)$$

Here, the parameters $\sigma_d = 0.995$, $\sigma_n^2 > 0$, and $\sigma_c^2 > 0$ are defined as follows: σ_d represents the one-lag correlation coefficient, σ_n^2 denotes the thermal noise power, and σ_c^2 is the clutter power. Moreover, the covariance matrix is defined as the following.

$$\boldsymbol{\Sigma}_t(\alpha_t, L) = \sum_{i=1}^{N_{ML}+N_{SL}} \frac{|\alpha_i|^2}{L} v(\theta_i) v(\theta_i)^\dagger \quad (19)$$

where θ_i , for $i = 1, \dots, N_{ML} + N_{SL}$, are the angles of arrival from the glistening surface, and they are defined as the following.

$$v(\theta_i) = \frac{1}{\sqrt{N}} \left[1, e^{j2\pi \frac{d}{\lambda} \sin(\theta_i)}, \dots, e^{j2\pi(N-1) \frac{d}{\lambda} \sin(\theta_i)} \right]^T \quad (20)$$

It is important to underscore that when considering the H_0 hypothesis, where $\alpha_i = 0$ for $i = 1, 2, \dots, N_{ML} + N_{SL}$, the multipath returns as described in (19) are absent. In addition, the Signal-to-Interference-Plus-Noise Ratio (SINR) can be defined as follows.

$$\text{JSINR} = |\alpha|^2 \mathbf{p}^\dagger \mathbf{M}^{-1} \mathbf{p} \quad (21)$$

Figure 1 depicts a scenario where there is an absence of multipath, and it showcases the probability of detection plot, P_d versus the Signal-to-Interference-Plus-Noise Ratio (SINR), where the loss parameter L equals 40 dB, and the parameter ϵ is equal to 0. The results from the figure validate the effectiveness and accuracy of the devised detector, as it matches the performance of the AMF in the

absence of multipath and when ϵ is equal to 0. This verification is essential in establishing the reliability of the devised detector.

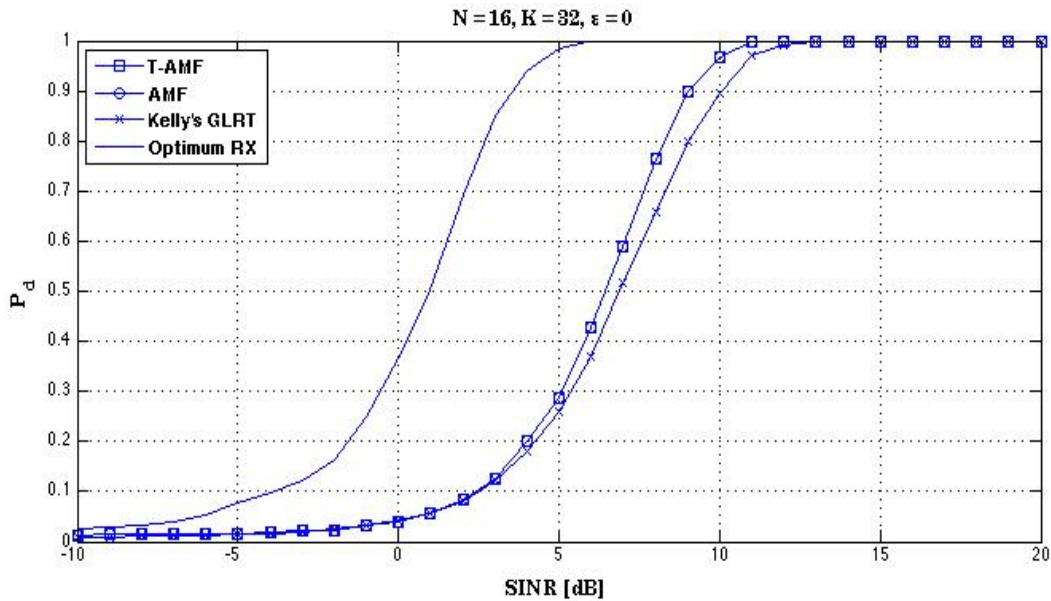


Figure 1. P_d versus SINR for the extended T-AMF, the extended AMF and the extended version of Kelly's receiver; $N = 16$, $K = 32$, $H = 10$, $P_{fa} = 10^{-2}$, $\epsilon = 0$, and $L = 40$ dB.

In Figure 2, the absence of multipath is assumed, and the probability of detection plot, P_d versus the Signal-to-Interference-Plus-Noise Ratio (SINR), is presented for a loss parameter L equal to 40 dB, while the parameter ϵ is equal to 0.75. The results from the figure indicate that when the value of ϵ is high, such as 0.75, the detection performance of the extended T-AMF is inferior to that of the AMF and Kelly's GLRT. This outcome is not unexpected since the sample data covariance matrix \mathbf{M} is expected to be similar to the actual primary data covariance matrix \mathbf{S} when there is no multipath (i.e., $\mathbf{M} \simeq \mathbf{S}$). Higher values of ϵ imply a higher probability of mismatch between the sample data covariance matrix and the actual primary data covariance matrix, which leads to inferior detection performance.

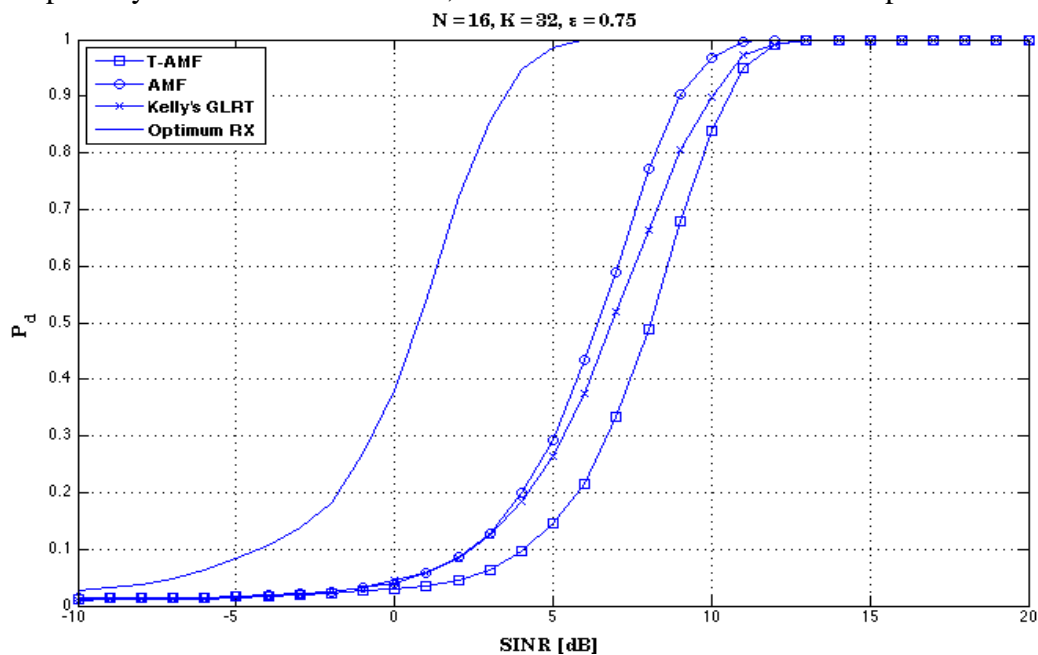


Figure 2. P_d versus SINR for the extended T-AMF, the extended AMF and the extended version of Kelly's receiver; $N = 16$, $K = 32$, $H = 10$, $P_{fa} = 10^{-2}$, $\epsilon = 0.75$, and $L = 40$ dB.

Figure 3 explores a scenario where there is a significant multipath effect, with a loss parameter L of 20 dB. In this scenario, Kelly's GLRT experiences severe performance degradation due to its strong selectivity. On the other hand, the AMF exhibits better detection performance in a multipath environment than Kelly's receiver, but it still has a notable performance loss compared to the extended T-AMF. For this particular scenario, the parameter ϵ is chosen as 0.75, allowing the extended T-AMF to exploit the multipath environment and achieve better performance.

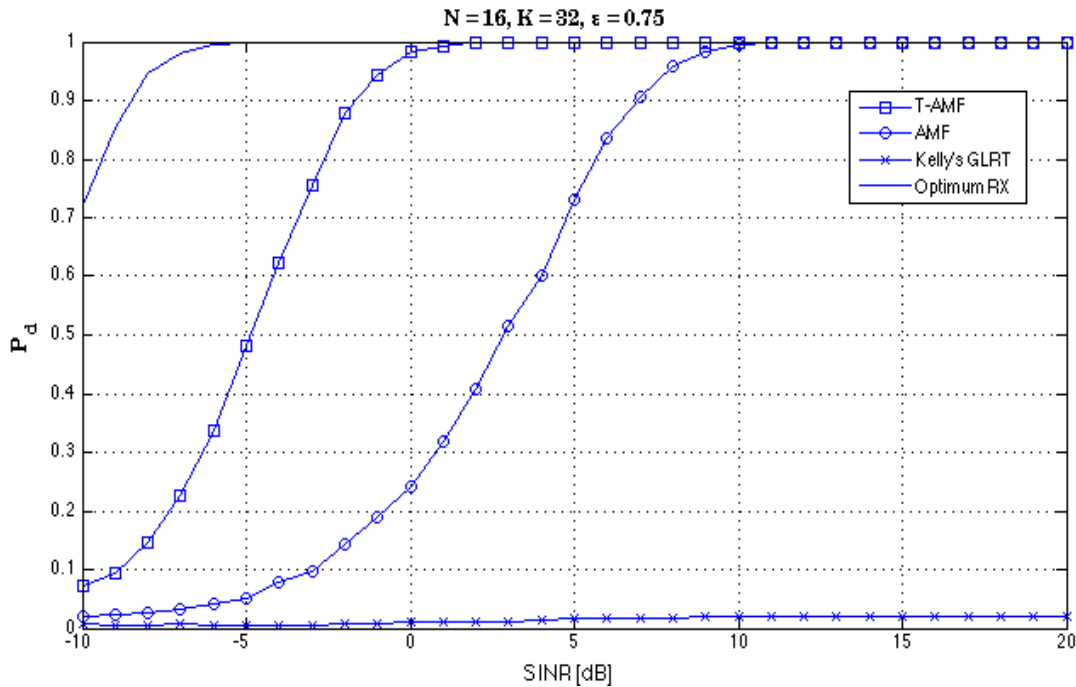


Figure 3. P_d versus SINR for the extended T-AMF, the extended AMF and the extended version of Kelly's receiver; $N = 16$, $K = 32$, $H = 10$, $P_{fa} = 10^{-2}$, $\epsilon = 0.75$, and $L = 20$ dB.

CONCLUSION

The paper discusses the adaptive detection of extended targets in a clutter rich environment with diffuse multipath. The author models the target return signal from each range cell as a combination of a deterministic signal and a Gaussian-distributed random vector, with the deterministic data vector representing the direct path component and the random data vector representing multipath echoes. For the respective hypothesis testing, the author implements a constraint GLRT in Section II, assuming that the primary data covariance matrix of each range bin is within a certain vicinity of a sample covariance matrix that is devised from the secondary data set. The similarity between primary covariance and sample covariance matrix of the secondary data is set by an adjustable parameter, which depends on the power of multipath components. Thus, the mismatch between the sample data covariance matrix and the actual primary data covariance matrix is adjustable. The performance analysis demonstrates that the devised extended T-AMF performs better than the extended versions of conventional adaptive receivers in diffuse multipath environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wants to thank Dr. Antonio De Maio and Dr. Augusto Aubry of DIETI University of Naples "Federico II", Italy for their constant interest and valuable advice in this article.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

REFERENCES

- A. D. Pamela and O. W. David, "Performance analysis of the incoherent and skewness matched filter detectors in multipath environments," *IEEE J. Ocean. Eng.*, vol. 20, no. 1, pp. 80–84, Jan. 1995.
- M. A. Richards, J. A. Scheer and W. A. Holm, *Principles of Modern Radar Volume I: Basic Principles*, Edison, NJ, USA:SciTech, 2010.
- Fertig, L.B.; Baden, M.J.; Kerce, J.C.; Sobota, D. "Localization and tracking with Multipath Exploitation Radar", In *Proceedings of the 2012 IEEE Radar Conference*, Atlanta, GA, USA, 7–11 May 2012; pp. 1014–1018.
- K. Gerlach and M. J. Steiner, "Adaptive detection of range distributed targets," *IEEE Trans. Signal Process.*, vol. 47, no. 7, pp. 1844–1851, Jul. 1999.
- R. L. Fante, "Cancellation of specular and diffuse jammer multipath using a hybrid adaptive array", *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.*, vol. 27, no. 5, pp. 823-837, 1991.
- R. L. Fante and J. A. Torres, "Cancellation of diffuse jammer multipath by an airborne adaptive radar", *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.*, vol. 31, no. 2, pp. 805-820, 1995.
- A. Aubry, J. Carretero-Moya, A. De Maio, A. Pauciullo, J. Gismero-Menoyo, and A. Asensio-Lopez, "Detection of Extended Target in Compound-Gaussian Clutter," in *Modern Radar Detection Theory*, IET A. De Maio and M. S. Greco, Eds., number chapter 9, pp. 333–374. Scitech Publishing, 2016.
- M. Tang, Y. Rong, J. Zhou, and X. R. Li, "Invariant adaptive detection of range-spread targets under structured noise covariance," *IEEE Trans. Signal Process.*, vol. 65, no. 12, pp. 3048–3061, Jun. 2017.
- C. G. Bachman, "Some recent developments in RCS measurement techniques", *Proc. IEEE*, Vol. 53, No. 8, pp. 208-216, 1965.
- E. Conte, A. De Maio and G. Ricci, "GLRT-based adaptive detection algorithms for range-spread targets", *IEEE Trans. Signal Process.*, Vol. 49, No. 7, pp. 1336-1348, 2001.
- E. Conte, A. De Maio and G. Ricci, "CFAR detection of distributed targets in non-Gaussian disturbance", *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Sys.*, Vol. 38, No. 2, pp. 612-621, 2001.
- A. Aubry, A. De Maio, L. Pallotta and A. Farina, "Radar detection of distributed targets in homogeneous interference whose inverse covariance structure is defined via unitary invariant functions", *IEEE Trans. Signal Process.*, Vol. 61, No. 20, pp. 949-9618, 2013.
- Hayvaci, H.T.; De Maio, A.; Erricolo, D. Improved detection probability of a radar target in the presence of multipath with prior knowledge of the environment. *IET Radar Sonar Navig.* 2013, 7, 36–46.
- Kumbul, U.; Hayvaci, H.T. Multipath exploitation for knowledge-aided adaptive target detection. *IET Radar Sonar Navig.* 2019, 13, 863–870.
- Yilmaz, S.H.G.; Zarro, C.; Hayvaci, H.T.; Ullo, S.L. Adaptive waveform design with multipath exploitation radar in heterogeneous environments. *Remote Sens.* 2021, 13, 1628.
- S. Kraut, L. L. Scharf and L. T. McWhorter. "Adaptive subspace detectors", *IEEE Trans. Signal Process.* Vol. 49, No. 1, pp. 1-16, 2001.
- F. Bandiera, A. De Maio, A.S. Greco and G. Ricci, "Adaptive radar detection of distributed targets in homogeneous and partially homogeneous noise plus subspace interference", *IEEE Trans. Signal Process.*, Vol. 55, No. 4, pp. 1223-1237, 2007.
- R. L. Fante, "Cancellation of specular and diffuse jammer multipath using a hybrid adaptive array", *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.*, vol. 27, no. 5, pp. 823-837, 1991.
- A. Aubry, A. De Maio, G. Foglia and D. Orlando, "Diffuse multipath exploitation for adaptive radar detection", *IEEE Trans. Signal Process.*, Vol. 63, No. 5, pp. 1268-1281, 2015.
- E. J. Kelly, "An adaptive detection algorithm", *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.*, vol. 22, no. 1, pp. 115-127, 1986.
- F. C. Robey, D. R. Fuhrmann, E. J. Kelly, R. Nitzberg, "A CFAR adaptive matched filter detector", *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.*, vol. 28, no. 1, pp. 208-216, 1992.
- S. Barbarossa and A. Farina, "Space-Time-Frequency Processing of Synthetic Aperture Radar Signals", *IEEE Trans. on Aerospace and Electronic Systems*, vol. 30, no. 2, pp. 341-358, 1994.

Atf İçin: Zilayaz, H.A. ve Köklü, H. (2023). Legendre ve Chebyshev Polinomları Çözümü ile Radyasyon Transfer Denkleminin Kesikli Özdeğerleri. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2594-2603.

To Cite: Zilayaz, H.A. & Köklü H. (2023). Discrete Eigenvalues of The Radiative Transfer Equation with Legendre and Chebyshev Polynomials Solution. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2594-2603.

Legendre ve Chebyshev Polinomları Çözümü ile Radyasyon Transfer Denkleminin Kesikli Özdeğerleri

Hatice Asel ZİLAYAZ¹, Halide KÖKLÜ²

Öne Çıkanlar:

- İntegro-Diferansiyel Denklemler Sistemi
- İzotropik Saçılma
- Küresel Harmonik Metodu

Anahtar Kelimeler:

- Özdeğer Problemi
- Işınım Transfer Denklemleri
- Chebyshev Polinomları

ÖZET:

Işınım transfer denklemi, homojen ortamda izotropik saçılmalı, sonlu plaka sistemi için ele alınmıştır. Legendre ve Chebyshev polinomları, çeşitli tekil saçılma albedolarıyla sistemin kesikli özdeğerlerini belirlemek üzere ışınım transfer denklemini çözmekte kullanılmıştır. Sayısal sonuçlar, P_N ve T_N yöntemlerinin yüksek seviye tekrarlamaya basamakları için gerçekleştirilmiştir. Sayısal değerler tabloleştirilmiş ve önceki çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımızın önceki çalışmalarla çok iyi uyum içinde olduğu gösterilmiştir.

Discrete Eigenvalues of the Radiative Transfer Equation with Legendre and Chebyshev Polynomials Solutions

Highlights:

- Integro-Differential Equation System
- Isotropic scattering
- Spherical Harmonics Method

Keywords:

- Eigenvalue Problem
- Radiative Transfer
- Chebyshev Polynomials

ABSTRACT:

The radiation transfer equation has been considered for finite slab with isotropic scattering in homogeneous medium. The Legendre and Chebyshev polynomials are used to solve the radiative transfer equation to determine the discrete eigenvalues of the system for various single scattering albedo. The numerical results are performed for high level iterations of the P_N and T_N methods. The numerical values are tabulated and compared with the previous works. It is shown that our results are in very good agreement with previous studies.

¹ Hatice Asel ZİLAYAZ ([Orcid ID: 0009-0002-1899-0068](https://orcid.org/0009-0002-1899-0068)), Halide KÖKLÜ ([Orcid ID: 0000-0003-1787-6693](https://orcid.org/0000-0003-1787-6693)). İğdır Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İğdir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Halide KÖKLÜ, e-mail: halide.koklu@igdir.edu.tr

Bu çalışma Hatice Asel ZİLAYAZ'ın Yüksek Lisans tez çalışmasından üretilmiştir.

INTRODUCTION

Radiative transfer theory has wide applications in astrophysics, atmospheric optics, marine science and biomedical optics. Radiative transfer theory is very important in describing and understanding the processes related to radiation in the universe. The radiative transfer equation is an integro-differential equation that describes the variation of the number of photons in a certain volume in a medium with time, taking into account the behaviour of photons in a medium such as scattering, absorption, and re-emission as a result of interaction in the medium (Liemert and Kienle, 2011). The radiative transfer equation is a fundamental tool in astrophysics, having been developed over approximately one hundred years. (Milne, 1921; Chandrasekhar, 1934; Kosirev, 1934). The solution of the Radiative transfer equation from the family of integral differential equations is difficult. The solutions are made with special polynomials such as Legendre, Lagrange, Bessel, Chebyshev, and Hermit. In Yılmaz, A. and Kocar, C., (2009), numerical convergence of spectral polynomial approximations to the radiation transfer equation in spherical environments is demonstrated. The T_N method was used as a representative of classical polynomial approaches to the corresponding pseudo-slab problem of the spherical medium radiated transfer equation. Macchali H. M., Haggag M.H. and Al-Gorashi A. K., (2013) investigated the integral form of the radiation transfer equation in a planar plate with isotropic scattering by using the Chebyshev polynomial approach. He made the numerical calculations for the transmittance and reflectivity of the plates with various values of the single scattering albedo. Arnold (2002) studied Chebyshev spectral effects to examine radiative transmission problems. The solutions of the time dependent radiative transfer equations are performed by Chebyshev spectral methods. By expanding the Chebyshev polynomials, the spatial dependence of the density could be calculated approximately. A unified system of complete differential equations was obtained for the expansion coefficients with respect to angle and time. Legendre polynomials method called P_N and Chebyshev polynomials method called T_N method are used to solve the radiative transfer equation for the plane geometrical system for isotropic scattering case. The calculations are made for many single scattering albedo numbers.

MATERIALS AND METHODS

P_N Solution of the Theory

The time-independent radiative transfer equation for isotropically scattering slab is can be written as (Pomraning 1970);

$$\mu \frac{\partial I(x, \mu)}{\partial x} + I(x, \mu) = \frac{\omega}{2} \int_{-1}^1 I(x, \mu') d\mu' \tag{1}$$

where $I(x, \mu)$ is the angular intensity μ is the cosine angle of the scattering direction, x is the optical variable, ω is the single scattering albedo. To obtain the eigenvalues for the various orders of P_N approximations, the specific intensity $I(x, \mu)$ is demonstrated a full set of spherical harmonics (Case and Zweifel 1967; Pomraning 1973; Duderstadt and Martin 1979), in the one-dimensional case to a full set of Legendre polynomials:

$$I(x, \mu) = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{2n+1}{2} \phi_n(x) P_n(\mu) \tag{2}$$

Legendre moments of the flux are given by

$$\phi_n(x) = \int_{-1}^1 P_n(\mu) I(x, \mu) d\mu \tag{3}$$

when Eqn. (2) is put into radiative transfer equation given in Eqn. (1)

$$\mu \frac{d}{dx} \left(\sum_{n=0}^{\infty} \frac{2n+1}{2} \phi_n(x) P_n(\mu) \right) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{2n+1}{2} \phi_n(x) P_n(\mu) = \frac{\omega}{2} \int_{-1}^1 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{2n+1}{2} \phi_n(x) P_n(\mu') d\mu' \tag{4}$$

The recursion relation (Stacey, 2007)

$$\mu P_n(\mu) = \frac{1}{2n+1} [(n+1)P_{n+1}(\mu) + nP_{n-1}(\mu)] \tag{5}$$

and the orthogonality of the Legendre polynomials;

$$\int_{-1}^1 P_n(x) P_m(x) dx = \begin{cases} 0 & \text{if } m \neq n \\ \frac{2}{2n+1} & \text{if } m = n \end{cases} \tag{6}$$

are applied to Equation (4). After some algebra, one can obtain

$$n \frac{d}{dx} \phi_{n-1}(x) + (n+1) \frac{d}{dx} \phi_{n+1}(x) + (2n+1) \phi_n(x) = \omega \phi_0(x) \delta_{n,0}$$

$$n = 0, 1, 2, 3 \dots \tag{7}$$

The eigen-spectrum of the Eq. (1) is obtained by employing the well-known ansatz for the solution of the form (Davison & Sykes, 1957),

$$\phi_n(x) = A_n(v) e^{x/v} \tag{8}$$

where $A_n(v)$ is the eigenfunctions and v is the eigenvalues of $A_n(v)$ function. The Eqn. (8) is substituted into general form of differential set of the angular moment into Eqn. (7) so a system of equations is obtained for the analytic expressions of $A_n(v)$; $A_0(v) = 1$. $A_{n+1} = 0$ relation enables to compute the discrete eigenvalues (Köklü and Özer, 2021). After all of these processes, the eigenvalues become straightforward. The eigenfunctions are obtained for $n=0$ and 1 in Eqn. (9 and 10);

$$A_1(v) = v A_0(v) (\omega - 1) \tag{9}$$

$$A_2(v) = \frac{-A_0(v) - 3v A_1(v)}{2} \tag{10}$$

Here $A_0(v)=1$ and $A_2(v)$ is assumed as zero and therefore the eigenvalues can be found as

$$v = \pm \frac{1}{\sqrt{3(1-w)}} \tag{11}$$

The other eigenvalues can be computed by applying the same procedure. The general form of the eigenfunctions may be written by inserting Eq. (8) into Eq. (7),

$$n A_{n-1}(v) + (n+1) A_{n+1}(v) + (2n+1)v A_n(v) = v A_0(v) \delta_{n,0} \tag{12}$$

As shown in Equation (11), the analytical solution of the $A_n(v)$ gives the discrete eigenvalues v by solving $A_{n+1}(v) = 0$ for any single scattering albedo w . Here, it has $(N+1)/2$ eigenvalues v , $k = 1, 2, 3, \dots, N + 1$ roots are used to find the flux moment.

T_N Solution of the Theory

The angular intensity function can be written in the following expression for the first type of Chebyshev polynomial method that is T_N method It is first used by Anlı, F. Yaşa, F. Güngör, S. et al. (2006).

$$I(r, \mu) = \frac{\phi_0(r)T_0(\mu)}{\pi\sqrt{1-\mu^2}} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^N \frac{\phi_n(r)T_n(\mu)}{\sqrt{1-\mu^2}} \quad (13)$$

where $\phi_n(r)$ is called as the Chebyshev moment and $T_n(\mu)$ is the term of the Chebyshev polynomial of first type. Equation (13) is substituted in Equation (1). When the equation has been solved the recurrence and the orthogonality relations are used, and then, m^{th} order Chebyshev polynomial is applied and integrated over $[-1, 1]$ to both sides of the resultant equation to determine the infinite set of ordinary differential equations as follows,

$$\frac{d}{dr} \phi_{n-1}(r) + \frac{d}{dr} \phi_{n+1}(r) + 2\phi_n(r) = \omega \phi_n(r) \delta_{n0}. \quad (14)$$

Eigen-spectrum of the radiative transfer equation for Chebyshev polynomial is obtained by seeking a solution of the form as (Yilmazer and Kocar, 2009);

$$\phi_n(r) = A_n(v) e^{r/v} \quad (15)$$

The series expression of $A_n(v)$ is found by substituting into Eq. (15) into Eqn. (14). The eigenvalue for $A_2(v) = 0$ is computed as

$$v = \pm \frac{1}{\sqrt{(4-2w)}} \quad (16)$$

The eigenvalues of the higher order iterations of the solution method are found by calculating the well-known assumption as $A_{n+1}(v) = 0$

RESULTS AND DISCUSSION

The radiative transfer equation is solved to obtain the discrete eigenvalues for various single scattering albedos by using the Legendre and first-type Chebyshev polynomials methods. The solutions are done up to the 13th iteration in order to observe the convergence in the results. The accuracy in the last iteration is acceptable for code verification. The single scattering albedo values are chosen from zero to two which are commonly used intervals in literature. The wide range of eigenvalues spectrum with two methods are tabulated in the tables. Wolfram Mathematica Program is used for the calculations. In Table 1, the numerical values of the discrete eigenvalues obtained from the solution of the Radiative Transfer equation with the Legendre polynomial are presented with all iteration steps. Table 2 is organized for the first type of Chebyshev polynomial method. The same iteration steps are applied for the solution of the radiative transfer equation with the same single scattering albedo numbers. As it is figured out that the radiative transfer equation solutions to calculate the discrete eigenvalues are rarely studied among researchers. Even so, in Table 3, our solutions with P_N and T_N methods are compared with the literature Taşdelen, N. (2017) and good agreement in the results is obtained.

In this paper, it is shown that the solution of the radiative transfer equation can be done with the Chebyshev polynomial of the first type. It means that the presented study can be rearranged for different problems in the radiative transfer equation for the future work. Radiative transfer equation attracts the attention of researchers working in both physics and mathematics. It is a structure of equations suitable for usage in many areas of physics. However, results can only be obtained with special solution methods. For this reason, our study is convenient in terms of approaching the radiative transfer equation differently. It is pleasing to note that the results of the Chebyshev method are in agreement with the P_N method in the literature.

Table 1: Discrete eigenvalues with P_N method for various single scattering albedo ω

ω	P_1	P_3	P_5	P_7	P_9	P_{11}	P_{13}
0.00	0.577350	0.339981	0.238619	0.183434	0.148874	0.125233	0.108054
		0.861136	0.661209	0.525532	0.433395	0.367831	0.319112
			0.932469	0.796666	0.679409	0.587317	0.515248
				0.960289	0.865063	0.769902	0.687292
					0.973906	0.904117	0.827201
						0.981560	0.928434
							0.986283
0.25	0.666666	0.370920	0.253620	0.192206	0.154610	0.129271	0.111049
		0.911411	0.696158	0.548404	0.449131	0.379216	0.327695
			0.962178	0.824300	0.701000	0.603953	0.528253
				0.980110	0.886464	0.788603	0.702900
					0.988275	0.921011	0.843117
						0.992594	0.942094
							0.995116
0.50	0.816496	0.409381	0.270885	0.201936	0.160837	0.133594	0.114223
		1.011376	0.740949	0.575296	0.466855	0.391716	0.336963
			1.036621	0.861400	0.727348	0.623233	0.542854
				1.042230	0.916237	0.812275	0.721556
					1.043745	0.945021	0.863918
						1.044189	0.961671
							1.044323
0.75	1.154700	0.455944	0.290519	0.212656	0.167568	0.138206	0.117579
		1.284234	0.785622	0.603418	0.485462	0.404806	0.346631
			1.289198	0.891430	0.752448	0.642384	0.557581
				1.289449	0.935828	0.832698	0.739002
					1.289462	0.958037	0.880136
						1.289463	0.970573
							1.289463
1.01	5.773502	5.750541	5.750539	5.750539	5.750539	5.750539	5.750539
		0.509117	0.313111	0.224794	0.175087	0.143306	0.121260
			0.817092	0.629102	0.503853	0.418174	0.356664
				0.906866	0.771095	0.658808	0.571149
					0.944113	0.845546	0.752162
						0.962924	0.889087
							0.973685
1.10	1.825741	1.757034	1.756653	1.756651	1.756651	1.756651	1.756651
		0.526921	0.321269	0.229197	0.177803	0.145139	0.122578
			0.824371	0.636523	0.509655	0.422571	0.360037
				0.910017	0.775761	0.663407	0.575208
					0.945733	0.848495	0.755538
						0.963865	0.891037
							0.974282
1.20	1.290994	1.200164	1.198298	1.198265	1.198265	1.198265	1.198265
		0.545469	0.330410	0.234184	0.180883	0.147216	0.124068
			0.830893	0.643836	0.515668	0.427253	0.363687
				0.912764	0.780103	0.667900	0.579309
					0.947136	0.851167	0.758721
						0.964680	0.892779
							0.974799
1.30	1.054092	0.950538	0.946161	0.946005	0.946000	0.946000	0.946000
		0.562336	0.339525	0.239247	0.184020	0.149331	0.125585
			0.836143	0.650229	0.521198	0.431691	0.367209
				0.914937	0.783720	0.671808	0.582994
					0.948243	0.853347	0.761407
						0.965324	0.894187
							0.975209

Continuation Table 1: Discrete eigenvalues with P_N method for various single scattering albedo ω

1.40	0.912870	0.801783	0.794225	0.793793	0.793769	0.793768	0.793768
		0.577350	0.348504	0.244358	0.187206	0.151481	0.127125
			0.840421	0.655798	0.526244	0.435864	0.370587
				0.916692	0.786756	0.675205	0.586290
					0.949136	0.855151	0.763686
						0.965844	0.895343
							0.975541
1.50	0.816496	0.701130	0.690105	0.689205	0.689136	0.689130	0.689130
		0.590531	0.357238	0.249488	0.190431	0.153662	0.128689
			0.843956	0.660647	0.530823	0.439764	0.373806
				0.918135	0.789325	0.678164	0.589234
					0.949871	0.856661	0.765634
						0.966273	0.896308
							0.975815
1.60	0.745355	0.627830	0.613356	0.611794	0.611637	0.611621	0.611619
		0.602017	0.365637	0.254601	0.193685	0.155871	0.130274
			0.846913	0.664877	0.534966	0.443390	0.376859
				0.919339	0.791520	0.680750	0.591863
					0.950486	0.857942	0.767312
						0.966632	0.897123
							0.976045
1.70	0.690065	0.571775	0.554073	0.551676	0.551377	0.551340	0.551335
		0.612001	0.373629	0.259665	0.196955	0.158103	0.131878
			0.849418	0.668581	0.538707	0.446748	0.379741
				0.920359	0.793410	0.683021	0.594213
					0.951008	0.859039	0.768768
						0.966938	0.897820
							0.976240
1.80	0.645497	0.527361	0.506762	0.503398	0.502894	0.502821	0.502810
		0.620687	0.381164	0.264647	0.200228	0.160353	0.133499
			0.851562	0.671838	0.542085	0.449850	0.382453
				0.921233	0.795051	0.685023	0.596318
					0.951455	0.859989	0.770039
						0.967200	0.898422
							0.976409
1.90	0.608580	0.491203	0.468080	0.463664	0.462891	0.462761	0.462739
		0.628267	0.388218	0.269517	0.203492	0.162615	0.135134
			0.853416	0.674715	0.545138	0.452711	0.384998
				0.921990	0.796488	0.686798	0.598208
					0.951843	0.860817	0.771159
						0.967428	0.898947
							0.976555
2.00	0.577350	0.461121	0.435850	0.430341	0.429239	0.429027	0.428987
		0.634908	0.394783	0.274249	0.206732	0.164882	0.136781
			0.855033	0.677270	0.547900	0.455348	0.387381
				0.922651	0.797755	0.688379	0.599911
					0.952183	0.861546	0.772150
						0.967628	0.899409
							0.976684

Table 2: Discrete eigenvalues with T_N method for various single scattering albedo ω

ω	T_1	T_3	T_5	T_7	T_9	T_{11}	T_{13}
0.00	0.707106	0.382683	0.258819	0.195090	0.156434	0.130526	0.111964
		0.923879	0.707106	0.555570	0.453990	0.382683	0.330279
			0.965925	0.831469	0.707106	0.608761	0.532032
				0.980785	0.891006	0.793353	0.707106
					0.987688	0.923879	0.846724
						0.991444	0.943883
							0.993712
0.25	0.816496	0.422799	0.276446	0.205056	0.162771	0.134920	0.115181
		0.965583	0.747351	0.580801	0.471292	0.394972	0.339482
			0.988005	0.861412	0.730013	0.626614	0.545822
				0.994837	0.913403	0.812691	0.723561
					0.997634	0.941182	0.862893
						0.998983	0.957672
							0.999704
0.50	1.000000	0.475087	0.296994	0.216200	0.169682	0.139639	0.118598
		1.052437	0.801739	0.610901	0.490965	0.408537	0.349458
			1.049924	0.903794	0.758457	0.647542	0.561409
				1.047160	0.945955	0.837641	0.743482
					1.045659	0.966471	0.884434
						1.044945	0.977614
							1.044626
0.75	1.414213	0.541196	0.320605	0.228565	0.177181	0.144690	0.122218
		1.306562	0.853795	0.642212	0.511632	0.422750	0.359877
			1.291605	0.933760	0.785001	0.668189	0.577087
				1.289733	0.963223	0.858411	0.761843
					1.289500	0.976866	0.900417
						1.289469	0.984197
							1.289464
1.01	7.071067	5.748472	5.750546	5.750539	5.750539	5.750539	5.750539
		0.615038	0.347816	0.242632	0.185582	0.150288	0.126196
			0.883822	0.669779	0.531780	0.437176	0.370655
				0.945815	0.803632	0.685408	0.591329
					0.969012	0.870646	0.775184
						0.980062	0.908660
							0.986147
1.10	2.236067	1.753107	1.756821	1.756645	1.756652	1.756651	1.756651
		0.637744	0.357571	0.247737	0.188620	0.152303	0.127622
			0.889885	0.677463	0.538032	0.441882	0.374263
				0.948053	0.808121	0.690116	0.595533
					0.970074	0.873364	0.778520
						0.980651	0.910408
							0.986509
1.20	1.581138	1.198087	1.198709	1.198240	1.198267	1.198264	1.198265
		0.659859	0.368410	0.253514	0.192065	0.154586	0.129235
			0.895085	0.684903	0.544443	0.446867	0.378153
				0.949956	0.812239	0.694662	0.599749
					0.970980	0.875801	0.781633
						0.981155	0.911958
							0.986821
1.30	1.290994	0.951262	0.946883	0.945959	0.946007	0.945999	0.946000
		0.678568	0.379093	0.259368	0.195572	0.156911	0.130876
			0.899128	0.691299	0.550276	0.451562	0.381894
				0.951435	0.815632	0.698575	0.603511
					0.971687	0.877775	0.784238
						0.981551	0.913204
							0.987067

Discrete Eigenvalues of the Radiative Transfer Equation with Legendre and Chebyshev Polynomials Solutions

Continuatio Table 2: Discrete eigenvalues with T_N method for various single scattering albedo ω

1.40	1.118033	0.805312 0.694161	0.795343 0.389465 0.902342	0.793738 0.265257 0.696792 0.952613	0.793783 0.199131 0.555543 0.818454 0.972253	0.793766 0.159276 0.455950 0.701946 0.879398 0.981869	0.793768 0.132544 0.385466 0.606854 0.786433 0.914224 0.987265
1.50	0.990147	0.698985 0.708274	0.683056 0.400357 0.905180	0.680418 0.271725 0.701955 0.953658	0.680407 0.203091 0.560722 0.821043 0.972758	0.680371 0.161916 0.460414 0.705130 0.880875 0.982154	0.680375 0.134407 0.389184 0.610101 0.788470 0.915149 0.987443
1.60	0.912870	0.635805 0.717885	0.615475 0.408776 0.907096	0.611799 0.276969 0.705605 0.954367	0.611679 0.206352 0.564520 0.822842 0.973102	0.611616 0.164102 0.463789 0.707392 0.881896 0.982349	0.611621 0.135952 0.392055 0.612461 0.789898 0.915787 0.987566
1.70	0.845154	0.581324 0.726921	0.556742 0.417549 0.908895	0.551762 0.282704 0.709154 0.955037	0.551442 0.209984 0.568323 0.824571 0.973427	0.551335 0.166553 0.467256 0.709603 0.882873 0.982534	0.551338 0.137688 0.395062 0.614809 0.791281 0.916397 0.987682
1.80	0.790569	0.538124 0.734559	0.509976 0.425683 0.910422	0.503600 0.288302 0.712255 0.955608	0.502993 0.213608 0.571734 0.826068 0.973706	0.502817 0.169020 0.470442 0.711545 0.883718 0.982693	0.502815 0.139442 0.397880 0.616904 0.792486 0.916924 0.987782
1.90	0.745355	0.502888 0.741075	0.471811 0.433178 0.911733	0.464011 0.293729 0.714980 0.956100	0.463033 0.217209 0.574797 0.827374 0.973948	0.462761 0.171496 0.473367 0.713260 0.884453 0.982831	0.462746 0.141210 0.400513 0.618779 0.793544 0.917383 0.987869
2.00	0.707106	0.473499 0.746682	0.440055 0.440055 0.912870	0.430858 0.298955 0.717390 0.956529	0.429434 0.220769 0.577555 0.828524 0.974159	0.429036 0.173975 0.476051 0.714783 0.885100 0.982952	0.428997 0.142989 0.402969 0.620464 0.794478 0.917787 0.987945

Table 3: Comparison of the discrete eigenvalues with literature

ω	Present study results		Taşdelen, N., (2017)
	P_9	T_9	P_9
0.00	0.183434	0.195090	0.18343
	0.525532	0.555570	0.52553
	0.796666	0.831469	0.79666
	0.960289	0.980785	0.96028
0.25	0.192206	0.205056	0.19220
	0.548404	0.580801	0.54840
	0.824300	0.861412	0.82430
	0.980110	0.994837	0.98011
0.50	0.201936	0.216200	0.20193
	0.575296	0.610901	0.57529
	0.861400	0.903794	0.86140
	1.042230	1.047160	1.04223
0.75	0.212656	0.228565	0.21265
	0.603418	0.642212	0.60341
	0.891430	0.933760	0.89143
	1.289449	1.289733	1.28944
0.99	0.223829	0.241512	0.22381
	0.627343	0.667937	0.62734
	0.906054	0.945229	0.90605
	5.796729	5.796729	5.79672

CONCLUSION

This study proved that the Chebyshev polynomials can be used to find the discrete eigenvalues of the radiation transfer equation. The solution of the radiative transfer equation has been done by Legendre polynomials by some researchers Ozisik, M. N. and Shouman S. M. (1980), Menguc M. P. and Viskanta R. (1982), Taşdelen, N. (2017) and Taşdelen, M. (2017). The results obtained from Legendre polynomial method can be considered as benchmark results. So the radiative transfer equation is solved first with the Legendre polynomial to make a comparison with the Chebyshev polynomial solution. The numerical results obtained from Legendre polynomials and Chebyshev polynomials methods are coherent with each other as it can be seen by Table 3. The discrete eigenvalues are computed with two different methods for various single-scattering albedo numbers. The discrete eigenvalues can be used for many problems in the radiative transfer equation. Such as the boundary value or albedo problems calculations are done by using the discrete eigenvalues of the angular eigenfunctions. The numerical results of the eigenvalues for the both methods are presented in tables. As can be seen from the tables, the results converge with each other in the case of isotropic scattering. It is seen that there is a complete agreement between the results. Comparison of the results obtained shows that the calculations are consistent with each other and with the literature.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

KAYNAKLAR

Arnold, D. K. and Miguel, M. (2002). Chebyshev Spectral Methods for Radiative Transfer, *SIAM Journal on Scientific Computing*, 23(6), 2074-2094.

- Anli, F. Yaşa, F. Güngör, S. et al. (2006). TN approximation to neutron transport equation and application to critical slab problem, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 101(1), 129-134.
- Case, K. M. and Zweifel P. F. (1967). Linear Transport Theory, *Addison-Wesley Publishing Company*, 342.
- Chandrasekhar, S. (1934). The radiative equilibrium of extended stellar atmospheres, *Monthly notices of the royal astronomical society*, 94(5), 444-458.
- Davison, B. and Sykes, J.B. (1958). Neutron Transport Theory, *Physics Today*, 11(2), 30-32.
- Duderstadt. J. J., Martin R., 1978. Transport Theory. A WILEY-Interscience Pubucation
- Köklü, H. and Özer, O. (2021). Critical Size of a Slab Reactor with Neutron Transport Theory of the Triplet Anisotropic Scattering, *The International Journal of Materials and Engineering Technology*, 3(2), 98-108.
- Kosirev, N.A. (1934). Radiative equilibrium of the extended photosphere, *Monthly notices of the royal astronomical society*, 94(5), 430-443.
- Liemert, A. and Kienle, A. (2011). Analytical solution of the radiative transfer equation for infinite-space fluence. *Physical Review A*, 83(1); 015804(1-4).
- Machali, H.M., Haggag, M.H. and Al-Gorashi, A.K. (2013). On The Use of a Spatial Chebyshev Polynomials Together with The Collocation Method in Solving Radiative Transfer Problem in a Slab, *Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications*, 46(3), 167-185.
- Menguc M. P. and Viskanta R. (1982), Comparison of radiative transfer approximations for a highly forward scattering planar medium, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 29(5), 381-394.
- Milne, E.A. (1921). Radiative equilibrium in the outer layers of a star, *Monthly notices of the royal astronomical society*, 81(5), 361-375.
- Ozisk, M. N. and Shouman S. M. (1980), Source Function Expansion Method for Radiative Transfer in a Two-Layer Slab, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 24(6),441-449.
- Pomraning, G. C. and Erdmann, R.C. (1970). Photon Transmission Through a Hot Electron Atmosphere, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 10(2), 133-141.
- Pomraning, G. C. (1973). A Simple Calculation of the Time Dependence of the Second Spatial Moment, *Nuclear Science and Engineering*, 52(1),144-145.
- Stacey, W. M. (1957). Nuclear Reactor Physics. John Wiley and Sons Inc, 10(9).
- Taşdelen, M., (2017). *Radyatif Transfer Denkleminde S_N Metodu ve A_g Faz Fonksiyonu ile Özdeğer Spektrumu* (Yüksek Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş.
- Taşdelen, N. (2017). *Radyatif Transfer Denkleminde S_N Metodu ve H_G Faz Fonksiyonu ile Özdeğer Spektrumu* (Yüksek Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş.
- Yılmaz, A. and Kocar, C. (2009). Some Benchmark Results in Spherical Media Radiative Transfer Problems, *Transport Theory and Statistical Physics*, 38(5), 273–292.

Atf İçin: Özden, P. (2023). 4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate Sıvı Kristal Molekülünün Geometrik Yapısının İncelenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2604-2615.

To Cite: Özden, P. (2023). Investigation of the Geometric Structure of 4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate Liquid Crystal Molecule. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2604-2615.

4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate Sıvı Kristal Molekülünün Geometrik Yapısının İncelenmesi

Pınar ÖZDEN¹

Öne Çıkanlar:

- 4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate molekülü kullanıldı
- HOMO-LUMO enerjileri bulundu
- HF/6-31G(d,p) ve DFT/B3LYP/6-31G(d,p) yöntemleri karşılaştırıldı

ÖZET:

Bu çalışmada, tek eksenli moleküler simetriye sahip bir termotropik nematik sıvı kristal olan BPHB (4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate) molekülünün geometrisi optimize edilmiştir ve spektral analizleri yapılmıştır. Bu amaçla Gaussian09 yazılım paketi ve GaussView 5.0 grafik ara yüz yazılım programları kullanılmıştır. Hesaplamalar Hartree-Fock HF/6-31G(d,p) ve yoğunluk fonksiyonel teorisi DFT/B3LYP/6-31G(d,p) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen yapının moleküler ve termodinamik yapısal parametreleri (elektronik özellikler, elektron ilgisi, elektronegatiflik, moleküler sertlik ve yumuşaklık, elektrofilik indeks, kimyasal potansiyel gibi), moleküler yük dağılımı (Mulliken atomik yükleri), FT-IR spektrumları, moleküler elektrostatik potansiyel haritası (MEP), HOMO-LUMO enerjileri, dipol momentleri, toplam enerjileri ve elektronik yapı parametreleri hesaplanmıştır. Her iki yöntem için hesaplanan değerler karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- HF
- DFT
- MEP
- FT-IR

Investigation of the Geometric Structure of 4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate Liquid Crystal Molecule

Highlights:

- 4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate molecule was used
- HOMO-LUMO energies were found
- HF/6-31G(d,p) and DFT/B3LYP/6-31G(d,p) methods were compared

ABSTRACT:

In this study, the geometry of BPHB (4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate), a thermotropic nematic liquid crystal with uniaxial molecular symmetry, was optimized and spectral analyses were performed. Gaussian09 software package and GaussView 5.0 graphical interface software programs were used for this purpose. Calculations were performed by Hartree-Fock HF/6-31G(d,p) and density functional theory DFT/B3LYP/6-31G(d,p) methods. Molecular and thermodynamic structural parameters (electronic properties, electron affinity, electronegativity, molecular hardness and softness, electrophilic index, chemical potential), molecular charge distribution (Mulliken atomic charges), FT-IR spectra, molecular electrostatic potential map (MEP), HOMO-LUMO energies, dipole moments, total energies and electronic structure parameters of the optimized structure were calculated. The calculated values for both methods were compared and analyzed.

Keywords:

- HF
- DFT
- MEP
- FT-IR

¹ Pınar ÖZDEN ([Orcid ID: 0000-0001-5308-2060](https://orcid.org/0000-0001-5308-2060)), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, 48000, Muğla, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Pınar ÖZDEN, e-mail: pozden@mu.edu.tr

GİRİŞ

Maddenin bilinen katı, sıvı ve gaz halleri dışında, kristal yapının düzen özelliklerini ve sıvıların akışkanlığını taşıyan malzemeler de vardır. Böyle ara fazlar, sıvı kristal faz veya mezofaz olarak adlandırılır ve bu tür fazları gösterebilen maddelere sıvı kristaller (LC'ler) veya mezojenler denir (Chandrasekhar, 1992; de Gennes, 1993; Sharma ve ark., 2019). Bu malzemelerin sergiledikleri ikili doğa ve özelliklerinin elektrik ve manyetik alanlara olan duyarlılıkları sıvı kristalleri birçok teknolojik uygulama için önemli bir aday haline getirir. Sıvı kristaller; LCD ekranlar, projeksiyon cihazları, süperkapasitör (Mamuk ve ark., 2021), ışık modülatörü (Mamuk ve ark., 2022), kimyasal sensör (Popov ve ark., 2017), biyosensör (Liu ve Jang, 2014; Lee ve ark., 2016) gibi birçok uygulamada kullanım potansiyeline sahip olmaları nedeniyle bu malzemelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça popülerdir (Carlton ve ark., 2013; Sharma ve ark., 2017).

Sıvı kristaller, moleküllerinin geometrik anizotropisi ve yüksek polarize olabilme özellikleri nedeniyle bir veya daha fazla mezofaz sergileyebilmektedir. Sıvı kristalin oluşumu ve farklı sıcaklıklardaki bu mezofazlar molekülün yapısıyla yakın ilişki içindedir (Gray, 1962; Sharma ve ark., 2017). Ana zincir ve yan gruplardaki değişiklikler molekülün birçok özelliği gibi sıvı kristalite özelliklerini de etkilemektedir. Fakat moleküler yapıya bağlı olarak oluşacak sıvı kristalite ve mezofazlarını tahmin etmek kolay bir iş değildir. Günümüzde kuantum kimyası konusundaki çalışmalar ve yüksek hızlı programlar yardımıyla çalıştırılan simülasyon programları bu korelasyonu kurmada yardımcı olabilmektedir (Bates ve Luckhursts, 1997; Luckhurst ve Romono, 1999; Smondyrev ve Phcovtis, 1999; Bharadwaj ve ark., 2000; Ojha ve ark., 2002; Sarman, 2000; Sharma ve ark., 2017). Bu uygulamalarla sadece sıvı kristal özellikleri değil moleküler elektrostatik potansiyel (MEP) yüzeyleri, HOMO ve LUMO seviyelerinin belirlenmesi, moleküler reaktivite, yük transferi, etkileşimler, elektro-optik ve diğer özellikler de incelenebilmektedir (Scrocco ve Tomasi, 1973; Sanz ve ark., 1988; March, 1996; Abood ve Hilban, 2013; El-Mansy ve ark., 2013; Yang ve ark., 2014; Tiwari ve Sharma, 2015; Sharma ve ark., 2017).

Sıvı kristal moleküllerinin geometrik modellemesi, bu malzemelerin temel işleyişinin ve davranışının daha iyi anlaşılması açısından önemlidir. Moleküler seviyede yapılan bu modellemeler, sıvı kristallerin moleküler organizasyonunu ve etkileşimlerini açıklamak için temel bir araçtır. Bu, sıvı kristal sistemlerin termodinamik ve kinetik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına ve kontrol edilmesine katkı sağlar. Sıvı kristal moleküllerinin geometrik modellemesi, özellikle ekran teknolojileri ve optoelektronik cihazların geliştirilmesinde büyük bir rol oynar. Bu cihazların daha ince, daha hafif ve daha enerji verimli hale getirilmesi, sıvı kristal moleküllerinin geometrik özelliklerinin hassas bir şekilde anlaşılmasına dayanır. Sayılan nedenlerle, moleküler modelleme, yeni nesil ekran teknolojilerinin tasarımında ve geliştirilmesinde hayati bir öneme sahiptir (Chigrinov ve Yakovlev, 2006; Wilson, 2007).

Bu çalışmada BPHB (4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate) sıvı kristal molekülü Hartree Fock (HF) ve Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (DFT) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Hartree-Fock (HF) yöntemi, atomlar ve moleküllerin incelenmesinde birçok yöntemin başlangıç noktasıdır. Kararlı bir kuantum sisteminin dalga fonksiyonunun ve enerjisinin tespiti için kullanılan bir yaklaşımdır (Young, 2001). Yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT), organik bileşiklerin yapılarının, dipol momentlerinin, titreşim frekanslarının, nükleer manyetik rezonans kimyasal kaymalarının, optik özelliklerinin, moleküler elektrostatik potansiyellerinin, moleküler mekanizmalarının ve termodinamik özelliklerini yüksek doğrulukla analiz edilmesini sağlayan bir yöntemler bütünüdür (Beytur ve Avinca, 2021). Uzaydaki her bir atomun en kararlı konumlarını belirlemek için Gaussian 09W programı kullanılmıştır. Optimize edilmiş bileşiklerin minimum enerji alanı yapısı, (BPHB) moleküler yapısal parametreleri,

MEP yüzeyi, termo-kimyasal parametreleri, toplam dipol moment, HOMO, LUMO ve IR analizleri (titreşim spektrumları), HF ve DFT-B3LYP yöntemlerinde 6-31G(d,p) temel seti ile hesaplanmıştır.

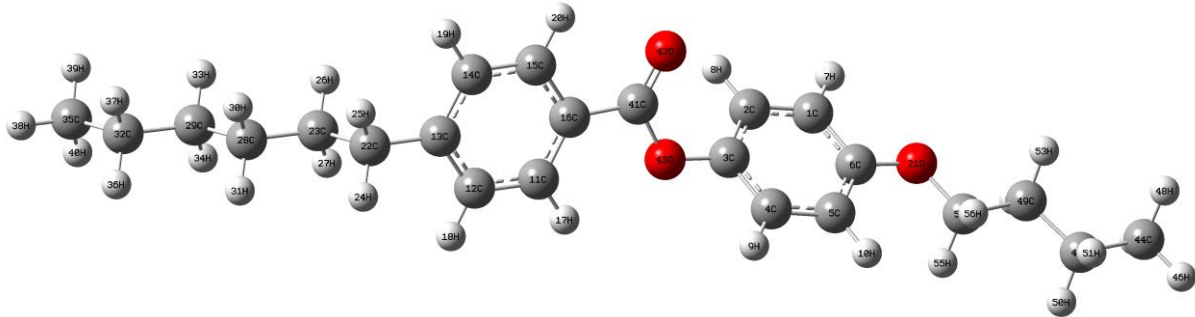
MATERYAL VE METOT

Optimizasyon

Bu çalışmada BPHB (4-buthoxyphenyl 4'-hexylbenzoate) sıvı kristal malzemesi incelemiştir. BPHB bileşiğinin moleküler geometrisi Şekil 1'de gösterilmiştir. BPHB molekülü tek eksenli moleküler simetriye sahip bir termotropik nematik sıvı kristaldir. Yaklaşık 350 K'de nematik-izotropik faz geçişi sergilemektedir. Nematik mezofazda 340 K sıcaklıkta yaklaşık $\Delta n=0.12$ çift kırılma değerine sahiptir. Mezofaz bölgesinde birbirlerine göre çapraz konumda bulunan kutuplayıcılar arasında nematikler için karakteristik olan iplikli tür tekstür vermektedir (Mamuk ve Nesrullajev, 2016). İlgili molekülün optimizasyonu ve spektral analizleri 11th Gen Intel(R) Core(TM) i5-1135G7 @ 2.40GHz 2.42 GHz kişisel bilgisayarı kullanılarak Gaussian09 yazılım paketiyle yapılmıştır. GaussView 5.0 grafik ara yüzü programıyla, girdi yapıları oluşturularak çıktı dosyaları yorumlanmıştır.

Analizler, 6-31G(d,p) temel seti baz alınarak hem birinci prensip olan HF hem de DFT-B3LYP yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. İlerleyen aşamalarda bu iki yöntem ve temel setleri için HF/6-31G(d,p) ve DFT-B3LYP/6-31G(d,p) ifadeleri kısaltma olarak kullanılmıştır.

BPHB'in moleküler geometrisi C, O ve H atomları için ilk önce HF/6-31G(d,p) yöntemiyle optimize edilerek analizler yapılmıştır. Daha sonra optimize edilmiş bu geometri tekrar DFT-B3LYP/6-31G(d,p) yöntemi ile optimize edilerek sonuçlar incelenmiştir. Optimize edilmiş geometriler, DFT-B3LYP'nin titreşim frekanslarının hesaplamasında, tüm durağan noktaları minimum olarak karakterize etmek için giriş verisi olarak kullanılmıştır.



Şekil 1. HF/6-31G(d,p) ve DFT-B3LYP/6-31G(d,p) yöntemleri ile optimize edilmiş BPHB'nin moleküler geometrisi

Konformasyonel, Moleküler Elektrostatik Potansiyel ve HOMO-LUMO Yüzey Çalışması

Elektrostatik potansiyel haritaları bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve potansiyel enerji yüzeyi (PES), her bir enerji noktasının sistemin olası bir konfigürasyonuna karşılık geldiği çok boyutlu bir yüzey olarak tanımlanır (Levine, 2003; Sharma ve ark., 2017). PES'te sistemin zamansal olarak çoğunlukla bulunduğu birkaç bölge vardır ve bu bölgeler genellikle sistemin kararlı durumlarına karşılık gelen yerel minimumlar ya da enerjisi düşük alanlardır. Sistem genellikle bu yerel minimumlar etrafında titreşirken, zaman zaman bir yerel minimumdan diğerine geçmektedir. İncelenen molekülün her atom merkezindeki net yük, dipol momentlerinin geometrik optimizasyonu ve hesaplanmaları HF/6-31G(d,p) ve DFT-B3LYP/6-31G(d,p) yöntemleri kullanılarak Gaussian programıyla yapılmıştır (Schmidt ve ark., 1993). Ayrıca, optimize edilmiş BPHB molekülünün moleküler elektrostatik potansiyeli (MEP) ve HOMO-LUMO yüzeyleri de incelenmiştir. HOMO ve LUMO enerjileri elektronegatiflik, sertlik, yumuşaklık, elektrofiliklik indeksi, lokal reaktivite gibi tanımlayıcıları belirlemek için kullanılmıştır. İyonlaşma potansiyeli (I), elektron ilgisi (A),

elektronegatiflik (χ), kimyasal sertlik (η) ve yumuşaklık (S) gibi moleküler parametrelerin hesaplanmasında Koopmans teoremi kullanılmıştır (Scrocco ve Tomasi, 1973; Campanario ve ark., 1994; March, 1996; Geerlings ve ark., 2003; Sharma ve ark., 2017).

HOMO ve LUMO moleküler yörüngelerdir. Moleküllerin elektron verme yeteneği HOMO enerjisi, elektron alma yeteneği ise LUMO enerjisi olarak adlandırılır. HOMO-LUMO enerji farkları moleküllerin polarizasyonu ile bağlantılıdır. Bu fark küçükse polarizasyon yüksek ve elektron dağılımı kolayca yönlendirilebilirken büyük olduğu durumlarda ise polarizasyon düşük olur ve elektronların yönlendirilme yeteneği de azalır (Fukui, 1982; Pearson, 1989; Gümüş ve Atalay, 2017).

İyonlaşma potansiyeli (I) molekülden bir elektron koparmak için gerekli enerji iken elektron ilgisi (A) ise gaz fazındaki moleküle bir elektron eklendiği zaman enerjisindeki artıştır ve HOMO LUMO seviyeleriyle aşağıdaki gibi ilişkilidir (Pauling, 1960; Foresman ve Frisch, 1996; Senet, 1997; Gümüş ve Atalay, 2017; Sharma ve ark., 2017).

$$I = -E_{HOMO} \quad A = -E_{LUMO} \quad (1)$$

Elektronegatiflik moleküldeki bir atomun elektronları çekme gücüdür. Kimyasal sertlik ise molekül içerisindeki yük transferinin engellenmesidir. I ve A değerleri kullanılarak moleküllerin elektronegatifliği (χ) ve kimyasal sertliği (η) aşağıdaki gibi hesaplanabilir (Pauling, 1960; Foresman ve Frisch, 1996; Senet, 1997; Gümüş ve Atalay, 2017; Sharma ve ark., 2017).

$$\chi = \frac{I+A}{2} \quad (2)$$

$$\eta = \frac{I-A}{2} \quad (3)$$

Kimyasal yumuşaklık ve elektrofilik indeks Parr ve diğerleri tarafından (Parr ve ark., 1978; Parr ve ark., 1999) şu eşitlikler ile verilmektedir:

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (4)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (5)$$

Kimyasal potansiyel (μ) ve elektronegatiflik (χ) arasındaki ilişki de yine Parr ve diğerleri tarafından (Parr ve ark., 1978; Parr ve ark., 1999) şu bağıntı ile verilmektedir:

$$\mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} = -\chi \quad (6)$$

FT-IR Spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, kimyasal işlemler ve moleküler yapıların ayrıntılı analizi için yaygın kullanılan önemli bir araçtır. FTIR spektroskopisi, bir maddeye kızılötesi ışık gönderilerek ve bu ışığın madde tarafından saçılmasını veya soğurulmasını ölçerek çalışır. Elde edilen spektrum, farklı dalga boylarındaki kızılötesi ışığın soğurma veya saçılma desenini gösterir. Bu desen, örnek içindeki kimyasal bağların türünü, miktarını ve yapısal bilgilerini sağlar. FTIR spektroskopisi, sıvı kristal sistemlerin konformasyonel değişimlerini ve faz geçişlerini araştırmak amacıyla etkili bir biçimde kullanılır. Bu yöntem, kızılötesi spektrumun karakteristik piklerinin şekli, en yüksek soğurma noktası

ve soğurma yoğunluğu gibi özelliklerini kullanarak, moleküler etkileşimler ve sıvı kristal fazlarıyla ilgili önemli veriler sağlar. Dahası, FTIR spektroskopisi, sıvı kristal moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi için de yaygın bir şekilde kullanılır (Martínez-Felipe ve ark., 2013; Avadanei ve ark., 2014; Osiecka ve ark., 2016; Singh ve ark., 2016; Mamuk ve Avcı, 2021).

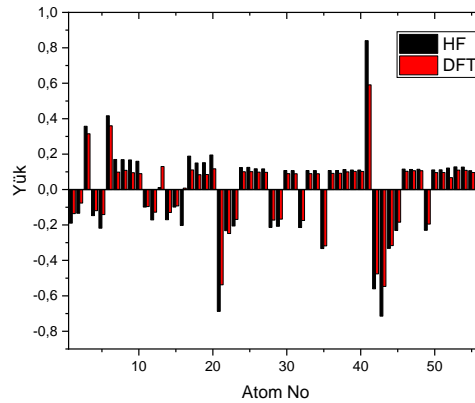
BULGULAR VE TARTIŞMA

Heisenberg'in belirsizlik ilkesi nedeniyle atomların yükleri elektron yoğunluğu gibi kesin olarak gözlenip hesaplanamaz. Bu nedenle tüm hesaplama programların bir düzeyde belirsizlik içeren farklı yöntemler kullanılır. Atomik yük hesabı için; doğal yoğunluk analizi, Mulliken yoğunluk analizi, MerzKollman-Singh yöntemi ve Breneman'ın CHelpG yöntemi gibi farklı yaklaşımlar Gaussian 09W programının kullandığı metotlardır. Atomik yörüngelerin doğrusal olarak üst üste gelmesiyle moleküllerin yörüngelerinin elde edilmesini sağlayan Mulliken yoğunluk analizi bu yöntemler arasında en bilinenlerdendir (Mulliken, 1955; Hohenberg ve Kohn, 1964; Reed ve Weinhold, 1985; Reed ve ark., 1985; Reed ve ark., 1988; Gümüş ve Atalay, 2017).

Çizelge 1: BPHB molekülünün hesaplanan Mulliken atomik yükleri

Atom Numarası	Atom Sembolü	Atom Yüğü (e.u.)		Atom Numarası	Atom Sembolü	Atom Yüğü (e.u.)	
		HF/6-31G(d,p)	DFT-B3LYP/6-31G(d,p)			HF/6-31G(d,p)	DFT-B3LYP/6-31G(d,p)
1	C	-0.190	-0.136	29	C	-0.207	-0.167
2	C	-0.134	-0.076	30	H	0.107	0.090
3	C	0.357	0.315	31	H	0.107	0.089
4	C	-0.147	-0.119	32	C	-0.214	-0.174
5	C	-0.218	-0.141	33	H	0.107	0.090
6	C	0.417	0.360	34	H	0.107	0.089
7	H	0.170	0.098	35	C	-0.333	-0.318
8	H	0.169	0.109	36	H	0.107	0.092
9	H	0.167	0.095	37	H	0.108	0.092
10	H	0.159	0.090	38	H	0.113	0.100
11	C	-0.099	-0.096	39	H	0.110	0.103
12	C	-0.171	-0.128	40	H	0.110	0.102
13	C	0.011	0.130	41	C	0.840	0.591
14	C	-0.170	-0.129	42	O	-0.560	-0.476
15	C	-0.099	-0.092	43	O	-0.714	-0.547
16	C	-0.203	0.008	44	C	-0.332	-0.317
17	H	0.188	0.111	45	C	-0.231	-0.184
18	H	0.150	0.084	46	H	0.115	0.103
19	H	0.152	0.085	47	H	0.114	0.106
20	H	0.195	0.117	48	H	0.114	0.107
21	O	-0.688	-0.538	49	C	-0.230	-0.195
22	C	-0.232	-0.248	50	H	0.111	0.096
23	C	-0.206	-0.169	51	H	0.112	0.096
24	H	0.124	0.101	52	C	0.122	0.067
25	H	0.125	0.101	53	H	0.128	0.110
26	H	0.117	0.098	54	H	0.127	0.109
27	H	0.117	0.097	55	H	0.106	0.096
28	C	-0.214	-0.172	56	H	0.109	0.098

BPHB molekülünün atomik yük dağılımı, HF/6-31G(d,p) ve DFT-B3LYP/6-31G(d,p) yöntemleriyle Mulliken popülasyon analizi (MPA) şeması kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 1, BPHB molekülünün çeşitli atomlarında bulunan kısmi yükleri göstermektedir. Karbon atomlarının hem pozitif hem de negatif yükler taşıdığı, hidrojen atomları üzerindeki yüklerin ise yalnızca pozitif değerlere sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 2). Bu, farklı hidrojen atomlarından karbon atomlarına yük transferini açıkça göstermektedir.

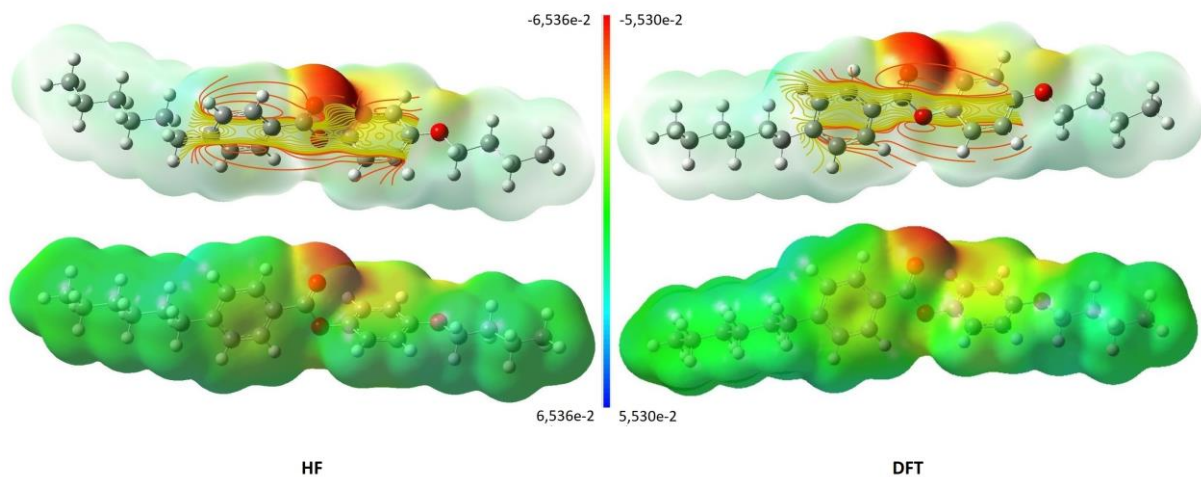


Şekil 2. BPHB molekülünün Mulliken grafiği

Moleküler Elektrostatik Potansiyel (MEP) ve HOMO-LUMO Yüzey Analizi

MEP haritası, molekülün yapısı ve aktivitesi arasındaki ilişkiyi elektrostatik olarak incelemeyi sağlar. MEP yüzeyi, molekülerin boyut, şekil, proton ilgisi, çözünme süreci ve elektrostatik yüklerin tahmini hesaplamalarında yardımcı bir araçtır. Fiziko-kimyasal özellik ilişkileri ile moleküler yapının araştırılmasını da sağlar. MEP yüzey şekilleri pozitif, negatif ve nötr elektrostatik potansiyel bölgelerinde renk derecelendirmesi şeklinde gösterilir.

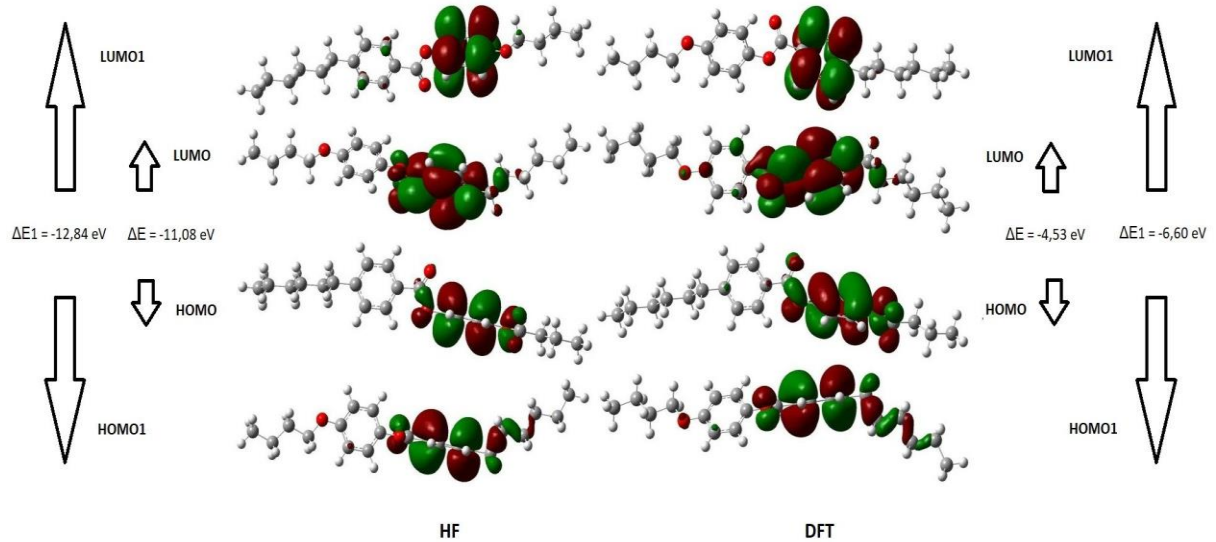
BPHB molekülünün MEP yüzeyi Şekil 3'de gösterilmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi, elektron yoğunlukları dış yüzeyde ve hidrojen atomlarının yakınında (mavi ve açık mavi bölgeler) çok düşüktür. Dolayısıyla bu bölgelerin yakınındaki elektrostatik potansiyeller pozitifdir. Yeşil bölgelerde daha az elektronegatifliğe sahip karbon atomlarının varlığından dolayı elektron yoğunluklarının ortalaması daha yüksektir. Dolayısıyla elektrostatik potansiyel bu bölgelerin yakınında daha az negatifdir. Elektron yoğunlukları, sarı ve kırmızı bölgelerde çok yüksektir. Bunun nedeni oksijen gibi güçlü elektronegatif atomların varlığıdır. MEP haritası oksijen atomları üzerindeki negatif potansiyel bölgeleri gösterirken, pozitif potansiyel bölgeleri hidrojen atomlarının etrafında yer almaktadır. Bu Çizelge 1'de gösterildiği gibi doğal yük dağılımı analizi ile doğrulanır.



Şekil 3. BPHB molekülünün HF/6-31G(d,p) ve DFT-B3LYP/6-31G(d,p) yöntemiyle elde edilen MEP yüzeyleri

Bir molekülün diğer kimyasal türlerle reaksiyon ve/veya etkileşim şeklini belirlemesi nedeniyle en önemli yörüngeler en dışakilerdir (en yüksek dolu moleküler yörünge, HOMO'lar ve en düşük boş moleküler yörünge, LUMO'lar). Sınır yörünge boşluğu, molekülün kimyasal reaktivitesini ve kinetik

kararlılığını karakterize etmeye yardımcı olur. BPHB molekülünün sınır yörüngeleri Şekil 4'te gösterilmiştir. BPHB molekülünün daha küçük HOMO-LUMO boşluğu, fotokimyasal işlemlerde kimyasal olarak oldukça reaktif ve daha az kararlı olduğunu gösterir. HOMO'lar ve LUMO'ların bir bütün olarak moleküller üzerinde yerleştiği görülmektedir.



Şekil 4. HF ve DFT yöntemleri ile BPHB molekülünün HOMO ve LUMO yörüngelerinin gösterimi

BPHB molekülünün hesaplanan iyonlaşma potansiyeli, elektron ilgisi, elektronegatiflik, global sertlik ve yumuşaklık, HOMO-LUMO enerji aralığı (ΔE) Çizelge 2'de verilmiştir. Sabit basınçta özgül ısı, sabit hacimde özgül ısı, entalpi, entropi gibi termodinamik parametreler, Gibbs'in HF ve DFT yöntemleriyle hesaplanan serbest enerjisi, iç enerjisi, toplam enerjisi ve diğer elektronik parametreleri ise Çizelge 3'te listelenmiştir. Çizelge 3'ten de anlaşılacağı gibi, özgül ısılar (C_p ve C_v), entropi, iç enerji, entalpi, Gibbs free HF yöntemiyle hesaplanan molekülün enerjisi ve toplam enerjisi, DFT yöntemiyle elde edilenlerden daha yüksek, HF yöntemiyle hesaplanan dipol momentini DFT yöntemiyle elde edilenden daha düşüktür.

Çizelge 2: BPHB molekülünün hesaplanan elektronik yapı parametreleri

Elektronik Yapı Parametreleri	HF/6-31G(d,p)	DFT-B3LYP/6-31G(d,p)
HOMO Enerjisi	-8.29 eV	-5.72 eV
LUMO Enerjisi	2.79 eV	-1.19 eV
Yörünge Enerji Boşluğu (ΔE)	-11.08 eV	-4.53 eV
İyonizasyon Potansiyeli (I)	8.29 eV	5.72 eV
Elektron İlgisi (A)	-2.79 eV	1.19 eV
Elektronegatiflik (χ)	2.75 eV	3.46 eV
Elektronik Kimyasal Potansiyel (μ)	-2.75 eV	-3.46 eV
Kimyasal Sertlik (η)	5.54 eV	2.27 eV
Kimyasal Yumuşaklık (S)	0.18 eV ⁻¹	0.44 eV ⁻¹
Elektrofilik İndeksi (ω)	0.68 eV	2.64 eV

Yine toplam enerji, sıfır noktası titreşim enerjisi, dönme sabitleri, entropi, toplam dipol momentini gibi hesaplanmış birkaç termodinamik parametre Çizelge 3'te verilmiştir. Hartree-Fock ve DFT (B3LYP) yöntemleri kullanılarak elde edilen C_p , C_v , entalpi, entropi, Gibbs serbest enerjisi, iç enerji ve diğer parametreleri de Çizelge 3'te listelenmiştir.

Çizelge 3: BPHB molekülünün hesaplanan termodinamik ve diğer elektronik parametreleri (Sıcaklık 298.150 K)

Parametreler	HF/6-31G(d,p)	DFT-B3LYP/6-31G(d,p)
Sabit Basıncıta Özgül Isı (C_p) [cal/(mol K)]	95.118	102.118
Sabit Hacimde Özgül Isı (C_v) [cal/(mol K)]	93.133	100.132
Entalpi [Kcal/Mol]	340.716	321.269
Entropi [cal/(mol K)]	188.990	192.396
Gibbs Serbest Enerjisi [Kcal/Mol]	284.372	263.906
Isı Sığası [cal/(mol K)]	Öteleme	2.981
	Dönme	2.981
	Titreşim	87.172
Entalpi [Kcal/Mol]	Öteleme	0.889
	Dönme	0.889
	Titreşim	338.352
Entropi [cal/(mol K)]	Öteleme	43.488
	Dönme	36.717
	Titreşim	108.785
Dönme Sıcaklıkları [Kelvin]	1	0.04733
	2	0.00179
	3	0.00177
Dönme Sabitleri [GHz]	1	0.98610
	2	0.03724
	3	0.03684
Sıfır noktası titreşim enerjisi [Kcal/Mol]	X	-2.6624
	Y	0.2405
Dipol Moment [Debye]	Z	0.7232
	Toplam Dipol Moment [Debye]	2.7693

FT-IR Spektroskopik İnceleme

BPHB molekülü, bir ucunda 6 diğer ucunda 4 karbon atomu içeren alkil zinciri ile birlikte iki benzen halkasından oluşmaktadır. Titreşim ataması, CH_3 gruplarının CH gerilme modları, CH_3 deformasyonları ve CC iskelet titreşimleri ile birlikte HCC eğilme titreşimleri dahil olmak üzere çeşitli modları içerir. BPHB molekülünün hesaplanan titreşim (IR) frekansları önceki çalışmalarda elde edilmiş deneysel verilerle birlikte Çizelge 4'te listelenmiştir (Yakubov, 2000; El-Mansy ve ark., 2013; Martínez-Felipe ve ark., 2013; Osiecka ve ark., 2016; Singh ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2017; Sharma ve ark., 2019; Beytur ve Avinca, 2021; Mamuk ve Avcı, 2021). BPHB LC molekülünün hesaplanan kızılötesi spektrumu Şekil 5'te gösterilmiştir.

Titreşim modları

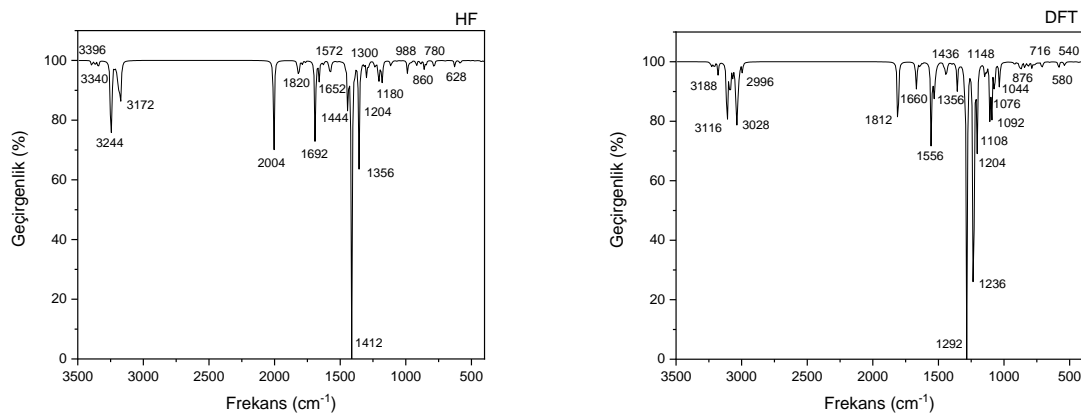
Bu çalışmada CH germe bölgeleri DFT yönteminde 2900 cm^{-1} ile 3120 cm^{-1} arasında, HF yönteminde ise 3170 cm^{-1} ile 3200 cm^{-1} aralığında görünmektedir. CH germe titreşim frekanslarının literatürdeki deneysel değerleri 3000 cm^{-1} ila 3100 cm^{-1} aralığındadır. Metil grubunun aromatik kısmı nedeniyle ortaya çıkan CH simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri de bu bölgede mevcuttur. Metilenin teorik olarak hesaplanan CH simetrik ve asimetrik titreşimleri DFT yönteminde sırasıyla 3028 cm^{-1} ve 3116 cm^{-1} 'de, HF yönteminde ise 3172 cm^{-1} 'de ortaya çıkmaktadır. Bu değerlere karşılık gelen daha önceki çalışmalardaki deneysel değerler sırasıyla 3024 cm^{-1} ve 3087 cm^{-1} 'de bulunur (Yakubov, 2000; El-Mansy ve ark., 2013; Martínez-Felipe ve ark., 2013; Osiecka ve ark., 2016; Singh ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2017; Sharma ve ark., 2019; Beytur ve Avinca, 2021; Mamuk ve Avcı, 2021).

CH'nin düzlem dışı bükülmesi, halkalar arası C-C gerilmesi, CC gerilmesi ve düzlem içi halka HCC bükme modları gibi diğer titreşimler de aromatik kısımlarda gözlenir. Bu titreşim modları sırasıyla 540 cm^{-1} , 580 cm^{-1} , 628 cm^{-1} ve 780 cm^{-1} 'de bulunur. CH_3 sallanma frekansı 1356 cm^{-1} 'de görünür ve CH_3 şemsiye deformasyon modu 1444 cm^{-1} 'de elde edilir. COC gerilme titreşimleri 1204 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca, fenil halkasındaki gerilme frekansları 1556 cm^{-1} ila 1572 cm^{-1} aralığındadır. Hartree-Fock ve DFT yöntemlerinin her ikisi kullanılarak hesaplanan titreşim frekanslarının literatürdeki deneysel verilerle iyi bir uyum içinde olduğu görülmektedir.

Çizelge 4: BPHB molekülünün metinde verilen önceki çalışmalardaki deneysel veriler kullanılarak bulunan titreşim modları

Frekans Değerleri (cm ⁻¹) ve Yüzde Hata Oranları (%)					
Literatürdeki Deneysel Veri	HF/6-31G(d,p)	Hata (%)	DFT-B3LYP/6-31G(d,p)	Hata (%)	Titreşim Modu
551	BM	BM	540 580	2.00 5.26	Halka dışı düzlem deformasyonu
626	628	0.32	BM	BM	Fenil halkasındaki C-C deformasyonu
750	BM	BM	716	4.53	CH ₂ rocking
776	780	0.52	BM	BM	C-H düzlem dışı bükülme
861	860	0.12	876	1.74	
998	988	1.00	1044	4.21	CH bükülmesi+CH ₃ rocking+CH ₂ salınımı
1061	BM	BM	1076	1.41	C-C gerilmesi
1121	BM	BM	1092	2.59	
1179	BM	BM	1108	1.16	Düzlem içi halka HCC bükme
1179	1180	0.08	1148	2.63	
1247	1204	3.45	1204	3.45	C-O-C titreşimi
1300	BM	BM	1236	0.88	
1300	1300	0.00	1292	0.62	CH ₂ salınımı
1348	1356	0.60	1356	0.60	HCC halka bükülmesi, COC gerilimi
1367		0.80		0.80	CH ₃ çekirdek salınımı
1408	1412	0.28	BM	BM	CH salınımı
1421	BM	BM	1436	1.06	CH ₂ makaslama titreşimi
1456	1444	0.82	BM	BM	CH ₃ şemsiye deformasyonu
1568	1572	0.26	1556	0.77	Fenil halkasındaki gerilme
1576	1572	0.25	1556	1.27	C=C gerilme
1635	1652	1.04	1660	1.53	C=C gerilme
1713	1692	1.23	BM	BM	C=O gerilme
2960	BM	BM	2996	1.20	CH ₃ asimetric gerilme titreşimi
3024	BM	BM	3028	0.13	
3087	3172	2.75	3116	0.94	CH fenil halkasındaki gerilme
3209	3244	1.09	3188	0.65	overtone CC fenil halkasındaki gerilme

*BM: Bulunamadı



Şekil 5. HF ve DFT yöntemleri ile BPHB molekülünün kızılötesi spektrumu

SONUÇ

Bu çalışmada BPHB sıvı kristal molekülü için optimize edilmiş moleküler yapısal parametreler, FT-IR spektrumları, termo-kimyasal parametreler, toplam dipol momentleri ve HOMO-LUMO enerji boşluğu için hesaplamalar yapılmıştır.

BPHB molekülünün 6-31G(d,p) temel seti kullanılarak Hartree Fock ve DFT-B3LYP tarafından elde edilen geometrik parametreleri iyi bir uyum içindedir. Yapısal analiz, BPHB molekülünün kararlı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. MEP ve HOMO-LUMO analizi, BPHB molekülünün kimyasal reaktivitesini, yük transferini ve elektrostatik özelliklerini doğru bir şekilde tahmin etmek için kullanılabilir. MEP haritasından da anlaşılacağı gibi, molekülün merkezinden dışarı doğru hareket ederken nükleofilik yetenek zayıflar ve elektrofilik yetenek güçlenir. HOMO-LUMO enerji aralığının daha düşük değeri nedeniyle BPHB, kimyasal olarak reaktif bir sıvı kristal moleküldür. 298.15K sıcaklıkta ölçülen termokimya, sistem içinde ısının serbest bırakıldığı veya soğurulduğu belirli kimyasal reaksiyonların gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. Yapı-aktivite ilişkisini aydınlatmak için 6-31G(d,p) temel seti kullanılarak HF ve DFT-B3LYP yöntemleri ile BPHB molekülünün tam bir titreşim analizi yapılmıştır. Ayrıca, BPHB nematojenin çeşitli titreşim modlarının Hartree-Fock ve DFT yöntemleri kullanılarak hesaplanan frekansları literatürdeki deneysel sonuçlarla iyi uyum içindedir.

Hesaplanan ve önceki çalışmalarda deneysel olarak ölçülen titreşim frekansları arasındaki farklılıkların, hesaplamaların hem toz hem de ince film halinde kaydedilen literatürdeki deneysel değerlerin aksine, gaz halindeki tek bir molekül üzerinde yapılmış olması nedeniyle moleküller arasındaki etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abood, N.A. ve Hilban, S.H. (2013). Theoretical study of structures, IR and NMR of some aliphatic hydrazones derived from aliphatic aldehydes and hydrazine by DFT method. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5, 324-331.
- Avadanei, M., Perju, E., Cozan, V., Bruma, M. (2014). Phase transitions of a monotropic azomethine liquid crystal investigated by ATR-FTIR spectroscopy. *Phase Transitions*, 87, 243-254.
- Bates, M.A. ve Luckhurst, G.R. (1997). Computer simulation studies of anisotropic systems. The density and temperature dependence of the second rank orientational order parameter for the nematic phase of a Gay-Berne liquid crystal. *Chemical Physics Letters*, 281, 193-198.
- Beytur, M. ve Avinca, I. (2021) Molecular, Electronic, Nonlinear Optical and Spectroscopic Analysis of Heterocyclic 3-Substituted-4-(3-methyl-2-thienylmethyleneamino)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones: Experiment and DFT Calculations. *De Gruyter Heterocyclic Communications*, 27, 1-16.
- Bharadwaj, R.K., Bunning, T.J. ve Farmer, B.L. (2000). A mesoscale modelling study of nematic liquid crystals confined to ellipsoidal domains. *Liquid Crystals*, 27, 591-603.
- Campanario, J.M., Bronchalo, E. ve Hidalgo, M. A. (1994). An Effective Approach for Teaching Intermolecular Interactions. *Journal of Chemical Education*, 71, 761-766.
- Carlton, R. J., Hunter, J. T., Miller, D. S., Abbasi, R., Mushenheim, P. C., Tan, L. N., Abbott, N. L. (2013). Chemical and biological sensing using liquid crystals. *Liquid Crystals Reviews*, 1, 29-51.
- Chandrasekhar, S. (1992). *Liquid Crystals*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chigrinov, V. G. ve Yakovlev, D. A. (2006). Optimization and Modeling of Liquid Crystal Displays. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 453, 107-121.
- de Gennes, P. G. (1993). *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford: Clarendon Press.
- El-Mansy, M.A.M., El-Nahass, M.M., Khusayfan, N.M., El-Menyawy, E.M. (2013). DFT approach for FT-IR spectra and HOMO-LUMO energy gap for N-(p-dimethylaminobenzylidene)-p-nitroaniline (DBN). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 111, 217-222.
- Foresman, J.B. ve Frisch, A. (1996). *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Pittsburg: Gaussian Inc.
- Fukui, K. (1982). Role of Frontier Orbitals in Chemical Reactions. *Science*, 218, 747-754.
- Geerlings, P., De Proft, F. ve Langenaeker, W. (2003). Conceptual Density Functional Theory. *Chemical Reviews*, 103, 1793-1873.
- Gray, G.W. (1962). *Molecular Structure and Properties of Liquid Crystals*. New York: Academic Press.
- Gümüş, H.P. ve Atalay, Y. (2017). 3-hidroksi-4-hidroksimiinometil-5-hidroksimetil-1,2-dimetilpiridinyum iyodid molekülünün geometrik yapısının incelenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21, 564-571.
- Hohenberg, P. ve Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*, 136, 864-871.

- Lee, H-G., Munir, S. ve Park, S-Y. (2016). Cholesteric Liquid Crystal Droplets for Biosensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8, 26407-26417.
- Levine, I.N. (2003). *Quantum Chemistry* (5th ed.). Singapore: Pearson Education.
- Liu, D. ve Jang, C-H. (2014). A new strategy for imaging urease activity using liquid crystal droplet patterns formed on solid surfaces. *Sensors and Actuators B*, 193, 770-773.
- Luckhurst, G.R. ve Romono, S. (1999). Computer simulation study of a nematogenic lattice model based on an elastic energy mapping of the pair potential. *Liquid Crystals*, 26(6), 871-884.
- Mamuk, A. E. ve Nesrullajev, A. (2016). Refractive and birefringent properties and order parameter of nematic liquid crystal at the direct and reverse nematic \leftrightarrow isotropic liquid phase transition. *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materials*, 18, 928-937.
- Mamuk, A. E. ve Avcı, N. (2021). 4-butoxybenzylidene-4'-butylaniline (BBBA) Sıvı Kristalinin Geniş Sıcaklık Aralığında İncelenmesi: Optik, Dielektrik, Kalorimetrik ve Kızılötesi Spektroskopik Analiz. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 10, 311-324.
- Mamuk, A. E., Koçak, Ç. ve Demirci Dönmez, Ç. E. (2021). Production and characterization of liquid crystal/polyacrylonitrile nano-fibers by electrospinning method. *Colloid and Polymer Science*, 299, 1209-1221.
- Mamuk, A. E., Koçak, Ç., Aslan, S., Bal Altuntaş, D. (2022). Electrochemical Properties of Coumarin 500 Encapsulated in a Liquid Crystal Guided Electrospun Fiber Core and Their Supercapacitor Application. *ACS Applied Energy Materials*, 5, 12078-12089.
- March, N.H. (1996). Electrostatic Potential, Bond Density and Bond Order in Molecules and Clusters. *Molecular Electrostatic Potentials: Concepts and Applications Theoretical and Computational Chemistry*, 3, 619-647.
- Martínez-Felipe A., Imrie C.T. ve Ribes-Greus A. (2013). Study of structure formation in side-chain liquid crystal copolymers by variable temperature fourier transform infrared spectroscopy. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52, 8714-8721.
- Mulliken, R.S. (1955). Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions. I. *The Journal of Chemical Physics*, 23, 1833-1840.
- Ojha, D.P., Kumar, D. ve Pisipati, V.G.K.M. (2002). Statistical Study of Molecular Ordering in a Nematogenic Compound – A Computational Analysis. *Crystal Research and Technology*, 37, 83-91.
- Osiecka N., Galewski Z., Juszyńska-Gałązka E., Massalska-Arodź M. (2016). Studies of reorganization of the molecules during smectic A–smectic C phase transition using infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 224, 677-683.
- Pauling, L. (1960). *The Nature of the Chemical Bond*. New York: Cornell University Press.
- Parr, R.G., Donnelly, R.A., Levy, M., Palke, W.E. (1978). Electronegativity: The Density Functional Viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 68, 3801-3807.
- Parr, R.G., von Szentpaly, L. ve Liu, S. (1999). Electrophilicity Index. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 1922-1924.
- Pearson, R.G. (1989). Absolute Electronegativity and Hardness: Applications to Organic Chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, 54, 1423-1430.
- Popov, N., Honaker, L. W., Popova, M., Usoltseva, N., Mann, E. K., Jakli, A., Popov, P. (2017). Thermotropic Liquid Crystal-Assisted Chemical and Biological Sensors. *Materials*, 11(20), 1-28.
- Reed, A. E. ve Weinhold, F. (1985). Natural localized molecular orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, 83, 1736-1740.
- Reed, A.E., Weinstock, R.B. ve Weinhold, F. (1985). Natural Atomic Orbitals and Natural Population Analysis. *The Journal of Chemical Physics*, 83, 735-746.
- Reed, A.E., Curtiss, L.A. ve Weinhold, F. (1988). Intermolecular Interactions from a Natural Bond Orbital, Donor-Acceptor Viewpoint. *Chemical Review*, 88, 899-926.
- Sanz, F., Manaut, F., Jose, J. Segura, J., Carbo, M. ve De La Torre, R. (1988). Automatic determination of MEP patterns of molecules and its application to caffeine metabolism inhibitors. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 170, 171-180.
- Sarman, S. (2000). Molecular dynamics simulation of thermomechanical coupling in cholesteric liquid crystals. *Molecular Physics*, 98, 27-35.
- Schmidt, M.W., Baldrige, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J.H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K.A., Su, S.J., Windus, T.L., Dupuis, M., Montgomery, J.A. (1993). General atomic and molecular electronic structure system. *Journal of Computational Chemistry*, 14, 1347-1363.

- Scrocco, E., ve Tomasi, J. (1973). In: New Concepts II. Topics in Current Chemistry Fortschritte der Chemischen Forschung, The electrostatic molecular potential as a tool for the interpretation of molecular properties. 42, 95-170. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Senet, P. (1997). Chemical hardnesses of atoms and molecules from frontier orbitals. Chemical Physics Letters, 275, 527-532.
- Sharma, D., Tiwari, G. ve Tiwari, S. N. (2019) . Electronic Structure and Thermodynamic Properties of 4-nheptyl-4'-cyanobiphenyl: A Computational Study. Materials Today: Proceedings, 15, 409–415.
- Sharma, D. Tiwari, G. ve Tiwari, S.N. (2017). Thermodynamical Properties and Infrared Spectra of 4-n-propoxy-4'-cyanobiphenyl: Hartree-Fock and Density Functional Theory Methods. International Journal of Electroactive Materials, 5, 19-30.
- Singh, S., Singh, H., Srivastava, A., Tandon, P., Deb, R., Debnath,,S., Rao, N.V.S., Ayala, A.P. (2016). Study of phase transitions in a bent-core liquid crystal probed by infrared spectroscopy. Vibrational Spectroscopy, 86, 24-34.
- Smondryev, A.M. ve Phcovtis, R.A. (1999). Nematic Structures in. Cylindrical Cavities. Liquid Crystals, 26, 235-240.
- Tiwari, S.N. ve Sharma, D. (2015). Molecular structure and interaction energy studies of 4, 4'-methoxy bis-hydrazone. Journal of Molecular Liquids, 207, 99-106.
- Wilson, M.R. (2007). Molecular simulation of liquid crystals: progress towards a better understanding of bulk structure and the prediction of material properties. Chemical Society Reviews, 36(12), 1881-8.
- Yakubov, A.A. (2000). Study of molecular structure and interactions in partially fluorinated liquid crystal by infrared spectroscopy. Journal of Molecular Structure, 519, 205–209.
- Yang, J., Yan, H., Wang, G., Zhang, X., Wang, T. ve Gong, X. (2014). Computational investigations into the substituent effects of –N3, –NF2, –NO2, and –NH2 on the structure, sensitivity and detonation properties of N, N'-azobis(1, 2, 4-triazole). Journal of Molecular Modeling, 20, 2148-2159.
- Young, D. (2001). Computational Chemistry: A Practical Guida for Aplying Tecniques to Real-World Problems. New York: Wiley-Interscience.

Atf İçin: Sütçü, K., ve Osmanoğlu, Y. E. (2023). Gama ile Işınlanmış Klorpropamid ve Prokainamid Hidroklorür İlaç Hammaddelerinde Oluşan Serbest Radikallerin EPR Spektroskopisi ile Tanımlanması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2616-2621.

To Cite: Sütçü, K., & Osmanoğlu, Y. E. (2023). Identification of Free Radicals Formed in Gamma-Irradiated Chlorpropamide and Procainamide Hydrochloride Pharmaceutical Raw Materials by EPR Spectroscopy. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2616-2621.

Gama ile Işınlanmış Klorpropamid ve Prokainamid Hidroklorür İlaç Hammaddelerinde Oluşan Serbest Radikallerin EPR Spektroskopisi ile Tanımlanması

Kerem SÜTÇÜ^{1*}, Yunus Emre OSMANOĞLU²

Öne Çıkanlar:

- Klorpropamid ve prokainamid hidroklorürde gama ışınlanması ile oluşan serbest radikallerin yapısal özellikleri elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi ile incelenmiştir.
- Radikal konsantrasyonları hesaplanmıştır.
- EPR parametreleri ve radikallerin yapısı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- Elektron paramanyetik rezonans
- Gama ışınlanması
- İlaç hammaddesi

ÖZET:

Bu çalışmada tıpta yaygın kullanılan klorpropamid ve prokainamid hidroklorür ilaç hammaddelerinde gama ile ışınlanarak oluşan serbest radikallerin yapısal özelliklerinin elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Gama ile ışınlama sonucunda hem klorpropamid ve hem de prokainamid hidroklorür numunelerinde iki farklı radikal oluştuğu tespit edilmiştir. Klorpropamid ve prokainamid hidroklorür numunelerinde sırasıyla -NĈH-, -NĈHĈH₂- ve -NĈH-, -NĈHĈH- radikallerinin oluştuğu önerilmiştir. Toz formunda çalışılan örneklerin oda sıcaklığında kaydedilmiş deneysel spektrumlarına en yakın simüle spektrumları simülasyon yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. Önerilen radikallerin deneysel spektrumlara olan katkıları hesaplanmıştır. Elde edilen radikallerin g değerleri ve eşlenmemiş elektronların aşırı ince yapı sabitleri hesaplanmıştır.

Identification of Free Radicals Formed in Gamma-Irradiated Chlorpropamide and Procainamide Hydrochloride Pharmaceutical Raw Materials by EPR Spectroscopy

Highlights:

- The structural properties of free radicals formed by gamma irradiation in chlorpropamide and procainamide hydrochloride were examined by electron paramagnetic resonance spectroscopy
- Radical concentrations were calculated.
- The EPR parameters and the structure of the radicals were identified

ABSTRACT:

In this study, it was aimed to determine the structural properties of free radicals formed by gamma irradiation in chlorpropamide and procainamide hydrochloride drug raw materials, which are widely used in medicine, by using electron paramagnetic resonance spectroscopy. As a result of gamma irradiation, it was determined that two different radicals were formed in both chlorpropamide and procainamide hydrochloride samples. It was suggested that -NĈH-, -NĈHĈH₂- and -NĈH-, -NĈHĈH- radicals were formed in chlorpropamide and procainamide hydrochloride samples, respectively. The simulated spectra closest to the experimental spectra recorded at room temperature of the samples studied in powder form were obtained using simulation software. The contributions of the proposed radicals to the experimental spectra were calculated. The g values of the obtained radicals and the hyperfine structure constants of the unpaired electrons were calculated.

Keywords:

- Electron paramagnetic resonance
- Gamma irradiation
- Pharmaceutical raw material

¹ Kerem SÜTÇÜ (Orcid ID: 0000-0002-5791-1492), Dicle Üniversitesi, Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

² Yunus Emre OSMANOĞLU (Orcid ID: 0000-0001-7338-7603), Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Kerem SÜTÇÜ, e-mail: ksutcu@dicle.edu.tr

INTRODUCTION

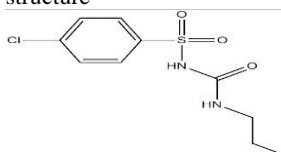
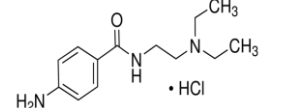
Chlorpropamide (CLP) is a long-acting oral hypoglycemic agent commonly used in type 2 diabetes (Bakare-Odunola et al., 2008). It is known that CLP is a sulfonamide derivative that is insoluble in water but soluble in alcohol (Iweala and Okeke, 2005). In addition, procainamide hydrochloride (PAH), an antiarrhythmic reagent, is used to treat cardiac arrhythmia in patients with heart disease (Al-Tamrah and Al-Abbad, 2015). Radiation sterilization of drugs, which is a non-contact method, is becoming increasingly important in today's world where the effect of the pandemic continues (Ambroz et al., 2002; Çolak and Korkmaz, 2004; Sütçü, 2019). However, as a result of radiation application, free radicals are formed in drugs and the identities of these free radicals should be identified. EPR spectroscopy is the most suitable method because of its high sensitivity in detecting free radicals (Murrieta et al., 1996).

In the study in which the EPR characterization of the Airfix drug was performed, it was determined that alkyl-type radical was formed as a result of irradiation (Ece et al., 2022). In the study, in which some drugs used in neurological and high blood pressure diseases were examined using EPR spectrometry after irradiation with gamma, g values of radicals and hyperfine structure constants of free electrons were determined by using simulation spectra (Köseoğlu et al., 2003). Damian examined the metoclopramide sample, which is in the antiemetic drug category, by EPR spectroscopy (Damian, 2003). It was stated that a single signal was recorded from the metoclopramide sample. The g and linewidth values of the single signal were calculated as $g=2.0047$ and $\Delta H=20$ G, respectively. When the literature is examined, it is seen that EPR spectroscopy is frequently used in examining irradiated food and amino acid compounds as well as irradiated drugs (Desrosiers, 1996; Kasumov et al., 2001, Aydın et al., 2008; Aydın et al., 2009; Başkan et al., 2010; Sayın, 2013, Başkan et al., 2015; Zhang, 2015; Sezer et al., 2017, Tokatlı et al., 2018, Karakaş et al., 2018). In this study, it was aimed to determine the chemical structures of the free radicals formed after gamma irradiation of CLP and PAH samples, which have such important properties in medicine.

MATERIALS AND METHODS

CLP and PAH pharmaceutical raw materials in powder form were purchased from commercial sources and gamma irradiation was carried out at Turkish Energy Nuclear and Mineral Research Agency (TENMAK). The irradiation process was achieved at room temperature equivalent to 15 kGy using a ^{60}Co gamma-ray source (Isotope, Ob-ServoSanguis) with a dose rate of 1785 Gy/h. The spectra of all samples were recorded using the E109C EPR X-band EPR spectrometer, which was operated at microwave frequency 9.821 GHz and microwave power 1.577 at room temperature after irradiation. The simulated spectra closest to the experimental spectra were performed using the EPR winsim2002 software program (Nih, 2012). Chemical formulas, molecular weights and molecular structures of CLP and PAH samples are given in Fig. 1.

Figure 1. Symbol, name, formula, molecular weight and chemical structure of CLP and PAH samples

Symbol	Name	Chemical Formula	Molecular Weight	Chemical structure
CLP	Chlorpropamide	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$	276.74 g/mol	
PAH	Procainamide hydrochloride	$\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \cdot \text{HCl}$	271.79 g/mol	

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental spectra of CLP and PAH samples are given in Fig. 2a and Fig.3a respectively. When these spectra are examined, it is observed that hyperfine coupling constants cannot be obtained due to the poor resolution of the signals. Experimental EPR signals of drugs are difficult to interpret because of the large chemical structures of drug molecules and the poor resolution of EPR signals (Köseoğlu et al., 2003). In this context, the spectroscopic parameters of the samples were obtained by interpreting the simulations of the spectra.

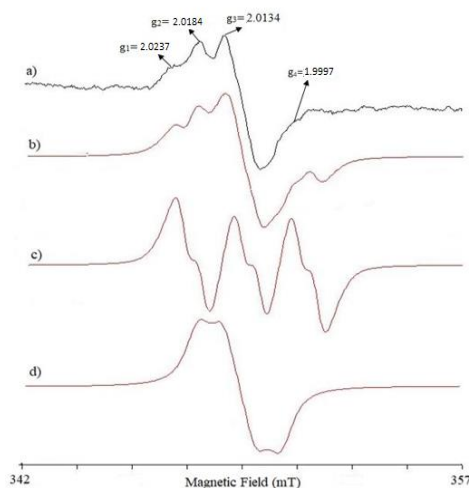


Figure 2. a) The EPR spectrum of 15 kGy irradiated CLP sample
 b) Simulation of the spectrum
 c) Simulation of radical (radical I)
 d) Simulation of radical (radical II)

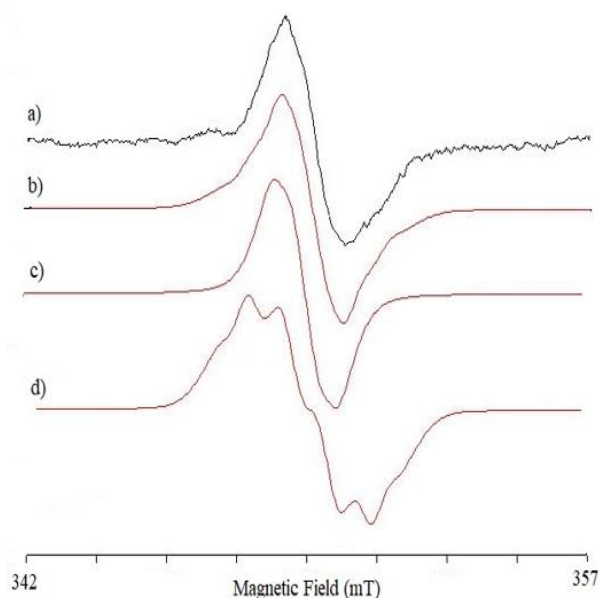


Figure 3. a) The EPR spectrum of 15 kGy irradiated PAH sample
 b) Simulation of the spectrum
 c) Simulation of radical (radical I)
 d) Simulation of radical (radical II)

When the EPR spectrum of CLP irradiated with gamma at 15 kGy was examined at room temperature, four signals with g values of $g_{I1}= 2.0237$, $g_{I2}= 2.0184$, $g_{I3}=2.0134$ and $g_{I4}= 1.9997$ were calculated, respectively (Fig.2a). Additionally the spectrum centered at $g = 2.0128$ with a spacing of 5.3

mT. It was found that gamma irradiation caused the generation of $\text{-N}\dot{\text{C}}\text{H-}$ (radical I) and $\text{-NCH}_2\dot{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$ (radical II) radicals in the CLP sample. The simulation spectrum of radical I given in Fig. 2c was obtained using $a_{\text{N}} = 1.95$ mT, $a_{\text{CH}} = 0.66$ mT and linewidth $\Delta H = 0.52$ mT. The g value of radical I was calculated as $g = 2.0100$. In the spectrum with a g value of $g = 2.0100$, three signals are seen due to the interaction of the unpaired electron with the ^{14}N nucleus. Since the hyperfine coupling constant of the a_{CH} is approximately equal to the linewidth of the spectrum, it has been determined that it does not make a significant contribution to the spectrum given in Fig. 2c. The contribution of the $\text{-N}\dot{\text{C}}\text{H-}$ radical to the experimental spectrum was calculated as 26%. The 6 mT broadening spectrum of radical II, whose contribution to the experimental spectrum was calculated as 74%, is given in Fig 2d. As a result of irradiation, it was thought that $\text{-NCH}_2\dot{\text{C}}\text{H}_2\text{-}$ radical was formed with the abstraction of a hydrogen from the methyl group in the structure. In a study in which EPR analysis of gamma-irradiated progesterone molecule was performed, it was determined that $\text{-CH}_2\dot{\text{C}}\text{H}_2\text{CH-}$ radical was formed in the structure as a result of irradiation (Sütçü, 2018). The unpaired electron interacts with two magnetically identical methylene protons with a 1:2:1 intensity distribution. Since the hyperfine coupling constants of both magnetically identical protons bonded to the adjacent carbon and the ^{14}N nucleus are smaller than the linewidth ($\Delta H = 0.45$ mT) value of the spectrum, they do not cause splits in the simulated spectrum. These interactions only contributed to the broadening of the lines (Osmanoğlu et al., 2017). The simulated spectrum of the radical II, whose g value was measured as 2.0108, was obtained using $a^1_{\alpha}=a^2_{\alpha}=0.9$ mT, $a^1_{\beta}=a^2_{\beta}=0.25$ mT and $a_{\text{N}}=0.33$ mT values. These a_{N} values agree well with those derived from the $\text{CH}_2\dot{\text{C}}\text{HNHCNHNH}$ radical in $\text{N}\alpha$ -carbamyl-L-arginine (Zincircioglu et al., 2006).

The experimental and simulated spectra of the gamma-irradiated PAH sample are given in Fig. 3a and Fig. 3b., respectively. The formation of the experimental spectrum in singlet structure with g value $g = 2.0087$ is caused by the interaction of two radicals. It is seen that this calculated g value is quite compatible with the literature (Ambroz et al., 2000; Varshney and Dodke, 2004; Çolak et al., 2006). The simulated spectrum of radical I, one of the radicals contributing to the experimental spectrum, is given in Fig. 3c. It has been determined that the α -proton and ^{14}N nucleus contribute to the simulated spectrum which g value and linewidth were calculated as $g = 2.0092$ and $\Delta H = 0.54$ mT, respectively. These a_{N} values agree well with those derived from the $\text{CH}_2\dot{\text{C}}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ radical in N -carbamoyl-L-glutamic acid single crystals (Osmanoğlu et al., 2005)

In this context, the paramagnetic species originating in Fig. 3c have been attributed to the $\text{-N}\dot{\text{C}}\text{H-}$ radical. The simulation spectrum were obtained by using hyperfine coupling constants $a_{\text{CH}} = 0.58$ mT and $a_{\text{N}} = 0.42$ mT. Since the measured hyperfine coupling constants are very close to the linewidth value, a singlet signal is obtained. Another paramagnetic species formed in the gamma-irradiated PAH sample was determined as the $\text{-N}\dot{\text{C}}\text{HCH}_2\text{-}$ (radical II) radical. The g -value and linewidth of the simulated spectrum (Fig. 3d) extending to a region of 7.3 mT were measured as 2.0103 and $\Delta H = 5.3$ mT, respectively. The $\text{N}\dot{\text{C}}\text{HCH}_2$ radical was formed by the removal of a hydrogen from the methylene group as a result of irradiation. The unpaired electron interacts with one α -proton, two magnetically identical β -protons and one ^{14}N nucleus. The simulated spectrum contributed by radical II was obtained by using $a_{\alpha} = 1.19$ mT, $a^1_{\beta} = a^2_{\beta} = 0.78$ mT and $a_{\text{N}} = 0.87$ mT hyperfine coupling constants. Similar values of the hyperfine coupling constants of α - protons have been found in the gamma-irradiated powders of ethyl 2-methyl-4-(2,6 dichlorophenyl)-5-oxo-7-phenyl-1,4,5,6,7,8 hexahydroquinoline-3-carboxylate at ambient temperature as 1.24 mT (Şimşek et al., 2017). It has been calculated by the simulation software that radical I contributes 52% and radical II contributes 48% to the experimental simulation exhibited in Fig. 3b.

CONCLUSION

In this study, the structures of free radicals formed in 15 kGy irradiated CLP and PAH drug raw materials were reported using EPR spectroscopy. The idea of having two different radicals in both samples as a result of irradiation has matured, with highly compatible simulations being obtained. Analysis of the experimental and simulated spectra revealed that $\cdot\text{N}\dot{\text{C}}\text{H}$ - and $\cdot\text{NCH}_2\dot{\text{C}}\text{H}_2$ -radicals were formed in the CLP sample, and $\cdot\text{N}\dot{\text{C}}\text{H}$ - and $\cdot\text{N}\dot{\text{C}}\text{HCH}_2$ - radicals were formed in the PAH sample. In the pharmaceutical industry; EPR spectroscopy will yield very productive results in determining the structures of free radicals that will occur in the chemical structures of drugs as a result of the destructive effect of radiation used to sterilize drugs. As a result, similar studies including EPR spectroscopy examinations of drug samples will be helpful in examining similar radical structures.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grant No. ZGEF.15.007 of research Fund of Dicle University (DUBAP).

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

Kerem SÜTÇÜ: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing- Original Draft, Writing- Review & Editing, Visualization, Supervision.

Yunus Emre OSMANOĞLU: Conceptualization, Methodology, Resources, Data Curation, Writing- Original Draft, Writing- Review & Editing, Visualization, Supervision.

Both authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Al-Tamrah, S., & Al-Abbad, S. (2015). Spectrophotometric determination of procainamide hydrochloride using sodium periodate. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(5), 609-613.
- Ambrož, H. B., Kornacka, E. M., Marciniak, B., Ogródowczyk, M., & Przybytniak, G. K. (2000). EPR study of free radicals in some drugs γ -irradiated in the solid state. *Radiation Physics and Chemistry*, 58(4), 357-366.
- Ambrož, H., Kornacka, E., Marciniak, B., & Przybytniak, G. (2002). Radical decay in irradiated drugs: Flutamide, ifosfamide. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 254(2), 293-298.
- Aydin, M., Baskan, M. H., & Emre Osmanoglu, M. Y. (2009). EPR study of gamma induced radicals in amino and iminodiacetic acid derivatives. *Brazilian Journal of Physics*, 39, 583-586.
- Aydin, M., Osmanoglu, Y. E., & Başkan, M. H. (2008). Electron paramagnetic resonance of γ -irradiated glycyl-L-glutamine monohydrate, iminodiacetic acid and methyliminodiacetic acid. *Radiation Effects & Defects in Solids*, 163(1), 47-53.
- Bakare-Odunola, M. T., Mustapha, A., & Abdu Aguye, I. (2008). Effect of Nigerian meals on the pharmacokinetics of chlorpropamide in type II diabetic patients. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 33, 31-35.
- Başkan, M. H., Aydın, M., & Osmanoglu, Ş. (2010). Investigation of ^{60}Co γ -irradiated l-(–) malic acid, N-methyl-dl-valine and l-glutamic acid γ -ethyl ester by electron paramagnetic resonance technique. *Journal of Molecular Structure*, 983(1-3), 200-202.
- Başkan, M. H., Osmanoglu, Y. E., Sütçü, K., Aydın, M., & Osmanoglu, Ş. (2015). Radiation effect studies in single crystal of Trifluoroacetyl- α -Aminoisobutyric acid. *Radiation Effects & Defects in Solids*, 170(10), 854-861.
- Çolak, Ş., & Korkmaz, M. (2004). Kinetics of the radicals induced in gamma irradiated sulfafurazole: an EPR study. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 59(7-8), 481-487.
- Çolak, Ş., Maquille, A., & Tilquin, B. (2006). Chemical analysis applied to the radiation sterilization of solid ketoprofen. *Radiation Effects & Defects in Solids*, 161(1), 75-80.

- Damian, G. (2003). EPR investigation of γ -irradiated anti-emetic drugs. *Talanta*, 60(5), 923-927.
- Desrosiers, M. F. (1996). Current status of the EPR method to detect irradiated food. *Applied Radiation and Isotopes*, 47(11-12), 1621-1628.
- Ece, E., Tasdemir, H. U., Biyik, R., Ozmen, A., & Sayin, U. (2022). Paramagnetic characterization and dosimetric properties of Airfix drug and its ingredients (Montelukast sodium, Sorbitol): An EPR and DFT study. *Radiation Physics and Chemistry*, 195, 110082.
- Iweala, E. E., & Okeke, C. U. (2005). Comparative study of the hypoglycemic and biochemical effects of *Catharanthus roseus* (Linn) g. apocynaceae (Madagascar periwinkle) and chlorpropamide (diabinese) on alloxan-induced diabetic rats. *Biokemistri*, 149-156.
- Karakaş Sarıkaya, E., Ateş, L., Sayin, U., Ozmen, A., & Dereli, Ö. (2018). Experimental and theoretical research on γ -irradiated 7-methoxy-4-methylcoumarin powder through EPR and DFT methods. *Radiation Effects and Defects in Solids*, 173(5-6), 377-387.
- Kasumov, V. T., Taş, E., Kartal, I., Uçun, F., Köksal, F., Çukurovali, A. (2001). Complexation of metal ions with 3, 5-di-tert-butyl-1, 2-benzoquinone-1-monooxime, ESR studies of radical intermediates. *Journal of Coordination Chemistry*, 52(3), 207-227.
- Köseoğlu, R., Köseoğlu, E., & Köksal, F. (2003). Electron paramagnetic resonance of some γ -irradiated drugs. *Applied radiation and isotopes*, 58(1), 63-68.
- Murrieta, H. S., Munoz, E. P., Adem, E., Burillo, G., Vazquez, M., & Cabrera, E. B. (1996). Effect of irradiation dose, storage time and temperature on the ESR signal in irradiated oat, and corn and wheat. *Applied Radiation and Isotopes*, 47(11-12), 1657-1661.
- NIH. 2012. Public Electron Paramagnetic Resonance Software Tools, <https://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/tox-pharm/tools/index.cfm>.
- Osmanoğlu, Ş., Aydın, M., & Başkan, M. H. (2005). EPR of gamma-irradiated L-glutamine hydrochloride and N-carbamoyl-L-glutamic acid. *Zeitschrift für naturforschung A*, 60(7), 549-553.
- Osmanoğlu, Y. E., Sütçü, K., & Osmanoğlu, Ş. (2017). Radiation effect studies on some glycine derivatives in solid state. *Radiation Effects & Defects in Solids*, 172(7-8), 621-628.
- Sayın, Ü. (2013). EPR analysis of gamma irradiated single crystal cimetidine. *Journal of Molecular Structure*, 1031, 132-137.
- Sezer, M. Ö., Kaplan, N., & Sayin, U. (2017). ESR analysis of natural and gamma irradiated coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds. *Radiation Effects & Defects in Solids*, 172(11-12), 815-823.
- Sütçü, K. (2018). EPR investigation of damage centers formed in some drug powders irradiated with gamma rays. *Journal of Molecular Structure*, 1163, 1-3.
- Sütçü, K. (2019). Gama ile Işınlanmış Etosüksimid Numunesinin Radyasyon Duyarlılığının Elektron Paramanyetik Rezonans Spektroskopisi Yöntemiyle İncelenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(2), 800-810.
- Şimşek, R., Gündüz, M. G., Şafak, C., Kökpınar, Ö., & Aydın, M. (2017). Free radicals properties of some gamma-irradiated organic compounds. *Bulgarian Chemical Communications*, 49(1), 82-86.
- Tokatli, A., Uçun, F., Sütçü, K., Osmanoğlu, Y. E., Osmanoğlu, Ş. (2018). Spectral analysis and quantum chemical studies of chair and twist-boat conformers of cycloheximide in gas and solution phases. *Journal of Molecular Structure*, 1154, 428-436.
- Varshney, L., & Dodke, P. B. (2004). Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization. *Radiation Physics and Chemistry*, 71(6), 1103-1111.
- Zhang, H. M. (2015). Investigation on the EPR parameters and local structure for the Cu^{2+} center in ZnAl_2O_4 spinel. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 389, 176-179.
- Zincircioğlu, S. B., Canoruç, N., Osmanoğlu, Ş., Başkan, M. H., Dicle, I. Y., & Aydın, M. (2006). Electron paramagnetic resonance of some γ -irradiated amino acid derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung A*, 61(10-11), 577-582.

Atf İçin: Erdal Altıntaş, Ö. (2023). Yenilebilir ve Tıbbi Mantar *Hericum erinaceus*'un Besin Bileşimi, Antioksidan Aktiviteleri ve Anti-kanser Etkisinin Değerlendirilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2622-2633.

To Cite: Erdal Altıntaş, Ö. (2023). Evaluation of Nutritional Composition, Antioxidant Activities and Anti-cancer Effect of Edible and Medicinal Mushroom *Hericum erinaceus*. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2622-2633.

Yenilebilir ve Tıbbi Mantar *Hericum erinaceus*'un Besin Bileşimi, Antioksidan Aktiviteleri ve Anti-kanser Etkisinin Değerlendirilmesi

Özlem ERDAL ALTINTAŞ^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Yüksek protein, karbonhidrat, diyet lifi ve glukan içeriği
- Yüksek antioksidan kapasite
- Antioksidan kapasite ile fenolik ve flavonoid içerik arasında pozitif korelasyon
- A549 ve HT-29 hücrelerine karşı inhibisyon etkisi

Anahtar Kelimeler:

- antioksidan
- antikanser aktivite
- besin kompozisyonu
- fenolik içerik
- *Hericum erinaceus*

ÖZET:

Mantarlar antik çağlardan itibaren besin bileşimleri ve tıbbi özellikleri sayesinde ilgi görmektedir. Son yıllarda mantar ekstrelerinin antioksidan bileşikleri, ilaç ve gıda endüstrilerinde sentetik antioksidan maddelerin alternatif kaynağı haline gelmiştir. Bu kapsamda araştırmacılar yenilebilir ve tıbbi özellikteki mantarlarla daha fazla ilgilenmeye başlamışlardır. Bu araştırmanın amacı ise, ticari olarak satın alınan *Hericum erinaceus* mantarının besin bileşimi, antioksidan potansiyeli, fenolik ve flavonoid içeriğini ortaya çıkarmak ayrıca A549 (akciğer adenokarsinomu) HT-29 (insan kolon adenokarsinomu) hücrelerine karşı antikanser etkisini değerlendirmektir. Bu bağlamda, besin bileşimi Association of Official Analytical Chemists (AOAC) prosedürüne uygun olarak analiz edilmiştir. *Hericum erinaceus* protein, karbonhidrat, diyet lifi ve glukan içeriği ile yüksek bir besin değeri göstermiştir. Bu mantarın su, etanol ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri belirlenmiş ve metanol ekstrelerinin üç ekstre türü arasında en yüksek fenolik (27.12±1.05 mg GAE/ g ekstre) ve flavonoid (13.48±1.13 mg QE/g ekstre) içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, ekstrelerin antioksidan kapasitesi farklı yöntemlerle (DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC) karşılaştırılmıştır. Metanol ekstreleri diğer ekstreler arasında en yüksek DPPH (38.88±1.59 µM TE/g ekstre), FRAP (21.44±0.79 µM TE/g ekstre) ve CUPRAC (30.05±1.80 µM TE/g ekstre) aktivitelerini gösterirken, etanol ekstreleri için ABTS (24.44±1.07 µM TE/g ekstre) aktivitesi en yüksek olarak belirlenmiştir. Son olarak, bu ekstrelerin A549 ve HT-29 hücrelerine karşı antikanser etkileri değerlendirildiğinde, 24 saatin sonunda su, etanol ve metanol ekstrelerinin A549 hücrelerini sırasıyla %49.08, %52.08 ve %57.91 oranında HT-29 hücrelerini ise %52.82, %63.71 ve %71.07 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir.

Evaluation of Nutritional Composition, Antioxidant Activities and Anti-cancer Effect of Edible and Medicinal Mushroom *Hericum erinaceus*

Highlights:

- High protein, carbohydrate, dietary fiber and glukan content
- High antioxidant capacity
- Positive correlation between antioxidant capacity and phenolic and flavonoid content
- Inhibition effect against A549 and HT-29 cells

Keywords:

- antioxidant
- anticancer activity
- nutritional composition
- phenolic content
- *Hericum erinaceus*

ABSTRACT:

Mushrooms have attracted interest since ancient times due to their nutritional composition and medicinal properties. In recent years, the antioxidant compounds of mushroom extracts have become a source of alternative synthetic antioxidant substances in pharmaceutical and food industries. In this context, researchers have become increasingly interested in edible and medicinal mushrooms. The aim of this study was to determine the nutritional composition, antioxidant potential, phenolic and flavonoid content of commercially purchased *Hericum erinaceus* mushroom and to evaluate its anticancer effect against A549 (lung adenocarcinoma) and HT-29 (human colon adenocarcinoma) cells. In this context, the nutrient composition was analyzed according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) procedure. *Hericum erinaceus* showed a high nutritional value with protein, carbohydrate, dietary fiber and glukan content. The total phenolic and total flavonoid contents of water, ethanol and methanol extracts of this mushroom were determined and it was found that the methanol extract had the highest phenolic (27.12±1.05 mg GAE/g extract) and flavonoid (13.48±1.13 mg QE/g extract) contents among the three extract types. In addition, the antioxidant capacity of the extracts was compared by different methods (DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC). Methanol extract showed the highest DPPH (38.88±1.59 µM TE/g extract), FRAP (21.44±0.79 µM TE/g extract) and CUPRAC (30.05±1.80 µM TE/g extract) activities among the other extracts, while ABTS (24.44±1.07 µM TE/g extract) activity was the highest for ethanol extract. Finally, when the anticancer effects of these extracts against A549 and HT-29 cells were evaluated, it was observed that water, ethanol and methanol extracts inhibited A549 cells by 49.08%, 52.08% and 57.91% and HT-29 cells by 52.82%, 63.71% and 71.07%, respectively, at the end of 24 hours.

¹Özlem ERDAL ALTINTAŞ (Orcid ID: 0000-0003-4680-1738), Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şuhut Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İğdır, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Özlem ERDAL ALTINTAŞ, e-mail: ozlem.altintas@afsu.edu.tr

GİRİŞ

Son zamanlarda, farklı geleneksel gıda ürünlerinin yeniden değerlendirilmesi, beslenme alışkanlıkları, sağlığa faydaları ve yaşam kalitesiyle ilgili konularla bağlantılı olarak yerel biyoçeşitlilikten elde edilen doğal ürünlerin tüketimi artmıştır. 21. yüzyıl tüketicilerinin bakış açısına göre gıda sadece hayatta kalma ve enerji kaynağı olarak düşünülmemelidir. Hipokrat'ın da ifadesi gereği gıdanın ilaç, ilacın da gıda olarak değerlendirilmesi gerekir. (El-Sheika ve ark., 2018). Son on yılda farklı geleneksel gıda ürünleri yeniden değerlendirilmiş ve bunların sağlığa faydaları tüketicilerin dikkatini çekmiştir. Bu nedenle, yenilebilir ve tıbbi mantarlar gibi sağlık durumunu korumaya yardımcı olabilecek gıda ürünlerinin tüketilmesi dünya çapında dikkat çekmiş, beslenme ve mutfak kullanımlarında bir trend haline gelmiştir (Abdelahafy ve ark., 2022). Mantarlar, besin değerleri, eşsiz aromaları ve tatları da dahil olmak üzere duyuşsal özellikleri, mikro elementler ve biyoaktif metabolitlerin kaynağı olmaları nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Popüler mutfak kültüründe mantarların kullanımı daha da araştırılmış ve sağlık toniklerine, çaylara ve bitkisel formüllere dahil edilmiştir (Boa, 2004; Rosa ve ark., 2020; Maity ve ark., 2021). Dünya çapında yaklaşık 15.000 mantar türü bilinmekte, bunların yaklaşık 2000'i insan tüketimi için kullanılmakta ve 700'den fazlası ise tıbbi özellikler taşımaktadır (Rai ve ark., 2005). Bununla birlikte, <100 tür ticari olarak yetiştirilmekte ve gıda için endüstriyel ölçekte değerlendirilmektedir (El-Sheika ve ark., 2018; Gong ve ark., 2020; Pérez-Montes ve ark., 2021). Ayrıca, küresel mantar pazarının 2020 yılında 46.1 milyar ABD doları olduğu ve 2021'den 2028'e kadar yıllık %9.5'lik bir büyüme oranına sahip olduğu tahmin edilmektedir (Grand View Research, 2021). Bu da yenilebilir mantarların dünya çapında güçlü bir tarımsal sanayi sektörü olduğunu vurgulamaktadır.

Mantarlar yeni nesil sağlıklı gıda bileşenleri olarak kabul edilmektedir (Das ve ark., 2021). Gıda ve ilaç endüstrisi mantarları gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, kafeik asit, ferulik asit ve mirisetin gibi fenolik bileşiklerin kaynağı olarak araştırmaktadır (Pérez-Montes ve ark., 2021). Ayrıca, biyoaktif bileşiklerin bolluğu nedeniyle biyoteknoloji endüstrisi, endüstriyel işlemlerden sonra yan ürünlerinden değerli fonksiyonel molekülleri geri kazanmak için mantarları araştırmaktadır (Ramos ve ark., 2019). Mantarlar dünya çapında büyük miktarlarda tüketilmektedir ve zengin biyoçeşitlilikleri, yeni gıdalar üretmek için tarımsal endüstriyel işlemlere olan ilgiyi artırmaktadır.

Ticari olarak yetiştirilen önemli bir yenilebilir ve tıbbi mantar türü olan "Aslan Yelesi" olarak adlandırılan *Hericium erinaceus* besin ve sağlık açısından faydaları nedeniyle Asya ülkelerinde yaygın olarak tüketilmektedir ve geleneksel Çin tıbbında uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. Bu tür, kanser, depresyon, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli ciddi hastalıkların azaltılmasına, önlenmesine ve hatta tedavisine katkıda bulunabilmektedir (Friedman, 2015). *Hericium erinaceus*'un ana aktif bileşenleri polisakkaritler, terpenoidler (özellikle bu türe özgü olan hericenones ve erinacines), steroidler, alkaloidler, laktonlar ve bazı fenolik bileşiklerden oluşmaktadır. Bu bileşikler antikanser aktivite ve immünomodülasyondan sorumlu olup nöroprotektif etkileri sayesinde sinir sisteminin işleyişini birçok düzeyde (öğrenme ve hafıza süreçlerinin desteklenmesi ve nörogenезin uyarılması) desteklemektedir (Ma ve ark., 2010; Tachabenjarong ve ark., 2022). Ayrıca, *Hericium erinaceus* içeren ürünler Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. *Hericium erinaceus* mantarı, sağlığı geliştirici özelliklerinin yanı sıra, özellikle Asya ülkelerinde tadı için de değerlidir (Khan ve ark., 2013). Şimdiye kadar, fonksiyonel ürünler ve tedavi edici geleneksel tıbbi ürünlerde *Hericium erinaceus* içeren sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada yerel biyoçeşitlilikten elde edilebilecek doğal ürünlerin güvenli tüketimini artırmak ve sağlığa faydalı etkilerini belirlemek

amacıyla *Hericium erinaceus*'un makro besin maddeleri, antioksidan kapasitesi ve antikanser aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Hericium erinaceus mantarı AGROMA Gıda Tarım Hayvancılık Sanayi Ticaret Limited Şirketi'nden (Denizli, Türkiye) ticari olarak satın alınmıştır. Bu çalışma kapsamında kullanılan *Hericium erinaceus* 2022 yılında hasat edilmiştir.

Besin Bileşimi Analizleri

Kurutulmuş ve öğütülmüş *Hericium erinaceus* mantarının kül, toplam protein, toplam karbonhidrat, yağ, toplam diyet lifi (TDL) ve glukoz içeriğini içeren yaklaşık besin bileşimi Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC) prosedürüne göre belirlenmiştir. *Kül içeriği*, numunenin kül fırınında yakılmasıyla analiz edilmiştir (Yöntem 930.22, AOAC 2012). *Toplam protein içeriği*, Kjeldal yöntemi ile belirlenen toplam azot içeriği üzerinden değerlendirilmiştir (AOAC, 2007). *Toplam karbonhidrat içeriği* ise DuBois ve ark. (1956) tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak belirlenmiş ve standart olarak saf glukoz kullanılmıştır. *Yağ içeriği*, soxhlet sisteminde ekstraksiyon yoluyla analiz edilmiştir (Yöntem 920.39, AOAC 2012). *Diyet lifi içeriği*, toplam diyet lifi (TDL), çözümlü diyet lifi ve çözünmez diyet lifi içeriği olarak AOAC'ye göre K-TDFR-100A (Megazyme Int., Dublin, İrlanda) kit ile belirlenmiştir (Yöntem 991.43, AOAC, 2007). Sonuçlar g/100 g ekstre olarak ifade edilmiştir. *Glukoz içerikleri* ise, β -glukoz Test Kiti (Mantar ve Maya) (Megazyme Int., Dublin, İrlanda) kullanılarak toplam, α - ve β -glukoz içerikleri olarak belirlenmiştir. Sonuçlar g/100 g ekstre olarak ifade edilmiştir.

Ekstre elde edilmesi

Kurutulmuş *Hericium erinaceus* (He) laboratuvar blenderı ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz halindeki numune 1:20 (g/mL) oranında sıvı (su, %50 sulu etanol ve %50 sulu metanol) içinde karıştırılmış ve karışımlar 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ultrasonikasyona tabi tutulmuştur. Karanlık koşullarda ve oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı (540 rpm) üzerinde 24 saat boyunca katı-sıvı ekstraksiyonuna bırakılmıştır. Belirtilen sürenin sonunda ekstraktlar santrifüjlenmiş (15 dakika boyunca 5000 g) ve Whatman No:1 filtreden geçirilmiştir. Çözümlü döner buharlaştırıcı (Heidolph Laborota 4000) ile tamamen buharlaştırılmış ve ardından örnekler liyofilize edilmiştir. Bu işlem sonunda, *Hericium erinaceus* su ekstresi (He-dH₂O), %50 (v/v) sulu etanol ekstresi (He-EtOH) ve %50 v/v metanol ekstresi (He-MeOH) olmak üzere üç farklı ekstre hazırlanmış ve deneysel aşamalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin değerlendirilmesi

Hericium erinaceus ekstraktlarının (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiş ve gallik asit standart olarak kullanılmıştır ($R^2=0.9974$). Sonuçlar mg gallik asit/g ekstre eşdeğeri (mg GAE/g ekstre) olarak ifade edilmiştir (Gamez-Meza ve ark., 1999). Ekstrelerin toplam fenolik içeriği ise, AlCl₃ kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiş ve Quercetin standart olarak kullanılmıştır ($R^2=0.9967$). Bulgular, mg Quercetin/ g ekstre eşdeğeri (mg QE/g ekstre) olarak ifade edilmiştir (Chang ve ark., 2002).

İn vitro antioksidan kapasite

DPPH radikal süpürme aktivitesi: *Hericium erinaceus* ekstraktlarının (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) DPPH radikal süpürme aktivitesi Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından belirtilen yöntem

kullanılarak belirlenmiştir. 4×10^{-4} M konsantrasyonda taze hazırlanmış metanol içerisinde DPPH çözeltisi her bir ekstre ile 4:1 (v/v) oranında karıştırılmış ve inkübasyon sonrası 517 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. DPPH radikal süpürme aktivitesi, Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitenin (TEAC) ($\mu\text{M TE/g}$ ekstre) bir fonksiyonu olarak ifade edilmiştir.

ABTS radikal süpürme aktivitesi: *Hericium erinaceus* ekstralarının (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) ABTS radikal katyon süpürme aktivitesi, Re ve ark. (1999) tarafından belirtilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. İlk olarak, ABTS stok çözeltisi ABTS⁺ elde etmek için K₂S₂O₈ ile reaksiyona tabi tutulmuştur. Karışım karanlıkta ve oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir. Her bir ekstre ABTS⁺ çözeltisi ile 1:10 v/v oranında karıştırılmıştır. Elde edilen reaksiyon karışımının karanlık koşullarda ve oda sıcaklığında inkübasyonu sonrası 734 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. ABTS radikal katyon süpürme aktivitesi Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitenin (TEAC) ($\mu\text{M TE/g}$ ekstre) bir fonksiyonu olarak ifade edilmiştir.

Ferrik indirgeyici antioksidan güç aktivitesi: *Hericium erinaceus* ekstralarının (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) ferrik indirgeyici antioksidan güç aktivitesi Benzie & Strain (1996) yöntemine göre belirlenmiştir. Her bir ekstre 1:9 v/v oranında FRAP çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım 37 °C'de karanlık koşullarda inkübe edilmiş ve 593 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitenin (TEAC) ($\mu\text{M TE/g}$ ekstre) bir fonksiyonu olarak ifade edilmiştir.

Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite: *Hericium erinaceus* ekstralarının (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi Apak ve ark. (2004) tarafından belirtilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak değerlendirilmiştir. Birer mL CuCl₂ çözeltisi (1.0×10^{-2} M), neocuproin çözeltisi (7.5×10^{-3} M) ve NH₄OOCCH₃ tampon çözeltisi (1M) (pH: 7.0) bir test tüpünde karıştırılmıştır. Her bir ekstre 1:10 v/v oranında su ile karıştırılarak elde edilen reaksiyon karışımına eklenmiştir. İnkübasyon sonrası 450 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Sonuçlar Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitenin (TEAC) ($\mu\text{M TE/g}$ ekstre) bir fonksiyonu olarak ifade edilmiştir.

İn vitro antikanser aktivite

Hücre Kültürü ve Hücre Hattı: *In vitro* çalışmalarda HT-29 (ATCC HTB-38) (insan kolon adenokarsinomu) ve A549 (ATCC CCL-185) (akciğer adenokarsinomu) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler yüksek glukoz içeren ve %10 fetal sıgır serumu ve %1 antibiyotik solüsyonu ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içinde kültüre edilmiştir.

Hericium erinaceus ekstralarının (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) sitotoksik özelliği HT-29 ve A549 hücrelerinde MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir (Khodavirdipour ve ark., 2021) Kısaca, %70-80 konfluensdeki hücreler tripsinize edilmiş ve 96 kuyucuklu bir plakaya 1×10^6 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekilmiştir. 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde gece boyu inkübe edildikten sonra, medium kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH ekstraları seri olarak iki kat seyreltilmiş bir konsantrasyonda (1000-62.5 $\mu\text{g/mL}$) kuyucuklara ilave edilmiştir. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, medium uzaklaştırılarak her bir kuyudan çıkarılmış, MTT reaktifi (Sigma-Aldrich®, Almanya) ilave edilmiş ve 37 °C'de %5 CO₂'de iki saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra MTT reaktifi aspire edilmiş, formazan kristallerini çözmek için DMSO ilave edilerek plaka oda sıcaklığında 5 dakika boyunca çalkalanmıştır. ELISA çok fonksiyonlu mikropilaka okuyucuda (Thermo Scientific™ Multiskan Go™, ABD) 570 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. İşlem görmemiş hücreler (mantar ekstresi içermeyen) negatif kontrol olarak kullanılırken, DMSO ile muamele edilmiş hücreler blank kontrolü olarak kullanılmıştır. Her

deney üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin (%) inhibisyon etkisi “Eşitlik 1.” ile belirlenmiştir.

$$(\%)İnhibisyon = [A570 \text{ nm örnek} \div A570 \text{ nm kontrol}] \times 100 \quad (1)$$

İstatistiksel analiz

Sonuçlar Ortalama±SD olarak ifade edilmiştir. İn vitro test verileri One-Way ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Veriler %95 güven aralığında (CI) ortalama olarak sunulmuştur. A, P değerlerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

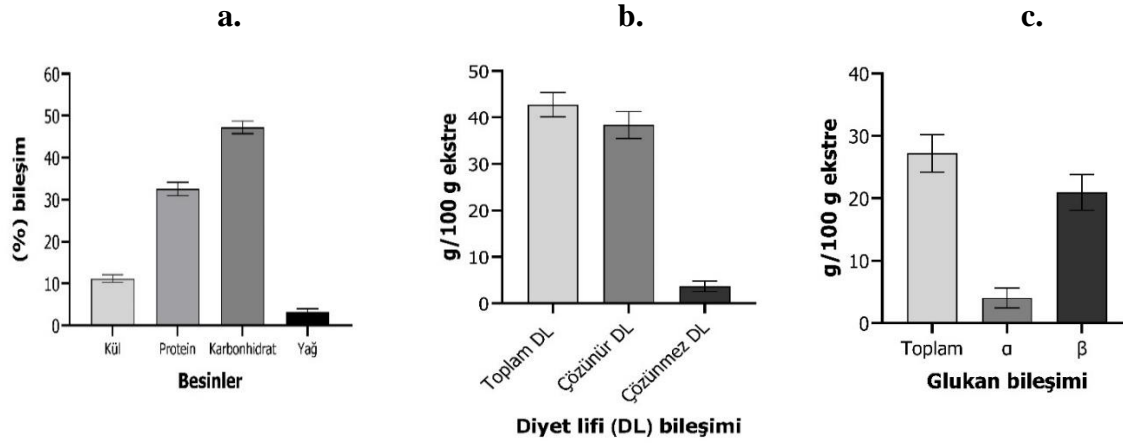
BULGULAR ve TARTIŞMA

Besin Bileşimi

Mantarlar çok eski zamanlardan beri tıbbi değerlerinin yanı sıra besinsel faydaları nedeniyle de tüketilmektedirler. *Hericium erinaceus* mantarının besin bileşimi Şekil 1'de verilmiştir. Bu yenilebilir ve tıbbi mantarın AOAC prosedürlerine göre yaklaşık %11.19 kül, %32.54 protein, %47.23 karbonhidrat ve %3.16 yağ içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. *Hericium erinaceus* mantarının düşük miktarda yağ ve yüksek miktarda protein içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Besin içeriği türlere ve kültür koşullarına göre değişmekle birlikte genel olarak yenilebilir mantarların çoğu (%35-70) karbonhidrat, (%15-34.7) protein, (%10) yağ ve (%6-10.9) mineral içermektedir (Assemie & Abaya 2022). Günümüzde yenilebilir mantarlar özellikle alternatif bir hayvansal protein kaynağı olarak daha fazla tercih edilmektedir. Bu kapsamda *Hericium erinaceus* mantarı önemli bir protein kaynağı olarak değerlendirilebilir. Atila ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada bazı tarımsal ve endüstriyel atıklar kullanılarak kültüre edilen *Hericium erinaceus* mantarının besin bileşimi analiz edilmiş ve kül içeriği %5.3-8.6 protein içeriği %12.57-14.74 arasında değiştiği belirlenmiştir. Mori ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Hericium erinaceus* mantarının %41.1 protein, %38.0 karbonhidrat, %4.4 yağ içerdiği bulunmuştur. Çeşitli lignoselülozik atıklar üzerinde kültüre edilen *Hericium erinaceus* mantarının ise kül içeriğinin %7.69-8.16, protein içeriğinin %6.0-11.6 arasında olduğu belirlenmiştir. Kültür koşulları ve analiz yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak *Hericium erinaceus*'un besin bileşiminde kısmi farklılıklar gözlemlenmekle birlikte bu çalışma kapsamında elde edilen besin bileşiminin genel olarak literatürde yer alan çalışmalarla uyum içinde olduğu görülmektedir.

Mantarlar hem diyet lifi hem de hücre duvarlarının fonksiyonel bir bileşeni olan glukanlar açısından oldukça zengin gıda kaynakları olarak değerlendirilmektedir (Ahmed ve ark., 2023; Shamin ve ark., 2023). *Hericium erinaceus* mantarının diyet lifi (toplam diyet lifi, çözünür diyet lifi ve çözünmez diyet lifi) ve glukan içeriği (toplam, α ve β) Şekil 1b ve 1c'de verilmiştir. 100 gram *Hericium erinaceus*'un 42.74 g toplam diyet lifi içerdiği ve bu bileşimin ise 38.41 g çözünmez diyet lifi, 3.69 g çözünür diyet lifinden oluştuğu bulunmuştur. 100 g *Hericium erinaceus*'un toplam glukan içeriği 27.20 g toplam diyet lifi içerdiği ve bu bileşimin ise 20.95 g β -glukan ve 4.04 g α -glukandan oluştuğu bulunmuştur. Liu ve ark. (2022)'nin yaptığı bir çalışmada *Hericium erinaceus*'un %88.93 toplam diyet lifi, %4.16 çözünür diyet lifi ve %84,67 çözünmez diyet lifi içerdiği belirlenmiştir. Chen ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Hericium erinaceus*'un %68.0 β -glukan, %93.0 toplam karbonhidrat, %0.6 yağ, %0.9 protein ve %2.3 kül içerdiği belirlenmiştir. Egwim ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışmada *Hericium erinaceus* mantarının %32.89±0.093 kül, %1.29±1.20 yağ, %16.76±0.21 lif, %41.13±0.58 protein ve %15.00±0.18 toplam karbonhidrat içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Rodrigues ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada Nijerya'dan toplanan

Hericium erinaceus mantarının besin bileşimi analiz edilmiş ve bu mantarın 10.11 ± 0.5 nem, 18.8 ± 0.1 protein, 61.3 ± 0.0 toplam karbonhidrat ve 2.9 ± 0.1 yağ içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Koutrotsios ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise kayın talaşında kültüre edilen *Hericium erinaceus* mantarının 2.87 ± 0.27 protein, 0.16 ± 0.02 yağ, 0.60 ± 0.03 lif, 0.92 ± 0.02 kül, 6.06 ± 0.30 toplam karbonhidrat, 1.65 ± 0.01 glukan içerdiği ve bu glukan içeriğinin ise 0.09 ± 0.01 'nin α -glukandan, 1.56 ± 0.02 'sinin ise β -glukandan oluştuğu analiz edilmiştir. Hassan (2077)'in yaptığı çalışmada ise farklı lignoselülozik atıklarda (talaş, pirinç, buğday ve bunların karışımı) kültüre edilen *Hericium erinaceus* mantarının besin bileşimi analiz edilmiş ve besin bileşimin ortama göre farklılık gösterdiği değerlendirilmiştir. edilen *Hericium erinaceus* mantarının en yüksek nem içeriğinin talaş ve buğday kepeği ortamında (91.05), en yüksek protein içeriğinin buğday kepeği ortamında (28.80) en yüksek yağ içeriğinin talaş ve buğday kepeği ortamında (4.21) ve en yüksek toplam karbonhidrat içeriğinin ise talaş ve buğday kepeği ortamında (60.82) olduğunu bulunmuştur.

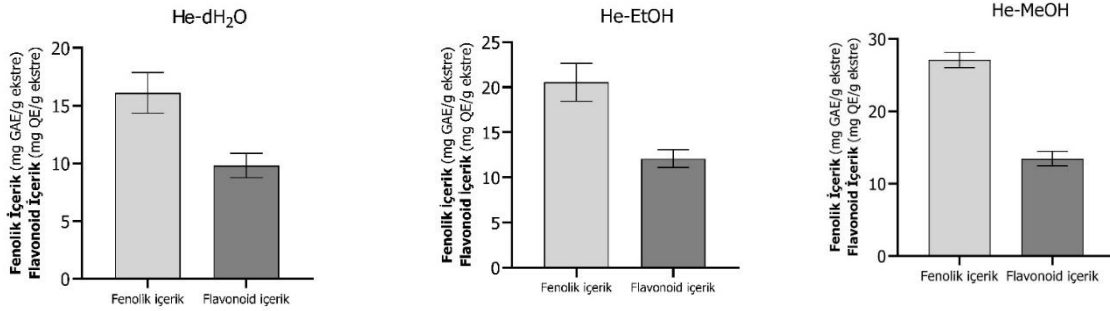


Şekil 1. *Hericium erinaceus* 'un a. Besin, b. Diyet Lifi ve c. Glukan Bileşimi

Toplam fenolik ve flavonoid içerik

Yenilebilir mantarlar özellikle fenolik ve flavonoid içerik açısından zengin kaynaklar olup bu bileşenleri sayesinde birçok dejeneratif hastalıkların tedavisinde takviye olarak kullanılmaktadır. Bu biyoaktif bileşenler antioksidan ve diğer biyolojik aktiviteler gibi insan sağlığı için potansiyel avantajları sayesinde, daha iyi sağlık koşulları sağlamak için fonksiyonel gıdalar, nutrasötik ajanlar olarak daha fazla ilgi görmektedir. Bu kapsamda değerlendirilmek için yeni ve kolay elde edilebilen fenolik bileşenler üzerinde araştırmalar da artmıştır (Fagarasi ve ark., 2020; Abdelshafy ve ark., 2022). *Hericium erinaceus* ekstrelerinin (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği Şekil 2'de verilmiştir. Belirtilen ekstrelerin toplam fenolik içeriğinin 16.10-27.12 mg GAE/g ekstre, toplam flavonoid içeriğinin ise 9.81-13.48 mg QE/g ekstre arasında değiştiği belirlenmiştir. Üç ekstre içerisinde He-MeOH ekstresinin en yüksek fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Kopylchuk ve ark. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada *Hericium erinaceus* etanol ekstresinin toplam fenolik içeriği 41.28 mg GAE/g ekstre, flavonoid içeriği ise 7.91 mg QE/g ekstre olarak belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise farklı büyüme dönemlerindeki (14, 21 ve 28. gün) *Hericium erinaceus* ham ekstresinin toplam fenolik içeriği 0.85-0.90 mg GAE/g ekstre ve toplam flavonoid içeriği 2.92-3.66 mg CE/g ekstre olarak belirlenmiştir (Tachabenjarong ve ark., 2022). Koutrotsios ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise kayın talaşında kültüre edilen *Hericium erinaceus* mantarının toplam fenolik içeriği 3.24 ± 0.42 GAE/g ekstre olarak belirlenmiştir. Rodrigues ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Hericium erinaceus* ham ekstresinin toplam fenolik

içeriği analiz edilmiş ve 734.0 ± 4.0 mg cathecol/g kuru ekstre olarak toplam fenolik içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Genel olarak, polifenol içeriği kullanılan çözücüye bağlı olarak değişmektedir. Literatürde etanol ve metanol gibi organik çözücülerinde daha yüksek fenolik bileşen verimleri elde edilmiştir. Araştırmamızda elde edilen sonuçlar literatürle uyum içerisindedir ve çözücü olarak etanol veya metanol kullanılması *Hericium erinaceus* fenolik ve flavonoid içeriğinin verimli bir şekilde elde edilmesinde iyi bir seçim olduğu bulunmuştur.



Şekil 2. *Hericium Erinaceus* Ekstrelerinin (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği

Antioksidan kapasite

Reaktif oksijen türleri (ROS) organizmalarda oksidatif hasar nedeni olarak bilinmektedir. Mantarlar, içerdikleri biyoaktif bileşikler (polisakkaritler, fenolik ve flavonoid bileşikler) sayesinde antioksidan potansiyele sahip olup oksidatif hasarın onarılmasına yardımcı olmaktadır (Tachabengjarong ve ark., 2022; Yu ve ark., 2023). Bu nedenle doğal antioksidan kaynak olarak mantarların değerlendirilmesi birçok çalışmanın ilgi odağı olmuştur. Çalışma kapsamında *Hericium erinaceus* ekstrelerinin (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) antioksidan kapasitesi dört farklı antioksidan test (DDPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC) ile değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. *Hericium Erinaceus* Ekstrelerinin *İn Vitro* Antioksidan Aktivite Değerleri

Mantar Ekstreleri	DPPH (μ M TE/g ekstre)	ABTS (μ M TE/g ekstre)	FRAP (μ M TE/g ekstre)	CUPRAC (μ M TE/g ekstre)
He-dH ₂ O	17.15 \pm 1.83	13.22 \pm 0.97	19.13 \pm 1.57	22.07 \pm 1.09
He-EtOH	25.58 \pm 1.22	24.44 \pm 1.07	13.71 \pm 1.63	10.94 \pm 0.85
He-MeOH	38.88 \pm 1.59	23.07 \pm 1.46	21.44 \pm 0.79	30.05 \pm 1.80

DPPH radikal süpürme aktivitesi: Tüm ekstrelerin DPPH radikallerine karşı etkili süpürücüler olduğu bulunmuştur. He-MeOH ekstresi en yüksek radikal süpürme aktivitesi gösterirken, He-dH₂O ekstresi en düşük radikal süpürücü olmuştur.

ABTS radikal süpürme aktivitesi: Tüm ekstreler ABTS radikal süpürme aktivitesi göstermiştir ve He-EtOH ekstresinin tüm ekstreler içerisinde en yüksek ABTS radikal süpürme aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Ferrik indirgeyici antioksidan güç aktivitesi: He-MeOH ve He-EtOH ekstrelerinin He-dH₂O ekstresinden daha yüksek bir FRAP aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite: Tüm ekstreler içerisinde He-MeOH ekstresi en yüksek bakır indirgeyici antioksidan etki gösterirken, He-dH₂O ekstresi en düşük etkiye sahip olmuştur.

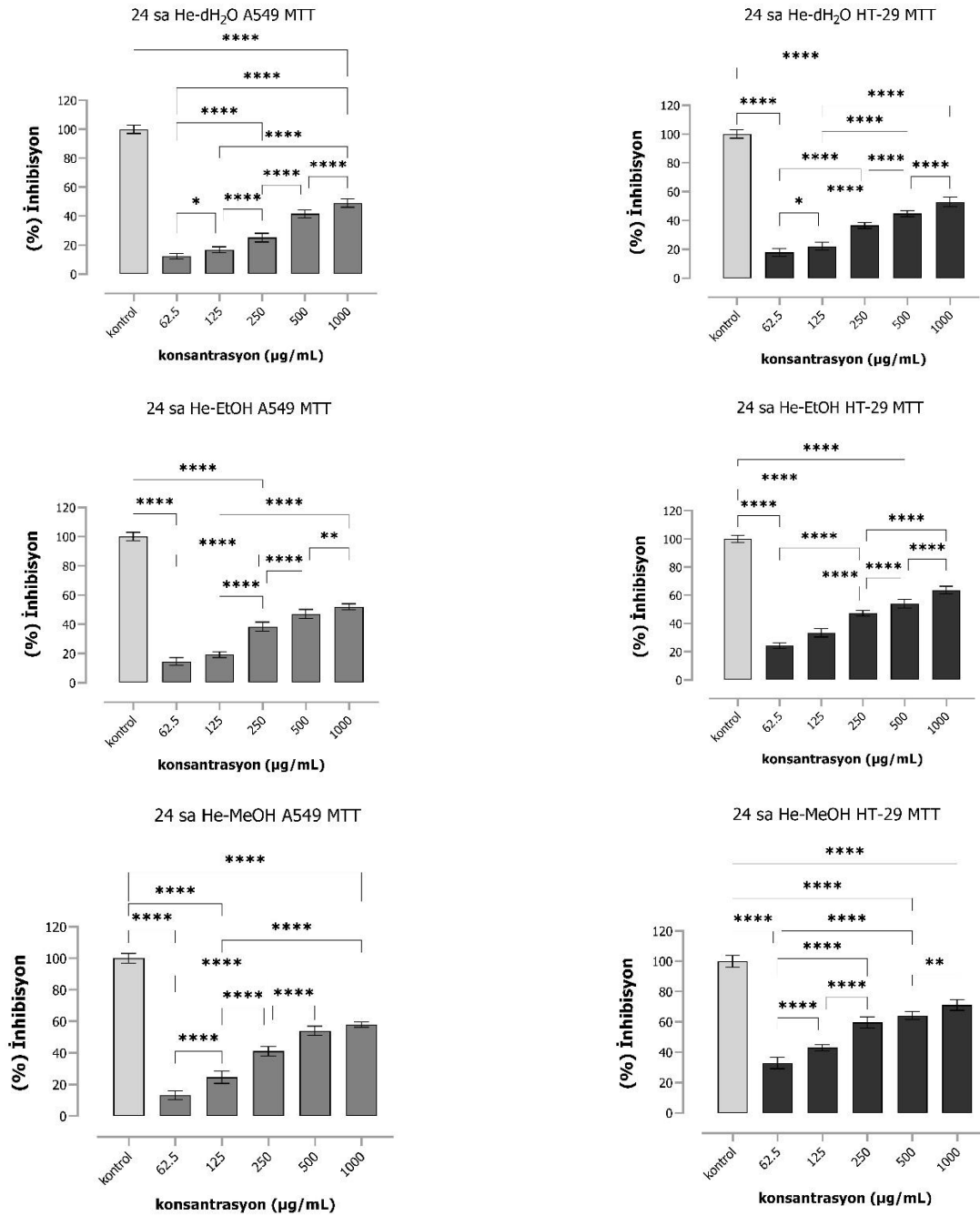
Mantarlardaki fenolik bileşiklerin nicel ve nitel özellikleri, ekstrelerin antioksidan aktivitesini belirlemektedir. Birçok çalışma, mantar çeşitlerinin antioksidan aktivitesinin fenolik bileşiklerin içeriği ile güçlü bir pozitif korelasyona sahip olduğunu doğrulamıştır (Abd Razak ve ark., 2019; Contato ve ark., 2020). Bu durum fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarını süpürme yeteneği ile ilişkilendirilebilir. *Hericium erinaceus* ekstrelerinden özellikle Hp-MeOH ekstresinin hem DPPH, FRAP ve CUPRAC antioksidan kapasitesinin en yüksek olduğu hem de toplam fenolik içeriğinin diğer ekstrelerden en yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasındaki pozitif korelasyon bir kez daha doğrulanmıştır.

Szydłowska-Tutaj ve ark. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada *Hericium erinaceus* etanol ve PBS ekstrelerinin antioksidan kapasite değerlendirilmiş ve etanol ekstresinin DPPH radikallerine karşı antioksidan aktiviteye sahip olmadığı, 0.71mg TE/g ekstre ABTS ve 0.3 mg TE/g ekstre FRAP etkinliğine sahip olduğu belirlenmiştir. PBS ekstresinin ise 0.20 mg TE/g ekstre DPPH, 1.02 mg TE/g ekstre ABTS ve 0.21 mg TE/g ekstre FRAP etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. Diğer bir çalışmada ise *Hericium erinaceus* ham ekstresinin FRAP antioksidan kapasitesinin 2.12-3.97 µmol TE/g ekstre arasında değiştiği belirlenmiştir (Atila ve ark., 2018).

İn vitro antikanser aktivite

Hericium erinaceus ekstrelerinin (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) sitotoksik özelliği iki farklı kanser hücresinde (A549 ve HT-29) değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir. 24 saat boyunca, ekstrelerin konsantrasyonundaki artışla birlikte A549 ve HT-29 hücrelerine karşı inhibisyon yüzdelerin arttığı görülmekte ve buna göre, her üç ekstrenin en yüksek konsantrasyonun (1000 µg/mL) A549 ve HT-29 hücrelerine karşı en yüksek anti-kanser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. He-dH₂O ekstresinin en yüksek konsantrasyonda A-549 hücrelerini %49.08, HT-29 hücrelerini ise %52.92 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. He-EtOH ekstresinin en yüksek konsantrasyonunda A-549 hücrelerinin %52.08'i, HT-29 hücrelerinin %63.71'i inhibe olmaktadır. He-MeOH ekstresinin ise en yüksek konsantrasyonunda A-549 hücrelerinde %57.91, HT-29 hücrelerinde %71.07 inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Genel olarak her üç ekstre de HT-29 hücrelerinde A-549 hücrelerine göre daha etkin bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

Literatürde *Hericium erinaceus*'un farklı hücrelere karşı anti-kanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Li ve ark. (2014) *Hericium erinaceus* ekstresinin 2.50±0.25, 0.80±0.08, 1.25±0.06 ve 5.00±0.22 mg/ml IC₅₀ ile sırasıyla karaciğer kanseri HepG2 ve Huh-7, kolon kanseri HT-29 ve mide kanseri NCI-87 hücrelerine karşı konsantrasyona bağlı in vitro sitotoksikite sergilediğini belirlemiştir. Bir başka çalışmada ise, *Hericium erinaceus* ekstresinin HeLa (serviks kanseri) hücrelerine karşı antikanser aktiviteye (IC₅₀ > 100 µg/mL) sahip olduğu belirlenmiştir (Darmasıwı ve ark., 2022). Wang ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ise kemoterapi ilacı 5-Flourourasil (5-Fu) ile birlikte uygulanan *Hericium erinaceus* kaynaklı immünomodülatör fungal proteinlerin yardımcı antitümör etkilerini değerlendirilmiş ve *Hericium erinaceus* kaynaklı immünomodülatör fungal proteinlerin, immün enflamatuvar yanıtı ve homeostazı iyileştirerek 5-Fu'nun antitümör etkinliğini destekleyebileceği gösterilmiştir.



Şekil 3. *Hericium Erinaceus* Ekstrelerinin (He-dH₂O, He-EtOH ve He-MeOH) A549 (akciğer adenokarsinomu) ve HT-29 (insan kolon adenokarsinomu) Hücreleri Üzerindeki Sitotoksite Sonuçları

SONUÇ

Tüketicilere daha sağlıklı gıdalar sunma eğilimi arttıkça, yeni fonksiyonel ve biyoaktif bileşikler üzerine yapılan araştırmalar da ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada, yenilebilir ve tıbbi mantar *Hericium erinaceus*'un düşük yağ, yüksek protein, karbonhidrat, diyet lifi ve glukan içeriği sayesinde ham makrofungus biyokütlenin bir besin takviyesi olarak kullanılabilme potansiyeli ortaya konulmuştur. *Hericium erinaceus* mantarı, önemli sağlık etkileri olan doğal diyet takviyeleri elde etmek için ideal bir yaklaşım olabilir. Ayrıca, *Hericium erinaceus* ekstreleri arasında, antioksidan analizlerinin en iyi sonuçları metanol ekstresinde gözlenmiştir. Toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriklerinin de metanol ekstresinde en yüksek değere sahip olduğu ve dolayısıyla fenolik ve flavonoid

içeriğın antioksidan aktivite ile pozitif bir korelasyon içerisinde olduğu bulunmuştur. Bu bağlamda, bu ekstre endüstriyel amaçlarla kullanılan bazı sentetik antioksidanların yerini alabilecek bir potansiyele sahiptir. A549 ve HT-29 hücreleri üzerindeki antikanser etkisinin değerlendirilmesi ile özellikle metanol ekstresinin akciğer ve kolon kanseri hastaları için yeni bir tedavi yaklaşımında kullanılabilceğı ortaya konmuştur. Elde edilen bu umut verici sonuçlar ışığında, bu mantar ekstresinin hem bir besin takviyesi olarak hem de anti-kanser tedavilerinde terapötik bir ajan olarak kullanılması için yeni nanoformülasyonlar tasarlanabilir; böylece biyoaktiviteleri, kontrollü salınımları ve biyoyararlanımlarının yanı sıra depolama, hazırlama ve tüketim boyunca stabiliteyi korunabilir.

KAYNAKLAR

- Abd Razak, D.L., Mohd Fadzil, N.H., Jamaluddin, A., Abd Rashid, N.Y., Sani, N.A. & Abdul Manan, M. (2019). Effects of Different Extracting Conditions on Anti-Tyrosinase and Antioxidant Activities of Schizophyllum Commune Fruit Bodies. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101116. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101116>
- Abdelshafy, A.M., Belwal, T., Liang, Z., Wang, L., Li, D., Luo, Z. & Li, L. (2022). A comprehensive review on phenolic compounds from edible mushrooms: Occurrence, biological activity, application and future prospective, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62:22, 6204-6224.
- Ahmed, A.F., Mahmoud, G.A-E., Hefyz, M., Liu, Z. & Ma, C. (2023). Overview on the edible mushrooms in Egypt. *Journal of Future Foods*, 3(1), 8-15.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S.E. (2004). A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: The CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Assemie, A., & Abaya, G., (2022). The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry, *International Journal of Microbiology*, 2022(7), Article ID 8744788.
- Association of Official Analytical Chemists. (2012). *Official Methods of Analysis*, 19th edition, Washington, DC.
- Association of Official Analytical Chemists. (2017). *Official Methods of Analysis*, 18th edition, Arlington, VA, USA.
- Atila, F., Tuzel, Y., Fernández, J.A., Cano, A.F. & Sen, F. (2018). The effect of some agro– industrial wastes on yield, nutritional characteristics and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* isolates. *Scientia Horticulturae*, 238, 246-254, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.049>
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Boa, E. (2004). Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182
- Chen, S.N., Chang, C.S., Yang, M.F., Chen, S., Soni, M. & Mahadevan, B. (2022). Subchronic toxicity and genotoxicity studies of *Hericium erinaceus* β -glucan extract preparation, *Current Research in Toxicology*, 3, 100068, <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2022.100068>
- Contato, A.G., Inácio, F.D., de Araújo, C.A.V., Brugnari, T., Maciel, G.M., Haminiuk, C.W.I., Bracht, A., Peralta, R.M. & de Souza, C.G.M. (2020). Comparison between the aqueous extracts of mycelium and basidioma of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*: chemical composition and antioxidant analysis. *Food Measure*, 14, 830–837.

- Darmasıwı, S., Aramsırırujıwet, Y. & Kımkong, I. (2022). Biological activities and chemical profile of *Hericium erinaceus* mycelium cultivated on mixed red and white jasmine rice. *Food Science and Technology*, 42, e08022.
- Das, A.K., Nanda, P.K., Dandapat, P., Bandyopadhyay, S., Gullón, P., Sivaraman, G.K., McClements, D.J., Gullón, B., & Lorenzo, J.M. (2021). Edible mushrooms as functional ingredients for development of healthier and more sustainable muscle foods: A flexitarian approach. *Molecules*, 26(9), 2463.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- El Sheikha, A.F. & Hu, D-M. (2018). How to trace the geographic origin of mushrooms? *Trends Food Science Technology* 78, 292–303.
- Egwim, E.C., Elem, R.C., & Egwuiche, R.U. (2011). Proximate composition, phytochemical screening and antioxidant activity of ten selected wild edible Nigerian mushrooms. *American Journal of Food And Nutrition*, 1(2), 89-94.
- Fogarasi, M., Diaconeasa, Z.M., Pop, C.R., Fogarasi, S., Semeniuc, C.A., Fărcaș, A.C., Țibulcă, D., Sălăgean, C.-D., Tofană, M. & Socaci, S.A. (2020). Elemental Composition, Antioxidant and Antibacterial Properties of Some Wild Edible Mushrooms from Romania. *Agronomy*, 10, 1972. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121972>
- Friedman, M. (2015). Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7108–7123.
- Gamez-Meza, N., Noriega-Oriega-Rodriguez, J.A., Medina-Juarez, L.A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., & Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 14-45.
- Gong, P., Wang, S., Liu, M., Chen, F., Yang, W., Chang, X., Liu, N., Zhao, Y., Wang, J. & Chen, X. (2020). Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*, 494, 108037
- Grand View Research. Mushroom market size & trends analysis report, 2021–2028. Accessed 10 Dec 2021. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/mushroom-market>
- Hassan, F.R.H. (2007). Cultivation of the Monkey Head Mushroom (*Hericium erinaceus*) in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(10), 1229-1233.
- Khan, M.A., Tania, M., Liu, R. & Rahman, M.M. (2013). *Hericium erinaceus*: An edible mushroom with medicinal values. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 10, 253–258.
- Khodavirdipour, A., Zarean, R., & Safaralizadeh, R. (2021). Evaluation of the Anti-cancer Effect of *Syzygium cumini* Ethanolic Extract on HT-29 Colorectal Cell Line. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 52, 575-581.
- Koutrotsios, G., Larou, E., Mountzouris, K.C., Zervakis, G.I. (2016). Detoxification of Olive Mill Wastewater and Bioconversion of Olive Crop Residues into High-Value-Added Biomass by the Choice Edible Mushroom *Hericium erinaceus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(2),195-209.
- Kopylchuk, H.P., Voloshchuk, O. M. & Pasailiuk, M.V. (2023). Comparison of total amino acid compositions, total phenolic compounds, total flavonoid content, β -carotene content and hydroxyl radical scavenging activity in four wild edible mushrooms. *Italian Journal of Mycology*, 52, 112-125.
- Li, G., Yu, K., Li, F., Xu, K., Li, J., He, S., Cao, S. & Tan, G. (2014). Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(2), 521-530. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.003>
- Liu, T., Wang, N., Xu, X. & Wang, D. (2022). Effect of high quality dietary fiber of *Hericium erinaceus* on lowering blood lipid in hyperlipidemia mice. *Journal of Future Foods*, (2), 1, 61-68, <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.018>

- Ma, B.J., Shen, J.W., Yu, H.Y., Ruan, Y., Wu, T.T. & Zhao, X. (2010). Hericenones and erinacines: Stimulators of nerve growth factor (NGF) biosynthesis in *Hericium erinaceus*. *Mycology*, 1, 92–98.
- Maity, P., Sen, I.K., Chakraborty, I., Mondal, S., Bar, H., Bhanja, S.K., Mandal, S. & Maity, G.N. (2021). Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 408–417.
- Mori, K., Inatomi, S., Ouchi, K., Azumi, Y. & Tuchida, T. (2009). Improving Effects of the Mushroom Yamabushitake (*Hericium erinaceus*) on Mild Cognitive Impairment: A Double-blind Placebo-controlled Clinical Trial. *Phytotherapy Research*, 23, 367–372.
- Pérez-Montes, A., Rangel-Vargas, E., Lorenzo, J.M., Romero, L. & Santos, E.M. (2021). Edible mushrooms as a novel trend in the development of healthier meat products. *Current Opinion In Food Science*, 37, 118–124.
- Rai, M., Tidke, G. & Wasser, S.P. (2005). Therapeutic potential of mushrooms. *Natural Product Radiance*, 4(4), 246–257.
- Ramos, M., Burgos, N., Barnard, A., Evans, G., Preece, J., Graz, M., Ruthes, A.C., Jiménez-Quero, A., Martínez-Abad, A., Vilaplana, F., Ngoc, L.P., Brouwer, A., van der Burg, B., Garrigós, M.D.C. & Jiménez, A. (2019). *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds. *Food Chemistry*, 292, 176–187.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yan, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.,
- Rodrigues, D.M.F., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T.A.P. Vasconcelos, M.W., Roiz, M., Rodriguez-Alcala, L.M., Gomes, A.M.P., Duarte, A.C. (2015). Chemical composition and nutritive value of *Pleurotus citrinopileatus* var *cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. salmoneo stramineus*, *Pholiota nameko* and *Hericium erinaceus*. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6927–6939.
- Rosa, G.B., Sganzerla, W.G., Ferreira, A.L.A., Xavier, L.O., Veloso, N.C., da Silva, J., Oliveira, G.P., Amaral, N.C., Veeck, A.P.L. & Ferrareze, J.P. (2020). Investigation of nutritional composition, antioxidant compounds, and antimicrobial activity of wild culinary-medicinal mushrooms *Boletus edulis* and *Lactarius deliciosus* (Agaricomycetes) from Brazil. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(10), 931–942.
- Shamim, M.Z., Mishra, A.K., Kausar, T., Mahanta, S., Sarma, B., Kumar, V., Mishra, P.K., Panda, J., Baek, K.-H. & Mohanta, Y.K. (2023). Exploring Edible Mushrooms for Diabetes: Unveiling Their Role in Prevention and Treatment. *Molecules* 28, 2837. <https://doi.org/10.3390/molecules28062837>
- Szydłowska-Tutaj, M., Szymanowska, U., Tutaj, K., Domagała, D. & Złotek, U. (2023). The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta. *Antioxidants* 12, 738.
- Tachabenjarong, N., Rungsardthong, V., Ruktanonchi, U., Poodchakarn, S., Thumthanaruk, B., Vatanyoopaisarn, S., Suttisintong, K., Iempridee, T. & Uttapap, D. (2022). Bioactive compounds and antioxidant activity of Lion's Mane mushroom (*Hericium erinaceus*) from different growth periods. *Research, Invention, and Innovation Congress- E3S Web Conf.* 355, 02016. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202235502016>
- Yu, Y., Liu, Z., Song, K., Li, L. & Chen, M. (2023). Medicinal value of edible mushroom polysaccharides: a review, *Journal of Future Foods*, 3(1), 16-23, <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.09.003>

Mısırozü Yağı ve Zeytinyağında Hekzanal Tayini

Nur ÇELİK¹, Tahir YÜCEL¹, İsa CAVIDOĞLU^{1*}

Öne Çıkanlar:

- 40°C'de her iki matris için en iyi SPME ekstraksiyon süresi 20 dk olarak belirlenmiştir.
- 50°C'de her iki matris için en iyi ekstraksiyon süresi 20 dk olarak belirlenmiştir.
- 60°C'de en iyi ekstraksiyon süresi mısırozü yağı için 40 dk, zeytinyağı için 30 dk olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- Hekzanal
- Katı faz mikroekstraksiyon (SPME)
- Mısırozü yağı
- Zeytinyağı

ÖZET:

Bu çalışmada, mısırozü yağı ve zeytinyağında oksidasyon göstergesi olarak kullanılan hekzanalın Katı Faz Mikroekstraksiyon (SPME) yöntemiyle tespiti araştırılmıştır. Hekzanal ile internal standart (IS) olarak kullanılan 5-metil 2-hekzanon arasındaki doğrusal ilişkinin düzeyini belirlemek üzere, matris olarak kullanılan mısırozü yağı ve zeytinyağına farklı oranlarda hekzanal ve IS eklenerek SPME yöntemi uygulanmış ve daha sonra değişkenler arasındaki ilişki, regresyon denklemi ve korelasyon katsayılarının (R^2) belirlenmesi ile değerlendirilmiştir. Mısırozü yağı ve zeytinyağı için uygulanan koşullarda en uygun sıcaklık ve süre koşulunun belirlenmesi için R^2 değerlerine bakılmıştır. R^2 değerleri dikkate alındığında, 40°C ve 50°C sıcaklıklarda mısırozü yağı ve zeytinyağında en yüksek hekzanal ekstraksiyon etkinliğine 20 dk'da ulaşıldığı saptanmıştır. 60°C'deki ekstraksiyon sıcaklığında ise en yüksek SPME etkinliği mısırozü yağı ve zeytinyağı için sırasıyla 40 dk ve 30 dk'da saptanmıştır. Tüm sonuçlar topluca değerlendirildiğinde mısırozü yağı ve zeytinyağında hekzanal analizi için 40°C'de 20 dk ekstraksiyon süresinin en uygun koşul olduğu saptanmıştır. Çalışmada hekzanal analizinde IS olarak 5-metil 2-hekzanonun kullanılabilmesi tespit edilmiştir. Mısırozü yağı ve zeytinyağında gaz kromatografisi (GC)-SPME yöntemi ile hekzanalın belirleme limitinin 5 ppb'ye kadar düşürülebileceği saptanmıştır.

Hexanal Analysis in Corn Oil and Olive Oil

Highlights:

- The best SPME extraction time was determined as 20 min for both matrices at 40°C.
- The best extraction time was determined as 20 min for both matrices at 50°C.
- The best extraction time at 60°C was determined as 40 min for corn oil and 30 min for olive oil.

Keywords:

- Hexanal
- Solid Phase micro-extraction (SPME)
- Corn oil
- Olive oil

ABSTRACT:

In this study, the analysis of hexanal which is known as oils oxidation indicator by Solid Phase Micro-Extraction (SPME) have been investigated in corn and olive oils. In order to determine the level of linearity between hexanal and 5-methyl 2-hexanone which is used as internal standard (IS), various ratios of hexanal and IS were added to corn and olive oils, and by applying the SPME technique the relation between variables were evaluated by regression equation and correlation coefficient (R^2). In order to determine the optimum temperature and time conditions in corn and olive oils, R^2 values have been evaluated. According to the R^2 values, it was found that the highest hexanal extraction efficiency in corn and olive oils at 40°C and 50°C have been achieved in 20 min extraction. At 60°C, the highest SPME efficiency in corn oil and olive oil have been observed in 40 and 30 min, respectively. The overall evaluation of data showed that the most appropriate condition for hexanal extraction from corn and olive oils was 20 min extraction at 40 °C. In this study it was also found that 5-methyl 2-hexanone could be used as IS for hexanal analysis. Gas chromatography (GC)-SPME analysis of corn and olive oils showed that the hexanal detection limit could extend down to 5 ppb.

¹ Nur ÇELİK (Orcid ID: 0009-0004-7888-6777), Tahir YÜCEL (Orcid ID: 0000-0003-0688-9499), İsa CAVIDOĞLU (Orcid ID: 0000-0001-7896-5871), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 65080, VAN, TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İsa CAVIDOĞLU, e-mail: isacavidoglu@yyu.edu.tr

Bu çalışma Nur ÇELİK'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Farklı kaynaklardan elde edilen yağlar, karbonhidrat ve proteinlerle birlikte beslenmemizde önemli bir yer tutmaktadır. Yağlar yüksek enerji kaynağı olmalarının yanında, elzem yağ asitleri ve önemli vitaminleri bünyelerinde taşımaları nedeniyle beslenmemizin vazgeçilmez öğeleri arasında yer almaktadırlar. İnsan sağlığı için gerekli olan doymamış yağ asitlerinin oksidasyona karşı duyarlı olmaları yağların kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Gıdalardaki oksidasyon reaksiyonları; ışık, nem, sıcaklık, serbest radikaller, metal iyonları ve enzimler gibi reaksiyonu başlatan unsurların varlığında gerçekleşen bir dizi tepkimelerin bütünüdür. Başlangıç, gelişme ve bitiş olmak üzere üç aşamadan oluşan bu zincir reaksiyonunun sonunda hidroperoksitler ve uçucu bileşenler ortaya çıkmaktadır. Oksidasyonun gelişme aşamasında bu zincir reaksiyonu hızlanır ve oksidasyonun birincil ürünleri olan hidroperoksitlerin oluşumu artırmaktadır. Oksidasyonun bitiş aşamasında ise serbest radikaller kendi aralarında reaksiyona girerek stabil radikaller meydana getirirler. Hidroperoksitler; hidrokarbon, aldehit, alkol ve ketonlar gibi ikincil oksidasyon ürünlerine dönüşürler (Hamilton, 1995; Gunstone ve ark., 1995; Hamilton ve ark., 1997; Kayahan, 2002; Pignoli ve ark., 2009).

Doymamışlık düzeyleri, trigliserit yapıları, antioksidan ve prooksidanların varlığı yağların oksidasyonunu etkileyen başlıca etmenlerdir. Peroksit sayısı yağlarda oksidasyon düzeyinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir göstergedir. Ortaya çıkan peroksitler kararlı yapıda olup sonraki aşamalarda parçalanmıyorlar ise oksidasyonun göstergesi olarak kullanılabilirler. Yağların oksidasyonu sonucu oluşan peroksit değeri, konjuge -dien ve -trienler oksidasyonun birincil ürünlerini oluştururken, ikincil oksidasyon ürünlerini anisidin, malonaldehit (MAD) ve tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren reaktif maddeler (TBARS) oluşturmaktadır (Brunton ve ark., 2000; Ma ve ark., 2014). Yağlarda oksidasyon düzeyini ve tadın kabul edilebilirliğinin bir belirteci olarak hekzanal içeriği de kullanılmaktadır (Pignoli ve ark., 2009). Hekzanal, esas olarak linoleik asidin parçalanması sonucu oluşan 6 karbonlu doymuş bir aldehittir (Mariutti ve ark., 2009; Camiletti ve ark., 2023). Hekzanalın yağların depolanması sonucu oluşan başlıca bir bileşen olduğu belirtilirken; özellikle linoleik asitçe zengin olan yağlarda meydana gelen uçucu bir oksidasyon ürünü olarak değerlendirilmektedir (Chitsamphandhvej ve ark., 2008; Garcia-Martinez ve ark., 2009).

Uçucu bileşenlerinin tayininde yaygın bir şekilde kullanılan SPME; hassas, ucuz ve hızlı sonuç veren bir metottur. SPME; örneğin hazırlanması, ekstrakte edilmesi ve konsantre edilmesi gibi işlemleri tek bir basamağa indirgemektedir (Zhang ve ark., 1994; Vas & Vekely, 2004; Pawliszyn, 2012; Jalili ve ark., 2020). SPME bir fiber vasıtasıyla sıvı örnekteki uçucuların ekstraksiyonunu ya tepe boşluğundan ya da doğrudan sıvıya daldırarak sağlar (Roberts ve ark., 2000). Yöntemin prensibi, kontrollü sıcaklık koşullarında analiz edilecek örnek içerisindeki uçucu bileşenlerin kapaklı bir cam vialin tepesinde bulunan boşluğa alınması ve sonrasında da tepe boşluğunda asılı olan fibere absorbe olmasına dayanmaktadır. Fibere geçen uçucu bileşenler doğrudan GC cihazına enjekte edilerek nitel ve nicel analizleri yapılır. (Vas & Vekely, 2004; Arato ve ark., 2009; Pawliszyn, 2012).

SPME metodu, başta hekzanal olmak üzere aldehitlerin analizinde araştırmacılar tarafından sıkça kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2004; Javidipour ve Qian, 2008; Ma ve ark., 2014). Uçucu bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan diğer yöntemlerde genelde örnekteki uçucu bileşenlerin tamamen izolasyonu sağlanırken, SPME metodunda temel olarak uçucular; örnek, tepe boşluğu ve SPME fiberi arasındaki dağılıma bağlı olarak ayrışmaktadır. Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, örnek hacmi ve örnek derişimi dağılıma etki eden başlıca etmenlerdir (Spietelun ve ark., 2013). Ekstraksiyon süresi, örnek matriksi ile SPME fiberi arasında denge kurulana kadar geçen süre olup kritik bir öneme sahiptir. Tepe boşluğu ekstraksiyonu, daldırarak yapılan ekstraksiyona kıyasla daha kısa sürmektedir.

Ekstraksiyon süresi; ekstraksiyon yöntemine, ekstrakte edilecek bileşenin molekül büyüklüğüne, örnek derişimine ve fiber çeşidine bağlı olarak değişmektedir (Prosen ve Zupancic-Kralj, 1999; Spietelun ve ark., 2013). Ekstraksiyon sıcaklığı, doğru ve hassas sonuç alabilmek için önemli bir parametredir. Daha doğru sonuç alınabilmesi için ekstraksiyon boyunca sabit sıcaklık uygulanması gerekmektedir. Sıcaklık uygulaması; bileşenin kısa sürede matriksten uzaklaştırılmasına, hassasiyetinin artmasına ve ekstraksiyon süresinin kısalmasına yardımcı olmaktadır (Anonim, 2001).

Farklı çeşit ve bölgelerden temin edilen natürel zeytinyağları ile ilgili yapılan bir çalışmada SPME-GC/Kütle Spektroskopisi (MS) yöntemi kullanılarak örneklerdeki mono ve seskiterpenik hidrokarbonlar tespit edilmiştir (Vichi ve ark., 2006). Contini ve Esti (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada, zeytinyağında SPME-GC metodu ile örneklerdeki uçucu bileşenler tespit edilmiştir. Andiç ve ark. (2011), motal peyniri örneklerinde GC-SPME yöntemi ile ester, asit, keton, alkol, aldehit, stiren, p-kresol ve m-kresol olmak üzere pek çok uçucu bileşenin varlığını tespit etmişlerdir. Baştürk (2011), farklı koşullarda muhafaza edilen ayçiçeği, fındık, soya ve zeytinyağı örneklerinin hekzanal miktarını SPME-GC metodu ile belirlemiştir. Ma ve ark. (2014), SPME-GC yöntemi ile yerfıstığı, soya ve zeytinyağı örneklerindeki hekzanal miktarını tespit etmişlerdir. Maher ve ark. (2015), konvansiyonel sprey kurutucu kullanarak hazırlanan emülsiyon ve nano-emülsiyondaki lipit oksidasyon derecesinin göstergesi olan pentanal ve hekzanal miktarını tespit etmek için SPME-GC yöntemini uygulamışlardır. Kishimoto (2021), ışık altında depolanan zeytinyağının fotooksidasyonunu değerlendirmek için oksidasyonun bir göstergesi olarak zeytinyağındaki hekzanal derişimini elektronik burun ile saptamıştır.

Bu çalışmada hekzanalın 3 fazlı divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) SPME fiberi ile ekstraksiyonu üzerinde ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkileri incelenmiştir. Bunun için matriks olarak belirlenen mısırozü yağı ve zeytinyağına farklı oranlarda hekzanal (0.005 ppm, 0.05 ppm, 0.5 ppm, 2.5 ppm ve 5 ppm) ve IS eklenerek (1 ppm) belirtilen parametrelerin etkinliği tespit edilmiştir. Çalışmada hekzanal ve IS arasında uygulanan ekstraksiyon süre ve sıcaklık koşullarında, doğrusallığı gösteren denklem ve iki değişken arasındaki ilişkinin düzeyini gösteren korelasyon katsayısı (R^2) saptanarak her sıcaklık ve süre parametresi için ilgili denklem ve korelasyon katsayıları değerlendirilmiş ve en uygun ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bu çalışmada, Van ilinde bulunan marketlerden temin edilen taze mısırozü yağı ve zeytinyağı kullanılmıştır. Araştırmada, kullanılan kimyasal maddelerin bilimsel hassasiyeti sağlayacak saflıkta ve nitelikte olması sağlanmıştır. IS olarak 5-metil 2-hekzanon (Merck, Almanya) kullanılmıştır. 10.000 ppm'lik stok çözeltiler metanolde hazırlanmış ve daha sonra bu stok çözeltilerden istenen derişimlerde hekzanal (Merck, Almanya) ve IS suda seyreltilerek hazırlanmıştır.

Metot

Bu çalışmada, mısırozü yağı ve zeytinyağına metanolde hazırlanan stok hekzanal çözeltilerinden daha önce belirlenen derişimlerde suda hazırlanan çözeltilerden (0.005 ppm, 0.05 ppm, 0.5 ppm, 2.5 ppm ve 5 ppm) hekzanal ve IS çözeltisi (1 ppm) hazırlanmıştır. Çalışmada 3 fazlı SPME fiberi (Supelco, USA) kullanılmıştır. Her bir derişimde 3 farklı sıcaklık (40, 50 ve 60°C) ve sürede (20, 30 ve 40 dk) ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hekzanal ve IS arasındaki ilişkinin doğrusallığını gösteren regresyon denklemi ile iki değişken arasındaki ilişkinin düzeyini gösteren R^2 değerleri belirlenmiştir. Hekzanal alanının IS alanına oranı ve hekzanal derişiminin IS derişimine oranı

bir grafikte gösterilerek her bir koşul için ilgili regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları saptanmıştır.

Hekzanal analizi

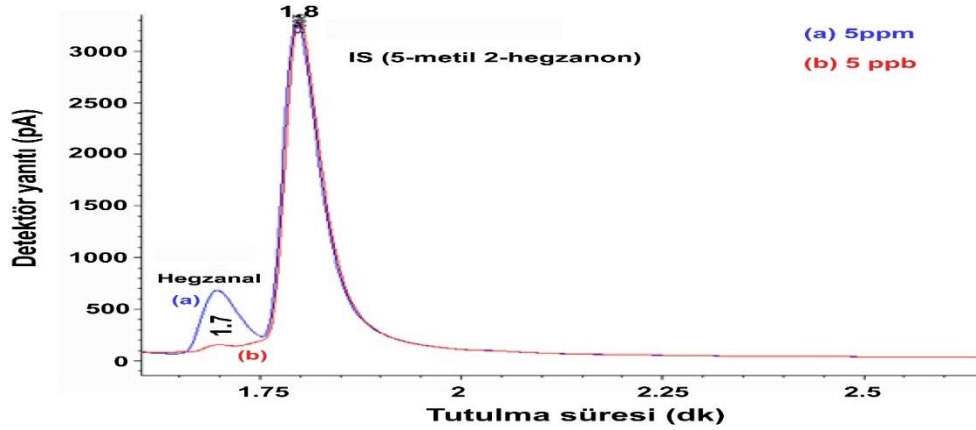
Hekzanal analizi için SPME fiberi, ekstraksiyondan önce 1 saat boyunca 250 °C'de GC (Agilent 6890N, USA) cihazının enjeksiyon bloğunda koşullandırılmıştır. 2 g yağ örneği 30 ml'lik bir cam vialde tartılmış ve örneklere belirlenen oranda hekzanal ve IS olarak bütün örnekler için sabit miktarda (1 ppm) 5-metil-2-hekzanon eklenmiştir. Vial dijital olarak sıcaklığı ayarlanabilen bir manyetik karıştırıcıda ortam sıcaklığının istenilen düzeye ulaşması için 5 dk boyunca bekletilmiştir. Sonrasında SPME fiberi vialin tepe boşluğuna yerleştirilerek daha önce belirlenen sıcaklık ve süre koşullarında hekzanalın örnekten tepe boşluğuna ve daha sonra fibere geçmesi sağlanmıştır. Ekstraksiyon sonunda SPME fiberi, absorbe olan uçucu bileşenlerin desorbe olması için Alev İyonizasyon Dedektörü (FID) ve HP-INNOWAX (30mx0.25mmx0.25µm film kalınlığı, J&W Scientific, USA) kolonu ile donatılmış GC cihazının enjeksiyon bloğuna yerleştirilmiştir. GC'de kullanılan azot, hidrojen ve kuru havanın akış hızları sırasıyla 1.5, 35 ve 350 ml/dk olarak ayarlanırken, enjektör ve dedektörün sıcaklıkları sırasıyla 250°C ve 260°C'ye ayarlanmıştır. Kolonun sıcaklığı ilk aşamada 40°C'de 5 dk ve daha sonra sırasıyla 75°C (8°C/dk) ve 220°C'ye (40°C/dk) kademeli olarak yükseltilerek, son aşamada 220°C'de 20 dk tutulmuştur. GC ile elde edilen kromatogramlardaki alanlar kullanılarak veriler değerlendirilmiştir. Bunun için hekzanalın derişiminin IS'nin derişimine oranı ile hekzanal alanının IS'nin alanına oranı bir grafiğe aktararak grafiğin regresyon denklemi ve R² değeri her bir sıcaklık ve süre için hesaplanmıştır. Böylece farklı ekstraksiyon sıcaklığı ve süreleri için elde edilen denklemlerle bilinmeyen bir yağ örneğindeki hekzanal miktarını saptamaya yarayan denklemler türetilmiştir (Javidipour ve Qian, 2008).

Veri Analizi

Verilerin analizinde; Microsoft Excel 2010 paket programı kullanılmıştır. Bu programla her bir sıcaklık ve süre koşulu için ilgili regresyon denklemleri ve R² değerleri hesaplanmıştır. R², bağımlı ve bağımsız değişken arasındaki ilişkinin derecesini ve yönünü gösteren katsayıdır. Bu katsayı, (-1) ile (+1) arasında bir değer almaktadır. Eğer; R²=1 ise iki değişken arasında pozitif tam bir ilişki vardır. Korelasyon katsayısı (R²)=-1 ise iki değişken arasında negatif tam bir ilişki vardır (Kayaalp ve Çankaya, 2008). Verilerin değerlendirilmesinde her bir sıcaklık ve süre parametresi için $y = mx + n$ gibi doğrusal regresyon denklemi türetilmiştir. Burada x bağımsız değişken olup hekzanal derişiminin IS derişimine oranı olarak ifade edilirken, y bağımlı değişken olup hekzanalın pik alanının IS pik alanına bölünmesi ile hesaplanmıştır. Böylece uygulanan sıcaklık ve sürelerde mısırozü yağı ve zeytinyağında hekzanal miktarını belirlemeye yarayan regresyon denklemleri yukarıda belirtilen parametrelerden (x ve y) yararlanılarak türetilmiştir (Javidipour ve Qian, 2008).

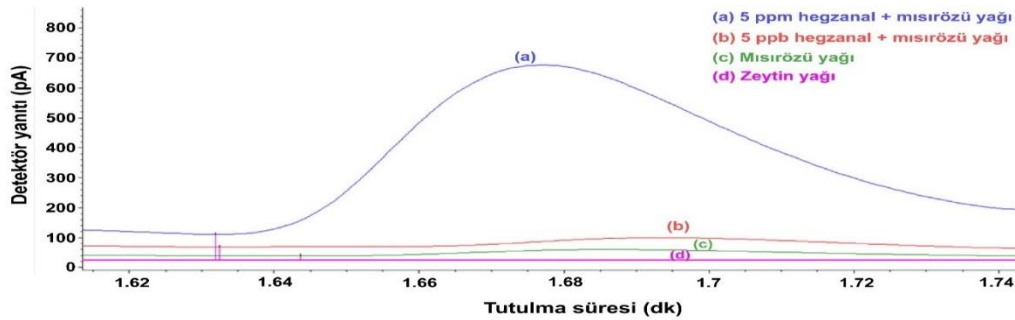
BULGULAR VE TARTIŞMA

Hekzanal ve IS Derişim/Alan ilişkisi üzerinde sıcaklık ve sürenin etkisini belirlemeden önce kromatogramdaki hekzanal ve IS'ın geliş sürelerini belirlemek üzere iki vialde iki farklı derişimde hekzanal (5 ppb ve 5 ppm) ve her iki vialde aynı derişimde IS (1 ppm) konularak örneklerin 60°C'de 40 dk ekstraksiyon koşullarında GC-SPME analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki örneğe ait kromatogramlar, karşılaştırmayı kolaylaştırmak üzere birlikte Şekil 1'de verilmektedir. Hekzanal ve IS'nin geliş sürelerinin sırasıyla 1.7 ve 1.8 dk olduğu görülmektedir. Her iki vialde aynı derişimde IS eklendiğinde IS'nın iki farklı örnekteki pikleri aynı alan ve yükseklikte olduğu görülürken, 5 ppb ve 5 ppm derişimlerdeki hekzanalın oldukça farklı pik alanlarına sahip oldukları açıkça görülmektedir.



Şekil 1. Hekzanal (5 ppb ve 5 ppm) ve IS (1 ppm) içeren örneğin ekstraksiyonu (60°C'de 40 dk) sonucu elde edilen kromatogram

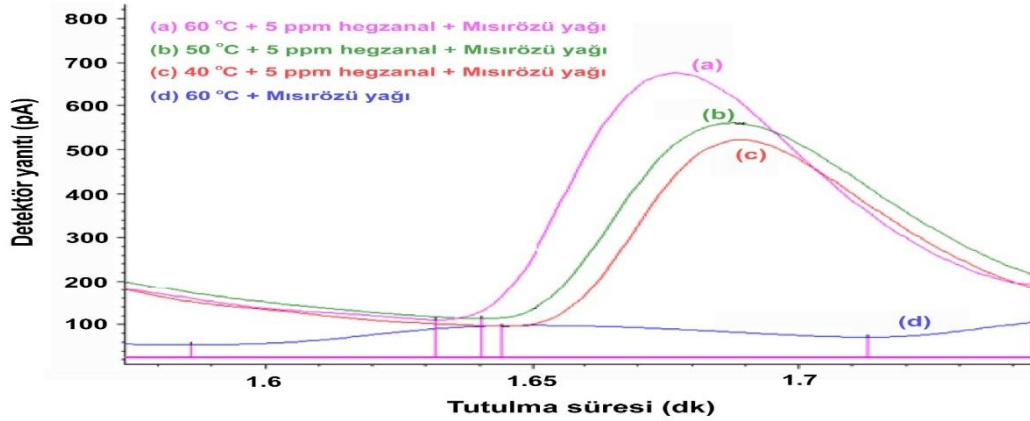
Bu aşamadan sonra matriks olarak kullanılan mısırözü yağı ve zeytinyağında doğal olarak hekzanal ve IS'in var olup olmadığını belirlemek üzere söz konusu yağlara hiç hekzanal eklemeyen ve ayrıca mısırözü yağına 5 ppb ve 5 ppm hekzanal eklenerek, 4 farklı örneğe 60°C'de 40 dk süre ile GC-SPME analizi uygulanarak elde edilen kromatogramlar birlikte Şekil 2'de verilmektedir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde dışarıdan hiç hekzanal ilave edilmemiş mısırözü yağı ve zeytinyağında hekzanalın tutulma süresinin olduğu noktada herhangi bir pike rastlanmamıştır (Şekil 2-c, d). Bu durum, çalışmada kullanılan mısırözü yağı ve zeytinyağının doğal olarak hekzanal içermediklerini göstermektedir. Hekzanal içermeyen mısırözü yağı ve zeytinyağı örneklerinde hekzanal piki görülmezken, 5 ppm düzeyinde hekzanal içeren örneğin 5 ppb derişiminde hekzanal içeren örnekten çok daha büyük bir alanı kaplayan pik ortaya koyduğu görülmektedir. Şekil 2'de görüldüğü gibi bu çalışmada uygulanan en yüksek sıcaklıkta (60°C) mısırözü yağı ve zeytinyağında hekzanal oluşmadığı tespit edilmiştir



Şekil 2. Mısırözü yağı, zeytinyağı, 5 ppb ve 5 ppm hekzanal içeren mısırözü yağı örneklerinin 60°C ve 40 dk'daki GC-SPME kromatogramları

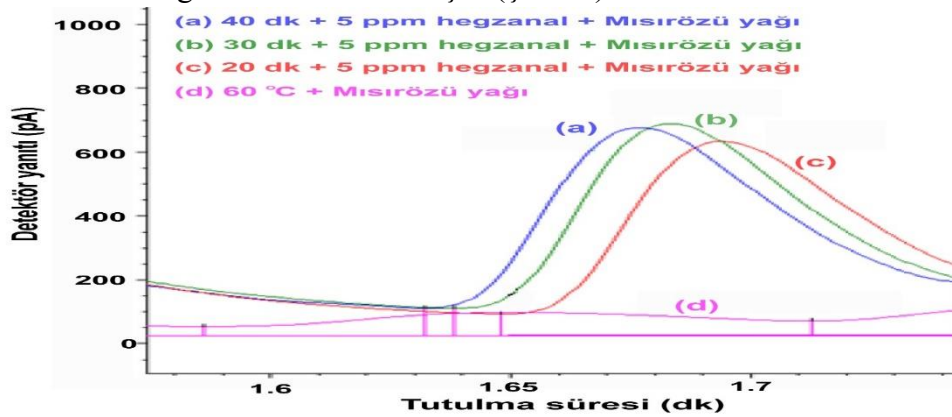
Çalışmada SPME koşullarının (sıcaklık ve süre) hekzanal ile IS'nin Alan/Derişim oranı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Farklı SPME koşullarının bu oran üzerindeki etkisine değinmeden önce ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin GC-SPME kromatogramları üzerindeki etkisi irdelenmiştir. SPME uygulamalarında uygun ekstraksiyon sıcaklığının seçimi önemli bir faktördür. Düşük sıcaklıklarda hekzanalın buharlaşarak matriksten ayrılıp, tepe boşluğundan SPME fibresine geçmesi yeterli düzeyde sağlanamazken, yüksek sıcaklıklarda doğal olarak örnekte bulunmayan hekzanalın ekstraksiyon sıcaklığının etkisi ile oluşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Her iki durumda da örneğin gerçek hekzanal içeriği hakkında yanıltıcı bilgi edinilmektedir. Hekzanal ve IS arasındaki derişim ile alan arasındaki ilişkinin saptanmasında elde edilen hekzanal piki sadece dışarıdan eklenen hekzanal içeriğini temsil etmelidir. Sıcaklığın etkisini belirlemek üzere 5 ppm düzeyinde hekzanal

içeren örneklerle sırasıyla 40, 50 ve 60°C SPME uygulandığında Şekil 3'teki kromatogram elde edilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla SPME fibresi tarafından daha yüksek düzeyde hekzanalın absorplandığı tespit edilirken, daha önce belirtildiği gibi 60°C'de katkısız mısırözü yağı ve zeytinyağında hekzanal oluşmadığı tespit edilmiştir. Yücel ve Cavidoğlu (2023), ayçiçeği yağında SPME-GC yöntemiyle hekzanal tayinini gerçekleştirdiği çalışmada 40 ve 50 °C'deki sıcaklıklarda hekzanal piklerinin keskin olmadığını belirlerken, 60 °C'de daha keskin ve belirgin hekzanal pikleri elde edildiğini tespit etmişlerdir. GC'den elde edilen pikin nitel ve nicel analizlerde kullanılabilmesi için mümkün olduğunca keskin ve belirgin olması gerekmektedir (Yücel ve Cavidoğlu, 2023). Yapılan bu çalışmada da 60°C'de daha keskin ve belirgin hekzanal pikleri elde edilmiştir.



Şekil 3. Mısırözü yağı ve 5 ppm hekzanal içeren mısırözü yağı örneklerinin 40, 50 ve 60°C'deki GC-SPME kromatogramları

Sürenin SPME ekstraksiyonu üzerindeki etkisini saptamak üzere derişim (5 ppm) ve sıcaklık (60°C) sabit tutularak 20, 30 ve 40 dk'lık SPME ekstraksiyonundan sonra elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Kromatogramda görüldüğü gibi 5 ppm düzeyindeki derişimlerde sürenin hekzanal ekstraksiyonu üzerinde belirgin bir etkisi olmamıştır (Şekil 4).



Şekil 4. 5 ppm hekzanal içeren mısırözü yağlarının 20, 30 ve 40 dk'daki GC-SPME kromatogramları

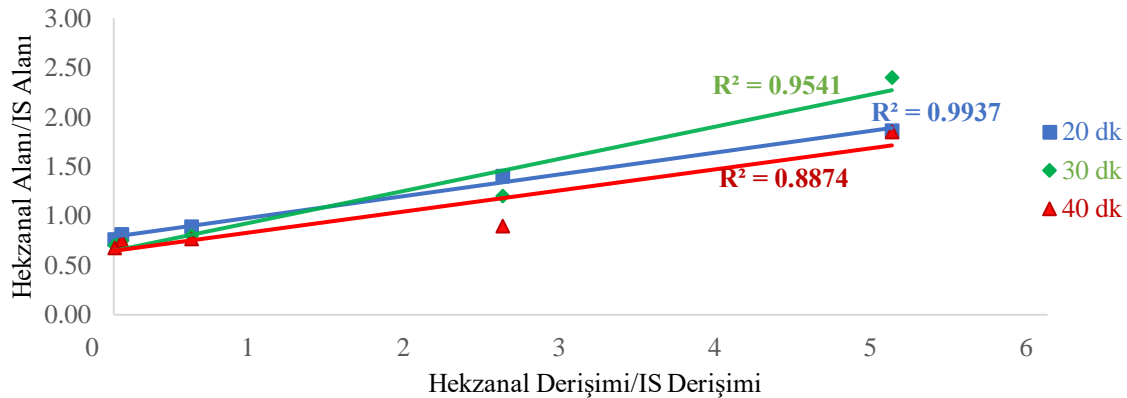
Sıcaklık ve sürenin GC-SPME kromatogramı üzerindeki etkisini ortaya koyduktan sonra 0.005, 0.05, 0.5, 2.5 ve 5 ppm hekzanal ve 1 ppm düzeyinde IS çözeltisi içeren mısırözü yağı ve zeytinyağına sırasıyla 40, 50 ve 60°C'de 20, 30 ve 40 dk süre ile uygulanan SPME koşullarında elde edilen kromatogramlardaki Hekzanal Derişimi/IS Derişimi ve Hekzanal Alan/IS Alan ilişkileri değerlendirilerek bunlara karşılık gelen regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır (Çizelge 1).

Ekstraksiyon sıcaklığı 40°C ve ekstraksiyon süresi olarak sırasıyla 20, 30 ve 40 dk uygulanan mısırözü yağı örneklerine ait elde edilen korelasyon analizi Çizelge 1'de ve Şekil 5'te verilmiştir.

Çizelge 1. Farklı sıcaklık ve sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu mısırozü ve zeytinyağı örneklerine ait regresyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

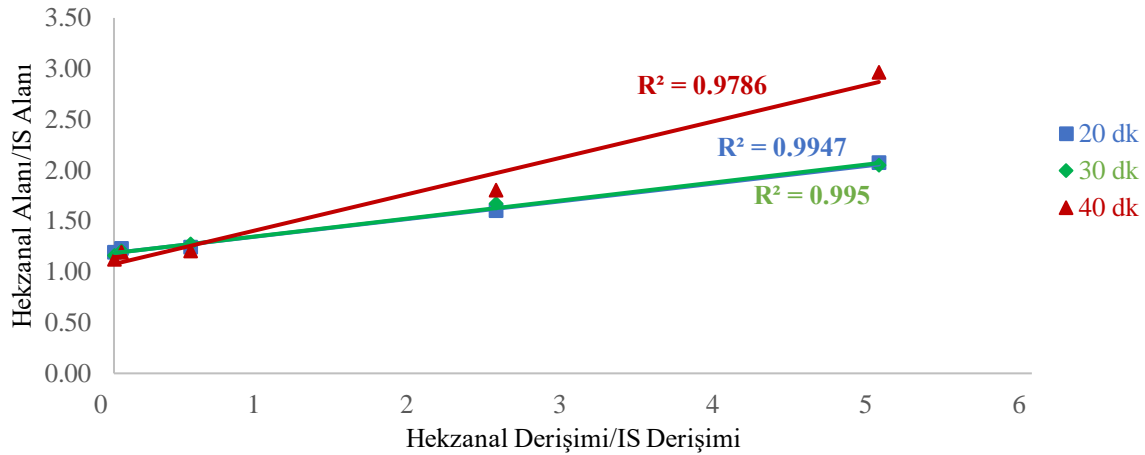
Mısırozü Yağı			Zeytinyağı		
Sıcaklık(°C)	Süre (dk)	Regresyon Denklemi (R ²)	Sıcaklık(°C)	Süre (dk)	Regresyon Denklemi (R ²)
40	20	y=0.2199x+0.7897 (R ² =0.9937)	40	20	y=0.1743x+1.1852 (R ² =0.9947)
	30	y=0.3248x+0.6468 (R ² =0.9541)		30	y=0.1773x+1.1843 (R ² =0.9950)
	40	y=0.2133x+0.6464 (R ² =0.8874)		40	y=0.3585x+1.0764 (R ² =0.9786)
50	20	y=0.1843x+0.7231 (R ² =0.9840)	50	20	y=0.0463x+1.1834 (R ² =0.9177)
	30	y=0.1887x+0.6820 (R ² =0.8386)		30	y=0.0561x+1.2376 (R ² =0.8591)
	40	y=0.1573x+0.6445 (R ² =0.9361)		40	y=0.0421x+1.1641 (R ² =0.6367)
60	20	y=0.1884x+0.6725 (R ² =0.8480)	60	20	y=0.0571x+1.2241 (R ² =0.9558)
	30	y=0.2048x+0.5601 (R ² =0.9226)		30	y=0.1489x+1.2021 (R ² =0.9786)
	40	y=0.1984x+0.6103 (R ² =0.9550)		40	y=0.1914x+1.2217 (R ² =0.9781)

40°C sıcaklıkta 20, 30 ve 40 dk süreyle ekstraksiyon uygulanan mısırozü yağı örneklerinden elde edilen grafik (Şekil 5) ve Çizelge 1'deki veriler incelendiğinde; regresyon denklemlerinin sırasıyla $y = 0.2199x + 0.7897$ ($R^2 = 0.9937$), $y = 0.3248x + 0.6468$ ($R^2 = 0.9541$) ve $y = 0.2133x + 0.6464$ ($R^2 = 0.8874$) olduğu saptanmıştır. Uçucu bileşenlerin belirlenmesinde, analizi yapılan bileşenin IS ile ilişkisi önemlidir (Javidipour ve Qian, 2008). Burada hekzanal ile IS arasındaki ilişkinin yakınlığını ortaya koyan R^2 gösterge olarak değerlendirilmiştir. R^2 değerleri göz önüne alındığında 40°C sıcaklıkta en etkili ekstraksiyon süresi 20 dk ($R^2=0.994$) olarak tespit edilmiştir. Sürenin artmasına bağlı olarak R^2 değerlerinde düşüş gözlemlenmiştir.

**Şekil 5.** Mısırozü yağına 40°C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen regresyon grafiği

40°C sıcaklıkta ve farklı sürelerde ekstraksiyon işlemine tabi tutulan zeytinyağı örneklerinden GC'den elde edilen hekzanal ve IS alan oranları kullanılarak elde edilen korelasyon analizi Çizelge 1'de ve Şekil 6'da verilmiştir. Veriler incelendiğinde; 20 dk'lık ekstraksiyon sonucunda elde edilen regresyon denklemi $y=0.1743x+1.1852$ ($R^2=0.9947$) iken, 30 dk ekstraksiyon uygulandığında elde edilen regresyon denklemi $y=0.1773x+1.1843$ ($R^2=0.9950$) olarak tespit edilmiştir. Son olarak 40 dk ekstraksiyon uygulandığında elde edilen regresyon denkleminin ise $y=0.3585x+1.0764$ ($R^2=0.9786$) olduğu görülmektedir.

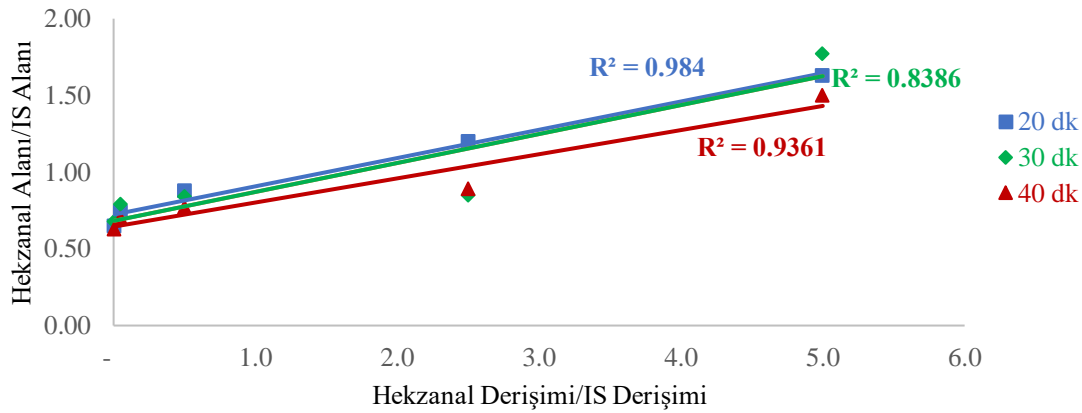
40°C sıcaklıkta 20 ve 30 dk ekstraksiyon sürelerinin R^2 değerlerinin birbirlerine oldukça yakın oldukları görülmektedir. Bu durumda zeytinyağında 40°C'de optimum ekstraksiyon süresi 30 dk olarak belirlenmesine rağmen çok sayıda örneğin söz konusu olduğu çalışmalarda zaman tasarrufu açısından 20 dk süreyle ekstraksiyon uygulanmasının hızlı sonuç verebileceği düşünülmektedir. Steenson ve ark. (2002), mısırozü yağındaki uçucu bileşenleri tespit etmek için geliştirmiş oldukları SPME-GC yönteminde ekstraksiyon sıcaklık ve süresini 35°C ve 20 dk olarak belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada da benzer bir şekilde 40°C ve 20 dk'nın üzerindeki sıcaklık ve sürelerde R^2 değerlerinde genellikle bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 1).



Şekil 6. Zeytinyağına 40°C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen regresyon grafiği

Javidipour ve ark. (2017) fındık, zeytin, soya ve ayçiçeği yağlarına mikrodalga uygulanması süresince oksidatif değişimleri inceledikleri çalışmalarında hekzanal analizi için uygulamış oldukları sıcaklık ve süre parametrelerini sırasıyla 40 °C ve 30 dk olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada, 9 dk'lık mikrodalga uygulamasından sonra örneklerin hekzanal içerikleri çarpıcı bir biçimde artarken peroksit içeriklerinde önemli oranda bir azalış görülmüştür. Bu durumu oksidasyonun birincil ürünlerinin göstergesi olan peroksitlerin, oksidasyonun ikincil ürünlerinin göstergesi olan hekzanala dönüşmesine bağlamışlardır.

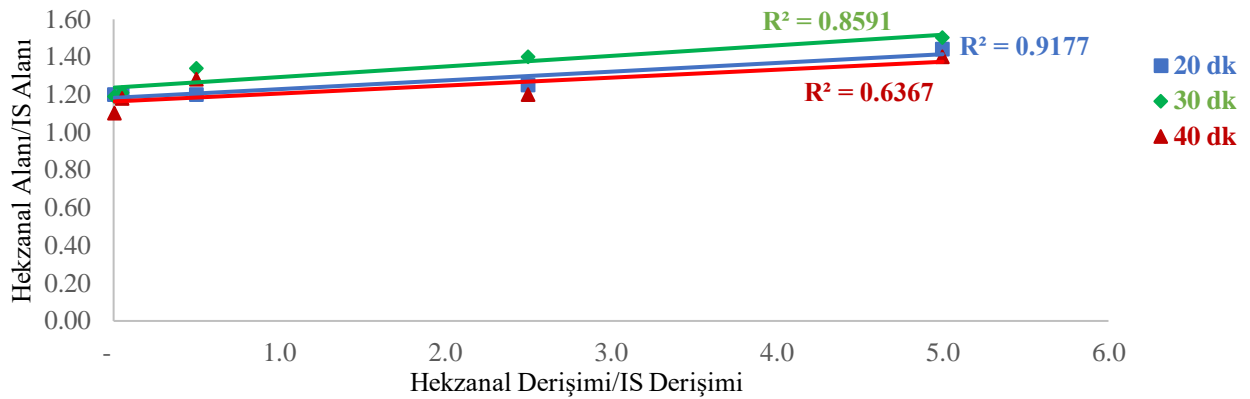
Ekstraksiyon sıcaklığı 50°C ve ekstraksiyon süresi sırasıyla 20, 30 ve 40 dk olarak uygulanan mısırozü yağı örneklerine ait korelasyon analizi Çizelge 1'de ve Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Mısırozü yağına 50°C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen regresyon grafiği

50°C sıcaklıkta 20, 30 ve 40 dk ekstraksiyon uygulanan mısırozü yağı örneklerinden elde edilen veriler (Çizelge 1 ve Şekil 7) değerlendirildiğinde; regresyon denklemlerinin sırasıyla $y=0.1843x+0.7231$ ($R^2=0.984$), $y=0.1887x+0.6820$ ($R^2=0.8386$) ve $y=0.1573x+0.6445$ ($R^2=0.9361$) olduğu görülmektedir. R^2 değerleri dikkate alındığında 50°C sıcaklıkta en etkili ekstraksiyon süresinin 20 dk olduğu tespit edilmiştir.

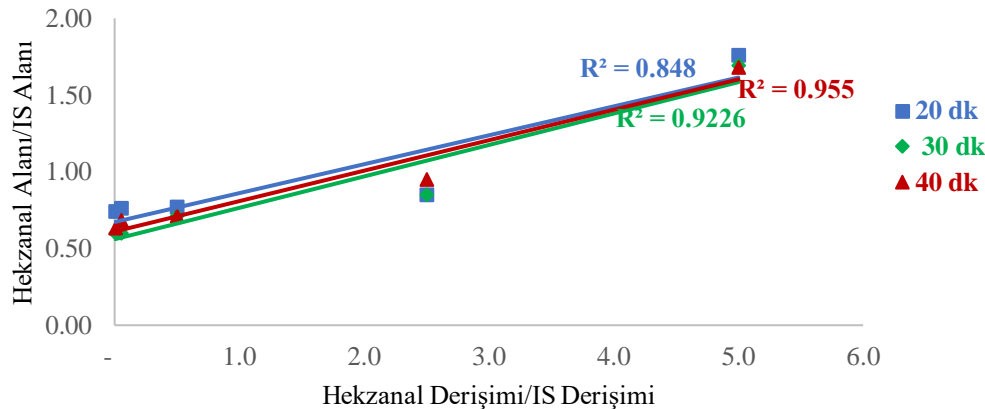
Ekstraksiyon sıcaklığı 50°C ve ekstraksiyon süresi sırasıyla 20, 30 ve 40 dk olarak uygulanan zeytinyağı örneklerine ait hekzanal ve IS arasındaki ilişkiyi veren regresyon denklemleri ve bu ilişkinin düzeyini gösteren korelasyon katsayıları Çizelge 1'de ve Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8. Zeytinyağına 50°C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen regresyon grafiği

50°C'de 20, 30 ve 40 dk ekstraksiyon uygulanan zeytinyağı örneklerinden elde edilen veriler (Çizelge 1 ve Şekil 8) incelendiğinde; regresyon denkleminin 20 dk için $y=0.0463x+1.1834$ ($R^2=0.9177$), 30 dk için $y=0.0561x+1.2376$ ($R^2=0.8591$) ve 40 dk için $y=0.0421x+1.1641$ ($R^2=0.6367$) olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon süresinin artmasına bağlı olarak korelasyon katsayılarında düşüş olduğu görülmektedir. R^2 değerleri dikkate alındığında 50°C sıcaklıkta en etkili ekstraksiyon süresi 20 dk olarak tespit edilmiştir.

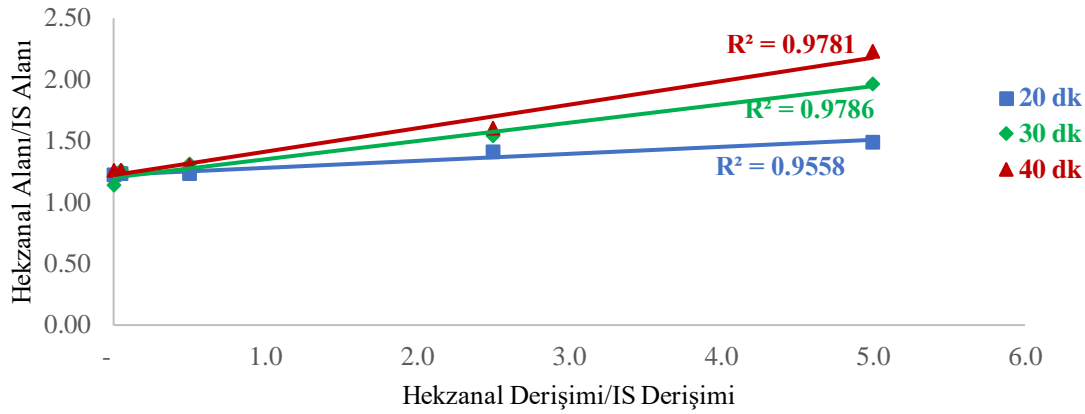
60°C'de ve 20, 30 ve 40 dk ekstraksiyona tabi tutulan mısırozü yağı örneklerine ait korelasyon analizi Çizelge 1'de ve Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. Mısırozü yağına 50°C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen regresyon grafiği

60°C sıcaklıkta 20, 30 ve 40 dk ekstraksiyon uygulanan mısırozü yağı örneklerinden elde edilen veriler (Çizelge 1 ve Şekil 9) incelendiğinde; regresyon denkleminin 20 dk için $y=0.1884x+0.6725$ ($R^2=0.848$), 30 dk için $y=0.2048x+0.5601$ ($R^2=0.9226$) ve 40 dk için $y=0.1984x+0.6103$ ($R^2=0.955$) olduğu saptanmıştır. Sürenin artmasıyla korelasyon katsayısı değerlerinde artış görülmektedir. R^2 dikkate alındığında mısırozü yağı için 60°C sıcaklıkta en etkili ekstraksiyon süresi 40 dk olarak tespit edilmiştir. Graciano ve ark. (2010), mısırozü yağındaki hekzanal miktarını tespit etmek için ekstraksiyon koşullarını 60°C ve 40 dk olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada da benzer bir şekilde ekstraksiyon sıcaklığı 60°C olduğunda sürenin artmasıyla hekzanal ve IS arasında daha yüksek bir korelasyon gözlemlenmiştir (Çizelge 1). Dolayısıyla 60°C'de 40 dk'lık süre uygulandığında doğrusal ilişkinin düzeyi de artmıştır.

Ekstraksiyon sıcaklığı 60°C ve ekstraksiyon süresi sırasıyla 20, 30 ve 40 dk olarak uygulanan zeytinyağı örneklerine ait hekzanal ve IS arasındaki ilişkiyi veren regresyon denklemleri ve bu ilişkinin düzeyini belirleyen korelasyon katsayıları Çizelge 1'de ve Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Zeytinyağına 60°C'de farklı sürelerde ekstraksiyon uygulanması sonucu elde edilen regresyon grafiği

60°C sıcaklıkta sırasıyla 20, 30 ve 40 dk ekstraksiyon uygulanan zeytinyağı örneklerinden elde edilen veriler (Çizelge 1 ve Şekil 10) değerlendirildiğinde; regresyon denklemlerinin sırasıyla $y=0.0571x+1.2241$ ($R^2=0.9558$), $y=0.1489x+1.2021$ ($R^2=0.9786$) ve $y=0.1914x+1.2217$ ($R^2=0.9781$) olduğu tespit edilmiştir. 60°C sıcaklıkta 30 ve 40 dk ekstraksiyon sürelerinin R^2 değerlerinin birbirlerine oldukça yakın oldukları görülmektedir. Bu durumda çok sayıda örneğin söz konusu olduğu çalışmalarda zaman tasarrufu açısından 30 dk süreyle ekstraksiyon uygulanmasının yeterli olabileceği düşünülmektedir. Yücel ve Cavidoğlu (2023), ayçiçeği yağında SPME-GC yöntemiyle farklı süre ve sıcaklıkların hekzanal ekstraksiyonu üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada en etkili ekstraksiyon sıcaklık ve süresinin 60°C'de 20 dk olduğunu tespit etmişlerdir. Kishimoto (2021), zeytinyağından hekzanal ekstraksiyon sıcaklık ve süresini 60 °C'de 15 dk olarak belirlemiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada oksidasyon düzeyinin göstergesi olarak değerlendirilen hekzanalın mısırozü yağı ve zeytinyağında SPME yöntemi ile nitel ve nicel analizi için uygun sıcaklık ve sürenin seçimi araştırılmıştır. Mısırozü yağı ve zeytinyağına farklı oranlarda eklenen hekzanal ve sabit düzeyde eklenen IS arasında derişim ve alan ilişkisi değerlendirilerek en yüksek R^2 değerini gösteren koşullar tespit edilmiştir. Elde edilen korelasyon katsayıları göz önüne alındığında, mısırozü ve zeytinyağlarında 40°C'de ekstraksiyon için en etkili ekstraksiyon süresinin 20 dk olduğu tespit edilmiştir. 50°C'de yapılan ekstraksiyon koşullarına bakıldığında en etkili ekstraksiyon süresinin hem mısırozü yağı hem de zeytinyağı için 20 dk olduğu saptanmıştır. Ayrıca 50°C'de zeytinyağında sürenin artmasıyla beraber R^2 değerlerinde düşüş gerçekleşmiştir. 60°C'deki ekstraksiyon koşulları incelendiğinde en etkili ekstraksiyon süresinin mısırozü yağı ve zeytinyağı için sırasıyla 40 ve 30 dk olduğu saptanmıştır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde mısırozü yağı ve zeytinyağında hekzanal analizi için 40°C'de 20 dk ekstraksiyon süresinin en uygun koşul olduğu saptanmıştır. 50°C ve 60°C'deki ekstraksiyonlarda R^2 değerleri yüksek olmasına rağmen yağ örneklerinin daha kısa süre ve daha düşük sıcaklığa maruz kalması ilkesi dikkate alındığından bu sıcaklıkların uygulanmasının tercih edilmemesi gerektiği düşünülmektedir. Hekzanalın IS ile arasındaki ilişkinin göstergesi olan R^2 değerlerine bakıldığında bu iki bileşen arasında yakın düzeyde bir ilişkinin olduğu tespit edilirken ($R^2>0.9$), IS olarak kullanılan 5-metil 2-hekzanon'un hekzanalın nicel analizi için uygun olduğu belirlenmiştir. Hekzanal'ın SPME yöntemiyle tespit edilebilir olması, yağlarda oksidatif stabilite çalışmalarında SPME yöntemi ile hekzanal tayininin iyi bir alternatif olduğu ve okside olmuş yağlarda oksidasyon düzeyinin belirlenmesinde SPME'nin hassas ve doğru sonuç verebilecek niteliğe sahip bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (**Proje No: FYL-2016-5384**)

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Andiç, S., Tunçturk, Y., & Javidipour, I. (2011). Effects of frozen storage and vacuum packaging on free fatty acid and volatile composition of Turkish Motal cheese. *Food Science and Technology International*, 17, 375-394.
- Anonim, (2001). Solid phase microextraction troubleshooting guide. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/306/877/t101928.pdf> (Erişim tarihi: Mart 17, 2023).
- Arato, S., Ito, H., Miyashita, K., Hayakawa, K., & Itabashi, Y. (2009). A facile method for the detection of aldehydes in oxidized lipids using solid-phase microextraction fiber and gas chromatograph equipped with a septum-free injector. *Journal of Oleo Science*, 58,17-22.
- Baştürk, A. (2011). *Ağır metal iyonları, askorbil palmitat, sıcaklık ve sürenin yağların oksidatif stabilitesi üzerine etkileri* (Doktora tezi). Yök Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 282941).
- Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction fibers for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chemistry*, 68: 339-345.
- Camiletti, O. F., Bergesse, A. E., Aleman, R., Riveros, C. G., & Grosso, N. R. (2023). Application of chickpea-based edible coating with chickpea husk polyphenols on the preservation of sunflower seeds. *Journal of Food Science*, doi: 10.1111/1750-3841.16489
- Chitsamphandvej, W., Phakdee, W. & Thanasan, W. (2008). A headspace solid phase microextraction methods for using to monitor hexanal and heptanal content in food samples. *Kasetsart Journal Natural Science*, 42: 206-212.
- Contini, M., & Esti, M. (2006). Effect of the matrix volatile composition in the headspace solid-phase micro-extraction analysis of extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 94, 143-150.
- Garcia-Martinez, M. C., Marquez-Ruiz, G., Fontecha, J., & Gordon, M. H. (2009). Volatile oxidation compounds in a conjugated linoleic acid-rich oil. *Food Chemistry*, 113: 926-931.
- Graciano-Verdugo, A. Z., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cruz-Zárate, P., Islas-Rubio, A. R., Sánchez-Valdez, S., Sánchez-Escalante, A., González-Méndez, N., & González-Ríos, H. (2010). Migration of a-tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect. on the oxidative stability. *Food Research International*, 43, 1073-1078.
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L., & Padley, F.B. (1995). *The lipid handbook*. London: Chapman & Hall.
- Hamilton, R.J. (1995). *Developments in oils and fats*. New York: Springer.
- Hamilton, R. J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. B., & Pierce, H. (1997). Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*, 60: 193-199.
- Jalili, V., Barkhordari, A., & Ghiasvand, A. (2020). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal*, 152, 104319.
- Javidipour, I., Erinç, H., Baştürk, A. & Tekin, A. (2017). Oxidative changes in hazelnut, olive, soybean, and sunflower oils during microwave heating. *International Journal of Food Properties*, 20, 1582-1592.

- Javidipour, I., & Qian, M. C. (2008). Volatile component change in whey protein concentrate during storage investigated by headspace solid-phase microextraction gas chromatography. *Dairy Science and Technology*, 88, 95-104.
- Kayaalp, G. T., & Çankaya, S. (2008). *İstatistik. 5. baskı*. Adana: Ç.Ü. Ziraat Fak., Yay. No: 258.
- Kayahan, M. (2002). *Yağ kimyası*, Ankara: ODTÜ Yayıncılık.
- Kishimoto N. (2021). Evaluation of photooxidation of olive oil by determining the concentration of hexanal as an oxidative marker using an electronic nose. *Chemical Engineering Transactions*, 85, 181-186.
- Lee, Y. C., Oh, S. W., Chang, J., & Kim, I. H. (2004). Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. *Food Chemistry*, 84, 1-6.
- Ma, C., Ji, J., Tan, C., Chen, D., Luo, F., Wang, Y., & Chen, X. (2014). Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for the analysis of aldehydes in edible oils. *Talanta*, 120, 94-99.
- Maher, P.G., Roos, Y.H., Kilcawley, K.N., Auty, M.A.E., & Fenelon, M.A. (2015). Levels of pentanal and hexanal in spray dried nanoemulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 63, 1069-1075.
- Mariutti, L.R.B., Nogueira, G.C., & Bragagnolo, N. (2009). Solid phase microextraction-gas chromatography for evaluation of secondary lipid oxidation product during long-term storage. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 1849-1855.
- Pawliszyn, J. (2012). *Theory of solid phase microextraction*. In J. Pawliszyn (Eds), *Handbook of Solid Phase Microextraction* (pp. 13-59). Amsterdam, Holland: Elsevier Press.
- Pignoli, G., Bou, R., Rodriguez-Estrada, M. T., & Decker, E. A (2009). Suitability of saturated aldehydes as lipid oxidation markers in washed turkey meat. *Meat Science*, 83, 412-416.
- Prosen, H., & Zupancic-Karlj, L. (1999). Solid phase microextraction. *Trends in analytical chemistry*, 18 (4), 272-282.
- Roberts, D. D., Pollien, P., & Milo, C. (2000). Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(6), 2430-2437.
- Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., & Namiesnik, J. (2013). Understanding solid-phase microextraction: key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chemical reviews*, 113, 1667-1685.
- Stenson, D. F., Lee, J. H., & Min, D. B. (2002). Solid phase microextraction of volatile soybean oil and corn oil compounds. *Food Chemistry and Toxicology*, 67, 71-76.
- Vas, G., & Vékely, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254.
- Vichi, S., Guadayol, J. M., Caixach, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1125 (1), 117-23.
- Yücel, T. & Cavidoğlu, İ. (2023). Katı faz mikroekstraksiyon-gaz kromatografisi metodu ile malonaldehit ve hekzanal tayini. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* , DOI: 10.53433/yyufbed.1215854
- Zhang, Z., Yang, M. J., & Pawliszyn, J. (1994). Solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 66, (17): 844 -852.

To Cite: Gumus, P. & Erol, U. H. (2023). Comparison of Fatty Acid Profile and Quality Properties of Commercial Apricot (*Prunus Armeniaca*) Kernel Oils. *Journal of the Institute of Science and Technology*, x(x), 2646-2654.

Comparison of Fatty Acid Profile and Quality Properties of Commercial Apricot (*Prunus Armeniaca*) Kernel Oils

Pinar GUMUS^{1*}, Umit Haydar EROL²

Highlights:

- Apricot is one of the important export products of Turkey.
- The apricot kernel oil has become widely popular in many industries.
- Oleic and linoleic acids were determined as major unsaturated fatty acids in apricot kernel oils.

Keywords:

- Apricot Kernel Oil
- *Prunus Armeniaca*
- Fatty Acid
- Antioxidant Activity

ABSTRACT:

Prunus armeniaca L. known as apricot, is one of the important export products of Turkey and its kernel oil has become widely popular in different fields such as food pharmacy, aromatherapy and cosmetics industry. Apricot oil obtained from the kernels of apricots is characterized by high contents of oil, fiber, various minerals, proteins, vitamins and phenolics with health-improving effects. The aim of this study was to compare the fatty acid composition and some quality properties of 10 different kinds of apricot kernel oils produced by the different brands. The lowest value of free fatty acid with 0.30 % was determined in the A5 sample. The antioxidant activity results of A1 brand apricot oil sample were found similar to A4 brand apricot oil ($P>0.05$). In the results of the total phenolic content was lowest in A5 sample with 101.17 mg GAE/100g. The results of the highest antioxidant activity and total phenolic content were determined in the sample A3. The common major fatty acids in the analyzed oil samples were determined as oleic acid, linoleic acid, palmitic acid and stearic acid. Oleic acid was determined as the main unsaturated fatty acid component for all oil types except the A1 sample.

¹ Pinar GÜMÜŞ (Orcid ID: 0000-0003-4085-9859), Kilis 7 Aralık University, Faculty of Yusuf Serefoglu Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Kilis, Türkiye

² Ümit Haydar EROL (Orcid ID: 0000-0001-6126-5844), Kilis 7 Aralık University, Advanced Technology Application and Research Center, Kilis, Türkiye

*Corresponding Author: Pinar GÜMÜŞ, e-mail: dr.pinargumus@gmail.com

INTRODUCTION

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is a member of the *Rosaceae* family (Kiralan et al., 2019). It is one of the main export products of Turkey widely grown around the worldwide (Kusmenoglu et al., 2008; Ozcan et al., 2010). It is characterized by high amounts of oil, carbohydrates, fibre, vitamins, minerals and phenolics with health-enhancing impacts (Sharma et al., 2016; Kiralan et al., 2018). Apricot is considered a delicious fruit consumed as fresh and dried; it is also used for edible, cosmetic and medicinal purposes due to its possible nutritional and chemical composition (Gundogdu et al., 2011; Akhone et al., 2022; Pawar and Nema, 2023).

Apricot is one of the most important fruits economically. It is widely known that apricot is one of the leading export products of Turkey. The main province of Turkey where apricots are frequently grown is Malatya. Apricot kernel, a waste product of apricot fruit, is a significant source of proteins, vitamins, minerals and carbohydrates and its oil is rich in unsaturated fatty acids and oleic acid being prevalent. Oil yield of apricot kernel alters with region, variety and oil extraction method (Kusmenoglu et al., 2008; Candan and Arslan, 2021; Akhone et al., 2022; Pawar and Nema, 2023).

Vegetable oils are a crucial component of the diet and help maintain health. Depending on the plant source, the oils extracted from plant seeds might be either edible or not. Some fruit seeds such as apricot, citrus and apple can be used as sources of oils. Apricot kernel oil considered as edible oil has become quite popular. This oil is an important source of saturated and unsaturated fatty acids, containing palmitic, stearic, linoleic, myristic, oleic, palmitoleic, and linolenic acid. It can also be utilized for industrial purposes gained importance amongst the consumers (Kusmenoglu et al., 2008; Ozcan et al., 2010; Gupta et al., 2012; Shariatifar et al., 2017; Stryjecka et al., 2019; Pawar and Nema, 2023).

In this study, apricot kernel oils supplied in the local markets of Turkey were evaluated in terms of some quality attributes such as free fatty acid, color, refractive index, total phenolic compounds and antioxidant activity and fatty acid composition.

MATERIALS AND METHODS

Materials

In this study, methanol, gallic acid, trolox, phenolphthalein, NaOH, Folin-Ciocalteu's reagent, sodium carbonate, potassium persulfate were purchased from Merck Milipore (Hohenbrunn, Germany); hexane, potassium hydroxide, diethyl ether, and ABTS purchased from Sigma-Aldrich Co. (Louis, USA). 10 different apricot kernel oils used in the study were obtained from various local markets of Turkey.

Methods

Chemical Extraction for Total Phenolics and Antioxidant Activity Analyses

100 ml of methanol was added to approximately 25 grams of each oil and mixed at room temperature on magnetic stirrers and in sealed flasks until the extraction solvent became colorless. This process was repeated at least five times. The obtained extracts were filtered with Whatman filter paper and the filtrate was collected. Then, methanol was removed at 60 °C in a Buchi, R300 model evaporator. The residues formed at the bottom of the flask were dissolved in methanol at volumes depending on detection limits and used for analysis (AOAC, 1990).

Physicochemical and Color Analyses

Color analyses of apricot kernel samples were made using the colorimetric method. Colorimetric measurements were made with Techkon, SpectroDens model (Königstein, Germany) colorimeter by taking L^* , a^* and b^* values. The refractive index of apricot kernel oil samples was determined by placing 2-3 drops of oil sample on the prism using Abbe type refractometer (Soif Optical Instruments, China). The process was carried out at room temperature (AOAC, 1995). The free fatty acid (FFA%) values of apricot kernel oils were calculated by taking 5 g oil samples and dissolving them in 50 ml of methanol/diethyl ether (50/50%) solution, adding a few drops of phenolphthalein and titration with 0.1 N NaOH solution (AOAC, 1995).

Determination of Total Phenolic Content

The total phenolic content of oil samples collected from different brands was determined. Briefly, the analyses were carried out as follows: 0.02 mL of extract and 1.58 mL of water were taken as a sample, to which 0.1 mL of Folin-Ciocalteu's reagent was added, followed by 0.3 mL of 20% (w/v) sodium carbonate. The mixture was allowed to stand at room temperature for 2 hours and then its absorbance was measured at 760 nm wavelength using a Biochrom, Libra S70 spectrophotometer (Cambridge, UK). Gallic acid was used as standard and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per 100 gram. The total phenolic content of the samples was calculated using a calibration graph plotted with standard gallic acid solutions (Castro-Concha et al., 2014).

Determination of Antioxidant Activity (ABTS Assay)

Antioxidant activity measurements of the extracts of different types of oil samples were carried out using ABTS (2,2-azino bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) method. The analyses were performed according to the method developed by Re et al. (1999) and were determined on the basis of the decrease in absorbance values measured at 734 nm wavelength by oxidation of ABTS radical cation by antioxidants. 7 mM ABTS solution was mixed with 2.45 mM potassium persulfate solution for 12-15 hours and diluted by reduction. The absorbance value was measured by adding 50 μ L of oil extracts to this diluted ABTS solution. The diluted ABTS solution was used as a blind sample and Trolox was used as a standard solution. Antioxidant activity results were calculated as μ mol TEAC/g using Trolox standard calibration graph.

Fatty Acid Composition

Extraction and esterification processes were carried out to detect the fatty acid ester content of apricot kernel oil samples (O'Fallon et al., 2007). The oil sample was taken and extracted with hexane for 1 hour. Extracted samples were filtered and esterified using 0.1N methanolic KOH. Esterified samples were analyzed in a mass detector (5977MSD) using a DB-WAX (30m, 0.32mm, 0.25 μ m) column in a GC/MS (Agilent, 7890B GC-5977MSD) instrument. Analysis was carried out with minor modifications to the methodology of Saini & Keum (2016). The temperature program was applied by modifying it according to the reference method. The oven temperature was first increased from 110°C to 175 °C by increasing 10°C per minute and kept at this temperature for 20 minutes. Then, the temperature was increased to 240°C by increasing 10°C per minute and kept at this temperature for 5 minutes. Detector and injection temperature were kept constant at 250°C.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the data and multiple comparison tests was performed in the JMP 14 program. Student's t-test was used for multiple comparisons. For the parameters in the analysis of variation, any P value below 0.05 was considered significant. All analyzes were carried out with 3 replications.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical and Color Analyses

Color, FFA, and refractive index results of apricot kernel oils of different brands are given in Table 1. The color is one of the most significant parameters for detecting consumer acceptance. As the L* value approaches 0, it shows the darkness of the oil, and as it approaches 100, it shows the lightness of the oil. The L* values of the samples were determined in the range of 10.66-30.02. When the L* values of the oils were examined, it was determined that the A5 sample was the brightest, while the A7 sample had the darkest color. When the a* values of the samples were analyzed, it was found that the A2 coded sample had the lowest a* value (-0.58), and the highest a* value belonged to the A7 sample (8.67). When the b* values of the samples were analyzed, the lowest b* value was found in the A5 (8.70) coded sample, while the highest b* value was found in the A8 (26.27) sample. Candan and Arslan (2021) stated that apricot kernel oils obtained by conventional methods had higher L* (31.15), while, a*(-1.66) and b* (3.98) values. It can be seen that the refractive indexes of apricot kernel oils varied between 1.433-1.474. A3 sample had lowest refractive index value, while the highest values were seen in A1, A5, A6 and A9 coded samples. Singh et al. (2010) reported that the wild apricot oil has refractive index with 1.468. The refractive index of apricot kernel oil was found to range between 1.4720-1.4729 (Gupta et al. 2012). While free fatty acid (% oleic acid) was measured at the highest value with 6.59 in A7 sample; the lowest value was determined in the A5 sample with 0.30. Ozcan et al. (2010) evaluated the acid value of different brands of apricot kernel oil and detected between 0.3 and 1.56% of oleic acid; Gupta et al. (2012) reported that apricot oils showed low acid value (2.27-2.78 mg KOH/g). Ozyurt (2019) stated that the acid value of apricot oil 0.81 mg KOH/g oil. Gayas et al. (2020) studied that the application of ultrasound extraction compared with conventional methods (mechanical and soxhlet extraction) in order to obtain oil from apricot kernels. It was reported that acid values of apricot kernel oil acquired by different extraction methods 2.73, 2.71, and 2.86 mg KOH/g oil, respectively.

Table 1. Physicochemical and color results of different apricot kernel oils

Samples	Free Fatty Acid (% Oleic Acid)	Refractive Index (n_D)	L*	a*	b*
A1	0.63±0.01 ^{ef}	1.474±0.00 ^a	16.07±0.08 ^d	0.01± 0.03 ^f	19.98±0.05 ^c
A2	0.60±0.21 ^{ef}	1.473±0.00 ^b	20.58±0.77 ^b	-0.58±0.33 ^e	17.47±0.56 ^d
A3	0.74±0.01 ^e	1.433±0.00 ^e	17.79±0.83 ^c	-0.16± 0.03 ^f	11.87±0.17 ^e
A4	6.44±0.07 ^a	1.470±0.00 ^d	15.86±0.58 ^d	5.73± 0.06 ^c	25.75±0.99 ^a
A5	0.30±0.08 ^f	1.474±0.00 ^a	30.02±0.45 ^a	1.60±0.18 ^e	8.70±1.36 ^f
A6	0.71±0.04 ^e	1.474±0.00 ^a	15.28±0.22 ^d	1.59±0.03 ^e	21.69±0.24 ^{bc}
A7	6.59±0.01 ^a	1.473±0.00 ^b	10.66±0.11 ^e	8.67±0.02 ^a	17.33±0.15 ^d
A8	2.11±0.03 ^b	1.472±0.00 ^c	15.85±0.23 ^d	6.60±0.06 ^b	26.27±0.36 ^a
A9	1.50±0.06 ^c	1.474±0.00 ^a	16.66±0.62 ^{cd}	4.23±0.04 ^d	23.21±0.50 ^b
A10	1.09±0.03 ^d	1.473±0.00 ^b	19.63±0.91 ^b	-0.09±0.04 ^f	22.21±0.59 ^b

Values followed by different letters within the same column are significantly different from each other (p<0.05)

Antioxidant Activity and Total Phenolic Content

The results of total phenolic compound and antioxidant activity of apricot kernel oils are shown in Table 2. The characteristic properties of these oils are important in terms of the quality of the oil as well as the amount of total phenolic compound, while the antioxidant activity of these oils has an influence on the health effect (Ozyurt, 2019). It can be seen that A3 coded sample had the highest total phenolic content, 3914.74 mg GAE/100 g. The total phenolic contents of the other samples were determined in the range of 101.17 and 354.46 mg GAE/100 g. It was found that the A10 coded sample had the lowest antioxidant activity, while the highest antioxidant activity was found in the A3 sample. For total phenolic content results, the difference between A9 and A10 coded samples was statistically insignificant ($P > 0.05$); for antioxidant results, the difference between A1 and A4 coded samples was statistically insignificant ($P > 0.05$) (Table 2). The effects of processing, packaging and storage of oils can also be another reason for the differences in the quality properties of oils. Uluata (2016) found that total phenolic content of apricot seed oils was 24.9 and 26.3 μg gallic acid/g oil and antioxidant activity of apricot seed oils were 168.8 and 151.2 μg Trolox/g oil, using ABTS assay. Ozyurt (2019) stated that total phenolic compound and antioxidant activity (ABTS assay) of apricot seed oil 804.47 and 380.93 mg GAE/L oil, respectively. Yucel Sengun et al. (2021) stated that total phenolic content of apricot kernel oil was 86.75 mg GAE/100 g.

Table 2. Total phenolic content and antioxidant activity results of different apricot kernel oils

Samples	Total phenolics (mg GAE/100g)	Antioxidant activity ($\mu\text{mol TEAC/g}$)
A1	281.23 \pm 8.75 ^c	9.82 \pm 0.73 ^{def}
A2	354.46 \pm 8.62 ^b	18.01 \pm 1.34 ^b
A3	3914.74 \pm 14.51 ^a	34.02 \pm 2.53 ^a
A4	120.45 \pm 2.85 ^{fg}	9.87 \pm 0.73 ^{def}
A5	101.17 \pm 3.15 ^h	11.74 \pm 0.87 ^{cd}
A6	131.74 \pm 1.75 ^f	8.51 \pm 0.77 ^{efg}
A7	199.30 \pm 7.47 ^d	13.78 \pm 0.92 ^c
A8	165.67 \pm 1.63 ^e	10.49 \pm 1.12 ^{de}
A9	107.51 \pm 3.49 ^{gh}	7.80 \pm 1.16 ^{fg}
A10	111.84 \pm 4.16 ^{gh}	7.36 \pm 0.84 ^g

Different letters within the same column are statistically different from each other ($p < 0.05$)

Fatty Acid Composition

The results of fatty acid composition of apricot kernel oils are shown in Table 3. The common major fatty acids in the analyzed oil samples were determined as oleic acid, palmitic acid, linoleic acid and stearic acid. The minor fatty acids are behenic acid, arachidic acid, myristic acid and cinnamic acids. In terms of saturated and unsaturated fatty acids in all oil samples; palmitic acid was measured as the major saturated fatty acid component, while the minor saturated fatty acid component was measured as myristic acid. Apricot kernel oil is an important source of unsaturated and saturated fatty acids, containing myristic, oleic, palmitic, linoleic, stearic, palmitoleic, and linolenic acid (Stryjecka et al., 2019). Oleic acid was detected as the major unsaturated fatty acid component for all species (31.28%, except A1 sample). The highest percentage of fatty acid was found in A4 sample as oleic acid (71.40%). The amount of oleic acid in the examined oil samples constitutes approximately 32% to 72% of the total fatty acids. While cinnamic acid was detected only in A2 sample; myristic acid and arachidic acid were determined as fatty acids in A8, A9 and A10 samples and behenic acid was found only in A9 and A10 samples. It was concluded that this may be due to the use of different extraction methods (Femenia et

Comparison of Fatty Acid Profile and Quality Properties of Commercial Apricot (*Prunus Armeniaca*) Kernel Oils

al., 1995; Al-Juhaimi et al., 2021; Hao et al., 2022; Akhone et al., 2022; Alajil et al., 2022; Pawar and Nema, 2023). The ratios of monounsaturated fatty acids were measured between 31.28% and 71.40%. Polyunsaturated fatty acids in apricot kernel oil samples were determined at rates ranging from 8.14% to 43.36%. The richest oil sample in terms of total unsaturated fatty acids content was A7 with 87.57%, while A3 with 16.86% of total saturated fatty acids was the oil sample containing the most saturated fatty acids. The ratio of Σ PUFA/ Σ SFA is very important in terms of nutrition. If the Σ PUFA/ Σ SFA ratio is greater than 1 in human nutrition, it is considered as edible oils with high nutritional value (Guici El Kouacheur et al., 2023). The Σ PUFA/ Σ SFA ratio was 0.72, which was the lowest in A3 sample. In other oil samples, this ratio is above 1 and can be evaluated in the category of oil with high nutritional value. The importance of the nutritional value and health advantages of fatty acids is obvious. In addition, linoleic acid has a positive nutritional role and beneficial physiological effects in the prevention of coronary heart disease and cancer. In particular, the inability of linoleic acid to be produced in the body for humans requires it to be taken from outside the body (Dubois et al., 2007). The fact that linoleic acid is the second most plentiful unsaturated fatty acid in the examined apricot kernel oils explains the importance of these oils in human nutrition. If the previous studies on *Prunus* cultivars are compared in terms of fatty acids; it can be seen that the linoleic and oleic acid percentages of the examined apricot kernel oils are quite high (Zhou et al., 2016).

Table 3. Fatty acid composition of different apricot kernel oils

Component (%)	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Cinnamic acid (C9:0)	-	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-
Myristic acid (C14:0)	-	-	-	-	-	-	-	0.06	0.08	0.09
Palmitic acid (C16:0)	6.88	8.53	13.97	4.64	9.98	6.66	8.01	9.88	9.38	8.70
Stearic acid (C18:0)	2.89	2.45	2.89	2.28	2.51	2.39	1.49	1.67	4.17	3.73
Oleic acid (C18:1)	31.28	45.05	51.86	71.40	51.92	46.06	56.61	61.01	45.47	42.26
Linoleic acid (C18:2)	43.36	31.84	12.16	8.14	31.76	33.75	30.96	23.75	38.01	41.98
Arachidic acid (C20:0)	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.26	0.42
Behenic acid (C22:0)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.49	0.49
Σ MUFA	31.28	45.05	51.86	71.40	51.92	46.06	56.61	61.01	45.47	42.26
Σ SFA	9.77	11.16	16.86	6.92	12.49	9.05	9.50	11.74	14.38	13.43
Σ UFA	74.64	76.89	74.92	79.54	83.68	79.81	87.57	84.76	83.48	84.24
Σ PUFA	43.36	31.84	12.16	8.14	31.76	33.75	30.96	23.75	38.01	41.98
Σ PUFA/ Σ SFA	4.43	2.85	0.72	1.18	2.54	3.73	3.26	2.02	2.64	3.12

(MUFA: Monounsaturated fatty acids, SFA: Saturated fatty acids, UFA: Unsaturated fatty acids and PUFA: Polyunsaturated fatty acids)

CONCLUSION

In this study, 10 apricot kernel oils obtained from the different brands were researched to determine whether they have generally similar physicochemical properties, antioxidant activities, fatty acid composition and compared with each other. Based on this study, it was observed that there were not significant differences between A1 and A4 samples with respect to antioxidant activity results ($P>0.05$); for total phenolic content, the difference between A9 and A10 samples was statistically insignificant ($P>0.05$). Although there is no significant difference between the L^* , a^* and b^* values of some of the samples ($P>0.05$), it has been found that all color values are statistically different from each other ($P<0.05$). According to the physicochemical analysis results, A1 and A3 coded samples had the lowest unsaturated fatty acid composition, while A7 and A8 coded samples had the highest unsaturated fatty acid composition. Considering the data obtained from this study, it can be said that the oil coded A2 is the good quality oil since it has desired FFA value and refractive index, higher antioxidant activity and

total phenolic content. It can also be considered as edible oils with high nutritional value since the ratio of Σ PUFA/ Σ SFA was greater than 1. This research increases the understanding of the quality and characterization of apricot kernel oils and can also be a baseline for improving regulations for these oils.

ACKNOWLEDGEMENTS

Both authors thank Kilis 7 Aralik University for providing laboratory facilities for this study.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest.

Author's Contributions

Both authors significantly contributed to different processes in the article. The authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Al-Juhaimi, F. Y., Ghafoor, K., Özcan, M. M., Uslu, N., Babiker, E. E., Ahmed, I. A. M., & Alsawmahi, O. N. (2021). Phenolic compounds, antioxidant activity and fatty acid composition of roasted alyanak apricot kernel. *Journal of Oleo Science*, 70(5), 607-613.
- Alajil, O., Sagar, V. R., Kaur, C., Rudra, S. G., Vasudev, S., Chandran, D., & Lorenzo, J. M. (2022). Chemical Characterization of Apricot Kernel: Nutraceutical Composition, Amino Acid, and Fatty Acid Profile. *Food Analytical Methods*, 15(9), 2594-2604.
- AOAC, M. (1990). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. AOAC: Official Methods of Analysis, 1, 69-90.
- AOAC. (1995). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis 16th Ed. Washington DC, USA.
- Akhone, M. A., Bains, A., Tosif, M. M., Chawla, P., Fogarasi, M., & Fogarasi, S. (2022). Apricot kernel: bioactivity, characterization, applications, and health attributes. *Foods*, 11(15), 2184.
- Candan, A., & Arslan, D. (2021). Enzymatic pre-treatment in cold pressing: Influence on flaxseed, apricot kernel and grape seed oils. *Grasas y Aceites*, 72(4), e432-e432.
- Castro-Concha L. A., Tuyub-Che J., Moo-Mukul A., Vazquez-Flota F. A., Miranda-Ham, M. L. (2014). Antioxidant capacity and capsicum total phenolic content of chinense jacq. (habanero pepper) in fruit tissues at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 25:23. <https://doi.org/10.1155/2014/809073>
- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(7), 710-732.
- Femenia, A., Rossello, C., Mulet, A., & Canellas, J. (1995). Chemical composition of bitter and sweet apricot kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 356-361.
- Gayas, B., Kaur, G., & Singh, A. (2020). Ultrasound assisted extraction of apricot kernel oil: Effect on physicochemical, morphological characteristics, and fatty acid composition. *Acta Alimentaria*, 49(1), 23-31.
- Guici El Kouacheur, K., Cherif, H. S., Saidi, F., Bensouici, C., Fauconnier, M. L. (2023). *P runus amygdalus* var. amara (bitter almond) seed oil: fatty acid composition, physicochemical parameters, enzyme inhibitory activity, antioxidant and anti-inflammatory potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(1), 371-384.

- Gupta, A., Sharma, P. C., Tilakratne, B. M. K. S., & Verma, A. K. (2012). Studies on physico-chemical characteristics and fatty acid composition of wild apricot (*Prunus armeniaca* Linn.) kernel oil. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(3), 366-370.
- Gundogdu, M., Ozrenk, K., Kan, T. & Gecer, M. K. (2011). Van Yöresinde Yetiştirilen Bazı Kayısı Çeşitlerinin Fenolik Bileşik, Tokoferol ve Yağ Asidi İçerikleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(4), 31-36.
- Hao, Y., Wang, J., Qi, L., Qiu, Y., Liu, H., Zhang, Y., & Wang, X. (2022). A comparative study of apricot kernel oil yield using different extraction methods. *BioResources*, 17(3), 5146.
- Kiralan, M., Kayahan, M., Kiralan, S. S., & Ramadan, M. F. (2018). Effect of thermal and photo oxidation on the stability of cold-pressed plum and apricot kernel oils. *European Food Research and Technology*, 244, 31-42.
- Kiralan, M., Özkan, G., Kucukoner, E., & Ozelik, M. M. (2019). Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Oil. Fruit oils. *Chemistry and functionality*, 505-519.
- Kusmenoglu, S. Orhan, İ., Koca, U., Aslan, S., Kartal, M. (2008). Fatty acid analysis of some Turkish apricot seed oils by GC and GC-MS techniques. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 29-34.
- Ozcan, M. M., Ozalp, C., Unver, A., Arslan, D., Dursun, N. (2010). Properties of apricot kernel and oils as fruit juice processing waste. *Food and Nutrition Sciences*, 1, 31-37.
- O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of animal science*, 85(6), 1511-1521.
- Ozyurt, H. (2019). The comparison of the quality properties of some commercial cold pressed seed oils. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A. Chemistry*, 6(2), 149-156.
- Pawar, K. R., & Nema, P. K. (2023). Apricot kernel characterization, oil extraction, and its utilization: a review. *Food Science and Biotechnology*, 1-15.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2016). GC-MS and HPLC-DAD analysis of fatty acids and tocopherols in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 685-689.
- Shariatifar, N., Pourfard, I. M., Khaniki, G. J., Nabizadeh, R., Akbarzadeh, A., Nejad, A. S. M. (2017). Mineral Composition, Physico-Chemical Properties and Fatty Acids Profile of *Prunus Armeniaca* Apricot Seed Oil. *Asian Journal of Chemistry*, 29(9).
- Sharma, M., Sharma, P. C., Kaundal, K., & Sharma, H. (2016). Antifungal activity assessment of essential oil of bitter apricot (*Prunus armeniaca*) kernels. *Indian Phytopathol*, 69(3), 290-293.
- Singh, R., Gupta, A., Joshi, D., & Nainwal, N. (2010). Wild apricot (*Prunus armeniaca*) kernel oil: a strategic alternative to value added fatty acids. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 4, 1-5.
- Stryjecka, M., Kiełtyka-Dadasiewicz, A., Michalak, M., Rachoń, L., & Głowacka, A. (2019). Chemical composition and antioxidant properties of oils from the seeds of five apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. *Journal of oleo science*, 68(8), 729-738.
- Uluata, S. (2016). Effect of extraction method on biochemical properties and oxidative stability of apricot seed oil. *Academik Food Journal*, 14(4), 333-340.
- Yucel Sengun, İ., Yucel, E., Kilic, G., & Ozturk, B. (2021). Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının yağ asidi kompozisyonu, biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi. *The Journal of Food*, 46(3), 608-620.

Comparison of Fatty Acid Profile and Quality Properties of Commercial Apricot (*Prunus Armeniaca*) Kernel Oils

Zhou, B., Wang, Y., Kang, J., Zhong, H., & Prenzler, P. D. (2016). The quality and volatile-profile changes of Longwangmo apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel oil prepared by different oil-producing processes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(2), 236-243.

Atf İçin: Güven L. (2023). *Cephalaria tchihatchewii* Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2655-2672.

To Cite: Güven L. (2023). Determination of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'s Extracts Antioxidant Activity, Effect on Metabolic Enzymes, and Chemical Characterization by UPLC-MS/MS Analysis. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2655-2672.

***Cephalaria tchihatchewii* Boiss. Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi, Metabolik Enzimler Üzerine Etkisi ve UPLC-MS/MS Analizi ile Kimyasal Karakterizasyonun Belirlenmesi**

Leyla Güven^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerinin antioksidan aktivite ve enzim inhibisyon etkileri incelendi, kimyasal bileşenlerinin analizi yapıldı

ÖZET:

Bu çalışma, *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'in metanol ve su ekstrelerinin (MECT, WECT) UPLC-MS/MS kullanarak kapsamlı bir kimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmeyi ve bu ekstrelerin potansiyel antioksidan aktivitesinin ve bazı metabolik enzimler üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Antioksidan aktivite, DPPH, ABTS, DMPD, FRAP, KUPRAK ve Fe³⁺ indirgeme testleri dahil olmak üzere çeşitli testler kullanılarak değerlendirilmiştir. MECT ve WECT'in enzim inhibisyon IC₅₀ değerleri, sırasıyla α -glukozidaz için 28.98 ve 34.19 μ g/mL, asetilkolinesteraz için 21.82 ve 26.52 μ g/mL ve karbonik anhidraz II için 27.75 ve 13.72 μ g/mL'dir. MECT ve WECT'de bulunan fenolik bileşik miktarları sırasıyla 47.00 ve 46.00 μ g GAE /mg ekstre, flavonoid miktarları 60.98 ve 49.34 μ g KE/mg ekstre olarak belirlenmiştir. MECT ve WECT'in IC₅₀ değerleri sırasıyla DPPH için 34.66 ve 57.76 μ g/mL, ABTS için 20.39 ve 17.33 μ g/mL ve DMPD için 53.32 ve 57.76 g/mL'dir. Ekstrelerin indirgeme yetenekleri ise sırasıyla Fe⁺³ indirgeme (λ_{700} :0.377 ve 0.680), FRAP (λ_{593} :0.690 ve 0.369) ve KUPRAK (λ_{450} :0.458 ve 0.333)'dür. UPLC-MS/MS analiziyle elde edilen sonuçlara göre ana bileşenler MECT'in kinik asit 0.39844 μ g/mL, klorojenik asit 38.412 μ g/mL, fumarik asit 0.301 μ g/mL ve WECT'in klorojenik asit 13.639 μ g/mL, kinik asit 11.004 μ g/mL, siyanidin-3-O-glukozit 0.778 μ g/mL olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin, antioksidan aktivite ve α -glukozidaz, asetilkolinesteraz, karbonik anhidraz II enzim inhibisyon etkisi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- Karbonik anhidraz II
- Kolinesteraz
- α -Glukozidaz
- Antioksidan
- Enzim inhibisyon
- UPLC-MS/MS
- Cephalaria*

Determination of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss.'s Extracts Antioxidant Activity, Effect on Metabolic Enzymes, and Chemical Characterization by UPLC-MS/MS Analysis

Highlights:

- Antioxidant activity and enzyme inhibition effects of extracts of *Cephalaria tchihatchewii* were investigated, chemical components were analyzed.

ABSTRACT:

The present study aims to perform a comprehensive chemical characterization of the methanol and water extracts of *Cephalaria tchihatchewii* Boiss. (MECT, WECT) using UPLC-MS/MS, besides evaluating the potential antioxidant activity of these extracts and their effect on some metabolic enzymes. The antioxidant activity was assessed using various assays including DPPH, ABTS, DMPD, FRAP, CUPRAC, and Fe³⁺ reducing assays. The inhibition effects of the extracts against α -glycosidase, acetylcholinesterase and carbonic anhydrase II enzymes were evaluated. The IC₅₀ values of MECT and WECT were for α -glycosidase were 28.98 and 34.19 μ g/mL, for acetylcholinesterase were 21.82 and 26.52 μ g/mL, and for carbonic anhydrase, 27.75 and 13.72 μ g/mL, respectively. The amounts of phenolic compounds present in MECT and WECT were determined to be 47.00 and 46.00 μ g GAE /mg extract, respectively. The amounts of flavonoids present in MECT and WECT were determined to be 60.98 and 49.34 μ g KE/mg extract, respectively. The MECT and WECT exhibited distinct activities on DPPH, ABTS, and DMPD. The IC₅₀ values were for DPPH 34.66 and 57.76 μ g/mL for ABTS 20.39 and 17.33 μ g/mL and for DMPD 53.32 and 57.76 g/mL, respectively. Reducing abilities of extracts were respectively Fe⁺³ reducing (λ_{700} :0.377 and 0.680), FRAP (λ_{593} :0.690 and 0.369), and CUPRAC (λ_{450} :0.458 and 0.333). UPLC-MS/MS revealed that the major components are MECT (quinic acid 39.844 μ g/mL, chlorogenic acid 38.412 μ g/mL, fumaric acid 0.301 μ g/mL), and WECT (chlorogenic acid 13.639 μ g/mL, quinic acid 11.004 μ g/mL, cyanidin-3-O-glucoside 0.778 μ g/mL). The extracts were determined to have various biological activities, including antioxidant activity and α -glycosidase, acetylcholinesterase, carbonic anhydrase II enzyme inhibition effect.

Keywords:

- Carbonic anhydrase II
- Cholinesterase
- α -Glycosidase
- Enzyme inhibition
- Antioxidant
- UPLC-MS/MS
- Cephalaria*

¹Leyla GÜVEN (Orcid ID: 0000-0002-3189-6415) Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 25240 Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Leyla GÜVEN, e-mail: leyla.guven@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Türkiye, yaklaşık 10.000 tür ile bitki florası açısından en zengin ülkelerden biridir. Türkiye'de yayılan önemli familyalardan biri de Caprifoliaceae'dir. Dipsacaceae familyası ise bu familyanın alt familyası olarak kabul edilmektedir. (Göktürk ve ark., 2014; Sumer ve ark., 2018)

Dipsacaceae, *Cephalaria* Schrader ex Roemer & Schultes'in de üyesi olduğu 13 cins ve 250-350 türden oluşan küçük bir familyadır. Bu familya, ağırlıklı olarak Akdeniz bölgesinde ve Yakın Doğu'da yayılış gösteren 94 türden oluşur. Türkiye'de 40 tür vardır ve bunların 25'i endemiktir. Birçok *Cephalaria* (Pelemir) türü, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve sitotoksik özellikleri nedeniyle geleneksel tıpta kullanılmıştır. *Cephalaria* türlerinin çoğu, Dipsacaceae familyasındaki son derece zengin bir kimyasal çeşitlilik ile karakterizedir. (Sarıkahya, 2014)

Yapılan birçok çalışma sonucunda bu türlerin bir kısmının eski zamanlarda boya, gıda katkı maddesi ve halk ilacı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. *Cephalaria* türleri flavonoid (luteolin, kersetin, sinarosit, kersimeritrin), iridoit (loganin, loganik asit, sverosit, kantleyozit ve gentiopikrin), alkaloid, lignan ve özellikle saponinler gibi ikincil metabolitler açısından zengindir. *Cephalaria* türlerinden elde edilen sekonder bileşiklerin sitotoksik, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, hemolitik ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. (Dagli ve ark., 2018; Sarıkahya ve ark., 2010)

Cephalaria cinsi zengin kimyasal bileşime ve biyolojik potansiyele sahiptir. *Cephalaria* türlerinin antibiyotik, antiviral, antikonvülsif, antifungal, antiparazit, antioksidan, anti-enflamatuvar ve antitümör olduğu bildirilmektedir. Ayrıca immünomodülatör, sitotoksik, pestisit, hemolitik gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedir. (Atalan, 2019; Celenk ve ark., 2020; Chrząszcz ve ark., 2020a; Dagli ve ark., 2019; Kasaplıgil ve ark., 2020; Sarıkahya ve ark., 2010; Sarıkahya ve ark., 2018)

Antioksidanlar, oksidasyon sürecini ve serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek metabolizmayı reaktif oksidatif türlerden ve oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumaktadır. Ayrıca kanser, Parkinson hastalığı, katarakt, diyabet, kalp-damar hastalıkları ve Alzheimer hastalığı gibi kronik hastalıkları önlemede olumlu etkiye sahiptirler. Ek olarak, antioksidanlar, radikal zincir reaksiyonlarını kolayca sonlandırabilir ve hücrel biyomoleküllere zarar veren serbest radikalleri etkili bir şekilde nötralize edebilmektedir. Bitkilerin antioksidan aktivitesi, fenolikler, flavonoidler ve diğer doğal bileşikler gibi sekonder metabolitlerle ilişkilidir. Bu bağlamda sebze, meyve ve tıbbi bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanların reaktif oksidatif veya serbest radikalleri kolayca ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Bu nedenle zararlı etkileri olan sentetik antioksidanlara alternatif olarak bitkilerden elde edilen güvenilir doğal antioksidanlar tercih edilmektedir. (Okkay ve ark., 2021; Topal ve ark., 2022)

Yaşam süresi arttıkça, hafıza kaybı ve diğer bilişsel bozukluklarla karakterize olan Alzheimer hastalığının (AH) insidansı da artar. Nörodejenerasyon, Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere birçok yıkıcı hastalıkla ilişkili nöronal ölüme neden olan karmaşık bir prosedürdür. Bu hastalık, beynin belirli bölgelerinde oksidatif stres, iltihaplanma ve asetilkolin (ACh) eksikliği ile ilişkilidir. Bu nedenle, antioksidan zengin besinler ve tıbbi bitkiler tüketmek potansiyel olarak AH'nin ilerlemesini ve nörodejenerasyonu yavaşlatabilir. ACh oluşumunu hidrolize edebilen asetilkolinesteraz (AChE), ACh'de azalmaya ve sinir sinyallemede bozulmaya neden olarak AH oluşumuna katkıda bulunur. AChE inhibitörleri, AChE enziminin aktivitesini inhibe eder ve ACh'nin bozulmasını azaltabilir. AH'nin tedavisinde Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan rivastigmin, takrin ve donepezil gibi birçok ilaç kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu farmasötik ajanlar, daha düşük aktivite, daha düşük seçicilik ve potansiyel toksisite gibi olumsuz özelliklere sahip olabilir. Bu nedenle, AH tedavisini iyileştirmek

için daha düşük toksisiteye, daha yüksek seçiciliğe ve daha güçlü aktiviteye sahip yeni farmasötik ajanlara acil bir ihtiyaç vardır. (Eruygur ve ark., 2019; Sezer Senol ve ark., 2016)

Karbonik anhidraz enzimleri hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunur ve pH regülasyonu, karboksilasyon reaksiyonları, sıvı dengesi, kemik rezorpsiyonu, tümör oluşumu, kalsifikasyon, bikarbonat sentezi ve diğer birçok patolojik ve fizyolojik süreçte önemli roller oynar. Karbonik anhidraz inhibitörleri, glokom, epilepsi, obezite ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde farmasötik ajan olarak kullanılır. (Arabaci ve ark., 2014)

Diabetes mellitus, kandaki atıpk glikoz seviyeleri ve nöropati, retinopati, kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz ve sinir hasarı gibi ilişkili komplikasyonlarla karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. DM'nin birincil etiyolojisinin oksidatif stres olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Hiperglisemide aşırı glukoz yüklenmesi, mitokondride reaktif oksidatif stres oluşumunu tetikleyerek mitokondriyal fonksiyonların bozulmasına yol açar. Polisakkaritler, sindirim enzimleri tarafından monosakkaritlere hidrolize edilir. Bu nedenle, sindirim enzimlerinin inhibisyonu, DM tedavisi için önemli bir terapötik yol sağlar. α -Glikozidaz enzimi bağırsak hücreleri tarafından salgınır. Her iki enzim de oligosakkaritleri ve polisakkaritleri glikoz gibi monosakkarit birimlerine hidrolize eder. α -Glikozidaz enzimine karşı inhibitör özelliklere sahip yeni tıbbi bitkilerin tanımlanması, hipergliseminin yönetimi için çok önemlidir. (Gulçin ve ark., 2018; Gülçin ve ark., 2020)

Cephalaria tchihatchewii ekstrelerinin antioksidan, antikolinesteraz, antidiyabetik ve antiglokom özellikleri açısından yaptığımız literatür araştırmasında, yeterli verilerin olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle araştırmamızın amacı, *Cephalaria tchihatchewii* bitkisinin metanol ve su ekstrelerinin kimyasal bileşimini ve biyoaktivitesini ortaya koymaktır.

MATERYAL VE METOT

Bitki materyali

Cephalaria tchihatchewii 1 Temmuz 2018 tarihinde Erzurum ili Şenyurt köyünde (40° 10' 27" K 41° 30' 27" D) koordinatlarında 2430 metre rakımda toplanmıştır. Prof. Dr. Yusuf Kaya (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından teşhis edilmiştir. Herbaryum örnekleri Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde AUEF 1386 herbaryum numarası ile muhafaza edilmektedir.

Ekstraksiyon

Öğütücüyle toz edilen 50 g bitki materyalleri 1000 mL metanol/kaynar su ile manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında bir gece boyunca ekstre edilmiştir. Ardından metanol/su süzütüsü ayrılmıştır. Metanol süzütüsü 120 rpm'de döner buharlaştırıcı uçurularak, su süzütüsü ise liyofilizatörde kurutulmuştur. *Cephalaria tchihatchewii* metanol ekstresinin (MECT) verimi %26.67, su ekstresinin (WECT) verimi ise %21.60'dir.

Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi (UPLC-MS/MS) Yöntemi

Cephalaria tchihatchewii bitkisinde, 35 fenolik bileşik ultra performanslı sıvı kromatografisi MS-MS sistemi ile analiz edildi. UPLC-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı ile elde edildi.

Kromatografik koşullar

Cihazın UPLC kısmı bir otomatik örnekleyci, bir ikili pompa, bir gaz giderici ve bir termostatlı kolondan oluşmaktadır. Fenolik bileşiklerin kromatografik ayrımı 30°C'de, C18 ters faz analitik kolon

(Zorbax SB-C18) üzerinde, % 0.1 formik asit içeren su (A) ve % 0.1 formik asit içeren asetonitrilden (B) oluşan mobil faz karışımının gradient elüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. (Güven ve ark., 2023)

Antioksidan aktivite testi

Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi

MECT ve WECT indirgeme kuvvetinin belirlenmesi, Oyaizu yönteminin değiştirilmiş bir versiyonuna göre gerçekleştirilmiştir (Gulcin, 2020; Oyaizu, 1986). Bu yöntemde Fe³⁺(CN⁻)₆'nın indirgenmesi ile azalan miktarı tespit edilmiştir. Ardından ferrik iyonların (Fe³⁺) eklenerek, Perl'in Prusya mavisi kompleksi oluşturuldu. *Cephalaria* ekstrelerine (15-45 µg/mL), %1'lik K₃Fe(CN)₆, ve 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ile eklenmiştir. Karışım, 50°C'de yarım saat inkübe edildikten sonra üzerine %10 luk trikloroasetik asit ve %0.1 FeCl₃ de ilave edilmiş ve 700 nm'de absorbansı ölçülmüştür.

Cu²⁺-Cu⁺ indirgeme kapasitesi (KUPRAK metodu)

MECT ve WECT Cu²⁺ indirgeme kuvvetinin belirlenmesi, KUPRAK testi kullanılarak belirlenmiştir (Ak ve ark., 2008; Apak ve ark., 2006). Deneyde kromojenik oksitleyici ajan olarak neokuprin kullanılmıştır. 15-45 µg/mL konsantrasyonlarındaki ekstrelelere 1.0 M'lık asetat tamponu, 10 mM CuCl₂ çözeltisi ve 7.5 mM neokuprin çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Çözelti hacmi distile su ile 2 mL'ye tamamlandı ve karışım oda sıcaklığında yarım saat inkübe edilerek absorbans 450 nm'de ölçüldü. Absorbansın artması, indirgeme yeteneğinin oranı olarak tanımlanmaktadır.

Ferric indirgeme gücü (FRAP metodu)

MECT ve WECT'in ferric indirgeme aktivitesi, TPTZ-Fe³⁺ kompleksinin asidik koşullar altında indirgeme yöntemine göre değerlendirildi (Göçer ve ark., 2011). TPTZ-Fe³⁺ kompleksinin asidik ortamda indirgenmesi, FRAP yönteminin temelini oluşturur. Bu amaçla 15-45 µg/mL konsantrasyonlarındaki ekstrelelere, 10 mM taze TPTZ solüsyonu, 0.3 M fosfat tampon solüsyon (pH 3.6) ve 20 mM FeCl₃ solüsyonu eklendi. 37°C'de yarım saat inkübasyondan sonra 593 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. Bitki ekstresi konsantrasyonu artmasıyla ölçülen absorbanslar da artmıştır.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) serbest radikal yakalama aktivitesi

MECT ve WECT'in DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi Blois yöntemi ile değerlendirildi (Blois, 1958). Yöntemin esası, DPPH serbest radikallerinin antioksidanlar ile uzaklaştırılmasına dayanır. 15-45 µg/mL konsantrasyondaki ekstre içeren tüplere 0.1 mM DPPH[•] eklendi ve karışım da sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. 517 nm'de karışımın absorbansı ölçülerek ekstrelerin DPPH[•] temizleme potansiyelleri belirlendi. Absorbanstaki azalma, numunelerin DPPH[•] süpürme yeteneğini gösterir.

N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD^{•+}) deradikalizasyon aktivitesi

MECT ve WECT'in DMPD radikal yakalama aktivitesinin belirlenmesi, Fogliona ve ark. tarafından geliştirilen yöntemine göre yapıldı (Fogliano ve ark., 1999). Örneklerin 15-45 µg/mL konsantrasyonlarına 0.1 M fosfat tampon, (pH 5.3), 0.05 M FeCl₃ ve DMPD^{•+} solüsyonu eklendi. Bir saatlik inkübasyonun ardından 505 nm'de absorbanslar kaydedildi.

Azino-bis (3-etilbenzo-tiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS^{•+}) radikal süpürme aktivitesi

MECT ve WECT'in ABTS radikal yakalama aktivitesi, Re ve ark. tarafından geliştirilen yöntemine göre belirlendi (Re ve ark., 1999). Bu teste göre ilk olarak ABTS^{•+} radikalleri oluşturulmuştur. Bunun

için 7.0 mM ABTS ve 2.45 mM K₂S₂O₈ reaksiyona sokuldu. Oluşan ABTS^{•+} radikallerini içeren solüsyonun absorbanans değeri, spektrofotometrede 734 nm'de 0.1 M tamponla (pH 7.4,) 0.750±0.025'e ayarlandı. Ayarlanan ABTS^{•+} çözeltisine 15-45 µg/mL konsantrasyonlarındaki *Thymus Cephalaria* ekstreleri çözeltisi ve yarım saat inkubasyondan sonra, tüm numuneler 734 nm'de absorbanansları ölçüldü. Absorbanstaki azalma, örneklerin ABTS^{•+} radikal temizleme kabiliyetini göstermektedir.

Total fenolik bileşiklerin miktarının belirlenmesi

MECT ve WECT'deki toplam fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile belirlendi (Singleton ve ark., 1999). *Cephalaria* ekstresine Folin-Ciocalteu reaktifi, %1'lik karbonat ilave edildi ve karıştırıldı. Karışım, oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat inkübe edildi ve 760 nm'de absorbanansı ölçülmüştür. Bir gram *Cephalaria* ekstraktındaki fenol miktarı, mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplandı.

Total flavonoit miktarının belirlenmesi

MECT ve WECT'in toplam flavonoit içeriği, %10 AlCl₃ ve 1.0 M potasyum asetatın ekstrelerdeki flavonoitlerle olan renk reaksiyonu ile belirlenmiştir (Kiziltas ve ark., 2021). *Cephalaria* ekstraktlarındaki toplam flavonoit içerik, %10 AlCl₃ ve 1.0 M potasyum asetatın ekstrelerdeki flavonoitlerle olan renk reaksiyonu ile 415 nm'de spektrofotometrik ölçüme dayanan bir metodla tespit edilmiştir. Bitki ekstrelerinin toplam flavonoit miktarı mg guercetin eşdeğeri (KE)/mg olarak hesaplandı.

In vitro enzim inhibisyon çalışmaları

Asetilkolinesteraz inhibisyon etkisi

MECT ve WECT'in AChE enzimi (*Electrophorus electricus* kaynaklı) üzerindeki inhibisyon etkisini incelemek için Ellman metodu kullanılmıştır (Ellman ve ark., 1961). Bu çalışmada ekstreler 1 M Tris/HCl tamponu (pH 8.0), 0.5 mM 5.5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit), 5.32 ×10⁻³ EU AChE solüsyonu, ve 1 µmol asetilkolin iyodat (substrat) karıştırıldı. Reaksiyonun oluşması için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve 412 nm'de absorbanansı ölçülmüştür.

α-Glikozidaz inhibisyon etkisi

MECT ve WECT'in α-glikozidaz enzim üzerindeki inhibisyon etkisi Karageçili ve ark.'nın metoduna göre gerçekleştirildi (Karageçili ve ark., 2023). Çalışmada farklı miktarlardaki bitki ekstreleri, 0.15 U/mL α-glikozidaz (Sigma-Aldrich) solüsyonu, ve tampon (pH 7.4) ile karıştırıldı. Daha sonra 35°C'de reaksiyonun başlaması için substrat olarak kullanılan 5 mM p-NPG (p-Nitrofenil-D-glukopiranosid) eklendi ve 3 dakika inkübe edildi. Absorbananslar 405 nm'de izlendi.

Karbonik Anhidraz II inhibisyon etkisi

MECT ve WECT'in karbonik anhidraz II enzime karşı inhibisyon etkisi Topal ve ark. (2014) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Karbonik anhidraz II izozimi, Sepharose-4B-Tirozin-sülfanamid afinite kolon kromatografisi kullanılarak insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Eritrositler santrifüj ile çöktürülmüş, serumu ayrılmış ve katı Tris ile pH 8.7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra bu numune afinite kromatografisi kolonuna yüklenmiş ve Tris-Na₂SO₄/HCl (pH 8.7, 22 mM/25 mM) ile dengelenmiştir. Karbonik anhidraz II, sodyum asetat/NaClO₄ (0.5 M, pH 5.6, 25°C) ile yıkanmıştır. Saflaştırma çalışması sırasında protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Standart protein olarak sığır serum albümini kullanılmıştır. Karbonik anhidraz II saflığı, SDS-PAGE tarafından kontrol

edilmiştir. Karbonik anhidraz II'nin saflaştırma ve inhibisyon işlemi sırasında, 348 nm'de absorbans değişimi takip edilerek esteraz etkileri gerçekleştirilmiştir (Topal ve Gulcin, 2014).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda yer alan MECT ve WECT ekstrelerinde yer alan fenolik maddeler Çizelge 1'de verilmiştir. MECT ve WECT'te tanımlanan fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS yöntemi ile kantitatif analizi, her analit için farklı derişim seviyelerinde oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, MECT'te en yüksek miktardan en düşük miktara doğru sıralandıklarında, kinik asit 39.844 µg/mL, klorojenik asit 38.412 µg/mL, fumarik asit 0.301 µg/mL, rosmarinik asit 0.209 µg/mL, gallik asit 0.204 µg/mL, kafeik asit 0.197 µg/mL, ferulik asit 0.044 µg/mL, viteksin 0.011 µg/mL; WECT'te klorojenik asit 13.639 µg/mL, kinik asit 11.004 µg/mL, siyanidin-3-O-glukozit 0.778 µg/mL, kerasiyanin klorit 0.374 µg/mL rosmarinik asit 0.135 µg/mL, peonidin-3-O-glukozit 0.001 µg/mL, apigenin 0.0001 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerde yer alan fenolik maddelerin kromatogramları UPLC-MS/MS'den yararlanılarak Şekil 1'de gösterilmiştir. MECT ve WECT ekstrelerinde farklı içerikte ve farklı miktarlarda fenolik bileşenlerin olması metanol ve su ekstrelerinin farklı polaritelere sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Yaptığımız bu çalışma ile ilk kez *Cephalaria tchihatchewii* methanol ve su ekstrelerinde UPLC-MS/MS analizi yapılmıştır. Farklı bir çalışmada ise *n*-BUOH ekstresi çalışılmış farklı içerikler tespit edilmiştir. Sarıkahya ve ark. (2019) tarafından yapılan bu çalışmada majör olarak hesperidin, siyanidin-3-O-glukozit, hiperozit, kersetin, luteolin, luteolin-7-O-glukozit, salisilik asit, jinsojenik asit ve kafeik asit gibi fenolik bileşikler içerdiği bildirilmektedir.(Sarıkahya ve ark., 2019) Van bölgesinden toplanan bitkinin fenolik bileşenleri yetiştiği yöre, iklim, toprak koşulları gibi faktörler sebebiyle farklı içeriklere sahip olduğu görülmektedir (Güven ve ark., 2021).

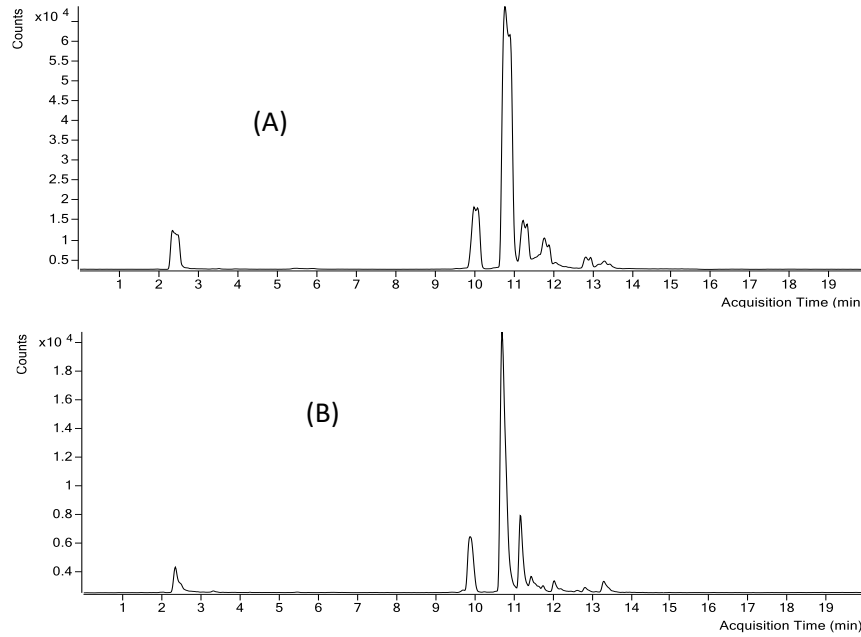
Çizelge 1. *Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile kantitatif analizi sonuçları

No	Analytes	AZ ^a	S.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	MECT (µg/mL)	WECT (µg/mL)
1	Kinik asit	2.361	190.9	85.0	Neg	39.844	11.004
2	Fumarik asit	4.133	114.9	71.1	Neg	0.301	T.E.
3	Gallik asit	5.465	168.9	79.0	Neg	0.204	T.E.
4	Pirogallol	6.657	124.9	96.6	Neg	T.E.	T.E.
5	Klorojenik asit	10.707	352.9	190.9	Neg	38.412	13.639
6	Peonidin-3-O-glukozit	10.923	460.9	298.8	Neg	T.E.	0.001
8	Kateşin	10.986	289.1	244.9	Neg	T.E.	T.E.
7	4-OH-Benzoik asit	11.457	137.0	93.1	Neg	T.E.	T.E.
10	Kafeik asit	11.470	178.8	134.8	Neg	0.197	T.E.
9	Epigallokateşin gallat	11.532	456.8	304.9	Neg	T.E.	T.E.
12	Kerasiyanin klorit	11.546	592.8	284.7	Neg	T.E.	0.374
19	Hesperidin	11.560	609.	300.9	Neg	T.E.	T.E.
16	Epikateşin	11.595	289.0	244.9	Neg	T.E.	T.E.
15	Viteksin	11.663	430.9	310.9	Neg	0.011	T.E.
17	Naringin	11.894	579.0	270.8	Neg	T.E.	T.E.
11	Siyanidin-3-O-glucoside	12.040	447.1	283.8	Neg	T.E.	0.778
18	Ellajik asit	12.203	300.8	283.4	Neg	T.E.	T.E.
14	Şiringik asit	12.266	169.9	122.8	Neg	T.E.	T.E.
26	Mirsetin	12.318	316.9	150.9	Neg	T.E.	T.E.
22	p-Kumarik asit	12.341	163.0	118.9	Neg	T.E.	T.E.
13	Vanilik asit	12.384	166.9	151.9	Neg	T.E.	T.E.
25	Taksifolin	12.435	302.9	124.7	Neg	T.E.	T.E.
24	Rosmarinik asit	12.462	358.8	160.8	Neg	0.209	0.135
21	Ferulik asit	12.469	193.0	134.0	Neg	0.044	T.E.
20	Sinapik asit	12.556	222.8	163.9	Neg	T.E.	T.E.
23	Vanilin	12.617	151.0	135.8	Neg	T.E.	T.E.
27	Resveratrol	13.121	226.8	184.8	Neg	T.E.	T.E.
28	Luteolin	13.307	284.9	132.9	Neg	T.E.	T.E.
29	Kersetin	13.392	300,9	150.7	Neg	T.E.	T.E.

Çizelge 1. *Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin UPLC-MS/MS ile kantitatif analizi sonuçları (Devamı)

No	Analytes	Az ^a	S.I. (m/z) ^b	F.I. (m/z) ^c	Ion. mode	MECT (µg/mL)	WECT (µg/mL)
31	Naringenin	13.960	270.9	150.8	Neg	T.E.	T.E.
30	Apigenin	13.975	268.9	224.8	Neg	T.E.	0.0001
32	Izoramnetin	14.160	314.9	299.8	Neg	T.E.	T.E.
33	Krisin	15.514	252.8	208.8	Neg	T.E.	T.E.
34	Galangin	15.585	268.9	168.8	Neg	T.E.	T.E.
35	Kurkumin	15.623	366.9	148.9	Neg	T.E.	T.E.

^aA.Z.: Alıkönme zamanı. ^bS.I. (m/z): Standart analitlerin moleküler iyonları (m/z). ^cFI (m/z): Fragment iyonlar, ^dT.E.: Tespit edilemedi

**Şekil 1.** MECT (A), WECT (B)'nin çoklu reaksiyon izleme kromatogramı

Cephalaria türünün metanol ve su ekstrelerinin 6 farklı metotla antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiş ve genel olarak en yüksek aktivite metanol ekstrelerinde (MECT) görülmüştür. Ayrıca hem Folin metoduyla hem de UPLC-MS/MS metoduyla fenolik madde miktarları incelenmiş ve en yüksek fenolik maddenin antioksidan aktiviteki gibi MECT'de görülmüştür. Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi fenolik madde miktarıyla antioksidan aktivite paraleldir. Alzheimer, glokom, diyabet gibi nörodejeneratif ve metabolik hastalıklar oksidatif hasarla bağlantılıdır (Izzotti ve ark., 2006; Rochette ve ark., 2014; Sezer Senol ve ark., 2016).

Herhangi bir antioksidan testi, bir bitki ekstresinin "toplam antioksidan kapasitesini" tam olarak yansıtamaz. Kapsamlı bir antioksidan testi yapmak istiyorsak, farklı mekanizmalarla (hidrojen/elektron transferi), hem lipofilik hem de hidrofilik bileşiklerin aktivitesi gösterilmelidir. Bu nedenle, bir bitki ekstresinin toplam antioksidan kapasitesini ortaya çıkarmak için farklı antioksidan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Gulcin, 2020; Zengin ve ark., 2019).

Fe³⁺-Fe²⁺ indirgeme kapasitesi deneyinde, reaksiyon karışımının absorbandsındaki artış, kompleks oluşumunu gösterir. Oluşan bu kompleks de indirgeme kapasitesindeki artışa işaret eder. (I. Gulcin, 2009) Antioksidan olarak kullanılan etanol içinde çözülmüş MECT ve WECT numunelerinin indirgeme gücünden dolayı numune içeren çözeltinin sarı rengi yeşil ve mavi tonuna dönüşmüştür (Gülçin ve ark., 2010). Bitki ekstrelerinin indirgeme kapasitesi konstrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Ekstrelerin ve standart antioksidanların (BHT (Bütül hidroksi toluen), BHA (Bütül hidroksi anisol), troloks ve α -tokoferol) indirgeme potansiyeli 15, 30, 45 µg/mL konsantrasyonlarında 700 nm'de olan absorbands değerleri ölçülerek belirlenmiştir.

30 µg/mL'de BHT (λ_{700} :2.018)> α -tokoferol (λ_{700} :1.895)> Troloks (λ_{700} :1.545)> BHA (λ_{700} :1.257)> WECT (λ_{700} :0.680)> MECT (λ_{700} :0.377) şeklinde bir sıralamaya sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 2. Çizelge 2.)

KUPRAK metodu, antioksidan bileşik etkisi ile Cu^{2+} 'nin Cu^+ 'a indirgenmesine veya polifenoller tarafından neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) varlığında sulu etanolik ortamda (pH 7.0) indirgemeye dayanır. 450 nm'de olan maksimum absorpsiyon pikine sahip olan bir Cu^+ kompleksi verir (Gülçin, 2008).

Cephalaria ekstreleri Cu^{2+} iyonları indirgeme kapasitesi, artan konsantrasyon ile orantılı olarak absorbands vermiştir. Çalışmış olduğumuz ekstrelerin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi farklı konsantrasyonda (15-45 µg/mL) çözeltilerinin 450 nm'de absorbandsları ölçülmüştür. 30 µg/mL'de absorbandslar kıyaslandığında BHT (λ_{450} :2.912)> Troloks (λ_{450} :2.323)> BHA (λ_{450} :1.800)> α -tokoferol (λ_{450} :1.139)> MECT (λ_{450} :0.458)> WECT (λ_{450} :0.333) şeklinde bir sıralamaya sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 2. Çizelge 2.)

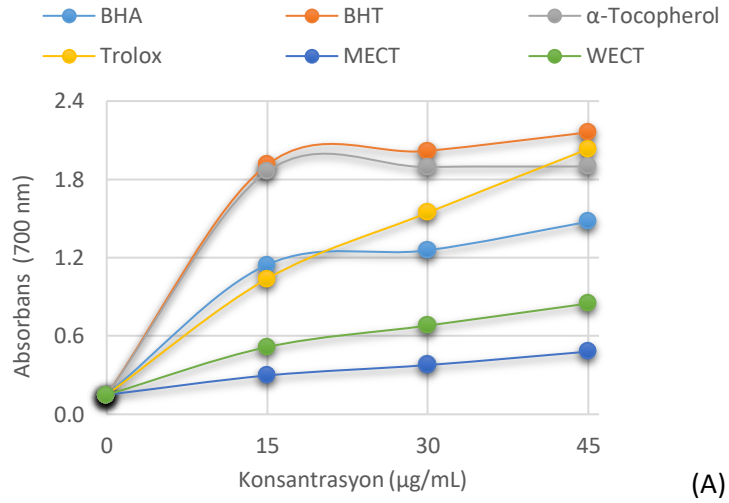
Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen *C. davisiana*, *C. elazigensis*, *C. paphlagonica* ve *C. stellipilis*'in n -hekzan ekstrelerinin KUPRAK analizi ile antioksidan kapasitelerinin belirlendiği çalışmada, antioksidan kapasitelerinin sırasıyla 0.334, 0.252, 0.136 ve 0.120 mmol Troloks/g kuru ekstre olduğu bildirilmiştir (Kırmızıgül ve ark., 2012).

FRAP testi, asidik ortamda antioksidanlar tarafından ferrik iyonlarının (Fe^{3+}) ligand kompleksinin, yoğun mavi renkli ferröz iyonları (Fe^{2+}) kompleksine indirgenmesini ölçen tipik bir elektron transfer bazlı yöntemdir. Başka bir deyişle, bu yöntem, antioksidan bileşiklerin asidik ortamda ferrik kompleksini ($[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$), yoğun mavi renkli ferröz komplekse ($[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) indirgemesine dayanmaktadır. Spektrofotometre aracılığıyla 593 nm'de artan absorpsiyon ile bu indirgeme ölçülmektedir (Gulcin, 2020).

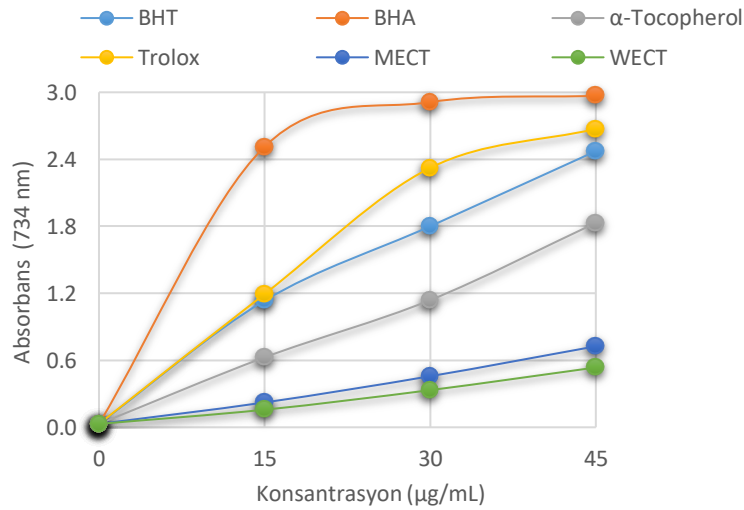
Cephalaria ekstrelerinin ferrik iyonlarının (Fe^{3+}) ligand kompleksinin ferröz iyonları (Fe^{2+}) kompleksine indirgenme kapasitesi artan konsantrasyon ile doğru orantılı şekilde artmıştır. Ayrıca çalışılan ekstrelerin ve standart antioksidanların indirgeme kapasitesi 30 µg/mL'de absorbandslarla karşılaştırıldığında BHT (λ_{593} :2.089)> α -tokoferol (λ_{593} :1.995)> troloks (λ_{593} :1.755)> BHA (λ_{593} :0.884)> MECT (λ_{593} :0.690)> WECT (λ_{593} :0.369) şeklinde bir sıralamaya sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 2. Çizelge 2.)

Çizelge 2. *Cephalaria* ekstrelerinin ve standartların 30 µg/mL konsantrasyonda Fe^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} -TPTZ iyonlarını indirgeme yetenekleri.

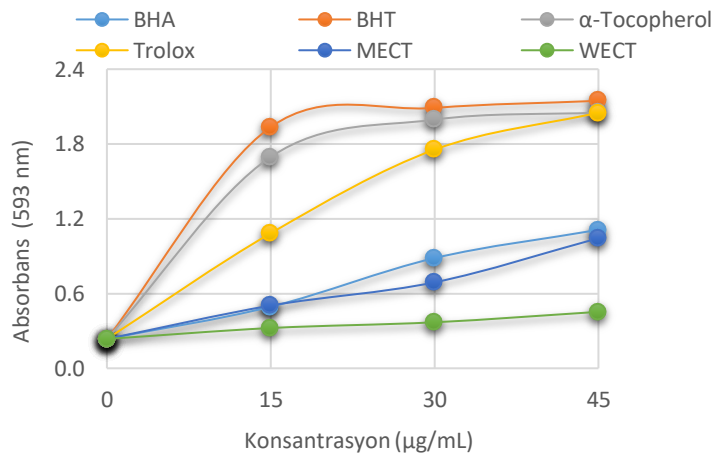
Antioksidanlar	Fe^{3+} indirgeme		Cu^{2+} indirgeme (KUPRAK)		Fe^{3+} -TPTZ indirgeme (FRAP)	
	λ (700 nm)	r^2	λ (450 nm)	r^2	λ (593 nm)	r^2
BHA	1.257	0.9523	1.800	0.9742	0.884	0.9899
BHT	2.018	0.9466	2.912	0.9969	2.089	0.9581
α -Tokoferol	1.895	0.9402	1.139	0.9967	1.995	0.9807
Troloks	1.545	0.9966	2.323	0.9980	1.755	0.9990
MECT	0.377	0.9928	0.458	0.9947	0.690	0.9910
WECT	0.680	0.9920	0.333	0.9900	0.369	0.9872



(A)



(B)



(C)

Şekil 2. *Cephalaria* ekstrelerinin A. Fe³⁺ indirgeme, B. Cu²⁺ indirgeme and C. Fe³⁺-TPTZ indirgeme kabiliyetleri

DPPH radikal giderme yöntemi, antioksidan aktiviteyi ölçmek ve enzimatik olmayan antioksidanların radikal giderme aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan basit, kolay, ekonomik ve hızlı bir deneydir. 517 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. DPPH radikali, koyu mor renk taşıyan kararlı organik nitrojen radikallerinden biridir. Ticari olarak mevcuttur ve ABTS⁺ gibi testten önce üretilmesi gerekmemektedir. Yaygın olarak kullanılan renk giderme tahlili ilk olarak Blois tarafından rapor edilmiştir (Blois, 1958). DPPH radikal çözeltisi, hidrojen atomu verebilen bir

antioksidan molekül ile karıştırıldığında, menekşe rengi kaybolarak indirgenmektedir (Alam ve ark., 2013).

Cephalaria ekstrelerinin ve çeşitli standart antioksidanların (BHT, BHA, Troloks ve α -tokoferol) DPPH radikali giderme aktivite tayini çalışmasında standart grafiği oluşturulmuştur. (Şekil 5) *Cephalaria* ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi konsantrasyon ile doğru orantılı bir şekilde artmaktadır. Grafiğe göre, ekstreler ve sentetik antioksidanlar için IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu DPPH' serbest radikal giderme aktivitesinin Troloks (IC₅₀: 5.92 μ g/mL) < BHA (IC₅₀: 9.0 μ g/mL) < α -tokoferol (IC₅₀: 9.63 μ g/mL) < BHT (IC₅₀: 21.0 μ g/mL) < MECT (IC₅₀: 34.66 μ g/mL) < WECT (IC₅₀: 57.76 μ g/mL) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3, Çizelge 3)

Cephalaria türleri antioksidan aktivitesi yüksek olan türlerdir. Yapılan bir çalışmada *C. syrica* türünde DPPH radikal süpürücü etki testinde neticesinde % 47 oranında inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Rahimi ve ark., 2019).

On *Cephalaria* türünün (*C. anatolica*, *C. aristata*, *C. aytachii*, *C. elazigensis* var. *elazigensis*, *C. hirsuta*, *C. taurica*, *C. tuteliana*, *C. procera* *C. speciosa*, *C. tchihatchewii*) heksan ekstrelerinin araştırıldığı bir çalışmada DPPH radikal temizleme ve KUPRAK yöntemlerini kullanarak antioksidan kapasiteleri açısından değerlendirilmiştir. DPPH testinde *C. tchihatchewii*, *C. hirsuta*, *C. anatolica*, *C. elazigensis* var. *elazigensis* ve *C. speciosa*'nın heksan ekstrelerinin sırasıyla 3.77, 5.13, 5.20, 5.28 ve 6.17 mg/mL IC₅₀ değerleriyle önemli radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. CUPRAC testinde ekstreler içinde *C. aristate*'nin en yüksek TEAC değerine (1.005 mmol TE/g ekstre) sahip olduğu ve indirgeme gücünün fenolik içerikle (2.91 mg GAE/g ekstre) ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sarıkahya ve ark., 2015).

DMPD radikal katyonu, potasyum persülfat (K₂S₂O₈) ve demir klorür (FeCl₃) ile oksidasyon yoluyla oluşturulabilen kararsız bir türdür. Ferrik iyonların (Fe³⁺) varlığında, *N,N*- dimetil -*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD), renkli DMPD radikal katyonuna (DMPD⁺) dönüştürülür. Test numunelerinde bulunan antioksidan moleküller, DMPD radikallerini kolayca temizleyerek DMPD⁺ testinin prensibini oluşturur. ABTS testi ile karşılaştırıldığında bu yöntemin daha basit, daha hızlı ve daha ucuz olduğu bildirilmiştir. Bir oksidan veya asidik pH varlığında, DMPD, stabil ve renkli bir DMPD radikal katyonuna (DMPD⁺) dönüştürülür. Bir hidrojen atomunu (veya bir elektronu) DMPD⁺'ye aktarabilen antioksidan moleküller çözeltinin hızlı renk bozulmasına neden olmaktadır ve 505 nm'de bir absorbans düşüşü ile ölçülmektedir. Bununla birlikte, DMPD'nin sadece suda çözünür olması ve hidrofobik antioksidanlarla kullanılamaması bir dezavantajdır (Gulcin, 2020).

Ekstrelerin, DMPD radikal giderme aktivitesi derişimin artması ile doğru orantılı olarak artmıştır. Bu karşılaştırma sonucu [DMPD⁺] serbest radikal giderme aktivitesinin Troloks (IC₅₀: 14.38 μ g/mL) < BHA (IC₅₀: 31.43 μ g/mL) < MECT (IC₅₀: 53.32 μ g/mL) < WECT (IC₅₀: 57.76 μ g/mL) şeklinde olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3, Çizelge 3)

ABTS, oksidanlar tarafından koyu renkli ABTS⁺ radikal katyonuna oksitlenir. Antioksidan kapasite, numunenin ABTS radikali ile doğrudan reaksiyona girerek, renginin açılmasını sağlamaktadır. ABTS⁺ hem yağda çözünen hem de suda çözünen bileşikler için uygundur. (I. Gulcin, 2009)

ABTS⁺ ile reaksiyon oldukça hızlıdır ve 0.25-0.5 dakikada tamamlanmaktadır. Mavi-yeşil renkli ABTS⁺ radikal katyonu çözeltisine numune içeren antioksidan ajanların konmasıyla rengi daha açık hale gelmektedir. Önceden oluşturulmuş radikalin serbest radikal süpürücülerle reaksiyonu, 734 nm'de numune absorbansının takip edilmesiyle kolayca görselleştirilmektedir (Gülçin ve ark., 2009).

ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi sonuçlarına göre ekstrelerin ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi konsantrasyon artışına bağlı olarak artmıştır. Ekste ve standart antioksidanlar için IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucu ABTS⁺ serbest radikal giderme aktivitesinin Troloks (IC₅₀: 7.71 µg/mL) = BHA (IC₅₀: 7.71 µg/mL) = BHT (IC₅₀: 7.71 µg/mL) < TCEO (IC₅₀: 7.75 µg/mL) < α-tokoferol (IC₅₀: 8.10 µg/mL) < WECT (IC₅₀: 17.33 µg/mL) < MECT (IC₅₀: 20.39 µg/mL) şeklinde olduğu bulunmuştur. (Şekil 3, Çizelge 3)

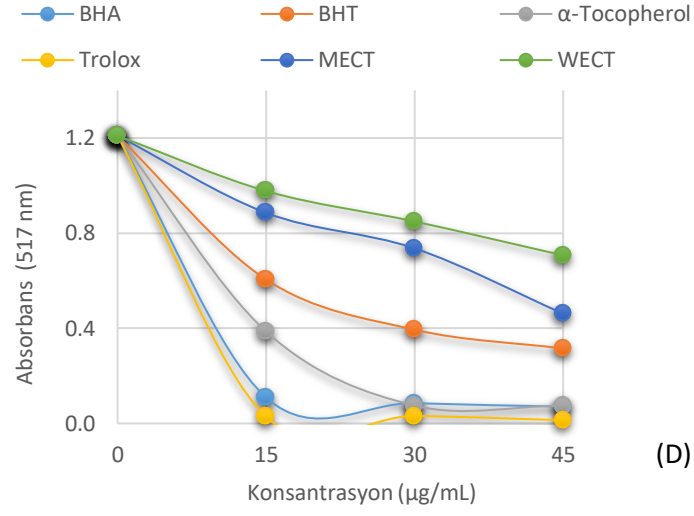
Cephalaria ekstrelerinin toplam fenolik bileşik madde miktarını tespit etmek için standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Elde edilen standart grafik yardımıyla denklem elde edilmiştir ($y = 0.002x$, $r^2: 0.9917$). Elde edilen denklem ile ekstrelerin toplam fenolik bileşik miktarı, gallik asit eşdeğeri (GAE) alınarak hesaplanmıştır. MECT ve WECT sırasıyla 760 nm'de 0.094, ve 0.092 değerinde absorbans vermiştir. Bu da 47.00 µg, ve 46.00 µg/mg gallik asit eşdeğeri (GAE) fenolik madde içerdiğini göstermektedir.

On *cephalaria* türünün fenolik içeriğine bakıldığı çalışmada *C. tchihatchewii* (3.04 mg GAE/g ekstre), *C. aristata* (2.91 mg GAE/g ekstre) ve *C. speciosa*'nın (2.66 mg GAE/g ekstre) en yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir (Sarıkahya ve ark., 2015). Türlerin farklı bölgelerden toplanmasıyla fenolik içerikleri değişebilmektedir (Güven ve ark., 2021).

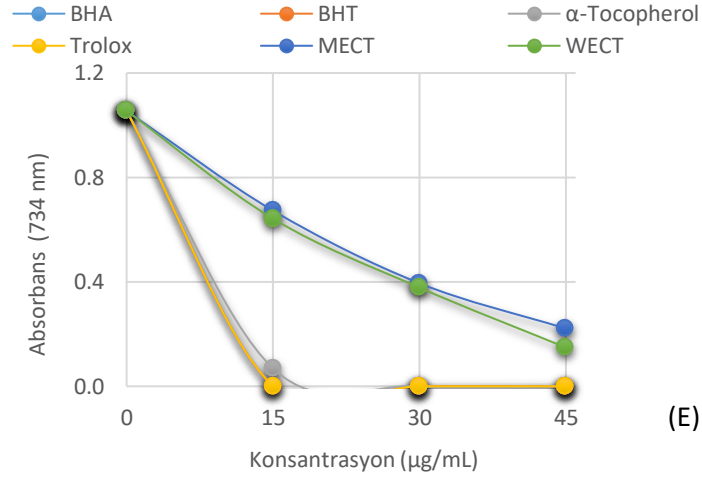
Cephalaria ekstrelerindeki flavanoit bileşiklerinin toplam miktarını belirlemek için standart flavanoit olarak kersetin kullanıldı. Elde edilen standart eğri kullanılarak denklem oluşturuldu ($y = 0.0061x$, $r^2: 0.9980$). Elde edilen denklem kullanılarak ekstrelerdeki toplam flavanoit bileşik miktarları kersetin eşdeğeri (KE) olarak hesaplandı. MECT (0.372), WECT (0.301) sırasıyla 415 nm'de absorbans değerleri vererek flavanoit maddelerin MECT (60.98 µg/mg KE) ve WECT (49.34 µg/mg KE) kersetin eşdeğerleri içerdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3. *Cephalaria* ekstrelerinin ve standart antioksidanlar için DPPH^{*}, ABTS⁺⁺ ve DMPD⁺⁺ IC₅₀ (µg/mL) süpürücü değerleri

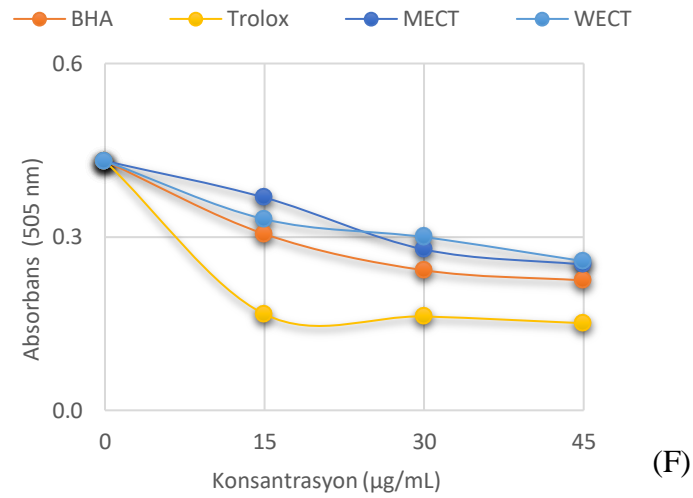
Antioksidanlar	DPPH [*] süpürme		ABTS ⁺⁺ süpürme		DMPD ⁺⁺ süpürme	
	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²	IC ₅₀	r ²
BHA	9.00	0.9399	7.71	0.9330	43.32	0.9993
BHT	21.00	0.9668	7.71	0.9330	-	-
α-Tokoferol	5.92	0.9770	8.10	0.9550	-	-
Troloks	9.63	0.9947	7.71	0.9330	23.90	0.9349
MECT	34.66	0.9844	20.39	0.9969	53.32	0.9801
WECT	57.76	0.9935	17.33	0.9985	57.76	0.9800



(D)



(E)



(F)

Şekil 3. *Cephalaria* ekstrelerinin ve standartların radikal süpürücü etkileri. **D.** DPPH• süpürücü yetenek, **E.** ABTS•+ süpürücü yetenek, **F.** DMPD•+ süpürücü yetenek

Yaptığımız çalışmada genellikle metanol ekstresi su ekstresine göre daha etkin çıkmıştır. Ekstreler tahlil edilen standart maddelere göre yakın antioksidan etkilere sahiptir. Bu da yan etkileri nedeniyle tercih edilmeyen sentetik antioksidanların yerine alternatif olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

C. elazigensis var. *purpurea* toprak üstü kısmının antioksidan etkileri incelendiğinde DPPH süpürücü aktivitesinin 125.6 $\mu\text{mol/mg}$ α -tokoferol eşdeğeri kuru ekstre, ABTS süpürücü aktivitesinin 34.09 $\mu\text{mol/mg}$ α -tokoferol eşdeğeri kuru ekstre, FRAP indirgeme kuvvetinin 123.4 $\mu\text{mol/mg}$ α -tokoferol eşdeğeri kuru ekstre olduğu bildirilmektedir. Çalışmada farklı parametreler üzerinden antioksidan aktivite belirtildiği için karşılaştırmada güçlük yaşanabilmektedir. Ayrıca çalışmada metanol ekstresinin AChE inhibisyon etkisinin IC_{50} değerinin 10.54 mg/mL olduğu görülmektedir.(Erdogan ve ark., 2023) Bizim çalışmamızda ise bu IC_{50} değeri 44.15 $\mu\text{g/mL}$ ve 36.75 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Buna göre MECT ve WECT ekstrelerinin daha etkili olduğu görülmektedir.

C. gigantea ve *C. uralensis* ekstrelerinin antioksidan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada *in vitro* olarak DPPH*, ABTS** ve metal şelatlama analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. *C. uralensis*'in toprak üstü kısımlarında daha yüksek DPPH radikal temizleme aktivitesi bulunmuştur ($\text{IC}_{50}=2.86$ mg/mL). *C. uralensis* çiçeklerinden elde edilen ekstrenin ise, ABTS**'de ($\text{IC}_{50}=0.45$ mg/mL) en yüksek serbest radikal temizleme etkisini göstermiştir (Chrząszcz ve ark., 2020b).

Yapılan farklı bir çalışmada *C. giganteae* yapraklarının metanol ve su ekstrelerinin sırasıyla total fenolik miktarının 198.1 mg/g, 227.2 mg/g, total flavanoit miktarının 269.6 mg/g ve 310.8 mg/g olduğu görülmektedir. *C. giganteae* yapraklarının metanol ve su ekstrelerinin sırasıyla DPPH süpürücü etkileri (IC_{50} 6.3, 0.6 $\mu\text{g/mL}$), ABTS süpürücü etkileri (IC_{50} 4.4, 2.8 $\mu\text{g/mL}$) ve Fe indirgeme kuvvetlerinin (IC_{50} 3.7, 2.8 $\mu\text{g/mL}$), *C. tchihatchewii* türüne göre farklı etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca bitkinin antidiyabetik potansiyeli değerlendirildiği çalışmada α -amilaz ve α -glikozidaz enzimlerinin inhibisyon miktarına göre aktivite testi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda türün köklerinden elde edilen sulu ekstrenin ve yapraklarından elde edilen etanol ekstresinin, sırasıyla α -amilaz ve α -glukozidaza karşı güçlü inhibisyon etki gösterdiği bildirilmiştir (Mbhele ve ark., 2015).

Doygun substrat konsantrasyonunda AChE enzimi için standart inhibitörü olan takrin ve *Cephalaria* ekstrelerinin inhibisyon etkisine bakılmıştır ve grafikleri çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak MECT IC_{50} değeri 44.15 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0.9960$); WECT IC_{50} değeri 36.75 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0.9906$), takrinin IC_{50} değeri ise 0.0246 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2=0.9706$) olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4)

Cephalaria procera ekstrelerinin fenolik içerikleri ve antioksidan aktivite ve kolinesteraz enzim inhibisyon etkisinin incelendiği bir çalışmada suyun fenolik içeriği en yüksek olup 79.64 GAE/mg kuru ekstre'dir, metanol ekstresi ise en yüksek toplam flavonoit içeriğe 15.33 mg KE/g kuru ekstre sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca metanol ekstresi 83.21 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeriyle en yüksek radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. Kolinesteraz enzim inhibisyon deneyinde ise su ekstresi, sırasıyla 134.63 $\mu\text{g/mL}$ ve 62.76 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değerleriyle en yüksek AChE ve BuChE inhibitör etkisini göstermiştir (Burak ve ark., 2021).

Enzim inhibisyon etkileri incelendiğinde incelediğimiz ekstrelerin genel olarak standartlardan daha düşük bir inhibe edici etkisi olduğu görülmektedir. Metanol ekstresi AChE ve α -glikozidaz enzimlerinde daha iyi inhibisyon etkisi göstermiştir. Ancak farklı olarak su ekstresi (WECT) CA II'yi daha iyi şekilde inhibe etmiştir. En iyi antioksidan kapasiteye sahip ekstre ile en iyi enzim inhibisyon etki sahip ekstrenin birbirinden farklı olması non-fenolik sekonder metabolitler ile ilişkili olabilir (Saleem ve ark., 2020).

Çizelge 4. *Cephalaria* ekstrelerinin karbonik anhidraz II (CA II), α -glikozidaz (α -Gly), asetilkolinesteraz (AChE) enzimlerine karşı inhibitör etki değerleri

Numuneler	IC ₅₀					
	CA II	r ²	AChE	r ²	α -Gly	r ²
MECT(μ g/mL)	27.75	0.9362	21.82	0.9960	28.98	0.9958
WECT(μ g/mL)	13.72	0.9760	26.52	0.9906	34.16	0.9307
Asetazolamid* (nM)	8.37	0.9825	-	-	-	-
Takrin** (nM)	-	-	5.97	0.9706	-	-
Akarboz*** (nM)	-	-	-	-	22800	0.9922

*Asetazolamid (AZA), CA II inhibisyonu için bir standarttır (Durmaz ve ark., 2022).

**Takrin, AChE enzimi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Hatice Kiziltas ve ark., 2022).

***Akarboz, α -glikozidaz için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Durmaz ve ark., 2022).

Doğun substrat konsantrasyonunda karbonik anhidraz II için standart inhibitörü olan asetazolamid ve *Cephalaria* ekstrelerinin inhibisyon etkisine bakılmıştır ve grafikleri çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak MECT IC₅₀=27.75 μ g/mL (r²=0.9372), WECT IC₅₀= 13.72 μ g/mL (r²=0.9760), asetazolamid IC₅₀=8.37 nM (r²=0.9825) olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4) Bilgimiz dahilinde yapılan literatür taramasında ilk kez bir *Cephalaria* türünün karbonik anhidraz II enzimi inhibisyon etkisi belirlenmiştir.

Doğun substrat konsantrasyonunda α -glikozidaz için *Cephalaria* ekstrelerinin inhibisyon etkisine bakılmıştır ve grafiği çizilmiştir. Grafikten yararlanılarak MECT IC₅₀=28.79 μ g/mL (r²=0.9958), WECT IC₅₀=34.16 μ g/mL (r²=0.9307), akarboz IC₅₀=14.72 nM (r²=0.9922), değeri olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4)

MECT ve WECT'in enzim inhibisyon etkileri standartlarla kıyaslandığında daha düşük etkiler gözlenmiştir. Ancak ilerleyen çalışmalarda izolasyon ile ekstrelerdeki etkin maddelerin yeniden enzim inhibisyon etkileri incelenerek etkilerin hangi maddelerden kaynaklandığı tespit edilmesi gerekmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, yerel halk tarafından geleneksel olarak hem ilaç hem de gıda olarak kullanılan *Cephalaria* türünün metanol ve su ekstresi, biyoaktivitesi ve fenolik bileşikleri bakımından değerlendirilmiştir. Bitki ekstrelerinin potansiyel tıbbi kullanımını araştırmak için, altı farklı antioksidan aktivite yöntemi kullanılmıştır ve üç farklı enzim ile inhibisyon kapasitesi belirlenmiştir. Literatür taramamızda, *Cephalaria tchihatchewii* ekstrelerinin antioksidan aktivite ve enzim inhibisyonu ile ilgili kapsamlı bir çalışmanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Böylece literatürdeki eksiklik bu çalışma ile giderilecek gibi görünmektedir. Bununla birlikte, gelecekteki çalışmalarda *in vivo* ve hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bitkinin teşhis edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Yusuf Kaya ve deneylerin yürütülmesinde katkı sunana Prof. Dr. İlhami Gülçin'e teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

Ak, T., & Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 21(2), 143-152.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., & Erçağ, E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), 292-304. <https://doi.org/10.1080/09637480600798132>
- Arabaci, B., Gulcin, I., & Alwasel, S. (2014). Capsaicin: A Potent Inhibitor of Carbonic Anhydrase Isoenzymes. *Molecules*, 19(7), 10103-10114.
- Atalan, E. (2019). Türkiye’de yetiştirilen pelemir bitkisinin [*Cephalaria syriaca* (L.)] antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antibiyofilm özelliklerinin ve tohum morfolojisinin araştırılması. Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Burak, B., Emel, M. K., & Yeter, Y. C. (2021). Total phenolic, total flavonoid contents, and in vitro biological activities of *Cephalaria procera*. *İstanbul Journal of Pharmacy*, 51(3), 365-371.
- Celenk, V. U., Sarikahya, N. B., & Kirmizigul, S. (2020). Isolation and Structural Studies on Saponins from Three *Cephalaria* Species from Anatolia. *Chemistry of Natural Compounds*, 56(1), 180-182.
- Chrząszcz, M., Miazga-Karska, M., Klimek, K., Granica, S., Tchórzewska, D., Ginalska, G., & Szewczyk, K. (2020a). Extracts from *Cephalaria Uralensis* (Murray) Roem. & Schult. and *Cephalaria Gigantea* (Ledeb.) Bobrov as Potential Agents for Treatment of Acne Vulgaris: Chemical Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Antioxidants*, 9, 796. doi:10.3390/antiox9090796
- Chrząszcz, M., Miazga-Karska, M., Klimek, K., Granica, S., Tchórzewska, D., Ginalska, G., & Szewczyk, K. (2020b). Extracts from *Cephalaria Uralensis* (Murray) Roem. & Schult. and *Cephalaria Gigantea* (Ledeb.) Bobrov as Potential Agents for Treatment of Acne Vulgaris: Chemical Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Antioxidants*, 9(9), 796.
- Dagli, M., & Sarikahya, N. (2018). Elucidation and characterization of glycosidic compounds from *Cephalaria tuteliana* (dipsacaceae). (master of science thesis), Ege University, Bornova-İZMİR.
- Dagli, M., Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A., & Kirmizigul, S. (2019). Comparative Phytochemical Screening and Cytotoxic Efficacy of Endemic *Cephalaria tuteliana*. *Natural Product Communications*, 14(10), 1934578X19862647.
- Durmaz, L., Kiziltas, H., Guven, L., Karagecili, H., Alwasel, S., & Gulcin, İ. (2022). Antioxidant, Antidiabetic, Anticholinergic, and Antiglaucoma Effects of Magnofluorine. *Molecules*, 27(18), 5902.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erdogan, M. K., Gundogdu, R., Yapar, Y., Gecibesler, I. H., Kirici, M., Behcet, L., . . . Taslimi, P. (2023). In vitro anticancer, antioxidant and enzyme inhibitory potentials of endemic *Cephalaria elazigensis* var. *purpurea* with in silico studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-13. doi:10.1080/07391102.2022.2163700

- Eruygur, N., Koçyiğit, U. M., Taslimi, P., Ataş, M., Tekin, M., & Gülçin, İ. (2019). Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. *South African Journal of Botany*, 120, 141-145. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.001>
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 1035-1040.
- Göçer, H., & Gülçin, İ. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 821-825. doi:10.3109/09637486.2011.585963
- Göktürk, R. S., & Sümbül, H. (2014). A taxonomic revision of the genus *Cephalaria* (Caprifoliaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 38, 927-968. doi:10.3906/bot-1310-6
- Gulcin, I. (2009). Antioxidant activity of L-adrenaline: a structure-activity insight. *chemicobiological interactions*, 179(2), 71-80.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- Gulçin, İ., Taslimi, P., Aygün, A., Sadeghian, N., Bastem, E., Kufrevioglu, O. I., . . . Şen, F. (2018). Antidiabetic and antiparasitic potentials: Inhibition effects of some natural antioxidant compounds on α -glycosidase, α -amylase and human glutathione S-transferase enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 741-746. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.001>
- Güven, L., Özgen, U., Secen, H., Sener, S. Ö., Badem, M., Celik, G., & Yayli, N. (2021). Phytochemical studies on the seeds, pseudofruits, and roots of *Rosa pimpinellifolia*. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(2), 153-163.
- Gülçin, I. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 871-876. <https://doi.org/10.1080/14756360701626223>
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., & Köksal, E. (2009). Antioxidant secoiridoits from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood science and technology*, 43(3), 195-212.
- Gülçin, İ., Gören, A. C., Taslimi, P., Alwasel, S. H., Kılıç, O., & Bursal, E. (2020). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101441. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101441>
- Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*, 3(1), 43-53.
- Güven, L., Ertürk, A., Miloğlu, F. D., Alwasel, S., & Gulcin, İ. (2023). Screening of Antiglaucoma, Antidiabetic, Anti-Alzheimer, and Antioxidant Activities of *Astragalus alopecurus* Pall—Analysis of Phenolics Profiles by LC-MS/MS. *Pharmaceuticals*, 16(5), 659.
- Izzotti, A., Bagnis, A., & Saccà, S. C. (2006). The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 612(2), 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.11.001>
- Karagecili, H., Yılmaz, M. A., Ertürk, A., Kiziltas, H., Güven, L., Alwasel, S. H., & Gulcin, İ. (2023). Comprehensive Metabolite Profiling of Berdav Propolis Using LC-MS/MS: Determination of Antioxidant, Anticholinergic, Antiglaucoma, and Antidiabetic Effects. *Molecules*, 28(4), 1739.

- Kasapligil, G., Nalbantsoy, A., & Medine, E. I. (2020). *Davisianoside B ve aristatoside C monodezmozidik saponinlerin akciğer kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik aktivitesinin incelenmesi*. (yüksek lisans tezi), EGE UNIVERSİTESİ, İZMİR.
- Kırmızıgül, S., Sarıkahya, N. B., Sümbül, H., Göktürk, R. S., Yavaşoğlu, N. Ü., Pekmez, M., & Arda, N. (2012). Fatty acid profile and biological data of four endemic *Cephalaria* species grown in Turkey. *Records of Natural Products*, 6(2), 151-155.
- Kiziltas, H., Bingol, Z., Goren, A. C., Pinar, S. M., Alwasel, S. H., & Gulcin, I. (2021). LC-HRMS profiling of phytochemicals, antidiabetic, anticholinergic and antioxidant activities of evaporated ethanol extract of *Astragalus brachycalyx* Fischer. *Journal of Chemical Metrology*, 15(2), 135-151. <https://doi.org/10.25135/jcm.62.2107.2155>
- Kiziltas, H., Bingol, Z., Goren, A. C., Pinar, S. M., Ortaakarsu, A. B., Alwasel, S. H., & Gulcin, İ. (2022). Comprehensive metabolic profiling of *Acantholimon caryophyllaceum* using LC-HRMS and evaluation of antioxidant activities, enzyme inhibition properties and molecular docking studies. *South African Journal of Botany*, 151, 743-755. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.048>
- Mbhele, N., Balogun, F. O., Kazeem, M. I., & Ashafa, T. (2015). In vitro studies on the antimicrobial, antioxidant and antidiabetic potential of *Cephalaria gigantea*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(1), 214-221.
- Okkay, U., Ferah Okkay, I., Cicek, B., Aydin, I. C., Ertugrul, M. S., Bayram, C., . . . Hacimuftuoglu, A. (2021). *Achillea millefolium* alleviates testicular damage in paclitaxel-intoxicated rats via attenuation of testicular oxido-inflammatory stress and apoptotic responses. *Andrologia*, 53(5), e14028. doi:10.1111/and.14028
- Oyaizu, M. (1986). Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Rahimi, A., Siavash Moghaddam, S., Ghiyasi, M., Heydarzadeh, S., Ghazizadeh, K., & Popović-Djordjević, J. (2019). The Influence of Chemical, Organic and Biological Fertilizers on Agrobiological and Antioxidant Properties of Syrian *Cephalaria* (*Cephalaria Syriaca* L.). *Agriculture*, 9(6), 122.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(9), 2709-2729. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.017>
- Saleem, H., Sarfraz, M., Ahsan, H. M., Khurshid, U., Kazmi, S. A. J., Zengin, G., . . . Ahemad, N. (2020). Secondary Metabolites Profiling, Biological Activities and Computational Studies of *Abutilon figarianum* Webb (Malvaceae). *Processes*, 8(3), 336.
- Sarikahya, N. B. (2014). Aristatosides A-C, hederagenin-type triterpene saponins from *Cephalaria aristata*. *Phytochem. Lett.*, 8, 149-155. doi:10.1016/j.phytol.2014.03.001
- Sarikahya, N. B., Goren, A. C., & Kirmizigul, S. (2019). Simultaneous determination of several flavonoits and phenolic compounds in nineteen different *Cephalaria* species by HPLC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 173, 120-125.

- Sarikahya, N. B., & Kirmizigul, S. (2010). Antimicrobial triterpenoid glycosides from *Cephalaria scoparia*. *J. Nat. Prod.*, 73(5), 825-830. doi:10.1021/np900724u
- SARIKAHYA, N. B., & Kirmizigul, S. (2010). *Isolation and structural determination of Cephalaria gazipashensis, Cephalaria elmaliensis and Cephalaria scoparia glycosides and Their Biological Properties*. (Doctor of philosophy), Ege University, Bornova-İZMİR.
- Sarikahya, N. B., Nalbantsoy, A., Top, H., Gokturk, R. S., Sumbul, H., & Kirmizigul, S. (2018). Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine*, 38, 135-144. doi:10.1016/j.phymed.2017.11.009
- Sarikahya, N. B., Ucar, E. O., Kayce, P., Gokturk, R. S., Sumbul, H., Arda, N., & Kirmizigul, S. (2015). Fatty acid composition and antioxidant potential of ten *Cephalaria* species. *Records of Natural Products*, 9(1), 116-123.
- Sezer Senol, F., Orhan, I. E., Ozgen, U., Renda, G., Bulut, G., Guven, L., . . . Sekeroglu, N. (2016). Memory-vitalizing effect of twenty-five medicinal and edible plants and their isolated compounds. *South African Journal of Botany*, 102, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.07.011>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178): Academic Press.
- Sumer, G., & Kirmizigul, S. (2018). *Phytochemical investigations of biologically active natural products from Cephalaria anatolica Schchian*. (MASTER OF SCIENCE THESIS), Ege University, İzmir.
- Topal, M., & Gulcin, I. (2014). Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *Turkish Journal of Chemistry*, 38(5), 894-902. doi:10.3906/kim-1403-5
- Topal, M., & Gulcin, İ. (2022). Evaluation of the in vitro antioxidant, antidiabetic and anticholinergic properties of rosmarinic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102417. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102417>
- Zengin, G., Atasagun, B., Zakariyyah Aumeeruddy, M., Saleem, H., Mollica, A., Babak Bahadori, M., & Mahomoodally, M. F. (2019). Phenolic profiling and in vitro biological properties of two Lamiaceae species (*Salvia modesta* and *Thymus argaeus*): A comprehensive evaluation. *Industrial Crops and Products*, 128, 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.027>

Atf İçin: Guliyev, M. ve Çelebi, Y. (2023). Yenilebilir Film ve Kaplamalarda Dut Yapraklarının Kullanımı. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2673-2682.

To Cite: Guliyev, M. & Çelebi, Y. (2023). Use of Mulberry Leaves in Edible Film and Coatings. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2673-2682.

Yenilebilir Film ve Kaplamalarda Dut Yapraklarının Kullanımı

Murad GULİYEV¹, Yasemin ÇELEBİ^{2*}

Öne Çıkanlar:

- Antioksidan
- Antimikrobiyal
- Yenilebilir film/kaplama

Anahtar Kelimeler:

- Dut yaprağı
- Yenilebilir film/kaplama
- Antioksidan
- Antimikrobiyal

ÖZET:

Dut yaprakları, gıda endüstrisinde yenilebilir film ve kaplamalar için yeni bir potansiyel kaynak olarak öne çıkmaktadır. Dut yaprakları, içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser gibi çeşitli sağlık faydaları sağlayabilmektedir. Dut yaprağı tabanlı yenilebilir kaplama ve filmler, gıda ürünlerinin kalitesini ve raf ömrünü artırdığı gibi aynı zamanda gıdaların fiziksel ve duyuşsal özelliklerini koruma potansiyeline sahiptirler. Bu bağlamda, yenilebilir doğal film ve kaplamalar gıda bozulmalarını minimize ederek, gıda endüstrisinde taze, sağlıklı ve kaliteli ürünlerin elde edilmesine olanak sağlayabilir. Bu nedenle yapılan çalışmada dut yapraklarının besinsel bileşimleri, fitokimyasal, biyolojik ve farmakolojik özellikleri, genel kullanım alanları ve gıda endüstrisinde yenilebilir kaplama ve film olarak kullanımları özetlenmiştir.

Use of Mulberry Leaves in Edible Film and Coatings

Highlights:

- Antioxidant
- Antimicrobial
- Edible film/coating

Keywords:

- Mulberry leaf
- Edible film/coating
- Antioxidant
- Antimicrobial

ABSTRACT:

Mulberry leaves are emerging as a new potential source for edible films and coatings in the food industry. Due to their bioactive components, mulberry leaves can offer various health benefits, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer properties. Edible coatings and films based on mulberry leaves have the potential to enhance the quality and shelf life of food products while preserving their physical and sensory attributes. In this context, natural edible films and coatings can minimize food spoilage, enabling the production of fresh, healthy, and high-quality products in the food industry. Therefore, this study summarizes the nutritional composition, phytochemical, biological, and pharmacological properties of mulberry leaves, their general applications, and their use as edible coatings and films in the food industry.

¹Murad GULİYEV, ([Orcid ID: 0000-0003-4397-2670](https://orcid.org/0000-0003-4397-2670)) Uşak Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Uşak, Türkiye

²Yasemin ÇELEBİ ([Orcid ID: 0000-0002-4495-0206](https://orcid.org/0000-0002-4495-0206)) Uşak Üniversitesi, Eşme Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Uşak, Türkiye.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yasemin ÇELEBİ, e-mail: yasemincelebisezer@gmail.com

Bu çalışma Murad GULİYEV'in Yüksek Lisans tezinin literatür kısmından üretilmiştir.

GİRİŞ

Günümüzde gıda endüstrisinin temel görevlerinden biri, tüketicilere taze, kaliteli ve sağlıklı ürünler sunmaktır (Tahir ve ark., 2019). Ancak, gıda ürünleri doğal bozulma süreçlerine tabi olduğundan, zaman içinde kalite kaybına uğrayabilirler. Bu kayıplar, hoş olmayan kokular, ekşime, koyulaşma, dokuda yumuşama, besin ve vitamin kaybı gibi sorunlar şeklinde ortaya çıkmaktadır. Gıda bozulmaları, oksijen seviyeleri, sıcaklık, bağıl nem, su içeriği ve pH gibi faktörlerin etkisi altında gelişmektedir (Roudaut ve ark., 2010). Yenilebilir filmler ve kaplamalar, sahip olduğu bariyer özellikleri (nem, gaz, aroma vb.) sayesinde gıda bozulmalarını minimize ederek ürünlerin kalitesini ve raf ömrünü korumada önemli rol oynarlar. Bu ürünler, mikrobiyolojik parametrelerin belirlenmiş standartlara uygun olarak korunmasından, besin içeriğinin muhafaza edilmesine ve fiziksel ile duyuşal özelliklerin, yani koku, tat ve dokunun korunmasına kadar çeşitli unsurları göz önünde bulundurarak gıda bozulmalarını azaltmaya katkı sağlamaktadırlar. Bu şekilde, yenilebilir filmler ve kaplamalar, gıdaların taze ve sağlıklı bir şekilde korunmasına katkı sağlamakta ve gıda endüstrisinin temel amaçlarından birini gerçekleştirmektedir (Kong ve ark., 2016).

Son zamanlarda, yenilebilir film ve kaplama üretiminde farklı bileşenler katılarak özellikleri geliştirilmektedir. Bunlardan dut yaprağı gıda endüstrisi için yeni bir hammadde kaynağı olarak ortaya çıkmış ve çeşitli dut yaprağı tabanlı gıda ürünlerinin üretimine ilham vermiştir. Bu ürünler arasında dut yaprağı tartarı, dut yaprağı krizantem bileşik granül içeceği, dut yaprağı sağlık çayı, dut yaprağı tozu, dut yaprağı eriştesi, dut yaprağı bisküvisi ve dut yaprağı sirkesi yer almaktadır (Su ve ark., 2014). Dut yaprağı, zengin biyoaktif bileşenleri, flavonoidler, alkaloidler ve antibakteriyel bileşikler nedeniyle çeşitli biyolojik faydalara sahiptir. Bu bileşenler, dut yapraklarının antioksidan özelliklere, hipoglisemik etkilere, lipid metabolizmasını düzenlemeye, antikanser, anti-inflamatuar ve antimikrobiyal etkilere sahip olmasını sağlamaktadır (Afzal ve ark., 2021).

Bu derlemede, kullanımı giderek yaygınlaşan dut yapraklarının besinsel bileşimleri, fitokimyasal, biyolojik ve farmakolojik özellikleri, genel kullanım alanları ve gıda endüstrisinde yenilebilir kaplama ve film olarak kullanımı hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Dut Yaprakları ve Besinsel Bileşimi

Dut ağacının kökeni Uzakdoğu ülkeleri olsa da günümüzde birçok ülkede yetiştirilmektedir. Dut ağacının *Morus alba* (beyaz dut), *Morus nigra* (karadut) ve *Morus rubra* (kırmızı dut) şeklinde üç türü mevcuttur (Ma ve ark., 2022). Dut yapraklarının besin öğeleri, hasada bağılı olarak, farklı çeşitlere, genetiğe, ortamlara, ekolojilere ve koşullara göre değişiklik gösterebilir. Taze dut yapraklarının değişen miktarlarda nem (%71.13- 76.68), ham protein (% 4.72-9.96), toplam kül (% 4.26-5.32), ham yağ (%0.64-1.51), karbonhidrat (%8.01-13.42) ve enerji (69-86 kcal/100 g) içerdiği bulunmuştur. Kurutulmuş dut yaprağı tozu ise değişen seviyelerde nem (%5.11-7.24), ham protein (%15.31-30.91), toplam kül (%14.59-17.24), ham yağ (%2.09-4.93), karbonhidrat(%9.70-29.64) ve enerji (113-224 kcal/100 g) içerdiği bulunmuştur. Ayrıca, kuru dut yaprağı tozunun bileşim değerleri askorbik asit için 100- 200 mg/100 g, β-karoten için 8.438 -13.125mg/100 g, mineral demir için 19 -35.72 mg/100 g, mineral çinko için 0.72 - 3.65 mg/100 g, mineral kalsiyum için 786.66 -2226.66 mg/100 g ve tannik asit için %0.13 - 0.36 arasındadır (Srivastava ve ark., 2006).

Fenolik bileşikler

Fenolik bileşiklerin türleri ve miktarları, dut yapraklarının çeşidine, yetiştirilmesine, olgunlaşmasına ve işlenmesine bağılı olarak farklılık göstermektedir (Qadir ve ark., 2019). Dut yapraklarının polifenol konsantrasyonları, kuru ağırlığın %1.05- 1.87 mg'sine denk gelmektedir (Lee ve Choi, 2012). Ek olarak, dut yapraklarında flavonoidler, alkaloidler (%6.4), fenolik asitler (%10.7)

ve benzofuranlar (%17.9) dahil olmak üzere çeşitli fenolik bileşikler yer almaktadır. Bunlardan kuwanonlar, moracinflavans, moragroller ve morkotin gibi bileşenler yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu bileşenler ise toplam 140 adet fenolik bileşiğin 81'ini oluşturmaktadır. (Chan ve ark., 2020; Hong ve ark., 2013). Dut türlerinin çok çeşitli olması nedeniyle, flavonoidlerin tanımlanması ile alakalı konu hâlâ devam etmekte olup, araştırmalar bunların ekstraksiyonu ve farmakolojik etkilerinin anlaşılması üzerine yoğunlaşmaktadır. Dut yaprakları, aurantiamid asetat, 1-deoksinojirimisin (1-DNJ), D-fagomin (FAG), 2-O- α -D-galaktopiranosil-deoksinojirimisin (GAL-DNJ), 4-O- β -D-glukopiranosil-fagomin (Glu-FAG), izofagomin (Ji ve ark., 2016), cis-5-hidroksipekolik asit, trans-5-hidroksipekolik asit, metil-pirolidin, karboksilik asit ve pipekolik asit (Chan ve ark., 2020) dahil olmak üzere çeşitli alkaloidler içermektedir. Kurutulmuş dut yapraklarından ekstrakte edilen toplam fenolik asit miktarı, 80.0 mg/100 g ila 184.3 mg/100 g arasında değişmektedir (Memon ve ark., 2010). Toplam fenolik asitlerin ana kısmını oluşturan kafeoilkinik asitler olup içeriğinin yaklaşık %60.5-%67.2'sini oluşturan (Memon ve ark., 2010) esas bileşeni ise 5-kafeoilkinik asittir (klorojenik asit) (Chan ve ark., 2020).

Polisakkaritler

Dut yaprağı polisakkaritleri (DYP) yaprakların iç epidermal hücrelerinde bulunur (Katayama ve ark., 2008). Bu polisakkaritleri oluşturan başlıca monosakkaritler arasında glikoz, galaktoz, arabinoz, fruktoz, ksiloz, rhamnoz, glukuronik asit, galakturonik asit, mannoz ve sorboz bulunmaktadır (He ve ark., 2018). DYP'lerin içeriği, farklı kurutma, ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleri nedeniyle değişiklik gösterebilir. Aynı zamanda dut yaprağı polisakkaritleri, doğal koyulaştırıcılar, jelleştirici maddeler, bağlayıcılar ve stabilizatörler olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler (Liao ve ark., 2020).

Steroidler ve Amino asitler

Dut yapraklarında bulunan fitosterol seviyesi, diğer bitkilerle kıyasla yaklaşık 3 ya da 4 kat daha yüksektir. Mevcut fitosteroller arasında kampesterol (8.3 mg/100 g), β -sitosterol (77.8 mg/100 g), stigmasterol (6.0 mg/100 g), sitostanol (78.0 mg/100 g), β -sitosterol- β -D-glukozit, lupeol, miyoinositol, inokosteron, ekdisteron ve diğer bileşikler bulunmaktadır (Han ve ark., 2010; Xu ve Ye, 2017). Dut yaprakları ile yapılan çalışmada, asparagin seviyeleri 0–1.30 mg/g, alanin 0.13–0.48 mg/g, prolin 3.48–11.71 mg/g ve gama aminobütirik asit 0.09–2.30 mg/g arasında değişiklik göstermiştir. (Liang ve ark., 2018).

Dut Yapraklarının Biyolojik ve Farmakolojik Özellikleri

Hem laboratuvar ortamlarında (in vitro), hem de canlı organizmalarda (in vivo) yürütülen çok sayıda çalışma, dut yaprağı özlerinin fenolik polisakkaritler, albümin, morasin N gibi bileşiklere bağlı olarak güçlü antioksidan özelliklere sahip olduğunu tutarlı bir şekilde göstermiştir (Choi ve ark., 2013; Sun ve ark., 2018; Tu ve ark., 2019). Dut yaprağı özlerinin lipid düşürücü özelliklere sahip olduğu ve hiperlipidemi ile kardiyovasküler hastalıklara (ateroskleroz ve koroner kalp hastalığı) karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (Gryn-Rynko ve ark., 2016; Thaipitakwong ve ark., 2018; Metwally ve ark., 2019; Varghese ve Jibu Thomas, 2019). Yapılan araştırmada, dut yapraklarının etanolik ekstraktlarının trigliseritleri, LDL (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) VLDL (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) kolesterolü ve toplam kolesterol seviyelerini düşürdüğü HDL (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein) kolesterol seviyelerini yükselttiği belirlenmiştir (Varghese ve Jibu Thomas, 2019).

Dut yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının in vitro testlerinde *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Pasteurella multocida* ve *Mycoplasma gallisepticum* dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkiler sergilediği rapor edilmiştir. 625 μ g/mL oranında

kullanılan dut yaprağı ekstresinin *S. enteritidis* ve *M. gallisepticum* mikroorganizmaları üzerinde bakterisidal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Hemeg ve ark., 2020). Dut yapraklarında bulunan 1-deoksinojirimisin (1-DNJ), oral bir patojen olan *Streptococcus mutans*'ın hızlı gelişimini ve biyofilm oluşumunu engellemektedir (Islam ve ark., 2008). Ayrıca, dut yapraklarının asit hidrolizat fermantasyonuyla elde edilen MH-bakteriyel selüloz bileşeni, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel etkisi önemli düzeydedir (Chen ve ark., 2019).

Dut Yapraklarının Genel Kullanım Alanları

İpek böceklerinin ana besin kaynağı olan dut yaprakları ipek böceği yetiştiriciliği için büyük öneme sahiptir. Bu yapraklar, sindirimi ve emilimi kolaylaştıran yüksek protein, karbonhidrat, lipid, inorganik madde, su ve vitamin içeriğiyle dikkat çekerler (Shimizu, 2018; Ma ve ark., 2022). Bunun yanı sıra yüksek protein ve enerji içeriğine sahip dut yaprakları, çiftlik hayvanlarının rasyonlarında geleneksel yemlerin yerine tercih edilebilmektedir. Bu doğrultuda kaliteli ve ekonomik yemlerin eldesi sağlanabilmektedir (Ma ve ark., 2022).

Dut yapraklarının, tansiyon düşürme, solunum yolu hastalıkları, ateş, öksürük ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir (Joh ve ark., 2015). Ayrıca, flavonoidler ve diğer biyoaktif maddeler açısından zengin olan dut yapraklarının kan şekeri ve kan lipitlerini düşürme, virüslere ve yaşlanmaya karşı direnç oluşturma gibi faydaları bulunmaktadır (Su ve ark., 2014). Dut yaprağı ekstresi, koronavirüs tip 2 (SARS-CoV-2) akut solunum sendromu salgınının tedavisi için kullanılan Keguan-1 ilacının bileşenlerinden biridir (Wang ve ark., 2020). Dut yapraklarının biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olması, özellikle Güney Kore, Hindistan ve Nepal gibi ülkelerde hastalıkların tedavisinde kullanılmasını yaygınlaştırmıştır (Joh ve ark., 2015). Ayrıca, dut yaprağı polifenollerinin oksidasyon süreçlerini engelleyebildiği, bakteri üremesini baskılayabildiği ve bu sayede hamı kavunu gibi ürünlerin raf ömrünü uzattığı gözlemlenmiştir (Yu ve Shi, 2021).

Son olarak, dut yaprağı suyu içecekleri ve dut yaprağı yoğurdu gibi ürünler, geleneksel kullanımı ile sağlıklı gıda seçenekleri sunmaktadır. Bu ürünler, beslenme ve sağlık açısından önemli faydalar sağladığı gibi yeni ürün geliştirme ve kullanma fırsatları da sunmaktadır. Örneğin dut yapraklarının çay şeklinde tüketilmesi vücuttaki kan şekeri düşürdüğü, antioksidan görevi görerek çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlamaktadır (Su ve ark., 2014; Eruygur ve Dural, 2019).

Yenilebilir Film ve Kaplamalar

Yenilebilir filmler ve kaplamalar, biyopolimer ve farklı maddelerin sıvı halinde karışımıyla oluşan ve kalınlığı 0.3 mm'den daha az olan malzemelerdir (Morales-Jiménez ve ark., 2020). Yenilebilir kaplama ve film arasında bazı farklılıklar mevcuttur. Yenilebilir kaplama, solüsyonunun gıdaya uygulanması ile elde edilirken, yenilebilir film ise önceden oluşturulup daha sonra ürünün üzerine işlenmektedir (Yai, 2008; Guimarães ve ark., 2018). Her iki durumda da benzer özelliklere sahip sağlam ambalaj malzemesi oluşmaktadır. Yenilebilir filmlerin ve kaplamaların ana özellikleri şu şekildedir:

1. UV ışınlarına karşı koruma sağlar (Debeaufort ve ark., 1998)
2. Mekanik hasara karşı bariyer oluşturur (Guimarães ve ark., 2018)
3. Ürünün raf ömrünü uzatır (Falguera ve ark., 2011)
4. Biyoaktif bileşenlere yenilebilir film ve kaplama üretimine ilave edilebilme imkanı sağlar (Salvia-Trujillo ve ark., 2017)
5. Antimikrobiyal etki oluşturur (Salvia-Trujillo ve ark., 2017; Kras'niewska ve ark., 2020; Kavrut, 2022)
6. Biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerden oluşur (Guimarães ve ark., 2018)

Yenilebilir Film ve Kaplamalarda Kullanılan Bileşenler

Kullanılan malzemeden kaynaklı her film ve kaplama farklı özellikler taşımaktadır. Yenilebilir filmler ve kaplamalar genellikle esneklik özelliği (EM), kopma sırasında uzama (E) ve gerilme mukavemeti (TS), antimikrobiyal, antioksidan özellikler, doğada parçalanabilme, sentetik ambalajlara alternatif olabilme (Castro-Muñoz ve ark., 2018; Castro-Muñoz ve ark., 2019, Kavrut, 2023a) gibi özellikleri açısından değerlendirilir. Çizelge 1’de en çok kullanılan biyopolimerler, katkı maddeleri ve özellikleri sıralanmaktadır.

Çizelge 1. Yenilebilir film ve kaplamaların üretiminde kullanılan ana malzemeler ve işlevsellikleri (Tavassoli-Kafrani ve ark., 2016; Díaz-Montes ve Castro-Muñoz, 2021; Kavrut, 2023)

Malzemeler	Örnekler	Özellikleri	Fonksiyonları
Polisakaritler	Nişasta Sellüloz Pektin Gamlar Kitosan Agar Alginat Dekstran	Koyulaştırıcılar Jellantlar Emülgatörler Stabilizatörler Kaplama	Katı bir polimer matrisin temel yapısını oluştururlar. Sertleştirme, mukavet özellikleri de bulunmaktadır.
Proteinler	Jelatin Kazein Peynir altı suyu proteini (PAS) Zein Gluten Soya	Jellantlar Koyulaştırıcılar Stabilizatörler Köpürtücüler	Antimikrobiyallerin ve antioksidanların taşınmasına yardımcı olurlar. Gazların (esas olarak oksijenin) taşınmasını kontrol ederler.
Lipitler	Mumlar Parafinler Gliseritler	Koruyucular Kaplama	Esneklik sağlanarak yenilebilir filmin kuruması önlenir.
Katkı Maddeleri			
Plastikleştiriciler	Gliserol Aloe Reçineler Sorbitol	Vizkozite Direnc Esneklik	Karışımındaki moleküller arası kuvveti ve erime sıcaklığını düşürürler. Ayrıca vikozeiteyi ve reolojik özellikleri de değiştirirler.
Kaotropik ajanlar	Urea	Yıkıcı ajan Antioksidanlar Stabilizatörler	Polimerlerin sudaki çözünürlüğünü arttırmırlar.
Antioksidan, antimikrobiyal vs. özellikli bileşenler	Polifenoller Bitki ekstraktları Uçucu yağlar	Fungisitler Herbisitler Gübreler	Ürünler için korumanın yanı sıra dengeleyici rolü oynarlar.

Dut Yapraklarının Yenilebilir Kaplama/Filmlerde Kullanımı

Dut yaprağının, kuersetin-3-glukozit, kaempferol-3-glukozit ve kuersetin-3-6-malonilglukozit gibi çeşitli flavonoidleri bulundurduğu antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Islam ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda %0-4 (h/h) dut yaprağı ekstraktının sodyum aljinat film özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, dut yaprağı ekstraktının konsantrasyonunun artması film kalınlığının arttığını ve film renginin yeşil ve sarı tonlarında yoğunlaştığını göstermiştir. Mekanik özellikler açısından, gerilme mukavemetinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Nem içeriği, suda çözünürlük ve su aktivitesi üzerinde ise belirgin bir etki görülmemekle birlikte, toplam fenolik içeriğinin arttığı ve en yüksek değer %4 dut yaprağı ekstraktı kullanıldığında elde edildiği ifade edilmiştir (Kuan ve ark., 2020). Rafflisan ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada dut (*Morus nigra L.*) yaprağı ekstraktı polivinil alkol (PVA) bazlı filmlere ekleyerek elde edilen yenilebilir filmlerin özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, HCl

ve gliserol, PVA bazlı filmlerin hazırlanmasında katkı maddesi olarak kullanımları açısından incelenmiştir. Sonuçlar, HCl ve gliserol kullanımının filmlerin görünüm bozukluğu açısından üzerinde minimum etkiye sahip olduğunu gösterirken, dut yaprağı ekstraktının, esas olarak yeşil pigmentlerin varlığı nedeniyle üretilen filmlere yeşil renk verdiğini göstermiştir. Dut yaprağı ekstraktı eklenmesinden sonra filmlerin gerilme mukavemetleri 21.38'den 28.28 MPa'ya yükselmiştir. Ayrıca, filmler gıda ambalaj materyali olarak uygulanmak üzere test edilmiştir. Genel olarak sonuçlar, dut yaprağı ekstraktı içeren PVA bazlı filmlerin, ticari streç filmlerine kıyasla gıdaların tazeliğini korumada daha yüksek kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir. Sığır kıymaları üzerine yapılan çalışmada ürün raf ömrünü artırmak için farklı konsantrasyonlarda (%2, %4, %6 a/a) dut yaprağı metanolik ekstraktı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki dut yaprağı metanolik ekstraktının, işlem görmüş sığır kıymasının mikrobiyolojik özelliklerini iyileştirdiği *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis* ve *E. coli* gibi önemli bakteri türlerinin sayısını azaltarak ürün raf ömrünü arttırdığı belirtilmiştir (Abdeldaiem ve ark., 2017). Yapılan başka bir çalışmada *Morus alba* L. yapraklarından elde edilen etanolik ekstraktın (MLEE), perakende koşullarında soğutulmuş domuz etinin korunmasındaki performansı araştırılmıştır. Çalışma sonuçları, MLEE'nin soğutulmuş domuz etinin raf ömrünü önemli ölçüde uzatabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, MLEE'nin et muhafazasında umut verici bir kaynak olabileceği noktasında yol göstermektedir (Cui ve ark. 2021).

SONUÇ

Gıda ürünlerinin korunması amacıyla yenilebilir film ve kaplamalar geliştirilirken çeşitli biyo-polimerik malzemeler ve ilave katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bu bileşenlerle elde edilen yenilebilir ambalajlar gıdaları dış etkenlere karşı korurken, aynı zamanda ambalajların fiziksel ve mekanik özelliklerini iyileştirmeye yardımcı olur. Bununla birlikte, gıda ürünlerinin kalitesini arttırmakta, raf ömrünü uzatmakta, patojenlerin inhibisyonunu sağlamakta rol oynar. Ülkemizin birçok bölgesinde rahatlıkla yetişebilen dut yetiştiriciliği, hem ulaşılabilirliği hem de ekonomikliği açısından büyük potansiyele sahiptir. Aynı zamanda, dut yaprağı gibi doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif bileşenler, yenilebilir kaplama ve filmlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Fenoller, flavonoidler, fenolik asitler ve alkaloidler gibi bileşenler, dut yapraklarının ana aktif bileşenleri olarak öne çıkmaktadır. Dut yaprağı ayrıca yüksek besin değeri taşıyan proteinler, amino asitler ve eser elementler içermektedir. Ancak birçok alanda rahatlıkla yetişebilen, ekonomik ve kolay ulaşılabilirliği olan dut yapraklarının yenilebilir film ve kaplamalarda kullanımı üzerine yapılan çalışmalar hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Abdeldaiem, M. H., Ali, H. G. M., & Foda, M. I. (2017). Improving the quality of minced beef by using mulberry leaves extract. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 1681-1689.
- Afzal, F., Khalid, W., Naveed Asif, M., Jabeen, A., Prakash Jha, R., Zubair Khalid, M., ... Zeeshan Ahmad, M. (2021). Role of mulberry leaves in human nutrition: A review. *Acta scientific nutritional health*, 4(3), 43-50.

- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (Eds.). (2016). *The microbiological quality of food: foodborne spoilers*. Woodhead Publishing.
- Castro-Muñoz, R., Galiano, F., Fila, V., Drioli, E., & Figoli, A. (2018). Matrimid® 5218 dense membrane for the separation of azeotropic MeOH-MTBE mixtures by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, 199, 27-36.
- Castro-Muñoz, R., & González-Valdez, J. (2019). New trends in biopolymer-based membranes for pervaporation. *Molecules*, 24(19), 3584.
- Chan, E. W. C., Wong, S. K., Tangah, J., Inoue, T., & Chan, H. T. (2020). Phenolic constituents and anticancer properties of *Morus alba* (white mulberry) leaves. *Journal of Integrative Medicine*, 18(3), 189–195.
- Chen, J., Chen, C., Liang, G., Xu, X., Hao, Q., & Sun, D. (2019). In situ preparation of bacterial cellulose with antimicrobial properties from bioconversion of mulberry leaves. *Carbohydrate Polymers*, 220, 170–175.
- Choi, J., Kang, H. J., Kim, S. Z., Kwon, T. O., Jeong, S. I., & Jang, S. I. (2013). Antioxidant effect of astragalins isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. *Archives of Pharmacal Research*, 36(7), 912–917.
- Cui, H., Dong, Y., Lu, T., Zou, X., Wang, M., Yang, X., & Zhou, H. (2021). Effect of ethanolic extract from *Morus alba* L. leaves on the quality and sensory aspects of chilled pork under retail conditions. *Meat Science*, 172, 108368.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in food science*, 38(4), 299-313.
- Díaz-Montes, E., & Castro-Muñoz, R. (2021). Edible films and coatings as food-quality preservers: An overview. *Foods*, 10(2), 249.
- Eruygur, N., & Dural, E. (2019). Determination of 1-Deoxynojirimycin by a developed and validated HPLC-FLD method and assessment of *in-vitro* antioxidant, alpha-Amylase and alpha-Glucosidase inhibitory activity in mulberry varieties from Turkey. *Phytomedicine*, 53, 234–242.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303.
- Gryn-Rynko, A., Bazylak, G., & Olszewska-Slonina, D. (2016). New potential phytotherapeutics obtained from white mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 84, 628–636.
- Guimaraes, A., Abrunhosa, L., Pastrana, L. M., & Cerqueira, M. A. (2018). Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: A new strategy towards biopreservation and healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 594-614.
- Han, J. H., Hu, Y. M., Wang, L., & Yang, Y. X. (2010). The phytosterols content in plant materials commonly used in functional food in China. *Acta Nutrimenta Sinica*, 32(01), 82–85.
- He, X., Fang, J., Ruan, Y., Wang, X., Sun, Y., Wu, N.i., ... Huang, L. (2018). Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. *Food Chemistry*, 245, 899–910.
- Hemeg, H. A., Moussa, I. M., Ibrahim, S., Dawoud, T. M., Alhaji, J. H., Mubarak, A. S., ... Marouf, S. A. (2020). Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3221–3227.

- Hong, H. C., Li, S. L., Zhang, X. Q., Ye, W. C., & Zhang, Q. W. (2013). Flavonoids with α -glucosidase inhibitory activities and their contents in the leaves of *Morus atropurpurea*. *Chinese Medicine*, 8(1), 19.
- Islam, B., Khan, S. N., Haque, I., Alam, M., Mushfiq, M., & Khan, A. U. (2008). Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from *Morus alba*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(4), 751–757.
- Ji, T., Li, J., Su, S. L., Zhu, Z. H., Guo, S., Qian, D. W., & Duan, J. A. (2016). Identification and determination of the polyhydroxylated alkaloids compounds with alpha-glucosidase inhibitor activity in mulberry leaves of different origins. *Molecules*, 21 (2), 206.
- Joh, B., Jeon, E. S., Lim, S. H., Park, Y. L., Park, W., & Chae, H. (2015). Intercultural usage of mori folium: Comparison review from a korean medical perspective. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–11.
- Katayama, H., Takano, R., & Sugimura, Y. (2008). Localization of mucilaginous polysaccharides in mulberry leaves. *Protoplasma*, 233(1-2), 157–163.
- Kavrut, E. (2022). *Hazır Köftelerde Yenilebilir Film Ambalajlamanın Escherichia coli O157: H7 Üzerine Antimikrobiyal Etkisi* (Doktora tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>.
- Kavrut, E. (2023). Role and selection of plasticizing substances in the production of edible packaging. In: Abstract Book. H. Çiftçi, ve Çadırcı, M. Ş. (Ed.), 10. International Gap Summit Scientific Research Congress, (s. 96-97). Şanlıurfa, Türkiye. Erişim Adresi: <https://www.gapzirvesi.org/>
- Kavrut, E. (2023a). Can it obtain a pH-sensitive natural decomposition indicator with protein-based edible film packaging? In: Abstract Book. M. M. Heydarlou. (Ed.), Anadolu 11th International Conference On Applied Sciences, (s. 251-252). Diyarbakır, Türkiye. Erişim Adresi: <https://www.anadolukongre.org/>.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2016). Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages. In *The stability and shelf life of food* (pp. 43-76). Woodhead Publishing.
- Kraśniewska, K., Galus, S., & Gniewosz, M. (2020). Biopolymers-based materials containing silver nanoparticles as active packaging for food applications—a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 698.
- Kuan, Y. L., Sivanasvaran, S. N., Pui, L. P., Yusof, Y. A., & Senphan, T. (2020). Physicochemical Properties of Sodium Alginate Edible Film Incorporated with Mulberry (*Morus australis*) Leaf Extract. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 43(3).
- Lee, W. J., & Choi, S. W. (2012). Quantitative changes of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) Leaves in relation to varieties, harvest period, and heat processing. *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(4), 280–285.
- Liang, Q., Wang, Q., Wang, Y., Wang, Y. N., Hao, J., & Jiang, M. (2018). Quantitative ¹H-NMR spectroscopy for profiling primary metabolites in mulberry leaves. *Molecules*, 23(3), 554.
- Liao, B. Y., Li, L., Tanase, C., Thakur, K., Zhu, D. Y., Zhang, J. G., & Wei, Z. J. (2020). The Rheological Behavior of Polysaccharides from Mulberry Leaves (*Morus alba* L.). *Agronomy*, 10(9), 1267.
- Ma, G., Chai, X., Hou, G., Zhao, F., & Meng, Q. (2022). Phytochemistry, bioactivities and future prospects of mulberry leaves: A review. *Food Chemistry*, 372, 131335.

- Memon, A. A., Memon, N., Luthria, D. L., Bhangar, M. I., & Pitafi, A. A. (2010). Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 60(1), 25–32.
- Morales-Jiménez, M., Gouveia, L., Yáñez-Fernández, J., Castro-Muñoz, R., & Barragán-Huerta, B. E. (2020). Production, preparation and characterization of microalgae-based biopolymer as a potential bioactive film. *Coatings*, 10(2), 120.
- Metwally, F. M., Rashad, H., & Mahmoud, A. A. (2019). *Morus alba* L. Diminishes visceral adiposity, insulin resistance, behavioral alterations via regulation of gene expression of leptin, resistin and adiponectin in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiology & Behavior*, 201, 1–11.
- Qadir, R., Anwar, F., Gilani, M. A., Zahoor, S., Misbah ur Rehman, M., & Mustaqeem, M. (2019). RSM/ANN based optimized recovery of phenolics from mulberry leaves by enzyme-assisted extraction. *Czech Journal of Food Sciences*, 37 (No. 2), 99–105.
- Rafflisman, N. S., Mah, S. K., Lee, S. Y., Yee, K. S. P., & Chowdhury, S. (2021, October). The impact of the mulberry (*Morus nigra* L.) leaf extract on the physicochemical properties of poly (vinyl alcohol) blend films. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1195, No. 1, p. 012016). IOP Publishing.
- Roudaut, G., & Debeaufort, F. (2010). Moisture loss, gain and migration in foods and its impact on food quality. *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*, 143-185.
- Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Graü, M. A., McClements, D. J., & Martín-Belloso, O. (2017). Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: A review. *Annual review of food science and technology*, 8, 439-466.
- Shimizu, K. (2018). Genetic engineered color silk: Fabrication of a photonics material through a bioassisted technology. *Bioinspiration & Biomimetics*, 13(4), 041003. <https://doi.org/10.1088/1748-3190/aabbe9>
- Srivastava, S., Kapoor, R., Thathola, A., & Srivastava, R. P. (2006). Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5-6), 305–313.
- Su, S. L., Guo, S., Bai, Y. L., Qian, D. W., & Duan, J. A. (2014). Utilization situation and analysis of resources utilization of herb-medicine castoff. *China Resources Comprehensive Utilization*, 32(07), 38–43.
- Sun, C., Wu, W., Ma, Y., Min, T., Lai, F., & Wu, H. (2018). Physicochemical, functional properties, and antioxidant activities of protein fractions obtained from mulberry (*Morus atropurpurea* roxb.) leaf. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S3311–S3325.
- Xu, S. Q., & Ye, J. M. (2017). Present situation and development direction of the comprehensive utilization of Mulberry leaves. *Hubei agricultural science*, 22, 4221–4224.
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Mahunu, G. K., Arslan, M., Abdalhai, M., & Zhihua, L. (2019). Recent developments in gum edible coating applications for fruits and vegetables preservation: A review. *Carbohydrate polymers*, 224, 115141.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate polymers*, 137, 360-374.
- Thaipitakwong, T., Numhom, S., & Aramwit, P. (2018). Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: A review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 109–118.

- Tu, J., Shi, D., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, Y., Yang, J., ... Yang, B. (2019). Identification of moracin N in mulberry leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110730.
- Varghese, S. M., & Jibu Thomas, J. (2019). Polyphenolic constituents in mulberry leaf extract (*M. latifolia* L. cv. BC259) and its antidiabetic effect in streptozotocin induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(1), 69–74.
- Wang, J.-B., Wang, Z.-X., Jing, J., Zhao, P., Dong, J.-H., Zhou, Y.-F., ... Xiao, X.-h. (2020). Exploring an integrative therapy for treating covid-19: A randomized controlled trial. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 26(9), 648–655.
- Yai, H. (2008). Edible films and coatings: Characteristics and properties. *Int. Food Res. J.*, 15, 237–248.
- Yu, L., & Shi, H. (2021). Effect of two mulberry (*Morus alba* L.) leaf polyphenols on improving the quality of fresh-cut cantaloupe during storage. *Food Control*, 121, 107624

Atf İçin: Keskin, P., Kılıç Kanak, E. ve Öztürk Yılmaz, S. (2023). Zeytin ve Zeytinyağında Bulunan Mayalar, Faydaları, Probiyotik Aktiviteleri ve Etki Mekanizmaları. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2683-2691.

To Cite: Keskin, P., Kılıç Kanak, E. & Öztürk Yılmaz, S. (2023). Probiotic Yeasts in Olives and Olive Oil, Their Benefits and Mechanisms of Action. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2683-2691.

Zeytin ve Zeytinyağında Bulunan Mayalar, Faydaları, Probiyotik Aktiviteleri ve Etki Mekanizmaları

Pınar KESKİN¹, Eda KILIÇ KANAK^{1*}, Suzan ÖZTÜRK YILMAZ¹

Öne Çıkanlar:

- Zeytin ve zeytinyağında bulunan mayalar
- Mayaların probiyotik aktiviteleri
- Mayaların probiyotik etki mekanizmaları

Anahtar Kelimeler:

- Probiyotik
- Maya
- Zeytin
- Zeytinyağı

ÖZET:

Günümüzde probiyotiklerin kullanımı gözle görülür şekilde artmaktadır. Bağırsakta patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyerek daha sağlıklı bir flora ortamı oluşturmaları, bağırsak bariyerini güçlendirmeleri, inflamasyonu inhibe etmeleri gibi pek çok sebep, probiyotiklere olan ilgiyi gündemde tutmaya devam edecektir. Bu mikroorganizmaların insan sağlığına etkileri ve gıda üzerindeki yararlı etkileri düşünüldüğünde, yeni ve daha etkin probiyotik kaynak arayışları başlamıştır. Probiyotik mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bakterilerden oluşmakla beraber, mayaların probiyotik özellikleri de günümüzde pek çok çalışma ile araştırılmaktadır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlı olabilmeleri, toksin üretebilmeleri ve patojenite gösterebilmeleri gibi etkileri sebebiyle, probiyotik seçiminde tercih mayalara yönelmiştir. Fermente gıdalarda lezzeti artırmaları, yeni fonksiyonel gıda gelişimine katkıları ve bunlara ek olarak ürünlerin raf ömrünü artırmaya yönelik küf ve patojen mikroorganizmalar üzerine biyolojik kontrol ajanı görevi görmeleri, mayaların gıda biyoteknolojisinde geleceğinin parlak olduğunu göstermektedir. Günümüzde kullanılan çoğu probiyotik, fermente gıdalardan ya da sağlıklı bir insanı kolonize eden mikroorganizmalardan elde edilir. Sofralık zeytin; gıda endüstrisinin en önemli fermente gıdalarından olması sebebi ile potansiyel probiyotik maya kaynağı olarak düşünülebilir. Taze üretilmiş sızma zeytinyağının da mayalar da dahil olmak üzere zengin bir mikrobiyota tarafından temsil edilen biyotik bir fraksiyon içerdiği gösterilmiştir. Bu derlemede, mayaların probiyotik özelliklerine, zeytin ve zeytinyağında bulunan mayalara ve bu mayaların probiyotik etki mekanizmalarına yer verilmiştir.

Probiotic Yeasts in Olives and Olive Oil, Their Benefits and Mechanisms of Action

Highlights:

- Yeasts found in olives and olive oil
- Probiotic activities of yeasts
- Probiotic action mechanisms of yeasts

Keywords:

- Probiotic
- Yeast
- Oil
- Olive oil

ABSTRACT:

Today, the use of probiotics is increasing visibly. Many reasons such as preventing the proliferation of pathogenic microorganisms in the intestine, creating a healthier flora environment, strengthening the intestinal barrier, inhibiting inflammation will continue to keep the interest in probiotics on the agenda. Considering the effects of these microorganisms on human health and their beneficial effects on food, the search for new and more effective probiotic sources has begun. Although the majority of probiotic microorganisms are composed of bacteria, the probiotic properties of yeasts are being investigated by many studies today. Since bacteria can be sensitive to antibiotics, produce toxins and show pathogenicity, preference has been given to yeasts in the selection of probiotics. The fact that they increase the flavor in fermented foods, contribute to the development of new functional foods and, in addition, act as a biological control agent on mold and pathogenic microorganisms to increase the shelf life of products shows that the future of yeasts in food biotechnology is bright. Most probiotics used today are derived from fermented foods or from microorganisms that colonize a healthy person. Table olives; Since it is one of the most important fermented foods in the food industry, it can be considered as a potential source of probiotic yeast. Freshly produced extra virgin olive oil has also been shown to contain a biotic fraction represented by a rich microbiota, including yeasts. In this review, the probiotic properties of yeasts, the yeasts found in olive and olive oil, and the probiotic action mechanisms of these yeasts are included.

¹ Pınar KESKİN (Orcid ID:0000-0003-4413-7167), Eda KILIÇ KANAK (Orcid ID:0000-0002-5880-8454), Suzan ÖZTÜRK YILMAZ (Orcid ID: 0000-0001-5952-8385) Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Eda KILIÇ KANAK, e-mail: edakilic@sakarya.edu.tr

GİRİŞ

Probiyotik kavramı yeni olmamakla birlikte, yıllar içinde değişmiştir. Gıda endüstrisinde fonksiyonel gıdaların üretimi açısından popüler bileşenlerden biri olan probiyotikler takviye (gıda) olarak da satılmaktadır. Kullanımdaki bu artış, dünya çapında hızla büyüyen probiyotik pazarının değerine de yansımıştır. 2015 Grand View Research raporu, küresel probiyotik pazarının 2013 yılında 32.06 milyar ABD doları değerinde olduğunu belirtmiştir (Diez-Gutierrez ve ark., 2020).

Probiyotik

Probiyotikler, insan bağırsağında bulunan ve yeterli miktarda uygulandığında konakçıya pek çok yararlı etkileri ile bilinen canlı mikroorganizmalardır (Smith ve Jones, 2012; Diez-Gutierrez ve ark., 2012). Yeterli miktarın ne kadar olduğu tam bilinmemekle birlikte, 1 gram gıda başına minimum 10^6 mikroorganizma olması gerektiği bilinmektedir (Gilliland, 1989).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilmesi için gereken koşullar:

- Patojenite göstermemelidir.
- Sindirim sisteminde hayatta kalma yeteneği olmalıdır.
- Antibiyotiklere karşı direnç göstermemelidir.
- Bağırsak epiteline yapışabilmelidir.
- Antimikrobiyal madde/maddeler üretebilmelidir.
- Toz, sıvı veya gıda formunda yeterli sağkalım (stabilite) göstermemelidir.
- Konak üzerinde faydalı etki göstermemelidir (Vohra ve Satyanarayana, 2011).

Probiyotiklerin sağlığa yararları

Probiyotik terapi; bulaşıcı, inflamatuvar, neoplastik ve alerjik birçok koşulun tedavisine öncülük etmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2011). Probiyotiklerin terapötik olduğu düşünülen yararlı etkileri arasında; patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite (Linares ve ark., 2016; Tsiouris ve Tsiouri, 2017; Sotoudegan ve ark., 2019), immünite stimülasyonu (Cerbo ve ark., 2016; Aureli ve ark., 2011), toksik ürünlerin nötralizasyonu (Soyoudegan ve ark., 2019), stres modülasyonu (Novik ve Savich, 2019), ürogenital sistemin korunması (Cerbo ve ark., 2016), bakteriyel aşırı büyümenin önlenmesi, bağırsak hareketliliği bozukluklarının önlenmesi, bağırsak mikrobiyotasının iyileştirilmesi (Sotoudegan ve ark., 2019), çölyak (Sousa Moraes ve ark., 2017), ve Chron's hastalığı (Gensollen ve Blumberg, 2017) gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında iyileştirici etkilerinin olması, kolon kanserinin önlenmesi (Gensollen ve Blumberg, 2017) ve kolesterol seviyesinin düşmesine olumlu etkiler (Sanders, 2000) yer almaktadır.

Probiyotik olarak kabul edilen türler

Hayvanlarda ve insanlarda normal bağırsak mikroflorasında en yaygın bulunan probiyotik mikroorganizmaların büyük bir bölümünü gram pozitif laktik asit bakterileri (*Lactobacilli* ve *bifidobacteria*) oluşturmaktadır (Vrese ve Schrezenmeir, 2008).

Lactobacilli ve *bifidobacteria*'ya ek olarak daha az yaygın olarak kullanılan diğer probiyotik mikroorganizmalar, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* ve *Saccharomyces* suşlarıdır (Vrese ve ark., 2001).

Mayalar

"Maya" terimi, orijinal olarak bira mayşesinin fermantasyonu sırasında oluşan köpüğü ifade eden Hollandaca (Flemenkçe) "öz" kelimesinden türetilmiştir. Fransızca "levure" kelimesi gibi mayaya atıfta bulunan diğer kelimeler, mayanın ekmek hamurunun kabarmasına neden olan rolüne atıfta bulunur (Hatoum ve ark., 2012).

Mayalar; fermente gıdalarda lezzet gelişimine büyük katkılarına ek olarak, istenmeyen bakterilere ve mantarlara karşı antagonistik aktiviteleri ile bilinmektedir (Hatoum ve ark., 2017) Mayaların yiyecek ve içecek üretimi, kalitesi ve güvenliği üzerindeki etkisi, ekolojik ve biyolojik faaliyetleriyle yakından bağlantılıdır. Mayaların taksonomisi, ekolojisi, fizyolojisi, biyokimyası ve moleküler biyolojisinin anlaşılmasındaki son gelişmeler, yeni ürünlerde bu organizmaların varlığına olan ilginin artmasına neden olmuştur (Fernandez-Pacheo ve ark., 2021)

Bir probiyotik maya olarak *S. boulardii*

Mayalar potansiyel probiyotik etkileri olan ilginç mikroorganizmalardır. Şimdiye kadar klinik etkileri olan ve çift kör klinik çalışmalarda probiyotik etkinliği kanıtlanmış ilk maya olan *S. boulardii* dışındaki probiyotik özelliklere sahip diğer maya suşlarının araştırılmasına büyük ilgi vardır (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Probiyotik olarak kullanılan ilk maya olan *S. Boulardii* (Pais ve ark., 2020), onu potansiyel bir probiyotik yapan birçok özelliğe sahiptir (Vrese ve Schrezenmeir, 2008):

- Gastrointestinal yoldan geçerken hayatta kalır.
- Kalın ve ince bağırsaktaki doğal florayı koruduğu ve restore ettiği gösterilmiştir.
- Patojenite göstermez.
- Optimum sıcaklığı hem in-vitro'da hem de in-vivo'da 37°C'dir.
- Bir dizi mikrobiyal patojenin büyümesini engeller.

Probiyotik olarak mayaların bakterilere göre avantajları

Çoğu maya türünün, birçok faydalı özelliği ayrıca insan ve hayvanlar için patojen olmaması nedeniyle biyoteknolojik işlemlerde kullanımını artmaktadır (Fernandez-Pacheo ve ark., 2021). Probiyotik mikroorganizmaların çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır ve direnç genlerinin probiyotik bakteriden patojen bakteriye transferi önemli bir dezavantajdır. Maya ile bakteri arasında genetik materyal aktarımı olmadığından, antibiyotik tedavisi sırasında maya kullanımı güvenli bir tercih olarak düşünülebilir (Amorim ve ark., 2018).

Probiyotik mayaların etki mekanizmaları

Antimikrobiyal etkiye sahiptir. *E.coli*, *Shigella*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Entamoeba histolytica* gibi hayvan çalışmalarında *S. boulardii*'nin çeşitli enterik patojenlere ve enterobacteriaceae familyasının üyelerine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Czerucka ve ark., 2002).

Probiyotik mayaların, antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Düzenleyici sitokinler üreten veya bu yeteneklere sahip T hücrelerini indükleyen mukozal dendritik hücrelerle etkileşimleri yoluyla bu etkileri meydana getirmeleri muhtemel görünmektedir (Vandenplas ve Benninga, 2009).

Yapılan bir randomize kontrol çalışmasında, *S. Boulardii* değerlendirilmiş ve *H. pylori* üçlü eradikasyon tedavisi alan hastalara eş zamanlı verildiğinde diyare riskini azalttığı bulunmuştur (Duman ve ark., 2005).

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında probiyotik özellik gösteren mayaların, terapötik etki gösterdiği belirtilmiştir. Crohn's hastalığından muzdarip 20 hastaya, sülfasalazin veya mesalazin (mesalamin) ve kortikosteroidler ile birlikte tedaviye *S. boulardii* eklenmesinin bağırsak hareketlerini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Plein ve Hotz, 1993).

S.boulardii ayrıca irritabl bağırsak sendromu (IBS) olan hastalarda da olumlu sonuçlar göstermiştir. İshalin baskın olduğu IBS hastalarında gerçekleştirilen çift kör, plasebo kontrollü bir

çalışmada, *S. boulardii* günlük dışkı sayısını azaltmış ve dışkı kıvamını iyileştirmiştir (Maupas ve ark., 1983).

Zeytin ve zeytinyağında bulunan mayalar

Sofralık zeytin üretiminde, zeytin fermantasyonu boyunca, ürünün güvenilirliğini, kalitesini ve lezzetini belirleyen çeşitli mikroorganizmalar önemli rol oynamaktadır. Bunlar içinde ön plana çıkan mikroorganizmalar *Enterobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae*, laktik asit bakterileri ve mayalardır (Fernandez ve ark., 1985; Garrido-Fernandez ve ark., 1997).

Sofralık zeytinlerden izole edilen maya türleri

Sofralık zeytinlerde bulunan mayalarla ilgili yapılan çalışmaların bir kısmı aşağıda özetlenmiştir. Moleküler yöntemler kullanarak, İspanyol yeşil terbiyeli sofralık zeytinlerden (kostik tuzsuz) *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia occidentalis* ve *Geotrichum candidum* türleri ve olgun siyah zeytinlerden *Candida boidinii* ve *Hanseniaspora guilliermondii* türleri tanımlanmıştır (Arroyo-Lopez ve ark., 2006). Fransız siyah zeytinlerinde *Wickerhamomyces anomalus*, *C. boidinii* ve *Debaryomyces etchelsii*'yi baskın türler olarak belirlenmiştir (Coton ve ark., 2006). İspanyol, Arbequina ve Cornicabra zeytin türlerinin maya biyoçeşitliliğinin incelendiği bir çalışmada, *Pichia caribbica*, *Lachancea fermentati* ve *Nakazawaea holstii* en sık izole edilen türler olurken, bunu *Paramysidia mississippiensis*, *Kluyveromyces thermotolerans* ve *Saccharomyces rosinii* izlemiştir (Romo-Sanchez ve ark., 2010). Yunan siyah zeytinlerinin doğal fermantasyonunun başlangıcında *Metschnikowia pulcherrima*'nın baskın maya türü olduğu ve bunu *Debaryomyces hansenii* ve *Aureobasidium pullulans*'ın izlediği bildirilmiştir (Nisiotou ve ark., 2010). Sicilya yeşil sofralık zeytinlerinde tüm fermantasyon süresi boyunca *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii* ve *Pichia kluyveri*'nin varlığı gösterilmiştir (Aponte ve ark., 2010). Asitlenmiş tuzlu sularda Manzanilla ve Hojiblanca çeşitlerinin zeytin depolanmasıyla ilişkili maya mikroflorasını incelendiğinde, her iki çeşitte de tanımlanan en önemli iki tür, depolama süresince mevcut olan *S. cerevisiae* ve *Pichia galeiformis* olaraak belirtilmiş olup, *C. boidinii* ise işlemin sonraki aşamalarında tespit edilmiştir. *Pichia membranifaciens* türü, Hojiblanca çeşidinin sadece erken depolama aşamalarında tespit edilmiştir.

Sofralık zeytin işlemede maya kullanımının faydalı yönleri Teknolojik uygulamalar

Mayalar, meyvelerin organoleptik özelliklerinin geliştirilmesine yardımcı olurlar. Bu mikroorganizmalar gliserol, etanol, yüksek alkoller, esterler ve sofralık zeytin işleme sırasında lezzet oluşumunda ve doku bakımında önemli bir rol oynayabilecek diğer uçucu bileşikler üretirler (Garrido-Fernandez ve ark., 1995; Arroyo-Lopez ve ark., 2008).

Zeytinlerdeki acı tattan sorumlu olan oleuropeini kimyasal olarak parçalamak için zeytinler kostik (NaOH) ile muamele edilmelidir. Biyolojik olarak fenolik bileşikler tüketebilen mayaların varlığı (kısmen β -glukosidaz aktivitelerinden dolayı), meyvedeki acılığı gidermek için küllü su arıtımı sırasında üretilen büyük miktarlarda zeytin atık suyunu azaltabilir ve aynı zamanda daha doğal bir ürün elde edilmesini sağlayabilir (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Mayalar, biyokontrol ajanları olarak işlev gören, mantarların ve diğer istenmeyen maya türlerinin büyümesini engelleyebilen, öldürücü faktörler olarak da adlandırılan etanol ve toksik proteinler veya glikoproteinler üretir (Viljoen, 2006). Özellikle *W. anomalus* ve *P. membranifaciens*, önemli sayıda mikroorganizmaya, özellikle mantarlara karşı kanıtlanmış inhibitör aktiviteleri nedeniyle, bu açıdan umut verici perspektiflere sahip türlerdir (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Mayalar, laktik asit bakterilerinin gelişmesinde olumlu etkiye sahiptir. Sofralık zeytinlerde, *D. hansenii*'nin siyah zeytin suyuna 48 saat önce aşılanmasıyla *L. plantarum* gelişimini iyileştirdiği gözlemlenmiştir (Tsapatsaris ve Kotzekidou, 2004). Mayalar; vitaminler, amino asitler ve pürinler gibi

maddeleri sentezleyen mikroorganizmalardır. Mayalar kompleks karbonhidratları parçalayarak optimal büyüme için karmaşık bir ortama ihtiyaç duyan *Lactobacillus* türlerinin gelişmesi teşvik eder (Viljoen, 2006). Yapılan bir çalışmada, sofralık zeytin ile ilgili bazı maya türlerinin (*P. membranifaciens*, *Pichia farinose*, *Pichia salictaria* ve *Candida diddensiae*) çeşitli vitaminleri (nikotinik ve pantotenik asitler, biotin ve B6 vitamini) sentezlediğinden bahsedilmiştir (Ruiz-Barba ve Jimenez-Diaz, 1995).

Katalaz pozitif mayalar, zeytinlerin doymamış yağ asidi oksidasyonuna ve peroksit oluşumuna karşı korunmasına katkıda bulunur. Sofralık zeytinden izole edilen *S. cerevisiae*, *W. anomalus*, *P. membranifaciens*, *P. galeiformis*, *Pichia fermentans* ve *Kluyveromyces lactis* türlerinin birçok suşunun bu özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

İnsan sağlığına yararları

Mayaların, probiyotik aktivite potansiyelleri üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır. Yapılan ilk araştırmalarda yüksek safra tuzu konsantrasyonlarını ve düşük pH değerlerini tolere eden çeşitli *Torulospira delbrueckii* ve *D. hansenii* suşları bulunmuş ve bu suşların kültür filtratlarının *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. typhimurium* gibi gıda kaynaklı patojenleri de inhibe ettiği görülmüştür. Başka bir çalışmada benzer özelliklere sahip *P. membranifaciens* ve *C. oleophila* suşları tespit edilmiştir. *K. lactis*, *D. hansenii*, *T. delbrueckii* ve *S. cerevisiae* gibi birçoğu sofralık zeytin işlemede de bulunan önemli sayıda maya türü, gastrointestinal sistemden geçişe, enteropatojenlerin inhibisyonuna ve yapışmaya karşı tolerans göstermiştir (Arroyo-Lopez ve ark., 2012). Özellikle, *S. cerevisiae*'nin etanol üretimi ile simüle edilmiş gastrointestinal koşullar altında *E. coli* bakterisinin hayatta kalmasını azaltabildiği kanıtlanmıştır (Etienne-Mesmin ve ark., 2011). Bu nedenle söz konusu özelliklere sahip zeytin mayası suşlarının araştırılması umut verici bir işidir (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Bazı mayalar, fitat komplekslerinin biyolojik bozunmasını sağlayan fitaz enzim aktivitesi göstermektedir. Fitik asit veya fitat, olgun bitki tohumlarında fosforun birincil depolanma şeklidir. İnsanlarda fitat komplekslerinin bozunması için gerekli olan enzim gastrointestinal sistemde bulunmamaktadır. Bu antibesinsel bileşiklerin fosforilasyonu mayalar tarafından katalize edilebilir. Fitazlar, serbest inorganik fosfat, inositol fosfat esterleri ve mineraller salan spesifik olmayan fosfataz enzimleridir. Bu enzimler birçoğu sofralık zeytinlerden izole edilen *I. orientalis*, *W. anomalus*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* ve *K. lactis* gibi maya türlerinde yaygındır (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Hücrel replikasyon ve büyüme için çok önemli olan folatlar, nükleotidlerin biyosentezinde temel kofaktörlerdir. Yeterli folat alımı kardiyovasküler hastalık ve kanser riskini azaltabilir. Mayalar, folat biyosentez yolunu içerir ve doğal folatlar üretir, ancak memeliler bunları sentezleme yeteneğinden yoksundur ve bu nedenle diyetle alınması gerekir. *S. cerevisiae* ve *Candida glabrata*, yüksek folat biyosentezine sahip türlerdir (Moslehi-Jenebian ve ark., 2010). Sofralık zeytinlerden izole edilen ve *C. diddensiae*, *P. membranifaciens*, *Pichia salictaria*, *Peronospora farinosa* ve *C. oleophila* türlerine ait çeşitli maya suşları da biotin, pridoksin, nikotinik ve pantetonik asit, tiamin ve riboflavin gibi önemli miktarda vitamin üretme kapasitesi göstermiştir (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalarda, bir takım mayaların, mikotoksinlerin biyolojik olarak parçalanması veya biyolojik olarak emilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Mikotoksinler, esas olarak *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait mantarlar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. En önemli mikotoksinler aflatoksinler, okratoksinler, sitrinin, fumonisinler, deoksinivalenol, zearaleon ve trikotesenlerdir. Bu bileşiklerin bazılarının sofralık zeytinlerde bulunduğu rapor edilmiştir. *S. cerevisiae*, mikotoksinlerin hücre duvarı bileşenlerine yapışması veya daha az toksik veya toksik olmayan ürünlere bozunması nedeniyle belirli bir detoksifikasyon kapasitesi göstermiştir (Arroyo-Lopez ve ark., 2012).

Sızma zeytinyağından izole edilen maya türleri

Sızma zeytinyağı, herhangi bir rafine işlemine tabi tutulmadan üretildiği için tüm raf ömrü boyunca tipik mikrobiyotasını koruyabilir. Farklı sızma zeytinyağı türleri temelde aynı yağ asitlerini içerir, ancak alifatik ve triterpenik alkoller, steroller, hidrokarbonlar, uçucu bileşikler ve antioksidanlar gibi küçük bileşenlerin konsantrasyonunu aynı oranda içermez (Servili ve ark., 2004).

Candida diddensiae ve *Nakazawaea wickerhamii* türlerine ait mayalar, süpermarketlerde bulunan ticari sızma zeytinyağında bulunmuştur (Ciafardini ve Zullo, 2008).

Moraiolo ve Frantoio çeşitlerinden üretilen tek çeşit sızma zeytinyağında *Nakazawaea molendini-olei*, *Yamadazyma terventina* ve *Pichia manshurica* maya türleri bulunurken, Taggiasca çeşidinden taze üretilmiş sızma zeytinyağında *C. oleophila*, *C. diddensiae*, *Candida norvegica*, *W. anomalus* ve *D. hansenii* bulunmuş fakat altı aylık depolamadan sonra sadece *W. anomalus*'un hayatta kaldığı belirtilmiştir (Ciafardini ve ark., 2017). İspanya'da üretilen zeytinyağından *Groenewaldozyma auringiensis* ve *L. fermentati* olarak bilinen diğer türler de izole edilmiştir (Peter ve ark., 2017). İnsan sağlığı ile ilgili olarak, ticari sızma zeytinyağında *Meyerozyma guilliermondii* ve *C. parapsilosis* olarak tanımlanan bazı fırsatçı patojen maya türleri keşfedilmiştir. Ancak sızma zeytinyağında tespit edilen canlı hücre sayısının azlığı göz önüne alındığında, bunların varlığı tüketiciler için bir risk teşkil etmemektedir. Ancak fırsatçı bir patojen olan *C. parapsilosis* lipolitik aktiviteye sahiptir ve peynir gibi çeşitli ürünlerden izole edilebilir, zeytinyağındaki varlığı lipolitik aktivitesi ile ilişkili olabilir (Ciafardini ve Zullo, 2018).

Maya türlerinin sızma zeytinyağı kalitesine etkisi

Sağlıklı zeytin mikrobiyotası; hasat sonrası depolama, işleme aşaması ve depolanması sırasında zeytinyağının genel kalitesinin iyileştirilmesine ve korunmasına büyük ölçüde katkıda bulunur. Bazı yağ kökenli maya türleri, oleuropein ve türevi oleuropein aglikon üzerinde etkili olan β -glukosidaz ve esteraz enzimlerinin üretimi yoluyla acılık giderme sürecini hızlandırarak yeni üretilen sızma zeytinyağının duyuşal özellikleri üzerinde olumlu bir etki göstermektedir (Ciafardini ve Zullo, 2018).

SONUÇ

Konakçının bağırsak mikrobiyal dengesini değiştirerek faydalı bir şekilde etkileyen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotiklerin pek çok faydalı etkisi bulunmaktadır (Ciafardini ve Zullo, 2018). İnflamatuar bağırsak hastalıklarında iyileşme, diyarede iyileşme, kolon kanserinin önlenmesi, yüksek kolestreol seviyesinin düşmesi, bağırsak mikroflorasını düzenlemesi yararlı etkilerinden bir kısmıdır (Kaya, 2020). Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için, bazı koşulları sağlaması gerekmektedir. Bu koşullar, gastrointestinal sistemde hayatta kalma, patojenite göstermeme, antimikrobiyal bileşikler üretme, agregasyon yeteneği, yüksek sıcaklıkta hayatta kalma, safra tuzu varlığında ve antibiyotik varlığına hayatta kalma olarak özetlenebilir (Smith ve Jones, 2012). Bakterilerle mukayese edildiğinde; düşük pH'lı mide ortamında hayatta kalma oranlarının yüksek olması, antibiyotiklere karşı direnç göstermesi, patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliklerinin olması ve genetik materyal aktarımı göstermemesi mayaların probiyotik kullanımının uygun bir alternatif olduğunu göstermektedir (Vohra ve Satyanarayana, 2011). Gıdalardan izole edilen çok sayıda maya suşunun çoklu özelliklerine rağmen, sadece *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces cerevisiae* türünün bir üyesi olan *Saccharomyces boulardii*'nin probiyotik olarak kabul edilmiş olması, araştırmacıları diğer mayaların da probiyotik etkinliklerinin araştırılmasına yönlendirmiştir. Gıda endüstrisindeki en önemli fermentatif gıdalardan olan zeytin ve zeytin ürünleri, potansiyel probiyotik maya kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Farklı zeytin çeşitlerinde bulunan mayalarla yapılan pek çok çalışma, bu mayaların probiyotik aktivitelerini göstermiştir. Sızma zeytinyağında

mayaların varlığı ve aktivitesi ancak son yirmi yılda keşfedilmiştir, bu nedenle zeytinyağının mikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar nispeten azdır (Ciafardini ve ark., 2006; Zullo ve ark., 2010). Yeni üretilen sızma zeytinyağında mayaların varlığı, esas olarak ekstraksiyon işlemi sırasında zeytinlerin karposferinden zeytinyağına geçişinden kaynaklanmaktadır. Zeytinlerin karposferindeki bazı mayalar yağlı habitatta uzun süre yaşayamazken, diğerleri ürünün kimyasal bileşimine göre seçici bir şekilde çoğalarak zeytinyağının tipik mikrobiyotası haline gelir ve muhafaza sırasında yağın organoleptik özelliklerini iyileştirir (Ciafardini ve ark., 2004; Zullo ve ark., 2010).

TEŞEKKÜR

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Amorim, J. C., Piccoli, R. H., & Duarte, W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, 107, 518-527.
- Aponte, M., Ventorino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C.M., & Moschetti, G. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*, 27, 162-170.
- Arroyo-Lopez, F.N., Romero-gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodriguez-Gomez, F., Jimenez-Diaz, R., Garcia-Garcia, P., Querol, A., & Garrido-Fernandez, A. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *Journal of Food Microbiology*, 160(1), 42-49.
- Arroyo López, F.N., Durán Quintana, M.C., Ruiz Barba, J.L., Querol, A., & Garrido Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23, 791-796.
- Arroyo-Lopez, F.N., Querol, A., Bautista- Gallego, J., & Garrido-Fernandez, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189–196.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., & Zuccotti, G.V. (2011). Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*, 63(5), 366-376 .
- Cerbo, A.D., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J.C., & Iannitti, T. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*, 69(3), 187-203.
- Ciafardini, G., Cioccia, G., & Zullo, B.A. (2017). Taggiasca extra virgin olive oil colonization by yeasts during the extraction process. *Food Microbiology*, 62, 58-61.
- Ciafardini, G., Cioccia, G., Peca, G., & Zullo, B.A. (2004). Transfer of selected yeasts to oil through olive inoculation. *Italian Journal of Food Science*, 1, 1-7.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A., Cioccia, G., & Irìde, A. (2006). Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 27-32.
- Ciafardini, G., & Zullo, B. (2018). Virgin olive oil yeasts: a review. *Food Microbiology*, 70, 245-253.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., & Sohier, D. (2006). Yeast ecology in Frech cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130-135.
- Czerucka, D. Piche, T., & Rampal, P. (2002). Review article: yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767-778.

- Diez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., R.Barron, L.J., Villaran, M.C., & Chavarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, 64, 103669.
- Duman, D.G., Bor, S., Ozütemiz, O., Sahin, T., Oğuz, D., İştan, F., Vural, T., Sandkci, M., İşksal, F., Şimşek, I., Soytürk, M., Arslan, S., Sivri, B., Soyakan İ., Temizkan, A., Beşik, F., & Kaymakoğlu, S., Kalaycı, C. (2005). Efficiency and safety *Saccharomyces boulardii* in prevention of antibiotic-associated diarrhoea due to *Helicobacter pylori* eradication. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17, 1357–1361.
- Etienne Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J.M., Alric, M., & Blanquet-Diot, S. (2011). Effect of a new probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1127-1131.
- Fernández Díez, M.J., Castro y Ramos, R., Garrido Fernández, A., González Cancho, F., González Pellisó, F., Nosti Vega, M., Heredia Moreno, A., Mínguez Mosquera, M.I., Rejano Navarro, L., Durán Quintana, M.C., Sánchez Roldán, F., García García, P., & Gómez-Millán, A.C. (1985). *Biología de la Aceituna de Mesa, Instituto de la Grasa y sus Derivados*, 1-100.
- Fernandez-Pacheo, P., Rosa, I.Z., Arevalo-Vilena, M., & Gomes E. (2021). Study of potential probiotic and biotechnological properties of on-*Saccharomyces* yeasts from fruit Brazilian ecosystems. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 1-16.
- Garrido-Fernandez, A., García- Garcia, P., & Brenes, M.B. (1995). Olive fermentations. In *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed*. 2. Baskı. VCH, Weinheim, 593-627.
- Garrido Fernández, A., Fernández Díaz, M.J., Adams, R.M. (1997). *Tables Olives: Production and Processing*, Springer Science & Business Media, 479p.
- Gensollen, T., & Blumberg, R.S. (2017). Correlation between early-life regulation of the immune system by microbiota and allergy development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(4), 1084-1091.
- Gilliland, S.E. (1989). Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science*, 72(10), 2483-2494.
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel application. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421.
- Kaya, Y. (2020). Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi. Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi.
- Linares, D.M., Ross, P., & Stanton, C. (2016). Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. *Bioengineered*, 7 (1), 11-20.
- Maupas, J., Champemont, P., & Delforge, M. (1983). Treatment of functional colopathies: double-blind trial with perenterol. *Revue medicale de Liege*, 38(23), 885-888.
- Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard Pedersen, L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2, 449-473.
- Nisiotou, A.A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., & Panagou, E.Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 396-405.
- Novik, G., & Savich, V. (2019). Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. *Microbes and Infection*, 22(1), 8-18.
- Pais, P., Almeida, V., Yılmaz, M., & Teixeira, M.C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic?. *Journal of Fungi*, 6(2), 78.
- Péter, G., Dlačny, D., Tóbiás, A., Fülöp, L., Podgoršek, M., & Čadež, N. (2017). *Brettanomyces acidodurans* sp. nov., a new acetic acid producing yeast species from olive oil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(5), 657-664.

- Plein, K., & Hotz, J. (1993). Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Chron's disease with special respect to chronic diarrhea : a pilot study. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 31, 129-134.
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, 604-612.
- Romo-Sánchez, S., Alves-Baffi, M., Arévalo-Villena, M., Úbeda-Iranzo, J., & Briones-Pérez, A. (2010). Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. *Food Microbiology*, 27, 487-492.
- Ruiz Barba, J.L., & Jiménez Diaz, R. (1995). Availability of essential B-group vitamins to *Lactobacillus plantarum* in green olive fermentation brines. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1294-1297.
- Sanders, M.E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 384-390.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G.F., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.
- Smith, A., & Jones, C.A. (2012). Probiotics: Sources, Types and Health Benefits. Nova Biomedical, Nova Science Publishers, Incorporated.
- Sotoudegan, F., Daniali, M., Hassani, S., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2019). Reappraisal of probiotics' safety in human. *Food and Chemical Toxicology*, 129, 22-29.
- Sousa Moraes, D.L.F., Grzeskowiak, L.M., de Sales Teixeira, T.F., & do Carmo Gouveia Peluzio, M. (2014). Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 482-489.
- Tsapatsaris, S., & Kotzekidou, P. (2004). Application of a central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 157-168.
- Tsiouris, C.G., & Tsiouri, M.G. (2017). Human microflora, probiotics and wound healing. *Wound Medicine*, 19, 33-38.
- Vandenplas, Y., & Benninga, M. (2009). Probiotics and functional gastrointestinal disorders in children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 48, 107-109.
- Viljoen, B.C. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. In *Yeasts in Food and Beverages*, Springer-Verlag, Berlin, 83-110.
- Vohra, A., & Satyanarayana, T. (2011). Probiotic yeasts. İçinde: *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer, Dordrecht, 411-433.
- Vrese, D.M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Food Biotechnology*, 111, 1-66.
- Vrese, D.M., Stegelmann, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C., & Schrezenmeir, J. (2001). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 421-429.
- Zullo, B.A., Cioccia, G., & Ciafardini, G. (2010). Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 27, 1035-1042.

Atf İçin: Şenol, A. F. ve Karakurt, C. (2023). Öğütülmüş Pişmiş Kil ve Mermer Atıklarının Çimentolu Harçlarda Dayanım Gelişimine Etkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2692-2705.

To Cite: Şenol, A. F. & Karakurt, C. (2023). Effect of Ground-Baked Clay and Marble Wastes on Strength Development of Cementitious Mortars. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2692-2705.

Öğütülmüş Pişmiş Kil ve Mermer Atıklarının Çimentolu Harçlarda Dayanım Gelişimine Etkisi

Ahmet Ferdi ŞENOL^{1*}, Cenk KARAKURT¹

Öne Çıkanlar:

- Pişmiş kil atığı işlenebilirlikleri azalttı
- Karışımda %5'ten daha fazla atık mermer kullanımı dayanımları azalttı
- Harç serilerinin 7, 28, 56 ve 90 günlük dayanımları incelendi

Anahtar Kelimeler:

- Pişmiş kil atığı,
- Mermer atığı,
- Çimento,
- Porozite,
- Mekanik özellikler

ÖZET:

Türkiye'deki nüfus artışı, yapıların hizmet ömrünün tamamlanması, kentsel dönüşümlerin uygulanması, yeni konut ve altyapı ihtiyaçları ile birlikte çimentoya olan talep istikrarlı bir şekilde artmaya devam etmektedir. Bununla birlikte çimento üretimindeki artış, yüksek karbon emisyonuna ve fazladan enerji tüketimine de sebep olmaktadır. Bu çalışmada, inşaat endüstrisindeki çimento kullanımını azaltmak, atık mermer ve inşaat yıkım sahaları kaynaklı çevre kirliliğini bertaraf etmek amacıyla, öğütülmüş pişmiş kil (K) ve mermer (M) atıklarının çimentolu harçlarda kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla tasarlanan harç serilerinde, çimento yerine ağırlıkça; %0 (kontrol), %5, %10 ve %15 oranlarında atık toz malzemeler kullanılarak yedi serilik harç karışımları üretilmiş, taze harç serilerinin işlenebilirlik özellikleri belirlendikten sonra üretilen numunelere; 7, 28, 56 ve 90 günlük standart kür uygulanarak fiziksel ve mekanik özellikleri araştırılmıştır. Taze harç serilerinde, K ikamesi arttıkça yayılma değerleri azalırken, M ikamesi arttıkça yayılma değerleri de artmıştır. Serilere uygulanan 90 günlük kür sonunda elde edilen en yüksek dayanım sonuçları kontrol serisine göre karşılaştırıldığında; çimento yerine %10 oranında K kullanılarak üretilen harçların basınç ve eğilme dayanımları sırasıyla; %8 ve %4 oranlarında artarken, %5 oranında M kullanılarak üretilen harçların dayanımları da %2 ve %4 oranlarında artmıştır.

Effect of Ground-Baked Clay and Marble Wastes on Strength Development of Cementitious Mortars

Highlights:

- Addition of baked clay waste reduced workability
- The use of more than 5% waste marble in the mixture reduced the strengths
- The 7, 28, 56 and 90-day strengths of the mortar series were examined

Keywords:

- Baked clay waste,
- Marble waste,
- Cement,
- Porosity,
- Mechanical properties

ABSTRACT:

The demand for cement continues to increase steadily in Turkey due to population growth, completion of the service life of buildings, implementation of urban transformations, new housing and infrastructure needs. However, the increase in cement production also leads to high carbon emissions and extra energy consumption. In this study, the use of ground baked clay (K) and marble (M) wastes in cement mortars was investigated in order to reduce the use of cement in the construction industry and to eliminate environmental pollution caused by waste marble and construction demolition sites. In the mortar series designed for this purpose, seven series of mortar mixtures were produced by using waste powder materials at 0% (control), 5%, 10% and 15% by weight instead of cement. After determining the workability properties of the fresh mortar series, the physical and mechanical properties of the samples were investigated by applying standard curing for 7, 28, 56 and 90 days. In the fresh mortar series the spreading values decreased as the K substitution increased, while the spreading values increased as the M substitution increased. When the highest strength results obtained at the end of 90-day curing were compared with the control series; the compressive and flexural strengths of the mortars produced by using 10% K instead of cement respectively; increased by 8% and 4%. The strengths of the mortars produced using 5% M are also; increased by 2% and 4%.

¹Ahmet Ferdi ŞENOL ([Orcid ID: 0000-0002-6663-3340](https://orcid.org/0000-0002-6663-3340)), Cenk KARAKURT ([Orcid ID: 0000-0002-4204-5341](https://orcid.org/0000-0002-4204-5341)), Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, Bilecik, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ahmet Ferdi ŞENOL, e-mail: ahmetferdi.senol@bilecik.edu.tr

GİRİŞ

Dünya üzerindeki nüfus ve kentleşme artışı, inşaat sektöründeki beton üretimi ile birlikte Portland çimentosunun üretimini de artırmaktadır. T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'nca en son yayımlanan Çimento Sektör Raporunda (Anonim, 2022); 2021 yılındaki küresel çimento üretiminin yaklaşık 4.4 milyar ton olduğu, bu üretimlerin %59'unun Çin tarafından, %4.1'inin de Avrupa Birliği ülkeleri tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Türkiye ise 78.9 milyon tonluk üretimi ile dünya çimento üretiminde 5'inci sırada yer almıştır. Çimento üretimindeki bu artışın, daha fazla enerji tüketimine ve yüksek karbon emisyonlarına sebep olduğu bilinmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, beton sektöründe çimento kullanımını azaltabilmek amacıyla, farklı malzemelerin çimento yerine kullanımını araştırmaktadırlar.

Ülkemizde meydana gelen depremler, kentsel dönüşümler ve yapıların hizmet ömrünün tamamlanması gibi nedenlerle birçok inşaat yapısı yıkılarak çevremizde atık sahalar oluşturmaktadır. Bu atık sahaların bertaraf edilerek ekonomiye kazandırılması amacı ile inşaat yıkım alanlarındaki atık pişmiş kil tuğla ve kiremitlerin öğütülerek, çimento yerine kullanılabilirliği kapsamlı bir şekilde araştırılmalıdır. Afet ve Acil Durum Yönetimi (AFAD) Deprem Dairesi Başkanlığının verilerine göre (Anonim, 2023); 6 Şubat 2023 tarihinde, sırası ile merkez üssü Pazarcık (Kahramanmaraş) ve Elbistan (Kahramanmaraş) olan 7.7 ve 7.6 (Mw) büyüklüklerinde depremler meydana gelmiştir. Bu depremler, Türkiye'nin 11 ilini etkileyerek, son yüzyılda yaşanan en yıkıcı depremleri olarak kayda geçmiştir. Depremlerin etkisi ile birçok şehirde yapılar yıkılarak yüksek miktarda inşaat yıkım atıkları oluşturmuştur (Şekil 1). Deprem sonrasında oluşan, ağır ve orta hasarlı betonarme binaların duvarları ile yerleşim alanlarındaki yığma binaların inşaat yıkım atıkları; çoğunlukla pişmiş kilden üretilen tuğla ve kiremitlerden meydana gelmektedir.



Şekil 1. Kahramanmaraş merkezli depremler (6 Şubat 2023) sonrası oluşan inşaat yıkım atıkları (Antakya)

Atık pişmiş kil tuğla ve kiremit tozlarının (K) yapısı incelendiğinde; bu tozların puzolanik malzeme özelliğinde olduğu ve bileşimlerindeki; SiO_2 , Al_2O_3 ve Fe_2O_3 'ün toplam yüzdelerinin genellikle %70'in üstünde olduğu görülmektedir. Öğütülmüş pişmiş killerin yüksek su emmesine sahip olması, çimento yerine ikame edildiğinde çimento esaslı malzemelerin işlenebilirliğini de azaltabilmektedir (Atyia ve ark., 2021). Zhao ve ark. (2020), pişmiş kil atıkları için yapılan öğütme süresinin artmasıyla, kil taneciklerinin özgül yüzey alanlarının ve puzolanik aktivitelerinin arttığını, ancak uzun öğütme süresinin de topaklanmaya ve yüksek enerji tüketimine neden olduğunu değerlendirmişlerdir. K'nin beton teknolojisinde kullanımı, son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Ge ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada, çimentonun üç farklı partikül boyutlarındaki tuğla tozu ile; %10, 20 ve 30 oranlarında değiştirilmesinin, betonun taze ve sertleşmiş özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, %10'un üzerindeki tuğla tozu ikamesinin, taze betonun çökme miktarını büyük ölçüde azalttığını, ikame oranlarının artması ile erken yaş dayanımlarının azaldığını, ancak kür yaşı arttıkça tuğla tozu ikameli beton dayanım sonuçlarının

kontrol betonunkine benzer sonuçlarda olduğunu tespit etmişlerdir. Wu ve ark. (2021), ultra yüksek dayanımlara sahip çimentolu harçların üretiminde, atık pişmiş kil tuğla tozlarını hacimce; %10, 20, 30, 40 ve 50 oranlarında çimento yerine kullanmışlardır. Atık pişmiş kil tuğla tozlarının %20 oranında ikame edildiği harç serilerinin, basınç ve eğilme dayanımlarında en yüksek değerlere ulaştığı ve çimentonun atık pişmiş kil tuğla tozları ile ikame edilmesinin, erken yaşlardaki toplam hidrasyon ısısını azalttığını tespit etmişlerdir.

Türkiye’de çevre sorunu oluşturan diğer bir atık üründe, ülkemizin en yüksek ihracat payına sahip doğal taşlarından olan mermerlerin, üretimi sonrası ortaya çıkan atık mermer ürünleridir. Mermer atıkları; toz, bulamaç ve mermer parçaları şeklinde arazilere gelişigüzel dökülerek ocak ve tesislerin yakınındaki su kaynaklarının ve yeşil arazilerin kirletilmesine sebep olmaktadır (Boğa ve Şenol, 2023). Mermer bloklarının %70’i taş ocağından çıkarma ve kesme işlemlerinden sonra atık olarak çevrede depolanırken, bu oranın %40’ı, kesim ve şekillendirme için kullanılan sistem nedeniyle atık mermer çamuruna dönüşmektedir (Bilir ve ark., 2022). Mermer; kalker (CaCO_3) ve dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) yüksek sıcaklık ve basınç altında yeniden kristalleşmesi sonucu oluşan doğal bir taşıdır (Demirel ve Alyamaç, 2018). Günümüze kadar yapılan bazı çalışmalarda; atık mermer tozunun (M) çimento ikamesi olarak, atık mermer parçalarının da agrega ikamesi olarak inşaat teknolojisindeki kullanımı araştırılmıştır.

Belkadi ve ark. (2023), farklı inceliklerdeki M’yi, çimento yerine; %5, 10, 15 ve 20 oranlarında kullanarak harç serileri oluşturmuşlar ve 28 günlük kür sonundaki numuneler üzerinde fiziksel ve mekanik deneyler gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda, M’nin özgül yüzey alanının, harçların mekanik dayanımı ve su emmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu, sürdürülebilir ve ekonomik harçların imalatında; çimento yerine, yaklaşık $4900 \text{ cm}^2/\text{g}$ ortalama incelikte ve %5 ile %8 ağırlık oranlarında M kullanmanın uygun olacağını değerlendirmişlerdir. Çelikten ve Canbaz (2021), çimento yerine ağırlıkça; %5, 10, 15 ve 20 oranlarında atık andezit ve M’yi ayrı ayrı kullanarak harç numuneleri üretmişler, üretilen numuneler üzerinde ultrases geçiş hızı, eğilme ve basınç dayanımı deneylerini gerçekleştirmişlerdir. Deney sonuçlarına göre, çimento yerine kullanılacak M için en uygun ikame oranının; %15 olabileceğini bildirmişlerdir. Seghir ve ark. (2018), Portland çimentosunun %15 oranlarına kadar M ile değiştirilmesinin, hava ile kürlenmiş çimento harcının fiziksel ve mekanik özellikleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda; M ilavesi ile çimento harçlarının kıvam ve priz sürelerinin çok düşük aralıklarda değiştiği, M’nin %10’dan fazla ikame edilmesi ile harçların mekanik özelliklerinin düşme eğiliminde olduğu ve %5’e kadar yapılan ikamenin, en uygun sonuçları oluşturduğunu bildirmişlerdir.

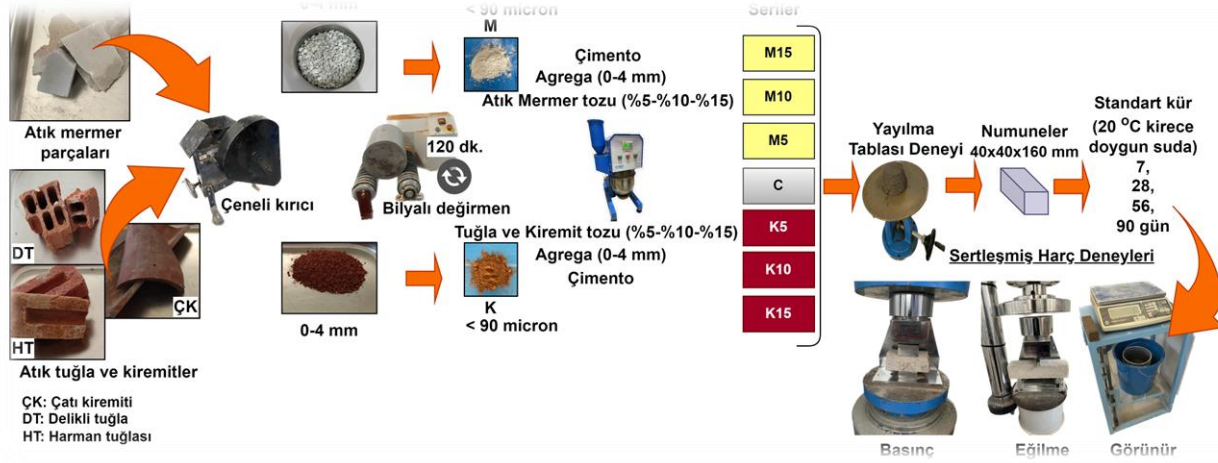
Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, atık mermerlerin beton teknolojisinde çoğunlukla dolgu malzemesi (ince veya kaba agrega) olarak kullanıldığı tespit edilmiştir. Literatürdeki birçok beton ve harç çalışmasında, atık mermerlerin agrega yerine kullanılması, çimento yerine kullanılmasına göre mekanik özellikler üzerinde daha fazla etkili olmuştur. Bu kapsamda, öğütülmüş mermer atıklarının çimento yerine ikame edildiği harçların, farklı kür sürelerindeki mekanik özellikleri ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Bununla birlikte, yakın zamanda Türkiye’de meydana gelen ve son yüzyılın en büyük depremlerinin etkisi ile oluşan yüksek miktardaki pişmiş kil tuğla ve kiremit atıklarının da geri dönüştürülerek farklı kullanım alanlarında değerlendirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, atık mermer sahalarından elde edilen mermer parçaları ile inşaat yıkım sahalarından elde edilen atık pişmiş kil tuğla ve kiremitlerin öğütülmesi ile elde edilen tozların, çimento harçlarında belli oranlarda kullanımıyla üretilen numunelerin, farklı kür sürelerindeki fiziksel ve mekanik özelliklerini araştırmaktır. Böylece, ülkemizdeki atık mermer alanları ve inşaat yıkım

sahalarının bertaraf edilerek ekonomik ürünlere dönüştürülmesine katkıda bulunabileceği değerlendirilmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmada, çimento yerine ağırlıkça; %0, 5, 10 ve 15 oranlarına kadar K ve M'nin ayrı ayrı kullanılarak üretildiği harçların; 7, 28, 56 ve 90 günlük standart kür sonundaki fiziksel ve mekanik özellikleri araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Harç serilerinin üretimi ve uygulanan deneyler Şekil 2'deki akış şemasında gösterilmiştir.



Şekil 2. Akış şeması

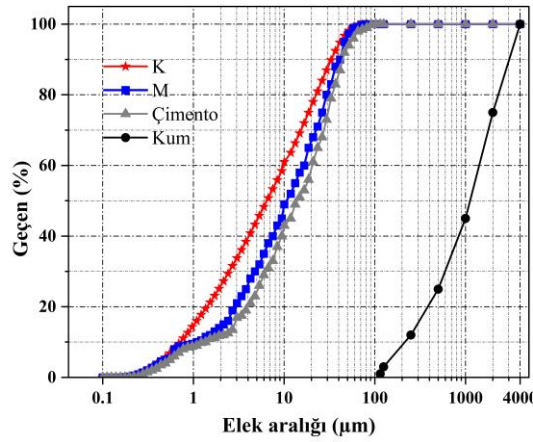
Materyal

Çalışmada kullanılan K, şehir merkezindeki inşaat yıkım alanlarındaki; harman tuğlası (HT), çatı kiremiti (ÇK) ve delikli tuğlaların (DT) toplanmasıyla, M ise; yerel mermer kesim işletmelerinden temin edilen atık mermer parçalarının toplanması ile elde edilmiştir. İnşaat yıkımları içerisindeki tuğla ve kiremit atıkları toplandıktan sonra çevresindeki kirleticileri ortadan kaldırmak amacıyla, harçlı tabakaları ayrılarak temizlenmiştir. Daha sonra, 105 °C'de 24 saat boyunca etüvde kurutularak içeriğindeki nem uzaklaştırılmış ve ürün gruplarına göre (ÇK, DT, HT ve M) ayrılarak, laboratuvarındaki çeneli kırıcıda 0-4 mm boyutlarına getirilmiştir. Son işlem olarak, malzemelerin yüzey alanını artırmak ve toz haline getirmek için her bir çeşidinden (ÇK, DT ve HT'den) eşit miktarda alınarak hazırlanan atık pişmiş kil paketi (K) ve M, laboratuvarındaki bilyalı değirmende 60 devir/dk hızla 120 dakika boyunca öğütülerek %95'inin 90 µm'lik elekten geçebilecek şekilde olması sağlanmıştır.

Harç serilerinin üretiminde; Vezirhan Çimento Fabrikasından temin edilen CEM I 42.5 R Portland çimentosu ve 0-4 mm elek aralığındaki (incelik modülü; 2.55) Osmaneli doğal nehir kumu (özgül ağırlık; 2.65) kullanılmıştır. Karışımlarda kullanılan çimento, M ve K (ÇK, DT ve HT) üzerinde yapılan kimyasal analiz sonuçları Çizelge 1'de, kullanılan toz malzemeler ve kumun tanecik boyut analizi Şekil 3'te verilmiştir. Çizelge 1'de görüldüğü üzere çimento ve M'nin ana kimyasal bileşeni CaO iken, öğütülmüş pişmiş kil atıklarının SiO₂'dir. Ayrıca, Çizelge 1'deki ÇK, DT ve HT'nin SiO₂+Al₂O₃+Fe₂O₃ toplamları, %70'in üstündedir. TS 25 (2015)'e göre bu oksitlerin ağırlıkça toplamının en az %70 olması, bu malzemelerin doğal puzolanların sahip olması gereken bir özelliği karşıladığını göstermektedir. Harç serilerinin üretiminde, karışım suyu olarak şehir şebeke suyu kullanılmıştır.

Çizelge 1. Toz malzemelerin kimyasal ve fiziksel analizleri

Oksitler. %	ÇK	K DT	HT	M	CEM I 42.5R
SiO ₂	43.7	48.9	45.6	1.2	18.7
Al ₂ O ₃	15.7	16.2	17.2	-	4.6
Fe ₂ O ₃	12.2	8.1	8.8	1.2	3.4
CaO	8.8	4.7	7.5	72.1	63.7
MgO	5.2	6.5	6.8	0.4	1.3
SO ₃	0.3	3.5	0.3	-	2.7
K ₂ O	1.6	3.2	3.2	-	0.7
TiO ₂	1.9	0.8	0.8	-	-
P ₂ O ₅	1.3	1.2	1.1	-	-
MnO	0.2	0.1	0.1	-	-
Kızdırma Kaybı	9.1	6.8	8.6	25.1	3.9
Serbest CaO	-	-	-	-	1.1
Özgül yüzey alanı cm ² /g		6040		4640	3295
Özgül ağırlık		2.80		2.35	3.12



Şekil 3. Toz malzemeler ve kumun tanecik boyut analizi

Metot

Harç karışımları; TS EN 196-1 (2016) standartlarına göre, 7 farklı seri olarak hazırlanmıştır. K ve M, çimento ile ağırlıkça; %5, %10 ve %15 oranlarında değiştirilmiştir. Karışım serilerine ilave olarak bağlayıcının sadece çimentodan oluştuğu kontrol (C) karışım serisi de üretilmiştir. Tüm serilerde; agrega/bağlayıcı oranı; 3 ve su/bağlayıcı oranı; 0.5 olarak sabit oranlarda kullanılmıştır. Karışım serilerindeki bağlayıcı ifadesi; çimento, M veya K'den oluşmaktadır. Harç serileri; C, M5, M10, M15, K5, K10 ve K15 olarak adlandırılmıştır. Seri kodlarındaki M; öğütülmüş mermer atıklarını, K; öğütülmüş pişmiş kil atıklarını, sayılar ise çimento yerine ağırlıkça ikame edilen toz yüzdesini ifade etmektedir. Örnek olarak, M5; %5 oranında öğütülmüş mermer atıklarını içeren harç serisidir. Harç serilerindeki malzeme karışım içerikleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Harçların karışım içerikleri (g)

Seriler	ÇK	K DT	HT	M	Çimento	Kum	Su
C	-	-	-	-	450	1350	225
K5	7.5	7.5	7.5	-	427.5	1350	225
K10	15	15	15	-	405	1350	225
K15	22.5	22.5	22.5	-	382.5	1350	225
M5	-	-	-	22.5	427.5	1350	225
M10	-	-	-	45.0	405	1350	225
M15	-	-	-	67.5	382.5	1350	225

Taze harç serilerinin yayılma tablası ile işlenebilirlik tayini, TS EN 1015-3/A2 (2007) standardına göre belirlenmiştir. Her seri için 12 adet numune ($40 \times 40 \times 160$ mm³ boyutlarında) üretilmiştir. Kalıplardan çıkartılan sertleşmiş harç numuneleri, laboratuvar ortamındaki kirece doygun



suda (20 ± 2 °C sıcaklıkta), 7, 28, 56 ve 90 günlük kür sürelerine kadar bekletilip (Şekil 4) daha sonra sertleşmiş harç deneyleri uygulanmıştır.

Şekil 4. Kür uygulanan harç numuneleri

Deney gününde numunelere TS EN 772-4 (2000)'e göre görünür porozite (Şekil 5.a), TS EN 196-1 (2016)'e göre üç noktalı eğilme dayanımı ve basınç dayanımı deneyleri uygulanmıştır (Şekil 5.b ve 5.c). Sonuçlar üç numunenin deney sonuçlarının ortalaması alınarak belirlenmiştir.

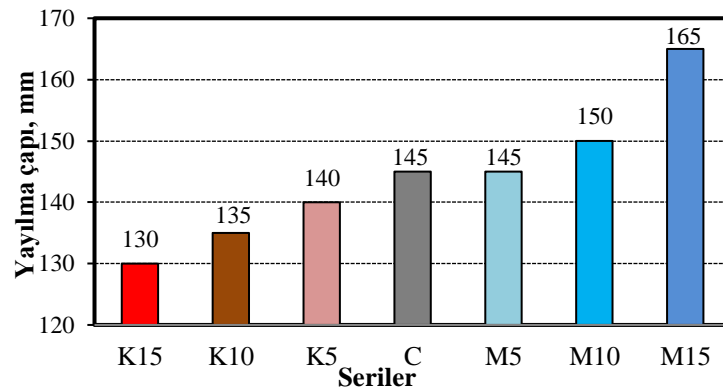


Şekil 5. Sertleşmiş harç numunelerine uygulanan deneyler; a) Görünür porozite ölçümleri b) Eğilme dayanımı c) Basınç dayanımı

BULGULAR VE TARTIŞMA

İşlenebilirlik Deney Sonuçları

Harç serilerinin işlenebilirlik özellikleri, yayılma tablası deneyi ile belirlenmiştir. Üretilen harç serilerinin yayılma çaplarındaki değişimler Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Yayılma deneyi sonuçları

Serilerin yayılma değerleri 130 ile 165 mm arasında değişmiştir. Serilerde, K ikamesi arttıkça yayılma değerleri azalırken, M ikamesi arttıkça yayılma değerleri de artmıştır. K5, K10 ve K15

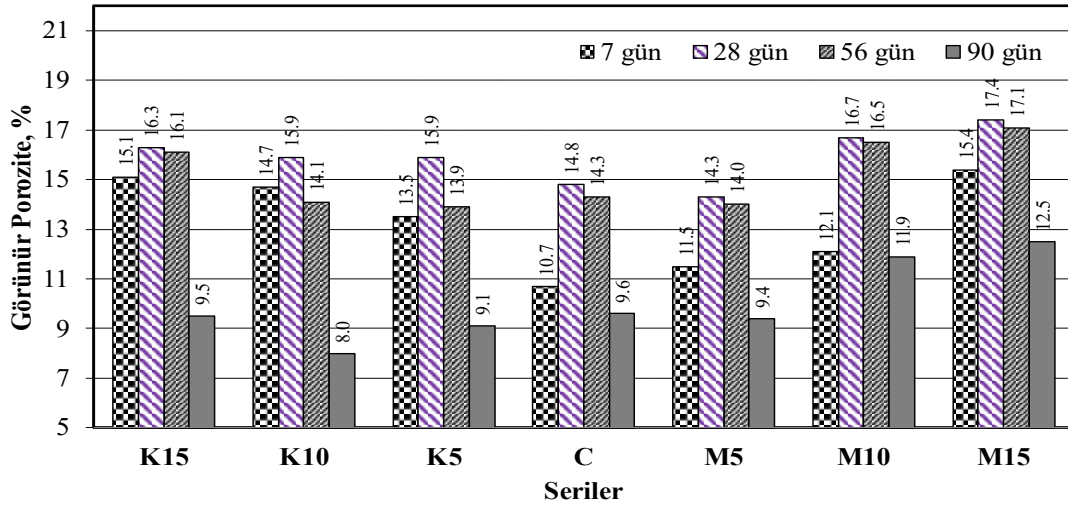
serilerindeki yayılma çapları, C serisine göre sırasıyla; %3.4, %6.9 ve %10.3 oranlarında azalmıştır. Harç serilerinde K ikamesi arttıkça, karışımın su ihtiyacı artmış ve işlenebilirliği de azalmıştır. Lam ve ark. (2021) ve Schackow ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmalarda da çimento harçları içerisine ilave edilen atık pişmiş kil tuğla tozları, yayılma değerlerini azaltmıştır. Bu durum su/bağlayıcı oranının sabitliği ile birlikte K'nin özgül yüzey alanının çimentodan yüksek olmasına ve artan su talebine bağlanabilir. Chen ve ark. (2023) yaptıkları bir çalışmada, atık pişmiş kil tuğla tozunun çimento harçlarının işlenebilirliğini azalttığını, bu duruma neden olarak da; atık pişmiş kil tuğla tozunun çimentodan daha büyük özgül yüzey alanına sahip olmasına ve partiküllerinin düzensiz bir yüzeye sahip olmasının su emilimini daha fazla artıran gözenekler oluşturmaya başlamışlardır.

M5, M10 ve M15 serilerinin yayılma çapları, C serisine göre sırasıyla; %0.7, %3.4 ve %13.8 oranlarında artmıştır. Bu durum, M'nin özgül ağırlığının çimentodan düşük olmasına ve dolayısı ile işlenebilirliğin artmasına katkı sağladığı şeklinde değerlendirilebilir. Yamanel ve ark. (2019)'da yaptıkları bir çalışmada, çimento harçlarında kullanılan M ikamesi ile benzer işlenebilirlik artışlarına ulaşmışlardır. Çalışmalarındaki M'den kaynaklı işlenebilirlik artışına neden olarak; karışımda kullanılan M'nin, çimento ile ağırlıkça yer değiştirdiği, çimento yerine aynı ağırlıkta M'nin ikamesi ile karışımın toplam hamur hacminin arttığı ve toplam hamur hacminin artmasının da harçların işlenebilirliklerini artırdığı şeklinde değerlendirmişlerdir. Özkılıç ve ark. (2023) yaptıkları bir çalışmada, çimentoyu %40 oranlarına kadar M ile yer değiştirmişler ve üretilen taze betonların işlenebilirliklerinin iyileştiğini bildirmişlerdir. Ma ve ark. (2019), çimentolu harç karışımlarında %30 oranına kadar M ve %4 oranlarına kadar nano silika kullandıkları çalışmalarında, artan M ile işlenebilirliklerin arttığını, bu duruma neden olarak; çimentonun hidrasyon sürecinde su ile reaksiyona girerek, M'den daha yüksek su ihtiyacına yol açtığını ve böylece M artışlarının, karışımdaki su ihtiyacını azaltarak işlenebilirliği artırdığına bağlamışlardır. Bununla birlikte, M'nin işlenebilirliği artırmasına başka bir nedende, çimentodan daha küçük taneciklere sahip olan M'nin (Şekil 3'te), çimento parçacıkları arasındaki boşlukları doldurarak dolgu suyunu serbest bırakmasına ve daha fazla yağlama suyu oluşturarak çimento parçacıkları arasındaki sürtünmenin azaltılmasına ve dolayısı ile harcın işlenebilirliğinin artmasına katkı sağladığı şeklinde değerlendirilmektedir.

M ikamesinin harç serilerinin işlenebilirliğini iyileştirmesi, karışımda kullanılacak su miktarının belirli bir orana kadar azaltılabilesine katkı sağlayabilecektir. Karışımda K ikamesinin artışı ile işlenebilirlikler bozulduğundan, K kullanılan serilerde akışkanlaştırıcı katkı kullanımı ile harçların işlenebilirliklerinin de korunabileceği değerlendirilmektedir.

Görünür Porozite

Harç serilerinin görünür porozite değerlerinin, kür sürelerine göre değişimi Şekil 7'de verilmiştir. Şekil 7'de görüleceği üzere tüm serilerdeki görünür porozite değerleri 28'inci güne kadar artmış ve daha sonraki 56'ncı ve 90'ıncı günlerde, zamanla azalmıştır. K ve M serilerinden elde edilen görünür porozite değerleri 90 günlük kür sonunda; %8-12.5 arasında değişmiştir. Kontrol (C) serisinin 7; 28; 56 ve 90 günlük kür sonundaki görünür porozite değerleri sırasıyla %10.7, %14.8, %14.3 ve %9.6 olmuştur.



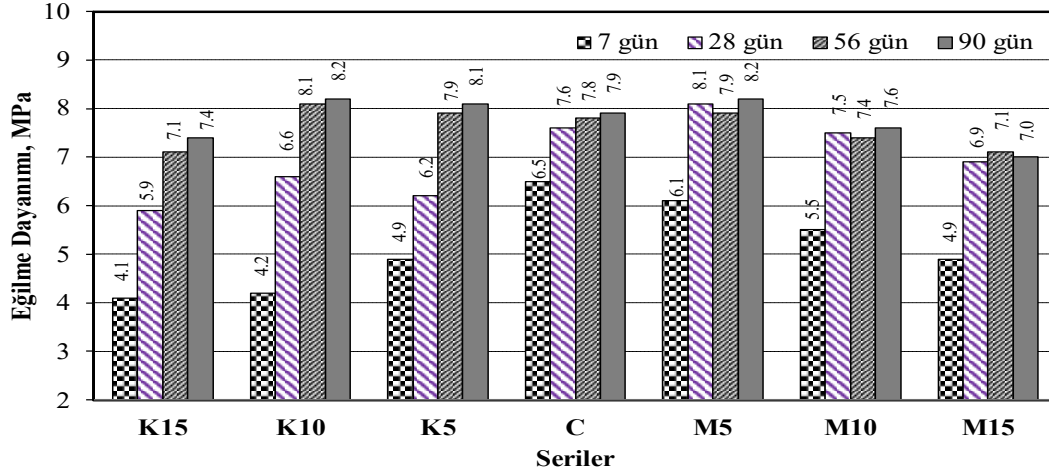
Şekil 7. Harç serilerinin kür süresi ve görünür porozite sonuçlarına göre değişimi

Şekil 7 incelendiğinde; 7'nci gün sonundaki K5, K10 ve K15 serilerinin görünür porozite değerleri, C serisine göre sırasıyla; %26, %37 ve %41 oranında artarken, M5, M10 ve M15 serilerinin porozite değerleri; %7, %13 ve %44 oranında artmıştır. İlk 7 gün sonunda, serilerdeki K ve M ikameleri arttıkça görünür porozitelerde artmıştır. 28'inci gün sonundaki K5, K10 ve K15 serilerinin görünür porozite değerleri, C serisine göre sırası ile; %7, %7 ve %10 oranında artarken, M5'de %3 azalmış, M10 ve M15 serilerinde ise; %13 ve %18 oranlarında artmıştır. 56'ncı gün sonundaki K serilerinin görünür porozite değerleri, C serisine göre K5 ve K10'da sırası ile %3 ve %1 oranlarında azalırken, K15'de %13 artmıştır. M serilerinde ise; M5'te %2 azalırken, M10 ve M15 serilerinde; %15 ve %19 oranlarında artmıştır. Böylece 56'ncı gün sonunda, serilerdeki K ve M ikamesinin artışı ile K15, M10 ve M15'in görünür porozite değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. 90 günlük kür sonundaki görünür porozite değerleri incelendiğinde, K5, K10 ve K15 serilerinin porozite değerleri, C serisine göre sırasıyla; %5, %17 ve %1 oranında azalırken, M serilerinde ise M5'de %2 oranında azaldığı, M10 ve M15 serilerinde; %24 ve %30 oranlarında arttığı tespit edilmiştir. Böylece, 90'ncü gün sonundaki serilerde K ikamesinin artışı ile görünür porozite değerlerinin azaldığı, M serilerinde ise M5 serisi hariç diğerlerinde arttığı tespit edilmiştir. Yüksek miktarlarda M'nin ikame edilmesi (%10'nun üstünde), çimento ile M tanelerinin farklı boyuttaki taneciklerinden kaynaklı topaklaşmaya (Aydın ve Arel, 2019), bu durumun da görünür porozite yapısının zayıflamasına neden olduğu şeklinde değerlendirilebilir. Tüm K serilerinin görünür porozite değerleri 7 ve 28 günlük kür sonunda C serisinin üstündeyken, 56 ve 90 günlük kür sürelerinde ise altında değerler almıştır. Bilindiği üzere, K'nin yüksek su emmesine sahip olması (Atyia ve ark., 2021), taze harç üretiminde yüksek miktarda su tutmasına neden olabileceği ve çimentonun hidrasyon sürecinin başlaması ve ortamdaki bağlı nemin düşmesiyle birlikte, K'de depolanan suyun serbest kalarak K ikameli harç serilerinin görünür porozitelerinin C serisine göre artmasına neden olabileceği şeklinde değerlendirilmektedir. K serilerinin 56 ve 90 günlük kür sonundaki görünür porozite değerlerinin C serisine göre daha düşük elde edilmesi ise uzun kür süreleri sonundaki pozolanik aktiviteye, K'nin C'ye göre daha yüksek inceliğe sahip olmasına ve harçların mikro gözeneklerini doldurma kabiliyetine bağlanmıştır. M serilerinde ise; sadece M5 serisinin 28, 56 ve 90'ncü günlerdeki görünür porozite değerlerinin azaldığı, M10 ve M15 serilerinin görünür porozite değerlerinin tüm kür sürelerinde C serisine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, çimento harçlarına %5 oranında ikame edilen M tanelerinin,

çimentoya göre daha ince olmasına ve çimento partiküllerinin arasındaki boşlukları doldurabilmesinden kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Eğilme Dayanımı Deney Sonuçları

Harç serilerinin kür süreleri ve eğilme dayanımlarına göre değişimi Şekil 8’de verilmiştir. Şekil 8’de görüldüğü üzere, kür sürelerinin artması ile genel olarak eğilme dayanımları da artmıştır. En uzun kür süresi olan 90 gün sonundaki eğilme dayanımları 7 ile 8,2 MPa arasında değişmiştir. Kontrol (C) harcının 7; 28; 56 ve 90 günlük kür sonundaki eğilme dayanımı değerleri sırasıyla; 6,5, 7,6, 7,8 ve 7,9 MPa olmuştur.



Şekil 8. Harç serilerinin kür süresi ve eğilme dayanımı sonuçlarına göre değişimi

Şekil 8 incelendiğinde; 7’nci gün sonundaki K5, K10 ve K15 serilerinin eğilme dayanımları, C serisine göre sırasıyla; %25, %35 ve %37 oranlarında, M5, M10 ve M15 serilerinin eğilme dayanımları da %6, %15 ve %25 oranlarında azalmıştır. Böylece ilk 7 gün sonunda, serilerdeki K ve M ikamesi arttıkça eğilme dayanımları da azalmıştır. K5, K10 ve K15 serilerinin 28’inci gün sonundaki eğilme dayanımları, C serisine göre sırasıyla; %18, %13 ve %22 oranında azalırken, M5 serisinde %7 oranında artmış, M10 ve M15 serilerinde ise; %1 ve %9 oranlarında azalmıştır. 28’inci gün sonunda serilerdeki K ve M ikamesinin artışı ile eğilme dayanımları M5 serisi hariç tamamında azalmıştır.

M serili harç serilerinde, hidrasyonun ilerlemesi ile artan C–S–H fazları, çimento matrisi ile M parçacıkları arasındaki boşlukları doldurabilmektedir. Eğilme dayanımındaki bu iyileşme (M5’teki), hem çimento hamuru matrisinin hem de arayüzey geçiş bölgelerinin düşük gözenekliliğinden de kaynaklanabilmektedir (Dobiszewska ve ark., 2023). Shirule ve ark. (2012)’da yaptıkları çalışmada, çimento ağırlığının %10’una kadar M ikame edilmesiyle üretilen numunelerin basınç ve yarmada çekme dayanımlarının arttığını bildirmişlerdir. Genel olarak, çekme dayanımındaki bu iyileşme hem çimento hamuru matrisinin hem de arayüzey geçiş bölgesinin düşük gözenekliliğine ve iyi dayanımına atfedilmiştir. M ikamesinin, agrega ile çimento hamuru arasındaki arayüzey geçiş bölgesini güçlendirerek çekme dayanımlarının artışına neden olduğu, Ashish (2018) tarafından yapılan çalışmada da tespit edilmiştir.

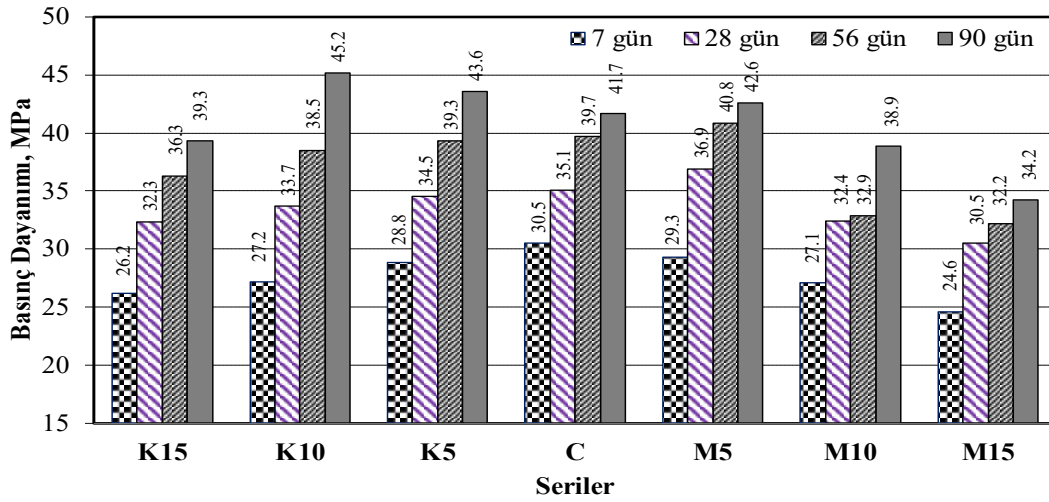
Serilere uygulanan 56 günlük kür sonunda; K serilerinin eğilme dayanımları, C serisine göre; K5’te %1, K10’da %4 oranında artarken, K15’te %9 oranında azalmıştır. Bu sonuçlar; Xue ve ark. (2021)’nin yaptıkları bir çalışmadaki, çimento yerine %20 oranına kadar atık pişmiş kil tuğla tozu ile üretilen harç numunelerinden elde edilen 28 günlük eğilme dayanımı sonuçları ile uyumludur. Xue ve ark. (2021) bu durumu; optimum miktardaki (%20’ye kadar) tuğla tozu kullanımının, çimento

parçacıkları arasındaki boşlukları doldurabildiğini ve tuğla tozunun harçtaki terlemeyi azaltarak çimento hamuru ile kum arasındaki geçiş bölgesinin yapısını iyileştirerek eğilme dayanımlarına katkı sağladığı şeklinde açıklamışlardır.

M serilerinin 56 günlük kür süresi sonundaki dayanımları incelendiğinde; M5'te; %1 oranında artış olurken, M10 ve M15 serilerinde; %5 ve %9 oranlarında eğilme dayanımları azalmıştır. 90 günlük kür süresi sonundaki eğilme dayanımları incelendiğinde, K5 ve K10 serilerinin dayanımlarının C serisine göre sırasıyla; %3 ve %4 oranlarında arttığı, K15 serisinde ise %6 oranında azaldığı tespit edilmiştir. M serilerinde ise; M5 serisinin 90'uncu günündeki eğilme dayanımı C serisine göre %4 oranında artarken, M10 ve M15 serilerinin dayanımları da %4 ve %11 oranlarında azalmıştır. Bu sonuçlar, Ergün (2011)'ün; çimento yerine %5 oranında M kullandığı çalışmasındaki harç serilerinin, 90 günlük kür sonundaki dayanım sonuçları ile uyumludur.

Basınç Dayanımı Deney Sonuçları

Harç serilerinin basınç dayanımlarının kür sürelerine göre değişimi Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. Harç serilerinin kür süresi ve basınç dayanımı sonuçlarına göre değişimi

Şekil 9'da görüldüğü üzere, kür sürelerinin artması ile tüm serilerin basınç dayanımları da artmıştır. Serilere uygulanan 90 günlük kür sonundaki basınç dayanımları; 34.2-45.2 MPa arasında değişmiştir. Kontrol (C) harcının 7; 28; 56 ve 90 günlük kür sonundaki basınç dayanımları sırasıyla; 30.5; 35.1; 39.7 ve 41.7 MPa olmuştur. Şekil 9 incelendiğinde; ilk 7 gün sonunda, serilerde K ve M ikamesi arttıkça basınç dayanımları da azalmıştır. 7'nci gün sonundaki K5, K10 ve K15 serilerinin basınç dayanımları C serisine göre sırasıyla; %6, %11 ve %14 oranlarında, M5, M10 ve M15 serilerinin basınç dayanımları da; %4, %11 ve %19 oranlarında azalmıştır. Serilerin 28'inci gün sonundaki basınç dayanımları, K ve M ikamesinin artışı ile M5 hariç azalmıştır. K5, K10 ve K15 serilerinin 28'inci gün sonundaki basınç dayanımları C serisine göre, sırasıyla; %2, %4 ve %8 oranında azalırken, M serilerinde ise; M5'te %5 oranında arttığı, M10 ve M15'te; %8 ve %13 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir. Wang ve ark. (2022)'da yaptıkları bir çalışmada; çimento harçlarına %5-25 oranlarında ilave edilen M'nin, harçların erken basınç ve eğilme dayanımlarını iyileştirdiği, en iyi dayanımların %5 ilavesi ile oluştuğu, %15'ten daha fazla M ilavesinin, dayanımları ciddi oranda düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Serilerin 56'ncı gün sonundaki basınç dayanımları; K ikamesinin artışı ile azalırken, M serilerinde ise M5 serisi hariç dayanımların azaldığı ve M10 ile M15'in dayanım kayıplarının 28 günlük sonuçlara göre daha da arttığı tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda (Moon ve ark., 2017;

Manzoor ve ark., 2022; Dobiszewska ve ark., 2023). M gibi inert mineral katkıların çimento hidratasyonunu erken yaşlarda hızlandırarak iyileştirdiği bildirilmiştir. Literatüre göre, M'nin çimento hidratasyonu üzerinde fiziksel bir etkisi vardır ve bu durum M'nin dolgu etkisi ile ilişkilidir. Çimentolu harçlara M ikamesi ile karışımın su/çimento oranı yükselir. Karışımdaki çimento miktarının azalması sonucunda her parçacığa tahsis edilen su miktarındaki artış, çimento parçacıklarının sınırlı miktarda su emdiği bir duruma göre çimento hidratasyonu için iyileştirilmiş koşullar sağlarken, C-S-H fazının çekirdeklenmesini de kolaylaştırabilir. Karışımdaki M ikame oranının daha fazla artmasıyla (M10 ve M15'teki gibi) çimento miktarının azalarak daha az hidratasyon ürünü olduğu ve böylece M10 ve M15 serilerinin 28 gün sonraki görünür porozitelerinin C serisine göre daha da artarak, basınç ve eğilme dayanımlarının da azalmasına katkı sağladığı değerlendirilmektedir. 56'ncı gün sonundaki K5, K10 ve K15 serilerinin basınç dayanımları C serisine göre sırasıyla; %1, %3 ve %9 oranında azalırken, M serilerinde ise; M5'te %3 oranında arttığı, M10 ve M15'te; %17 ve %19 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir. K'nin çimentolu harçlara %15 oranına kadar dahil edilmesi ile karışımdaki çimentonun bağıl içeriği azalmış, bu durumun da hidratasyon ürünü miktarının azalmasına bağlı olarak, K serilerinin 56 günlük küre kadarki basınç dayanımlarını, C serisine göre azalttığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Harç serilerine uygulanan kür süresi 90 güne ulaştığında, K5 ve K10'nun basınç dayanımlarının, C serisine göre; %5 ve %8 oranlarında arttığı, K15 serisinin ise %6 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, Shao ve ark. (2019)'nın harç üretiminde çimento yerine belli oranlarda atık pişmiş kil tuğla tozunun ikame edilmesi ile yaptıkları bir çalışmada; üretilen numunelere uyguladıkları 7, 28 ve 90 günlük kür sonundaki basınç dayanım sonuçlarına benzerdir. Zhang ve ark. (2023)'nin yaptıkları benzer bir çalışmada da, çimentonun %10, 20 ve 30 oranlarında atık pişmiş kil tuğla tozu ile yer değiştirdiği serilerden elde edilen basınç dayanım kayıplarının 90 güne kadar zamanla azaldığı ve %10 ikameli serideki dayanım kaybının %0.1'e kadar düştüğünü tespit etmişlerdir. Harç serilerine uygulanan 90 günlük kür sonunda, K10 serisi; 45.2 MPa ile tüm K serilerinden elde edilen en yüksek basınç dayanımına ulaşmıştır. Kullanılan K'nin 90 gün sonundaki puzolanik performansı, yüksek miktardaki inceliğine (6040 cm²/g) bağlanabilir. Puzolanların inceliği, puzolanik reaksiyonları hızlandırmada etkili bir faktördür (Ebrahimi ve ark., 2023). K15 serisinin tüm kür sürelerindeki basınç dayanımlarının, C serisi dayanımlarının altında kalması, karışımdaki çimento içeriğinin azalarak, basınç dayanımını sağlayan kalsiyum-silika-hidrat (C-S-H) jellerinin ve kalsiyum-hidrat (C-H) miktarlarının azalmasına bağlanabilir.

M serilerinin 90 günlük kür sonundaki basınç dayanımları incelendiğinde; M5 serisinin basınç dayanımı C serisine göre %2 oranında artarken, M10 ve M15 serilerinin basınç dayanımları; %7 ve %18 oranlarında azalmıştır. Aliabdo ve ark., (2014)'a göre literatürdeki iç yapı analizleri; M içeren ve içermeyen harç numunelerinin iç yapı morfolojisinin birbirinden önemli ölçüde farklı olmadığını ve bu durumunda, M'nin hidratasyon işlemi sırasında belirgin bir rolünün bulunmamasını doğruladığını bildirmişlerdir. Çalışmada, M'nin %5 oranında çimento ile yer değiştirmesi, basınç dayanımında bir miktar artışa (%5'lik) yol açmıştır. Basınç dayanımındaki bu artış, çimentodan daha ince öğütülmüş olan M'nin (Şekil 3'te), gözenek doldurucu etkisinin hidratasyon için uygun çekirdek sağlamasına ve bunun sonucunda da hidratasyonu katalize etmesine (Ergün, 2011) bağlanabilir.

Genel olarak harç serilerindeki K ve M ikame artışı, erken yaş basınç dayanımlarını azaltırken, kürlenme yaşı arttıkça dayanım kayıplarının özellikle K serilerinde giderek azaldığı, K5, K10 ve M5 serilerinde ise C serisinin üstünde basınç dayanımları elde edildiği tespit edilmiştir. M5 serisinin 28, 56 ve 90 günlük kür sonundaki basınç dayanımları, C serisine göre daha yüksek elde edilmiştir. Bu durum, Singh ve ark. (2017)'nin çalışmalarında değerlendirdikleri gibi, M'nin harç karışımındaki

boşlukları doldurarak daha yoğun bir karışım oluşturmaya yardımcı olan mikro doldurucu etkisine bağlanabilir. Bununla birlikte harç serilerinde %5'ten daha fazla M kullanılarak üretilen M10 ve M15'in basınç dayanımlarının, her kür süresi için C serisi basınç dayanımlarının altında değerler alması; karışımlardaki çimento miktarının azalmasından ve M10 ile M15'in görünür porozitelerinin, C serisinden her zaman daha yüksek miktarlara ulaşmasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmektedir.

SONUÇ

DeneySEL çalışmalar kapsamında elde edilen sonuçlara göre yapılan değerlendirmeler aşağıda sunulmuştur;

- Harç serilerinde K ikamesinin artışı ile yayılma değerleri %10.3 oranına kadar azalırken, M ikamesinin artışı ile %13.8 oranına kadar artmıştır.

- Harç serilerinin görünür poroziteleri; K ikamesi ile 28 güne kadar artmış, bu süreden sonra K15 serisi hariç genellikle azalmıştır. M serilerinde ise; M5 serisinin tüm kür sürelerinde genellikle azalırken, M10 ve M15 serilerinde artmıştır.

- Çimentolu harçlara, %5 oranında M ikame edilmesi, harçların 90 günlük küre kadar ki basınç dayanımlarını %5 oranına kadar artırırken, eğilme dayanımlarını da %7 oranına kadar artırmıştır. K'nin %5 ve %10 ikamesi, harçların 90 günlük küre kadar ki basınç dayanımlarını sırası ile %5 ve %8 oranlarına kadar artırırken, eğilme dayanımlarını da %3 ve %4 oranlarına kadar artırmıştır.

- M'nin basınç ve eğilme dayanımına katkısı %5 çimento değişimi ile sınırlı olurken, K'de ise %10 oranına kadar sınırlı olmuştur. Bu oranlardan daha yüksek M ve K ikamelerinde, basınç ve eğilme dayanımları olumsuz etkilenmektedir.

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçların; depremlerden kaynaklanan büyük miktardaki atığın yönetilmesine bir katkı olarak, yıkılmış veya çökmüş yığma ve betonarme binalardan elde edilen tuğla ve kiremit atıklarının kullanımı ile mermer endüstrisinden kaynaklı atık mermerlerin kullanımına yönelik uygun teknolojilerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği değerlendirilmektedir.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, deney çalışmalarında yardımcı olan, İnşaat Mühendisliği Bölümü lisans öğrencilerinden; *Büşra Elgün ve Eren Gündüz*'e teşekkür eder.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

Aliabdo, A. A., Abd Elmoaty, M., & Auda, E. M. (2014). Re-use of waste marble dust in the production of cement and concrete. *Construction and building materials*, 50, 28-41.

Anonim, (2022). T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, <https://www.sanayi.gov.tr/plan-program-raporlar-ve-yayinlar/sector-raporlari/mu0102011404>, (Erişim adresi: 26 Nisan, 2023).

Anonim, (2023). <https://www.afad.gov.tr/duyurular>, (Erişim adresi: 26 Nisan, 2023).

Ashish, D. K. (2018). Feasibility of waste marble powder in concrete as partial substitution of cement and sand amalgam for sustainable growth. *Journal of Building Engineering*, 15, 236-242.

- Atyia, M. M., Mahdy, M. G., & Abd Elrahman, M. (2021). Production and properties of lightweight concrete incorporating recycled waste crushed clay bricks. *Construction and Building Materials*, 304, 124655.
- Aydin, E., & Arel, H. Ş. (2019). High-volume marble substitution in cement-paste: Towards a better sustainability. *Journal of Cleaner Production*, 237, 117801
- Belkadi, A. A., Kessal, O., Chiker, T., Achour, Y., Rouabhi, A., Messaoudi, O., & Khouadjia, M. L. K. (2023). Full factorial design of mechanical and physical properties of eco-mortars containing waste marble powder. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(4), 4325-4338.
- Bilir, T., Karadağ, Ö., & Aygün, B. F. (2022). Waste marble powder. In *Sustainable Concrete Made with Ashes and Dust from Different Sources* (pp. 479-506). Woodhead Publishing.
- Boğa, A. R., & Şenol, A. F. (2023). The effect of waste marble and basalt aggregates on the fresh and hardened properties of high strength self-compacting concrete. *Construction and Building Materials*, 363, 129715.
- Chen, G., Li, S., Zhao, Y., Xu, Z., Luo, X., & Gao, J. (2023). Hydration and microstructure evolution of a novel low-carbon concrete containing recycled clay brick powder and ground granulated blast furnace slag. *Construction and Building Materials*, 386, 131596.
- Çelikten, S., & Canbaz, M. (2021). Atık Andezit ve Mermer Tozunun Çimento Harçlarının Dayanım Özelliklerine Etkisi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29(1), 43-48.
- Demirel, B., & Alyamaç, K. E. (2018). Waste marble powder/dust. In *Waste and Supplementary Cementitious Materials in Concrete* (pp. 181-197). Woodhead Publishing.
- Dobiszewska, M., Bagcal, O., Beycioğlu, A., Goulias, D., Köksal, F., Płomiński, B., & Ürünveren, H. (2023). Utilization of rock dust as cement replacement in cement composites: An alternative approach to sustainable mortar and concrete productions. *Journal of Building Engineering*, 106180.
- Ebrahimi, M., Eslami, A., Hajirasouliha, I., Ramezanpour, M., & Pilakoutas, K. (2023). Effect of ceramic waste powder as a binder replacement on the properties of cement-and lime-based mortars. *Construction and Building Materials*, 379, 131146.
- Ergün, A. (2011). Effects of the usage of diatomite and waste marble powder as partial replacement of cement on the mechanical properties of concrete. *Construction and building materials*, 25(2), 806-812.
- Ge, Z., Wang, Y., Sun, R., Wu, X., & Guan, Y. (2015). Influence of ground waste clay brick on properties of fresh and hardened concrete. *Construction and Building Materials*, 98, 128-136.
- Lam, M. N. T., Nguyen, D. T., & Nguyen, D. L. (2021). Potential use of clay brick waste powder and ceramic waste aggregate in mortar. *Construction and Building Materials*, 313, 125516.
- Ma, B., Wang, J., Tan, H., Li, X., Cai, L., Zhou, Y., & Chu, Z. (2019). Utilization of waste marble powder in cement-based materials by incorporating nano silica. *Construction and Building Materials*, 211, 139-149.
- Manzoor, S., Ganesh, S., & Danish, P. (2022). Effect on properties of concrete by utilization of metakaolin and marble powder. *Materials Today: Proceedings*, 62, 6689-6694.)
- Moon, G. D., Oh, S., Jung, S. H., & Choi, Y. C. (2017). Effects of the fineness of limestone powder and cement on the hydration and strength development of PLC concrete. *Construction and Building Materials*, 135, 129-136

- Özkılıç, Y. O., Zeybek, Ö., Bahrami, A., Çelik, A. İ., Mydin, M. A. O., Karalar, M., & Jagadesh, P. (2023). Optimum usage of waste marble powder to reduce use of cement toward eco-friendly concrete. *Journal of Materials Research and Technology*, 25, 4799-4819
- Schackow, A., Stringari, D., Senff, L., Correia, S. L., & Segadães, A. M. (2015). Influence of fired clay brick waste additions on the durability of mortars. *Cement and Concrete Composites*, 62, 82-89.
- Seghir, N. T., Mellas, M., Sadowski, Ł., & Żak, A. (2018). Effects of marble powder on the properties of the air-cured blended cement paste. *Journal of Cleaner Production*, 183, 858-868.
- Shao, J., Gao, J., Zhao, Y., & Chen, X. (2019). Study on the pozzolanic reaction of clay brick powder in blended cement pastes. *Construction and Building Materials*, 213, 209-215.
- Shirule, P. A., Rahman, A., & Gupta, R. D. (2012). Partial replacement of cement with marble dust powder. *International Journal of Advanced Engineering Research and Studies*, 1(3), 2249.
- Singh, M., Srivastava, A., & Bhunia, D. (2017). An investigation on effect of partial replacement of cement by waste marble slurry. *Construction and Building Materials*, 134, 471-488.
- TS 25. (2015), Doğal puzolan (tras)-Çimento ve betonda kullanılan-Tarifler, gerekler ve uygunluk kriterleri, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- TS EN 1015-3/A2. (2007), Kagir harcı-deney metotları-bölüm 3: taze harç kıvamının tayini (yayımla tablası ile), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- TS EN 196-1. (2016), Çimento deney metotları- Bölüm 1: Dayanım tayini, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- TS EN 772-4. (2000), Kagir birimler- Deney metotları- Bölüm 4: Tabii taş kagir birimlerin toplam ve görünen porozitesi ile boşluksuz ve boşluklu birim hacim kütlelerinin tayini, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Wang, T., Yang, W., & Zhang, J. (2022). Experimental Studies on Mechanical Properties and Microscopic Mechanism of Marble Waste Powder Cement Cementitious Materials. *Crystals*, 12(6), 868.
- Wu, J. D., Guo, L. P., & Qin, Y. Y. (2021). Preparation and characterization of ultra-high-strength and ultra-high-ductility cementitious composites incorporating waste clay brick powder. *Journal of Cleaner Production*, 312, 127813.
- Xue, C., Qiao, H., Cao, H., Feng, Q., & Li, Q. (2021). Analysis on the strength of cement mortar mixed with construction waste brick powder. *Advances in Civil Engineering*, 1-10.
- Yamanel, K., Durak, U., İlkentapar, S., Atabey, İ. İ., Karahan, O., & Duran, C. (2019). Influence of waste marble powder as a replacement of cement on the properties of mortar. *Revista de la Construcción. Journal of Construction*, 18(2), 290-300.
- Zhang, H., Zhang, C., He, B., Yi, S., & Tang, L. (2023). Recycling fine powder collected from construction and demolition wastes as partial alternatives to cement: A comprehensive analysis on effects, mechanism, cost and CO2 emission. *Journal of Building Engineering*, 71, 106507.
- Zhao, Y., Gao, J., Liu, C., Chen, X., & Xu, Z. (2020). The particle-size effect of waste clay brick powder on its pozzolanic activity and properties of blended cement. *Journal of cleaner production*, 242, 118521.

Atf İçin: Aksakal, E., Çelik, Z. ve Bingöl, A.F. (2023). Farklı Konsantrasyonlarda Sodyum Sülfata Maruz Kalan Silis Dumanı İçerikli Betonların Sülfat Direncinin İncelenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2706-2716.

To Cite: Aksakal, E., Çelik, Z. & Bingöl, A.F. (2023). Investigation of Sulphate Resistance of Concretes Containing Silica Fume Exposed to Sodium Sulphate at Different Concentrations. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2706-2716.

Farklı Konsantrasyonlarda Sodyum Sülfata Maruz Kalan Silis Dumanı İçerikli Betonların Sülfat Direncinin İncelenmesi

Emrah AKSAKAL¹, Zinnur ÇELİK^{2*}, Ahmet Ferhat BİNGÖL³

Öne Çıkanlar:

- Sülfat
- Basınç dayanım kaybı
- Durabilite

Anahtar Kelimeler:

- Na₂SO₄
- Sülfat direnci
- Silis dumanı
- Konsantrasyon
- Genleşme oranı

ÖZET:

Bu çalışmada, farklı ikame seviyelerinde silis dumanı (SD) içeren betonların sodyum sülfat çözeltisine maruz kaldıktan sonraki özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla, çimento ağırlığına göre %5, %10 ve %15 oranında SD kullanılmıştır. Karışımlar %3, %5 ve %10 konsantrasyona sahip Na₂SO₄ çözeltisinde 30, 60, 90 ve 120 günlük periyotlarda bekletilmiştir. Tüm karışımların çözeltiye maruz kalma sonrası basınç dayanım kayıpları ve genleşme oranları tespit edilmiştir. Ayrıca karışımların taze beton özelliği olarak çökme değerleri ölçülmüştür. Özellikle SD ilaveli karışımların çökme değerlerinin azalmaması için süper akışkanlaştırıcı kullanılmıştır. Böylelikle SD ilaveli karışımların çökme değerlerinde kayda değer düşüşler meydana gelmemiştir. Test sonuçları, SD varlığının, sodyum sülfat etkisinden kaynaklanan dayanım kaybı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Sodyum sülfat saldırısına karşı en iyi direnç, %15'lik SD ikamesi ile elde edilmiş olup; 120 günlük periyotta ve tüm konsantrasyon oranlarında %3 ile %8 arasında dayanım kaybı tespit edilmiştir. Özellikle %3 konsantrasyonlu çözeltiye maruz bırakılan numunelerin erken yaşlarda (30 ve 60.gün) dayanımlarında artış meydana gelmiştir. Bu durum, gözenek boşluklarının genişleyen ürünler tarafından doldurulmasına ve harç matrisinin yoğunlaştırılmasına bağlanabilir. %10 konsantrasyona sahip çözeltide bekletilen kontrol numunesinin bağıl artık basınç dayanımı %94 ile %77.95 aralığında değişirken, SD-15 numunesi için bu değerler %100.31 ile %92.35 aralığında elde edilmiştir. Ayrıca Na₂SO₄ çözeltisine maruz kalan numunelerin genleşme oranları, basınç dayanımı sonuçları ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Investigation of Sulphate Resistance of Concretes Containing Silica Fume Exposed to Sodium Sulphate at Different Concentrations

Highlights:

- Sulfate
- Compressive strength loss
- Durability

Keywords:

- Na₂SO₄
- Sulfate resistance
- Silica fume
- Concentration
- Expansion value

ABSTRACT:

In this study, the properties of concretes containing silica fume (SF) at different substitution levels after exposure to sodium sulfate solution were investigated. For this purpose, 5%, 10% and 15% SF were used according to the cement weight. The mixtures were kept in Na₂SO₄ solution with 3%, 5% and 10% concentrations for 30, 60, 90 and 120 day periods. Compressive strength losses and expansion ratios of all mixtures after exposure to solution were determined. In addition, the slump values of the mixtures as fresh concrete properties were also measured. A superplasticizer was used especially in order not to decrease the slump values of SF added mixtures. Thus, there was no significant decrease in the slump values of the SF-added mixtures. The test results showed that the presence of SF had a positive effect on the strength loss caused by the sodium sulfate effect. The best resistance to sodium sulfate attack was obtained with 15% SF substitution; A strength loss of 3% to 8% was detected in a 120-day period and at all concentrations. In particular, the strength of the samples exposed to 3% concentrated solution increased at early ages (30 and 60 days). This can be attributed to the filling of the pore spaces by the expanding products and the thickening of the mortar matrix. While the relative residual compressive strength of the control sample kept in 10% concentration solution ranged between 94% and 77.95%, these values were obtained between 100.31% and 92.35% for the SD-15 sample. In addition, it was observed that the expansion values of the samples exposed to the Na₂SO₄ solution were similar to the compressive strength results.

¹Emrah AKSAKAL ([Orcid ID: 0009-0005-4924-5169](https://orcid.org/0009-0005-4924-5169)), Karayolları Genel Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

²Zinnur ÇELİK ([Orcid ID: 0000-0001-7298-7367](https://orcid.org/0000-0001-7298-7367)), Atatürk Üniversitesi, Pasinler Meslek Yüksekokulu, İnşaat Teknolojileri Bölümü, Erzurum, Türkiye

³Ahmet Ferhat BİNGÖL ([Orcid ID: 0000-0002-8798-8343](https://orcid.org/0000-0002-8798-8343)), Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zinnur ÇELİK, e-mail: zinnur.celik@atauni.edu.tr

Bu çalışma Emrah AKSAKAL'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Sülfat iyonları ile çimentonun hidratasyon ürünleri arasında meydana gelen ve hasarlara neden olan bir reaksiyon olarak tanımlanabilecek dış sülfat saldırısı (DSS), agresif bir ortamda beton dayanıklılığı için gerçek bir tehdittir. Sülfat iyonları yer altı sularında, deniz sularında, topraklarda ve atık sularda bulunur (Figg, 1999; El-Hachem ve ark., 2012). Dış sülfat saldırısı (DSS), sülfat ortamlarına maruz kalan hidrolik yapılar ve kıyı binaları gibi beton yapıların dayanıklılığını etkileyen önemli faktörlerdendir. Sülfat saldırısına maruz kalan çimentolu ürünlerin bozulma süreçleri dört ana kategoriye ayrılabilir: taşıma süreci, kimyasal reaksiyonlar, genişleme kuvvetleri ve mekanik tepkiler (Ikumi ve Segura, 2019; Wang ve ark., 2021). Sülfat saldırısı, dış ortamdan taşınan sülfat iyonlarının çimento içerisindeki bazı bileşenlerle reaksiyona girerek birincil olarak etrenjit ($\text{Ca}_6[\text{Al}(\text{OH})_6]_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 26\text{H}_2\text{O}$) ve ikincil olarak jips ($\text{Ca}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) oluşturmasından kaynaklanan ve beton içerisinde önemli mekanik hasara yol açabilen bir olaydır (Planel, 2006). Bu oluşumlardan etrenjit, katı hacim artışına neden olarak genişleme ve çatlamaya, jips ise betonun kütle ve mukavemet kaybına yol açabilir (Brown ve Badger, 2000; Wang ve ark., 2017). Bu durumun sıklıkla tekrarı, betonun zayıflamasına ve agrega taneleri ile çimento matrisinin ayrışmasına neden olan yıkıcı genişleme ve çatlaklar meydana getirir (Santhanam ve ark., 2003; Liu ve ark., 2012). Betonun sülfatlara direnme kabiliyeti, geçirgenliği, su/çimento oranı, çimento tipi ve maruz kalma şartları gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Skalny ve Pierce, 1999; Şahmaran ve ark., 2007).

Uçucu kül (UK), yüksek fırın cürufu (YFC), silis dumanı (SD) ve metakaolin (MK) gibi mineral katkı malzemeleri genellikle betonun işlenebilirlik, mekanik ve sülfat saldırısı gibi agresif ortamlara karşı dayanıklılık özelliklerini iyileştirmek için betona dahil edilir. Mineral katkı malzemesi olarak silis dumanı (SD) kullanımı, portlanditin güçlü puzolanik reaksiyon yoluyla ikincil C-S-H jeline dönüştürülmesi nedeniyle sülfat ortamına maruz kalan harç numunelerinin direncini arttırmaktadır. Ayrıca ince parçacık boyutundan dolayı SD'nin doldurucu etkisi, sodyum sülfat çözeltisinden kaynaklanan sülfat iyonlarının harç içerisine nüfuz etmesine ve difüzyonuna kolayca izin vermez (Lee ve ark., 2005).

Lee ve ark. (2005) çalışmalarında, %5, %10 ve %15 oranlarında SD'yi çimento yerine ikame ederek, 0.45 su/çimento oranında hazırladıkları harç numunelerini sodyum sülfat çözeltisine maruz bırakarak belirli günlerde basınç dayanımı kayıplarını tespit etmişlerdir. Çalışmada referans numunenin 180 gün sodyum sülfat çözeltisinde bekletildikten sonra basınç dayanımında %14.01 azalma meydana gelmiştir. Bu durum, %5, %10 ve %15 SD kullanılan numunelerde sırasıyla %3.63, %0.57 ve %1.29 olarak hesaplanmıştır. Lv ve ark. (2022), çimento harcına UK, SD ve YFC ilave ederek harçların uzun süreli sülfat direncini araştırmışlardır. Çalışmada SD'li karışımın, UK ve YFC'ye göre yüksek sülfat direnci sergilediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, 36 aylık sodyum sülfat çözeltisine maruz kalmanın ardından %3 SD kullanılan karışımın artık basınç ve eğilme dayanımı sırasıyla %71.6 ve %76.2 olarak elde edilmiştir. Bu çalışmaların aksine, Hekal ve ark. (2002), portland çimentosunun kısmen silis dumanı (%10-15) ile değiştirilmesinin, sertleştirilmiş çimento hamurunun sülfat direncinde önemli bir iyileşme göstermediğini bildirmişlerdir.

Sülfat atağına maruz kalan harç ve beton numunelerin dirençlerinin belirlenmesindeki en önemli parametrelerden biri genişleme yüzdeleridir. Aghabaglou ve ark. (2014), %10 oranında UK, SD ve MK'yi çimento ile ikame ederek hazırladıkları harç numunelerini Na_2SO_4 çözeltisine daldırarak genişleme değerlerini belirlemişlerdir. En düşük genişleme değerleri SD ilaveli karışımlardan elde edilmiştir. Sonuç olarak, mineral katkının puzolanik aktivite indeksi arttıkça, kontrol ve puzolanik karışımların genişleme değerleri arasındaki farkın arttığını tespit etmişlerdir. Sezer (2012)

çalışmalarında, SD oranının %5'den %15'e yükselmesiyle harç numunelerin genleşme değerlerinde azalmalar olduğunu bildirmiştir.

Literatürde genel olarak çeşitli mineral katkıları, farklı su/çimento oranları ve farklı sülfat çözeltileri (Na_2SO_4 , MgSO_4) kullanılarak hazırlanan çözeltilere maruz bırakılan harç numunelerinin sülfat direnci araştırılmıştır. Bu makalede incelenen çalışmaların çoğunluğunda ve diğer literatür araştırmalarında beton veya harç numuneler %5 sodyum sülfat solüsyonlarına maruz bırakılmıştır. Bu, ASTM C1012'de belirtildiği gibi sülfat çözeltisine maruz kalan hidrolik çimento harçları için önerilen sülfat iyonu konsantrasyonudur. Ancak beton yapılar daha düşük veya daha yüksek oranda Na_2SO_4 çözeltisine maruz kalabilir. Bu nedenle çalışmada genel olarak kullanılan çözelti oranından (%5) hariç olarak %3 ve %10 çözeltilerdeki sonuçları da araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında, %0, %5, %10 ve %15 oranında SD ilave edilen beton numuneler üç farklı sodyum sülfat konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. Beton numunelerinin sülfat direncini belirlemek üzere basınç dayanımı ve genleşme değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca karışımların işlenebilirliğini belirlemek için çökme deneyi yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Malzemeler ve Karışım Oranları

Çalışmada bağlayıcı malzeme olarak özgül ağırlığı 3.12 ve özgül yüzeyi $3710 \text{ cm}^2/\text{gr}$ olan Portland 42.5R çimentosu (PÇ 42.5R) kullanılmıştır. Özgül ağırlığı 2.20 olan silis dumanı (SD) çimento kütlesine göre %5, %10 ve %15 oranlarında ikame edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan PÇ ve SD'nin kimyasal bileşimi Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çimento ve SD'nin kimyasal bileşimi

Kimyasal Bileşim	PÇ 42.5R	SD
SiO_2 (%)	18.68	88.92
Al_2O_3 (%)	4.23	0.56
Fe_2O_3 (%)	2.46	0.32
CaO (%)	64.66	2.06
MgO (%)	2.97	4.02
SO_3 (%)	3.20	0.20
Kızdırma kaybı	2.13	2.96
Çözünmeyen kalıntı	0.46	

Çalışmada, 0-3 mm, 0-7 mm ve 7-15 mm aralığında kırmataş agregalar kullanılmıştır. Agregalara ait özgül ağırlık değerleri sırasıyla 2.47, 2.69 ve 2.63 olarak belirlenmiştir. Agregaların su emme oranları ise sırasıyla %1.8, %1.7 ve %1.5 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca karışımların işlenebilirliğini ayarlayabilmek için polikarboksilik eter esaslı, yüksek oranda su azaltıcı yeni nesil süper akışkanlaştırıcı kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında toplam bağlayıcı miktarı 450 kg/m^3 olarak seçilmiştir. Silis dumanı %5, %10 ve %15 oranlarında çimento ile ikame edilmiştir. Beton karışımların tamamında su/çimento (S/Ç) oranı 0.35 olarak belirlenmiştir. Agregalar, 0-3 mm, 0-7 mm ve 7-15 mm boyut aralıklarında sırasıyla %15, %35 ve %50 karışım oranlarında kullanılmıştır. Ön deneyler sonucunda, süper akışkanlaştırıcı katkı maddesi miktarı tüm karışımlarda bağlayıcı malzeme oranının %2'si olarak belirlenmiştir. Bu parametreler doğrultusunda 4 farklı beton karışımı hazırlanmıştır. Silis dumanı ikame edilmeyen karışım kontrol olarak, silis dumanı ilave edilen karışımlar ise SD oranına göre kodlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan beton karışımlarına ait malzeme oranları Çizelge 2'de sunulmuştur.

Çizelge 2. Beton karışım oranları (kg/m³)

Karışım kodu	Çimento	Silis Dumanı	0-3 mm agrega	0-7 mm agrega	7-15 mm agrega	S/Ç	Akışkanlaştırıcı
Kontrol	450		267	623	890	0.35	9
SD-5	427.5	22.5	265	620	885	0.35	9
SD-10	405	45	264	617	881	0.35	9
SD-15	382.5	67.5	263	614	877	0.35	9

Deney Yöntemleri

DeneySEL çalışma, farklı oranlardaki silis dumanının normal betonun işlenebilirlik, mekanik ve sülfat direnci özellikleri üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçlamaktadır. Bu kapsamda taze beton karışımlarının çökme (slump) deneyi TS EN 12350-2 (2019) standardına göre yapılmıştır. Su küründe bekletilen numunelerin 28. günde basınç dayanımı değerleri ölçülmüştür. Sülfat direnci sonrası dayanımı belirlenecek olan numuneler ise 28 günlük kür süresinden sonra, %3, %5 ve %10 konsantrasyona sahip Na₂SO₄ çözeltileri içerisinde bekletilmiştir. Çözeltide bekletilen numuneler 30, 60, 90 ve 120 günlük periyotlarda çözeltiden çıkarılarak dayanım testine tabi tutulmuştur. Basınç dayanımı testi, 100x200 mm boyutlarında silindir numuneler üzerinde TS EN 12390-3 standardına uygun olarak yapılmıştır. Ayrıca “Eşitlik 1.” kullanılarak sodyum sülfat çözeltisinde bekletilen beton numunelerin bağıl artık basınç dayanımı hesaplanmıştır.

$$\text{Bağıl Artık Basınç Dayanımı (\%)} = [(f_{cn}/f_{c0})] \times 100 \quad (1)$$

Burada, f_{cn} : Na₂SO₄ çözeltisine bırakılan numunelerin n+28 gün sonraki basınç dayanımı (MPa), f_{c0} : Na₂SO₄ çözeltisine bırakılmayan standart küremeye tabi tutulan numunelerin 28 günlük basınç dayanımını (MPa) göstermektedir.

Ayrıca Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan beton numunelerin genleşme oranları, 70x70x280 mm boyutlarında prizma numuneler üzerinde ASTM C1012’e uygun olarak belirlenmiştir. Genleşme oranları “Eşitlik 2.” kullanılarak hesaplanmıştır.

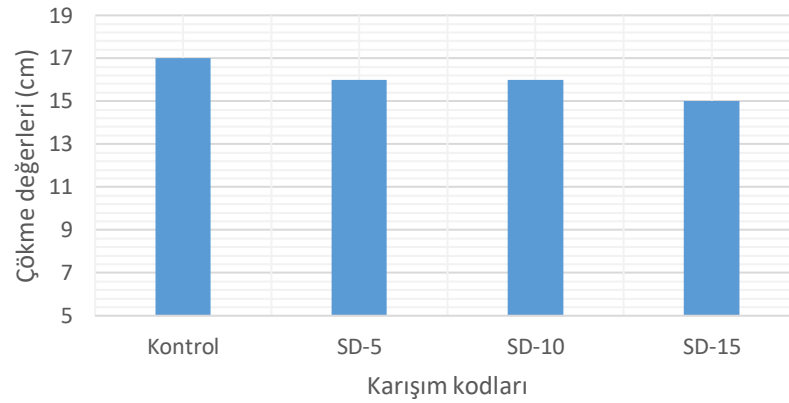
$$\text{Genleşme oranı (\%)} = \left[\frac{L_n - L_0}{L_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

Burada, L_n : Na₂SO₄ çözeltisine bırakılan numunelerin n gün sonraki uzunluğunu, L_0 : Na₂SO₄ çözeltisine bırakılmayan standart küremeye tabi tutulan numunelerin başlangıç uzunluğunu göstermektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

İşlenebilirlik

Karışımlara ait çökme (slump) değerleri Şekil 1’de sunulmuştur. Çalışmaya ait ön deneyler sonucunda süper akışkanlaştırıcı kullanılmadan hazırlanan silis dumanlı karışımların çökme değerlerinin, kontrol numunesine kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, SD partiküllerinin, çimento partiküllerine göre çok küçük olmasından dolayı daha fazla su ihtiyacı olmasına bağlanabilir. Bu nedenle, çalışmada karışımların üretilmesinde su/çimento oranı sabit tutularak, SD ilaveli karışımların çökme değerlerini iyileştirmek için süper akışkanlaştırıcı kullanılmıştır.

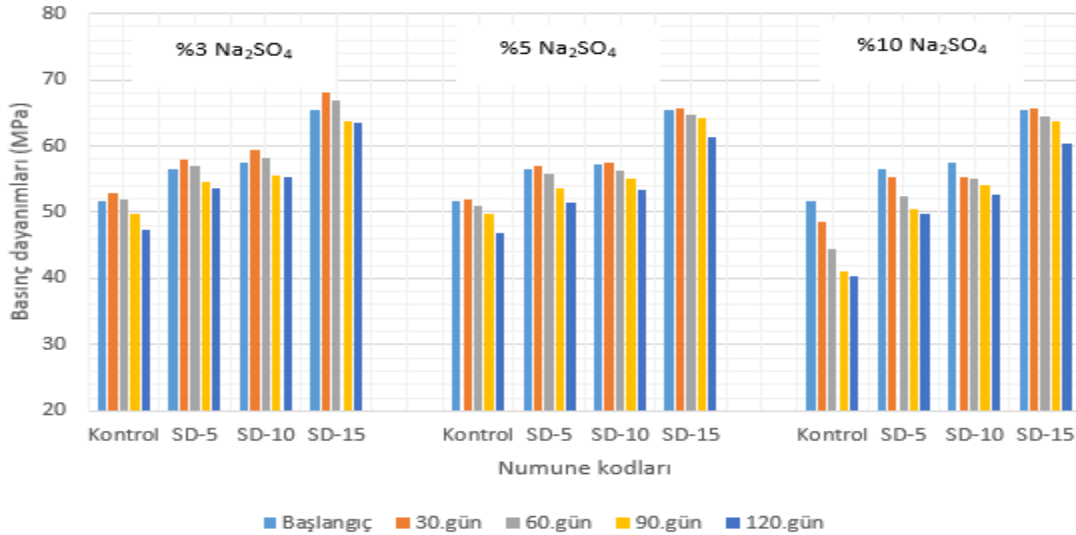


Şekil 1. Karışımlara ait çökme değerleri

Süper akışkanlaştırıcı kullanılmamasından kaynaklı olarak karışımlara ait çökme değerleri arasında kayda değer farklılık meydana gelmemiştir. SD kullanılan karışımların çökme değerindeki düşüklük, süper akışkanlaştırıcının bir kısmının yüzeyinde adsorbe olmasına neden olan silis dumanının çok ince parçacık boyutuna bağlanabilir (Mazloom ve ark., 2004; Park ve ark., 2005).

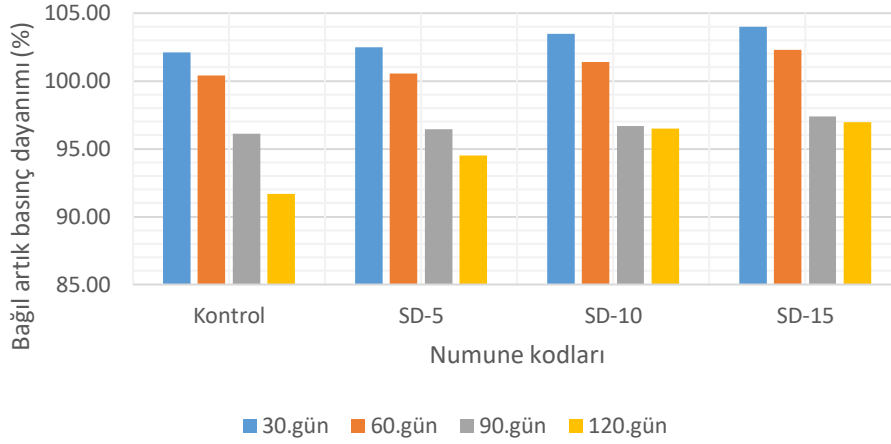
Basınç Dayanımı

Na_2SO_4 çözeltisinde bırakılmadan önce ve %3, %5 ve %10 konsantrasyona sahip çözeltide 30, 60, 90 ve 120 günlük periyotlarda bekletilen numunelere ait basınç dayanımı sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Na_2SO_4 çözeltisine maruz bırakılmadan önceki en yüksek başlangıç basınç dayanımı (28.gün) SD-15 serisinden elde edilmiştir.

Şekil 2. Karışım numunelerine ait başlangıç ve Na_2SO_4 çözeltisine maruz kaldıktan sonraki basınç dayanımları

Karışımlardaki SD miktarı arttıkça basınç dayanımında artışlar tespit edilmiştir. Kontrol numunesine kıyasla %5, %10 ve %15 SD kullanımı basınç dayanımını sırasıyla yaklaşık %9.48, %11.03 ve %26.50 arttırmıştır. Bu durum, yüksek puzolanik aktiviteli bir malzeme olan SD'nin, çimento hidratasyonundan kaynaklı olarak oluşan CaOH_2 ile reaksiyona girerek ek C-S-H jelleri oluşturması ile açıklanabilir (Sezer, 2012). Ayrıca, SD partiküllerinin çok ince olmasından dolayı beton içerisinde bulunan mikro boşlukları doldurma etkisine de atfedilebilir (Yazıcı ve ark., 2009). Çelik ve ark. (2022) çalışmalarında %5, %10 ve %15 oranında SD ilavesinin beton basınç dayanımını, referans numunesine göre %6.22, %10.50 ve %22.07 oranında arttırdığını tespit etmişlerdir. Mazloom ve ark. (2004) %6,

%10 ve %15 SD ikamesinin dayanımı sırasıyla %12.06, %16.38 ve %20.69 oranında arttırdığını gözlemlenmiştir. Ancak %15 oranından daha fazla SD ilavesi işlenebilirliği olumsuz etkileyeceğinden dayanımda düşüşlere neden olabilir.

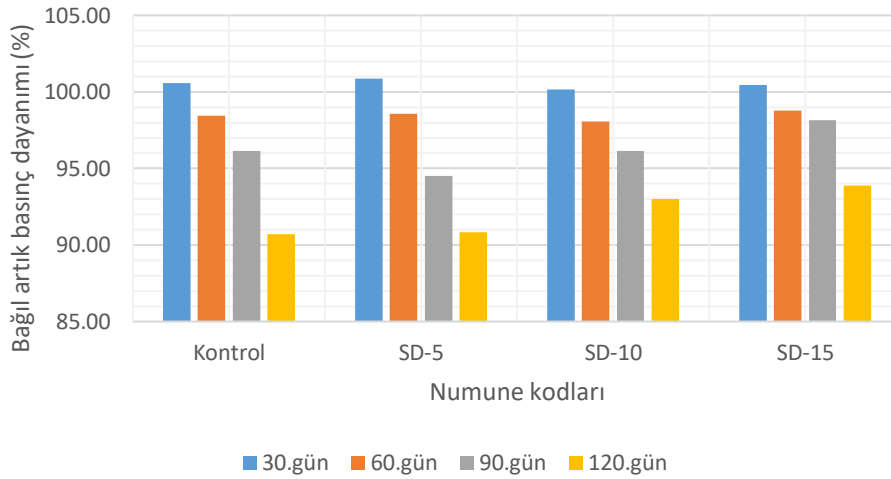


Şekil 3. %3 Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan numunelerin artık basınç dayanımı

%3 konsantrasyona sahip Na₂SO₄ çözeltisinde bekletilen numunelere ait 30, 60, 90 ve 120 günlük bağıl artık basınç dayanımı oranları Şekil 3'te sunulmuştur. Tüm karışım türlerinde özellikle 30 günlük süreç boyunca sodyum sülfata maruz bırakılan betonların dayanımının arttığı tespit edilmiştir. En yüksek dayanım artışı yaklaşık %4 oranıyla SD-15 serisinden elde edilmiştir. Na₂SO₄ çözeltisine maruz kalmanın erken aşamalarında (30 ve 60 gün) bağıl artık dayanımlarındaki artış Al-Amoudi (1998) ve Lee ve ark. (2005) tarafından da rapor edilmiştir. Bakharev (2005) çalışmasında, sülfat çözeltisine maruz kalan numunelerin basınç dayanımının ilk ayda arttığını ve ardından sabit bir düşüşe geçtiğini bildirmiştir. Bu durum, gözenek boşluklarının genişleyen ürünler tarafından doldurulmasına, harç matrisinin daldırmanın erken döneminde ve yüksek çekme gerilmesine maruz kalmadan önce yoğunlaştırılmasına bağlanabilir (Lee ve ark., 2005). %3 konsantrasyonlu Na₂SO₄ çözeltisine tabi tutulan numunelerde maruz kalma süresi arttıkça basınç dayanım kayıpları artmıştır. Örneğin, kontrol numunesinin 120 gün sülfat maruziyetinden sonraki dayanımı, başlangıç dayanımına kıyasla %8.32 oranında azalmıştır.

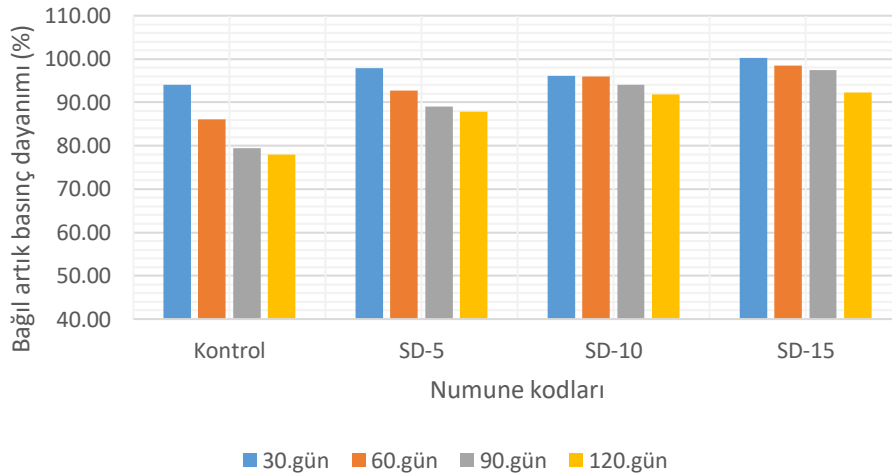
%5'lik Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan beton numunelerin basınç dayanımı sonuçları Şekil 4'de verilmiştir. %3'lük Na₂SO₄ sonuçlarına benzer şekilde ilk ayda dayanımda artışlar gözlemlenmiştir. Ancak 60 günlük sonuçlar, %3'lük Na₂SO₄ sonuçlarının aksine dayanım kaybına uğramıştır. Bu durum konsantrasyonda ki artışla ilişkilendirilebilir. Kontrol numunesindeki bağıl artık dayanım oranları %90.72 ile %100.58 aralığında değişmiştir. Bu oranlar, SD-5, SD-10 ve SD-15 serilerinde sırasıyla %90.81 ile 100.88, %93.02 ile %100.17 ve %93.88 ile %100.46 arasında tespit edilmiştir. Karışımlara ikame edilen SD oranı arttıkça basınç dayanım kaybı azalmıştır. En yüksek dayanım kaybı %9.28 ile kontrol numunesinde tespit edilirken, en düşük dayanım kaybı %6.12 ile SD-15 numunesinde elde edilmiştir. Bu durum, SD'nin puzolanik reaksiyonundan dolayı mevcut CaOH₂'i azaltmasına ve böylece SD katkılı karışımlarda sülfat etkisi ile dayanım kaybını arttıracak jips oluşumunun azalmasına bağlanabilir (Sezer, 2012). Ayrıca, SD'nin çok küçük partikül boyutundan dolayı betonun geçirimsizliğini azaltarak çözeltinin beton içine nüfuz etmesini engellemiştir. Wang ve ark., (2017), SD'nin %5 konsantrasyonlu Na₂SO₄ saldırısına karşı direnci arttırmada etkili olduğunu ve SD'nin uçucu külden daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Farklı Konsantrasyonlarda Sodyum Sülfata Maruz Kalan Silis Dumanı İçerikli Betonların Sülfat Direncinin İncelenmesi



Şekil 4. %5 Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan numunelerin artık basınç dayanımı

Sodyum sülfat konsantrasyon oranının %10'a yükselmesiyle basınç dayanım kayıpları artmıştır. %10 Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan numunelerin bağıl artık basınç dayanımı değerleri Şekil 5'de gösterilmiştir.

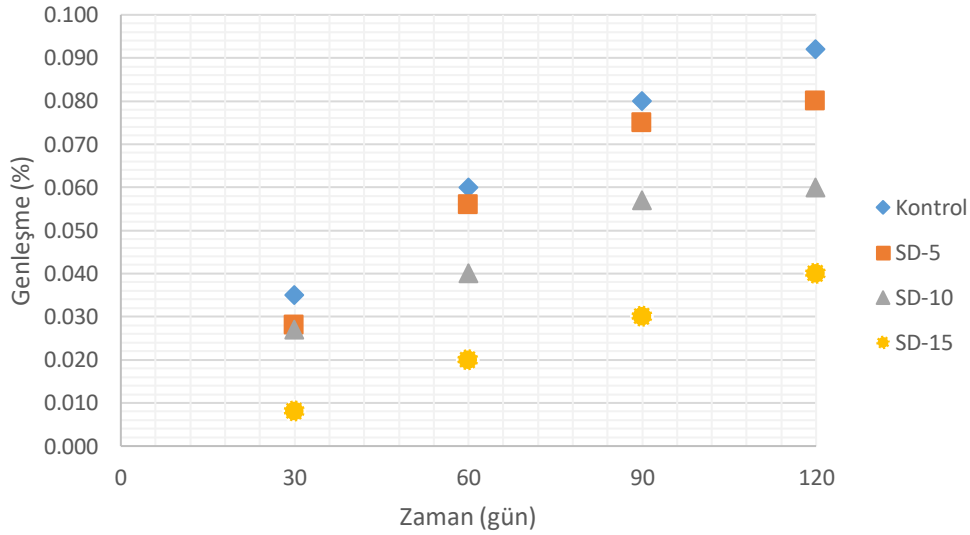


Şekil 5. %10 Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan numunelerin artık basınç dayanımı

SD-15 karışımı haricinde diğer bütün numunelerde bağıl artık basınç dayanımı oranı ilk ayda %100'den az olduğu belirlenmiştir. Kontrol numunesinin bağıl artık basınç dayanımı %94 ile %77.95 aralığında değişmiştir. Kontrol harçlarının basınç dayanımındaki bu azalma, reaksiyon ürünlerinin (alçıtaşı ve etrenjit) yıkıcı etkisinin, dayanıma katkılarında daha baskın olduğunu göstermektedir (Şahmaran ve ark., 2007). Bu oranlar, SD-5, SD-10 ve SD-15 serileri için sırasıyla %97.88 ile %87.81, %96.17 ile %91.81 ve %100.31 ile %92.35 arasında değişmiştir. Bu sonuçlar, SD ilavesinin, yalnızca kontrol numunesiyle kıyaslandığında dayanım kaybında önemli etkilere yol açtığını göstermektedir. Bununla birlikte, üç farklı SD oranı için dayanım kaybı miktarı önemli ölçüde farklı değildi ve yaklaşık 120 gün Na₂SO₄ saldırısına maruz kaldıktan sonra, dayanım kaybı, %5-15'lik SD içerikleri için yaklaşık %8-12'de nispeten sabit kalmıştır. Sonuç olarak, konsantrasyon oranı ve maruz kalma süresi arttıkça numunelerin dayanım kayıpları da artmıştır. Bu durum, genleşmeye, çatlamaya ve dayanımda azalmaya yol açan etrenjit ve alçı oluşumuyla birlikte beton numunelerin bozulmasına bağlanabilir.

Na₂SO₄ Çözeltisi Sonrası Genleşme Oranları

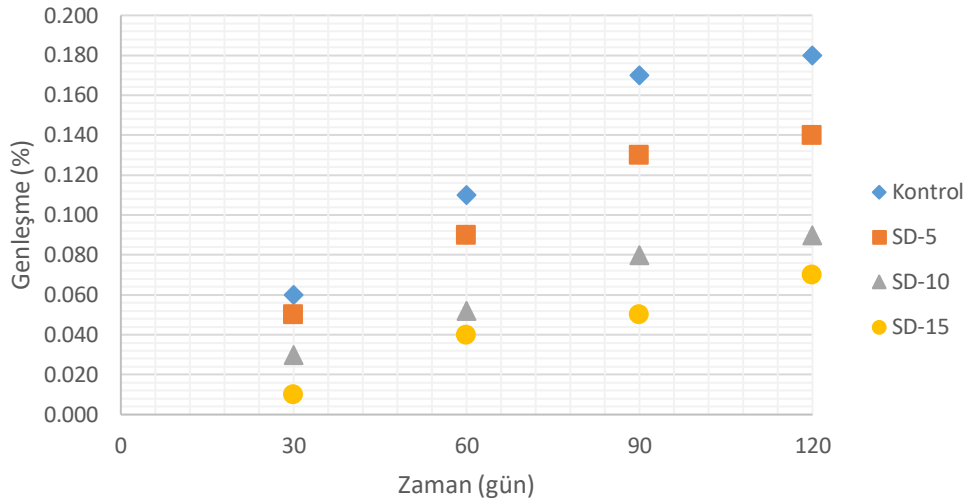
%3, %5 ve %10 konsantrasyona sahip sodyum sülfat çözeltilerinde bekletilen silis dumanı içerikli betonların genleşme değerleri sırasıyla Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8'de gösterilmektedir. %3 Na₂SO₄ çözeltisinde bekletilen numunelerde en yüksek genleşme değerleri kontrol numunesinden elde edilmiştir. Kontrol numunesinin genleşme oranları 0.035 ile 0.092 aralığında değişmiştir. Karışımlardaki SD oranı arttıkça genleşme oranları azalmıştır. 30 günlük periyod sonrası en düşük genleşme oranı SD-15 serisinden elde edilmiştir. SD-15 serisinin genleşme oranları 0.008 ile 0.04 arasında değişmiştir. Bu durum, çimentonun bir kısmının SD ile ikame edilmesiyle birlikte karışımlardaki hem C₃A hem de kalsiyum hidroksit miktarının azalmasına atfedilebilir. Sonuçta, tüm alüminat taşıyan fazlarda azalma meydana gelecek ve bu da etrenjit oluşumunu azaltacaktır. Ayrıca çimentonun hidrasyonu ile üretilen CaOH₂'in önemli bir bölümünün SD tarafından tüketilmesi ve bu nedenle karışımın pH'ının düşmesinden dolayı etrenjit daha az genleşir (Dulajjan ve ark., 2003).



Şekil 6. Beton numunelerinin %3 Na₂SO₄ çözeltisindeki genleşme oranları

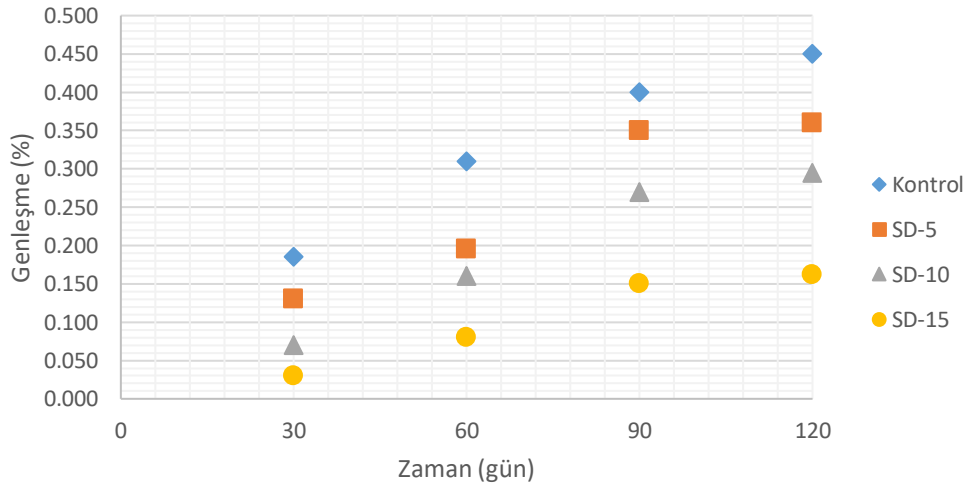
Konsantrasyon oranı arttıkça (%5) karışımların genleşme oranları da artmıştır. %5 Na₂SO₄ çözeltisine maruz bırakılan numunelerde en fazla genleşme oranı kontrol numunesinden elde edilmiştir. Kontrol numunesinin çözeltiliye 30 gün maruz bırakılması durumunda genleşme oranı 0.06 iken, 120 gün sonunda bu değer 0.18'e yükselmiştir. Sezer (2012) çalışmalarında kontrol numunesinin 30 günlük genleşme oranını yaklaşık 0.016 olarak hesaplamıştır. SD oranı arttıkça beton numunelerinin genleşme oranı azalmıştır. SD-5 serisinin genleşme oranları 0.05 ile 0.14 arasında değişmiştir. SD oranı %15'e yükselmesiyle birlikte bu aralık 0.01 ile 0.07 arasında ölçülmüştür. Lv (2022) SD'nin sülfat direncinin yüksek olmasını portlanditin puzolanik reaksiyonla uzaklaştırılmasından ziyade, toplam gözenekliliği ve zararsız gözenek yüzdesini korumasına atfetmiştir.

Farklı Konsantrasyonlarda Sodyum Sülfata Maruz Kalan Silis Dumani İçerikli Betonların Sülfat Direncinin İncelenmesi



Şekil 7. Beton numunelerin %5 Na₂SO₄ çözeltisindeki genişleme oranları

%10 konsantrasyona sahip sodyum sülfat çözeltisine maruz bırakılan numunelerin genişleme oranları önemli miktarda artmıştır. Kontrol numunesinin genişleme oranı 0.06 ile 0.18 arasında değişmiştir. Diğer konsantrasyon oranlarına benzer şekilde SD oranı arttıkça genişleme oranı azalmıştır. Tüm konsantrasyon oranlarında erken yaşlarda özellikle 30 günlük süreçte genişleme oranları arasındaki fark az iken, bekletme süresi arttıkça genişleme oranları arasındaki fark artmıştır. Karışımlar arasında en düşük genişleme diğer konsantrasyon oranlarına benzer olarak SD-15 serisinde tespit edilmiştir.



Şekil 8. Beton numunelerin %10 Na₂SO₄ çözeltisindeki genişleme oranları

SONUÇ

Bu çalışmada, çimento yerine %5, %10 ve %15 oranında silis dumani ikame edilmiş karışımların sülfat direnci araştırılmıştır. Karışımlar %3, %5 ve %10'luk konsantrasyona sahip Na₂SO₄ çözeltisinde 30, 60, 90 ve 120 gün bekletilerek basınç dayanımı kaybı ve genişleme oranları belirlenmiştir. Çalışmada aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

- Karışımların işlenebilirliğini düzenleyebilmek için süper akışkanlaştırıcı kullanılmıştır. Bu nedenle silis dumani ikameli karışımlarda kayda değer çökme kayıpları meydana gelmemiştir. Ayrıca karışımların çökme değerleri 15-17 cm aralığında ölçülmüştür.

• Na_2SO_4 çözeltisine maruz bırakılmadan önceki başlangıç basınç dayanımı SD ilavesi arttıkça artmıştır. En yüksek basınç dayanımı değeri SD-15, en düşük basınç dayanım değeri ise kontrol numunesinden elde edilmiştir.

• %3 konsantrasyonlu Na_2SO_4 çözeltisine maruz bırakılan numunelerin erken yaşta (30 ve 60. gün) bağıl artık basınç dayanım oranlarında artış tespit edilmiştir. Bu durum, gözenek boşluklarının genişleyen ürünler tarafından doldurulmasına ve harç matrisinin yoğunlaştırılmasına atfedilmiştir.

• SD ikamesi arttıkça basınç dayanım kayıpları Na_2SO_4 çözeltisinin tüm konsantrasyon oranlarında azalmıştır. Tüm konsantrasyon ve yaşlarda en az dayanım kaybı SD-15 serisinde hesaplanmıştır. Ayrıca tüm karışımlarda konsantrasyon oranı ve zaman arttıkça dayanımda ki düşüşlerde artmıştır.

• Özellikle %10 konsantrasyona maruz bırakılan kontrol örneklerinde kayda değer dayanım kayıpları olmuştur. Bununla birlikte, üç farklı SD oranı için dayanım kaybı miktarı önemli ölçüde farklı değildi ve yaklaşık 120 gün Na_2SO_4 saldırısına maruz kaldıktan sonra, dayanım kaybı, %5-15'lik SD içerikleri için yaklaşık %8-12'de nispeten sabit kalmıştır.

• Beton numunelerin genleşme oranları dayanım kayıpları ile benzerlik göstermiştir. Tüm konsantrasyon oranlarında ve yaşlarında SD oranı arttıkça genleşme oranları azalmıştır. Özellikle %10 konsantrasyonda numuneleri tamamında önemli genleşmeler kaydedilmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Al-Amoudi, O. S. B. (1998). Sulfate attack and reinforcement corrosion in plain and blended cements exposed to sulfate environments. *Building and Environment*, 33(1), 53-61.
- Al-Dulaijan, S. U., Maslehuddin, M., Al-Zahrani, M. M., Sharif, A. M., Shameem, M., & Ibrahim, M. (2003). Sulfate resistance of plain and blended cements exposed to varying concentrations of sodium sulfate. *Cement and Concrete Composites*, 25(4-5), 429-437.
- ASTM C 1012-02.(2002). Standard test method for length change of hydraulic-cement mortars exposed to a sulfate solution. United States of America: *ASTM International*, 1-6.
- Bakharev, T. (2005). Durability of geopolymer materials in sodium and magnesium sulfate solutions. *Cement and concrete research*, 35(6), 1233-1246.
- Brown, P. W., & Badger, S. (2000). The distributions of bound sulfates and chlorides in concrete subjected to mixed NaCl , MgSO_4 , Na_2SO_4 attack. *Cement and Concrete Research*, 30(10), 1535-1542.
- Çelik, Z., Bingöl, A. F., & Ağsu, A. S. (2022). Fresh, mechanical, sorptivity and rapid chloride permeability properties of self-compacting concrete with silica fume and fly ash. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions of Civil Engineering*, 1-11.
- El-Hachem, R., Rozière, E., Grondin, F., & Loukili, A. (2012). New procedure to investigate external sulphate attack on cementitious materials. *Cement and Concrete Composites*, 34(3), 357-364.
- Figg, J. (1999). Field studies of sulfate attack on concrete. *Materials Science of Concrete: Sulfate Attack Mechanisms*, Ed. J. Marchand and JP Skalny. American Ceramic Society, Westerbok, Ohio, 315-323.

- Hekal, E. E., Kishar, E., & Mostafa, H. (2002). Magnesium sulfate attack on hardened blended cement pastes under different circumstances. *Cement and Concrete Research*, 32(9), 1421-1427.
- Ikumi, T., & Segura, I. (2019). Numerical assessment of external sulfate attack in concrete structures. A review. *Cement and Concrete Research*, 121, 91-105.
- Lee, S. T., Moon, H. Y., & Swamy, R. N. (2005). Sulfate attack and role of silica fume in resisting strength loss. *Cement and Concrete Composites*, 27(1), 65-76.
- Liu, T., Zou, D., Teng, J., & Yan, G. (2012). The influence of sulfate attack on the dynamic properties of concrete column. *Construction and Building Materials*, 28(1), 201-207.
- Lv, X., Yang, L., Li, J., & Wang, F. (2022). Roles of fly ash, granulated blast-furnace slag, and silica fume in long-term resistance to external sulfate attacks at atmospheric temperature. *Cement and Concrete Composites*, 133, 104696.
- Mardani-Aghabaglou, A., Sezer, G. İ., & Ramyar, K. (2014). Comparison of fly ash, silica fume and metakaolin from mechanical properties and durability performance of mortar mixtures view point. *Construction and Building Materials*, 70, 17-25.
- Mazloom, M., Ramezani-pour, A. A., & Brooks, J. J. (2004). Effect of silica fume on mechanical properties of high-strength concrete. *Cement and concrete composites*, 26(4), 347-357.
- Park, C. K., Noh, M. H., & Park, T. H. (2005). Rheological properties of cementitious materials containing mineral admixtures. *Cement and concrete research*, 35(5), 842-849.
- Planel, D., Sercombe, J., Le Bescop, P., Adenot, F., & Torrenti, J. M. (2006). Long-term performance of cement paste during combined calcium leaching–sulfate attack: kinetics and size effect. *Cement and Concrete Research*, 36(1), 137-143.
- Santhanam, M., Cohen, M. D., & Olek, J. (2003). Effects of gypsum formation on the performance of cement mortars during external sulfate attack. *Cement and concrete research*, 33(3), 325-332.
- Sezer, G. İ. (2012). Compressive strength and sulfate resistance of limestone and/or silica fume mortars. *Construction and Building Materials*, 26(1), 613-618.
- Skalny, J., & Pierce, J. (1999). Sulfate attack issues. *Material Science of Concrete—Sulfate Attack Mechanisms*, American Ceramic Society, Westerville, OH, 49-64.
- Şahmaran, M., Kasap, O., Duru, K., & Yaman, I. O. (2007). Effects of mix composition and water–cement ratio on the sulfate resistance of blended cements. *Cement and Concrete composites*, 29(3), 159-167.
- TS EN 12350-2, (2019). Beton - Taze beton deneyleri - Bölüm 2: Çökme (slump) deneyi. *Türk Standardları Enstitüsü*. Ankara.
- TS EN 12390-3, (2019). Beton – sertleşmiş beton deneyleri- Bölüm 3: Deney numunelerinde basınç dayanımının tayini, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.
- Wang, H., Chen, Z., Li, H., & Sun, X. (2021). Numerical simulation of external sulphate attack in concrete considering coupled chemo-diffusion-mechanical effect. *Construction and Building Materials*, 292, 123325.
- Wang, D., Zhou, X., Meng, Y., & Chen, Z. (2017). Durability of concrete containing fly ash and silica fume against combined freezing-thawing and sulfate attack. *Construction and Building Materials*, 147, 398-406.
- Yazıcı, H., Yardımcı, M. Y., Aydın, S., & Karabulut, A. Ş. (2009). Mechanical properties of reactive powder concrete containing mineral admixtures under different curing regimes. *Construction and building materials*, 23(3), 1223-1231.

Atf İçin: Mertol, H. C. (2023). 6 Şubat 2023 Depremlerinde Gözlenen Betonarme Binalardaki Sorunların Hiyerarşik Bir Üçgen ile Açıklanması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2717-2729.

To Cite: Mertol, H. C. (2023). Explanation of the Problems in Reinforced Concrete Buildings Observed in the February 6th, 2023 Earthquakes with a Hierarchical Triangle. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2717-2729.

6 Şubat 2023 Depremlerinde Gözlenen Betonarme Binalardaki Sorunların Hiyerarşik Bir Üçgen ile Açıklanması

Halit Cenan MERTOL¹

Öne Çıkanlar:

- Kahramanmaraş Depremleri
- Yıkılma nedenleri
- Hiyerarşik üçgen

Anahtar Kelimeler:

- Kahramanmaraş
- Deprem
- Betonarme bina
- Hiyerarşik üçgen
- Yıkılma nedenleri

ÖZET:

Ülkemiz 6 Şubat 2023 tarihinde, saat 04:17'de merkez üssü Kahramanmaraş'ın Pazarcık ilçesi olan $M_w=7.7$ büyüklüğünde bir depremle sarsılmıştır. Yaklaşık dokuz saat sonra, saat 13:24'te, bu sefer merkez üssü Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesi olan $M_w=7.6$ büyüklüğünde ikinci bir deprem oluşmuştur. Depremlerin çevresinde bulunan 11 şehir afet bölgesi kapsamına alınmıştır. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı'nın verilerine göre bölgede 582000 bağımsız bölüm ve 202000 binanın acil yıkılacak, ağır hasarlı veya yıkık olduğu saptanmıştır. Bu makalede, deprem bölgesine yapılan, depremin olduğu gün başlayan ve 5 gün süren incelemeler neticesinde, betonarme binalarda yıkılmaya neden olan sorunlar hiyerarşik bir üçgen şeklinde, önem sırasına göre anlatılmıştır. Yetersiz kenetlenme boyu, etriye uçlarının 135° derece bükülmemesi, malzeme ile ilgili sorunlar, kolon ve kiriş uç bölgelerinde sarılma bölgelerinin bulunmaması, güçlü kiriş-zayıf kolon, vb. sorunların yıkılmaların önemli bir kısmını oluşturduğu gözlemlenmiştir. Yıkılan yapıların, yapıldıkları dönemde yürürlükte olan deprem yönetmeliklerinin şartlarını yerine getirmediği görülmüştür.

Explanation of the Problems in Reinforced Concrete Buildings Observed in the February 6th, 2023 Earthquakes with a Hierarchical Triangle

Highlights:

- Kahramanmaraş Earthquakes
- Reasons of collapse
- Hierarchical triangle

Keywords:

- Kahramanmaraş
- Earthquake
- Reinforced concrete building
- Hierarchical triangle
- Reasons of collapse

ABSTRACT:

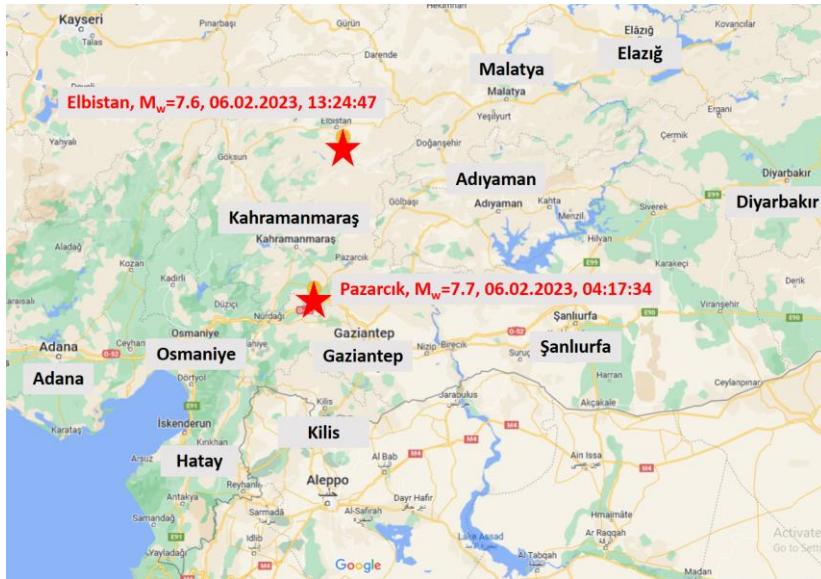
On February 6th, 2023, at 04:17, our country was struck by an earthquake with a magnitude of $M_w=7.7$. The epicenter was Pazarcık, Kahramanmaraş. About nine hours later, at 13:24, a second earthquake with a magnitude of $M_w=7.6$ occurred in Elbistan, Kahramanmaraş. After the earthquakes, 11 cities in the region were declared as disaster zones. According to the data of the Ministry of Environment, Urbanization and Climate Change, it has been determined that 582 thousand independent sections and 202 thousand buildings in the region are to be demolished immediately, heavily damaged or demolished. In this article, as a result of the investigations made in the earthquake effected regions, which started on the day of the earthquake and lasted for 5 days, the problems that caused the collapse of reinforced concrete buildings were explained in a hierarchical triangle, in the order of importance. Insufficient development length, end of the stirrups not bent at 135° , problems with the materials, lack of confinement regions at the ends of columns and beams, strong beam-weak column, etc. It has been observed that these problems constitute a significant part of the collapses. It was determined that the collapsed structures did not meet the requirements of the earthquake regulations in effect at the time they were built.

¹ Halit Cenan MERTOL ([Orcid ID: 0000-0001-8058-5798](https://orcid.org/0000-0001-8058-5798)) Atılım Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Halit Cenan MERTOL, e-mail: cenan.mertol@atilim.edu.tr

GİRİŞ

6 Şubat 2023 saat 04:17'de merkez üssü Kahramanmaraş'ın Pazarcık ilçesi olan $M_w=7.7$ (derinlik 8.6 km) ve yaklaşık dokuz saat sonra, saat 13:24'te bu sefer merkez üssü Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesi olan $M_w=7.6$ (derinlik 7 km) büyüklüğünde depremler oluşmuştur (AFAD, 2023). Depremlerin etkileri tek bir il ile sınırlı kalmamıştır. Depremler bölgedeki 11 ilde bulunan binalarda ağır hasarlara, yıkımlara ve can kayıplarına neden olmuştur. Depremin ardından depremden etkilenen Adana, Adıyaman, Diyarbakır, Elazığ, Gaziantep, Hatay, Kahramanmaraş, Kilis, Malatya, Osmaniye ve Şanlıurfa afet bölgesi illeri olarak ilan edilmiştir. Kahramanmaraş Depremlerinin merkez üstleri ve afet bölgesi içinde yer alan il merkezlerinin konumları Şekil 1'de gösterilmiştir. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı'nın verilerine göre bölgede 637222 bağımsız bölümden oluşan 227027 binanın acil yıkılacak, ağır hasarlı veya yıkık olduğu saptanmıştır (ÇŞİDB, 2023).



Şekil 1. 6 Şubat 2023 tarihinde olan depremler ve afet bölgesi illeri (Google Haritalar, 2023)

Bu makalede elde edilen sonuçlara ulaşabilmek için, ilk depremin oluşumunun yaklaşık 18 saat sonrasında deprem bölgesine ulaşılarak yıkılan ve ağır hasarlı binalar incelenmeye başlanmıştır. Sırasıyla Adana, İskenderun, Antakya, Kahramanmaraş, Pazarcık, Adıyaman, Besni, Gaziantep, Nurdağı ve Osmaniye incelemelerde bulunulan merkezler arasındadır. Bu makalede, beş gün boyunca farklı illerde yapılan incelemeler sonucunda tespit edilen betonarme binalardaki sorunlar, önem sırasına göre hiyerarşik bir üçgenle açıklanmıştır.

Bu depremlerde tamamen veya kısmen yıkılmış betonarme yapıların büyük bir çoğunluğu 1975 yılından sonra inşa edilmiştir. Bu binaların tasarımlarının en azından Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmeliğe'ne (ABYYHY, 1975) göre yapılmış olması gerekmektedir. Günümüze kadar bu yönetmelik, Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmelik (ABYYHY, 1998), Deprem Bölgelerinde Yapılacak Binalar Hakkında Yönetmelik (DBYBHY, 2007) ve Türkiye Bina Deprem Yönetmeliği (TBDY, 2018) isimleri altında değişikliklere uğramıştır. Bu makalede, betonarme binalardaki gözlenen sorunların yönetmelikler ışığında değerlendirilmesi de yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Afet bölgesi illerinde yapılan gözlemlerin ve değerlendirmelerin daha anlaşılır bir şekilde ifade edilebilmesi için, Maslow (1943) tarafından geliştirilen Maslow Teorisi, bu makalede betonarme binalardaki sorunlar için kullanılmıştır. Maslow Teorisine (Maslow, 1943) göre, insanların temel

İhtiyaçları, fizyolojik, güvenlik, sevgi, saygınlık ve kendini gerçekleştirme olarak belirlenmiştir. Fizyolojik ihtiyaçlar olarak beslenme, nefes alma, uyuma, örtünme, vb.; güvenlik ihtiyaçları olarak tehlikesiz bir ortamda yaşama, sosyal güvenliğe sahip olma, olumsuz çevresel etkilerden korunma, vb.; sevgi ihtiyacı olarak sevmek, sevilme, ait olma, aile, arkadaşlık, dostluk, vb.; saygınlık ihtiyacı olarak kendine ve başkalarına saygı, özgüven, başkaları tarafından saygı duyulmak, vb.; ve kendini gerçekleştirme ihtiyacı olarak sahip olunan yeteneklerin yaratıcı bir şekilde kullanılması olarak tarif edilebilmektedir. Bu temel ihtiyaçların birbirleriyle, yukarıdaki sıralama düzeninde, hiyerarşik bir şekilde alakalı olduğu ifade edilmiştir. Teoriye göre, herhangi bir kategorideki ihtiyacın yeterli düzeyde sağlanmasından sonra, bir üst ihtiyaç kategorisine geçilebilmektedir. Maslow'un bu teorisinin üçgen şeklinde anlatıldığı görsel Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekilde en alttaki ihtiyaç kategorisi basamağının yeterli düzeyde sağlanamaması durumunda, bir üst ihtiyaç kategorisi birey tarafından düşünülmemektedir. Diğer kategoriler için de, bir altındakinin yeterli düzeyde sağlanması gerekmektedir.



Şekil 2. İhtiyaçlar hiyerarşisinin üçgen olarak gösterimi (Maslow, 1943)

Kahramanmaraş Depremlerinde görülen betonarme bina sorunlarının Maslow Teorisi (Maslow, 1943) kullanılarak anlatılması için hazırlanan üçgen Şekil 3'te gösterilmiştir. Bu gösterime göre, en alt kategorideki koşulunun sağlanamaması durumunda, yapımızın yıkılabileceği ve diğer üst kategorilerde yapılan çalışmaların hiçbir şey ifade etmeyeceği söylenebilir. Örnek olarak, etriye uçlarının 135° bükülmediği binalarda, en iyi malzemeleri kullansanız bile, bina yıkılabilmektedir.



Şekil 3. Betonarme binalardaki sorunlar hiyerarşisinin üçgen olarak gösterimi

Bu üçgende belirlenen sıralama oluşturulurken ilgili basamaklar için aşağıdaki bilgiler göz önüne alınmıştır:

• **Yeterli Kenetlenme Boyu:** Betonarme malzemesinin oluşabilmesi için betonla çelik donatı arasında yeterli aderans bulunmalıdır (Arslan ve Arslan, 2018). Bu aderansın olmaması donatının akmadan betondan sıyrılmasına ve hesaplanan eleman kapasitelerinin oluşmamasına (elemanların gerekli zorlanmalara maruz kalmadan geçmesine) neden olacaktır (Orakçal ve Chowdhury, 2011). Bu nedene ilk basamak olarak yeterli kenetlenme boyu seçilmiştir.

• **Etriye Uçlarının 135° Bükülmesi:** İkinci basamakta çelik donatı için sıyrılma probleminin bulunmadığı varsayılmaktadır. Bu nedenle kiriş ve kolonlar artık yükler altında zorlanmaya başlayacaktır. Bu zorlanmalar sonunda betonarme yapı davranışını sürdürürebilmek için, yapı elemanlarının içinde betonun bulunması gerekmektedir. Ancak etriye uçlarının 135° bükülmemesi, tersinir yükler altında zorlanan bölgelerde (kolon ve kirişlerin sonlarında) kabuk betonu döküldükten sonra çekirdek betonun da dökülmesine neden olmaktadır (Susanto ve diğerleri, 2020). Betonarme davranışı bu şekilde sonlanmaktadır.

• **Malzeme ile İlgili Sorunlar:** Birinci ve ikinci basamaktaki sorunların önlemlerinin alınması, yapısal elemanlarda betonarme davranışının oluşturulabileceğini göstermektedir. Yani çelik donatı ve beton, dayanımlarının sonlarına kadar zorlanabilecektir. Bu aşamada bu malzemelerin dayanımını etkileyen faktörler, yapısal elemanların hesaplanan kapasitelerini de etkileyecektir.

• **Sarılma Bölgesi:** Çelik donatının sıyrılmadığı, yapısal elemanlarında çekirdek betonun bulunduğu, iyi kalitede çelik donatı ve beton malzemesine sahip yapılarda, artık bir üst faktör olan sarılma bölgesi davranışta rol oynamaktadır. Yapı elemanlarının en çok zorlandığı eleman sonlarında sarılma bölgesinin bulunması, bu bölgede bulunan çekirdek betonun dayanımının artmasına neden olacaktır. Yani en çok zorlanan bölgelerin dayanımı sarılma bölgelerinin bulunması nedeniyle artacaktır.

• **Güçlü Kiriş, Daha Güçlü Kolon:** Eleman kapasitelerinin yeterli olması sonrasında, sistem davranışına bu basamakta yer verilmiştir. Kolonların kirişlerden daha güçlü olması deprem süresince azami enerji soğrulmasına neden olmaktadır (Bakırcı Er ve diğerleri, 2014).

• **Gelişmiş Konular:** Üçgenin alttan bütün basamaklarının sağlandığı halde yıkılmış olan bir yapının yıkılma nedeni olarak gelişmiş konular gösterilebilir. Bu konular yanlış tasarımdan, yanlış zemin raporu verilerine, çekiçleme etkisinden, kısa kolon etkisine, vb. durumları içermektedir.

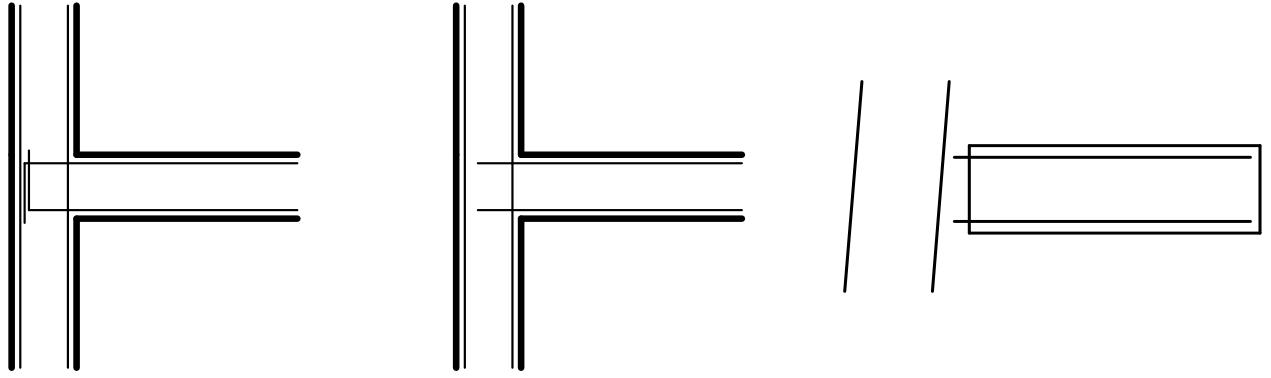
Şekilde gösterilen sorunlar aşağıdaki bölümde detaylı olarak anlatılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Betonarme Binalardaki Sorunlar

1. basamak: yeterli kenetlenme boyu

Kirişlerden gelen boyuna donatılar kolonlara yeterli bir şekilde ankre edilmelidir. Bu ankraji sağlamak için, kenar kolonlara saplanan kirişlerin boyuna donatıları, kolonların içlerine doğru bükülür (Şekil 4-a). Bu konudaki yanlış uygulama ise, kirişlerin boyuna donatılarının kolonun içine bükülmeden, kolonun içinde bir süre devam ettirilip sonlandırılmasıdır. Bu yanlış uygulama Şekil 4-b'de gösterilmiştir. Bu durumda deprem yükleri altında binanın kirişlerinin boyuna donatıları, kolonlardan sıyrılarak ayrılır ve yapının bütünlüğünün kaybolmasına (yıkılmasına) neden olur (Şekil 4-c). Donatıları yeterli kenetlenme boyuna sahip olmayan yapılar Şekil 3'te gösterilen üçgenin en alt basamağını oluşturmaktadır. Bu tip yapılar deprem süresinin ilk birkaç saniyesinde yıkılabilmektedir. Bu tip yapılarda üçgenin diğer basamakları ile ilgili ne yapıldığının hiçbir önemi bulunmamaktadır. Bu basamakta bina zaten yıkılmıştır. Deprem bölgesindeki incelemeler sırasında bunun gibi yanlış uygulamalarla karşılaşmıştır. Bir örneği Şekil 5'te gösterilmiştir.



a) Kiriş boyuna donatılarının kolon içinde bükülmesi

b) Yanlış uygulama olarak kiriş boyuna donatılarının kolon içinde yerleştirilmesi

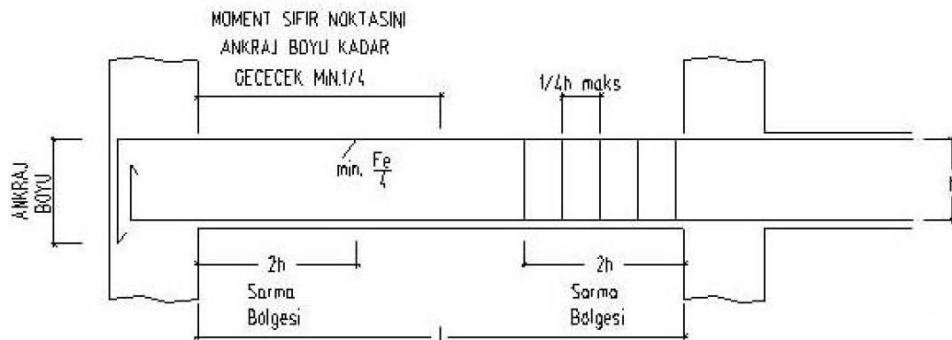
c) Yanlış uygulama sonucu kiriş boyuna donatılarının kolondan sıyrılarak ayrılması

Şekil 4. Kiriş boyuna donatılarının kolona bağlanması



Şekil 5. Yetersiz kenetlenme boyu (Kahramanmaraş)

ABYYHY (1975)'te bulunan ve kiriş boyuna donatılarının bükülerek, kolon içine yeterli düzeyde ankre edilmesi ile ilgili görsel Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu koşullar, bu yönetmelikten sonra çıkan yönetmeliklerde de bulunmaktadır. Yeterli kenetlenme boyu konusunda ABYYHY (1975)'te belirtilen gerektirmelerin sağlanması, bu depremlerde yetersiz kenetlenme boyu nedeniyle yıkılan binaların ayakta kalmasına neden olabilecekti.



Şekil 6. Kiriş boyuna donatılarının kolon içinde yeterli ankraj boyunu gösteren yönetmelik görseli (ABYYHY, 1975)

2. basamak: etriye uçlarının 135° bükülmesi

Dikdörtgen kesitli kolon ve kirişlerdeki enine donatılar (etriyeler) süresiz olduğu için teker teker üretilmektedir. Dikdörtgen kesitli bir kolonda veya kirişte hazırlanması gereken enine donatı imalatının adımları Şekil 7-a'da gösterilmiştir. İmalat sırasında en önemli olan husus, etriye uçlarının ikisinin de birer kanca şeklinde (135°) bükülmesidir. Enine donatı imalatında yanlış bir uygulama olan,

etriye uçlarının ikisinin de 90° bükülmesi, inşaatlarda yaygın olarak görülmektedir. Bu imalat aynı zamanda yönetmeliklerimize de aykırıdır. Dikdörtgen kesitli bir kolonda veya kirişte yanlış olarak yapılan enine donatı imalatı Şekil 7-b’de gösterilmiştir.

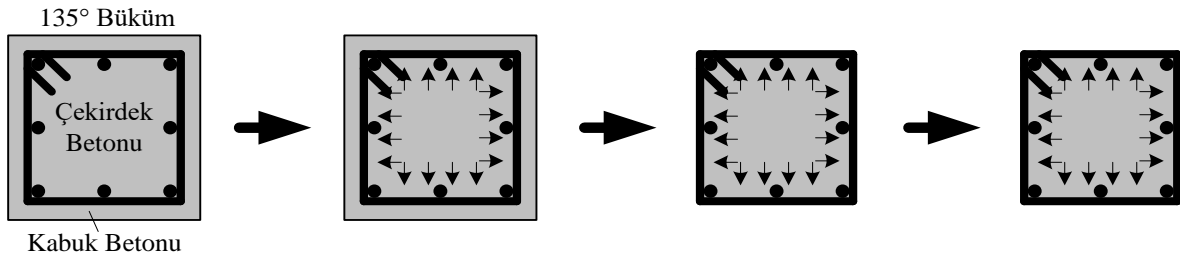


a) Yapılması gereken enine donatı imalatı (135° büküm)

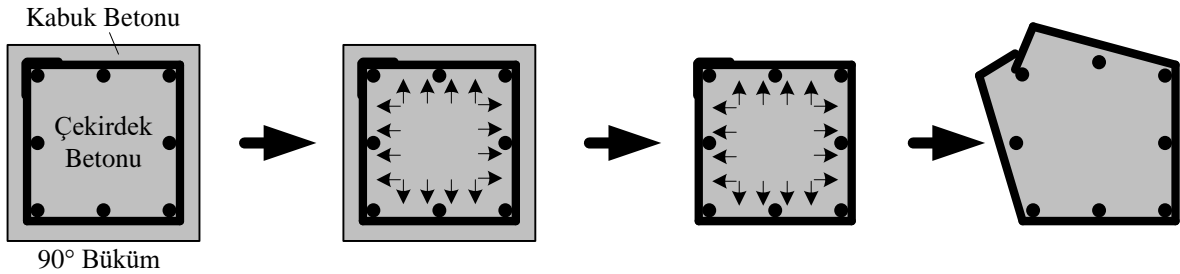
b) Yanlış uygulanan enine donatı imalatı (90° büküm)

Şekil 7. Enine donatı imalatı

Yüksek moment, kesme veya aksel yük kuvvetleri altında betonarme binalardaki yapısal elemanların öncelikle kabuk betonu hasar alır. Kabuk betonu etriyelerin dışında kaldığı ve onu yerinde tutan bir donatı olmadığı için, artan yük etkileri nedeniyle dökülmeye başlar. Etriye uçlarının 135° büküldüğü ve çekirdek betonun içine ankre edildiği durumda, etriyeler çekirdek betonunu sargılamayı sürdürür. Kabuk betonunu kaybeden yapısal eleman, sargılanmış çekirdek betonu sayesinde gelen yükleri taşımaya devam eder (Şekil 8-a). Etriye sonlarının 90° bükülülerek kabuk betona saplandığı durumda ise, kabuk betonun dökülmesinden sonra, etriye uçlarını açılır. Bu etriyeler artık betonu sargılama görevlerini sağlayamazlar (Şekil 8-b). Bu tipteki bir yapısal elemanın yüklere dayanımı tamamen kaybedilir. Bir başka deyişle, yapısal elemanların etriyesiz üretilmesi ile etriye uçların 90° bükerek üretilen elemanın yükler altındaki davranışı aynıdır.



a) 135° bükülmüş etriyelere sahip olan bir eleman

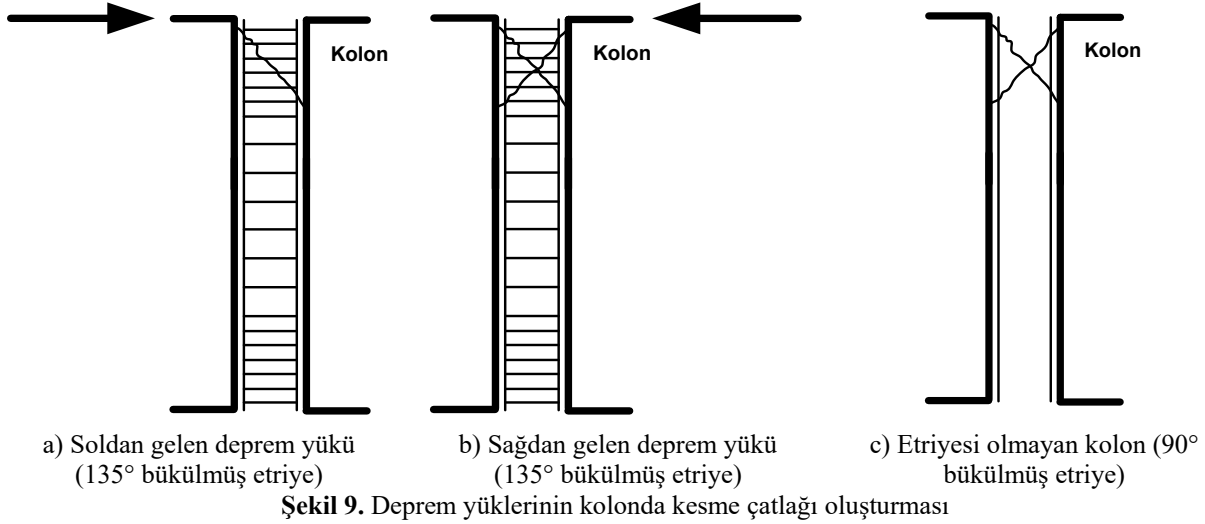


b) 90° bükülmüş etriyelere sahip olan bir eleman

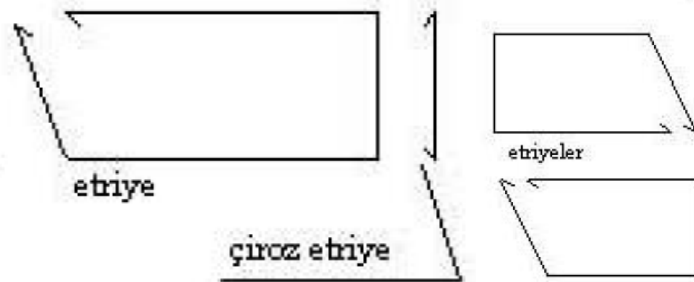
Şekil 8. Betonarme elemanda kabuk betonun dökülmesi ve sonrası

Deprem yükleri nedeniyle betonarme binaların kolonlarında kesme kuvveti oluşur. Bu kesme kuvveti kolonlardaki betonun kendi mukavemeti ile kolonlardaki etriyelerin dayanımı ile karşılanmaktadır. Kesme kuvveti betonun kesme dayanımından yüksek olduğu durumda, betonda çapraz bir çatlak oluşur (Şekil 9-a). Yükün diğer yönden geldiği durumda ise çapraz çatlak diğer yönde de oluşur ve çatlaklar birleşerek "X" şeklini alır (Şekil 9-b). Beton çatladıktan sonra, uygulanan kesme

kuvvetini karşılayacak tek unsur etriyelerdir. Etriye bulunmayan veya etriye uçları 90° bükülmüş etriyelere sahip yapılarda, deprem nedeniyle kolonlarda oluşan kesme kuvvetleri karşılanamaz ve yapı yıkılır (Şekil 9-c). Deprem bölgesindeki incelemeler sırasında yıkılan binaların kolonlarının ve kirişlerinin hiçbirinde etriyelerin iki ucu da 135° büküldüğü görülmemiştir. Bu tipteki yanlış uygulamaların örnekleri Şekil 10'da gösterilmiştir.



ABYYHY (1975)'te bulunan ve etriye uçlarının kanca şeklinde bükülmesini anlatan görsel Şekil 11'de gösterilmiştir. Bu koşullar, bu yönetmelikten sonra çıkan yönetmeliklerde de bulunmaktadır. Etriye uçlarının 135° bükülmesi konusunda ABYYHY (1975)'te belirtilen gerektirmelerin sağlanması, bu depremlerde etriye uçlarının 90° bükülmesi nedeniyle yıkılan binaların ayakta kalmasına neden olabilecekti.



Yeterli kenetlenme boyuna sahip olan ve etriye uçlarının 135° büküldüğü yapılar Şekil 3'te gösterilen üçgenin en alttaki iki basamağını geçmiş demektir. Etriyelerin 135° bükülmesi ile artık çekirdek betonunun kolonlarda ve kirişlerde varlığını sürdürmesi sağlanmaktadır. Bu aşamadan sonra

malzemelerin kalitesi bir anlam kazanmaktadır. 90° bükülmüş etriyeleri olan binalarda ise, beton kolonun çekirdek bölgesinde tutulmadığı için, betonun kalitesinin hiçbir önemi yoktur.

3. basamak: malzeme ile ilgili sorunlar

a) Beton

Kahramanmaraş Depremlerinde yıkılan ve ağır hasar almış binalardaki yapısal elemanlarda beton kalitesinin istenilen nitelikte olmadığı gözlenmiştir. Saha ziyaretleri sırasında bazı binaların betonunda segregasyon, organik malzemeler, uygun olmayan gradasyon, vb. sorunlarla karşılaşmıştır. Betonda dairesel şekilli agregaların kullanımı, kırma taş agregaların kullanımına göre daha düşük aderansa neden olmaktadır (Neville, 2012). Özellikle dairesel agregalı betonun, kırma taş agregalı betona göre eğilme dayanımını daha düşüktür (ACI, 2023). Çok iri agrega kullanımı, betonun çekme dayanımını oldukça düşürebilmektedir (Tsiskreli ve Dzhvkhidze, 1970). Bölgedeki binaların bazılarında dairesel şekilli agregaların 50 mm çapından daha büyük olduğu belirlenmiştir. Bazı binalara ait beton kaliteleri ve iri agrega olarak kullanılan taş parçası Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Yıkılan bazı binalarda gözlenen beton kalitesi

ABYYHY (1975)’te mesken amaçlı kullanılan binalar için asgari beton basınç dayanımı belirlenmemiştir. Ancak tasarımda belirlenen beton basınç dayanımının aynısının inşa sırasında da kullanılması gerekmektedir. Sonraki yıllarda, deprem bölgelerindeki tüm binalar için asgari beton basınç dayanımı ABYYHY (1998)’e göre 16 MPa, DBYBHY (2007)’ye göre 20 MPa ve TBDY (2018)’e göre 25 MPa olarak belirlenmiştir.

b) Çelik Donatı

Yıkılan veya ağır hasar almış binaların bazılarında donatının aşırı korozyona uğradığı görülmüştür. Korozyona uğrayan donatının (malzeme kaybindan dolayı) etkili kesit alanı küçülmektedir. Bu nedenle, tasarım sırasında hesaplanan çekme kuvvetlerini karşılama konusunda keside yerleştirilen donatı miktarı yetersiz kalmaktadır. Korozyona uğramış donatısı bulunan bir binanın yapısal eleman detayı Şekil 13-a’da gösterilmiştir.



a) Donatının aşırı korozyonu

a) Yetersiz donatı aralığı

Şekil 13. Yıkılan bazı binalarda gözlenen çelik donatılar

Her bir çelik donatının çevresi yeteri kadar beton örtüsü ile kaplanmalıdır. Bu beton örtüsü hem donatıya gerekli aderansı, hem de donatının dış etkenlerden korunmasını sağlar. Çelik donatılar yeteri kadar beton ile kaplanmaz ise, donatı tasarım sırasında hesaplanan çekme kuvvetlerini karşılayacak düzeyde deformasyona uğrayamaz ve bu nedenle yetersiz kalır (Döndüren ve diğerleri, 2006). Yıkılan bir binanın enkazından çıkarılan yapısal elemandaki uygun olmayan donatı düzenlemeleri Şekil 13-b’de gösterilmiştir.

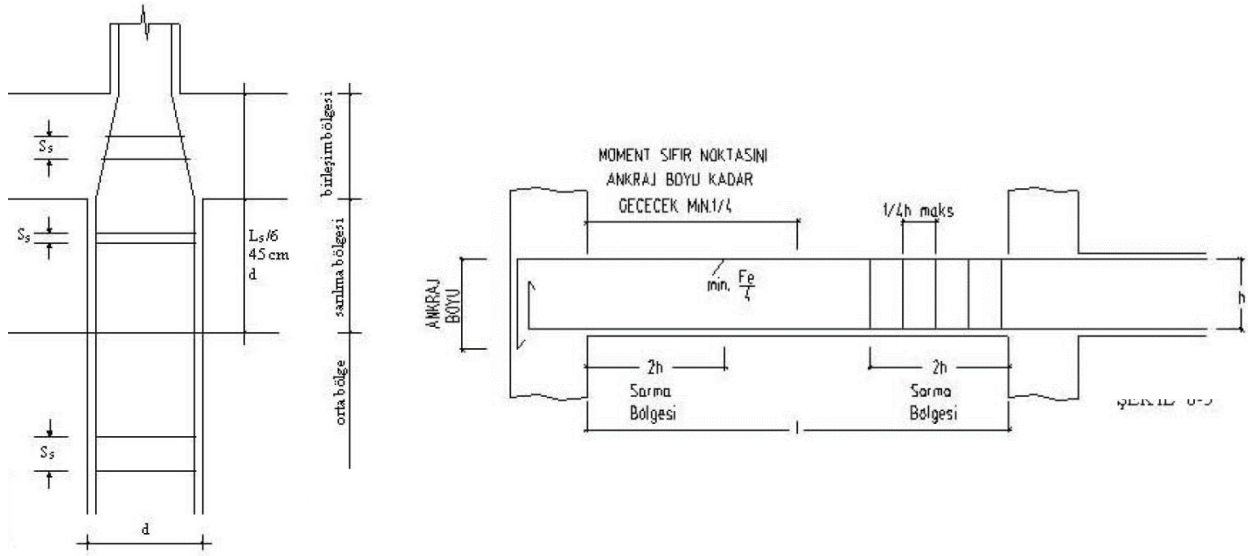
4. basamak: sarılma bölgeleri

Yeterli kenetlenme boyuna sahip olan, etriye uçlarının 135° büküldüğü ve malzeme ile ilgili sorunları bulunmayan yapılar, Şekil 3’te gösterilen üçgenin alttan üç basamağını sağlamıştır. Bir üst basamak olan, kolonlardaki ve kirişlerdeki sarılma bölgeleri bu bölümde ele alınmıştır. Deprem kuvvetleri altında yapısal elemanlardan kolon ve kirişlerin sonları en yüksek etkilere maruz kalmaktadır. Bu nedenle, kolonların alt ve üst ile kirişlerin sağ ve sol uçlarında etriye aralıkları, elemanların orta bölgelerine göre daha sık bir şekilde imal edilirler. Gelen yüksek yükler altında kolon ve kirişlerin uç bölgeleri kabuk betonunu kaybedecektir. Ancak, etriye sıklaştırılması yapılan sarılma bölgelerinde çekirdek betonu halen yerinde kalacak, sargılamının etkisi ile çekirdek betonun dayanımı artacak ve yapısal eleman yükleri taşımaya devam edecektir. Bu bölgelere “sarılma bölgeleri” denilmektedir. Bu depremlerde yıkılan bazı binaların sarılma bölgesi bulunmayan yapısal elemanlardaki donatı düzenlemeleri Şekil 14’te gösterilmiştir.



Şekil 14. Yıkılan bazı binalardaki yapısal elemanlarında sarılma bölgesi bulunmaması

ABYYHY (1975)’te bulunan ve kolon ve kiriş sarılma bölgelerini anlatan görsel Şekil 15’te gösterilmiştir. Bu koşullar, bu yönetmelikten sonra çıkan yönetmeliklerde de bulunmaktadır. Kolon ve kiriş sarılma bölgeleri konusunda ABYYHY (1975)’te belirtilen gerektirmelerin sağlanması, bu depremlerde sarılma bölgelerinin uygulanmaması nedeniyle yıkılan binaların ayakta kalmasına neden olabilecekti.



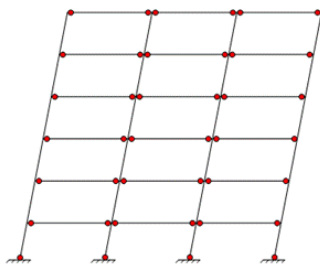
a) Kolon sarılma bölgesi

b) Kiriş sarılma bölgesi

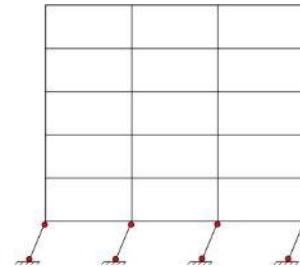
Şekil 15. Kolon ve kiriş sarılma bölgelerini gösteren yönetmelik görselleri (ABYYHY, 1975)

5. basamak: güçlü kiriş, daha güçlü kolon

Binalar deprem yüklerine maruz kalınca, ilk önce birinci kat kolonların alt ucunda hasar oluşur ve bu bölgeler plastik mafsala dönüşür. Kolonları kirişlerden daha güçlü olan yapılarda, daha az güçlü elemanların (kirişlerin) sağ ve sol uçlarında hasar oluşur ve bu bölgeler de plastik mafsala dönüşür. Bu binalarda göçmenin gerçekleşebilmesi, yani çerçevesel sistemin mekanizmaya dönüşmesi için, binada bulunan bütün kirişlerin her iki ucunun da plastik mafsala dönüşmesi gerekmektedir (Şekil 16-a) (Işık ve Özdemir, 2016). Tüm kirişlerin uçlarının plastik mafsala dönüşmesi hem uzun bir süreçtir, hem de çok yüksek düzeyde enerji gerektirir. Bu nedenle, kolonları kirişlerden daha güçlü olan binalar deprem süresince yıkılmadan ve en yüksek enerjiyi sönmüleyerek ayakta kalabilirler. Ancak uçları mafsallaşan kirişlerin çekirdek betonunun yükleri taşımaya devam edebilmesi için, Şekil 3'te gösterilen üçgenin alttan dört basamağının (yeterli kenetlenme boyu, etriye uçlarının 135° bükülmesi, malzeme ile ilgili sorunlar ve sarılma bölgesi) mutlaka sağlanması gerekmektedir. Güçlü kiriş, daha güçlü kolon koşulunu sağlamış ve Kahramanmaraş Depremleri sırasında yıkılmamış ancak ağır hasar almış olan bir bina Şekil 17-a'da gösterilmiştir.



a) Kirişlerin uçlarının mafsallaşarak oluşan göçme mekanizması (kolonların kirişlerde güçlü olduğu istenen davranış)



b) Birinci kat kolonlarının uçlarının mafsallaşarak oluşan göçme mekanizması (kirişlerin kolonlardan güçlü olduğu istenmeyen davranış)

Şekil 16. Kolon kiriş güç dengesine göre göçme mekanizmaları



a) Kolonların kirişlerden daha güçlü olduğu bina



b) Alt katı göçen bina (kirişlerin kolonlarından daha güçlü olduğu bina)

Şekil 17. Kolon kiriş güç dengesine göre binaların davranışları

Kirişlerin kolonlardan daha güçlü olduğu binalarda, birinci kat kolonlarının alt uçlarında hasar (plastik mafsal) oluşmasının ardından, daha az güçlü elemanlarda yani birinci kat kolonlarının üst uçlarında da hasar oluşur ve bu bölgeler de plastik mafsala dönüşür. Bu durumda çerçevesi sistemin en alt katı mekanizmaya dönüşür ve yapı bir kat aşağıya doğru yıkılır (Şekil 16-b). Henüz depremin başlarında daha istenilen düzeyde enerji sönmülmeyen bina göçmüş olur. Kirişleri kolonlarından daha güçlü olan ve Kahramanmaraş Depremleri sırasında yıkılmış olan bir bina Şekil 17-b'de gösterilmiştir.

Kirişlerin güçlü, kolonların kirişlerden daha güçlü olmaları koşulu ABYYHY (1975)'te bulunmamaktadır. Bu koşulun sağlanma gerekliliğinden ilk olarak ABYYHY (1998)'de bahsedilmiştir. Bu yönetmeliğe göre, kolonların kirişlerden en az %20 oranında daha güçlü olması gerekmektedir. Bu koşul, bu yönetmelikten sonra çıkan yönetmeliklerde de bulunmaktadır. Kolonların kirişlerden daha güçlü olmaları konusunda ABYYHY (1998)'de belirtilen gerektirmelerin sağlanması, bu depremlerde kirişlerin kolonlardan güçlü olması nedeniyle yıkılan binaların ayakta kalmasına neden olabilecekti.

6. basamak: gelişmiş konular

Şekil 3'te gösterilen üçgenin alttan 5 kategorisinin de sağlayan ancak yıkılan bir yapının yıkılma nedeni olarak gelişmiş konuları gösterebiliriz. Bunlar üçgenin ilk beş basamağına girmeyen konulardan oluşmaktadır. Yanlış tasarımdan, yanlış zemin raporu verilerine, çekiçleme etkisinden, kısa kolon etkisine, birçok konu göz önünde bulundurulabilir.

SONUÇ

Birinci depremin meydana gelmesinden yaklaşık 18 saat sonra, depremlerden etkilenen illerde (Adana, İskenderun, Antakya, Kahramanmaraş, Adıyaman, Besni, Gaziantep, Nurdağı, Osmaniye) incelemelere başlanmış ve bölgede toplam beş gün bulunulmuştur. Bu incelemeler neticesinde elde edilen sonuçlar ve öneriler aşağıda sıralanmıştır:

- Bu depremlerde yıkılan yapıların çok büyük bir çoğunluğunda, bu yapıların yapım döneminde yürürlükte olan deprem yönetmeliklerinde belirtilen kuralların ve koşulların önemli bir kısmının uygulanmadığı görülmüştür.

• Bu depremlerde yaşanan mevcut yıkımların nedenleri, Maslow (1943) tarafından geliştirilen ihtiyaçlar teorisi benzeri “Betonarme Binalardaki Sorunlar Hiyerarşisi Üçgeni” (Şekil 3) ile basitleştirilecek, bu makalede anlatılmıştır.

• Yıkılan binalardaki karşılaşılan en büyük sorunlar (önem sırasına göre, en önemliden başlayarak) yetersiz kenetlenme boyu, etriye uçlarının 90° bükülmesi, malzeme ile ilgili sorunlar, kolon ve kirişlerde sarılma bölgelerinin bulunmaması, kirişlerin kolonlardan daha güçlü olması olarak sıralanabilir.

• Karşılaşılan problemler sadece bu deprem ve bölgeye özgü olmamakla birlikte, 2011 yılında Van’da (Baran ve diğerleri, 2014), 2020 yılında Elazığ’da (Mertol ve diğerleri, 2021) ve yine 2020 yılında İzmir’de (Mertol ve diğerleri, 2023) gerçekleşen depremlerde karşılaşılan sorunlarla büyük benzerlik göstermektedir.

• Betonarme Binalardaki Sorunlar Hiyerarşisi Üçgeni’nin aşağıdan ilk beş basamağının sağlanması halinde bile, bu depremde yıkılan binaların önemli bir kısmının ayakta kalmasının sağlanabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bölgedeki incelemelerin gerçekleştirilmesi için sağladıkları destekten dolayı Atılım Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dekanlığı’na, Rektörlüğü’ne ve Müttevelli Heyeti’ne teşekkür ederim. İnceleme ekibinde yer alan Prof. Dr. Tolga Akış’a, Araş. Gör. Yunus Kantekin’e ve Araş. Gör. İshak Can Aydın’a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- ABYYHY. (1975). Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmelik. T. C. İmar ve İskan Bakanlığı, Ankara.
- ABYYHY. (1998). Afet Bölgelerinde Yapılacak Yapılar Hakkında Yönetmelik. T. C. Bayındırlık ve İskân Bakanlığı, Ankara.
- AFAD (Afet ve Acil Durum Yönetimi Başkanlığı). (2023). 06 Şubat 2023 Pazarcık (Kahramanmaraş) M_w 7.7 ve Elbistan (Kahramanmaraş) M_w 7.6 Depremlerine İlişkin Ön Değerlendirme Raporu. İçişleri Bakanlığı, Deprem Dairesi Başkanlığı, Ankara.
- American Concrete Institute (ACI). (2023). Erişim adresi: <https://www.concrete.org/tools/frequentlyaskedquestions.aspx?faqid=715> (Ulaşım Tarihi 8 Haziran 2023).
- Arslan, M. E. ve Arslan, T. (2018). Kenetlenme Boyu ve Donatı Çapının Beton-Donatı Aderansına Etkisinin Mafsallı Kiriş Deneyiyle İncelenmesi. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 30(2), 1-11.
- Bakırcı Er, Ş., Aykaç, S. ve Can, H. (2014). Betonarme Zayıf Kolon-Kiriş Birleşimlerinin Davranışı. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29(3), 537-547.
- Baran, E., Mertol, H. C. ve Güneş, B. (2014). Damage in reinforced-concrete buildings during the 2011 Van, Turkey, earthquakes. *Journal of Performance of Constructed Facilities*, 28, 466-479. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)CF.1943-5509.0000396](https://doi.org/10.1061/(ASCE)CF.1943-5509.0000396).
- ÇŞİDB. (2023). Bakan Kurum: “2 Ay İçerisinde 11 İlimizin Tamamında Toplam 309 Bin Bağımsız Bölümün İnşa Sürecini Başlatmış Olacağız”. Erişim adresi: <https://csb.gov.tr/bakan-kurum-2-ay-icerisinde-11-ilimizin-tamaminda-toplam-309-bin-bagimsiz-bolumun-insa-surecini-baslatmis-olacagiz-bakanlik-faaliyetleri-38466> (Ulaşım Tarihi: 8 Haziran 2023).

- DBYBHY. (2007). Deprem Bölgelerinde Yapılacak Binalar Hakkında Yönetmelik. T. C. Bayındırlık ve İskân Bakanlığı, Ankara.
- Döndüren, M. S., Çöğürçü, M. T. ve Altın, M. (2006). Betonla Donatı Arasındaki Aderans Davranışının Deneysel İncelenmesi,” *Selçuk Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 21(3-4), 57-68.
- Google Haritalar. (2023). Erişim adresi: <https://www.google.com/maps> (Ulaşım Tarihi: 8 Haziran 2023).
- Işık, E. ve Özdemir, M. (2016). Betonarme Yapılarda Güçlü Kiriş – Zayıf Kolon Durumunun Yapı Performansına Etkisi. 1st International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2016), Adana.
- Maslow, A. H. (1943). A theory of human motivation. *Psychological Review*, 50(4), 370–396. <https://doi.org/10.1037/h0054346>.
- Mertol, H. C., Tunç, G. ve Akış, T. (2021). Damage observation of reinforced concrete buildings after 2020 Sivrice (Elazığ) earthquake, Turkey. *Journal of Performance of Constructed Facilities*, 35 (5). [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)CF.1943-5509.0001619](https://doi.org/10.1061/(ASCE)CF.1943-5509.0001619).
- Mertol, H. C., Tunç, G. ve Akış, T. (2023). A site survey of damaged RC buildings in İzmir after the Aegean sea earthquake on October 30, 2020. *Gradevinar*, 75(5), 451-470. DOI: 10.14256/JCE.3343.2021.
- Neville, A. M. (2012). Properties of Concrete. *Trans-Atlantic Publications Inc.*, 5th Edition, 846 s.
- Susanto, A., Kasyanto, H. ve Susilahadi, S. (2020). Experimental Study of 90° Hook and Standard Hook at the End of Reinforced Concrete Beam Stirrup. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, 830.
- Orakçal, K. ve Chowdhury, S. R. (2011). Betonarme Kolonlarda Donatı Sıyrılmasının Analitik Modellenmesi. 1. Türkiye Deprem Mühendisliği ve Sismoloji Konferansı, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- TBDY. (2018). Türkiye Bina Deprem Yönetmeliği, Deprem Etkisi Altında Binaların Tasarımı için Esaslar. T. C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Ankara.
- Tsiskreli, G. D. ve Dzhavakhidze, A. N. (1970). The effect of aggregate size on strength and deformation of concrete. *Hydrotechnical Construction*, 4, 448-453. <https://doi.org/10.1007/BF02376145>.

Atf İçin: Portakal, G. G., Yeşiltepe, Ö. ve Örnek, M. (2023). Geohücre İle Donatılan Zeminlerde Temel Geometrisi Ve Boyutlarının Taşıma Gücü Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2730-2742.

To Cite:Portakal, G. G., Yeşiltepe, Ö. & Örnek, M. (2023). Investigation of the Effects of Foundation Geometry and Dimensions on Bearing Capacity in Soils Reinforced with Geocells. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2730-2742.

Geohücre ile Donatılan Zeminlerde Temel Geometrisi ve Boyutlarının Taşıma Gücü Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Gökçe Gizem PORTAKAL¹, Ömer YEŞİLTEPE^{2*}, Murat ÖRNEK¹

Öne Çıkanlar:

- Geohücre, zeminlerde iyileştirme amaçlı kullanılabilir
- Temel geometrisi taşıma gücünü etkiler.
- Geohücre taşıma gücünü artırır

ÖZET:

Üst yapıdan gelen yükleri kabul edilebilir sınırlar içerisinde deplasman yaparak güvenli bir şekilde taşımak, temel zemininde olması gereken bir özelliktir. Bu şartları taşımayan zeminlerin geoteknik açıdan uygun bir hale getirilmesi için çeşitli zemin iyileştirme yöntemlerine başvurulabilmektedir. Zeminlerin iyileştirilmesinde kullanılan malzemelerden birisi de geohücrelerdir. Geohücreler içine yerleştirilen zemin dolgusu ile sürtünmesinden meydana gelen kenetlenme ile üzerindeki yükleri yayarak, zeminde meydana gelebilecek oturmaları azaltmakta ve taşıma gücünü arttırmaktadırlar. Bu amaçla bu çalışmada geohücre ile donatılan zeminlerde, geohücresinin zemin yüzeyi ile düşey mesafesinin ve üzerine yerleştirilen temel geometri ve boyutlarının taşıma gücü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda 28x34x10 cm hücre boyutlarına sahip geohücre kullanılmıştır. İlk olarak geohücresinin zemin yüzeyi ile düşey mesafesini belirlemek için üç farklı mesafede arazi deneyleri yapılmıştır. Sonrasında optimum düşey mesafe belirlenerek farklı ebatlarda kare ve daire temeller kullanılarak taşıma gücü ve oturma değerleri araştırılmıştır. Deney sonuçlarına göre temel boyutlarının artmasıyla birlikte taşıma gücünün arttığı ve oturma değerlerinin azaldığı tespit edilirken, kare kesite sahip temellerin daire kesitli temellere göre yaklaşık olarak % 14,6 daha az oturma gerçekleştirdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- Geohücre
- Zemin iyileştirme
- Taşıma gücü
- Temel geometrisi

Investigation of the Effects of Foundation Geometry and Dimensions on Bearing Capacity in Soils Reinforced with Geocells

Gökçe Gizem PORTAKAL¹, Ömer YEŞİLTEPE^{2*}, Murat ÖRNEK¹

Highlights:

- Geocell can be used for soil improvement.
- The geometry of foundation affects the bearing capacity
- Geocell increases the bearing capacity

ABSTRACT:

Bearing the loads coming from the superstructure safely by displacement within acceptable limits is a desired feature on the foundation soil. Various soil improvement methods can be applied to make the soils that do not satisfy these conditions geotechnically suitable. One of the materials used in the improvement of soils is geocells. Geocells reduce the settlements that may occur on the soil and increase the bearing capacity by spreading the loads on them with the clamping caused by friction with the soil fill placed inside. For this purpose, the effects of vertical distance of geocell from the soil surface and the geometry and dimensions of the foundation placed on it have been investigated in soils reinforced with geocells. In this condition, a geocell with a cell size of 28x34x10 cm was used. Firstly, field tests have been conducted at three different distances to determine geocell vertical distance from the soil surface. Afterwards, the optimum vertical distance was determined and the bearing capacity and settlement values were investigated by using square and circular foundations of different sizes. According to the results of the field tests, it was determined that the bearing capacity increased and the settlement decreased with increase in the dimensions of the foundations, while it was determined that the foundations with a square section performed approximately 14.6% less settlement than the foundations with a circular section.

Keywords:

- Geocell
- Soil improvement
- Bearing capacity
- Foundation geometry

¹Gökçe Gizem PORTAKAL ([Orcid ID: 0000-0002-1648-6418](https://orcid.org/0000-0002-1648-6418)), Murat ÖRNEK ([Orcid ID: 0000-0002-0809-2531](https://orcid.org/0000-0002-0809-2531)) İskenderun Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, İskenderun/Hatay, Türkiye

²Ömer YEŞİLTEPE ([Orcid ID: 0000-0002-9337-9157](https://orcid.org/0000-0002-9337-9157)), Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, İnşaat Bölümü, Kilis, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ömer YEŞİLTEPE, e-mail: omeryesiltepe@kilis.edu.tr

Bu çalışma Gökçe Gizem PORTAKAL'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Dünyada gün geçtikçe kentleşme ve bununla birlikte yapılaşma hızla artmaktadır. Bu durum yerleşim yerlerinde yapılaşma alanı sorununa sebep olmaktadır. Bunun bir sonucu olarak yapıya elverişsiz alanların iyileştirilerek kullanılabilir hale getirilmesi sıklıkla başvurulan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu amaçla yapılan zemin iyileştirme uygulamaları geoteknik mühendisliğinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

Zemin iyileştirme yöntemleri alt başlıklar altında incelenmektedir. Genel olarak zemin iyileştirme yöntemleri dört gruba ayrılabilir (Hausmann, 1990). Bunlar mekanik, hidrolik, donatı kullanılarak iyileştirme ve fiziksel-kimyasal yöntemlerdir. Kompaksiyon işlemi olarak da tanımlanan mekanik iyileştirme, statik ya da dinamik yükleme ile zeminin yüksek mertebelerde yüklerle sıkıştırılarak iyileştirme yöntemidir. Zeminde bulunan yeraltı su seviyesinin çeşitli yöntemlerle zeminden uzaklaştırılarak zeminin iyileştirilmesine hidrolik iyileştirme yöntemi adı verilmektedir. Donatı işlevi görebilecek malzemelerin zemin içerisinde kullanılması ile zeminin çekme kapasitesini artırarak yapılan iyileştirmeye donatı kullanılarak iyileştirme yöntemi denilmektedir. Fiziksel karıştırma, zemini ısıtma ve dondurma, enjeksiyon gibi yöntemleri kullanarak zeminin iyileştirilmesi ise fiziksel-kimyasal iyileştirme kapsamında yer almaktadır.

Yapının inşa edileceği zeminin türüne ve inşa edilecek yapının türüne göre yukarıda bahsedilen iyileştirme yöntemlerinden hangisinin tercih edileceğine karar verilmektedir. Zeminin türüne göre incelendiğinde, genellikle iri daneli zeminler için mekanik olarak iyileştirme ve bir donatı malzemesi kullanarak iyileştirme yöntemleri kullanılırken ince daneli zeminlerde ise hidrolik yöntemler ve kimyasal yöntemler tercih edilmektedir. Yapılacak yapının türüne göre incelendiğinde ise genellikle üst yapı, fabrika, konut uygulamalarında sıkıştırma ve enjeksiyon yöntemleri tercih edilirken, karayolu, demir yolu gibi alt yapı projelerinde donatı kullanılarak iyileştirme yöntemleri tercih edilmektedir.

Donatı kullanılarak yapılan iyileştirmelerde geosentetikler sıklıkla kullanılmaktadırlar. Geosentetikler, filtrasyon, ayırma, drenaj, güçlendirme, yalıtım ve koruma gibi işlevlere sahip polietilen, polyester, polipropilen gibi malzemelerden üretilen sentetik donatı malzemeleridir (Örnek, 2009).

Geohücreler üç boyutlu petek yapılarından dolayı üzerindeki dolgu malzemesini hapsederek zemin kapasitesini arttıran ve zeminin yanal hareketini kısıtlayan bir geosentetik donatı türüdür (Han ve ark., 2008). Geohücrelerin hücre yüksekliği, açıklığı ve kalınlığı proje türüne ve yüküne uygun olarak tasarım yapılarak istenen boyutlarda imal edilebilmektedir. Ayrıca akordiyon şeklindeki yapısı sebebiyle kolaylıkla katlanıp açılabilirdiğinden dolayı nakliye ve uygulama açısından kolaylık sağlamaktadır.

Literatürde geohücrelerle ilgili yapılmış olan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Tafreshi ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada geohücreyle güçlendirilmiş zemin ortamına yerleştirilen temelin yük-deplasman eğrilerini verebilecek analitik bir modelden bahsedilmiştir. Kullanılan dolgu malzemesine ait boyutsuz modülünü ve kullanılan geohücreye ait sekant modülünü, geohücrenin sayısını ve katman kalınlığını içerecek şekilde analitik olarak geliştirilen model, deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile doğrulanmıştır. Dolgu malzemesinin katman sayısı ve kalınlığıyla beraber, malzeme modüllerindeki artış ile daha fazla taşıma gücü değerlerinin elde edildiği ve temelde meydana gelen oturma miktarının azaldığı belirlenmiştir. Bunlara ilaveten geliştirilen analitik modelin sonuçları ile literatürden elde edilen verilerin sonuçları da karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonuçlarının birbiriyle tutarlı oldukları belirtilmiştir.

Kargar ve Hosseini (2017) tarafından yapılan çalışmada zemin iyileştirilmesinde kullanılan geosentetik türlerinden olan geohücrelerin zeminin taşıma gücü üzerindeki etkileri laboratuvar ortamında yapılan deneylerle araştırılmıştır. Yapılan çalışmada kullanılan hücrenin yüksekliği, sayısı,

açıklığı ve genişliği deneylerde araştırılan değişken parametreler olarak kabul edilmiştir. Deneylerde kare kesitli temel ve kum zemin kullanılmıştır. Deneylerden elde edilen sonuçlar, taşıma gücü-deplasman grafiği olarak sunulmuştur. Geohücre yüksekliğinin artırılmasının temel oturma değerini yaklaşık olarak %48 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Geohücre açıklığının azaltılmanın ise taşıma gücünü arttırdığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda optimum geohücre genişliğinin kullanılan temel genişliğinin 5 katı olduğu tespit edilmiştir. Geohücre sayısının ise taşıma gücünü bir miktar arttırdığı fakat taşıma gücü için en belirleyici özelliğin geohücre yüksekliği olduğu belirtilmiştir.

Mehrjardi ve Motarjemi (2018) tarafından geohücre ile iyileştirilmiş zeminlerin herhangi bir iyileştirme işlemi yapılmamış zemine göre kayma mukavemeti değerinin artış miktarını tespit etmek için bir dizi çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, farklı dane çapı dağılımına sahip zemin dolgu malzemeleri üzerinde, farklı gerilme değerlerinde ve zemin yoğunluklarında yapılan 36 adet deneye ait sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Geohücre kullanılarak güçlendirilmiş zemin ortamında dane çapının artmasıyla beraber kayma gerilmelerinin arttığı tespit edilirken, donatının kullanılmadığı zemin ortamında zemin yoğunluğundaki artışın zemin ortamındaki iyileşmeye katkısının olduğu belirtilmiştir.

Mehrjardi ve ark. (2019) tarafından geohücre kullanılarak iyileştirilmek istenen zeminlerde optimum parametreler belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, dört adet farklı dane boyutu dağılımına sahip zemin profilleri, birbirinden farklı iki adet geohücre açıklığı ve farklı boyutlarda üç adet plaka genişliği ile toplam 36 adet laboratuvar deneyi yapılmıştır. Deney sonuçları incelendiğinde, yapılan iyileştirmeler ile zeminleri taşıma gücü değerleri yaklaşık olarak 5,24 kat artmıştır. Ayrıca optimum temel genişliğinin, kullanılan zeminin dane boyutunun yaklaşık 20 katı olduğu ve optimum geohücre açıklığının dolgu olarak kullanılan zemin malzemesinin dane boyutunun 15 katı civarında olduğu belirtilmiştir.

Xianrong ve ark. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada geohücrelerin asfalt karışımlarının hizmet ömrü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada, aynı yükleme koşullarında geohücre kullanılan numunelerin donatı kullanılmayan numunelere göre yorulma ömürlerinin uzadığı belirlenmiştir. Ayrıca yükleme ortamı sıcaklığının iyileştirme işlemleri üzerinde önemli bir etkisinin olduğu ve sıcaklığın artmasıyla birlikte %230'lar mertebesinde iyileşmeler görüldüğü belirtilmiştir.

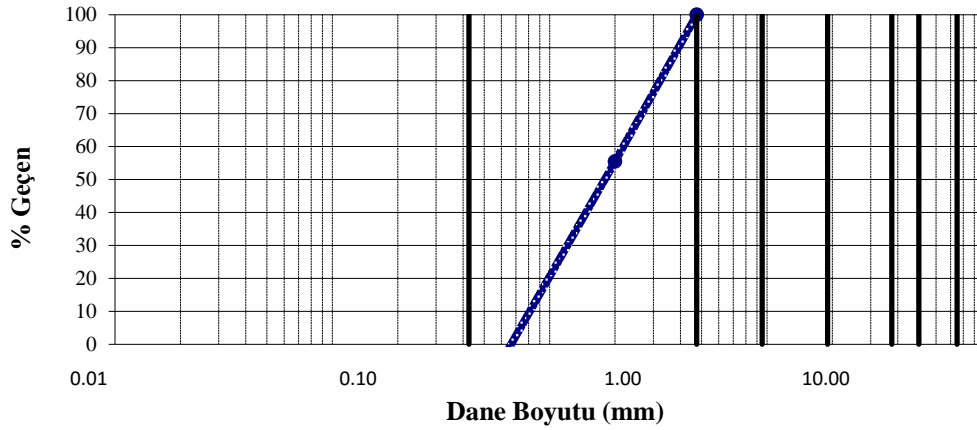
Inti ve Tandon (2021) tarafından yol üst yapısında kaplama malzemesi olmadan geohücrelerin etkisinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, düşük hacme sahip yol modeli oluşturularak yapılan laboratuvar deneyleri ile yolda meydana gelen gerilmelerin geohücrelerin kullanımı ile daha iyi bir şekilde yayıldığı görülmüştür. Araştırma bulguları ışığında, yapılması planlanan kaplama tasarımlarında geohücre ile tasarımların göz önünde bulundurulması gerektiği tavsiye edilmiştir.

Bu çalışmada, zemin iyileştirme yöntemlerinden biri olan geohücre ile donatılan zeminin taşıma gücü bakımından iyileşme mertebesi arazi deneyleri ile araştırılmıştır. Geohücre boyutları olarak 28x34x10 cm (genişlik x uzunluk x yükseklik) seçilmiştir. Zemin malzemesi olarak 0-5 mm dane boyutlarında dolgu malzemesi kullanılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Arazi deneylerinde kullanılan zeminin özelliklerini tespit etmek amacıyla birim hacim ağırlık deneyi (TS 1900-1) ve elek analizi deneyi (TS-EN 17892-4) yapılmıştır. Deneyler sonucunda zemin sınıfı kötü derecelendirilmiş kum (SP) olarak belirlenirken, zeminin birim hacim ağırlığı 1.72 g/cm^3 ,

gevşek haldeki birim hacim ağırlığı 1.63 g/cm^3 olarak tespit edilmiştir. Zemine ait dane boyutu dağılımı eğrisi Şekil 1’de verilmiştir. Deneylerde dikdörtgen ve daire kesite sahip model temeller birbirleri ile aynı kesit alanda olacak şekilde ve 2 cm kalınlığa sahip metal plakalardan üretilmiştir. Dairesel temeller 25, 30, 45 cm çaplarında imal edilirken, daire temellerle aynı kesite alanına sahip olan kare temeller ise 22x22 cm, 26x26 cm, 40x40 cm boyutlarındadır (Şekil 2). Deney alanının ölçüleri belirlenirken literatür araştırması yapılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda deney alanının boyutlarının deneylerde kullanılan model temellerin çapının en az iki katı olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (Mehrijardi ve ark. 2019). Bu sebeple deneyler, genişliği 1500 mm, uzunluğu 2000 mm ve yüksekliği 1000 mm olan bir alanda gerçekleştirilmiştir. Deney alanının hazırlanmasına ait görsel Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 1. Deneylerde Kullanılan Zeminin Dane Boyutu Dağılım Eğrisi



Şekil 2. Daire ve Kare Kesitli Model Temeller



Şekil 3. Deney Ortamının Hazırlanması

Arazi ortamında gerçekleştirilmiş olan plaka yükleme deneyleri esnasında zemini güçlendirmek amacıyla 34cm-28cm-10cm (uzunluk-genişlik-kalınlık) boyutlarına sahip olan geohücre kullanılmıştır. Kullanılan geohücre 1.5 m x 2.0 m ölçülerine sahip 3.0 m² alanı kaplayacak şekilde hazırlanmıştır. Geohücreye ait teknik özellikler Çizelge 1’de verilmiştir. Geohücrelerin deney alanına yerleştirilmiş durumdaki görseli Şekil 4’de verilmiştir.

Çizelge 1. Deneylerde Kullanılan Geohücrelere Ait Teknik Özellikler

Teknik Özellik	Değeri	Deney Standardı
Geohücrenin eni	28 cm	-
Geohücrenin boyu	34 cm	-
Geohücrenin yüksekliği	10 cm	-
Yoğunluk	0.935 /0.965 gr/cm ³	ASTM D-1505
Geohücrenin karbon oranı	% 1.5-%2	ASTM D-1603
Geohücrenin çevresel baskıya karşı direnci	> 3000 saat	ASTM D-1693
Geohücrenin kısa dönem çekme dayanımı	>200 N/cm	EN ISO 10319
Geohücrenin uzun dönem çekme dayanımı	>200 N/cm	ENV ISO 13438 B2



Şekil 4. Geohücrenin Deney Alanına Yerleştirilmesi

Deney ortamı %70 sıklık değerinde olacak şekilde ayarlanmış ve sıkıştırma işlemi kompaktör yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 5). Kuru kum zemin deney sahasına 20cm’lik tabakalar halinde gerekli miktarlarda (kuru birim hacim ağırlık 1.72 t/m³ olacak şekilde) 5 tabaka olarak yerleştirilmiştir. Bu amaçla (1.5mx2.0mx0.2m) hacme sahip olacak şekilde sabit bir yoğunluk için gerekli kum miktarı (her bir tabaka için yaklaşık 1030kg kum) yerleşecek kadar sıkıştırma işlemi yapıp üzeri masterlanarak dört adet köşe noktasından ölçüm yapılmıştır. Bu işlem diğer tabakalar için de tekrar edilmiştir. Sıkıştırma işlemi bitirildikten sonra TS 1900-1 (2006) standardına göre yapılan kum konisi deneyi ile %70 sıklık değeri sıkıştırma işleminden sonra kontrol edilerek sağlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Zeminin Kompaktör ile Sıkıştırılması İşlemi

Sıkıştırma işlemi tamamlandıktan sonra yükleme için plaka yükleme düzeneği hazırlanmıştır. Yük aktarımı için içi dolu bir kamyon kullanılmıştır. Kullanılan piston kamyonu yaptığı itki kuvveti kadar kuvveti zemine aktarmıştır. Deneyleerde kullanılan iki deplasman ölçer ile zeminde meydana gelen düşey deplasman değerleri uygulanan her yük kademesi için kaydedilmiştir. Şekil 6’da deney sırasında piston ve deplasman ölçerlerin konumu verilmiştir.

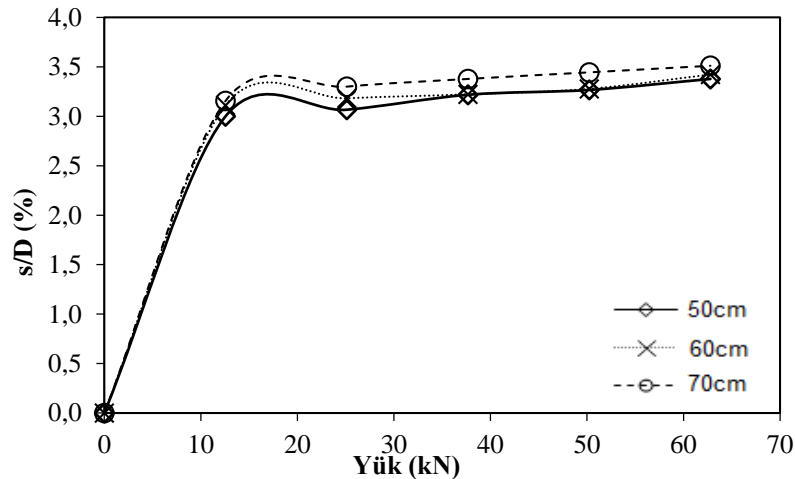


Şekil 6. Deney Sırasında Pistonun ve Deplasman Ölçerlerin Konumları

BULGULAR VE TARTIŞMA

Optimum Geohücre Derinliğinin Belirlenmesi

Deneyleerde kullanılacak geohücresinin zemin yüzünden optimum derinliğini belirlemek amacıyla, ilk olarak zemin yüzeyinden 50 cm, 60 cm ve 70 cm derinlikte olacak şekilde geohücre yerleştirilerek 45 cm çapına sahip daire temel ile deneyleer gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları Şekil 7’de sunulmuştur.



Şekil 7. Donatı Derinliğinin Etkisi

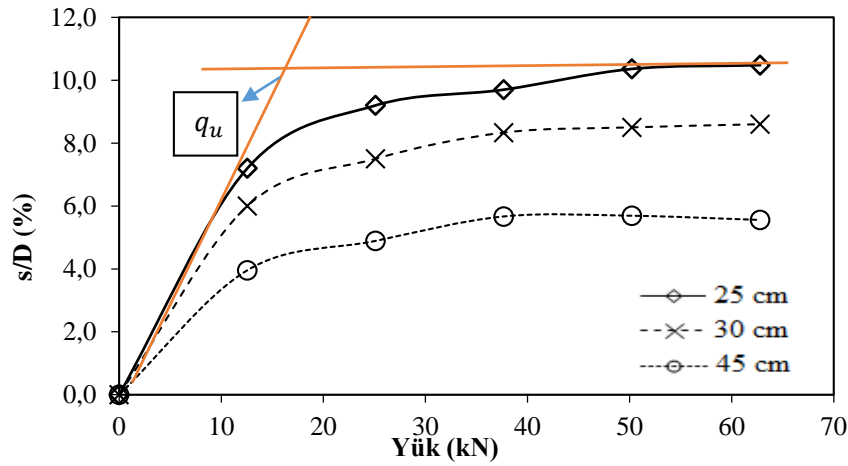
Deneyleerde geohücresinin zemin üst yüzeyinden 50 cm, 60 cm, 70 cm alta konumlandırılması durumunda tespit edilen taşıma gücü değerlerinin üç deneyleerde de 15 kN mertebelerinde olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu değerde meydana gelen oturma miktarları 50 cm için 13.95 mm olarak ölçülürken, 60 cm için 14.5 mm ve 70 cm için 14.85 mm olarak ölçülmüştür. Yapılan deneyleer sonucunda donatının zemin yüzeyinden uzaklığının artmasıyla oturma değerlerinin çok küçük miktarda

arttığı belirlenmiştir. Bundan dolayı temel geometrisinin ve boyutlarının taşıma gücünün üzerindeki etkisini incelemek için yapılan deneylerde donatı derinliği 50 cm olarak seçilmiştir.

Temel geometrisinin ve boyutlarının taşıma gücüne etkisi

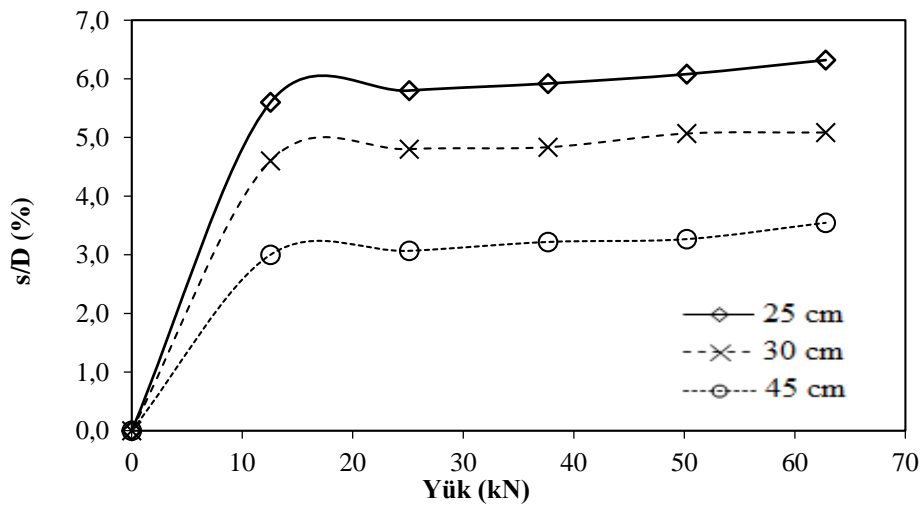
Kare ve daire kesite sahip iki adet temel geometrisi ve her iki temel tipi için de ayrı ayrı olacak şekilde değişken parametre, üç adet farklı ebatlara sahip temel boyutu belirlenmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere 45 cm, 30 cm ve 25 cm çap değerlerine sahip daire kesitli temeller ile aynı kesit alana sahip 40 cm, 26 cm ve 22 cm genişliklerinde kare kesitli temeller belirlenmiştir. Her deneyde zeminin taşıma gücü değerleri donatılı ve donatısız durumlar için incelenmiştir.

Donatısız durumda model temel olarak 25 cm, 30 cm ve 45 cm çapındaki daire kesitli temellerle yapılan ve temel çapının taşıma gücü üzerindeki etkisinin araştırıldığı deneylere ait grafik Şekil 8'de sunulmuştur. Grafiklerde s: geohücre derinliği, D: daire temel çapı B: kare temel kenar ölçüsünü ifade etmektedir.



Şekil 8. Donatısız Durumda Temel Çapının Etkisi

50 cm derinliğe geohücrenin yerleştirildiği bir sonraki deney etabında 25 cm, 30 cm ve 45 cm çaplarındaki daire kesitli temeller kullanılmış ve temel çapının taşıma gücü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Deneylere ait grafik Şekil 9'da sunulmuştur.

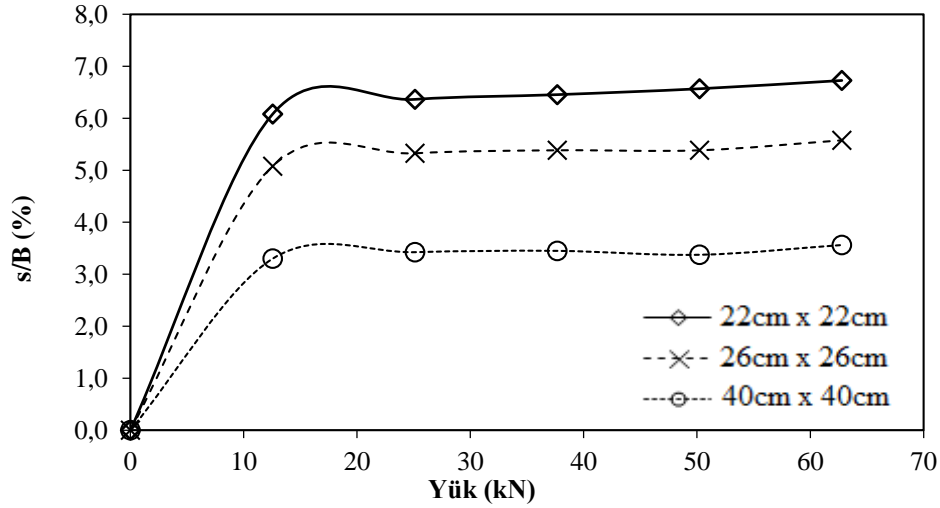


Şekil 9. Donatılı Durumda Temel Çapının Etkisi

Donatısız olarak yapılan deneylerde taşıma gücü değerinin tespit edilmesi için teğet kesiştirme yönteminden yararlanılmıştır (Trautmann ve Kulhawy, 1988). Deneylerde 45 cm çapa sahip model temelde oturma değeri 25,2 mm olarak ölçülürken, 25 cm çapa sahip model temelde 25,5 mm ve 30 cm

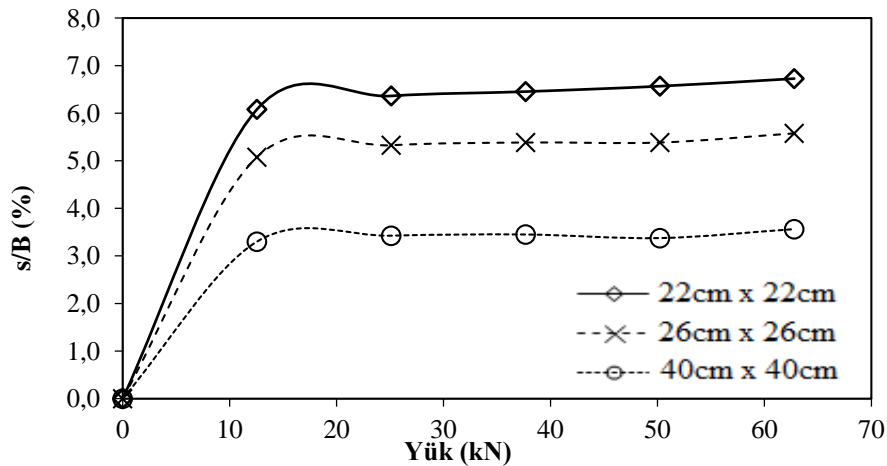
çapa sahip model temelde ise oturma değerleri 25.9 mm olarak ölçülmüştür. Geohücrenin kullanıldığı deneylerde donatı kullanılmayan deneylere göre daha az oturma değerleri ölçülürken bu değerler 25 cm çapa sahip temelde 14.75 mm, 30 cm çaptaki temelde 14.5 mm ve 45 cm çapındaki daire temelde 14.2 mm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar incelendiğinde temel çapı azaldıkça daha fazla oturmaların meydana geldiği görülmüştür.

Donatısız durumda model temel olarak 40cm-26cm ve 22cm kenar uzunluğunda kare temeller kullanılarak yapılan ve temel genişliğinin taşıma gücü üzerindeki etkisinin araştırıldığı deneylere ait grafik Şekil 10'da sunulmuştur.



Şekil 10. Donatısız Durumda Temel Genişliğinin Etkisi

Bir sonraki deney aşamasında 50 cm derinliğe geohücre yerleştirilmiş ve 22 cm, 26 cm ve 40 cm kenar uzunluklarına sahip kare temeller kullanılmıştır. Temel genişliğinin taşıma gücü üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu deneylere ait grafik Şekil 11'de yer almaktadır.

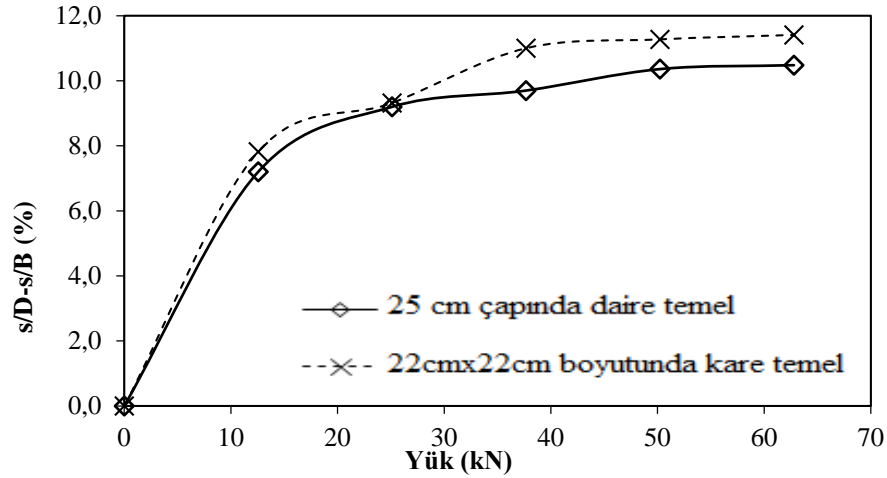


Şekil 11. Donatılı Durumda Temel Genişliğinin Etkisi

Deneylerde 40 cm x 40 cm genişliğindeki kare temelde oturma değeri 18 mm olarak tespit edilirken, 22 cm, 26 cm kenar uzunluğuna sahip model kare temellerde ise oturma değerleri sırasıyla 20.9 mm ve 20,7 mm olarak ölçülmüştür. Geohücrenin kullanıldığı deneylerde ise 40 cm x 40 boyutlarına sahip kare temelde, 22 cm - 22 cm, 26 cm - 26 cm boyutlarındaki kare temellere göre sırasıyla %15.5 ile % 13.9 daha fazla taşıma gücü değerleri elde edilmiştir.

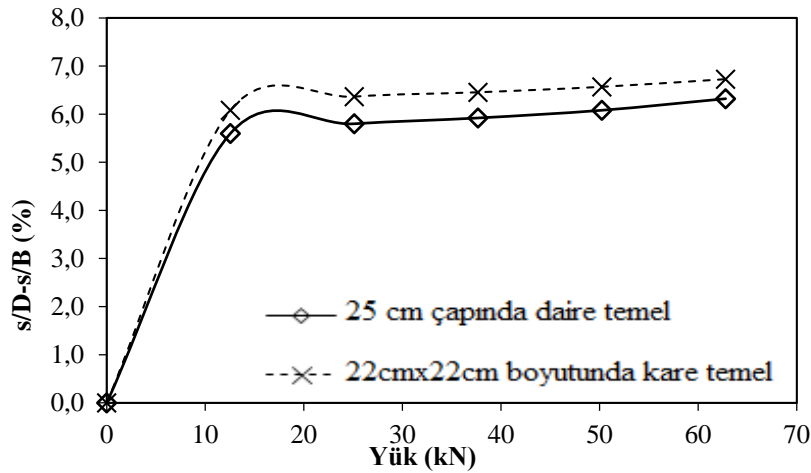
Temel geometrisinin taşıma gücü üzerindeki etkisini incelemek için donatısız durumda 25 cm çapındaki daire temel ile eşit kesit alana sahip 22 cm x 22 cm genişliğindeki kare temel kullanılmıştır.

Aynı yüke maruz bırakılan daire ve kare kesitli model temele ait oturma değerlerine ait grafik Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. Donatısız Durumda Daire ve Kare Temellere Ait Q-s/D-s/B Grafiği

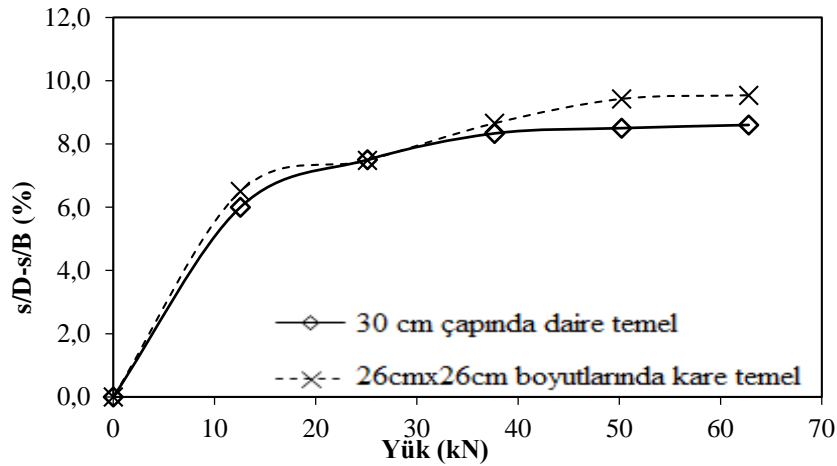
Geohücre donatılı durum için aynı temellerin (daire ve kare kesitli model temel) kullanıldığı deneylerde elde edilen grafik Şekil 13’de sunulmuştur.



Şekil 13. Donatılı Durumda Daire ve Kare Temellere Ait Q-S/D-S/B Grafiği

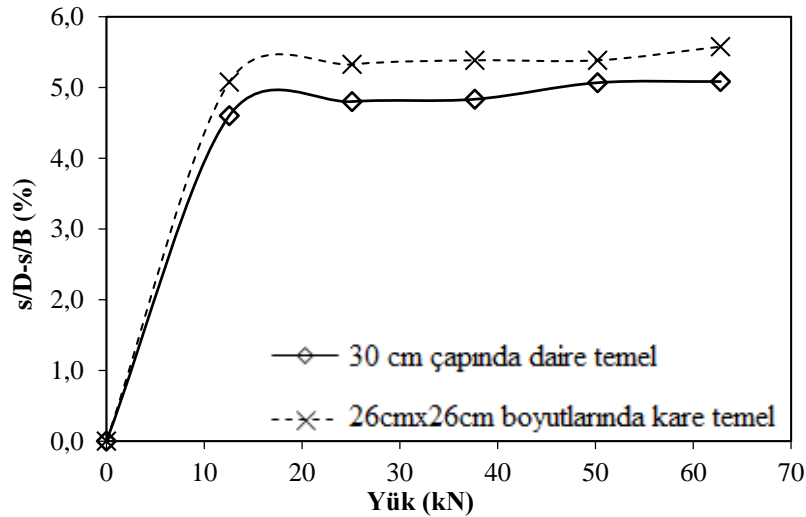
Donatının kullanıldığı ve donatı olmadan gerçekleştirilen deneylerde de kare kesite sahip temel, daire kesite sahip temelden daha az oturma yapmıştır. Donatısız durumda yapılan deneylerde kare ve daire model temellerde meydana gelen oturma değerleri 20,9 mm ile 25,9 mm ölçülürken donatı kullanılarak yapılan deneylerde oturma değerlerinin 14,3 mm ile 14,75 mm mertebelerinde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında donatının kullanılmadığı durum için daire kesite sahip temele kıyasla %19 daha fazla taşıma gücü değeri elde edilen kare temel, donatılı durumda %3 daha iyi taşıma gücü değerine ulaşmıştır.

Temel geometrisinin taşıma gücü üzerindeki etkisini incelemek için donatısız durumda 30 cm çapındaki daire temel ile eşit kesit alana sahip 26 cm x 26 cm genişliğindeki kare temelin aynı yüke maruz kaldıklarında meydana gelen oturma değerlerine ait grafik Şekil 14’de yer almaktadır.



Şekil 14. Donatısız Durumda Daire ve Kare Temellere Ait Q-s/D-s/B Grafiği

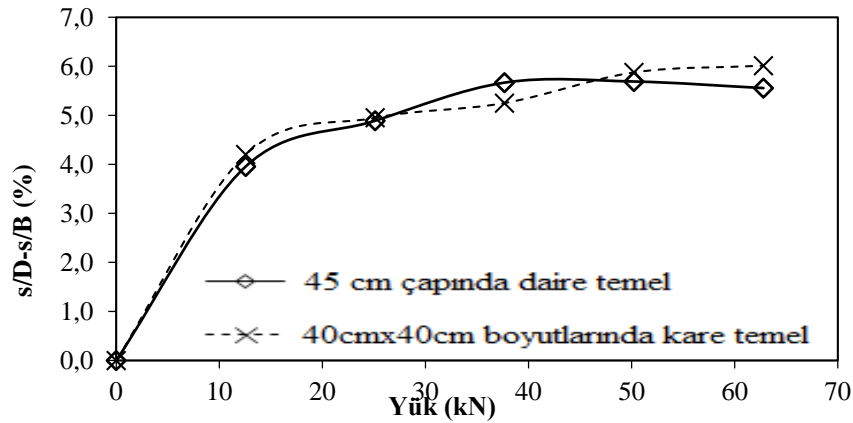
Eşdeğer alana sahip daire ve kare kesitli model temellerin kullanıldığı donatılı deneylerden elde edilen grafik Şekil 15'de sunulmuştur.



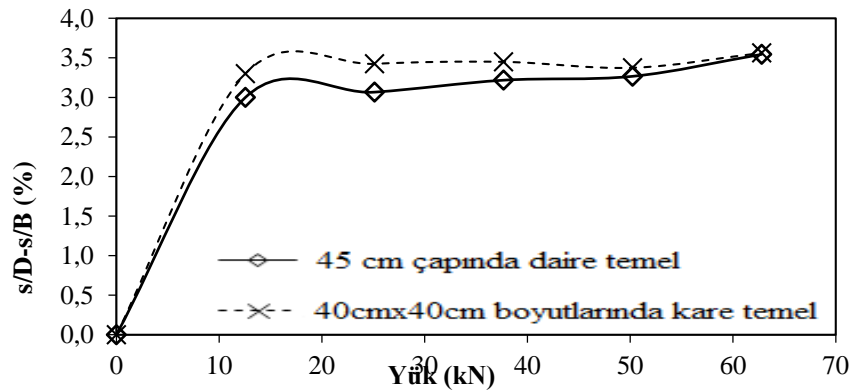
Şekil 15. Donatılı Durumda Daire ve Kare Temellere Ait Q-s/D-s/B Grafiği

Donatının kullanıldığı ve donatı kullanılmadan gerçekleştirilen deneylerde nihai taşıma gücü değerinin yaklaşık 15 kN olarak tespit edilmiştir. Buna göre donatının kullanılmadığı durumda kare temelde meydana gelen oturma değeri, daire temelde meydana gelen oturma değerine göre %18 daha az olurken donatının kullanıldığı deneylerde bu oran %3.2 olarak tespit edilmiştir.

Temel geometrisinin taşıma gücü üzerindeki etkisinin incelemek için donatısız durumda 45 cm çapındaki daire temel ile eşit kesit alana sahip 40 cm x 40 cm genişliğindeki kare temelin aynı yüke maruz kaldıklarında meydana gelen oturma değerlerine ait grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 16). Aynı temellerin kullanıldığı ve donatılı durum için elde edilen grafik ise Şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 16. Donatısız Durumda Daire ve Kare Temeller İçin Q-s/D-s/B Grafiği



Şekil 17. Donatılı Durumda Daire ve Kare Temeller İçin Q-s/D-s/B Grafiği

Donatı kullanılmadan yapılan deneylerde kare kesite sahip temel 18 mm oturma yaparken daire kesitli temel 25.2 mm oturma yapmıştır. Donatı kullanılarak gerçekleştirilen deneyde ise kare kesitli temelde meydana gelen oturma değeri 12.08 mm, daire kesitli temelde meydana gelen oturma miktarı 14.2 mm mertebesinde ölçülmüştür. Bu verilere göre kare temelin her iki durumda da yaklaşık olarak 2.2 mm'ye kadar daha az oturma gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde yük değeri arttıkça temellerin oturma değerleri arasındaki farkların da arttığı belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak uygulanan yük değeri arttıkça temel geometrisindeki değişimin taşıma gücüne etkisinin daha belirgin bir şekilde gözlenebileceği sonucuna varılmıştır. Buna ilaveten temel geometrisindeki değişimin taşıma gücü üzerindeki etkisinin, donatı kullanılmayan durumda donatı kullanılan duruma göre daha belirginleştiği tespit edilmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma kapsamında geohücre ile donatılan zeminlerde i) geohücrenin zemin yüzeyi ile düşey mesafesinin ve ii) üzerine yerleştirilen temelin geometri ve boyutlarının taşıma gücü üzerindeki etkileri araştırıldığı seri deneyler gerçekleştirilmiş ve sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Geohücrelerin zemin yüzeyiyle mesafesinin artmasıyla taşıma gücünün yaklaşık olarak %5 azaldığı görülmüştür. Temel boyutları arttıkça taşıma gücünde artış, oturma miktarında azalma meydana gelmiştir. Farklı geometrilere sahip temellerin altında geohücrenin donatı olarak kullanılması durumunda donatısız durumda geometriden dolayı oluşan farkın azaldığı tespit edilmiştir. Kare kesitli temellerin daire kesitli temellere göre yaklaşık olarak %15 daha az oturma gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir. Donatı kullanılmayan durumda kare kesitli temelin oturma değeri, daire kesitli temele göre %18 daha az tespit edilirken donatı kullanılan durumda bu oranın %3.2 olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen veriler ışığında geohücrenin etkisinden daha fazla yararlanabilmek adına geohücrenin zemin yüzeyinden optimum derinlik belirlenerek yerleştirilmesi taşıma gücü bakımından faydalı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca temel geometrilerinden kaynaklanan deplasman farklarının azaltılmasında geohücre donatı olarak kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

İlgili yazarların verilerin yorumunu etkileyebilecek olası çıkar çatışması yaratabilecek herhangi bir finansal destek veya ilişkisi yoktur.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- ASTM D1505. (1985). The Density of Plastics by the Density-Gradient Technique. Annual Book of ASTM Standards. USA.
- ASTM D1603. (1983). Standard Test Method for Carbon Black Content in Olefin Plastics. Annual Book of ASTM Standards. USA.
- ASTM D1693. (1980). Standard Test Method for Environmental Stress-Cracking of Ethylene Plastics. Annual Book of ASTM Standards. USA.
- EN ISO 10319. (2015). Geosynthetics – Wide-width Tensile Test. Europeane Norm-International Organization for Standardization.
- ENV ISO 13438. (1999). Geotextiles and Geotextile-Related Products-Screening Test Method for Determining the Resistance to Oxidation. Europeane Norm-International Organization for Standardization.
- Han, J., Yang, X., Leshchinsky, D. and Parsons, R. L. (2008). Behavior of geocell-reinforced sand under a vertical load. *Transportation Research Record*, 2045 (1), 95-101.
- Hausmann, M. R. (1990). *Engineering Principles of Ground Modification*. McGraw-Hill.
- Inti, S. and Tandon, V. (2021). Design of geocell reinforced roads through fragility modeling. *Geotextiles and Geomembranes*, 49 (5), 47 (2), 1085-1094.
- Kargar, M. and Hosseini, S. M. (2017). Effect of reinforcement geometry on the performance of a reduced-scale strip footing model supported on geocell reinforced sand. *Scientia Iranica*, 24 (1), 96-109.
- Mehrjardi, G. T. and Motarjemi, F. (2018). Interfacial properties of geocell-reinforced granular soils. *Geotextiles and Geomembranes*, 46 (4), 384-395.
- Mehrjardi, G. T., Behrad, R. and Tafreshi, S. M. (2019). Scale effect on the behavior of geocell-reinforced soil. *Geotextiles and Geomembranes*, 47(2), 154-163.
- Örnek, M. (2009). *Yumuşak kil zeminlerin geogrid donatı ile güçlendirilmesi*. (Doktora tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Tafreshi, S. M., Shaghghi, T., Mehrjardi, G. T., Dawson, A. R. and Ghadrđan, M. (2015). A simplified method for predicting the settlement of circular footings on multilayered geocell-reinforced non-cohesive soils. *Geotextiles and Geomembranes*, 43 (4), 332-344.
- Trautmann, C. H. And Kulhawy, F. H. (1988). Uplift load-displacement behavior of spread foundations. *Journal of Geotechnical Engineering*, 114(2), 168-184.
- TS 1900-1. (2006). İnşaat Mühendisliğinde Zemin Laboratuvar Deneyleri. Teknik Kurul. Türk Standartları Enstitüsü.

- TS EN 17892-4. (2016). Geoteknik Etüt ve Deneyler- Zemin Laboratuvar Deneyleri. Teknik Kurul. Türk Standartları Enstitüsü
- TS EN ISO 17892-4. (2016). İnşaat Mühendisliğinde Zemin Laboratuvar Deneyleri. Teknik Kurul. Türk Standartları Enstitüsü.
- Xianrong, W., Xiedong, Z., Yunsheng, Z. and Xiaowei, L. (2021). Fatigue damage characteristics of geocell-reinforced asphalt mixture. *Construction and Building Materials*, 269, 121252.

Atf İçin: Ali H. M., Karataş F., Özer D. ve Saydam S. (2023). Farklı Ülkelerdeki *Loranthus Europaeus*'un Amino Asit Profili. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2743-2750.

To Cite: Ali H. M., Karataş F., Özer D. & Saydam S. (2023). Amino Acids Profile of *Loranthus Europaeus* from Different Countries. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2743-2750.

Farklı Ülkelerdeki *Loranthus europaeus*'un Amino Asit Profili

Haval Mohammed ALI¹, Fikret KARATAŞ^{2*}, Dursun ÖZER³, Sinan SAYDAM²

Öne Çıkanlar:

- Aminoasit
- Ökse otu
- HPLC

Anahtar Kelimeler:

- *Loranthus europaeus*
- Amino asitler
- Toplam amino asit
- HPLC

ÖZET:

Bu çalışmada, farklı ülkelerde yetişen *Loranthus europaeus* örneklerindeki aminoasit miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile tayin edildi. Esansiyel olmayan aminoasitler bakımından, İran'da yetişen *Loranthus europaeus*, aspartik asit, serin, alanin, pirolin ve tirozin; Irak'ta yetişen, glutamik asit, asparajin, glisin, glutamin; Türkiye'de yetişen örneklerin ise sistein yönünden daha zengin olduğu bulunmuştur. Türkiye'de yetişen *Loranthus europaeus* örneklerinin asparajin, serin, glisin, glutamin, alanine, pirolin ve tirozin; Irakta yetişen aspartik asit, İran'da yetişen ise glutamik asit yönünden fakir oldukları söylenebilir. Toplam esansiyel amino asit açısından en zengin İran iken, en fakir Türkiye'de yetişen *Loranthus europaeus* örneklerinin olduğu belirlenmiştir. Toplam aminoasit miktarı en fazla Irak örneklerinde iken, en düşük olan ise Türkiye örneklerinde bulunmuştur. Esansiyel ve non-esansiyel aminoasit miktarlarının bölgeler arasında değişiklik göstermesi, coğrafi ve ekolojik farklılıklardan kaynaklandığı söylenebilir.

Amino Acids Profile of *Loranthus europaeus* from Different Countries

Highlights:

- *Loranthus europaeus*
- Aminoacids
- HPLC

Keywords:

- *Loranthus europaeus*
- Amino Acids
- Total Amino Acid
- HPLC

ABSTRACT:

In this study, the amounts of amino acids in *Loranthus europaeus* samples grown in different regions (Türkiye, Iran and Iraq) were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results indicate that, aspartic acid, serine, alanine, proline and tyrosine were found to be highest in samples grown in Iran, glutamic acid, asparagine, glycine, and glutamine were found in *Loranthus europaeus* samples grown in Iraq, and cysteine was found to be highest in samples grown in Türkiye. It can be said that *Loranthus europaeus* growing in Turkey is poor in terms of asparagine, serine, glycine, glutamine, alanine, proline and tyrosine, on the other hand aspartic acid found to be lowest in samples from Iraq and glutamic acid is the lowest samples from Iran. It was obtained that while *Loranthus europaeus* samples grown in Iran is the richest in terms of total essential amino acids, on the other hand samples grown in Türkiye is the poorest. Total amino acids content was highest in Iraqi samples and the lowest in Turkish samples. It can be said that the variation of essential and non-essential amino acids contents between regions could be due to geographical, and ecological differences.

¹ Haval Mohammed ALI, ([Orcid ID: 0000-0002-2500-9760](https://orcid.org/0000-0002-2500-9760)), , University of Duhok Chemistry Department, College of Science, Duhok, Iraq

² Fikret KARATAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-0884-027X](https://orcid.org/0000-0002-0884-027X)), ² Sinan SAYDAM, ([Orcid ID: 0000-0003-1531-5454](https://orcid.org/0000-0003-1531-5454)), Fırat University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Elazığ, Türkiye

³ Dursun Özer, ([Orcid ID: 0000-0002-7225-8903](https://orcid.org/0000-0002-7225-8903)), Fırat University, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Elazığ, Türkiye

*Corresponding Author: Fikret KARATAŞ, e-mail: fkaratas@firat.edu.tr

INTRODUCTION

The hemiparasite *Loranthus europaeus* (Loranthaceae), also known as mistletoe, is a plant native to Southeast Europe, Anatolia, Southern Russia, Iran and Iraq (Sharquie et al., 2017; Benabderrahim et al., 2019). Mistletoe, which is semi-parasitic, produces its own carbohydrates by photosynthesis while living in various host trees, but obtains the mineral and water needs necessary for nutrition from its hosts. (Griggs, 1991; Ferenc et al., 2014). Mistletoe composition and biological activities depend on harvest season and host tree species (Wagner et al., 1996). Mistletoe, which slows down or stops the development of host trees and causes them to weaken, which is used as an animal feed because they do not shed their leaves in winter (Öztürk et al., 2020). *Loranthus* has traditionally been used to treat schizophrenia, diabetes, blood clots, and as an immune system enhancer. It is also employed to treat heart illness, epilepsy, infertility, rheumatoid arthritis, oedema, menopausal syndrome, burns, eczema, foot ulcers, swellable injuries, and agglutination. Several scientific studies have revealed that this plant contains bioactive constituents such as rutin, epicatechin, and quercetin (Aidy et al., 2022). Studies have reported that *Loranthus europaeus* contains many substances such as flavonoids, rutin, alkaloids, glycosides, carbohydrates, aldehydes, ketones, protein, polysaccharides, terpenes, phenolic acid, palmitic acid, paraffin and sugar (Harvala et al., 1984; Al-Fartosy and Al-Rikaby, 2007; Sharquie et al., 2016).

It has been reported that amino acids are important in the metabolism of nutrients, cellular growth and development, reproduction and health, and abnormal physiological functions and diseases occur when the intake rate is unbalanced or deficient (Song et al., 2018). It has been reported that liver dysfunction is caused by a change in the ratio of aromatic amino acids to branched-chain amino acids (Lake et al., 2002). It has been reported that different amino acids are used to detoxify ammonia in the blood in liver diseases and in the treatment of heart failure, peptic ulcer and male infertility, while some amino acids serve as intermediate precursors in the production of antibiotics (Stoimenova et al., 2013). Since the amino acid content of food and feed is a measure of its nutritional value, that is an important to determine the amino acid amount in plants (Heems et al., 1998).

According to literature survey, there is not sufficient study was found on the amino acid contents of *Loranthus europaeus*. The main goal of this study is to determine the essential and non-essential amino acid content in the seeds of *Loranthus europaeus* grown in three different regions (Türkiye, İran ve Irak) and compare the results. The results obtained from this work may guide researcher to investigate the way to use *Loranthus europaeus* as source of amino acids.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Loranthus europaeus seeds were purchased from markets in three different countries (Turkey, Iraq and Iran). Experiments were carried out by SHIMADZU HPLC, Prominence-I LC- 2030C 3D Model equipped with PDA detector, Sonicator (Wise Clean, WUC-AO3H, 170 W), Blender (Fakir Hausgrate 220 W). Double distilled (dd H₂O) water was used throughout the work. All the chemical used are reagent or analytical grade and obtained from Merck or Sigma-Aldrich.

Determination of Amino Acid

According to the methods used by Çakmak et al. (2021) samples dried at 80 °C then 1.5 gram taken from the homogenized samples, hydrolysed, derivatized and analysed by HPLC.

Statistical Analysis

All measurements were triplicated and Mean \pm Standard deviation was determined. The results were subjected to one-way ANOVA by SPSS 22.0 for Windows. Differences between the group's means were analyzed for significance using Tukey's HSD (honestly significant difference) test. The level of statistical significance was expressed as $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Amino acids are the building blocks of proteins and intermediates in metabolic pathways that regulate gene expression, immunity and signal transduction. In addition to their physiological regulatory roles, amino acids are closely related to other metabolic networks (Wu, 2010; Kim et al., 2015). Analysis results of the *Loranthus europaeus* samples taken from different regions are given in Table 1, Figures 1 and 2.

Table 1. The amounts of amino acids in the seeds of the *Loranthus europaeus* plant grown in Turkey, Iran and Iraq ($\mu\text{g/g dw}$)

Amino acids	Türkiye	Iran	Irak
Aspartic acid	97.81 \pm 5.27 ^b	271.34 \pm 15.76 ^a	61.67 \pm 6.36 ^c
Glutamic acid	530.79 \pm 12.30 ^a	448.57 \pm 26.19 ^b	561.75 \pm 33.29 ^a
Asparagine	2044.38 \pm 30.83 ^c	2284.67 \pm 73.38 ^b	2965.00 \pm 55.00 ^a
Serine	1.80 \pm 0.26 ^b	3.13 \pm 0.25 ^a	2.07 \pm 0.15 ^b
Glycine	178.06 \pm 13.42 ^c	259.00 \pm 13.53 ^b	289.00 \pm 14.53 ^a
Glutamine	688.11 \pm 32.80 ^c	939.67 \pm 35.50 ^b	1371.33 \pm 73.21 ^a
Alanine	3.90 \pm 0.59	4.97 \pm 0.18	4.31 \pm 0.47
Proline	1.88 \pm 0.20	2.42 \pm 0.28	2.02 \pm 0.26
Tyrosine	291.02 \pm 21.19 ^c	440.67 \pm 27.30 ^a	372.00 \pm 17.09 ^b
Cysteine	36.80 \pm 3.22 ^a	34.50 \pm 4.43 ^a	19.80 \pm 4.85 ^b
Histidine*	465.39 \pm 50.21	404.33 \pm 26.39	391.67 \pm 27.54
Arginine	94.25 \pm 7.03 ^a	86.33 \pm 7.51 ^a	41.00 \pm 5.57 ^b
Threonine*	32.29 \pm 4.52 ^a	13.33 \pm 2.52 ^c	21.00 \pm 2.65 ^b
Valine*	9.57 \pm 0.85 ^a	9.57 \pm 0.65 ^a	7.37 \pm 0.71 ^b
Methionine*	382.33 \pm 17.38 ^c	677.33 \pm 41.97 ^a	554.67 \pm 22.48 ^b
Leucine*	86.67 \pm 3.58 ^c	169.67 \pm 3.06 ^a	128.33 \pm 6.11 ^b
Isoleucine *	41.17 \pm 2.75 ^c	87.33 \pm 4.04 ^a	68.33 \pm 2.52 ^b
Phenylalanine *	374.47 \pm 19.62 ^c	540.33 \pm 37.29 ^a	421.67 \pm 17.56 ^b
Tryptophan*	207.93 \pm 24.91	208.33 \pm 13.58	233.33 \pm 15.28
Lysine*	51.08 \pm 5.63 ^b	41.67 \pm 6.51 ^b	83.00 \pm 7.55 ^a
TE	1745.16 \pm 90.58 ^c	2238.23 \pm 55.51 ^a	1950.37 \pm 7.27 ^b
TNE	3874.57 \pm 64.96 ^c	4688.93 \pm 108.35 ^b	5648.95 \pm 42.41 ^a
TA	5619.73 \pm 110.81 ^c	6927.16 \pm 154.16 ^b	7599.32 \pm 313.16 ^a
TE/TNE%	45	48	35
TE/TA%	31	32	26

Note: *: Essential amino acid, TE: Total essential amino acid, TNE: Total non-essential amino acid, TA: Total amino acid, Statistical difference indicated in table with the different letter the highest average value's expressed with the letter "a" and the lowest value's with the letter "c" in addition the same letter indicates no statistical difference. There are significant differences at the $p < 0.05$ level between the values indicated with different letters on the same line. There is no significant difference at the $p > 0.05$ level between values without lettering in the same line.

Aspartic acid plays a role in the tricarboxylic acid cycle, defence systems, and the production of signal amino acids (Sanchez et al., 1998). Glutamic acid, which is important for proline biosynthesis, is effective in the carbon and nitrogen cycle in metabolism (Forde and Lea, 2007). The highest aspartic acid and glutamic acid were observed in the samples grown in Iran and Iraq region, respectively while the lowest amount was found in Iraq and Iran (Table 1 and Figure 1).

Asparagine, which is an important in regulating the glucose balance in the cell, provides nitrogen accumulation (Haroun et al., 2010). While asparagine was found highest in the *Loranthus europaeus* grown in Iraq region, the lowest was the samples from Türkiye ($p < 0.05$).

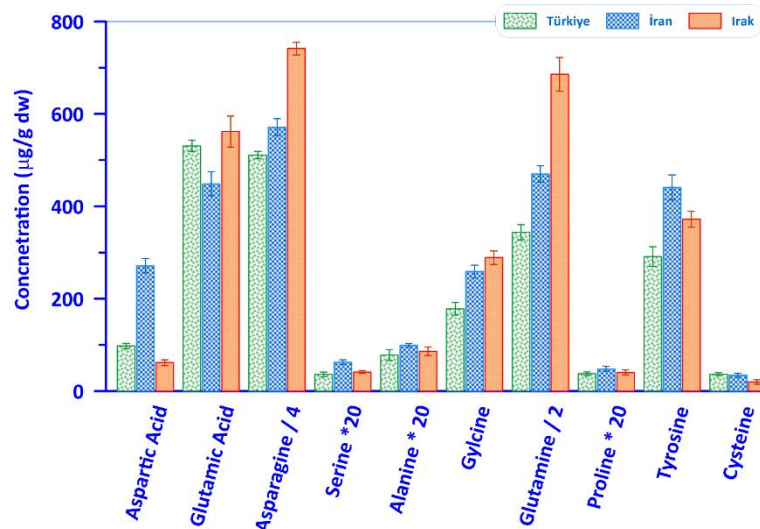


Figure 1. Non-essential amino acid amounts in *Loranthus europaeus* samples from different regions (asparagine value divided by 4, glutamine value divided by 2, serine, alanine, proline values multiplied by 20)

Serine has a fundamental role in signalling, while glycine is effective in reducing the effect of oxygen-dependent free radicals (Ros et al., 2014). The highest amount of glycine and serine were observed in the samples grown in Iran and Iraq, respectively.

While glutamine regulates nitrogen metabolism in the cell (Miflin and Habash, 2002), alanine plays a role in the regulation of the defence system and intracellular pH (Kalefetoğlu and Ekmekçi, 2005). The lowest glutamine and alanine were found in samples grown in Turkey (Table 1 and Figure 1).

Bakar et al. (2021) reported that the amount of serine in white myrtle fruit (2.75 mg/g dw) and glutamic acid (1.8 mg/g dw) in black myrtle fruit. Proline, which involves in protein synthesis and structure, has an important role in wound healing, antioxidant reactions and immune responses in addition to metabolism and nutrition (Wu et al., 2011). The difference between the proline content of *Loranthus europaeus* grown in all three regions is statistically insignificant when compared with each other ($p > 0.05$). Duan et al. (2020) found the amounts of aspartic acid, glutamic acid, proline, serine and glycine in licorice 0.56, 0.37, 6.38, 4.86 and 0.14 mg/kg, respectively.

Tyrosine is required for the synthesis of a variety of natural compounds in plants, such as tocopherols, ubiquinone, betalains, and benzyloisoquinoline alkaloids. Tyrosine-derived metabolites, tocopherols and ubiquinone are important for plant survival (Xu et al., 2019). Cysteine is very important in supporting protein folding and stability by forming disulfide bonds with other cysteine molecules. Cysteine is a precursor molecule for the synthesis of glutathione, which plays an important role in the response of plants to stress (Mendoza-Cozatl et al., 2010). The highest tyrosine was observed in the sample grown in Iran, while the lowest was observed in the sample grown in Türkiye ($p < 0.05$). The lowest cysteine was observed in the sample grown in Iraq ($p < 0.05$), the difference between the samples from Türkiye and Iran was statistically insignificant ($p > 0.05$).

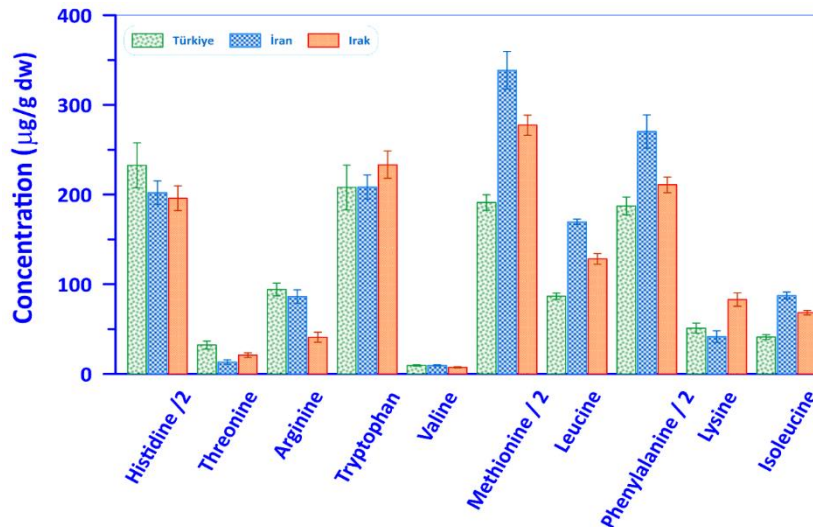


Figure 2. Essential amino acid amounts in *Loranthus europaeus* samples from different regions (Histidine, methionine and phenylalanine values divided by 2)

Histidine is necessary for the formation of red blood cells and the myelin sheath, arginine is an important for growth hormone synthesis and strengthening the immune system (Lee and Kim, 2019). The difference between the amount of histidine in the samples grown in Türkiye, Iraq and Iran was found to be statistically insignificant ($p > 0.05$). Arginine content of the sample grown in the Iraq region is the lowest and Türkiye region is the highest, on the other hand the difference between samples from Iran and Türkiye regions were insignificant ($p > 0.05$). Mukhtar et al. (2022) found the amounts of glycine, asparagine, glutamine, histidine and arginine in bitter tomato eggplant grown in Nigeria 4.58, 5.36, 1.22, 8.40 and 0.09 mg/g dw, respectively.

Threonine, which is an important in fat metabolism and immune system, is also found in the structure of proteins such as collagen and elastin (Olgun et al., 2016). While the highest amount of threonine was observed in the sample grown in Türkiye, the lowest amount was determined in the sample grown in Iran, and the difference between regions was significant ($p < 0.05$).

Proteins rich in proline, glycine, leucine and methionine play an important role in cell wall growth, while leucine, isoleucine and valine have been reported to protect the cell against osmotic stress (Zemanova et al., 2017). Phenylalanine, tyrosine and tryptophan are aromatic amino acids derived from the shikimate pathway and are required for protein synthesis and production of aromatic secondary metabolites, e.g. anthocyanin. It is stated that tryptophan, which is important in cell development, is the precursor of neurotransmitter biomolecules (Zemanova et al., 2017). The lowest valine was found in the *Loranthus europaeus* sample grown in Iraq, the highest values found in the samples from Iran and Türkiye regions. While the highest amount of methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine was observed in samples grown in Iran region, the lowest was determined in samples grown in Türkiye, and the difference between regions is statistically significant ($p < 0.05$) (Table 1 and Figure 2). Mukhtar et al. (2022) found the amounts of methionine, tryptophan, lysine, cysteine and tyrosine in the dark eggplant sample grown in Turkey 3.71, 1.0, 6.80, 1.88 and 1.02 mg/g dw, respectively.

In the parsley leaf, alanine, proline, leucine, isoleucine, valine and threonine were found to be 2.79, 0.80, 0.35, 0.22, 0.79 and 0.79 g/kg, respectively (Duan et al., 2020). The difference between tryptophan content in samples grown in all three regions is insignificant ($p > 0.05$). Lysine has a role in metabolism, such as producing glutamic acid and increasing resistance to stress (Azevedo and Lea, 2001). While the highest amount of lysine is found in the sample grown in the Iraq region ($p < 0.05$), the difference between other regions is statistically insignificant ($p > 0.05$). While total essential amino acid amounts 1745.16,

1950.37 and 2238.23 were found in *Loranthus europaeus* samples grown in Turkey, Iraq and Iran, the total amino acid values 5619.73, 7599.32 and 6927.16 $\mu\text{g/g}$ dw were found respectively. The difference between the values of the three regions were significant ($p < 0.05$) (Table 1).

Mukhtar et al. (2022) reported that the total amount of essential amino acids in five different eggplant samples ranged from 19.31 to 27.21 mg/g dw. Sadiq et al. (2013) found the amount of essential amino acids in the pulp and seed of the date palm (*Phoenix dactylifera*), respectively 12.78 and 7.11 g/100 g dw, while the total amino acid amount 28.22 and 15.28 g/100 g dw were reported.

The total amount of essential and non-essential amino acids in *Nitraria tangutorum* Bobr were 44.39 and 65.65 mg/g dw, respectively, and it has been reported that TE/TA, TE/TNE ratios should be over 40% and 60%, respectively, in a good protein source (Zhou et al. 2019).

As seen in Table 1, TE/TNE ratio in *Loranthus europaeus* samples were between 35-48%, while TE/TA values were between 26 and 32%. From these results, it can be said that the essential amino acid ratios are lower than the recommended amount in all samples studied (Table 1).

CONCLUSION

In terms of non-essential amino acids, it can be said that the samples grown in Iran and Iraq are richer than Türkiye. It can be said that the *Loranthus europaeus* samples grown in Türkiye is rather poor in terms of asparagine, serine, glycine, glutamine, alanine, proline and tyrosine amino acids compared to other regions. *Loranthus europaeus* grown in Iran is rich in aspartic acid, serine, alanine, proline and tyrosine, while the samples grown in Iraq is richer in glutamic acid, asparagine, glycine and glutamine than the other regions.

It can be said that *Loranthus europaeus*, which grows in the Iran region, is richer in total essential amino acids compared to other regions.

The difference between the regions in terms of total amino acid, essential amino acid and non-essential amino acid was statistically significant ($p < 0.05$) when compared with each other.

Loranthus europaeus is thought to have the potential to be used in important sectors such as pharmaceuticals and food additives in terms of essential amino acids such as histidine, tryptophane, methionine and phenylalanine.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Aidy A, Bahmani M, Pirhadi M, Kaviar VH, Karimi E, Abbasi N. 2022. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Effect of Essential Oil and Extract of *Loranthus europaeus* Jacq. on *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 28(2): 161–167.
- Al-Fartosy AJM, Al-Rikaby AKJ. 2007. Antioxidant Action of Monoterpene from *Loranthus europaeus* L. Seeds. *Al Basra Journal for Agricultural Science* 20: 322-336.
- Azevedo RA, Lea PJ. 2001. Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids* 20(3): 261-279.
- Bakar B, Çakmak M, Ibrahim MS, Özer D, Saydam S, Karatas F. 2021. Investigation of Amounts of vitamins, lycopene, and elements in the fruits of *Opuntia ficus-indica* subjected to different pretreatments. *Biological Trace Element Research* 198(1): 315-323.

- Benabderrahim MA, Elfalleh W, Sarikurkcu C, Sarikurkcu RB. 2019. Biological activities and phytochemical composition of organs from *Loranthus europaeus*,” *Ind. Crops Prod.*, 141: 111772.
- Çakmak M, Özer D, Karataş F, Saydam S. 2021. Combine Effect of Vitamin C and venlafaxine on the Amino Acid Content of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Sciences* 9(6): 137-153.
- Duan W, Huang Y, Xiao J, Zhang Y, Tang Y. 2020. Determination of free amino acids, organic acids, and nucleotides in 29 elegant spices. *Food Science Nutrition* 8(7): 3777–3792.
- Ferenc L, Stefan M, Arben M, Hyssen S. 2014. Handbook of the major forest pests in Southeast Europe, Pristina, pp.71.
- Forde BG, Lea JF, 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany* 58(9): 2339-2358.
- Griggs P. 1991. Mistletoe, myth, magic and medicine. *The Biochemist* 13: 3–4
- Haroun SA, Shukry WM, El-Sawy O. 2010. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under in vitro conditions. *Bioscience Research* 7(1): 1-21.
- Harvala E, Exner J, Becker, H. 1984. Flavonoids of *Loranthus europaeus*. *Journal of Natural Products*, 47, 1054-1055.
- Heems D, Luck G, Fraudeau C, Vérette E. 1998. Fully automated precolumn derivatization, on-line dialysis and high- performance liquid chromatographic analysis of amino acids in food, beverages and feedstuff,” *J. Chromatogr. A*, 798(1–2): 9–17.
- Kalefetoğlu T, Ekmekçi Y. 2005. Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri ve dayanıklılık. *G.U. G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 18(4): 723-740.
- Kim HJ, Jang SH, Ryu JS, Lee JE, Kim YC, Lee MK, Jang TW, Lee SY, Nakamura H, Nishikata N, Mori M, Noguchi Y, Miyano H, Lee KY. 2015. The performance of a novel amino acid multivariate index for detecting lung cancer: A case control study in Korea. *Lung Cancer* 90: 522–527.
- Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson DG, Reily MD, Lehman-McKeeman LD, Vaillancourt RR, Cherrington NJ. 2002. Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids* 47(3): 603–615.
- Lee DY, Kim EH. 2019. Therapeutic Effects of Amino Acids in Liver Diseases: Current Studies and Future Perspectives. *Journal of Cancer Prevention* 24(2): 72-78.
- Mendoza-Cozatl DG, Zhai Z, Jobe TO, Akmakjian GZ, Song WY, Limbo O, Russell MR, Kozlovskyy VI, Martinoia E, Vatamaniuk OK, Russell P, Schroeder JI. 2010. Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 285: 40416-40426.
- Mifflin BJ, Habash DZ. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* 53(370): 979- 987.
- Mukhtar ZG, Özer D, Karataş F, Saydam S. 2022. Amino Acid Contents of Some Eggplant Species Grown in Different Region. *Journal of the Institute of Science and Technology* 12(2): 857-869.
- Olgun M, Budak Başçiftçi Z, Ayter G, Turan M, Aydın D, Şaban D, Sönmez AC, Koyuncu O. 2016. Potasyum İyodür Uygulamasının Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(2), 46-60.
- Öztürk YE, Gülümser E, Mut H, Çopur Doğrusöz M, Başaran U. 2020. Ökse Otu (*Viscum album L.*)’nun Yem Kalitesinin Belirlenmesi *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi* 7(2): 201-206. doi: 10.19159/tutad.731121.

- Ros R, Bertomeu JM, Krueger S. 2014. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science* 19(9): 564-569.
- Sadiq IS, Izuagie T, Shuaibu M, Dogoyaro AI, Garba A, Abubakar S. 2013. The Nutritional Evaluation and Medicinal Value of Date Palm (*Phoenix dactylifera*). *International Journal of Modern Chemistry* 4(3): 147-154.
- Sanchez FJ, Manzanares M, de Andres, EF, Tenorio JL, Ayerbe L. 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research* 59(3): 225-235.
- Sharquie KE, Noaimi AA, Saleh BA. 2016. *Loranthus europaeus* as an Alternative Medicine in Treatment of Acute Cutaneous Leishmaniasis: Review Article. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 6: 24-33.
- Sharquie KE, Noaimi AA, Saleh BM, Sharara ZA, Al-Salam WS. 2017. Topical 40% <i>Loranthus europaeus</i> Ointment as an Alternative Medicine in the Treatment of Acute Cutaneous Leishmaniasis versus Topical 25% Podophyllin Solution. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 7(2): 148–163.
- Song Y, Xu C, Kuroki H, Liao YY, Tsunoda M. 2018. Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147: 35–49.
- Stoimenova A, Ivanov K, Obreshkova D, Saso L. 2013. Biotechnology in the production of pharmaceutical industry ingredients: Amino acids. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 27(2): 3620–3626.
- Wagner ML, Fernandez T, Alvarez E, Ricco RA, Hajos S, Gurni AA. 1996. Micromolecular and macromolecular comparison of Argentina mistletoe (*Ligaria cuneifolia*) and European mistletoe (*Viscum album* L.). *Acta Farmaceutica Bonaerense* 15(2): 99–108.
- Wu G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition* 1: 31-37.
- Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Kim SW, Knabe DA, Li P, Li X, Mc Knight JR, Satterfield MC, Spencer TE. 2011. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. 40(4): 1053–1063.
- Xu JJ, Fang X, Li CY, Yang L, Chen XY. 2020. General and specialized tyrosine metabolism pathways in plants. *aBIOTECH* 1:97-105.
- Zemanova V, Pavlik M, Pavlikova D. 2017. Cadmium toxicity induced contrasting patterns of concentrations of free sarcosine, specific amino acids and selected microelements in two *Noccea* species. *Plos One* 12(5): 1-17.
- Zhou W, Wang Y, Yang F, Dong Q, Wang H, Hu N. 2019. Rapid Determination of Amino Acids of *Nitraria tangutorum* Bobr. from the Qinghai-Tibet Plateau Using HPLC-FLD-MS/MS and a Highly Selective and Sensitive Pre-Column Derivatization Method. *Molecules* 24: 1665.

Atf İçin: Gürbüz, D, Önal, Y. ve Utku T. (2023). Kinetic investigation of the effect of sulfur on extending the shelf life of sulfurized apricots. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2751-2768.

To Cite: Gürbüz, D, Önal, Y & Utku T. (2023). Kinetic investigation of the effect of sulfur on extending the shelf life of sulfurized apricots. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2751-2768.

Kinetic investigation of the effect of sulfur on extending the shelf life of sulfurized apricots

Duygu GÜRBÜZ¹, Yunus ÖNAL^{1*}, Tuğba UTKU²

Öne Çıkanlar:

- Kayısı
- Raf ömrü
- Ambalaj

Anahtar Kelimeler:

- Kükürtlenmiş kayısı
- Yarı ömür
- Kinetik
- Kükürt dioksit

ÖZET:

Bu çalışmada Malatya ilindeki fabrikadan temizlenmiş farklı kükürt değerlerine sahip kükürtlenmiş kayısı alınmıştır. Bu kayısı numuneleri satışa sunulan ambalaj içerisinde market ortamındaki sıcaklık değerlerinde (4, 26 ve 40°C sıcaklık) muhafaza edilerek kükürt dioksit değerleri günlük olarak tayin edilmiştir. Deneysel süreler sonucunda numundeki kükürt dioksitin hesaplanarak azalma hızı ve diğer veriler hesaplanmıştır. Kükürt dioksitin farklı sıcaklıklarda zamanla değişiminden kayıp hızı ve kinetiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan kükürtlü kayısının ambalaj içerisinde farklı sıcaklıklarda raf ömrü, bozulma, kükürt dioksit değerinin raf ömrü üzerine etkisi gibi önemli sonuçlar elde edilmiştir. Farklı oranlarda kükürt içeren kayısının analiz sonuçlarına göre kinetik çalışmada kuru kayısı örneklerinde, rafta kalma süresince meydana gelen; nem ve SO₂ kaybı incelendiğinde 4°C için birinci derece kinetik modele uygun, 26 ve 40°C için de ikinci mertebe kinetik modele uygun olduğu belirlenmiştir. Deneysel sonuçlardan 4°C sıcaklıkta 980 saat süre sonunda, 26°C sıcaklıkta 525 saat süre sonunda satışa sunulan örneklerin kükürt uzaklaşma değerleri oldukça düşük elde edilmiştir. 40°C sıcaklık değerinde yaklaşık 740 saat süre sonunda nem ve SO₂ kayıpları hızlanmıştır. 4°C sıcaklıkta rafta bekleme süresince 3280 ppm düzeyinde kükürt dioksit içeren örnekte 980 saat süre sonunda % 11 oranında kükürt dioksit kaybı olmuştur. Aynı numunelerde 40°C sıcaklıkta 740 saat süre sonunda % 46 oranında kükürt dioksit kaybı belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda kükürt dioksit kaybının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Örneklerin nem açısından saklama koşulları incelendiğinde 4 ve 40°C sıcaklıklarda 29 gün sonunda kayısı nemini %52-85 aralığında kaybetmektedir. Satışa sunulan ambalajlı kükürtlenmiş kuru kayısının su aktivitesinin %25 olduğu temel alındığında yapılan bu çalışmada bu değere göre yaklaşık ortalama 25 gün raf ömrü saptanmıştır.

Kinetic investigation of the effect of sulfur on extending the shelf life of sulfurized apricots

Highlights:

- Apricot
- Shelf life
- Packaging

Keywords:

- Sulphurous apricots,
- Half life,
- Kinetic,
- Sulfur dioxide

ABSTRACT:

In this study, sulphurized apricots with different sulfur values were obtained from the factory in Malatya province. These apricot samples were kept at market temperature values (4, 26 and 40°C) in the package offered for sale, and their sulfur dioxide values were determined daily. As a result of the experimental periods, reduction rate and other data were determined by calculating the sulfur dioxide in the sample. Also, loss rate and kinetics of sulfur dioxide were determined from its change over time at different temperatures. From the results obtained, important findings such as shelf life of sulphurous apricots at different temperatures in the package, deterioration and effect of the sulfur dioxide value on the shelf life were obtained. According to the analysis results of apricots containing different amounts of sulfur, when the moisture and SO₂ loss in dried apricot samples during their stay on the shelf were examined in the kinetic study, it was determined that it was suitable for the first order kinetic model for 4°C and the second order kinetic model for 26 and 40°C. From the experimental results, quite low sulfur removal values were obtained for the samples offered for sale after 980 hours at 4°C and 525 hours at 26°C. Moisture and SO₂ losses accelerated after approximately 740 hours at a temperature of 40°C. In the sample containing 3280 ppm sulfur dioxide during shelf storage at 4°C, there was an 11% loss of sulfur dioxide after 980 hours. A 46% sulfur dioxide loss was determined in the same samples after 740 hours at 40°C. It has been determined that sulfur dioxide loss is greater at higher temperatures. When the storage conditions of the samples were examined in terms of humidity, it was observed that apricots lost their moisture in the range of 52-85% after 29 days at temperatures of 4 and 40 °C. Based on the fact that the water activity of the packaged sulfurized dried apricots offered for sale is 25%, in this study, an average shelf life of approximately 25 days was determined according to this value.

¹ Duygu GÜRBÜZ ([Orcid ID: 0000-0002-2852-0505](https://orcid.org/0000-0002-2852-0505)), Yunus Önal ([Orcid ID: 0000-0001-6342-6816](https://orcid.org/0000-0001-6342-6816)), İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye

² Tuğba UTKU ([Orcid ID: 0000-0001-7034-2725](https://orcid.org/0000-0001-7034-2725)), İnönü Üniversitesi Merkez Araştırma Lab. IBTAM Müdürlüğü Malatya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yunus ÖNAL, e-mail: yunus.onal@inonu.edu.tr

Bu çalışma Duygu Gürbüz'ün Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

INTRODUCTION

Due to the recent increase in the importance given by developed countries to the agricultural sector, it has led to the development of policies based on the progress of the sector. In the field of agriculture, great efforts are being made in cooperation with the private sector, state sector, universities and other institutions to ensure sustainability and increase productivity in agriculture. When the Common Agricultural Policy implemented by the European Union countries is taken into consideration in this sense, the importance and extent of the work carried out for the development of the sector can be understood. In accordance with the Common Agricultural Policy, the EU spends approximately 40% of its budget (55 billion €) on the agricultural sector every year (Davis, 1972; Davis et al 1975; Davis et al 1973).

Increasing interest in the agricultural sector of countries that can be considered superior to Turkey with their institutional structures and technologies is a situation that should be followed. (Stern et al., 2007). Turkey, like other countries, must quickly adapt to the changing developments and trends in the world and increase its competitiveness.

Agricultural sector has an important place in the Turkish economy. With its geographical location, natural riches and climate, Turkey has suitable conditions for growing many agricultural products. Turkey does not have the place it should be in agriculture due to inadequate policies, technology, research and development activities, and education (Budak and Şan, 2017).

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) is in the *Prunus* genus of the Rosaceae family. Apricot, which we can say is a temperate climate fruit, generally grows in places where the vineyard climate prevails in Turkey. However, some varieties and types also grow in subtropical climate conditions. Because it is damaged by excess moisture, it does not grow in many regions of the Black Sea Region (Kocaeli, Zonguldak, Bolu, Ordu, Trabzon and Rize) and in the high plateaus of Eastern Anatolia where severe winter cold is effective (Özçağiran et al., 2004).

Considering that Turkey is the leader in the apricot sector in world production, it should closely follow the developments in the sector and focus on it. With their quality and taste, the apricot varieties grown in Malatya are the most admired apricots in the world. Exporting products as raw materials in the sector and processing these products in foreign countries causes the mistake of increasing their added value (Karaçalı, 2006; Asma et al., 2000). Processing apricots and obtaining added value from the product in this way will be beneficial for producers, industrialists, and Turkey.

Golden yellow dried apricot color has a significant impact on consumer demand. During drying and storage, apricots lose their characteristic golden yellow color due to browning reactions. Nowadays, apricots are sulfurized before drying to prevent both enzymatic and non-enzymatic browning reactions. The sulfurization process, which is an important stage of dried apricot production, is carried out by farmers who do not have the knowledge and sufficient resources. This situation causes excessive sulfuration of the produced apricots and negatively affects our dried apricot exports. Thus, it cannot provide sufficient income, especially for our farmers and then for our country's economy (Salurcan, 2018; Korbel et al 2013; Wedzicha, 1984; WHO Food Additives Series 2008).

The fruits harvested in the sulphurization process with traditional methods are placed on the drying boards (kerevet). Apricots placed on the drying boards are placed in the sulphuring chambers. In one corner of the room, a furnace with powdered sulfur is lit (2 kg of powdered sulfur for 1 ton of fresh apricots) and the door of the room is tightly closed. In order for the fruits to absorb the sulfur gas thoroughly, they are kept in the heating chamber for 6-8 hours. Afterwards, the fruits are taken out of

the warming room and placed in a single row on a cloth in a sunny area and left to dry (Sobutay, 2003; Freedman, 1980).

Aim of the research is to kinetically examine change in sulfur values of sulfurized apricots, which are offered for sale on the shelves, specific to Malatya province, during their stay on the shelves. Malatya apricot is important for the reasons mentioned. Every study and research on apricot is needed. Our aim is to make a small contribution to the apricot industry with the research carried out. The aim of the research is to analyze the enterprises that produce apricots in Malatya province and to reflect it to the whole province of Malatya, and therefore to the Turkish apricot sector

MATERIALS AND METHODS

In the study, 2000, 3000, 4000, 5000 ppm sulphurous apricots and sun dried apricot samples from Çöloğlu, Hacıhaliloğlu, Kabaası and Karacabey were purchased from the apricot processing factory through BAP. In this study, H₂O₂ (Sigma-Aldrich 7722-84-1), NaOH (Sigma-Aldrich 1310-73-2), HCl (Sigma-Aldrich 7647-01-0), C₁₉H₁₀Br₄O₅S (Sigma-Aldrich 115-39-9) were used as chemicals in the analysis processes. Samples were weighed using Denver Instrument and Precisa 3100 C Balance. In addition, Nüve PN500 oven was used for drying processes and Moulinex HV6 Meat Grinder was used for grinding processes.

Sulfur analysis method in apricot

In this study, Çöloğlu, Hacıhaliloğlu, Kabaası and Karacabey apricot samples in the packaging at the final sales point were taken from the sales point and some of them were sulfurized and some were used without sulfurization. The sulfurization method of apricots was performed as the 'traditional sulfuration method'.

Sulfur dioxide determinations were carried out in the laboratory at temperature conditions of 4, 26 and 40°C, taking into account features such as apricots, packaging material, temperature and light properties. Analyzes were terminated when the sulfur dioxide value became constant.

In the study, distillation method introduced by Monier Williams (1927), standardized by TSE, and modified by Reith and Willems in 1958, was used to determine sulfur (Gökçe 1966). First of all, ready-to-pack apricot samples containing 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm sulfur and sun dried apricots were purchased from the factory through BAP. Apricots were weighed into half-kilo polystyrene containers, which is the most commonly used packaging at sales points, and covered with (PET) stretch film, which is used in food packaging. Apricots were stored at temperatures of 4, 26 and 40°C. Appropriate amounts of samples were taken from the packaging at certain time intervals and prepared for analysis. First of all, the apricots were milled, 5 g of sample was weighed and the experimental setup was prepared before the distillation process. Then, 150 ml of distilled water was placed in a 1 L distillation flask and N₂ gas was sent to the system for 15 minutes, producing 30 bubbles per minute. In this way, oxygen that causes the oxidation of SO₂ to sulfate (SO₄)⁻² was removed from the medium. Then, 130 ml of distilled water, the weighed apricot sample and 40 ml of 15% HCl solution were added to the distillation flask. 10 ml of 3% H₂O₂ was added to the distillate collection flask. The relevant mixture was boiled in the heater for approximately 90 minutes (Figure 1) Sulfur dioxide (SO₂) in dried apricots was liberated with hydrochloric acid (HCl) and distilled in an inert gas atmosphere of nitrogen (N₂). Then, the distillate was converted to sulfuric acid with hydrogen peroxide (H₂O₂) in the collection flask. Amount of SO₂ in apricots was calculated from the amount of base consumed by titrating the acid formed with adjusted NaOH solution. Therefore, the international standard method was used in sulfur dioxide analysis. Also, weighings were performed on analytical precision balances available in our laboratory and, the samples

were analyzed by keeping them in a temperature-controlled oven in the laboratory. Distilled water was used in the all experiments.



Figure 1. Sulfur analysis mechanism

Drying method in an oven

In this section, apricot types that contain and do not contain sulfur in certain proportions were used. Apricot samples arranged in Petri dishes were weighed more frequently at the first time intervals and then expanded at later time intervals. Then, moisture content was noted. The process continued until the moisture content in the apricots was constant.

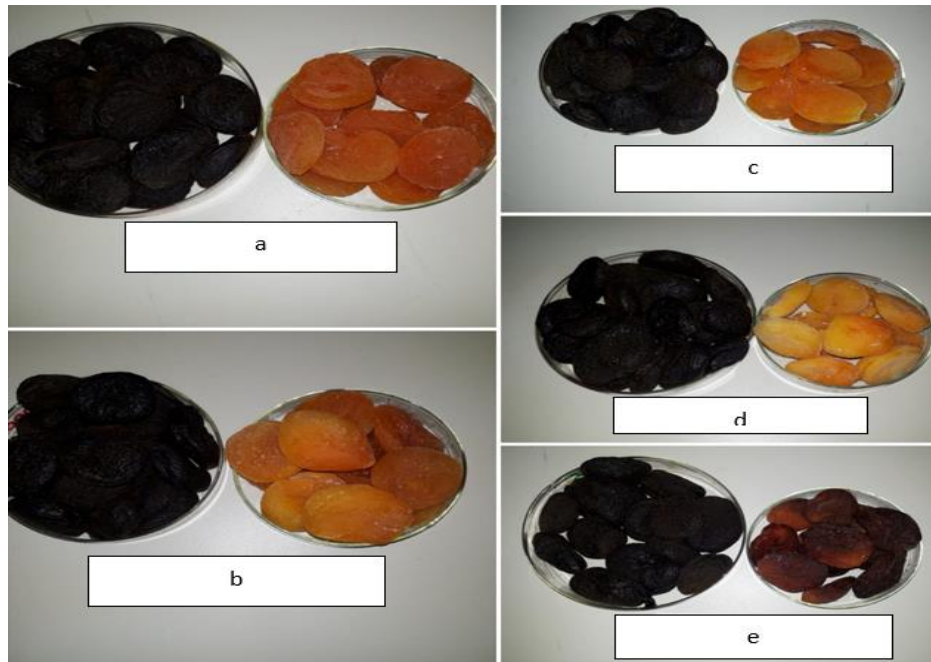


Figure 2. Before and after drying in the oven of (a) 2000 ppm, (b) 3000 ppm, (c) 4000 ppm, (d) 5000 ppm, (e) Sun Dried (Gün Kuru)

As can be seen in the Figure 2, color and odor changes were observed in the apricots dried in the oven as a result of the amount of moisture removed.

RESULTS AND DISCUSSION

Change in Free Moisture Value

Free moisture-time curves used in the graphical evaluation of the results of the experiments carried out at certain time intervals at 4°C, 26°C and 40°C were examined at different sulfur concentrations (2000, 3000, 4000 and 5000 ppm) and sun dried apricots. The free moisture change over time was examined separately for all temperatures and concentrations and the results were given in Figures 3, 4, 5.

When Figure 3 is examined, results regarding the loss of free moisture at the end of 816 hours for 2000, 3000, 4000 ppm sulfur apricots and sun dried for 4°C operation and at the end of 768 hours for 5000 ppm are as follows:

It can be seen that free moisture decreases over time for a concentration of 2000 ppm. Total change in free moisture is 85.29%. In other words, it is seen that apricots with 2000 ppm sulfur lose a great deal of moisture in storage conditions depending on the packaging material used.

In the experiments carried out at 3000 ppm, change in the free moisture value is in the direction of increasing compared to the 2000 ppm sample. The increase is related to the storage conditions of the sample as well as the ambient humidity. Considering that all experiments were carried out under the same conditions (constant temperature, humidity and pressure), amount of the free moisture at the beginning was 0.003047, while amount of free moisture after drying was found to be 0.001333. Accordingly, approximately 56.35% moisture was removed from the apricot.

When the free moisture change was examined in the experiments performed at 4000 ppm, the amount of free moisture at the beginning was 0.0012, while the amount of free moisture at the end of drying was found to be 0.0003. Accordingly, approximately 75% moisture has been removed from the apricot. Decreases and increases at certain time intervals are associated with opening and closing the package during sampling.

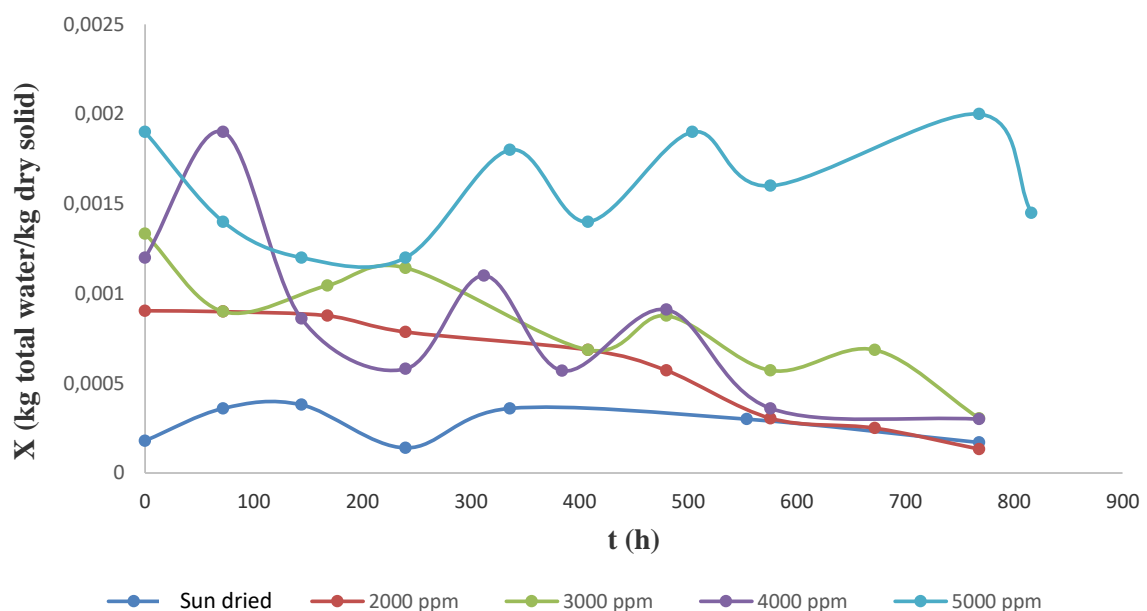


Figure 3. Curve of drying versus flow rate of sulfur apricots and sun dried fruits studied at different concentrations under storage conditions at 4°C

When the change in free moisture value was examined in the experiments performed at 5000 ppm, amount of free moisture at the beginning was 0.0019, while amount of free moisture at the end of drying was found to be 0.0015. Accordingly, approximately 21% moisture was removed from the apricot.

Decreases and increases at certain time intervals are associated with opening and closing the packaging during sampling. However, at 5000 ppm concentration, the change in free moisture remained less after a longer period of time compared to others, which can be explained by the fact that sulphurous structures bind more water in the body.

In the experiments performed on sun-dried apricots, change in the free moisture value was at a minimum level compared to the sulphurous samples. While amount of the free moisture at the beginning was 0.00018, amount of the free moisture after drying was found to be 0.00017. Accordingly, approximately 5.6% moisture was removed from the apricot.

In summary, since amount of the moisture in the environment is low under cold storage conditions, water in the material will move away from the environment through evaporation. This is the reason for the decrease in the amount of free moisture. Therefore, in cold storage conditions, it should be taken into account whether environment is fully closed or semi-open.

As can be seen in Figure 4, results regarding the loss of free moisture after certain periods for 2000, 3000, 4000 ppm, 5000 ppm and sun-dried under the 26°C condition are as follows:

In the experiments carried out at 2000 ppm, change in the free moisture is not much. Reason for this can be explained by the fact that the inside of the package and the ambient humidity are the same. While amount of the free moisture at the beginning was 0.00711, amount of the free moisture after drying was found to be 0.007202. Accordingly, moisture in the apricots increased by approximately 1.29%.

Change in free moisture value in the experiments performed at 3000 ppm is similar to that of 2000 ppm. While amount of the free moisture at the beginning was 0.00232, amount of the free moisture after drying was found to be 0.00247. Accordingly, moisture in the apricots increased by approximately 6.46%.

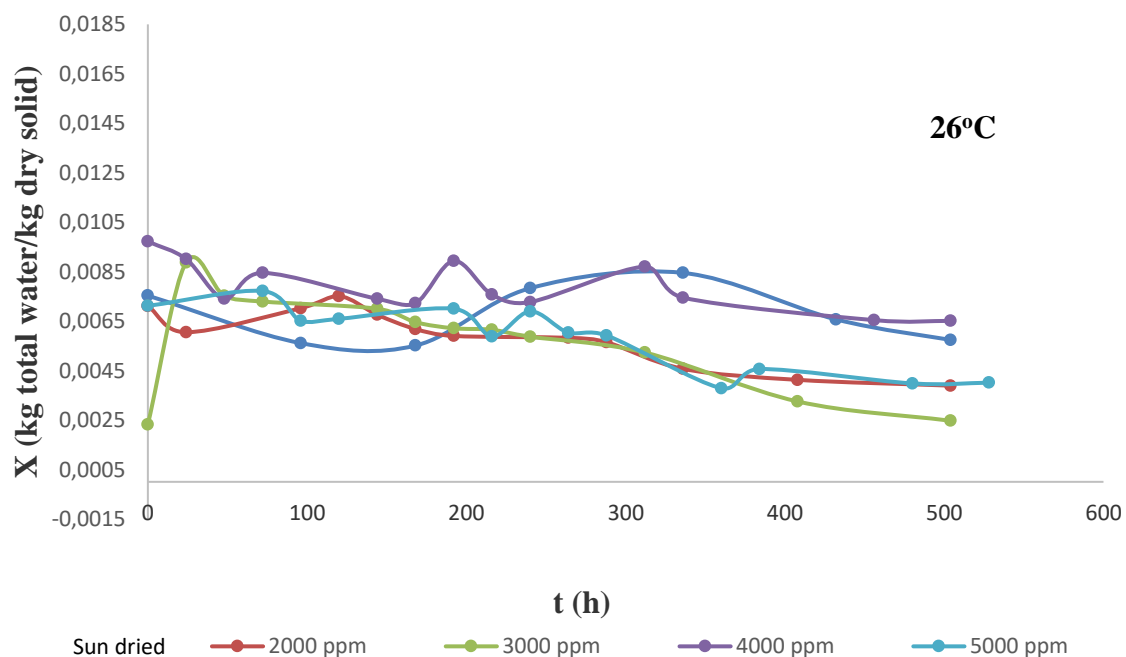


Figure 4. Curve of drying versus flow rate of sulfur apricots and sun dried apricots studied at different concentrations under storage conditions of 26°C

In experiments conducted at 4000 ppm, change in the free moisture is greater, unlike other 2000 and 3000 ppm concentrations. While amount of the free moisture at the beginning was 0.00972, amount

of the free moisture after drying was found to be 0.00651. Accordingly, approximately 33% moisture was removed from the apricot.

In experiments conducted at 5000 ppm, change in the free moisture up to 360 hours is higher, unlike other 2000, 3000 and 4000 ppm concentrations. While amount of the free moisture at the beginning was 0.00711, amount of the free moisture after drying was found to be 0.00378. Accordingly, approximately 47% moisture was removed from the apricot.

Change in the free moisture for sun-dried apricots is not much compared to the sulfur-containing ones. While amount of the free moisture at the beginning was 0.00753, amount of the free moisture after drying was found to be 0.00545. Accordingly, approximately 27% moisture was removed from the apricot.

Variation in free moisture at 26°C is lower than that of at 4°C.

As shown in Figure 5, results regarding the loss of free moisture at the end of certain periods for 2000, 4000, 5000 ppm, 3000 ppm and sun dried for 40°C operation are as follows:

In the experiments carried out at 2000 ppm, it was observed that the moisture was rapidly removed at the initial value with the change in the free moisture value. While the amount of free moisture at the beginning was 0.033, the amount of free moisture after drying was found to be 0.00461. Accordingly, approximately 86% moisture was removed from the apricot.

In the experiments carried out at 3000 ppm, it was observed that the moisture was removed rapidly at the initial value when the free moisture value changed. While amount of the free moisture at the beginning was 0.0345, amount of the free moisture after drying was found to be 0.00812. Accordingly, approximately 76% moisture was removed from the apricot.

In the experiments carried out at 4000 ppm, it was observed that the moisture was removed rapidly at the initial value when the free moisture value changed. While amount of the free moisture at the beginning was 0.038, amount of the free moisture after drying was found to be 0.012. Accordingly, approximately 68% moisture was removed from the apricot.

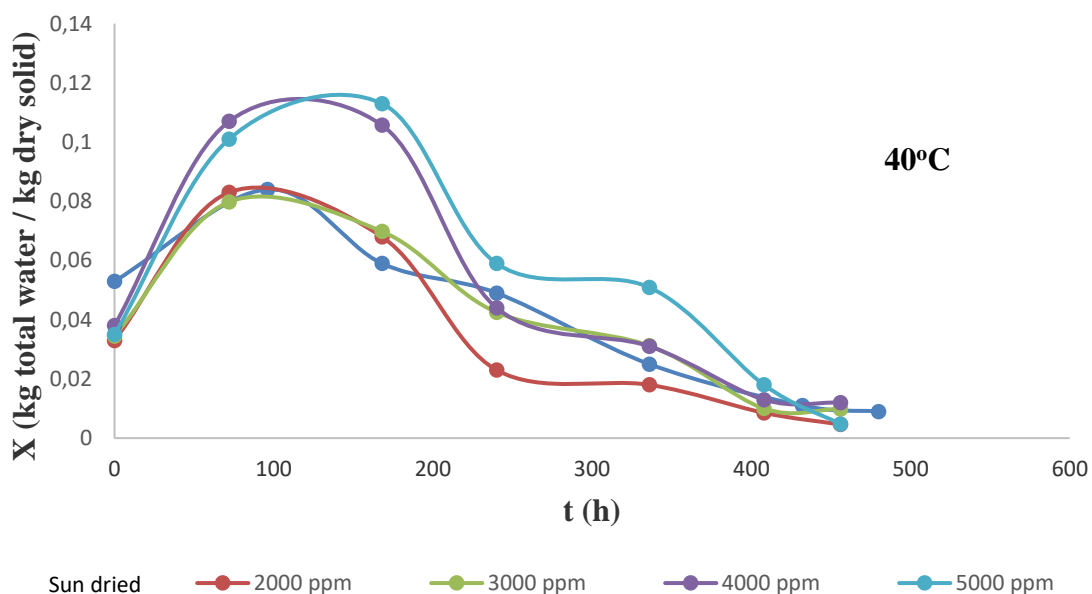


Figure 5. Curve of drying versus flow rate of sulfur apricots and sun dried apricots studied at different concentrations under storage conditions of 40°

In the experiments carried out at 5000 ppm, it was observed that the moisture was removed rapidly at the initial value when the free moisture value changed. While amount of the free moisture at the

beginning was 0.035, amount of the free moisture after drying was found to be 0.00472. Accordingly, approximately 87% moisture was removed from the apricot.

In the experiments performed on sun-dried apricots, it was observed that the moisture was removed rapidly at the initial value when the free moisture value changed. While amount of the free moisture at the beginning was 0.053, amount of the free moisture after drying was found to be 0.009. Accordingly, approximately 83% moisture was removed from the apricot.

When the results obtained from the figures are evaluated, the high level of free moisture loss can be explained by the opening of the pores due to the high temperature and the increased tendency of water to evaporate. As a result of the increase in water vapor concentration in the packaging, driving force for mass transfer increased due to both the pressure difference and the concentration difference between the external environment. As a result, moisture loss increased.

In summary, when storage conditions are examined in terms of humidity, apricots lose 52-85% of their moisture after 29 days at temperatures between 4 °C and 40°C. The cold refrigerator environment causes moisture loss just like the warm environment. When the moisture content of ready-to-eat apricots falls below approximately 25%, it becomes hard and difficult to chew. Therefore, ambient humidity conditions, temperature and packaging are of great importance in determining the shelf life. However, shelf life of sulfur apricots may vary depending on the consumption method. Considering that water activity of packaged sulfurized dried apricots offered for sale should be 0.25 (free moisture 25%), an average shelf life of approximately 25 days can be given according to this value in this study. However, when the dried apricots reach the initial moisture value again, they can be put on sale after the necessary tests are carried out.

Change in Sulfur Amount

Sulfur is of great importance due to its importance in terms of health, both in the shelf life and consumption of apricots. Particularly compared to other fruits, apricot is a type of fruit that is easily spoiled and very difficult to store. Due to this feature, drying and storing of apricots has become important. In addition, short duration of consumption and durability when dried without additives necessitated the use of sulfur in drying and storing apricots. Therefore, drying and storing fresh apricots by sulfur has been used for many years as the most reasonable method

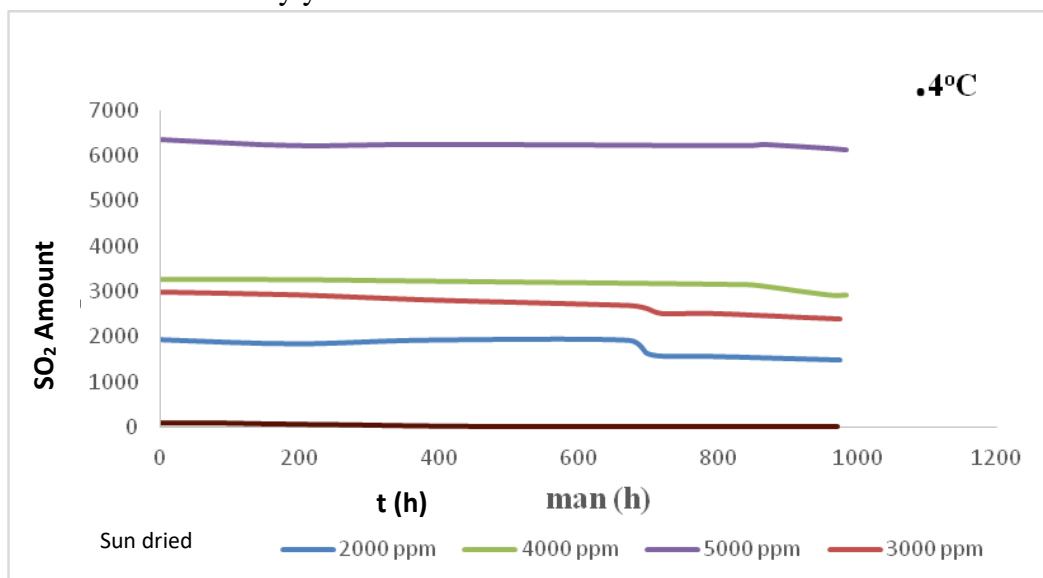


Figure 6. Change of sulfur dioxide amount in apricots over time under storage conditions at 4°C

Therefore, amount of sulfur in sulfurized apricots and their storage conditions have always been questioned. However, its importance has increased with the fact that sulfurized apricot strengthens the

immune system. Shelf life of apricots after their sulfurization is of great importance in putting it on sale. Since darkening of the color of apricots due to the decrease in sulfur in low sulfur rates has a negative effect on sales and appeal, determining decrease in sulfur rate in sales conditions and shelf life has gained importance.

As shown in Figure 6, there is not much change in the sulfur dioxide rates of packaged apricot samples with 2000, 3000, 4000, 5000 ppm sulfur and dried sun dried apricots until approximately 950 hours at 4°C. Mass transfer from outside to inside and from inside to outside was minimal in apricots packaged at 4°C. Based on this, as seen in the graphic, it is the most suitable storage condition. The fact that there is no change in the sulfur rate despite the decrease in free moisture indicates that the sulfur is in the form of an organic compound and not in a form that can interact with water. Moreover, even if free sulfur dioxide forms sulfate acid with water, when the water evaporates, it remains in the structure of the apricot in the form of sulfur sulfate. This is the main reason why apricots are preserved by sulfurization.

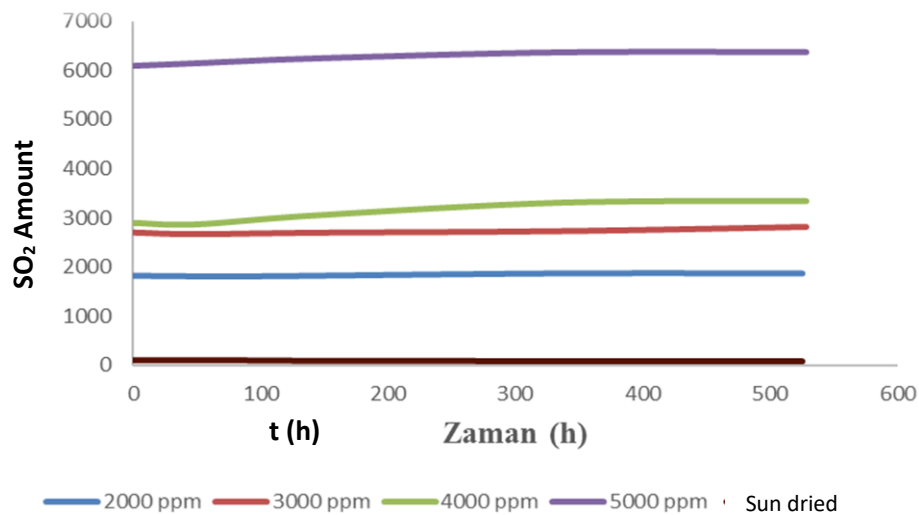


Figure 7. Change of sulfur dioxide amount in apricots over time under storage conditions at 26°C.

When Figure 7 is examined, it is seen that the amount of sulfur removal in all samples is at a minimum level at 26°C. The situation is similar with storage conditions at 4°C.

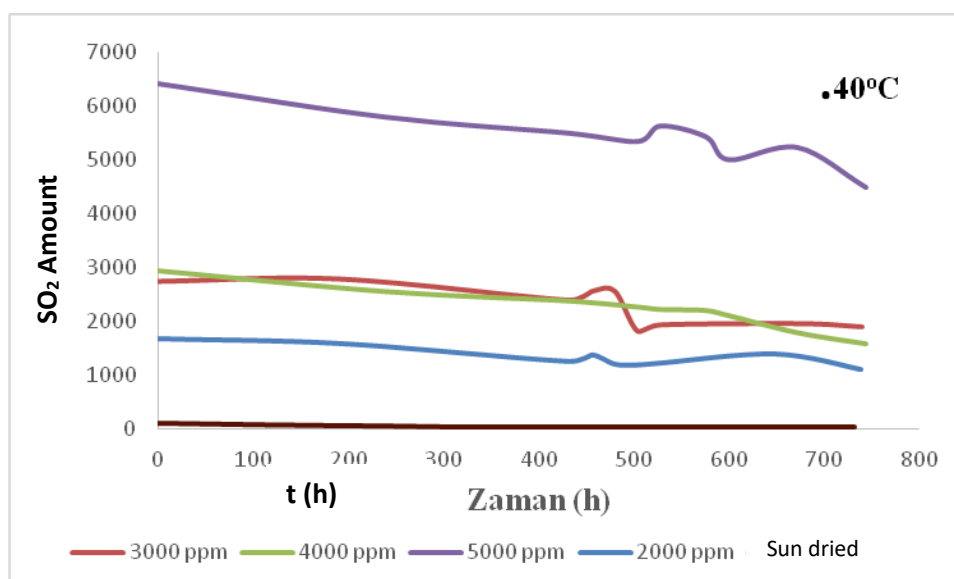


Figure 8. Change of sulfur dioxide amount in apricots over time under storage conditions at 40°C

As seen in Figure 8, it was observed that the amount of sulfur dioxide removal from sulfurous apricots at 40°C decreased compared to 4°C and 26°C temperatures. The reason for this is that the amount of SO₂ moves away from the apricot as the pores open due to the increase in temperature.

Variation of Sulfur Concentration with Time

Time-dependent removal of sulfur during drying of sulphurous and sun-dried apricots was investigated. First-order reaction kinetics were investigated according to equation 1 (Gonzalo et al., 2009).

$$-dCA / dt = kCA \quad (1)$$

$$CA / CA_0 = \exp(-kt) \quad (2)$$

$$\ln CA / CA_0 = -kt \quad (3)$$

$$\ln CA = \ln CA_0 - kt \quad (4)$$

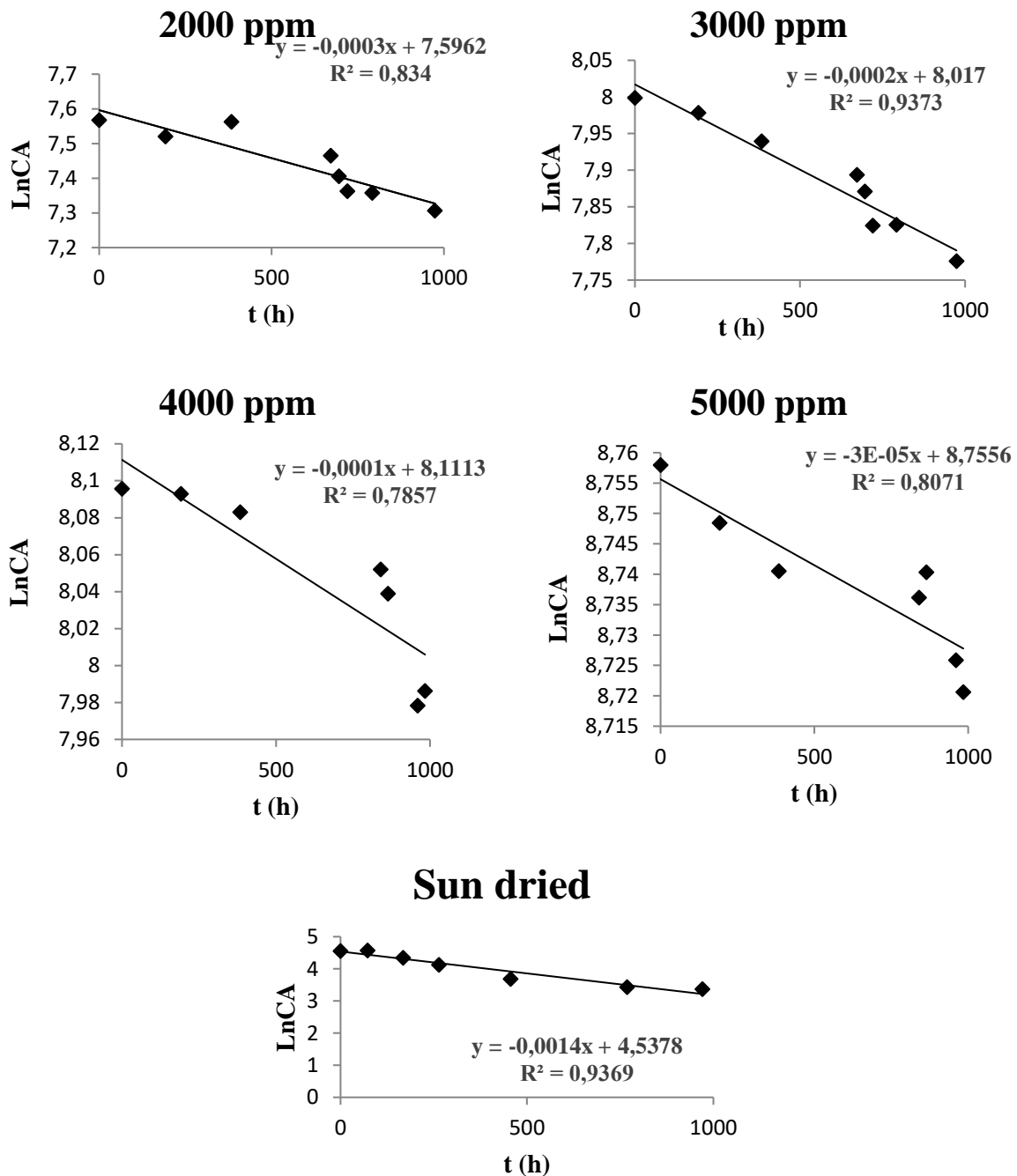


Figure 9. Time-dependent concentration variation graphs of first-order sulphurous and sun-dried apricots at 4°C

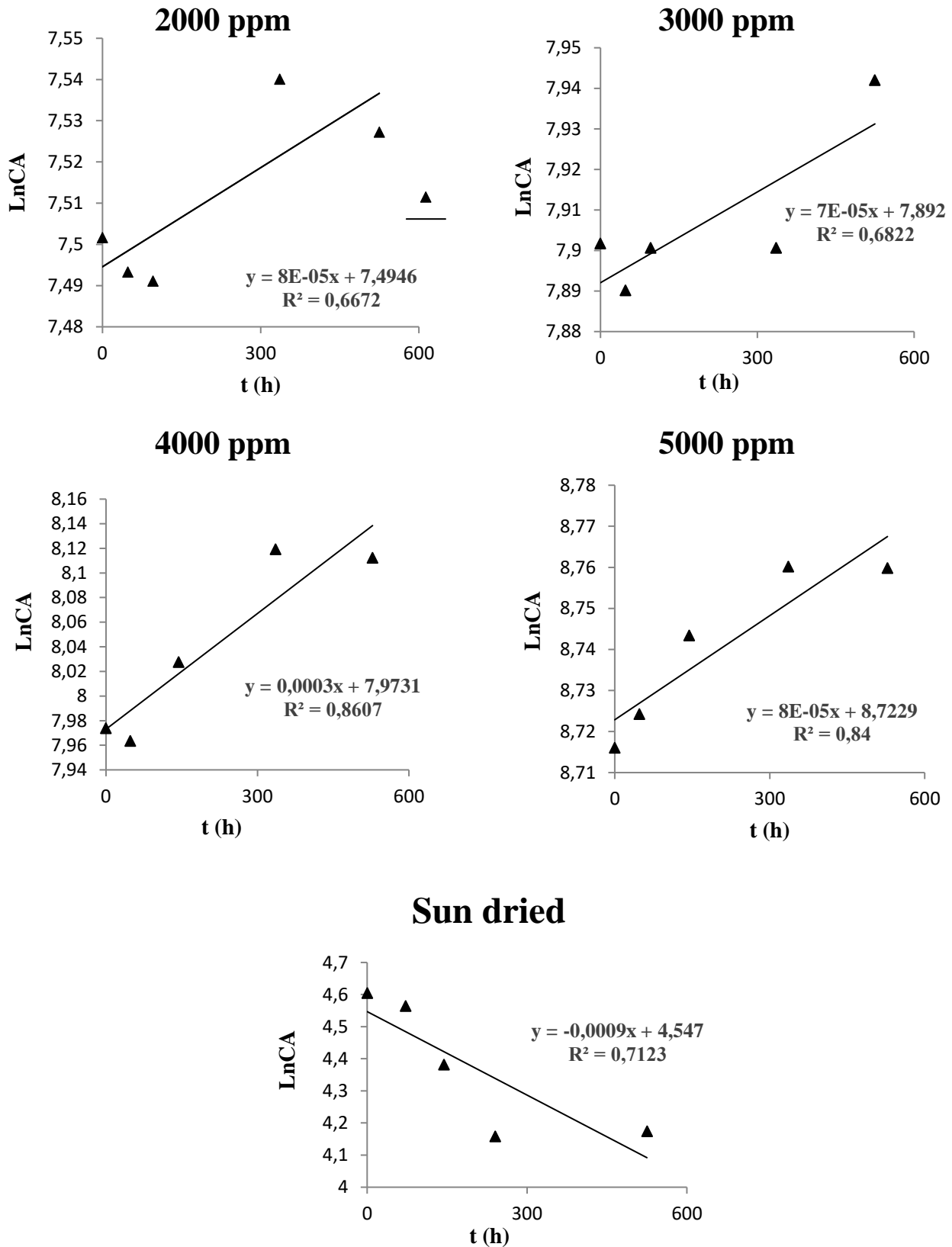


Figure 10. Time-dependent concentration variation graphs of first- order sulphurous and sun dried apricots at 26°C

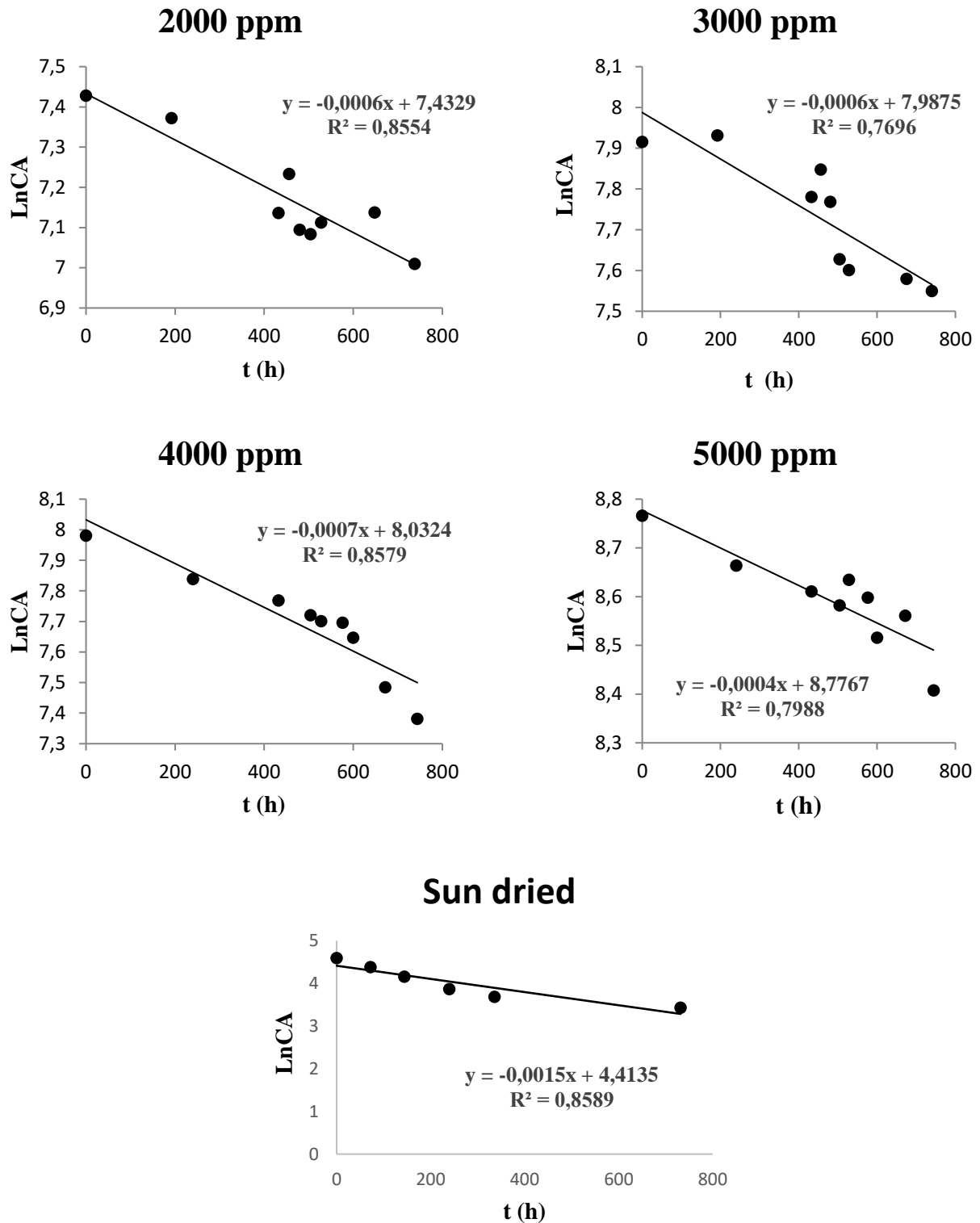


Figure 11. Time-dependent concentration variation graphs of first-order sulphurous and sun-dried apricots at 40°C

Second-order reaction kinetics were investigated according to equation 5.

$$-dCA / dt = kCA^2 \quad (5)$$

$$1/CA - 1/CA_0 = kt \quad (6)$$

$$1/CA = 1/CA_0 + kt \quad (7)$$

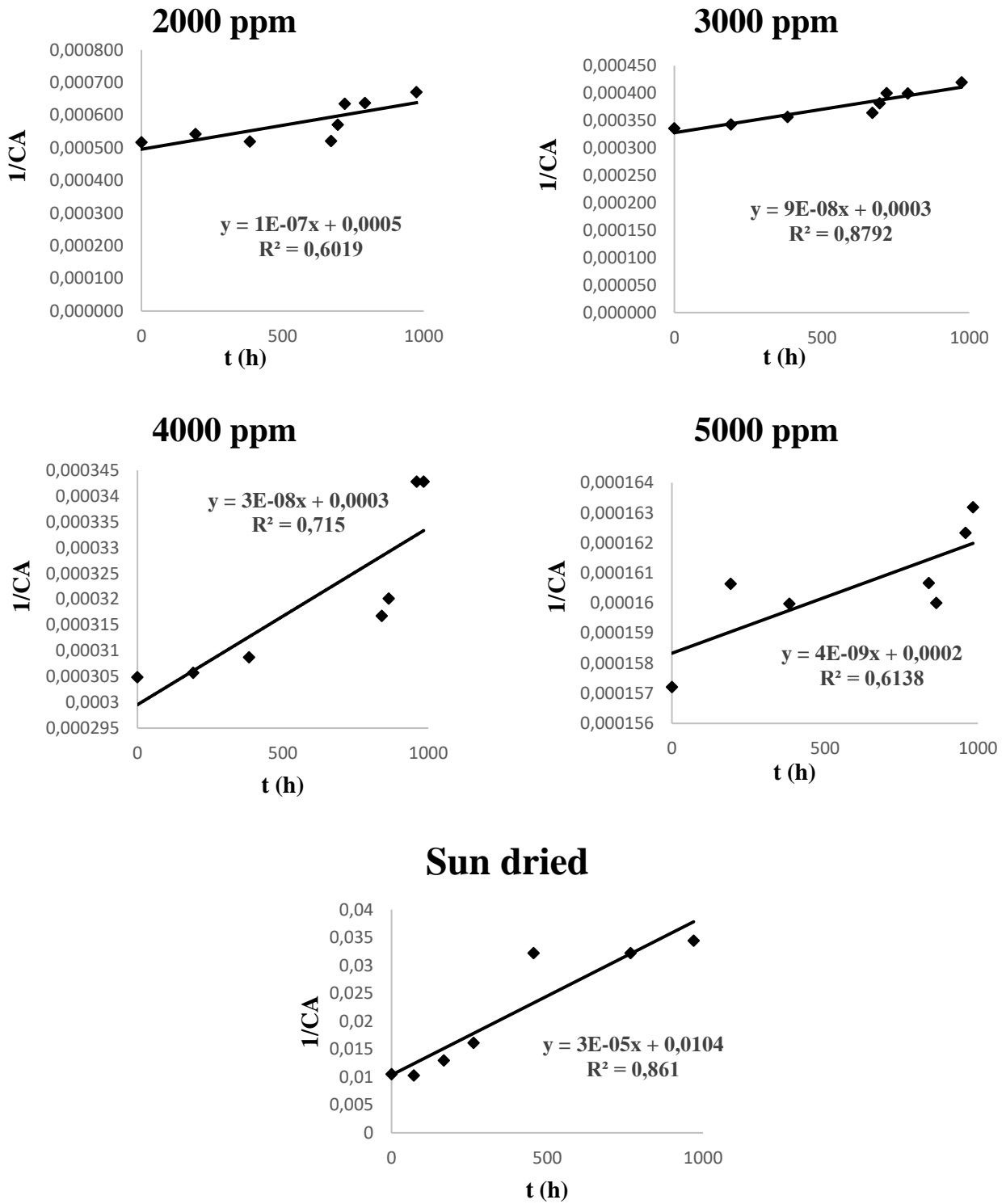


Figure 12. Time-dependent concentration variation graphs of second-order sulphurous and sun-dried apricots at 4°C

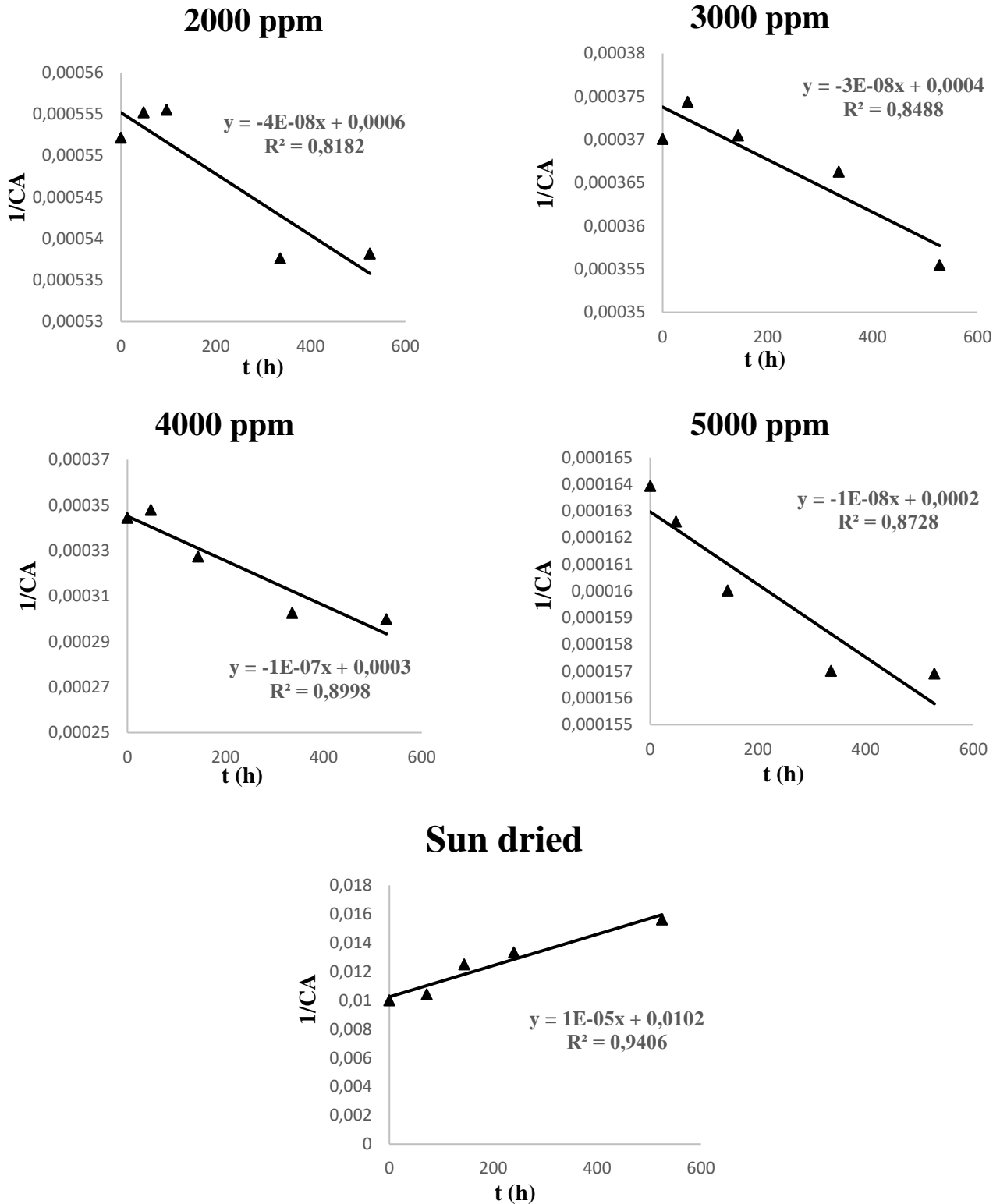


Figure 13. Time-dependent concentration variation graphs of second-order sulphurous and sun-dried apricots at 26°C

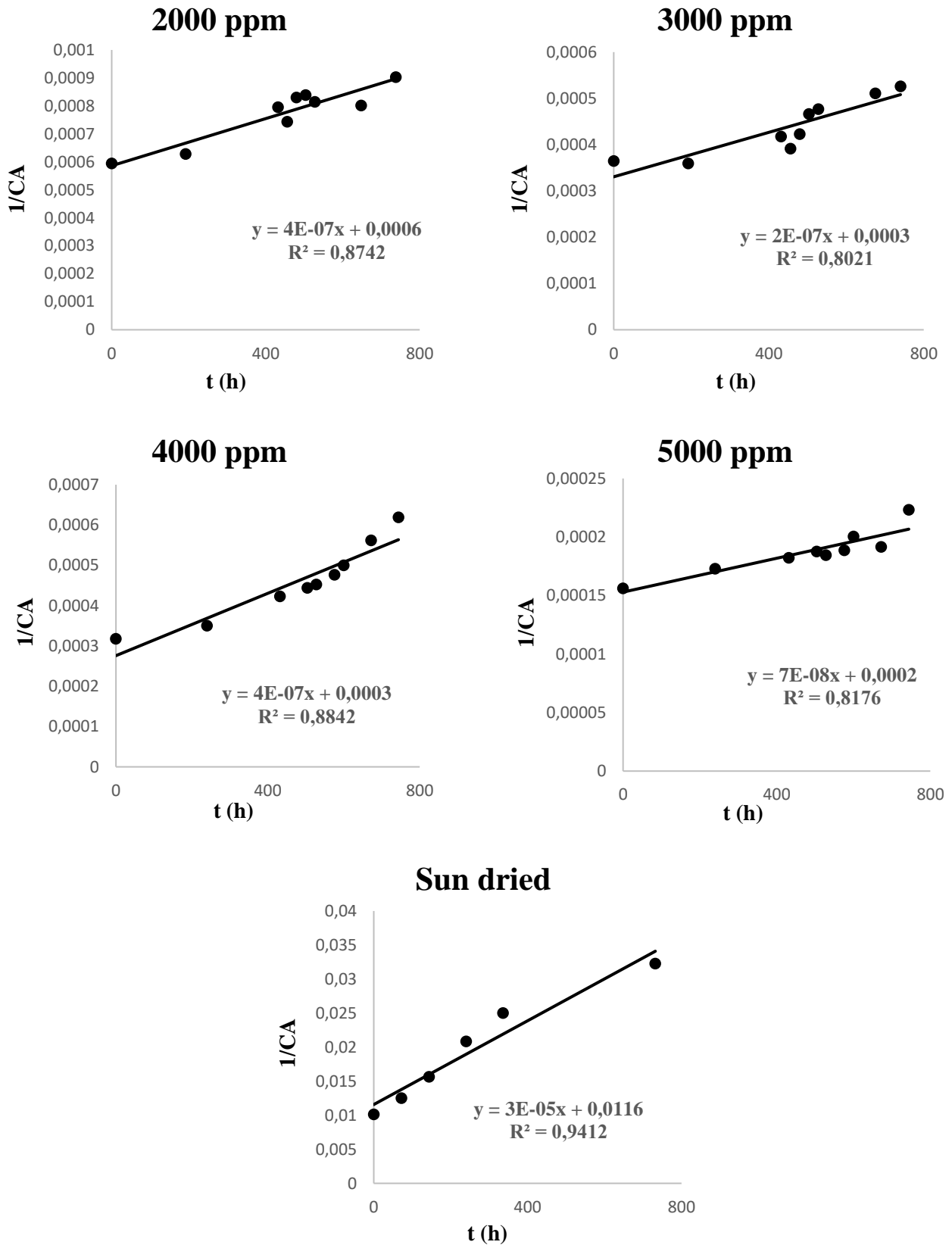


Figure 14. Time-dependent concentration variation graphs of second-order sulphurous and sun-dried apricots at 40°C

Table 1. First-order rate constants versus change of concentration at different temperatures

Concentration	Temperature	k (d ⁻¹)	Ea (kJ/mol)
Sun dried	4°C	1.4*10 ⁻³	1.38
	26°C	1.1*10 ⁻³	
	40°C	1.5*10 ⁻³	
2000 ppm	4°C	2*10 ⁻⁴	13.88
	26°C	-8*10 ⁻⁵	
	40°C	6*10 ⁻⁴	
3000 ppm	4°C	2*10 ⁻⁴	21.99
	26°C	-7*10 ⁻⁵	
	40°C	6*10 ⁻⁴	
4000 ppm	4°C	1*10 ⁻⁴	38.96
	26°C	-3*10 ⁻⁴	
	40°C	7*10 ⁻⁴	
5000 ppm	4°C	3*10 ⁻⁵	51.86
	26°C	-8*10 ⁻⁵	
	40°C	4*10 ⁻⁴	

When the velocity constants calculated according to the 1st and 2nd order velocity data in Tables 1 and 2 are examined, for the first order, positive and increasing values were obtained for the 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm sulfur dioxide concentrations for the 4°C temperature at constant drying conditions. The high rate constant at high temperature indicates that sulfur dioxide removal is high. Since the experiments carried out at 26°C were performed under variable ambient conditions, the rate constant was negative. It was concluded that the ambient conditions in the drying process affect the results quite a lot.

Table 2. Second-order rate constants versus change of concentration at different temperatures

Concentration	Temperature	k (d ⁻¹)	Ea(kJ/mol)
Sun dried	4°C	3*10 ⁻⁵	-1.47
	26°C	2*10 ⁻⁵	
	40°C	3*10 ⁻⁵	
2000 ppm	4°C	1*10 ⁻⁷	27.75
	26°C	-4*10 ⁻⁸	
	40°C	4*10 ⁻⁷	
3000 ppm	4°C	9*10 ⁻⁸	15.98
	26°C	-3*10 ⁻⁸	
	40°C	2*10 ⁻⁷	
4000 ppm	4°C	3*10 ⁻⁸	51.86
	26°C	-1*10 ⁻⁷	
	40°C	4*10 ⁻⁷	
5000 ppm	4°C	4*10 ⁻⁹	57.34
	26°C	-1*10 ⁻⁸	
	40°C	7*10 ⁻⁸	

When the rate constants found for the 2nd order velocity are examined, the rate constants show a decrease at the 40°C temperature condition.

CONCLUSION

Free moisture change of the samples increases as temperature increases depending on the packaging. Equilibrium conditions in terms of evaporation and mass transfer inside the package will also be at different times. While evaporation will be less at low temperatures, it will be more at high temperatures. As a result, more steam will be formed at high temperatures and pressure will be created inside. Therefore, driving force for mass transfer from the package to the outside will increase. When the kinetic data on sulfur dioxide removal were examined, it was determined that it was suitable for the first-order kinetic model for 4°C, and suitable for the second-order kinetic model for 26 and 40°C, considering the temperature and based on the correlation coefficients.

Based on the change of sulfur dioxide amount, it was determined that average change in SO₂ amount is approximately 15% for 4°C and 36% for 40°C.

According to the kinetic data of sulfur dioxide removal, it is not notable for 4°C and 26°C temperatures. However, it can be explained by the presence of sulfur dioxide in different chemical forms at 40°C. Reason for this can be explained by the bonding of sulfur with organic compounds in the structure at low temperatures. This is explained by the fact that water forms sulfate acid even when moisture is removed and sulfate has no tendency to evaporate. As a result of the decomposition of the structure with HCl in the determination of sulfur, sulfur in the organic structure is separated from the structure as sulfur dioxide.

In terms of time, sulfur removal values of the samples stored at 4°C for approximately 980 hours and at 26°C for approximately 525 hours were found to be low. It was determined that moisture and SO₂ losses accelerated after approximately 740 hours at 40°C.

During storage at 4°C, the sample containing 3280 mg/kg SO₂ lost 11% of SO₂ after 980 hours and in the same example, 46% SO₂ loss occurred after 740 hours at 40°C. Moreover, it was observed that SO₂ loss increases rapidly at high temperatures.

When storage conditions were examined in terms of humidity, it was determined that apricot lost 52-85% of its moisture at the end of 29 days and 4°C and 40°C temperatures. Based on the 25% water activity of packaged sulphurized dried apricots offered for sale, in this study, an average shelf life of 25 days was determined according to this value. The k values of sulfur removal vary according to the temperatures.

Acknowledgements

We would like to thank İnönü University Scientific Research Projects Unit for their support in supplying the laboratory materials required for the thesis study within the scope of the project No. FYL-2018-1464.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Asma, B. M. (2000) Kayısı Yetiştiriciliği. Türkiye, Malatya: Evin Ofset
- Budak, M. M & Şan, B. (2017). Hasat Öncesi Giberellik Asit ve Oksalik Asit Uygulamalarının 'Kosiu' ve 'Hakko' Asya Armut Çeşitlerinde Meyve Kalitesi Üzerine Etkileri, *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*; 12 (2): 73-80.

- Davis, E. G., McBean, D. McG., & Rooney, M. L. (1975). Packaging foods that contain sulphur dioxide. *CSIRO Food Research Quarterly*, 35, 57–62.
- Davis, P. H. (1972). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Vol.3. ISBN: 9780852241547, 0852241542
- Davis, E. G., McBean, D. McG., Rooney, M. L., & Gipps, P. G. (1973). Mechanisms of sulphur dioxide loss from dried fruits in flexible films. *Journal of Food Technology*, 8, 391–405.
- Freedman, B. J. (1980). Sulphur dioxide in foods and beverages: its use as a preservative and its effect on asthma. *British Journal of Diseases of the Chest*, 74, 128–134.
- Gonzalo, M., Angel, B., Domingo, S. & Antonio, M. (2009). Sulphur dioxide evolution during dried apricot storage. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 531–533.
- Gökçe K. (1966). Malatya kayısılarının kükürtlenmeleri üzerine teknik çalışmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 261, 87 s., Ankara.
- Karaçalı, İ. (2006). *Bahçe Ürünlerinin Muhafaza ve Pazarlanması*. (5. Baskı). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, (494).
- Korbel, E., Attal, E., Grabulos, J., Lluberas, E., Durand, N., Morel, G., Goli, T. & Brat, P. (2013). Impact of temperature and water activity on enzymatic and non-enzymatic reactions in reconstituted dried mango model system, *European Food Research and Technology*, 237(1), 39–46.
- Özçağırın, R, Ünal, A & Özeker, E, (2004). İsfendiyaroğlu M. Ilıman İklim Meyve Türleri, Sert Çekirdekli Meyveler, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova İzmir
- Salurcan, A. (2018). *Farklı Düzeylerde Kükürtlenen Kuru Kayısıların Organik Asit Ve Karotenoid Miktarlarında Depolama Boyunca Meydana Gelen Değişimin, Kayısının Rengi Ve Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi*, (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. TEZ NO: 508060
- Sobutay, T. (2003). Erişim: 05.06.2015. Kayısı sektör araştırması. İstanbul Ticaret Odası Dış Ticaret Şubesi Araştırma Servisi. <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-54.pdf>.
- Stern, A. R, Flaishman, M. A & Ben-Arie, R. (2007). Effect of Synthetic Auxins on Fruit Size of Five Cultivars of Japanese Plum (*Prunus salicina Lindl.*) *Scientia Horticulture*, 112, 304-309.
- Türk Standartları Enstitüsü TSE 485 Kuru Kayısı Dried Apricot 2009 ICS 67.080.10
- Wedzicha, B. L. (1984). *Chemistry of sulphur dioxide in foods*. London, England: Elsevier App. Sci. Pu.
- WHO Food Additives Series. (2008). Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je15.htm>.

Atf İçin: Canbay, E., Kundakçı, Ş., Yıldız, E., Çelik Canbay, Z., Doğan, S. ve Akyılmaz, E. (2023). Rutenyum Mediyatör Kompleksi Temelli Galaktoz Biyosensörü Geliştirilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2769-2779.

To Cite: Canbay, E., Kundakçı, Ş., Yıldız, E., Çelik Canbay, Z., Doğan, S. & Akyılmaz, E. (2023). Development of Galactose Biosensor Based on Ruthenium Mediator Complex. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2769-2779.

Rutenyum Mediyatör Kompleksi Temelli Galaktoz Biyosensörü Geliştirilmesi

Erhan CANBAY¹, Sevval KUNDAKÇI², Ezginur YILDIZ², Zeynep ÇELİK CANBAY³, Serçin DOĞAN², Erol AKYILMAZ³.

Öne Çıkanlar:

- Rutenyum mediyatör kompleksli karbon pasta elektrot kullanıldı.
- Amperometrik galaktoz biyosensörü geliştirildi.
- Örnek uygulaması liyofilize serum ve süt örneklerinde deneme yapıldı.

Anahtar Kelimeler:

- Rutenyum mediyatör kompleksi
- Galaktoz
- Galaktozemi
- Biyosensör
- Amperometri

ÖZET:

Galaktoz seviyesinin ölçümü, galaktozemi ve galaktoz intoleransı açısından klinik önem taşır. Özellikle yenidoğanlarda hemen tespit edilmemesi ölümcül sonuçlar doğurabilir. Teşhis konduktan sonra da galaktozun diyetten çıkarılması gerekir. Dolayısıyla hem kan hem de diyetle özellikle süt ve süt ürünlerinde galaktozun tayini büyük önem taşır. Literatür verilerinde galaktoz tayini için geliştirilen yöntemler spektrofotometre, kromatografi, kütle spektrometresi gibi ön işlem ve pahalı ekipman gerektiren, zaman alıcı ve nispeten yavaş yöntemlerdir. Bu çalışmanın amacını da galaktoz tayini için hızlı, spesifik, ucuz elektrokimyasal bir biyosensör sistemi geliştirilmesi oluşturmaktadır. Biyokomponent olarak Galaktoz Oksidaz (GaOX) enzimi kullanılan bu çalışmada, çalışma elektrodu olarak Rutenyum mediyatör kompleksi içeren karbon pasta elektrot kullanılmıştır. GaOX enzimi pasta yapısı içerisinde immobilize edilmiştir. Çalışmanın özgünlüğünü pasta yapısı içerisinde kullanılan Rutenyum mediyatör sisteminin kullanılması oluşturmaktadır. Elektrot yapımı aşamaları döngüsel voltammetri (CV) yöntemiyle karakterize edilirken, optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları 0&0.9 V arası DP, ve 0.5 V'ta amperometrik ölçümler yoluyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda ayrıca çalışma tamponu içerisinde 1 mM p-benzokinin mediyatör sistemi kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonu optimum pH 6,5, optimum sıcaklık ise 30 °C olarak bulunmuştur. Geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığı 0.05 – 1 mM arası bulunurken, tekrarlanabilirliği 0.25 mM galaktoz için ortalama 0.24 mM, standart sapma ± 0.021 ve varyasyon katsayısı (%VK) %8,3 olarak bulunmuştur. Girişim etkisi denemesinde herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Örnek denemesi liyofilize serum ve laktosuz süt örneklerinde yapılmış ve % geri elde hesaplanmıştır. Bu projede kullanılan Rutenyum mediyatör kompleksinin biyosensör yapımında kullanılmasına literatürde çok az rastlanılmış olmakla birlikte bu çalışmayla ilk defa bir galaktoz biyosensöründe ve ilk defa bir karbon pasta elektrotla kullanımı gerçekleştirilmiştir.

Development of Galactose Biosensor Based on Ruthenium Mediator Complex

Highlights:

- Ruthenium mediator complexed carbon paste electrode was used.
- An amperometric galactose biosensor was developed.
- Sample analysis were conducted on lyophilized serum and milk samples.

Keywords:

- Ruthenium mediator complex
- Galactose
- Galactosemia
- Biosensor
- Amperometry

ABSTRACT:

Measurement of galactose level is of clinical significance in terms of galactosemia and galactose intolerance. Especially in newborns, it can have fatal consequences if it is not detected immediately. After diagnosis, galactose should be removed from the diet. Therefore, the determination of galactose in both blood and diet, especially milk and dairy products, is of great importance. In the literature data, the methods developed for galactose determination are time consuming and relatively slow methods that require pre-processing and expensive equipment such as spectrophotometer, chromatography, mass spectrometer. The aim of this study is to develop a fast, specific, inexpensive electrochemical biosensor system for galactose determination. In this study, in which Galactose Oxidase (GaOX) enzyme was used as a biocomponent, a carbon paste electrode containing a ruthenium mediator complex was used as the working electrode. GaOX enzyme was immobilized in the paste structure. The originality of the study is the use of the Ruthenium mediator system used in the paste structure. Electrode construction stages were characterized by cyclic voltammetry (CV) method, while optimization and characterization studies were carried out by means of DP between 0 & 0.9 V and amperometric measurements at 0.5 V. The studies also used a 1 mM p-benzoquinone mediator system in working buffer. As a result of optimization studies, optimum pH was found to be 6.5 and optimum temperature was 30 °C. While the linear detection range of the developed biosensor was found between 0.05- mM, the repeatability was found to be 0.24 mM on average, the standard deviation ± 0.021 and the coefficient of variation (CV%) as 8.3% for 0.25 mM galactose. No interference was observed in the interference effect trial. Sample analysis was made on lyophilized serum and lactose-free milk samples and % recovery was calculated. The use of the Ruthenium mediator complex used in this project in the production of biosensors has been rarely encountered in the literature. However, with this study, it was used for the first time in a galactose biosensor and for the first time with a carbon paste electrode.

¹ Erhan CANBAY (Orcid ID: 0000-0003-0948-1675), Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Sevval KUNDAKÇI (Orcid ID: 0000-0002-2566-4618), Ezginur YILDIZ (Orcid ID: 0000-0003-1815-6970), Serçin DOĞAN (Orcid ID: 0000-0002-9735-8142), Özel Ege Lisesi, İzmir, Türkiye

³ Zeynep ÇELİK CANBAY (Orcid ID: 0000-0001-7159-1088), Erol AKYILMAZ (Orcid ID: 0000-0003-4108-2738), Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Erhan CANBAY, e-mail: erhancanbay87@gmail.com ; erhan.canbay@ege.edu.tr

Bu çalışma Tübitak 2204-A Lise Öğrenci Araştırma Projeleri Yarışmasında yarışmış ve Ege Bölge elemelerine kalan 8 projeden biridir.

GİRİŞ

Galaktoz normalde üç enzimin koordineli aktiviteleri yoluyla glikoza metabolize edilir: galaktokinaz (GALK), galaktoz-1-fosfat uridil transferaz (GALT) ve üridin difosfoglukoz 4-epimeraz (GALE) (Anderson, 2018). Yüksek konsantrasyonlarda galaktoz ve metabolitleri memeliler için toksiktir (Anderson, 2018). Galaktokinaz ve GALT'ın ve belki de nadiren epimerazın kalıtsal eksiklikleri, galaktoz içermeyen bir diyetin erken tanınması ve kurumuyla önlenebilecek klinik bozukluklara neden olur (Beutler, 1991). Galaktoz, sağlıklı kişilerde maksimum 0.28 mM ve 5 günden daha küçük yenidoğanlarda 1.11mM'de seviyesinde bulunur (Connell, 2012). Yenidoğan bebeklerde 1.11 mM'dan yüksek galaktoz seviyeleri ölümcül olabilir (Adam vd., 2015; Beutler, 1991). Galaktozemi galaktoz metabolizmasındaki enzimlerden birinin eksikliği durumunda ortaya çıkan kalıtsal bir metabolik bozukluk olup galaktoz birikimi ile karakterizedir (Anderson, 2018; Beutler, 1991). Yenidoğan döneminde teşhis edilmeyen ve dolayısıyla tedavi edilmeyen hastalarda yetersiz beslenme, gelişememe, sarılık, karaciğer hastalığı, katarakt, E. coli sepsisi ve yenidoğan ölümü gerçekleşebilir (Adam vd., 2015; Vaca vd., 1978). Galaktozeminin tedavisi, süt ve süt ürünlerini içeren diyet galaktozunun kısıtlanmasını içerir (Beutler, 1991; Connell, 2012).

Biyosensör sistemlerinde kullanılan redoks mediyatörleri reaksiyonu hızlandırırken enzimin de rejenerasyonunu sağlarlar. Literatüre bakıldığında ferrisyanür, ferrosen, benzokinon, metil violojen gibi çok sayıda mediyatör sistemi biyosensör sistemlerinde kullanılmıştır (Cosnier, 2014; Sohail & Adeloju, 2016; Turner, 2013). Osmiyum ve rutenyum komplekslerinin redox mediyatörü olarak kullanıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Akyılmaz vd., 2010; Marazuela vd., 1997; Ryabov vd., 2001). Özellikle $[Ru(XX)_2Y_2]$ yapısında XX'in 1,2-bypiridine, Y'nin ise asit ligandı olduğu türleri oksiredüktazlarla hızlı bir şekilde reaksiyona girmiştir (Akyılmaz vd., 2010). Ne var ki rutenyum mediyatör komplekslerinin kullanıldığı çalışmalar sınırlı olmakla birlikte Galaktoz Oksidaz ile kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Galaktoz tayini için önceki yöntemler arasında kolorimetri (Kim vd., 2012) , kütle spektrometri (Li vd., 2011) , ince tabaka kromatografisi (Pruden vd., 1975) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Gross & Acosta, 1991; Hu vd., 1995) bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler maliyetli, zaman alıcıdır ve yüksek girişim etkisi ile (özellikle kolorimetrik yöntem için) yeterince spesifik değildir, bu nedenle bu sorunların üstesinden gelmek için galaktoz tayini için yapılan biyosensörler diğer analitler için olduğu gibi galaktoz tayini için de büyük ilgi çekmektedir. Özellikle yeni mediyatör sistemleri, karbon nanotüpler, nanopartiküllerin kullanımıyla biyosensörlerin hassasiyet ve seçicilikleri artmıştır (Canbay & Akyılmaz, 2014; Karunakaran vd., 2015; Mulchandani & Pan, 1999; Turner, 2013). Bir biyosensör, bir biyolojik algılama elemanını bir dönüştürücü ile birleştirerek analit konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal üretir (Karunakaran vd., 2015; Nikolelis & Nikoleli, 2018). Biyosensörlerin kullanımı sadece laboratuvarında değil ev, sokak, arazi, hastane hemen her yerdedir. Glukoz oksidazın kullanıldığı glukoz biyosensörleri ilk ticarileşen türleri olmakla birlikte bugün birçok analit için ticarileşen biyosensör vardır. Bütün bu biyosensörlerin ortak noktası öncelikle laboratuvarında oluşturulan yöntem çalışmalarıyla başlamasıdır. Sonra optimizasyon çalışmaları yapılır, yöntemin doğruluğu, kesinliği, girişim etkisi ve stabilitesi belirlendikten sonra piyasanın da o analit için talebi doğrultusunda ticarileşir. Biyosensörler sayesinde bir hasta bir damla kan alabilir ve glikoz konsantrasyonunu bir dakikadan daha kısa sürede okuyabilir. Biyosensörler sadece analitleri tanımlamak ve ölçmek için değil, aynı zamanda çok düşük bir konsantrasyonda bile kompleks bileşiklerde bulunan spesifik moleküllerin taranmasında da kullanılabilir. Bu özellik, analitik araştırma, gıda ve kimya endüstrileri, kirlilik kontrolü , süreç izleme ve klinik tanı alanlarında

faydalarını sağlamıştır. Biyosensörler basitliği, hızlı tepkisi, göreceli düşük maliyeti, sürekli izlenmesi ve minyatürleştirilmesi nedeniyle tamamlayıcı bir araç olarak düşünülebilir (Farré & Barceló, 2007; Karunakaran vd., 2015; Scheller vd., 1985). Galaktoz oksidaz galaktoz biyosensörleri yapımında en fazla kullanılan enzimdir (Evik vd., 2010; Kanyong vd., 2013; Tkac vd., 2007; Xie vd., 2016). Galaktoz oksidaz (GaOX) enzimi galaktozu oksijen varlığında yükseltirken açığa H₂O₂ çıkar. H₂O₂ elektroaktif bir türdür ve birçok elektrotla 0.7 V'ta yükseltgenmesi izlenebilir. Galaktoz biyosensörlerinin birçoğu bu prensiple çalışır (Tkac vd., 2007). Fakat 0.7 V ürik asit, askorbik asit gibi kolay okside olabilen türler için girişime açık bir potansiyeldir. Bu potansiyeli düşürmek için mediyatör sistemleri kullanılır ki bu da ikinci nesil biyosensörlerin çalışma prensibini oluşturmaktadır (Karunakaran vd., 2015). Diğer katı elektrotların (Altın, Camımsı karbon, Platin.vb) yanında karbon pasta elektrotların avantajı hızlı hazırlanabilmeleri, ucuz olmaları, yüzeyinin çizilme sorunu olmaması, mediyatör ve biyoaktif yapının pasta yapısı içerisinde immobilize edilme kolaylığı gibi birçok avantajı vardır. Dezavantajı ise diğer katı elektrotlara nazaran tersinirliğinin nispeten düşük olması, yüksek potansiyelerde yükseltgenme -indirgenme yapması sayılabilir. Fakat bu sorun pasta yapısı içerisinde, nanopartiküllerin (Şvancara vd., 2009), nanotüplerin (Zhang vd., 2011), grafenin, iyonik sıvıların (Canbay vd., 2014) ve mediyatörlerin kullanılması ile giderilebilmektedir.

Özetle bu çalışmanın konusunu galaktoz tayinine yönelik Rutenyum mediyatör kompleksi temelli hızlı, spesifik, kolay hazırlanan, ucuz bir biyosensör sistemi geliştirmek oluşturmaktadır. Bu proje kapsamında kullanılacak olan rutenyum mediyatör kompleksi (2,2'-bipyridine) (chloro)(p-cymene)rutenium(II)]chloride) literatür verilerine göre ikinci kez kullanılacak olup karbon pasta elektrot yapısı içinde ve galaktoz tayinine yönelik olması ilk defa bu çalışma da gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın özgün yanını da bu oluşturmaktadır.

MATERYAL VE METOT

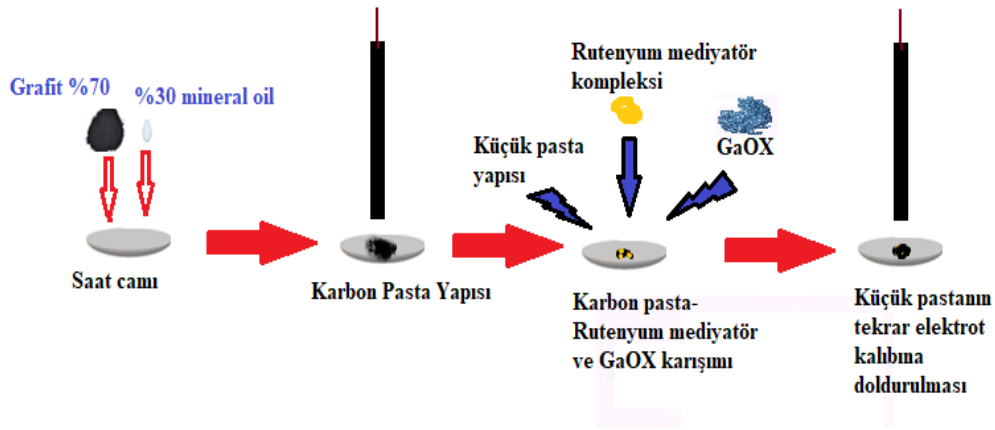
Kimyasallar ve Ekipmanlar

Galaktoz oksidaz (1000 U veya 3000 U/g), galaktoz, grafit tozu, mineral yağı, grafit tozu (%99.99 saflıkta), potasyum fosfat dibazik, potasyum fosfat monobazik, ferrisiyanür, ferrosiyanür, p-benzokinon Sigma (U.S.A)'den temin edilmiştir. Rutenyum mediyatör kompleksi (2,2'-bipyridine)(chloro)(p-cymene)rutenium(II)]chloride Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalında Lalrempuia ve ark. bulduğu yöntemle sentezlenmiştir (Lalrempuia vd., 2005). Denemelerde Palm Sens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; karbon pasta elektrot kalıbı, CHI 111 model Ag/AgCl doygun referans elektrodu, CHI 115 model Pt yardımcı elektrodu; P1000 otomatik pipetleri, Nuve (TR) marka termostat, Yellow line manyetik karıştırıcı, Sonikatör LC 30 kullanıldı.

Yöntem

Biyosensörün hazırlanması

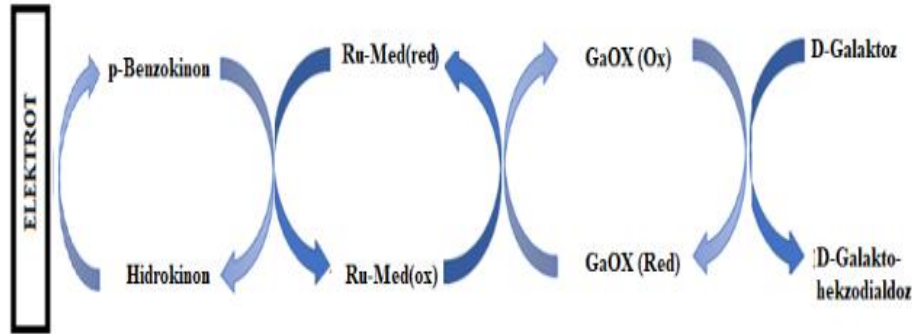
Öncelikle grafit tozundan %70 mineral yağından %30 olacak tartımlar yapılarak bir saat camı içine eklenir. Bu yapı birbiri içerisinde iyice karışana ve macun kıvamında olana kadar karıştırılarak karbon pasta elektrot (CPE) oluşturulur. Elektrot yüzeyi temiz bir A4 kağıt üzerinde oval bir biçimde hareket ettirilerek elektrot yüzeyi düz ve pürüzsüz hale getirilir. Bu elektrodun kısmındaki küçük pasta yapısı tekrar saat camına dökülür. Bu küçük pastaya 4 mg olacak şekilde rutenyum mediyatör kompleksi ve 5 mg (yaklaşık 15 U) GaOX eklenerek pasta yapısı içerisinde iyice dağılına kadar karıştırılır. Karbon pasta elektrot kabı tekrar bu küçük pasta yapısına batırılarak pastanın elektrot içine girmesi sağlanır. Ardından elektrot tekrar A4 kağıt yüzeyi üzerinde hareket ettirilerek oval ve pürüzsüz yapı elde edilir (CPE-RuMed-GaOX). Biyosensörün şematik gösterimi Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Biyosensör hazırlanmasının şematik gösterimi

Biyosensörün çalışma prensibi

Geliştirilen biyosensörün çalışma prensibi şekil 2’de şematize edilmiştir. Buna göre GaOX D-Galaktozu D-Galakto-hekzodialdoza yükseltir. Rutenyum mediyatör (Ru-Med) kompleksi GaOX’u tekrar okside haline çevirirken kendisi indirgenir. Ru-Med rejenere etmek ve elektron transferini hızlandırmak için benzokinon çözelti içerisindeki mediyatör olarak kullanılmıştır. Benzokinon Ru-Med’den aldığı elektronlarla hidrokinona indirgenirken hidrokinonun elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi ile anodik pikte artış gözlenir. Yapılan çalışmalarda tampon olarak 0.1 M KCl ve 1 mM benzokinon içeren pH:6 fosfat tamponu kullanılmıştır. Ag/AgCl referans elektrodu, Pt tel yardımcı elektrot ve CPE-RuMed-GaOX elektrodu ise çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.

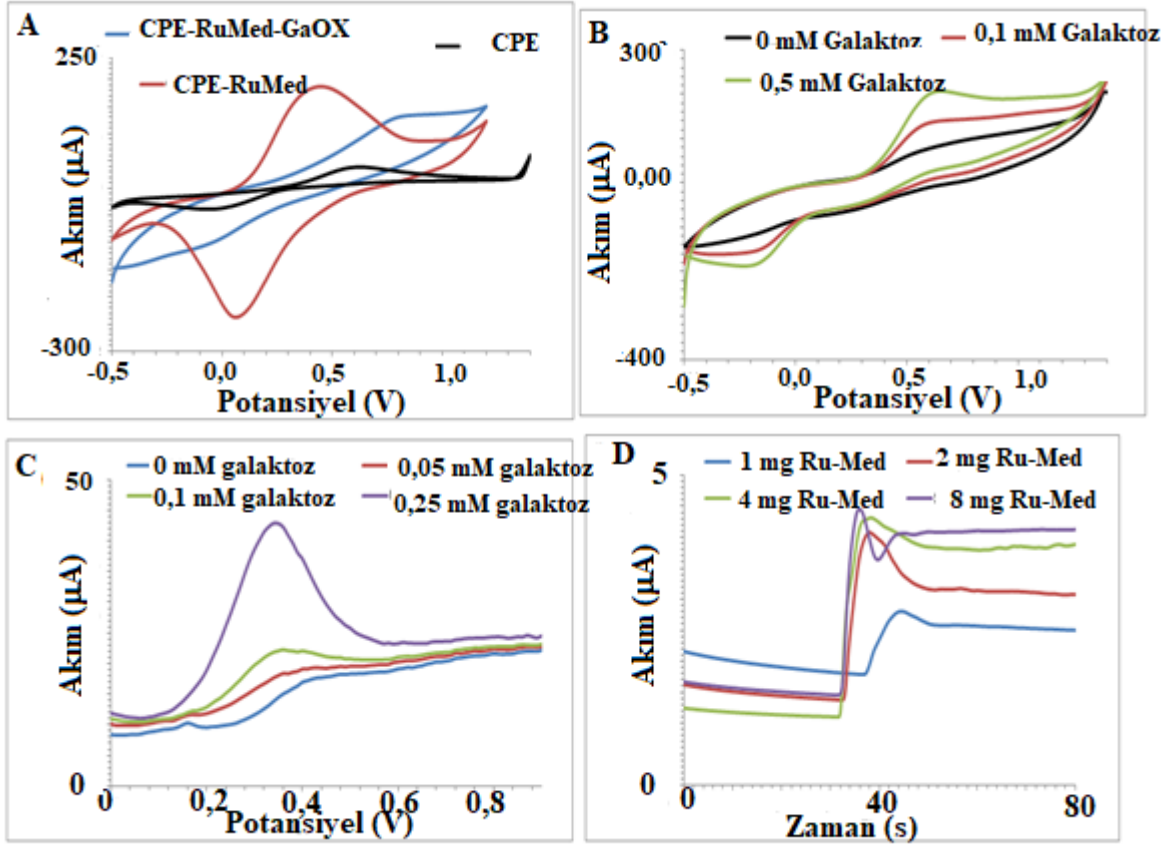


Şekil 2. Biyosensörün çalışma prensibi

BULGULAR VE TARTIŞMA

Galaktoz Biyosensörünün İmmobilizasyonuna İlişkin Bulgular

Şekil 3A’da geliştirilen Galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin Ferri/Ferro siyanür prob çözeltisinde alınmış döngüsel voltammogramları (CV) yer almaktadır. Rutenyum mediyatör kompleksinin kullanıldığı elektrodun sinyal yoğunluğunu ve pik tersinirliğini yalnız karbon pasta elektrot (CPE) ile karşılaştırıldığında ciddi oranda arttırdığı gözlenmektedir. Bu durum Rutenyum mediyatör kompleksinin karbon pasta yapısı içerisine iyi bir şekilde geçtiğini göstermesinin yanı sıra iletkenliğinin ne derece iyi olduğunu da göstermektedir. CPE-RuMed elektroda enzimin ilavesiyle pik tersinirliği nispeten bozulmuş ve sinyal yükseklikleri düşmüştür. GaOX’un yalıtkan doğası gereği pik yüksekliğinin düşmesi beklenen bir durumdur ve enzimin pasta yapısı içerisine immobilize olduğunu gösterir.



Şekil 3: (A) Galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin döngüsel voltammogramlar. pH:7.0 PBS (0.1 M KCl ve 5 mM Ferri/Ferro Çözeltisi içeren) Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık : 25 °C. CPE: Karbon pasta elektrot, RuMed: Rutenyum Mediyatör Kompleksi, GaOX: Galaktoz Oksidaz) (B) Galaktoz biyosensörünün galaktoz ilavesiz ve 0.1 mM ve 0.5 mM galaktoz eklemeleri (ekleme sonrası çözelti içindeki konsantrasyonları) sonrası alınan CV'leri. pH:6.0 PBS (0.1 M KCl ve 1 mM p-Benzokinin içeren) Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık : 30 °C. (C) Galaktoz biyosensörünün galaktoz ilavesiz ve 0.05 mM; 0.1 ve 0.25 mM galaktoz eklemeleri (ekleme sonrası çözelti içindeki konsantrasyonları) sonrası alınan DP'leri. pH:6.0 PBS (0.1 M KCl ve 1 mM p-Benzokinin içeren) Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık: 30 °C. (D) Galaktoz biyosensörünün cevabına Rutenyum mediyator kompleksinin miktarının etkisi. Ölçümler amperometriktir. 0.25 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometrik sonuçlar

Galaktoz Biyosensörünün Galaktoz Cevabına İlişkin Bulgular

Şekil 3 B'de galaktoz biyosensörünün galaktoza verdiği cevabın döngüsel voltammetri sonuçları Şekil 3 C'de bu sonuçtan yola çıkarak hedef alınan anodik pike ilişkin Differansiyel Puls Voltammetrisi (DP) sonuçlarına ilişkin bulgular yer almaktadır. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları DP ve amperometri teknikleri ile yapılmıştır. DP ölçümleri substrat ilavesini takiben 3 dakikalık inkübasyon sonrası alınmış olup amperometrik ölçümler ekleme anında kaydedilen sonuçları göstermektedir.

Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 20 - 40 °C arasında çalışılmıştır. Biyosensör cevabı 30 °C'ye kadar artmış sonrasında ise hemen hemen sabit kalmıştır. Enzim stabilitesinin yüksek sıcaklıklarda azaldığı bilindiği için 30 °C optimum sıcaklık olarak seçilmiştir.

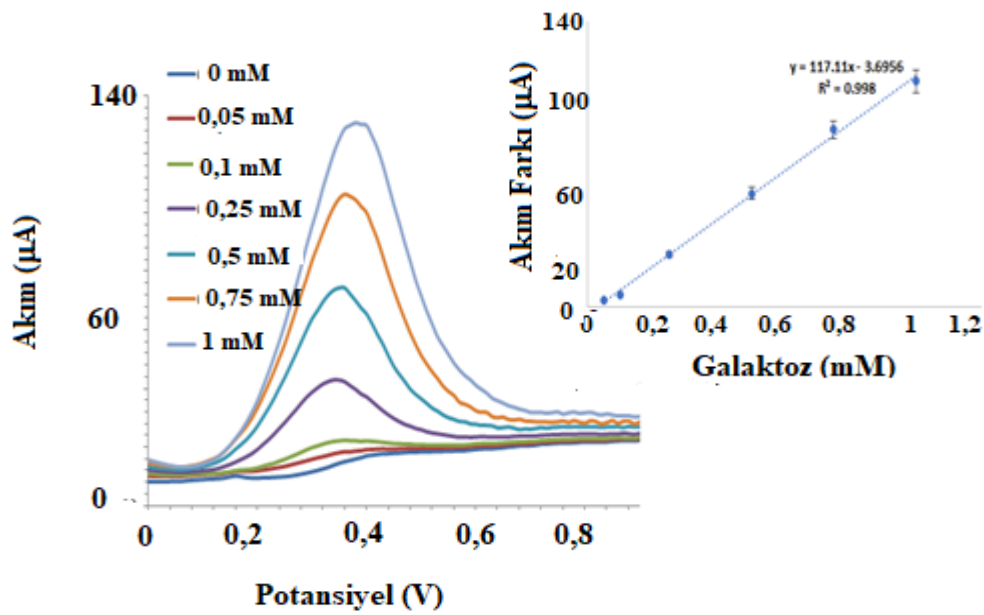
Galaktoz Biyosensörünün Cevabına Rutenyum Mediyator Kompleksinin Miktarının Etkisine İlişkin Bulgular

Rutenyum mediyator kompleksi bu projenin özgünlüğünü oluşturduğu için elektrot yapısı içindeki miktarının belirlenmesi önemlidir. Karbon pasta elektrotlar 4 farklı Ru-Med miktarlarıyla hazırlanmış ve ölçümler 0.25 mM galaktoz için amperometrik yöntemle alınmıştır. Her ölçüm 3 kere tekrarlanmış ve aynı miktarı içeren elektrotlar 2'li olarak hazırlanmıştır. Şekil 3 D'ye bakıldığında Ru-

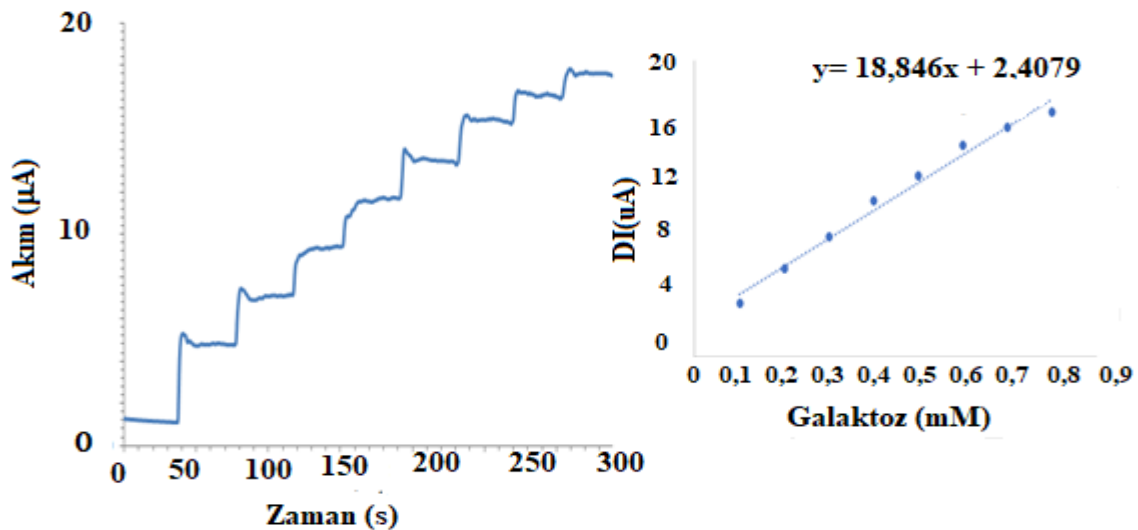
Med kompleksinin kullanılması verilen biyosensör cevabını da arttırmıştır. 4 mg Ru-Med kullanılan elektrotta alınan cevap tepe noktasını oluştururken 8 mg Ru-Med'in kullanıldığı elektrotla 4 mg'ın kullanıldığına hemen hemen aynı cevap alınmıştır. Ru-Med'in fazlası elektrodun pasta yapısını bozduğu gibi enzim-substrat ilişkisi için bir difüzyon bariyeri oluşturmuş olabilir.

Galaktoz Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığına İlişkin Bulgular

Geliştirilen galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin DP sonuçları ve o sonuçlara göre çizilen standart grafiği Şekil 4'de , sıralı katım amperometri sonuçları ve o sonuçlara göre çizilen standart grafiği ise Şekil 5'de verilmiştir. Her iki grafiğinde doğrusallığı validasyon kriterlerine uymakla birlikte DP ile elde edilen sonuçların doğrusallığı çok daha iyidir. DP ölçümleri 0.05-1.00 mM galaktoz konsantrasyonları için alınırken amperometri sonuçları ise 0.1-0.8 mM galaktoz konsantrasyonlarına göre elde edilmiştir.



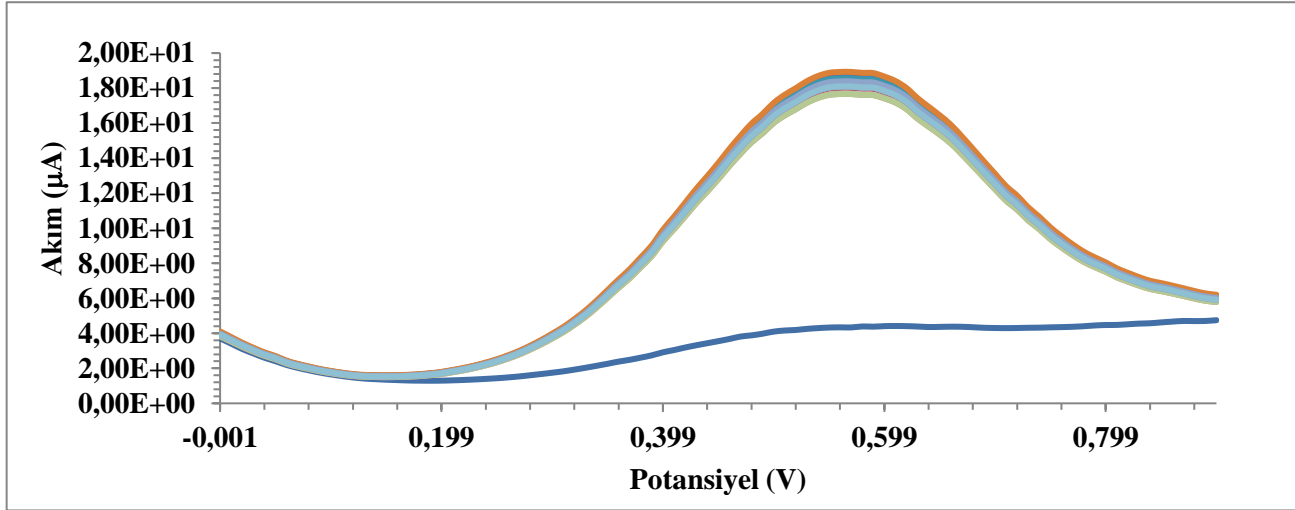
Şekil 4. Galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemeye yönelik DP sonuçları ve bu sonuçlara göre çizilmiş standart grafiği



Şekil 5. Galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemeye yönelik 0.1 mM galaktoz sıralı katım amperometri sonuçları ve bu sonuçlara göre çizilmiş standart grafiği

Galaktoz Biyosensörünün Tekrarlanabilirliğine İlişkin Bulgular

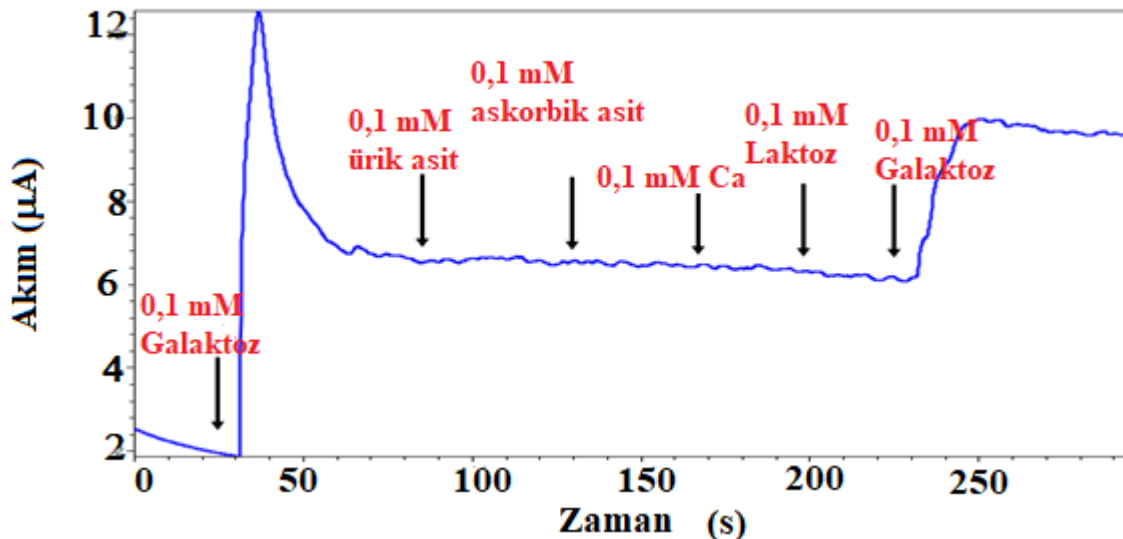
Tekrarlanabilirlik bir analitik yöntemin kesinliğini gösteren bir parametredir. Biyoanalitik yöntem validasyon kriterlerine göre varyasyon katsayısı %15'in altında olmalıdır. Bu çalışmada 0.25 mM galaktoz DP yöntemiyle 10 defa ölçülmüş ve elde edilen DP'ler Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu çalışmada 0.25 mM galaktoz ortalaması 0.24 mM, standart sapması 0.021 ve varyasyon katsayısı %8.3 olarak bulunmuştur. Söz konusu değerler validasyon kriterlerine uymaktadır (European Medicines Agency & Ema, 2012).



Şekil 6. Geliştirilen galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliğine ilişkin DP sonuçları.(n=10)

Galaktoz Biyosensörünün Girişim Etkisi Çalışmasına İlişkin Bulgular

Geliştirilen galaktoz biyosensörünün girişimci etkisi denemesi 0.5V'ta amperometrik ölçüm yoluyla yapılmıştır (Şekil 14). Deney kolay okside olabilen ürik asit, askorbik asit ve ölçümü planlanan örnek süt olduğu için sütte bol bulunan kalsiyum ve laktozla yapılmıştır. Şekil 7'de görüleceği üzere galaktoz ilavesi ile akım artarken diğer analitlerin ilavesi akımda kaydadeğer bir fark yaratmamıştır. Son ilave edilen galaktoz için elde edilen cevap ise ilk cevaba göre %5 oranında azalmıştır. Bunun nedeni diğer analitlerin eklenmesiyle çözelti hacminin artması ve galaktozun derişimin görece azalmasıdır. Ancak %5'lik fark kabul edilebilir bir farktır.



Şekil 7. Geliştirilen galaktoz biyosensörüne girişimci etkisini gösteren amperometrik ölçüm.

Örnek Denemesi ve Geri Elde Denemesine İlişkin Bulgular

Örnek denemesi hem ticari satın alınan liyofilize serum örneğiyle (BIORAD) hem de laktozsuz sütlerde standart katma yoluyla yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 1’de gösterilmiştir. Hem liyofilize serumda hem de laktozsuz sütte yapılan denemelerde %geri elde %100’e yakın çıkmıştır. Bu da yöntemin doğru ölçüm yapabildiğini gösterir.

Çizelge 1. Geliştirilen biyosensörle liyofolize serum ve laktozsuz sütte geri elde denemesi

Örnek	Eklenen (mM)	Biyosensörle bulunan (mM)	% Geri elde
Serum (BIORAD)	0	0.15 ± 0.012	
	0.25	0.39 ± 0.06	96
	0.5	0.66 ± 0.09	102
Laktozsuz Süt (25 kat seyreltilmiş)	0	0.52± 0.08	
	0.25	0.79± 0.11	108

Literatürdeki Galaktoz Biyosensörleri ile Karşılaştırma

Çizelge 2. Literatürdeki galaktoz biyosensörlerinin karşılaştırması

Elektrot	Cevap Süresi (s)	Tayin Aralığı	Tayin Limiti	Duyarlılık	Elektrot hazırlama süresi	Referans
PEP	5	2.0-16.0 mM	0.025 mM	1.75 $\mu\text{A}/\text{mM}$	Yaklaşık 26 saat	(Şenel vd., 2011)
PGVFc	5	2.0-20.0 mM	0.1 mM	23 nA/mM	Yaklaşık 26 saat	(Evik vd., 2010)
PMP	4	2.0-20.0 mM	-	15 nA/mM	Yaklaşık 1 saat	(Ekinci & Paşahan, 2004)
PVF	30	1.0-40.0 mM	-	4.5 mA/mM	Yaklaşık 40 dakika	(Gülce vd., 2002)
p(HEMA)/PPy	70	0.05-10 mM	-	0.94 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 1 saat	(Brahim vd., 2002)
PPEG	5	0-24 mM	-	0.025 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 30 dakika	(Sung & Bae, 2006)
ITO/EDOT	5	0.1-1.0 mM	-	1.59 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 1 saat	(Lee vd., 2011)
CPE/RuMed	5	0.05-1.0 mM	-	20 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 20 dakika	Bu çalışma

PGVFc, poly (glycidyl methacrylate-co-vinylferrocene); PMP, poly (4-methoxyphenol); PVF, polyvinylferrocene; PPy, polypyrrole.; p(HEMA)/PPy, Polypyrrole hidroksimetakrilat; PPEG, polipirrol poli etilen glikol; ITO-EDOT, indium tin oxide (ITO) glass electrode, 3,4-Ethylenedioxythiophene (EDOT)

SONUÇ

Bu proje kapsamında tayini özellikle galaktozemi tanısı, tedavisinin izlenmesi ve diyetin kontrolü açısından büyük önem taşıyan galaktoz için yeni bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu projede kullanılan Rutenyum mediyatör kompleksinin biyosensör yapımında kullanılmasına literatürde çok az rastlanılmış olmakla birlikte bu çalışmayla ilk defa bir galaktoz biyosensöründe ve ilk defa bir karbon pasta elektrotla kullanımı gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörle optimizasyon çalışmaları 0&0.9 V arasında DP yöntemiyle yapılırken sensörün performansını gösteren deneyler hem DP hem de 0.5 V'ta amperometrik ölçümler yoluyla gerçekleştirilmiştir. DP ölçümleri 3 dakikalık karıştırılmalı inkübasyon sonrası alınırken amperometrik ölçümler galaktoz ilavesi ile anlık olarak alınmıştır. Çalışmada ayrıca çalışma tamponu içerisinde elektron transferini hızlandırması ve Ru-Med'in rejenerasyonu sağlaması açısından 1 mM p-benzokinin mediyatör olarak kullanılmıştır. İmmobilizasyon aşamalarını gösteren Şekil 3A'da Ru-Med yapısının elektrot yapımında kullanılmasının pik yüksekliği ve kalitesine yaptığı pozitif etki rahatlıkla görülebilmektedir.

Çalışma koşullarının optimizasyonunda optimum pH 6.5 ve optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunurken her iki değerde literatür verileriyle uyumludur ve kullanılan immobilizasyon tekniğinin galaktoz oksidaz enziminin çalışma koşullarını değiştirmedikini göstermektedir. Rutenyum mediyatör kompleksinin biyosensör cevabına etkisini gösteren deneyde kullanılan rutenyum miktarı ile biyosensör cevabının 4 mg'a kullanılabildiği daha sonra ise sabit kaldığı anlaşılmıştır. Bunun nedeni 4 mg'ın fazlasının pasta yapısını bozması ve enzim substrat ilişkisi için difüzyon bariyeri oluşturması olabilir.

Biyosensörün performansını gösteren doğrusal tayin aralığı denemesinde biyosensör cevabı 0.05-1.0 mM arasında doğrusal çıkmıştır. Bu aralık kan glukoz seviyelerinin tespiti için yeterlidir. Tekrarlanabilirlik denemesinde 0.25 mM galaktoz için %VK 8,3 çıkmıştır. Bu değer biyoanalitik yöntemler için kabul edilebilir bir değerdir. Girişim etkisi denemesi amperometrik yöntemle yapılmış ve sonuçlar Şekil 7'de gösterilmiştir. Şekil 7'den de anlaşılacağı üzere aynı konsantrasyondaki ürik asit, askorbik asit, kalsiyum ve laktozun herhangi bir girişimi olmamıştır. Bu sonuç geliştirilen biyosensörün ne denli seçici olduğunu gösterir. Örnek denemesi hem liyofilize serum hem de laktozsuz süt örneklerinde yapılmıştır. Hem liyofilize serum hemde laktozsuz sütte elde edilen % geri elde sonuçları %100'e yakındır ve bu da geliştirilen biyosensörün doğru ölçüm yaptığını gösterir.

Son olarak Çizelge 2'de literatürde var olan galaktoz biyosensörleriyle bu çalışmada geliştirilen biyosensör tayin aralığı, cevap süresi, duyarlılık ve elektrot hazırlama süresi açısından karşılaştırılmıştır. Çizelge 2'ye göre bu çalışmada geliştirilen biyosensörün tayin aralığı diğerleri ile benzerlik göstermekle birlikte cevap süresi oldukça kısa, duyarlılığı yüksek ve en önemlisi diğerlerine nazaran oldukça basit ve hızlı bir elektrot hazırlama süresine sahip olma gibi avantajları mevcuttur.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Adam, B. W., Flores, S. R., Hou, Y., Allen, T. W., & De Jesus, V. R. (2015). Galactose-1-phosphate uridyltransferase dried blood spot quality control materials for newborn screening tests. *Clinical Biochemistry*, 48(6), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.009>

- Akyilmaz, E., Kozgus, O., Türkmen, H., & Çetinkaya, B. (2010). A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino benzene. *Bioelectrochemistry*, 78(2), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.09.003>
- Anderson, S. (2018). GALT Deficiency: Galactosemia. *MCN The American Journal of Maternal/Child Nursing*, 43(1), 44–51. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000388>
- Beutler, E. (1991). Galactosemia: screening and diagnosis. *Clinical Biochemistry*, 24(4), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(91\)80003-L](https://doi.org/10.1016/0009-9120(91)80003-L)
- Brahim, S. I., Maharajh, D., Narinesingh, D., & Guiseppi-Elie, A. (2002). Design and characterization of a galactose biosensor using a novel polypyrrole-hydrogel composite membrane. *Analytical Letters*, 35(5), 797–812. <https://doi.org/10.1081/AL-120004070>
- Canbay, E., & Akyilmaz, E. (2014). Design of a multiwalled carbon nanotube-Nafion-cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination. *Analytical Biochemistry*, 444, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.019>
- Canbay, E., Türkmen, H., & Akyilmaz, E. (2014). Ionic liquid modified carbon paste electrode and investigation of its electrocatalytic activity to hydrogen peroxide. *Bulletin of Materials Science*, 37(3), 617–622. <https://doi.org/10.1007/s12034-014-0681-2>
- Connell, E. (2012). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (5th edn). *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1258/acb.2012.201217>
- Cosnier, S. (2014). Electrochemical biosensors. İçinde *Electrochemical Biosensors*. <https://doi.org/10.1039/B714449K>
- Ekinci, E., & Paşahan, A. (2004). Poly (4-methoxyphenol) film as a galactose-sensing material. *European Polymer Journal*, 40(8), 1605–1608. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.04.020>
- European Medicines Agency, & Ema. (2012). Guideline on bioanalytical method validation. *EMA Guideline*, 44(July 2011), 1–23. <https://doi.org/EMA/CHMP/EWP/192217/2009>
- Evik, E., Şenel, M., & Fatih Abasyank, M. (2010). Construction of biosensor for determination of galactose with galactose oxidase immobilized on polymeric mediator contains ferrocene. *Current Applied Physics*, 10(5), 1313–1316. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.03.014>
- Farré, M., & Barceló, D. (2007). Sensor, biosensors and MIP based sensors. İçinde *Food Toxicants Analysis* (ss. 599–636). <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50017-1>
- Gross, K. C., & Acosta, P. B. (1991). Fruits and vegetables are a source of galactose: Implications in planning the diets of patients with Galactosaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14(2), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF01800599>
- Gülce, H., Ataman, I., Gülce, A., & Yildiz, A. (2002). A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00452-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00452-5)
- Hu, O. Y., Hu, T. -M., & Tang, H. -S. (1995). Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: Comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(2), 231–235. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840223>
- Kanyong, P., Pemberton, R. M., Jackson, S. K., & Hart, J. P. (2013). Development of an amperometric screen-printed galactose biosensor for serum analysis. *Analytical Biochemistry*, 435(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2013.01.006>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 1–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Kim, M. Il, Shim, J., Li, T., Woo, M. A., Cho, D., Lee, J., & Park, H. G. (2012). Colorimetric quantification of galactose using a nanostructured multi-catalyst system entrapping galactose oxidase and magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *Analyst*, 137(5), 1137–1143. <https://doi.org/10.1039/c2an15889b>
- Lalrempuia, R., Kollipara, M. R., Carroll, P. J., Yap, G. P. A., & Kreisel, K. A. (2005). Syntheses and characterization of cyano-bridged homo and hetero bimetallic complexes containing η^5 and η^6 -cyclic hydrocarbons. *Journal of Organometallic Chemistry*, 690(17), 3990–3996. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2005.05.044>
- Lee, K. N., Lee, Y., & Son, Y. (2011). Enhanced sensitivity of a galactose biosensor fabricated with a bundle of conducting polymer microtubules. *Electroanalysis*, 23(9), 2125–2130. <https://doi.org/10.1002/elan.201100183>

- Li, Y., Ptolemy, A. S., Harmonay, L., Kellogg, M., & Berry, G. T. (2011). Ultra fast and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry based assay for galactose-1-phosphate uridylyltransferase and galactokinase deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.018>
- Marazuela, M. D., Cuesta, B., Moreno-Bondi, M. C., & Quejido, A. (1997). Free cholesterol fiber-optic biosensor for serum samples with simplex optimization. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(3), 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)85341-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)85341-9)
- Mulchandani, A., & Pan, S. (1999). Ferrocene-conjugated m-phenylenediamine conducting polymer-incorporated peroxidase biosensors. *Analytical biochemistry*, 267(1), 141–147. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2983>
- Nikolelis, D. P., & Nikoleli, G. P. (2018). Nanotechnology and biosensors. İçinde *Nanotechnology and Biosensors*. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00358-0>
- Pruden, B. B., Pineault, G., & Loutfi, H. (1975). A thin-layer chromatographic method for the quantitative determination of d-mannose, d-glucose and d-galactose in aqueous solution. *Journal of Chromatography A*, 115(2), 477–483. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)98950-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)98950-2)
- Ryabov, A. D., Sukbarev, V. S., Alexandrova, L., Le Lagadec, R., & Pfeffer, M. (2001). New synthesis and new bio-application of cyclometalated ruthenium(II) complexes for fast mediated electron transfer with peroxidase and glucose oxidase. *Inorganic Chemistry*, 40(25), 6529–6532. <https://doi.org/10.1021/ic010423h>
- Scheller, F. W., Schubert, F., Renneberg, R., Müller, H. G., Jänchen, M., & Weise, H. (1985). Biosensors: trends and commercialization. *Biosensors*. [https://doi.org/10.1016/0265-928X\(85\)80001-8](https://doi.org/10.1016/0265-928X(85)80001-8)
- Şenel, M., Bozgeyik, I., Çevik, E., & Fatih Abasiyanik, M. (2011). A novel amperometric galactose biosensor based on galactose oxidase-poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Synthetic Metals*, 161(5–6), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2010.12.025>
- Sohail, M., & Adeloju, S. B. (2016). Nitrate biosensors and biological methods for nitrate determination. İçinde *Talanta* (C. 153, ss. 83–98). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.002>
- Sung, W. J., & Bae, Y. H. (2006). Glucose oxidase, lactate oxidase, and galactose oxidase enzyme electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 114(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.04.027>
- Švancara, I., Vytrás, K., Kalcher, K., Walcarius, A., & Wang, J. (2009). Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. İçinde *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.200804340>
- Tkac, J., Whittaker, J. W., & Ruzgas, T. (2007). The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.014>
- Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: Sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>
- Vaca, G., Sanchez-Corona, J., Medina, C., Olivares, N., Rivera, H., Hernández, A., Ibarra, B., Sotomayor, J. M., & Cantó, J. M. (1978). Galactosemia as a result of galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Archivos de Investigacion Medica*, 9(3).
- Xie, J., Chen, C., Zhou, Y., Fei, J., Ding, Y., & Zhao, J. (2016). A Galactose Oxidase Biosensor Based on Graphene Composite Film for the Determination of Galactose and Dihydroxyacetone. *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.201500486>
- Zhang, X., Cui, Y., Lv, Z., Li, M., Ma, S., Cui, Z., & Kong, Q. (2011). Carbon nanotubes, conductive carbon black and graphite powder based paste electrodes. *International Journal of Electrochemical Science*.

Determination of Antioxidant Activity of The Leaves of Hawthorn (*Crataegus Monogyna*)

Emrah DİKİCİ^{1*}, Ekrem KÖKSAL²

Highlights:

- Hawthorn as a natural source of antioxidants
- The role of free radicals in degenerative diseases such as cancer, aging and cardiovascular disorders

Keywords:

- Hawthorn
- *Crataegus monogyna*
- Antioxidant activity
- Metal reduction

ABSTRACT:

This study was carried out to make decision the antioxidant activity of the leaves of hawthorn (*Crataegus monogyna*), which is a natural source of antioxidants. For this purpose, the leaves of hawthorn were collected and dried, and an ethanol extract was prepared. Total antioxidant activity (with respect to the ferric thiocyanate method), ion reduction capacity of Cu²⁺ (copper method), and Fe³⁺ (potassium ferricyanide reduction method) were determined on the prepared ethanol extracts. Additionally, scavenging activity of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and determination of the total phenolic-flavonoid compound content were carry out. The extracts obtained from Hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves were found to inhibit lipid peroxidation (of linoleic acid emulsion) by 40.9%. This inhibition occurred at a concentration of 10 µg/mL of the extracts. At the similar concentration, BHT exhibited 68.3% inhibition, while trolox exhibited 29.9% inhibition. Hawthorn (*Crataegus monogyna*), which was found to have a higher total phenolic content than trolox, exhibited significant DPPH scavenging and metal reduction activities. During the investigation of the antioxidant activity of the ethanol extract obtained from *Crataegus monogyna*, α-tocopherol, its water-soluble analogue trolox and BHT (butylated hydroxytoluene) were utilized as reference antioxidant compounds.

¹Emrah DİKİCİ ([Orcid ID: 0000-0002-3086-8156](https://orcid.org/0000-0002-3086-8156)) Aksaray University, Scientific and Technological Application and Research Center, Aksaray, Türkiye

²Ekrem KÖKSAL ([Orcid ID: 0000-0002-1026-972X](https://orcid.org/0000-0002-1026-972X)), Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Department of Biochemistry, Erzincan, Türkiye

*Corresponding Author: Emrah DİKİCİ, e-mail: emrah.dikici25@gmail.com

This study was produced from Emrah DİKİCİ's Master's thesis.

INTRODUCTION

According to recent studies on degenerative diseases (i.e. aging, cancer, cataracts and cardiovascular diseases) it has been revealed that free radicals play a key role in the body (Atoui et al., 2005). It is widely accepted that the research on free radicals began with Gomberg's proof of the existence of the triphenylmethyl radical ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$) in 1900 (Gomberg, 1900).

Free radicals, contain one or more unpaired electrons in an orbital. Despite variations in their activities, radicals are generally less stable than non-radical species. Almost every radical species can interact with another radical or molecule through different mechanisms. The selectivity of these interactions depends on the concentration of radicals, the localization of unpaired electrons in the radical, and the presence of weak bonds in the molecules that radicals interact with (Perkins et al., 1996; Demir et al., 2016).

Oxygen and its derivatives are highly reactive molecules that can cause functional impairment or destruction of proteins, lipids, and nucleic acids. This can lead to cell death, tissue damage, and various diseases (i.e. neural disorders, inflammations, cancer, cardiovascular diseases, atherosclerosis and skin irritations). Due to these effects, they are referred to as reactive oxygen species (ROS) (Bar-Or, 2015; Aggul et al., 2020). In addition to ROS, certain reactive nitrogen species (RNS) are also formed in the body, and both RO and RN species are significant contributors to oxidative stress. Reactive species can occur due to both internal and external sources (i.e. air pollution, smoke, radiation, free transition metal ions and pesticides) (Gulcin et al., 2003; Koksals, 2007).

The reaction between reactive oxygen species and biomolecules occurs in a radical chain reaction manner, and oxidative damage also follows a chain mechanism. This chain reaction generates new reactive species that can further damage other biomolecules. This process becomes more prominent in the organism as time progresses (Szweda, 2002; Grune et al., 2004).

In response to the detrimental effects of reactive species mentioned above, organisms have developed systems to prevent or tolerate these effects. The most significant barrier against oxidative damage is the stark difference between the oxygen concentration in the atmosphere (150 mmHg) and the oxygen concentration in tissues (30 mmHg) (Mavi, 2005).

Living organisms need to protect themselves against free radicals and the toxic effects of normal oxygen metabolism. Especially aerobes have various defense systems against reactive oxygen and nitrogen species. These systems are generally referred to as the "Antioxidant System" (Bursal, 2009). Antioxidants serve as radical scavengers in our body by inhibiting lipid peroxidation and other free radical reactions. In this way, they help prevent various diseases caused by radicals (Gencaslan, 2007).

In the organism, RO and RN species are continuously generated, and the unwanted effects of these species are counteracted by the antioxidant system. This situation maintains a balance in a continuous manner. The disruption of this balance in favor of oxidants is referred to as "Oxidative Stress" (Köksal, 2007; Aggul et al., 2022). Antioxidants may put a limit on the effects of ROS by giving a hydrogen atom or forming a metal chelate complex. (Prakash et al., 2007; Kavaz et al., 2021). Antioxidants require the presence of other acceptors alongside them to be able to donate the electrons they receive. Therefore, naturally occurring antioxidants that are similar to each other and coexist possess greater value compared to synthetic uniformly antioxidants (Caliskan, 2006).

Synthetic antioxidants (i.e. BHT and butylated hydroxyanisole (BHA)) are utilized as food additives to prevent lipid oxidation. However, due to their toxic and potentially carcinogenic effects, the usage of BHA and BHT is restricted by legal regulations. Therefore, consumer trends indicate an increasing demand for natural and trustworthy antioxidants (Köksal et al., 2011; Aras et al., 2018). This

highlights the importance of researching natural sources of antioxidants for human health (Stoilova et al., 2007; Aras et al., 2016). According to Baytop, Hawthorn leaves are the leaf parts of the tree, which can reach up to 10 meters in height and belong to the Hawthorn species (*Crataegus monogyna*). The tree is thorny and bears white or pink flowers. There are around 20 *Crataegus monogyna* species in Turkey. The fruit is 6-10 mm in diameter, 1-3-seeded, and has a brownish-red or red color. It is a common plant in western and southern Anatolia (Baytop, 1999).

The leaf and flower of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) were recognized as a modern herbal medicine and published in the official German gazette on July 19, 1994 (Heftnummer:133, ATC-code:c01EF). They are also available as ready-made medications (Crægium, Crataegutt, Crataegysat, Faros, Orthangin) in Europe. Additionally, Hawthorn leaf and flower are included in the monographs of ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) and WHO (World Health Organization). There are numerous studies in the literature related to Hawthorn (*Crataegus monogyna*). Among these, the antioxidant effects in in vivo and in vitro settings and the preventive effect against selenite-induced cataracts are prominent research areas (Wang et al., 2011a).

In another experimental study conducted by Wang et al., the antioxidant capacity of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) fruit was determined (Wang et al., 2011b). Furthermore, the microwave-assisted extraction of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) fruit was investigated for its antioxidant activity and surface methodology of polyphenols (Liu et al., 2010). Park et al. investigated the changes in phenolic ingredient and antioxidant activity of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) fruit throughout different stages of ripening (Park et al., 2010). Dalli et al., carried out a study on the inhibitory effect of extracts of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) on neutrophil functions in humans. (Dalli et al., 2008). In a study conducted by Kilic and Sengun in 2023, the bioactive properties of Kombucha beverages produced from Hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves were determined (Kilic & Sengun, 2023).

Here, it was aimed to compare the antioxidant features of extracts obtained from Hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves with standard antioxidants like trolox, α -tocopherol, and BHT.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Neocuprine (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) radical, 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonic acid)-1,2,4-triazine (Ferrozin), linoleic acid, α -tocopherol, polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20), and trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany. Potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), gallic acid, FCR, quercetin, aluminum nitrate (Al(NO₃)₃), and trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany. Ammonium thiocyanate was purchased from Merck.

Collection of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) Leaves and Preparation of Sample Extracts

Plant samples were gathered in Bağıštaş, İliç, Erzincan. The identities of plants were confirmed by Assoc. Prof. Dr. Mustafa Korkmaz from Erzincan University. The plant leaves were subsequently divided into small pieces and dried (at room temperature). After this process, the dried samples were kept in the dark until they were used in the experiments For ethanol extraction, 20 g of powdered hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves were blended and pulverized. The sample was then mixed with twenty times its volume of ethanol (400 ml) in a closed-neck flask and stirred on a magnetic stirrer for 24 h. The obtained ethanol extract was filtered through filter paper. The filtered extracts were combined and the ethanol was evaporated at 40°C using an evaporator (Heidolph 94200, Bioblock Scientific, Germany). The sample was put in to fridge (-20°C).

Determination of Total Antioxidant Activity

The total antioxidant activity was made decision by utilizing the ferric thiocyanate method (Mitsuda et al., 1966). Firstly, stock solutions were prepared. To this end, 20 mg of ethanol extracts were thawed in 20 ml of ethanol. The stock solutions were pipetted into weighing boats using automatic pipettes to achieve the desired concentration, and the volume was arranged to 2.5 ml with a buffer solution.

Subsequently, linoleic acid emulsion (2.5 ml) was added to each weighing dish (2.5 ml of linoleic acid emulsion and 2.5 ml of buffer solution were utilized as a control). The incubation temperature was set at 37°C. A 100 µl sample were received from each weighing dish and transferred to separate test tubes including amount of 4.7 ml ethanol (this was done every 6 hours). Then, Fe²⁺ solution (100 µl) and SCN⁻ (100 µl) solution were added. A blind sample was made ready by adding Fe²⁺ (100 µl) and SCN⁻ (100 µl) solutions to a tube including 4.8 ml of ethanol. The samples were measured at 500 nm absorbance value.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The determination of total reducing power was performed utilizing the Oyaizu method (Yen & Chen 1995). Freshly prepared stock solutions were taken from each at concentrations of 10, 20, and 30 µg/ml, and taken into tubes. The volume was adjusted to 1 ml with pure water. Subsequently, phosphate buffer (2.5 ml, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] (2.5 ml, 1%) were transferred to each tube. The mixture was then waited (50°C, 20 min). Subsequently these steps, 2.5 ml of TCA (trichloroacetic acid, 10%) was added to the reaction mixture. Afterwards, 2.5 ml of the solution was taken from the upper phase, and 2.5 ml of pure water and FeCl₃ (0.5 ml, 0.1%) were added. The absorbance value was measured at 700 nm wavelength. Pure water was utilized as the blank sample. Water was utilized as a control instead of the sample.

Cupric Ions Reducing Assay (CUPRAC)

The copper ion (Cu²⁺) reduction capacities of the ethanol extract from hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves were made decision by using a slight modification of the CUPRAC method, as employed by Apak et al. (Apak et al., 2006). First of all, CuCl₂ (0.25 ml, 0.01 M) solution was taken into the tubes. Then, ethanolic solution (0.25 ml, 7.5x10⁻³ M) of neocuprine and ammonium acetate buffer (0.25 ml, 1 M) were added. After mixing the solution, the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves and standards were added at different concentrations (10-30 µg/ml). Subsequently incubation (30 min.), absorbance measurements were carried out and recorded (at a wavelength of 450 nm). The increasing absorbance of the reaction mixture shows the incremented copper ion (Cu²⁺) reduction capacity.

DPPH· Scavenging Activity

DPPH· free radical scavenging test was execute following the method defined by Blois (Blois, 1958). A 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 1 mM) was utilized as the free radical. Stock solutions were transferred to the tubes to create solutions at concentrations of 10, 20, and 30 µg/µl, and the total volume was arranged to 3 ml with pured ethanol. Then, the stock DPPH· solution (1 ml) was transferred to each sample tube. After waiting (in the dark and room temperature, 30 min) the absorbances at 517 nm were recorded against the ethanol blank. As controls, 3 ml of ethanol and 1 ml of DPPH· solution were utilized. The decrease in absorbance indicated the remaining amount of DPPH· solution, thus representing the free radical scavenging activity.

Determination of Total Phenolic Content

The total phenolic compound ingredient in the extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves was made decision by using the FCR (Folin-Ciocalteu reagent) method (Singleton et al., 1999). A standard curve was first plotted utilizing gallic acid as the standard phenolic compound. For this, gallic acid (25 mg) was dissolved in pure water (25 ml), resulting in a stock solution with a concentration of 1 mg/ml. From this stock solution, different concentrations (100, 200, 400, 500, and 600 µg of gallic acid) were transferred to separate tubes. The volumes of the tubes were adjusted to 23 ml with pure water. To each flask, Folin-Ciocalteu reagent (0.5 ml, FCR) were supplemented, and after waiting for 3 minutes, Na₂CO₃ (1.5 ml, 2%) solution was transferred. The mixture was mixed (at room temperature, 2 h), and the absorbance of the samples was recorded at 760 nm against the blank sample, which consisted of distilled water. Distilled water was used as a control in place of the sample. The total phenolic compound content in the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves was appraised with the method carried out by Gulcin et al. (Gulcin, 2005).

From each previously prepared stock solution, 1000 µl was taken and transferred to weighing boats, and the sum was arranged to 23 ml with pure water. To the mixture, 0.5 ml of FCR (Folin-Ciocalteu reagent) was added, followed by the addition of 1.5 ml of 2% Na₂CO₃ solution after 3 minutes. The samples were mixed at room temperature for two hours. After this process, the absorbance of the samples were measured at 760 nm. These measuring was repeated three times. The amount of gallic acid equivalent (GAE) corresponding to the absorbance values of the samples was determined using the following equation (The equation was obtained from the standard curve). The results were calculated based on the equation with an equality of 1, and the gallic acid equivalent (GAE) amounts were presented in micrograms (µg) ($r^2: 0.9884$).

$$\text{Absorbance}_{(\lambda 760\text{nm})} = 0,002 \times [\text{Gallic acid}] + 0,0025 \quad (1)$$

Determination of Total Flavonoid Content

The total flavonoid ingredient in the extracts of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves was determined using the method developed by Park et al. Quercetin was utilized as the standard. For this purpose, a standard curve was first plotted. The stock solution was prepared by dissolving the standard in pure water at a concentration of 1 mg/mL (quercetin-25 mg were thawed in pure water-25 ml). From this stock solution, different concentrations (10, 20, 30, 40, and 50 µg of quercetin) were transferred to test tubes. Then, to each tube, sequentially, a solution of CH₃COO⁻ (1 M, 0.1 ml) prepared in water and Al(NO₃)₃ solution (10%, 0.1 ml) were added. The volume of each tube was completed with 4.3 ml of ethanol solution and vortexed. After incubating (at room temperature, 40 min.), the absorbances were recorded at 415 nm against the ethanol blank. The concentration of flavonoids was calculated in quercetin equivalents (QE) using the following equation derived from the standard curve (with quercetin as the standard compound).

$$\text{Absorbance}_{(\lambda 415\text{nm})} = 0,0147 \times [\text{Quercetin}] \quad (2)$$

To determine the total flavonoid ingredient in the ethanol extracts of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves, stock solutions utilized for the determination of total phenolic compounds were transferred to test tubes containing 1000 µg of extract in each. Subsequently, the various amounts of extracts added to the tubes were diluted with ethanol solution (4.3 ml) including potassium acetate (0.1 ml, 1 M) prepared in water and aluminum nitrate solution (0.1 ml, 10%). The mixtures were vortexed. After incubating (at room temperature) for 40 minutes, the absorbances were recorded at 415 nm in the same manner.

RESULTS AND DISCUSSION

Total Antioxidant Activity

The total antioxidant activity of ethanol extracts obtained from hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves was determined using concentrations of 10 µg/ml, as shown in Figure 1. As depicted in the figure, the total antioxidant activity of the ethanol extract from hawthorn leaves increased proportionally with the increasing concentration.

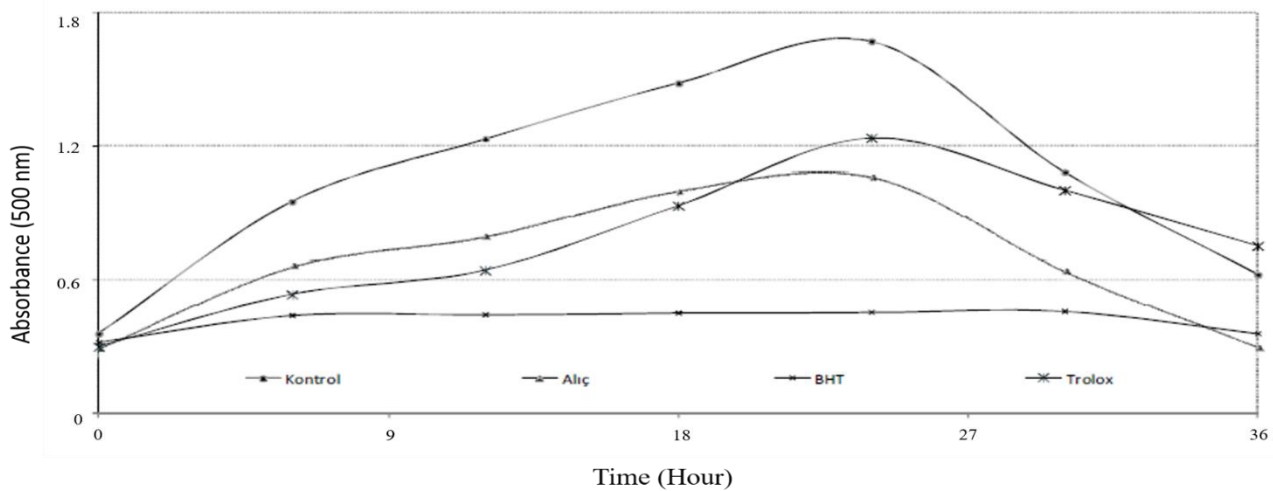


Figure 1. Comparison of the total antioxidant activity of the ethanol extract obtained from hawthorn (*Crataegus monogyna*) with two standard antioxidants, BHT and trolox, was performed at a concentration of 10 µg/ml

According to the determined 24-h maximum incubation period, the inhibition percentages of standard antioxidants on linoleic acid emulsion were calculated. The calculations were performed according to the following equation (3).

$$\text{Inhibition of LP (lipid peroxidation, \%)} = 100 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}} \times 100) \quad (3)$$

Here, A_{sample} represents the absorbance value of the ethanol extract at the incubation moment when the values at different concentrations reached their maximum. A_{control} represents the absorbance value at the incubation moment when reached the maximum control value. Trolox and BHT were used as positive controls (Figure 1). When compared, it was observed that the ethanol extract obtained from the leaves of hawthorn (*Crataegus monogyna*) at a concentration of 10 µg/ml inhibited linoleic acid emulsion peroxidation by 40.9%. Also, at the same concentration, trolox and BHT inhibited linoleic acid peroxidation by 68.3% and 29.9%, respectively.

FRAP Assay

The reduction capacity of the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves used in the study also increased proportionally with the increasing extract concentration, similar to the total antioxidant activity. The decrease potential of this extract was determined by measuring the absorbances of its solutions at different concentrations (10-30 µg/ml) at 700 nm (Figure 2). As can be seen from the figure, the reduction capacity was determined to be in the following order: Trolox > BHT > Hawthorn > α-tocopherol.

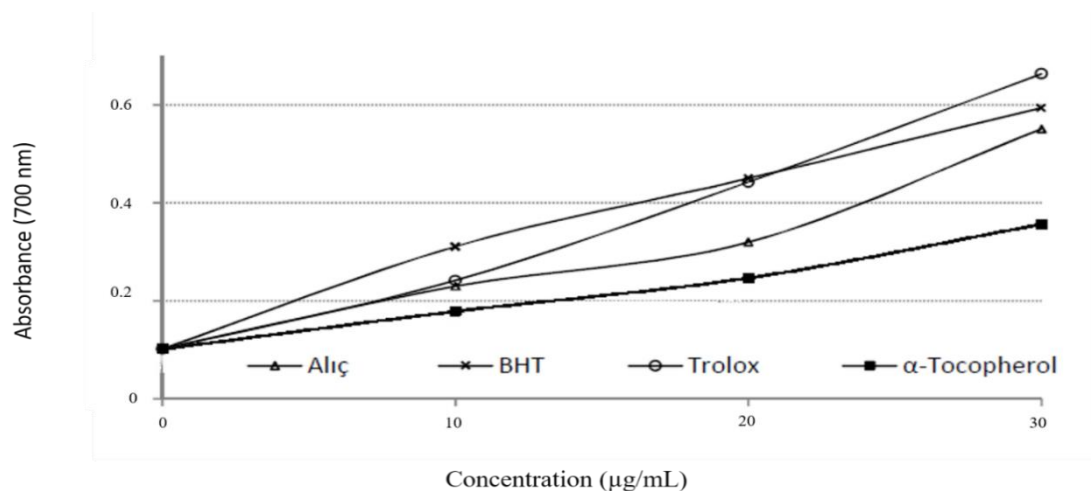


Figure 2. Comparison of the reduction capacities of the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves at different concentrations (10-30 µg/ml) with the standard antioxidants α-tocopherol, trolox, and BHT

CUPRAC Assay

The reduction capacity of the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves for copper ions (Cu^{2+}) as well as its ability to reduce ferric ions (Fe^{3+}) to ferrous ions (Fe^{2+}) increases proportionally with the concentration of the extract. Moreover, the reduction capacity of hawthorn leaves for copper ions is higher than that of the standard antioxidant, trolox. The reduction capacity of the extract for copper ions (Cu^{2+}) was determined by measuring the absorbances of its solutions at different concentrations (10-30 µg/ml) at 450 nm (Figure 3).

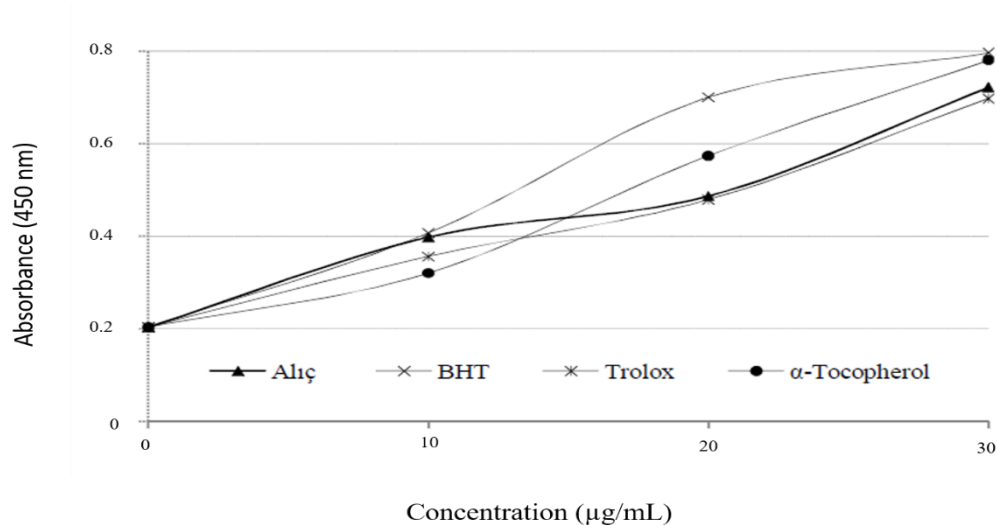


Figure 3. Comparison of the reduction capacities of copper ions (Cu^{2+}) by the ethanol extract obtained from hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves at different concentrations (10-30 µg/ml) with the standard antioxidants α-tocopherol, trolox, and BHT

DPPH Assay

Hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves exhibited different effects in scavenging the DPPH free radical. As observed from Figure 4, the scavenging activity of the DPPH· free radical was determined to be in the following order: α-tocopherol > Trolox > Hawthorn > BHT. The ethanol extract of hawthorn leaves showed lower but comparable scavenging activity compared to the standards. Additionally, it was determined that hawthorn leaves had a higher capability to scavenge DPPH free radicals compared to BHT.

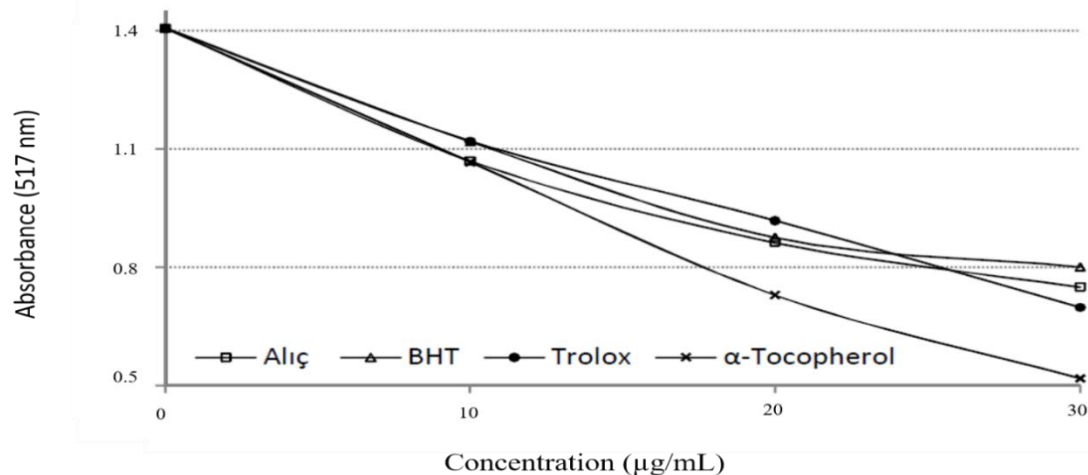


Figure 4. Comparison of the scavenging activities of DPPH free radicals by the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves at different concentrations (10-30 µg/ml) with the standard antioxidants BHT, α-tocopherol, and trolox

Total Phenolic and Flavonoid Content

According to the standard curve of gallic acid, the ethanol extract obtained from hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves contained 161 µg of phenolic compounds per 1 mg. It was found that the total flavonoid compound content in 1 mg of ethanol extract was 55.6 µg quercetin equivalent (QE) (The standard curve created with quercetin was used for the calculation) (Table 1).

Table 1. Equivalent amount of total phenolic and flavonoid compounds in 1 mg of ethanol extract obtained from hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves

Radicals	Total phenolic compound (µg GAE /mg extract)	Total flavonoid compound (µg QE /mg extract)
Hawthorn (<i>Crataegus monogyna</i>)	161	55.6

CONCLUSION

The antioxidant properties of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaf extracts were determined using various in vitro tests. These tests included total antioxidant activity using the ferric thiocyanate method, scavenging of DPPH· free radicals, CUPRAC test, FRAP test, determination of total flavonoid content, and determination of total phenolic compound content.

An increase in total antioxidant activity, reduction capacity, and DPPH· radical scavenging activity was observed in the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves at the tested concentrations (10-30 µg/ml), indicating a positive correlation with increasing concentration.

In the comparison of antioxidant and antiradical studies, standard substances such as BHT, α-tocopherol, and trolox were used. It was observed that in some antioxidant analyses, the activity of the ethanol extract of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves was higher than that of the standards at the same concentrations. There appears to be a correlation between the metal-reducing and free radical scavenging capacities of hawthorn ethanol extracts and their phenolic and flavonoid contents. While the ethanol extracts of hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaf parts exhibited high activity in metal reduction and DPPH· free radical scavenging measurements, the situation was reversed in total antioxidant activity assays. This can be easily explained by the fact that the ethanol extracts of hawthorn leaf parts contain higher amounts of phenolic and flavonoid compounds compared to the standards, indicating their superior reducing and free radical scavenging abilities.

In conclusion, hawthorn (*Crataegus monogyna*) leaves can be considered as a natural source of antioxidants that can be utilized in both pharmaceutical and dietary products.

ACKNOWLEDGEMENTS

In this study, I would like to express my gratitude to Associate Professor Dr. Mustafa Korkmaz from the Department of Biology at Erzincan Binali Yıldırım University for his assistance in the taxonomic identification of the plant used.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Aggul, A. G., Gulaboglu, M., Cetin, M., Ozakar, E., Ozakar, R. S., & Aydin, T. (2020). Effects of emulsion formulations of oleuropein isolated from ethanol extract of olive leaf in diabetic rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.
- Aggul, A.G., Demir, G.M. & Gulaboglu, M. (2022). Ethanol Extract of Myrtle (*Myrtus communis L.*) Berries as a Remedy for Streptozotocin-Induced Oxidative Stress in Rats. *Appl Biochem Biotechnol*, 194, 1645–1658.
- Apak, R., Guclu K., Ozyurek, M., Karademir S.E., & Erca E. (2006). The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 292–304.
- Aras, A., Dogru, M., & Bursal, E. (2016). Determination of antioxidant potential of *Nepeta nuda* subsp. *lydiae*. *Analytical Chemistry Letters*, 6(6), 758-765.
- Aras, A., Bursal, E., Alan, Y., Turkan, F., Alkan, H., & Kılıç, Ö. (2018). Polyphenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Satureja boissieri*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 37(6), 209-219.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27-36.
- Bar-Or, D., Bar-Or, R., Rael, L.T., & Brody, E.N. (2015). Oxidative stress in severe acute illness, *Redox Biol.*, 4, 340-345.
- Baytop T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul: Savaş Cilt Evi, Nobel Tıp Kitabevleri, 146-147, 194-195
- Blois, (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 26, 1199–1200.
- Bursal, E. (2009). *Kivi meyvesinin (Actinidia deliciosa) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu*, (PhD Thesis, Atatürk University), Erzurum.
- Caliskan, E. (2006). *İğde çiçeği (Elaeagnus angustifolia) ve Kedi nanesi (Nepeta catoria) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi*, (MSc. Thesis, Tokat University), Tokat.
- Dalli, E., Milara, J., Cortijo, J., Morcillo, E.J., Cosin-Sales, J., & Sotillo, J.F. (2008). Hawthorn extract inhibits human isolated neutrophil functions”, *Pharmacological Research*, 445-450.
- Demir, G. M., Gulaboglu, M., Aggul, A. G., Baygatalp, N. K., Canayakin, D., Halici, Z., & Suleyman, H. (2016). Antioxidant and antidiabetic activity of aqueous extract of *Myrtus Communis L.* berries on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Biol. Sci*, 11(5), 11-16.
- Gencaslan, G. (2007). *Türkiye’de tıbbi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin antioksidan etkilerinin taranması*, (MSc. Thesis, Ankara University), Ankara.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K., & Davies, K.J.A. (2004). “Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and ‘aggresomes’ during oxidative stress, aging, and disease”, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 2519-2530.
- Gomberg, M. (1900). An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl. *Journal of the American Chemical Society*. 22(11), 757–771.

- Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E., & Küfrevioğlu, Ö.İ. (2003). "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts", *Food Chemistry*, 83, 371–382.
- Gulcin, I. (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper Nigrum*) seeds", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499.
- Isık, M., Dikici, E., Tohma, H., & Koksak, E. (2017). Antioxidant Activity and Total Phenolic/Flavonoid Contents of *Phlomis pungens* L., *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 2017, 45 (3), 425–433.
- Kavaz, A., Isık, M., Dikici, E., & Yuksel, M. (2022). Anticholinergic, Antioxidant, and Antibacterial Properties of *Vitex Agnus-Castus* L. Seed Extract: Assessment of Its Phenolic Content by LC/MS/MS, *Chem. Biodiversity*, 19, e202200143.
- Kilic, G. & Sengun, I.Y., (2023). Bioactive properties of Kombucha beverages produced with Anatolian hawthorn (*Crataegus orientalis*) and nettle (*Urtica dioica*) leaves, *Food Bioscience*, 53, 102631
- Koksak, E. (2007). *Karnabahar (Brassica oleracea L.) peroksidaz enziminin saflastırılması ve karakterizasyonu, antioksidan ve antiradikal aktivitesinin belirlenmesi*, (PhD Thesis, Atatürk University), Erzurum.
- Koksak, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu F., & Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 5(2), 217-222.
- Liu, J.L., Yuan, J.F., & Zhang, Z.Q. (2010). Microwave-assisted extraction optimised with response surface methodology and antioxidant activity of polyphenols from hawthorn (*Crataegus monogyna* pinnatifida Bge.) fruit, *International Journal Of Food Science And Technology*, 2400-2406.
- Mavi, A. (2005). *İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflastırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi*, (PhD Thesis, Atatürk University), Erzurum.
- Mitsuda, H., Yasumoto, K., & Iwami K. (1966). Antioxidativ action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid, *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210–214.
- Park, Y., Choi, S., Hwang, S., & Lee, K. (2010). Changes of phenolics and antioxidant activity during hawthorn (*Crataegus monogyna* pinnatifida Bunge) fruit ripening", *Planta Medica*, 1276-1277.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., & Contado, J.L. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil, *Arquivos de Biologiae Tecnologia*, 40, 97–106.
- Perkins, L.A., Johnson, M.R., Melnick, M.B., & Perrimon, N. (1996). The nonreceptor protein tyrosine phosphatase corkscrew functions in multiple receptor tyrosine kinase pathways in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 180(1), 63-81.
- Prakash, D., Upadhyay, G., Singh, B.N., & Singh, H.B. (2007). Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem.*, 104, 783-790.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., & Gargova, S. (2007). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chem.*, 102, 764-770.
- Szweda, P.A., Friguet, B., & Szweda, L.I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 29–36.
- Vernon, L., Singleton, R. O., Rosa, M. & Lamuela-Raventós. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Wang, H., Zhang, ZS., Guo, Y., Sun, P., Lv, XL., & Zuo, YB. (2011a). Hawthorn fruit increases the antioxidant capacity and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice, *European Food Research And Technology*, 743-751.
- Wang, T., Zhang, P., Zhao, C.F., Zhang, Y., Liu, H., Hu, L.M., Gao, X.M., & Zhang, D.Q. (2011b). Prevention effect in selenite-induced cataract in vivo and antioxidative effects in vitro of *crataegus monogyna* pinnatifida leaves, *Biological Trace Element Research*, 106-116.
- Yen, G.C. & Chen, H.Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27–32.

Atf İçin: Palas, B., Ersöz, G. ve Atalay, S. (2023). Tabakalı Çift Hidroksit Katalizörler Kullanılarak Peroksimonosülfat ve Hidrojen Peroksit Aktivasyonu ile Gıda Boyalarının Giderimi: Box-Behnken Tasarımı ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2790-2808.

To Cite: Palas, B., Ersöz, G. & Atalay, S. (2023). Removal of Food Dyes by Peroxymonosulfate and Hydrogen Peroxide Activation Using Layered Double Hydroxide Catalysts: Optimization of Reaction Conditions by Box-Behnken Design. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2790-2808.

Tabakalı Çift Hidroksit Katalizörler Kullanılarak Peroksimonosülfat ve Hidrojen Peroksit Aktivasyonu ile Gıda Boyalarının Giderimi: Box-Behnken Tasarımı ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Burcu PALAS^{1*}, Gülin ERSÖZ¹, Süheyda ATALAY¹

Öne Çıkanlar:

- Tabakalı çift hidroksit katalizörlerin peroksimonosülfat ve hidrojen peroksit aktivasyonu performansları karşılaştırılmıştır
- Reaksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir.
- Co-Fe-Tabakalı Çift Hidroksit katalizör ile %97.47 renk giderimi elde edilmiştir

ÖZET:

Bu çalışmada, çeşitli tabakalı çift hidroksit (TÇH) katalizörlerinin peroksimonosülfat ve hidrojen peroksit aktivasyonu performansları, model gıda boyası olarak seçilen tartrazinin sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında test edilmiştir. Cu-Fe-TÇH, Co-Fe-TÇH ve Ni-Fe-TÇH'nin peroksimonosülfat ve hidrojen peroksit varlığında katalitik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Farklı oksidanlar kullanılarak gerçekleştirilen katalizör tarama deneylerinde Co-Fe-TÇH ve peroksimonosülfat en uygun katalizör ve oksidan olarak belirlenmiştir. Katalizör yüklemesi, pH ve oksidan/boya molar oranının etkileşimli etkileri araştırılmış ve Box-Behnken Design ve tepki yüzeyi metodolojisi kullanılarak reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. 2 g/L katalizör yüklemesi, pH 3 ve 11,36 oksidan/boya molar oranı olarak belirlenen optimum reaksiyon koşullarında %87.35 organik madde giderimi ve %97.47 renk giderimi elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- Tabakalı Çift Hidroksit,
- Gıda Boyası, Box-Behnken Tasarımı
- İleri Oksidasyon Prosesleri
- Peroksimonosülfat Aktivasyonu
- Hidrojen Peroksit Aktivasyonu

Removal of Food Dyes by Peroxymonosulfate and Hydrogen Peroxide Activation Using Layered Double Hydroxide Catalysts: Optimization of Reaction Conditions by Box-Behnken Design

Highlights:

- Peroxymonosulfate and hydrogen peroxide activation performances of layered double hydroxide catalysts were compared
- Reaction conditions are optimized using the response surface method
- 97.47% decolorization was achieved with Co-Fe-Layered Double Hydroxide catalyst

ABSTRACT:

In the present study, peroxymonosulfate and hydrogen peroxide activation performances of various layered double hydroxide (LDH) catalysts were tested for the removal of the model food dye, tartrazine, from aqueous solutions. Catalytic activities of Cu-Fe-LDH, Co-Fe-LDH and Ni-Fe-LDH were compared in the presence of peroxymonosulfate and hydrogen peroxide. In the catalyst screening experiments performed by using different oxidants, Co-Fe-LDH and peroxymonosulfate were determined as the most suitable catalyst and the oxidant, respectively. The interactive effects of the catalyst loading, pH and the molar ratio of the oxidant to dye were investigated and the reaction conditions were optimized by using Box-Behnken Design and response surface methodology. Under the optimum reaction conditions determined as 2 g/L of catalyst loading, pH 3, and 11.36 oxidant/dye molar ratio, 87.35% organic matter removal and 97.47% decolorization efficiencies were achieved.

Keywords:

- Layered Double Hydroxide
- Food Dye
- Box-Behnken Design
- Advanced Oxidation Processes,
- Peroxymonosulfate Activation,
- Hydrogen Peroxide Activation

¹ Burcu PALAS (Orcid ID: 0000-0002-2815-0057), Gülin ERSÖZ (Orcid ID: 0000-0002-5875-5946), Süheyda ATALAY (Orcid ID: 0000-0002-1703-1044), Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Burcu PALAS, e-mail: burcu.palas@ege.edu.tr

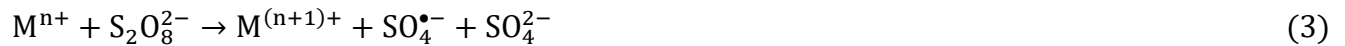
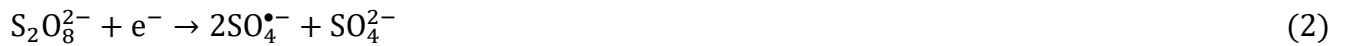
GİRİŞ

Gıda, tekstil, deri, plastik, kağıt, kozmetik ve ilaç endüstrisi dahil olmak üzere çeşitli sektörlerde yaygın olarak kullanılan boyar maddelerin atıksular ile su kaynaklarına taşınması önemli küresel çevre sorunlarından biridir. Boyar maddelerin çoğunun doğada mutajenik, toksik etkilerinin olduğu ve kansere neden olduğu bilinmektedir. Her yıl yaklaşık 7×10^5 ton boya deşarj edilmektedir. Boyar madde içeren atıksular ışığın penetrasyonunu ve fotosentezi azaltarak sucul yaşam için bir tehdit oluşturmaktadır (Farhan Hanafi ve Sapawe, 2020; Rathee ve ark., 2019; Vashisht ve ark., 2022).

Gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılan tartrazin suda çözünürlüğü yüksek bir azo boyar maddedir. Tartrazin enerji verici içecekler, ekmek, cips, dondurma, sakız, jelatin ve yoğurt gibi gıda maddelerinin yanı sıra ilaç endüstrisinde kapsül şeklinde kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda, tartrazinin alerjileri tetiklediğini ve genotoksik ve sitotoksik etkilere neden olabileceği açıklanmıştır (Alcantara-Cobos, Gutiérrez-Segura, Solache-Ríos, Amaya-Chávez, ve Solís-Casados, 2020; Dos Santos ve ark., 2022; Villabona-Ortiz, Figueroa-Lopez ve Ortega-Toro, 2022).

Boya giderimi için uygulanan adsorpsiyon, koagülasyon, nanofiltrasyon, biyolojik arıtım gibi çok sayıda yöntem arasından ileri oksidasyon prosesleri kirleticilerin bir fazdan diğerine aktarımı yerine tamamen bozunması nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Atıksu arıtımında uygulanan çevre dostu yöntemler arasında önemli bir yere sahip ileri oksidasyon proseslerinde açığa çıkan radikaller ($\text{SO}_4^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2^-$ ve $\bullet\text{OOH}$) seçici olmaksızın geniş bir yelpazedeki organik kirleticileri H_2O , CO_2 ve basit inorganik tuzlara dönüştürmektedir (Gupta ve ark., 2022).

Bu radikallerden $\text{SO}_4^{\bullet-}$, yüksek bir redoks potansiyeli (2,5-3,1eV) ve uzun yarılanma süresi (30-40 μs) ile organik madde dönüşümünde yüksek verime sahiptir. $\text{SO}_4^{\bullet-}$ tabanlı ileri oksidasyon prosesleri son yıllarda toksik inatçı organik kirleticilerin iyileştirilmesinde artan bir ilgi görmektedir. $\text{SO}_4^{\bullet-}$, radikalleri ısıtma, ultrasonikasyon, UV ışık veya katalizör kullanarak peroksimonosülfat aktivasyonu ile açığa çıkmaktadır (Eşitlik 1-5). Peroksimonosülfat aktivasyonu için Co, Fe, Cu, Ni ve Mn gibi geçiş metalleri içeren katalizörlerin yüksek katalitik performans gösterdiği bilinmektedir (Zeng ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2018).



Katalizör kullanımı dışındaki yöntemlerin yüksek enerji tüketimi su arıtımı için pratik uygulamaları kısıtlamaktadır. Bu nedenle, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ üretimi için yüksek verimli ve çevre dostu katalizörlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Hidrotalsit benzeri malzeme olarak bilinen tabakalı çift hidroksitler (TÇH) değiştirilebilir ara katman anyonlarından oluşur ve formülü $[\text{M}^{2+}_{1-x}\text{M}^{3+}_x(\text{OH})_2](\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$ olarak ifade edilebilir. M^{2+} ve M^{3+} iki değerlikli ve üç değerlikli metalleri, A^{n-} ise ara katman anyonunu ifade etmektedir. Geniş yüzey alanı, kristal yapısı ve moleküler stabilitesi nedeniyle tabakalı çift hidroksitler atıksu arıtımına yönelik uygulamalar için umut verici çok fonksiyonlu malzemeler arasında yer almaktadır. Bakır ve demir iyonları içeren tabakalı çift hidroksitlerin kullanımı ile çok az miktarda metal geçişi ile peroksit aktivasyonu sağlanabilmektedir (Yan ve ark., 2017).

Literatürde atıksulardaki organik kirleticilerin tabakalı çift hidroksit katalizörler kullanılarak ileri oksidasyon proseslerinde giderimi üzerine yayınlanan çalışmalar yer almaktadır. Örneğin, Bai, Liu,

Yin, Duan ve Ma (2017) Co-Fe-TÇH malzemelerin Fenton benzeri oksidasyon ile nitrobenzen giderimi performansını incelemişlerdir. En yüksek giderim değeri (%100), 50 mg/L nitrobenzen başlangıç konsantrasyonu için pH = 2.7, $[H_2O_2]_0 = 500$ mg/L, katalizör dozajı = 1 g/L'de elde edilmiştir (Bai, Liu, Yin, Duan ve Ma, 2017).

Zhao ve ark. (2018) $Fe_3O_4-Cs_xWO_3/NiAl$ tabakalı çift hidroksit kompozitler ile peroksimonosülfat (PMS) aktivasyonu gerçekleştirerek PMS konsantrasyonu, pH ve reaksiyon ortamında bulunan anyonların 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin bozunması üzerine etkilerini araştırmışlardır. 20 mg/L 2,4-D, 1 g / L FCW / TÇH ve 0,50 g / L PMS kullanılarak 180 dakikada hemen %90.53 2,4-Diklorofenoksiasetik bozunumu sağlandığı rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2018). Luo ve ark. (2019) Co-Cu-Al tabakalı çift hidroksit katalizörler kullanarak 20 mg/L Asit Turuncu 7, 0.1 g/L CoCuAl-tabakalı çift oksit ve 0.1 g / L PMS deney koşullarında 30 dakika içinde %100 boya giderimi sağlamışlardır (Luo ve ark., 2019).

Yan ve ark. (2017) etilbenzenin bozunması için CuMgFe tabakalı çift hidroksit (CuMgFe-TÇH) ile kataliz edilmiş persülfat kullanmışlardır. 0,08 mmol/L etilbenzen derişimi, pH 7,6, 0,2 g/L CuMgFe-TÇH ve 4 mmol/L persülfat derişimi koşulları altında 24 saatte % 93,7 bozunma elde edilmiştir (Yan ve ark., 2017). Hong ve ark. (2019) üçlü CoMgAl tabakalı çift hidroksitleri peroksimonosülfat varlığında atrazinin sudan uzaklaştırılmasında katalizör olarak kullanmışlardır. 75 mg/L $Co_1Mg_2Al_1-TÇH$, 0,4 mM PMS, 10 mg/L atrazin başlangıç derişim ve pH 6,3 olarak belirlenen optimum koşullar altında %98,7 atrazin giderimini elde edilmiştir (Hong ve ark., 2019).

Literatürde yer alan tabakalı çift hidroksit katalizörler varlığında endüstriyel kirleticilerin oksidasyonu üzerine gerçekleştirilmiş çalışmalar değerlendirildiğinde tabakalı çift hidroksit katalizörlerin peroksimonosülfat veya H_2O_2 aktivasyonu ile organik madde gideriminde etkili olduğu ve başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Literatür incelemesi sonucunda tartrazin gıda boyasının tabakalı çift hidroksitler varlığında adsorpsiyonu üzerine çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ouassif ve ark. (2020) Zn-Al-TÇH adsorbentler (Ouassif ve ark., 2020), Shamsayei, Yamini ve Asiabi (2020) Diatomit/TÇH adsorbentler kullanarak (Shamsayei, Yamini ve Asiabi, 2020) tartrazin adsorpsiyonu gerçekleştirmişlerdir. Ancak tartrazin gıda boyasının tabakalı çift katalizörler varlığında peroksimonosülfat veya H_2O_2 oksidan kullanımıyla ileri oksidasyon proseslerinde gideriminin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma kapsamında insan ve çevre sağlığını tehdit eden endüstriyel kirleticilerin atıksulardan etkili ve çevre dostu arıtım sistemleri ile uzaklaştırılabilmesi için tabakalı çift hidroksit katalizörler hazırlanarak ileri oksidasyon proseslerinde kullanılmıştır. Gıda katkı maddelerinin gideriminde etkili katalizörlerin belirlenebilmesi için çeşitli iki değerlikli kationlar kullanılarak Cu-Fe-TÇH, Co-Fe-TÇH ve Ni-Fe-TÇH katalizörler sentezlenmiştir. Hazırlanan katalizörlerin performansları ileri oksidasyon proseslerinde peroksimonosülfat ve H_2O_2 aktivasyonu için ayrı ayrı test edilerek en uygun tabakalı çift hidroksitin belirlenmesinin yanı sıra en yüksek giderim değerlerini sağlayan oksidan da tespit edilmiştir.

Seçilen katalizör ve oksidan varlığında en uygun reaksiyon koşullarının belirlendiği parametrik çalışma planı yanıt yüzey yöntemi ile oluşturulmuştur. Merkezi kompozit tasarım, Box-Behnken tasarımı ve Doehlert matrisi, süreç optimizasyonu için uygulanan en yaygın olarak kullanılan çok seviyeli yanıt yüzey yöntemleridir. Box-Behnken tasarımının en büyük avantajı, gerekli deney sayısını azaltabilmesi ve çok sayıda faktör için kullanılabilmesidir. Prosesleri optimize etmek için sadece üç faktör seviyesi (düşük, orta ve yüksek) kullanıldığından, deneylerin hiçbiri uygun olmayan sonuçlar verebilecek koşullar altında (örneğin çok düşük pH değerleri) yapılmamaktadır. Deneysel çalışmaların

sayısı önemli ölçüde azaldığından, Box-Behnken yönteminin uygulanmasıyla zamandan tasarruf etmek mümkündür (Ba-Abbad, Chai, Takriff, Benamor ve Mohammad, 2015; Zolgharnein, Shahmoradi, ve Ghasemi, 2013).

Literatürde boyaların sudan uzaklaştırılmasında Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan deney planının kullanıldığı çok sayıda çalışma yer almaktadır. Boya gideriminde uygulanan adsorpsiyon (Alipour ve ark., 2021), fotokataliz (Buu ve ark., 2023), Fenton benzeri oksidasyonu (Soufi ve ark., 2022), peroksimonosülfat aktivasyonu (Bouzayani, Rosales, Pazos, Elaoud ve Sanromán, 2019), elektrokoagülasyon (de Oliveira ve ark., 2020) ve sonokataliz (Mahdavi ve Ashraf Talesh, 2021) gibi atıksu arıtım sistemlerin en uygun işletme koşullarının belirlenmesinde Box-Behnken tasarımı yaygın olarak uygulanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında katalizör yüklemesi, oksidan dozajı ve pH gibi parametrelerin en uygun değerleri yanıt yüzey yöntemleri ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında belirlenmiştir. Tabakalı çift hidroksitlerin peroksimonosülfat ve hidrojen peroksit aktivasyonu performanslarının karşılaştırılması ve gıda boyası oksidasyonunda çeşitli iki değerlikli metal içeren tabakalı çift hidroksitlerin katalitik aktivitelerinin test edilmesi bu çalışmanın özgün yönlerini oluşturmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar

Demir nitrat nonahidrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Merck, %99–102), bakır nitrat trihidrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Tekkim Kimya), kobalt nitrat heksahidrat ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba), nikel nitrat heksahidrat ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, %99–102) ve sodyum hidroksit (Merck, $\geq\%99$) tabakalı çift hidroksit katalizörlerini hazırlamak için kullanılmıştır. Hedef kirletici olarak tartrazin ($\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}_2$, 534.36 g/mol, Sigma Aldrich, $\geq\%85$) kullanılmıştır. Hidrojen peroksit (H_2O_2 , Merck, %35) ve Oxone[®] (potasyum peroksimonosülfat, Sigma-Aldrich) oksidan olarak tartrazinin katalitik oksidasyonunda kullanılmıştır.

Katalizör hazırlanışı ve karakterizasyonu

Tabakalı çift hidroksitler, birlikte çöktürme yöntemine göre hazırlanmıştır (Khataee ve ark., 2019; Mandal, Mayadevi ve Kulkarni, 2009; Mikami ve ark., 2016; Shi, Wang, Sun, Zhang ve Wang, 2020). İki değerlikli metal/üç değerlikli metal molar oranı 3 olacak miktarlarda iki değerlikli metal nitrat (bakır, kobalt veya nikel nitrat tuzu) ve demir nitrat nonahidrat saf suda çözülerek pH 10'a ulaşıncaya kadar 2 N NaOH çözeltisi damla damla çözeltiye ilave edilmiştir. Karıştırılan çözelti çökelek oluşumu gözlemlendikten sonra süzülerek oda sıcaklığında bekletilmiş ve son adımda 80°C'de 8 saat süre ile kurutulmuştur.

Elde edilen Cu-Fe-TÇH, Co-Fe-TÇH, ve Ni-Fe-TÇH katalizörlerin yüzey yapıları taramalı elektron mikroskopu ile Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde incelenmiştir. Katalizörlerin FT-IR spektrumları Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda 4000-400 cm^{-1} aralığında kaydedilmiştir. Katalizör seçimi deneylerinde en iyi sonuç veren tabakalı çift hidroksit için XRD ve BET yüzey alanı analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Katalizörlerin XRD deseni $2\theta=5-80^\circ$ aralığında kaydedilmiştir. BET yüzey alanı, gözenek hacmi ve gözenek botuyu analizleri 350°C ve 3 saat degaz koşulları uygulanarak yapılmıştır.

Deney sistemi ve prosedürü

Peroksimonosülfat ve hidrojen peroksit aktivasyonu deneyleri beher ve manyetik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerde 20 mg/L tartrazin çözeltilerini pH'sı istenen değere

seyreltik sülfürik asit veya sodyum hidroksit çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Belirlenen miktarda tabakalı çift hidroksit katalizör boya çözeltilisine eklenmiştir. Katalizörlerin adsorpsiyon ve oksidasyon performanslarının ayırt edilebilmesi için adsorpsiyon dengesine ulaşıncaya kadar oksidan eklemekten sadece katalizör varlığında karıştırma uygulanmıştır. Yarım saat sonunda oksidan olarak peroksimonosülfat veya hidrojen peroksit eklenip karıştırma uygulanarak bir saatlik oksidasyon gerçekleştirilmiştir.

Deneysel Planı

Katalizör ve oksidan seçimi deneylerinde Cu-Fe-TÇH, Co-Fe-TÇH ve Ni-Fe-TÇH olmak üzere çeşitli iki değerlikli metal iyonları ile hazırlanan katalizörlerin boya giderimi performansları hidrojen peroksit ve peroksimonosülfat oksidanlar varlığında ayrı ayrı incelenmiştir. Atıksularda tespit edilen tartrazin derişimi ve peroksimonosülfat aktivasyonu ile boya giderimi üzerine yapılan literatür araştırmasına göre katalizör seçimi deneylerinde tartrazin başlangıç derişimi, 20 mg/L (Rodriguez ve ark., 2016), boya/oksidan molar oranı =1/10 (Chen ve ark., 2014), katalizör yüklemesi 0,2 g/L (Gong ve ark., 2017; Zeng ve ark., 2018) olarak belirlenmiştir.

En etkili tabakalı çift hidroksit ve oksidan türü seçildikten sonra, seçilen katalizör ve oksidan varlığında katalizör yüklemesi, pH ve oksidan/boya molar oranının etkilerinin incelendiği parametrik çalışma planı yanıt yüzey metodolojisi ve Box–Behnken tasarımına göre oluşturulmuştur. Parametrik çalışma deney koşulları Çizelge 1’de gösterilmektedir.

Çizelge 1. Tabakalı Çift Hidroksit Kullanılarak Tartrazin Giderimi Üzerine Gerçekleştirilecek Deneysel Çalışma Koşulları (KY:Katalizör yüklemesi, O/B: Oksidan/Boya molar oranı)

Deneysel No	KY, g/L	pH	O/B
1	0.2	3	10
2	2	3	10
3	0.2	11	10
4	2	11	10
5	0.2	7	5
6	2	7	5
7	0.2	7	15
8	2	7	15
9	1.1	3	5
10	1.1	11	5
11	1.1	3	15
12	1.1	11	15
13	1.1	7	10
14	1.1	7	10
15	1.1	7	10

Analiz

Oksidasyon süresince tartrazin derişimindeki değişim, reaksiyon sıvısından alınan örneklerin Thermo Genesys 10S UV-VIS Spektrofotometrede analizi ile belirlenmiştir. Tartrazin maksimum pik verdiği 428 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerindeki azalma kromofor taşıyan azo (-N=N-) bağlarının kırılması ile gerçekleşen renk giderimini ifade etmektedir. Spektrumda 257 nm’de yer alan pikteki azalış ise benzen benzeri aromatik yapıların parçalanmasını göstermektedir (Chen ve ark., 2022; Dung ve ark., 2022). Renk giderimi ve organik madde giderimi değerleri Eşitlik 6 ve 7 ile hesaplanmıştır:

$$\text{Organik Madde Giderimi, \%} = \left[\frac{A_{O@257 \text{ nm}} - A_{t@257 \text{ nm}}}{A_{O@257 \text{ nm}}} \right] \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Renk Giderimi, \%} = \left[\frac{A_{O|@428 \text{ nm}} - A_{t|@428 \text{ nm}}}{A_{O|@428 \text{ nm}}} \right] \times 100 \quad (7)$$

A_o : Boya çözeltisinin başlangıçtaki absorbans değeri, mg/L

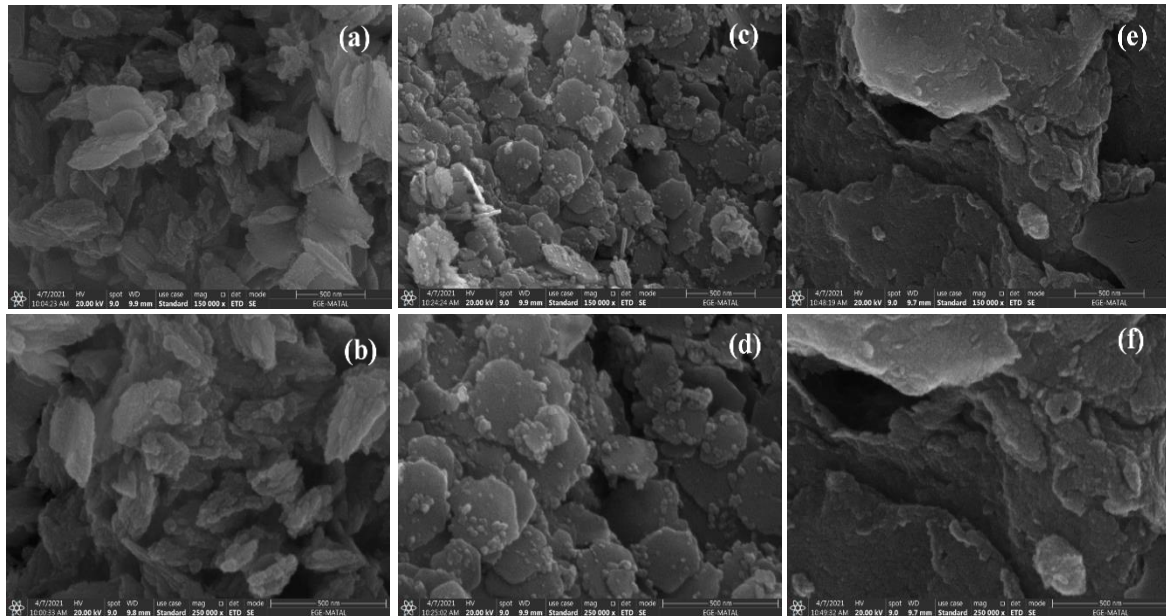
A_t : Boya çözeltisinin giderim sonrasındaki absorbans değeri, mg/L

BULGULAR VE TARTIŞMA

Katalizör Karakterizasyonu

Yüzey morfolojisinin incelenmesi

Tabakalı çift hidroksitlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 1'de gösterilmektedir. Taramalı elektron mikrografları 150000 ve 250000 kat büyütmelerde tespit edilmiştir. Şekil 1'de yer alan mikrograflara göre Cu-Fe-TÇH yaprak benzeri yapılardan oluşurken, Co-Fe-TÇH altıgen veya disk benzeri tabakalardan oluşmaktadır. Bakır ve kobalt içeren tabakalı çift hidroksitler nispeten daha homojen yapılar gösterirken Ni-Fe-TÇH farklı büyüklükteki parçacıkların aglomerasyonu ile daha heterojen bir tabakalı yüzey morfolojisi sergilemektedir. Katalizör seçimi deneylerinde gıda boyası gideriminde en etkili olduğu belirlenen Co-Fe-TÇH katalizörler genellikle 200-300 nm aralığında değişen çaplara sahip disk benzeri tabakalardan oluşmuştur. Bu çalışmada sentezlenen tabakalı çift hidroksit katalizörlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri literatürde çeşitli tabakalı çift hidroksit malzemeler için verilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile uyumludur (Khan, Khan ve Asiri, 2016; Rouahna, Ouakouak, Barkat ve Srasra, 2020; Tonelli, Gualandi, Musella ve Scavetta, 2021; Zheng ve Chen, 2017).

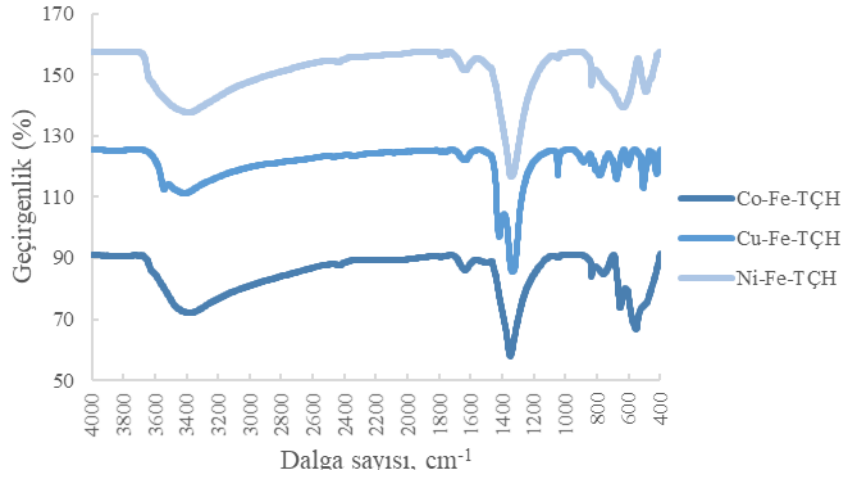


Şekil 1. Cu-Fe-TÇH (a,b), Co-Fe-TÇH (c,d) ve Ni-Fe-TÇH (e,f) Katalizörlerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

FT-IR analizi

Tabakalı çift hidroksit katalizörlerin FT-IR spektrumları Şekil 2'de gösterilmektedir. FT-IR analizine göre, tabakalı çift hidroksit spektrumları güçlü ve iyi tanımlanmış absorpsiyon bantları göstermiştir. Tabakalı çift hidroksitlerin 3400 ve 1630 cm^{-1} civarındaki O-H ve H-O-H titreşimlerine karşılık gelen tipik bantları, ara katman su molekülleri ile ilişkili metal hidroksil gruplarından kaynaklanan hidroksil gerilme modu ve su moleküllerinin bükülme modundan kaynaklanmaktadır (Gholami, Dinpazhoh, Khataee, Hassani ve Bhatnagar, 2020; Zhang, Zhang, Bi ve Chen, 2013). 1050 cm^{-1} ve 1350 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon bantları, ara katman NO_3^- anyonunun asimetrik gerilme

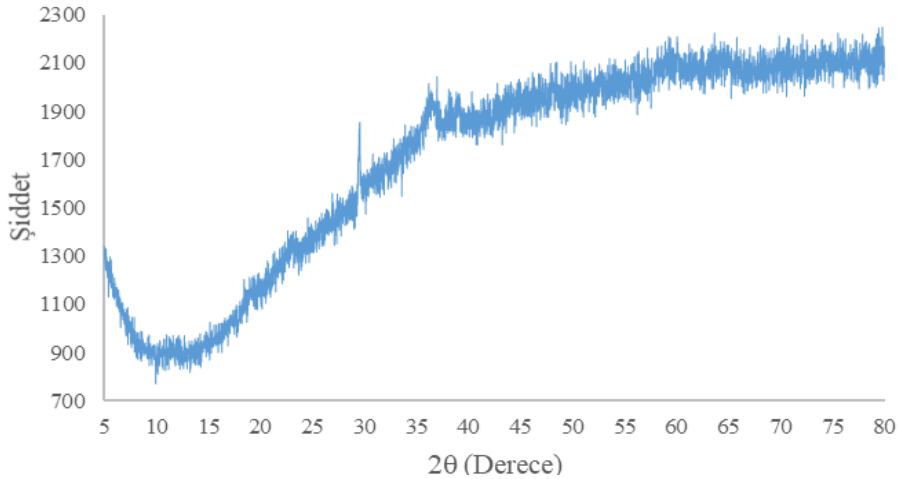
bandına karşılık gelmektedir (H. Wu, Zhang, Long, Zhang ve Jie, 2020; L. Wu ve ark., 2017). 1000 cm^{-1} in altındaki dalga sayılarında gözlenen IR bantları, metal-oksijen (M–O–H veya O–M–O) titreşim modlarını göstermektedir (Said, Elhossieny, Riad ve Mikhail, 2018; Yusuf, Moheb ve Dinari, 2021).



Şekil 2. Tabakalı Çift Hidroksit Katalizörlerin FT-IR Spektrumları

XRD analizi

Katalizör seçimi deneylerinde en yüksek performansı sergileyen Co-Fe-TÇH katalizör için XRD analizi gerçekleştirilerek elde edilen sonuçlar Şekil 3'te gösterilmiştir. Co-Fe-TÇH'nin kırınım desenine göre tabakalı çift hidroksitlerin katmanlı yapısının $2\theta = 11,5^\circ, 23,1^\circ, 36,5^\circ, 38,6^\circ, 59,1^\circ$ ve $60,5^\circ$ deki altı karakteristik piki (003), (006), (012), (009), (018), (110) ve (113) düzlemlerinden kaynaklanan kırınım piklerine karşılık gelmektedir (Deng ve ark., 2021; Khodayar ve ark., 2022).



Şekil 3. Co-Fe-TÇH Katalizörün XRD Deseni

Yüzey alanı analizi

Katalizör seçimi deneylerinde en yüksek katalitik aktiviteyi sergileyen Co-Fe-TÇH için yüzey alanı, gözenek boyutu ve hacmi ölçümleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar literatürde çeşitli tabakalı çift hidroksitler için rapor edilen değerler ile karşılaştırmalı olarak revize makalede Çizelge 2'de sunulmuştur. Literatürdeki çalışmalarda hazırlanan tabakalı çift hidroksitlerin yüzey alanları değişkenlik göstermektedir. Örneğin Mandel ve ark. (2013) saf tabakalı çift hidroksitlerin yüzey alanlarının 1 ile $7\text{ m}^2/\text{g}$ arasında değiştiğini rapor ederken Rosaiah ve ark. (2023) hazırladıkları tabakalı çift hidroksitlerin yüzey alanlarının 29 ile $47\text{ m}^2/\text{g}$ arasında değiştiğini belirtmişlerdir (Mandel ve ark., 2013; Rosaiah ve ark., 2023). Çizelge 2'ye göre, bu çalışmada sentezlenen Co-Fe-TÇH

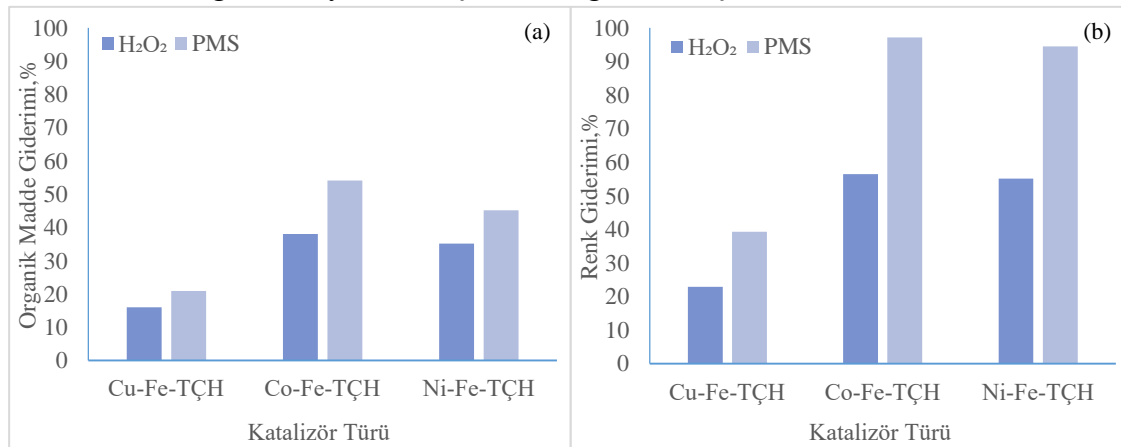
katalizörün 22.63 m²/g olarak ölçülen yüzey alanı literatürdeki çalışmalarda verilen yüzey alanlarına göre kabul edilebilir aralıktadır. Ayrıca, literatürdeki çalışmalarda kullanılan tabakalı çift hidroksit malzemelerin genel olarak bu çalışmada sentezlenen Co-Fe-TÇH gibi mezopor gözenek yapısına sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 2. Literatürdeki Çalışmalarda ve Bu Çalışmada Kullanılan Tabakalı Çift Hidroksitlerin Yüzey Alanı, Gözenek Boyutu ve Hacmi Analiz Sonuçları

	Bu Çalışma	(Utami, Ahmad, Zahara, Lesbani ve Mohadi, 2022)	(Xu ve ark., 2017)	(Jemini, Singh ve Pal, 2022)
Tabakalı çift hidroksit türü	Co-Fe-TÇH	Ni-Al-TÇH	S ₄ /Co-Fe-TÇH	Zn-Cr-TÇH
BET yüzey alanı, m ² /g	22.63	3.288	21.069	27.439
Gözenek hacmi, cm ³ /g	0.164	0.006	0.187	0.027
Gözenek boyutu, nm	28.91	16.983	24.753	2.183

Katalizör ve oksidan seçimi deneyleri

Tartrazin gıda boyasının sudan uzaklaştırılması için çeşitli tabakalı çift hidroksitlerin katalitik performansları iki farklı oksidan kullanılarak test edilmiştir. Katalizör ve oksidan seçimi deneylerinde Cu-Fe-TÇH, Co-Fe-TÇH ve Ni-Fe-TÇH olmak üzere çeşitli iki değerlikli metal iyonları ile hazırlanan katalizörlerin boya giderimi performansları hidrojen peroksit ve peroksimonosülfat oksidanlar varlığında ayrı ayrı incelenmiştir. Deneylerde tartrazin başlangıç derişimi, pH, oksidan boya/molar oranı ve katalizör yüklemesi sırasıyla 20 mg/L, 3, 10 ve 0.2 g/L'de sabit tutulmuştur. Elde edilen organik madde ve renk giderimi yüzdeleri Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Tabakalı Çift Hidroksitlerin Hidrojen Peroksit ve Peroksimonosülfat Aktivasyonu ile (a) Organik Madde Giderimi ve (b) Renk Giderimi (Reaksiyon koşulları: Tartrazin başlangıç derişimi=20 mg/L, pH=3, oksidan boya/molar oranı=10, katalizör yüklemesi=0.2 g/L)

Deney sonuçlarına göre en yüksek organik madde ve renk giderimi değerleri peroksimonosülfat varlığında elde edilmiştir. Peroksimonosülfat varlığında gerçekleştirilen deneylerde renk giderimi %39.2 ile %97.2 arasında değişirken H₂O₂ varlığında elde edilen renk giderimi değerleri %22.9 ile %56.4 arasında değişmiştir. Kobalt ve nikel içeren tabakalı çift hidroksitler genel olarak bakır içeren tabakalı çift hidroksite göre daha yüksek katalitik performans sergilemiştir. En yüksek organik madde ve renk giderimi Co-Fe-TÇH ve peroksimonosülfat varlığında %54.1 ve %97.2 olarak hesaplanmıştır. Aynı koşullarda Cu-Fe-TÇH ve Ni-Fe-TÇH kullanılarak %20.9 ve %45.1 organik madde giderimi ve %39.2 ve %94.5 renk giderimi elde edilmiştir.

Sülfat radikali kaynağı olarak peroksimonosülfat, termodinamik olarak hidrojen peroksitten daha güçlü bir oksidandır ve hidrojen peroksitin suda kendiliğinden ayrışma özelliği göz önünde

bulundurulduğunda daha kararlı bir yapıya sahiptir. Kobalt en iyi peroksimonosülfat aktivasyonu sağlayan metaller arasında gösterilmektedir. Geçiş metalleri ile peroksimonosülfat aktivasyonu ısı, ultraviyole veya ultrason kullanımı nedeniyle enerji tüketiminin yüksek olduğu aktivasyon sistemlerine kıyasla yüksek enerji gereksinimini ortadan kaldırması ve arıtım maliyetlerini azaltması nedeniyle elverişli bir yöntemdir (Zhang, Zhang, Xiang, Teng ve Wang, 2017).

Katalizör ve oksidan seçimi deneylerinde belirlenen en etkili katalizör ve oksidan varlığında reaksiyon parametrelerinin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi için yanıt yüzey yöntemleri kullanılmıştır.

Reaksiyon parametrelerinin etkileşimi ve organik madde ve renk giderimi üzerine etkileri

Deneyel tasarım değişkenlerin yanıt fonksiyonu üzerine etkilerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Deneylerin istatistiksel tasarımı ile klasik deneysel çalışmalara göre deney sayısını azaltılmakta, değişkenler arası etkileşimler incelenmekte ve çok değişkenli sistemlerde parametrelerin optimum değerlerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Modifiye edilmiş merkezi kompozit deneysel tasarım olan Box-Behnken tasarımı diğer yanıt yüzey yöntemlerine göre az sayıda deney ile yanıt fonksiyonunun hesaplanmasını sağlayarak deneysel çalışma maliyetini ve süresini düşürmektedir (Oktav Akdemir, 2022; Solak, 2019).

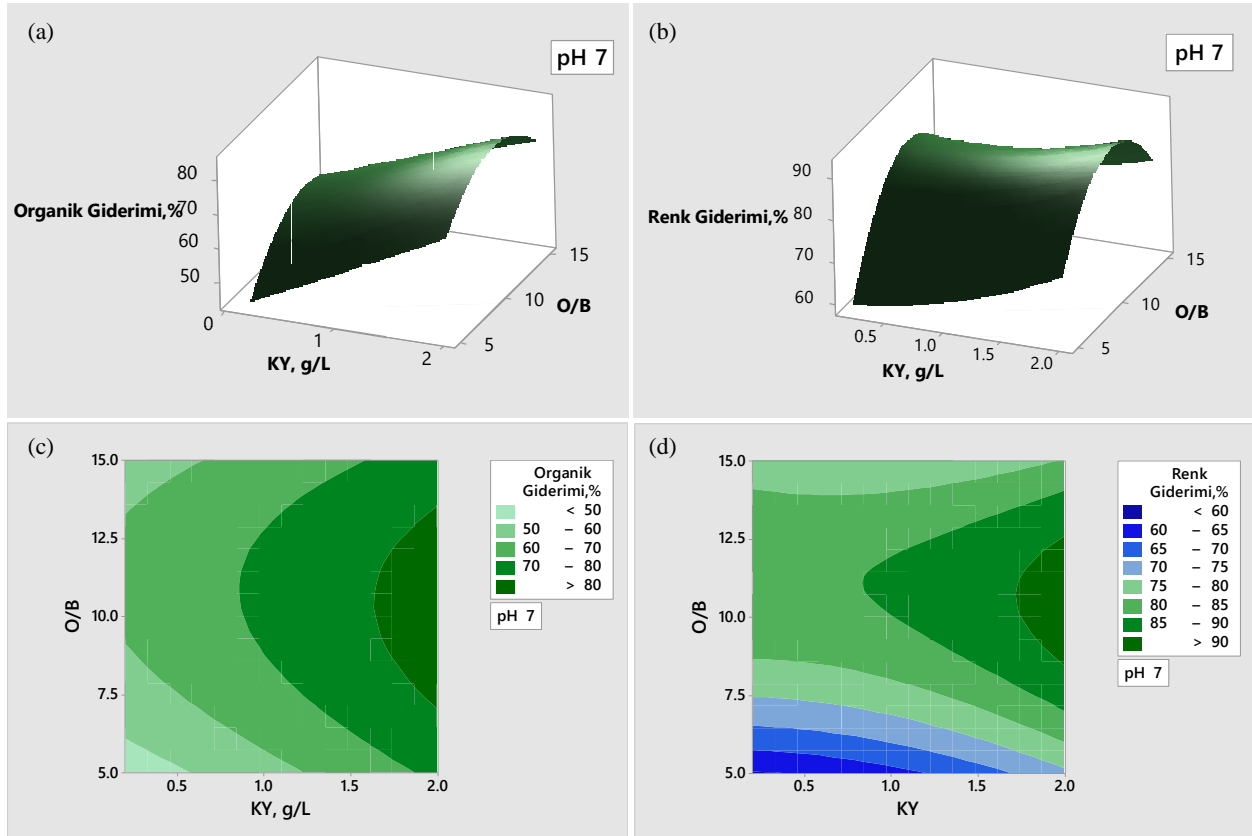
Tartrazin gıda boyasının sudan uzaklaştırılmasında en etkili olduğu tespit edilen Co-Fe-TÇH varlığında en uygun reaksiyon koşullarının belirlendiği bir parametrik çalışma yapılmıştır. Parametrik çalışmada katalizör yüklemesi, pH ve oksidan/boya molar oranının organik madde ve renk giderimi üzerine interaktif etkileri incelenmiştir. Oksidan olarak katalizör seçimi deneylerinde daha iyi sonuç veren peroksimonosülfat kullanılmıştır. Yanıt yüzey yöntemlerinden Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan deney planında reaksiyon parametrelerinin alt ve üst limitleri katalizör yüklemesi için 0.2-2 g/L, pH için 3-11, oksidan/boya molar oranı için 5-15 olarak tanımlanmıştır.

Katalizör yüklemesi ve oksidan/boya molar oranının interaktif etkisi

İleri oksidasyon proseslerinde kirletici giderimini etkileyen en önemli parametrelerden katalizör yüklemesi ve oksidan derişiminin etkileşimi ve organik madde ve renk giderimi üzerine etkilerini gösteren üç boyutlu yüzey ve kontur grafikleri Şekil 5'te verilmiştir.

Sonuçlara göre, katalizör yüklemesi arttıkça renk ve organik madde giderimi de artmaktadır. Daha yüksek katalizör yüklemesinde boya giderimindeki artış katalizör yüzeyindeki aktif merkezlerin artışı ile açıklanabilir (Zhu, Zhu, Zhang, Lu ve Qiu, 2019). Sabit başlangıç boya derişiminde oksidan miktarındaki artış belirli bir noktaya kadar organik madde ve renk giderimini artırmıştır. Oksidan/boya molar oranı optimum değerinin üzerine çıktığında fazla miktardaki oksidanın reaktif radikaller üzerindeki süpürme etkisi, sülfat radikallerin kendi kendini süpürmesi ve daha az reaktif $SO_5^{\bullet-}$ radikallerinin oluşumu (Eşitlik 8-10) nedeniyle boya gideriminde düşüş meydana gelmektedir (Huang, Chen, Wang, Guo ve Crittenden, 2017; Oh ve ark., 2021):





Şekil 5. Katalizör Yükleme ve Oksidan/Boya Molar Oranının Renk Giderimi ve Organik Madde Giderimi Üzerine Etkileri

Şekil 5 c ve d’de yer alan kontur grafiklerine göre %80’in üzerinde organik madde giderimi ve %90’ın üzerinde renk giderimi sağlanabilmesi için katalizör yüklemesinin 1.7 g/L’nin üzerinde olması ve oksidan/boya molar oranının 8.5-12.5 arasında tutulması önerilmektedir.

Peroksimonosülfat aktivasyonu süresince, katalizör yüzeyindeki Co^{2+} peroksimonosülfatı $\text{SO}_4^{\bullet-}$ açığa çıkarmak üzere aktive ederken, Co^{3+} peroksimonosülfat ile düşük hızda reaksiyona girerek önceki değerlik durumuna indirgenmektedir (Eşitlik 11 ve 12).



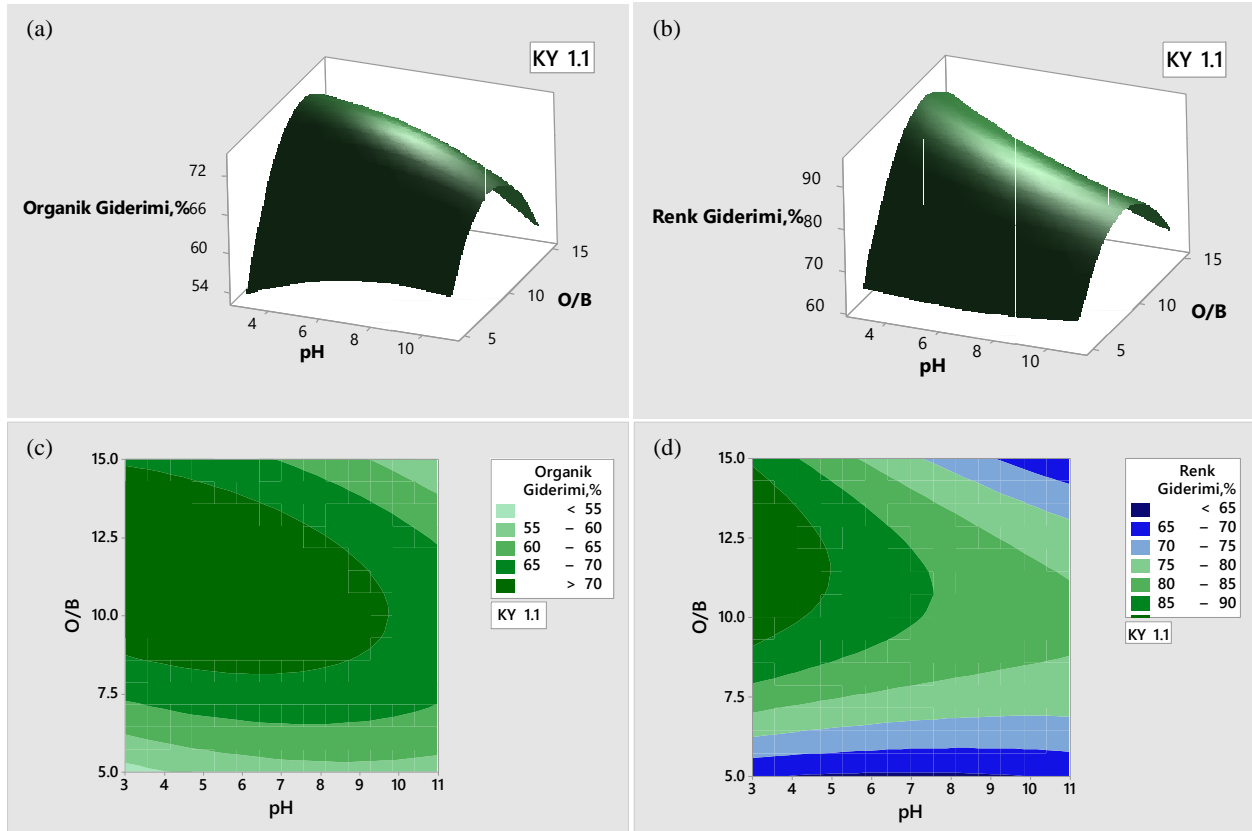
Ayrıca literatürde önerilen aktivasyon mekanizmalarına göre, $\text{SO}_4^{\bullet-}$ radikallerinin $\text{H}_2\text{O}/\text{HO}^-$ ile reaksiyona girmesi ile hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) açığa çıkabilmektedir. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) oluşumu, HSO_5^- iyonunun hidrolizi süresince HSO_4^- ve H_2O_2 açığa çıkması ile başlamaktadır. Açığa çıkan hidrojen peroksit $\bullet\text{OH}$ radikali ile reaksiyona girerek hidroperoksil (HO_2^{\bullet}) radikali oluşumuna ve takip eden bölünme reaksiyonunda $\text{O}_2^{\bullet-}$ üretilmesine neden olmaktadır. Süperoksit radikallerin su veya hidroksil radikali ile etkileşime girmesiye singlet oksijen $^1\text{O}_2$ radikalleri açığa çıkmaktadır (Jin ve ark., 2023).

pH ve oksidan/boya molar oranının interaktif etkisi

Peroksimonosülfat aktivasyonu ile kirletici gideriminde genellikle pH 2-9 aralığında yüksek sonuçlar elde edilmekte ve çok asidik veya bazik koşullarda giderim değerleri düşmektedir. Aşırı asidik ortamda fazla miktardaki H^+ iyonları, peroksimonosülfat moleküllerindeki O-O ile güçlü hidrojen bağları oluşturmakta ve katalizör ile peroksimonosülfat arasındaki reaksiyonu inhibe etmektedir. Güçlü alkali koşullar altında ise iki değerlikli peroksimonosülfat anyonları oluşmakta ve

oluşan anyonlar ile negatif yüklü katalizörler arasındaki elektrostatik itici kuvvetler reaktif oksijen türlerinin üretimini engellemektedir (Zhao ve ark., 2021).

Ancak model kirleticinin ayrışma sabitine ve kullanılan katalizörlerin izoelektrik noktasına bağlı olarak çözelti veya atıksu pH değerinin peroksimonosülfatın heterojen aktivasyonu üzerine etkisi değişiklik göstermektedir ve literatürde pH etkisi ile ilgili farklı sonuçlar yer almaktadır. Peroksimonosülfat aktivasyonu ile tartrazin gideriminde pH ve oksidan derişiminin etkileşimli etkisini gösteren yüzey ve kontur grafikleri Şekil 6'da verilmektedir.



Şekil 6. pH ve Oksidan/Boya Molar Oranının Renk Giderimi ve Organik Madde Gideirmi Üzerine Etkileri

Yüzey grafiklerine göre, oksidan/boya molar oranı boya gideriminde çözelti pH'sına göre daha etkili olmuştur. Boya çözeltilisinin başlangıç pH'sı 3-11 aralığında değiştiğinde organik madde ve renk giderimi yüzdelerinde büyük bir fark gözlenmemektedir. Benzer şekilde Fu, Ma, Zhao, Xu ve Zhan (2019) peroksimonosülfat aktivasyonu ile boya gideriminde pH 3-11 aralığında katalitik performansta küçük farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir (Fu, Ma, Zhao, Xu ve Zhan, 2019). Şekil 6'da yer alan kontur grafiklerine göre O/B molar oranı 11 civarında iken 3-11 aralığındaki tüm pH değerlerinde %65'in üzerinde organik madde giderimi ve %80'in üzerinde renk giderimi elde edilebilmektedir.

Reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu

DeneySEL verilere göre organik madde ve renk giderimini açıklayan model denklemlerin türetilmesi için ikinci dereceden polinom denklemi kullanılmıştır. Tüm doğrusal ve kareli terimler ve etkileşim ögeleri göz önüne alındığında, ikinci dereceden yanıt modeli Eşitlik 13'te tanımlanmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (13)$$

Eşitlikte yer alan Y süreç yanıtını, k model sayısını, i ve j model için dizin sayılarını, x_1, x_2, \dots, x_k kodlanmış bağımsız değişkenleri, β_0 ofset terimini, β_i birinci dereceden (doğrusal) ana etkiyi, β_{ii} ikinci

dereceden etkiyi, β_{ij} etkileşim etkisini ve ϵ hatayı (tahmin edilen ve ölçülen değerler arasındaki tutarsızlıkları) ifade etmektedir (Sharma, Singh ve Dilbaghi, 2009; Yetilmezsoy, Demirel ve Vanderbei, 2009).

Analiz sonuçlarının Box-Behnken tasarımına göre değerlendirilmesi için Minitab 17 programı kullanılmıştır. Proses değişkenleri ile yanıt arasındaki ilişkiyi ifade eden matematiksel modeller çoklu regresyon analizi yapılarak elde edilmiştir. Organik madde ve renk giderimi için uygun ikinci derecede regresyon modelleri kuadratik olarak Eşitlik 14 ve 15'te sırasıyla oluşturulmuştur:

Organik Madde Giderimi,

$$\% = -22.5 + 20.7 KY + 4.43 \text{ pH} + 12.02 \text{ O/B} + 0.28 KY* KY - 0.152 \text{ pH}*\text{pH} - 0.460 \text{ O/B}*\text{O/B} - 0.508 KY*\text{pH} - 0.470 KY*\text{O/B} - 0.234 \text{ pH}*\text{O/B} \quad (14)$$

$$\text{Renk Giderimi, \%} = 5,1 - 2,95 KY - 0,79 \text{ pH} + 16,26 \text{ O/B} + 3,11 KY* KY + 0,086 \text{ pH}*\text{pH} - 0,6168 \text{ O/B}*\text{O/B} + 1,010 KY*\text{pH} - 0,592 KY*\text{O/B} - 0,3005 \text{ pH}*\text{O/B} \quad (15)$$

Organik madde giderimi model denklemi için regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı (R^2_{adj}) %93.38 ve %81.46 iken renk giderimi model denklemi için R^2 ve R^2_{adj} değerleri sırasıyla %96.43 ve %90.01 olarak bulunmuştur. R^2 değerlerinin 1'e yakın olması kuadratik modellerin yanıtı uygun olduğunu ve deneysel değerler ve model değerler arasındaki korelasyonun uygun olduğunu göstermektedir.

Deneysel tasarım çalışması süresince toplanan verilere göre deney sonuçlarına etki eden parametrelerin etki değerlerinin hesaplanması için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Türetilen modellerin anlamlılığı ve yeterliliği Fisher varyasyon oranı (F) ve olasılık değerinden (p) belirlenmiştir. Modelin anlamlı kabul edilmesi için p değerinin 0,05'ten düşük olması beklenmektedir (Akay, 2020). Cu-Fe-TÇH katalizör kullanılarak peroksimonosülfat aktivasyonu ile tartrazinin sudan uzaklaştırılmasında organik madde ve renk giderimi için elde edilen verilerin varyans analiz sonuçları Çizelge 3 ve 4'te gösterilmiştir.

Organik madde giderimine ait ANOVA çizelgesi incelendiğinde F-değeri 7.83 ve p değeri 0.018 (<0.05) olarak bulunmuştur. Organik madde giderimi model denkleminde en önemli terimin katalizör yüklemesinin lineer etkisi olduğu ve oksidan/boya molar oranının kuadratik etkisinin de %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3'te renk giderimi için verilen varyans analizi sonuçlarına göre 15.02 ve 0.004 olarak bulunan F ve p değerleri modelin anlamlılığını göstermektedir. Model denkleminde oksidan/boya molar oranının kuadratik etkisi 0.001 p değeri ile en etkili terimdir. Katalizör yüklemesi ve pH'nın kuadratik etkileri ve katalizör yüklemesi ve pH etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmazken diğer reaksiyon parametrelerinin tüm lineer, etkileşimli ve kuadratik etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir. Analizler sonucunda Co-Fe-TÇH katalizör ile peroksimonosülfat aktivasyonunda gıda boyası giderimi için oluşturulan regresyon modelleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Optimizasyon çalışmalarında hem organik madde giderimi hem renk giderimi maksimize edilerek reaksiyon parametrelerinin optimum değerleri belirlenmiştir. En uygun reaksiyon koşulları 2 g/L katalizör yüklemesi, pH 3 ve 11.36 oksidan/boya molar oranı olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullarda organik madde giderimi ve renk giderimi %87.35 ve %97.47 olarak hesaplanmıştır.

Tabakalı Çift Hidroksit Katalizörler Kullanılarak Peroksimonosülfat ve Hidrojen Peroksit Aktivasyonu ile Gıda Boyalarının Giderimi: Box-Behnken Tasarımı ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Çizelge 3. Tabakalı Çift Hidroksit Kullanılarak Peroksimonosülfat Aktivasyonu ile Organik Madde Giderimi Değerlendirilmesinde Kuadratik Çözüm Modeli İçin Varyans Analizi Sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Düzeltilmiş kareler toplamı	Düzeltilmiş kareler ortalaması	F-Değeri	p-Değeri
Model	9	1857.44	206.38	7.83	0.018
Doğrusal	3	1236.35	412.12	15.64	0.006
KY (Katalizör yüklemesi)	1	1099.66	1099.66	41.73	0.001
pH	1	47.04	47.04	1.79	0.239
O/B (Oksidan/Boya molar oranı)	1	89.66	89.66	3.40	0.124
Kare	3	502.10	167.37	6.35	0.037
KY*KY	1	0.19	0.19	0.01	0.936
pH*pH	1	21.90	21.90	0.83	0.404
O/B*O/B	1	487.60	487.60	18.50	0.008
İki yönlü etkileşim	3	118.99	39.66	1.51	0.321
KY*pH	1	13.38	13.38	0.51	0.508
KY*O/B	1	17.90	17.90	0.68	0.447
pH*O/B	1	87.71	87.71	3.33	0.128
Hata	5	131.75	26.35		
Uyum Eksikliği	3	131.06	43.69	126.87	0.008
Saf hata	2	0.69	0.34		
Toplam	14	1989.19			

Çizelge 4. Tabakalı Çift Hidroksit Kullanılarak Peroksimonosülfat Aktivasyonu ile Renk Giderimi Değerlendirilmesinde Kuadratik Çözüm Modeli İçin Varyans Analizi Sonuçları

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Düzeltilmiş kareler toplamı	Düzeltilmiş kareler ortalaması	F-Değeri	p-Değeri
Model	9	1889.82	209.980	15.02	0.004
Doğrusal	3	715.47	238.489	17.06	0.005
KY (Katalizör yüklemesi)	1	164.66	164.657	11.78	0.019
pH	1	278.55	278.547	19.93	0.007
O/B (Oksidan/Boya molar oranı)	1	272.26	272.263	19.48	0.007
Kare	3	948.61	316.205	22.62	0.002
KY*KY	1	23.41	23.405	1.67	0.252
pH*pH	1	7.02	7.024	0.50	0.510
O/B*O/B	1	877.90	877.897	62.81	0.001
İki yönlü etkileşim	3	225.74	75.246	5.38	0.050
KY*pH	1	52.89	52.891	3.78	0.109
KY*O/B	1	28.41	28.408	2.03	0.213
pH*O/B	1	144.44	144.438	10.33	0.024
Hata	5	69.89	13.978		
Uyum Eksikliği	3	67.53	22.511	19.10	0.050
Saf hata	2	2.36	1.178		
Toplam	14	1959.71			

Optimum koşullarda 60 dakikalık PMS aktivasyonu ile elde edilen %97.47'lik tartrazin giderimi literatürde çeşitli katalizörler varlığında gerçekleştirilen PMS aktivasyonu sonuçları ile karşılaştırıldığında, Co-Fe-TÇH'nin diğer katalizörlere benzer veya daha yüksek boya giderim performansı sergilediği görülmektedir. Örneğin, Fu ve ark. (2019) Fe₃O₄ ve grafitleştirilmiş gözenekli biyokömür kompozit malzeme kullanarak PMS aktivasyonu prosesinde 100 dakikada %95 tartrazin giderimi tespit etmişlerdir (Fu ve ark., 2019). Stevanović ve ark. (2022) kobalt destekli kitosan türevi karbon-smektit katalizörler kullanarak PMS aktivasyonu ile 60 dakikada %98 tartrazin giderimi sağlamışlardır (Stevanović ve ark., 2022). Tuna ve Şimşek (2023) CaFe₂O₄ katalizör varlığında

görünür bölge ışık ile deteklenen PMS aktivasyonu prosesinde 180 dakika içinde %98.1 tartrazin giderimi elde etmişlerdir (Tuna ve Simsek, 2023). You ve ark. (2022) reaksiyon sıvısına iyon eklenmediği durumda sıfır değerlikli demir ve PMS aktivasyonu ile 60 dakikada %43.1 tartrazin giderimi olduğunu rapor etmişlerdir (You ve ark., 2022).

SONUÇ

Peroksimonosülfat ve hidrojen peroksitin çeşitli iki değerlikli metaller kullanılarak aktivasyonu ile model gıda katkı maddesi olarak seçilen tartrazinin sudan uzaklaştırılması üzerine gerçekleştirilen çalışmada en etkili katalizör ve oksidan sırasıyla Co-Fe-TÇH ve peroksimonosülfat olarak belirlenmiştir. Yanıt yüzey yöntemlerinden Box-Behnken tasarımına göre planlanan parametrik çalışmada katalizör yüklemesi ve oksidan/boya molar oranının çözelti pH'sına göre organik madde ve renk giderimi üzerinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Optimum koşullar altında (katalizör yüklemesi=2 g/L, pH=3 ve O/B=11.36) %87.35 organik madde giderimi ve %97.47 renk giderimi hesaplanmıştır. Co-Fe-TÇH katalizörünün çevre dostu ileri oksidasyon prosesleri kullanılarak gıda endüstrisi atıksularının etkili şekilde arıtılmasında yüksek bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: FKB-2021-22402).

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Akay, S. (2020). Ultrasonik Ortamda Biyokömür Kullanarak Sulu Çözeltilerden 5-Florourasilin Giderilmesi: Yanıt Yüzey Modellemesi ve Optimizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 15(2), 264–286. <https://doi.org/10.29233/sdufeffd.800157>
- Alcantara-Cobos, A., Gutiérrez-Segura, E., Solache-Ríos, M., Amaya-Chávez, A. ve Solís-Casados, D. A. (2020). Tartrazine removal by ZnO nanoparticles and a zeolite-ZnO nanoparticles composite and the phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials*, 302. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110212>
- Alipour, M., Vosoughi, M., Mokhtari, S. A., Sadeghi, H., Rashtbari, Y., Shirmardi, M. ve Azad, R. (2021). Optimising the basic violet 16 adsorption from aqueous solutions by magnetic graphene oxide using the response surface model based on the Box–Behnken design. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 101(6), 758–777. <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1671378>
- Ba-Abbad, M. M., Chai, P. V., Takriff, M. S., Benamor, A. ve Mohammad, A. W. (2015). Optimization of nickel oxide nanoparticle synthesis through the sol-gel method using Box-Behnken design. *Materials and Design*, 86, 948–956. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2015.07.176>

- Bai, J., Liu, Y., Yin, X., Duan, H. ve Ma, J. (2017). Efficient removal of nitrobenzene by Fenton-like process with Co-Fe layered double hydroxide. *Applied Surface Science*, 416, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.04.117>
- Bouzayani, B., Rosales, E., Pazos, M., Elaoud, S. C. ve Sanromán, M. A. (2019). Homogeneous and heterogeneous peroxymonosulfate activation by transition metals for the degradation of industrial leather dye. *Journal of Cleaner Production*, 228, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.217>
- Buu, T. T., Ngoc, B. K., Quan, V. M., Hai, N. D., Nam, N. T. H. ve Hieu, N. H. (2023). The removal enhancement of organic contaminations and optimization of the photocatalytic efficiency by Box-Behnken design using ZnO-TiO₂/porous graphene aerogel. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28100-z>
- Chen, D., Ma, X., Zhou, J., Chen, X. ve Qian, G. (2014). Sulfate radical-induced degradation of Acid Orange 7 by a new magnetic composite catalyzed peroxymonosulfate oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 476–484. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.004>
- Chen, X., Zhou, Y., Li, J., Pillai, S. C., Bolan, N., He, J., ... Wang, H. (2022). Activated peroxydisulfate by sorghum straw-based biochar for enhanced tartrazine degradation: Roles of adsorption and radical/nonradical processes. *Environmental Pollution*, 316(P2), 120665. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120665>
- de Oliveira, A. G., Ribeiro, J. P., Neto, E. F. A., de Lima, A. C. A., Amazonas, Á. A., da Silva, L. T. V. ve do Nascimento, R. F. (2020). Removal of natural organic matter from aqueous solutions using electrocoagulation pulsed current: optimization using response surface methodology. *Water Science and Technology*. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.323>
- Deng, Y., Zou, X., Liu, Z., Wang, J., Wang, Z. ve Tang, J. (2021). Co₇Fe₃/CoFe₂O₄@C Lamellar composites derived from Co-Fe LDH/PVA as an effective heterogeneous activator of peroxymonosulfate. *Journal of Alloys and Compounds*, 854, 157244. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.157244>
- Dos Santos, J. R., de Sousa Soares, L., Soares, B. M., de Gomes Farias, M., de Oliveira, V. A., de Sousa, N. A. B., ... de Castro E Sousa, J. M. (2022). Cytotoxic and mutagenic effects of the food additive tartrazine on eukaryotic cells. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 23(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s40360-022-00638-7>
- Dung, N. T., Duong, L. T., Hoa, N. T., Thao, V. D., Ngan, L. V. ve Huy, N. N. (2022). A comprehensive study on the heterogeneous electro-Fenton degradation of tartrazine in water using CoFe₂O₄/carbon felt cathode. *Chemosphere*, 287(P2), 132141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132141>
- Farhan Hanafi, M. ve Sapawe, N. (2020). A review on the water problem associate with organic pollutants derived from phenol, methyl orange, and remazol brilliant blue dyes. *Materials Today: Proceedings*, 31(Part 1), A141–A150. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.258>
- Fu, H., Ma, S., Zhao, P., Xu, S. ve Zhan, S. (2019). Activation of peroxymonosulfate by graphitized hierarchical porous biochar and MnFe₂O₄ magnetic nanoarchitecture for organic pollutants degradation: Structure dependence and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 360, 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.207>

- Fu, H., Zhao, P., Xu, S., Cheng, G., Li, Z., Li, Y., ... Ma, S. (2019). Fabrication of Fe₃O₄ and graphitized porous biochar composites for activating peroxy monosulfate to degrade p-hydroxybenzoic acid: Insights on the mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121980. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121980>
- Gholami, P., Dinpazhoh, L., Khataee, A., Hassani, A. ve Bhatnagar, A. (2020). Facile hydrothermal synthesis of novel Fe-Cu layered double hydroxide/biochar nanocomposite with enhanced sonocatalytic activity for degradation of cefazolin sodium. *Journal of Hazardous Materials*, 381, 120742. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120742>
- Gong, C., Chen, F., Yang, Q., Luo, K., Yao, F., Wang, S., ... Zeng, G. (2017). Heterogeneous activation of peroxy monosulfate by Fe-Co layered double hydroxide for efficient catalytic degradation of Rhodamine B. *Chemical Engineering Journal*, 321, 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.03.117>
- Gupta, A. D., Singh, H., Varjani, S., Awasthi, M. K., Giri, B. S. ve Pandey, A. (2022). A critical review on biochar-based catalysts for the abatement of toxic pollutants from water via advanced oxidation processes (AOPs). *Science of the Total Environment*, 849, 157831. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157831>
- Hong, Y., Peng, J., Zhao, X., Yan, Y., Lai, B. ve Yao, G. (2019). Efficient degradation of atrazine by CoMgAl layered double oxides catalyzed peroxy monosulfate: Optimization, degradation pathways and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 370, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.127>
- Huang, T., Chen, J., Wang, Z., Guo, X. ve Crittenden, J. C. (2017). Excellent performance of cobalt-impregnated activated carbon in peroxy monosulfate activation for acid orange 7 oxidation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(10), 9651–9661. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8648-7>
- Jemini, Singh, S. ve Pal, B. (2022). Efficient ZnCr LDH/monoclinic-WO₃ composites for Degradation of Tetracycline under Visible Light. *ChemistrySelect*, 7(48). <https://doi.org/10.1002/slct.202203846>
- Jin, X., Huang, Y., He, S., Chen, G., Liu, X., He, C., Chen, Q. (2023). Preparation of Co-Fe based Prussian blue analogs loaded nickel foams for Fenton-like degradation of tetracycline. *Applied Catalysis A: General*, 650, 118985. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2022.118985>
- Khan, S. A., Khan, S. B. ve Asiri, A. M. (2016). Layered double hydroxide of Cd-Al/C for the Mineralization and De-coloration of Dyes in Solar and Visible Light Exposure. *Scientific Reports*, 6, 14–18. <https://doi.org/10.1038/srep35107>
- Khataee, A., Sadeghi Rad, T., Nikzat, S., Hassani, A., Aslan, M. H., Kobya, M. ve Demirbaş, E. (2019). Fabrication of NiFe layered double hydroxide/reduced graphene oxide (NiFe-LDH/rGO) nanocomposite with enhanced sonophotocatalytic activity for the degradation of moxifloxacin. *Chemical Engineering Journal*, 375, 122102. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122102>
- Khodayar, N., Noori, A., Rahmanifar, M. S., Shabangoli, Y., Baghervand, A., El-Kady, M. F., ... Mousavi, M. F. (2022). Super-Fast and Super-Long-Life Rechargeable Zinc Battery. *Advanced Energy Materials*, 12(43), 2202784. <https://doi.org/10.1002/aenm.202202784>
- Luo, L., Wang, Y., Zhu, M., Cheng, X., Zhang, X., Meng, X., ... Hao, H. (2019). Co-Cu-Al Layered Double Oxides as Heterogeneous Catalyst for Enhanced Degradation of Organic Pollutants in Wastewater by Activating Peroxy monosulfate: Performance and Synergistic Effect. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00167>

- Mahdavi, R. ve Ashraf Talesh, S. S. (2021). Enhanced selective photocatalytic and sonocatalytic degradation in mixed dye aqueous solution by ZnO/GO nanocomposites: Response surface methodology. *Materials Chemistry and Physics*, 267, 124581. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124581>
- Mandal, S., Mayadevi, S. ve Kulkarni, B. D. (2009). Adsorption of aqueous selenite [Se(IV)] species on synthetic layered double Hydroxide Materials. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(17), 7893–7898. <https://doi.org/10.1021/ie900136s>
- Mandel, K., Drenkova-Tuhtan, A., Hutter, F., Gellermann, C., Steinmetz, H. ve SEXTL, G. (2013). Layered double hydroxide ion exchangers on superparamagnetic microparticles for recovery of phosphate from waste water. *J. Mater. Chem. A*, 1(5), 1840–1848. <https://doi.org/10.1039/C2TA00571A>
- Mikami, G., Grosu, F., Kawamura, S., Yoshida, Y., Carja, G. ve Izumi, Y. (2016). Harnessing self-supported Au nanoparticles on layered double hydroxides comprising Zn and Al for enhanced phenol decomposition under solar light. *Applied Catalysis B: Environmental*, 199, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.06.031>
- Oh, W. Da, Zaeni, J. R. J., Lisak, G., Lin, K. Y. A., Leong, K. H. ve Choong, Z. Y. (2021). Accelerated organics degradation by peroxymonosulfate activated with biochar co-doped with nitrogen and sulfur. *Chemosphere*, 277, 130313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130313>
- Oktav Akdemir, E. (2022). Zeytinyağı Endüstrisi Atıksularının Kitosan ile Koagülasyonunda Box-Behnken İstatistiksel Deney Tasarım Yönteminin Uygulanması, *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 241–248.
- Ouassif, H., Moujahid, E. M., Lahkale, R., Sadik, R., Bouragba, F. Z., Sabbar, E. M. ve Diouri, M. (2020). Zinc-Aluminum layered double hydroxide: High efficient removal by adsorption of tartrazine dye from aqueous solution. *Surfaces and Interfaces*, 18, 100401. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2019.100401>
- Rathee, G., Awasthi, A., Sood, D., Tomar, R., Tomar, V. ve Chandra, R. (2019). A new biocompatible ternary Layered Double Hydroxide Adsorbent for ultrafast removal of anionic organic dyes. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52849-4>
- Rodriguez, J. A., Ibarra, I. S., Miranda, J. M., Barrado, E. ve Santos, E. M. (2016). Magnetic solid phase extraction based on fullerene and activated carbon adsorbents for determination of azo dyes in water samples by capillary electrophoresis. *Analytical Methods*, 8(48), 8466–8473. <https://doi.org/10.1039/c6ay02631a>
- Rosaiah, P., Vadivel, S., Prakash, N. G., Dhananjaya, M., Al-Asbahi, B. A., Roy, S., ... Park, S.-H. (2023). Fabrication of Porous Ni-Co LDH Nanocomposites as Efficient Electrodes for Supercapacitors. *International Journal of Energy Research*, 2023, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2023/5793868>
- Rouahna, N., Ouakouak, A., Barkat, D. ve Srasra, E. (2020). Zn-Al layered double hydroxide: Synthesis, characterization and application for orthophosphates ions adsorption in aqueous medium. *Materials Research Express*, 7(4). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab73fe>
- Said, S., Elhossieny, M., Riad, M. ve Mikhail, S. (2018). Pristine Cu (Co)/Fe layered double hydroxides (Co(Cu)/Fe-LDH) as active catalysts for the transalkylation of toluene to trimethylbenzenes. *Molecular Catalysis*, 445, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2017.11.038>

- Shamsayei, M., Yamini, Y. ve Asiabi, H. (2020). A novel diatomite supported layered double hydroxide as reusable adsorbent for efficient removal of acidic dyes. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 00(00), 1–17. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1743833>
- Sharma, P., Singh, L. ve Dilbaghi, N. (2009). Optimization of process variables for decolorization of Disperse Yellow 211 by *Bacillus subtilis* using Box–Behnken design. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2–3), 1024–1029. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.104>
- Shi, Z., Wang, Y., Sun, S., Zhang, C. ve Wang, H. (2020). Removal of methylene blue from aqueous solution using Mg-Fe, Zn-Fe, Mn-Fe layered double hydroxide. *Water Science and Technology*, 81(12), 2522–2532. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.313>
- Solak, M. (2019). Kimyasal Spreyleme Atıksuyunun Arıtımında Elektrokoagülasyon Prosesinin Optimizasyonu: Box-Behnken Dizaynı. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(3), 1367–1377. <https://doi.org/10.29130/dubited.518579>
- Soufi, A., Hajjaoui, H., Elmoubarki, R., Abdennouri, M., Qourzal, S. ve Barka, N. (2022). Heterogeneous Fenton-like degradation of tartrazine using CuFe_2O_4 nanoparticles synthesized by sol-gel combustion. *Applied Surface Science Advances*, 9, 100251. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100251>
- Stevanović, G., Jović-Jovičić, N., Krstić, J., Milutinović-Nikolić, A., Banković, P., Popović, A. ve Ajduković, M. (2022). Nanocomposite Co-catalysts, based on smectite and biowaste-derived carbon, as peroxy-monosulfate activators in degradation of tartrazine. *Applied Clay Science*, 230, 106718. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2022.106718>
- Tonelli, D., Gualandi, I., Musella, E. ve Scavetta, E. (2021). Synthesis and characterization of layered double hydroxides as materials for electrocatalytic applications. *Nanomaterials*, 11(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nano11030725>
- Tuna, Ö. ve Simsek, E. B. (2023). Enhanced visible-light-assisted peroxy-monosulfate activation of low-cost perovskite CaFe_2O_4 for tartrazine degradation: Experimental design modelling. *Materials Research Bulletin*, 159, 112090. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2022.112090>
- Utami, H. P., Ahmad, N., Zahara, Z. A., Lesbani, A. ve Mohadi, R. (2022). Green Synthesis of Nickel Aluminum Layered Double Hydroxide using Chitosan as Template for Adsorption of Phenol. *Science and Technology Indonesia*, 7(4), 530–535. <https://doi.org/10.26554/sti.2022.7.4.530-535>
- Vashisht, A., Rai, R., Thakur, S., Kondal, S., Singh, K. A., Manju, ... Gilhotra, V. (2022). Anaerobic Processes in Dye Removal. In *Biological Approaches in Dye-Containing Wastewater* (s. 95–118). https://doi.org/10.1007/978-981-19-0545-2_4
- Villabona-Ortíz, Á., Figueroa-Lopez, K. J. ve Ortega-Toro, R. (2022). Kinetics and Adsorption Equilibrium in the Removal of Azo-Anionic Dyes by Modified Cellulose. *Sustainability*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/su14063640>
- Wu, H., Zhang, Y., Long, S., Zhang, L. ve Jie, X. (2020). Tribological behavior of graphene anchored Mg-Al layered double hydroxide film on Mg alloy pre-sprayed Al coating. *Applied Surface Science*, 530, 146536. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146536>
- Wu, L., Zheng, Z., Pan, F., Tang, A., Zhang, G. ve Liu, L. (2017). Influence of Reaction Temperature on the Controlled Growth of Mg-Al LDH Film. *International Journal of Electrochemical Science*, 6352–6364. <https://doi.org/10.20964/2017.07.74>

- Xu, H., Yuan, Y., Liao, Y., Xie, J., Qu, Z., Shanguan, W. ve Yan, N. (2017). [MoS₄]²⁻ Cluster Bridges in Co-Fe Layered Double Hydroxides for Mercury Uptake from S-Hg Mixed Flue Gas. *Environmental Science & Technology*, 51(17), 10109–10116. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02537>
- Yan, J., Chen, Y., Qian, L., Gao, W., Ouyang, D. ve Chen, M. (2017). Heterogeneously catalyzed persulfate with a CuMgFe layered double hydroxide for the degradation of ethylbenzene. *Journal of Hazardous Materials*, 338, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.007>
- Yetilmezsoy, K., Demirel, S. ve Vanderbei, R. J. (2009). Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box-Behnken experimental design. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1–3), 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.035>
- You, W., Liu, L., Xu, J., Jin, T., Fu, L. ve Pan, Y. (2022). Effect of Anions and Cations on Tartrazine Removal by the Zero-Valent Iron/Peroxymonosulfate Process: Efficiency and Major Radicals. *Catalysts*, 12(10), 1114. <https://doi.org/10.3390/catal12101114>
- Yusuf, S., Moheb, A. ve Dinari, M. (2021). Green phenol hydroxylation by ultrasonic-assisted synthesized Mg/Cu/Al-LDH catalyst with different molar ratios of Cu²⁺/Mg²⁺. *Research on Chemical Intermediates*, 47(4), 1297–1313. <https://doi.org/10.1007/s11164-021-04402-0>
- Zeng, H., Zhang, W., Deng, L., Luo, J., Zhou, S., Liu, X., ... Crittenden, J. (2018). Degradation of dyes by peroxymonosulfate activated by ternary CoFeNi-layered double hydroxide: Catalytic performance, mechanism and kinetic modeling. *Journal of Colloid and Interface Science*, 515, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.01.016>
- Zhang, B., Zhang, Y., Xiang, W., Teng, Y. ve Wang, Y. (2017). Comparison of the catalytic performances of different commercial cobalt oxides for peroxymonosulfate activation during dye degradation. *Chemical Research in Chinese Universities*, 33(5), 822–827. <https://doi.org/10.1007/s40242-017-6413-6>
- Zhang, H., Zhang, G., Bi, X. ve Chen, X. (2013). Facile assembly of a hierarchical core@shell Fe₃O₄@CuMgAl-LDH (layered double hydroxide) magnetic nanocatalyst for the hydroxylation of phenol. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(19), 5934. <https://doi.org/10.1039/c3ta10349h>
- Zhao, C., Shao, B., Yan, M., Liu, Z., Liang, Q., He, Q., ... Tang, L. (2021). Activation of peroxymonosulfate by biochar-based catalysts and applications in the degradation of organic contaminants: A review. *Chemical Engineering Journal*, 416, 128829. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128829>
- Zhao, G., Chen, X., Zou, J., Li, C., Liu, L., Zhang, T., ... Jiao, F. (2018). Activation of peroxymonosulfate by Fe₃O₄-Cs_xWO₃/NiAl layered double hydroxide composites for the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 57(48), 16308–16317. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b04453>
- Zheng, Y. ve Chen, Y. (2017). Preparation of polypropylene/Mg-Al layered double hydroxides nanocomposites through wet pan-milling: formation of a second-staging structure in LDHs intercalates. *RSC Advances*, 7(3), 1520–1530. <https://doi.org/10.1039/c6ra26050k>
- Zhu, J., Zhu, Z., Zhang, H., Lu, H. ve Qiu, Y. (2019). Efficient degradation of organic pollutants by peroxymonosulfate activated with MgCuFe-layered double hydroxide. *RSC Advances*, 9(4), 2284–2291. <https://doi.org/10.1039/C8RA09841G>
- Zolgharnein, J., Shahmoradi, A. ve Ghasemi, J. B. (2013). Comparative study of Box-Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics*, 27(1–2), 12–20. <https://doi.org/10.1002/cem.2487>

Atf İçin: Güzel, A. (2023). Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik Aktivitesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2809-2817.

To Cite: Güzel, A. (2023). Phytochemical Analysis and Antioxidant, Anticholinesterase and Antiatherogenic Activity of Hairy Tea (*Stachys lavandulifolia*). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2809-2817.

Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik Aktivitesi

Abdussamat GÜZEL^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Antioksidan aktiviteye sahiptir
- Kolinergik etkilidir
- Anti aterojeniktir

Anahtar Kelimeler:

- Antioksidan
- Asetilkolinesteraz
- Paraoksonaz
- *Stachys lavandulifolia*
- LC-MS/MS

ÖZET:

Stachys lavandulifolia Vahl. etnobotanikte önemli yeri olan Lamiaceae familyasına ait çiçekli bitki ailesindedir. Bu çalışmada bitkinin fitokimyasal kompozisyonu, asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu, antiaterosklerotik aktivite için paraoksonaz (hPON 1) inhibisyonu ve antioksidan kapasitesi araştırıldı. Fitokimyasal içerik LC-MS/MS sistemi ile enzim inhibisyonu ve antioksidan kapasite çalışmaları ise spektrofotometre ile belirlendi. *S. lavandulifolia* ekstraktlarının (metanol, hekzan ve su) antioksidan kapasitesi ABTS, DPPH, FRAP ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak belirlendi. *S. lavandulifolia* 'nın metanol ekstraktı AChE üzerinde önemli inhibisyon sergiledi (metanol ekstraktı için IC₅₀ değeri 0.105±0.17 mg/mL (R²:0.978)). Buna karşılık, *S. lavandulifolia*'nın metanol ve su ekstraktları hPON 1 üzerinde inhibisyon etkisi göstermedi. ABTS için en yüksek aktivite metanol ekstresinde %23.42 ve DPPH aktivitesi için metanol ekstresinde %50.07 olarak belirlendi. Metal indirgeme gücü deneyinde, FRAP su ekstraktı için 0.233±0.47 ve CUPRAC metanol ekstraktı için 0.587±1.52 absorbans olarak tespit edildi. Bitkinin metanol ekstraktında LC-MS/MS analizlerine göre luteolin, fumarik asit, kafeik asit, siringik asit, hidroksibenzoik asit, kuersetin, salisilik asit, gallik asit, kateşin hidrat ve asetohidroksamik asit saptanmıştır. Sonuç olarak, antioksidan, anti-aterojenik ve anti-nörodejeneratif özelliklere sahip olan *S. lavandulifolia*, Alzheimer hastalarında kullanılan sentetik ilaçlar yerine doğal bir ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Phytochemical Analysis and Antioxidant, Anticholinesterase and Antiatherogenic Activity of Hairy Tea (*Stachys lavandulifolia*)

Highlights:

- Has antioxidant activity
- It is cholinergic
- It is anti-atherogenic

Keywords:

- Antioxidant
- Acetylcholinesterase
- Paraoxonase
- *Stachys lavandulifolia*
- LC-MS/MS

ABSTRACT:

Stachys lavandulifolia Vahl. is a flowering plant family belonging to the Lamiaceae family, which has a great place in ethnobotany. In this study, the phytochemical composition, inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and paraoxonase (hPON 1) for antiatherosclerotic activity, and antioxidant capacity of the plant were investigated. Phytochemical content was determined by LC-MS/MS system, enzyme inhibition, and antioxidant capacity studies were determined by spectrophotometer. The antioxidant capacity of *S. lavandulifolia* extracts (methanol, hexane, and water) was determined by applying ABTS, DPPH, FRAP, and CUPRAC methods. The methanol extract of *S. lavandulifolia* exhibited significant inhibition of AChE (IC₅₀ value for methanol extract 0.105±0.17 mg/mL (R²:0.978)). In contrast, methanol and water extracts of *S. lavandulifolia* showed no inhibitory effect on hPON 1. The highest activity for ABTS was 23.42% in methanol extract and 50.07% for DPPH activity in methanol extract. In the metal-reducing power test, the absorbance was 0.233±0.47 for FRAP water extract and 0.587±1.52 for CUPRAC methanol extract. According to LC-MS/MS analysis, luteolin, fumaric acid, caffeic acid, syringic acid, hydroxybenzoic acid, quercetin, salicylic acid, gallic acid, catechin hydrate, and acetohydroxamic acid were determined in the methanol extract of the plant. In conclusion, *S. lavandulifolia*, which has antioxidant, anti-atherogenic, and anti-neurodegenerative properties, has the potential to be used as a natural medicine instead of synthetic drugs used in Alzheimer's patients.

¹ Abdussamat GÜZEL (Orcid ID: 0000-0001-7810-4510), İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Malatya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Abdussamat GÜZEL, e-mail: abdussamat.guzel@inonu.edu.tr

GİRİŞ

Bitkisel ilaçlara yönelimin artmasına paralel olarak, bilimsel çalışmalarda da tıbbi bitkiler yoğun ilgi görmektedir. Bunun nedeni olarak konvansiyonel yaklaşım ilaçlarının yan etkilerinin oluşu ileri sürülebilir. Tıbbi bitkilere potansiyel farmasötik özellik kazandıran ise şikimik asit yolu ve malonik asit yolundan sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Yapılan çalışmalarda sekonder metabolitlerin önemli bir üyesi olan fenolik bileşikler, terapötik etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Karimi ve ark., 2015; Ekor, 2014; Verma ve Singh, 2008).

Fenolik bileşiklere biyoaktivite kazandıran, aromatik halka üzerindeki fonksiyonel hidroksil gruplarıdır. Bu hidroksil gruplarının sayısı ve konumu fenolik bileşiklerin biyoaktivite çeşitliliğini ortaya koymaktadır. Fenolik bileşiklerin bu özelliği ile kanser, ateroskleroz ve Alzheimer gibi hastalıkların patogeneğinde rol oynayan reaktif oksijen türleri detoksifiye edilir (Kim ve ark., 2020). Nörodejeneratif ve kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların birçok yan etkisi bilinmektedir. Bu nedenle tıbbi bitkilerdeki etken maddelerin karakterizasyonu ve efektif oldukları biyoaktivitelerin belirlenmesi önem arz etmektedir. Farmasötik etkiye sahip tıbbi bitkilerin kullanılmasıyla yan etkilerin ciddi bir oranda ortadan kaldırılması mümkün olabilir (Verma ve Singh, 2008).

Bilişsel ve davranışsal bir bozukluk olan ve daha çok yaşlı insanlarda görülen Alzheimer hastalığı, ilerleyici, kronik ve nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığının histopatolojik özelliklerine bakıldığında, sinaptik dejenerasyon, hipokampal nöronal kayıp, anöploidi, tau-hiperfosforilasyon, hücre dışı β -protein amiloid agregasyonu ve hücre içi nörofibriler yumaklardır (Swerdlow, 2007). Fakat Alzheimer hastalığı histopatolojik parametreleri şu anda yalnızca amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklardır. Parasempatik sinir sisteminin bir nörotransmitteri olan asetilkolin eksikliği, amiloid plak oluşumunun nedenlerinden biri olarak öne sürülmüştür. Kolinerjik etki yaklaşımında, hidrolitik enzim olan asetilkolinesteraz (AChE) sinapslardaki asetilkolin miktarını artırmak için inhibe edilir ve impuls iletimi sağlanmış olur (Avila, 2006). AChE inhibitörlerinin kolinerjik etkiyi arttırdığı ve dolayısıyla Alzheimer hastalarında terapötik etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır (Güzel ve ark., 2022). Ayrıca birçok çalışma, AChE inhibitörlerinin glokom hastalığında retinal ganglion hücrelerin oküler hipertansiyon hasarından yapısal olarak korunmasına yol açtığını göstermektedir (Almasieh ve ark., 2010).

Karaciğerde sentezlenen insan serum paraoksonaz-1 enzimi (arilesteraz, hPON1) bir ester hidrolazdır. Kalsiyuma bağımlı olan bu enzim, HDL ile ilişkili olup aterosjenik lipid peroksitlerin etkilerini nötralize ederek ateroskleroz oluşumunu engeller. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, kardiyovasküler hastalıklarda HDL ve hPON1 değerleri düşük çıkmıştır (Chistiakov ve ark., 2017). Dolayısıyla kullanılan ilaçların veya tıbbi bitkilerin hPON1 enzimini inhibe etmesi problem oluşturmaktadır.

Stachys cinsi, Avrupa, Asya, Afrika, Avustralya ve Kuzey Amerika kıtalarında bulunan yaklaşık üç yüz tür ile Lamiaceae'nin çiçekli bitki ailesinin en büyük cinslerinden biridir. Türkiye Florası'nda 37'si endemik olmak üzere 86 *Stachys* cinsi bulunmaktadır (Özhatay ve Kültür, 2006; Bhattacharjee, 1980). *Stachys* cinslerinin fitokimyasal içeriklerinde fenolik ve flavonoid glikozitler (Miyase ve ark., 1996), terpenoidler ve steroidler (Yamamoto ve ark., 1994), flavonoid bileşenler (El-Ansari ve ark., 1991) gösterilmiştir. Ayrıca, *Stachys* cinsleri üzerine yapılan biyoaktivite çalışmalarında antiinflamatuvar, antitoksik, hipoazotemik, antihepatit, antibakteriyel ve antioksidan gibi çeşitli farmakolojik etkiler göstermiştir (Maleki ve ark., 2001). Bununla birlikte, etnobotanik açısından bazı *Stachys* cinsleri ateroskleroz, genital ve enflamatuvar tümörler, kanser ve ülser gibi hastalıkların

tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, *Stachys* cinlerinin çayı sedatif, antispazmodik, diüretik ve emmenagog aktivite gösterdiği için fitoterapi uygulamalarında kullanılmaktadır (Couladis ve ark., 2003). Daha önceki yapılan çalışmalarda *S. lavandulifolia*'nın feolik bileşikler arasında kinik asit ve klorojenik asit ana bileşikler olarak rapor edilmiştir (Bingol ve Bursal, 2018).

Bu çalışmada, *S. lavandulifolia* ekstralarının serbest radikal giderme (ABTS ve DPPH) ve indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC) gibi çeşitli antioksidan testleri kullanarak antioksidan aktivitesi ve AChE ve hPON 1 enzimlerine karşı inhibisyonu araştırılmıştır. Ayrıca, *S. lavandulifolia*'nın 26 fenolik bileşiğinin LC-MS/MS ile kantitatif ve kalitatif tayini yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki Örnekleri

S. lavandulifolia, Temmuz 2022'de Adıyaman Çelikhane kasabasında toplandı (B7 38°05'16"K 38°20'35"D) ve Turgay Kolaç (İnönü Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu) tarafından tanımlanmıştır. İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumun'da kayıtlıdır (Kayıt No: TK 1354). Bitkinin herba kısmı distile su ile yıkandıktan sonra gölgede oda sıcaklığında kurutuldu.

Ekstraksiyon işlemleri

Kurutulmuş olan bitki bir öğütücü ile toz haline getirildikten sonra 5g numune 27°C'de maserasyon yöntemi kullanılarak 50 mL ekstraksiyon solventleri (metanol, su ve heksan) ile ayrı ayrı ekstre edildi. Elde edilen ekstrakt kâğıttan süzülde ve döner evaporatörde 40°C'de buharlaştırıldı. Hazırlanan 1 mg/mL'lik ekstrakt ile LS-MS/MS analizleri, antioksidan kapasite ve enzim inhibisyon çalışmaları yapıldı.

LC-MS/MS kromatografik koşulları

Seçilen 25 fenolik bileşiğın kalitatif ve kantitatif tayini, bir tandem MS cihazına (Shimadzu, Kyoto, Japonya) bağı bir Nexera model Shimadzu HPLC ile daha önce açıklanan yöntem kullanılarak gerçekleştirildi (Uğur ve Güzel, 2023; Uğur, 2022). ESI kaynağı ile donatılmış bir Shimadzu LCMS 8040 üçlü dört kutuplu kütle spektrometresi kullanılarak MS tespiti yapıldı. LC-ESIMS/MS verileri, LabSolutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) tarafından toplandı ve işlendi. Analitleri ve Fitokimyasalları ölçmek için çoklu reaksiyon izleme (MRM) modları kullanıldı.

Radikal giderme aktivitesi

S. lavandulifolia ekstraktlarının kolorimetrik DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri Blois yöntemine (Blois, 1958) göre gerçekleştirilmiştir. ABTS katyon giderme testi, Re ve ark. (Re ve ark., 1999) tarafından uygulanan yöntemle göre gerçekleştirildi. Radikal giderme etkisi (%) = $[(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$

İndirgeme kapasitesi

S. lavandulifolia ekstraktlarının demir iyonları (Fe³⁺) indirgeme analizleri, Oyaizu yönteminin modifiye bir versiyonu ile gerçekleştirilmiştir (Elmastaş ve ark., 2006; Oyaizu, 1986). *A. lithophila* ekstraktlarının Cu²⁺- Cu⁺ indirgeme aktivitesi Apak ve arkadaşlarının bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır (Apak ve ark., 2008).

Enzim inhibisyon etkileri

S. lavandulifolia'nın su ve metanol ekstraktlarının inhibitör etkileri AChE ve hPON1 enzimlerine karşı test edildi. Asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelerini değerlendirmek için Ellman'ın

yöntemi kullanıldı (Ellman ve ark., 1961). Ayrıca paraoksonaz inhibitör aktivitelerini göstermek için bir önceki çalışmamızdaki protokol kullanılmıştır (Güzel, 2023).

BULGULAR VE TARTIŞMA

S. lavandulifolia fitokimyasal analizi için yüksek seçiciliği ve duyarlılığı nedeniyle LC-MS/MS sistemi seçilmiştir. Çalışılan analitler için LOD, LOQ, lineer aralık ve R^2 belirlendi (Tablo 1). Fitokimyasal kompozisyonun LC-MS/MS ile belirlenmesi için *S. lavandulifolia* bitkisinin metanol ekstresi kullanıldı. *S. lavandulifolia* fenolik bileşiklerden luteolin $5677.31 \pm 13,94$ mg/kg, fumarik asit 4023.19 ± 7.34 mg/kg, kafeik asit 2042.65 ± 5.85 mg/kg, siringik asit 816.33 ± 6.53 mg/kg, hidroksibenzoik asit 109.58 ± 4.48 mg/kg, kuersetin 105.33 ± 3.75 mg/kg, salisilik asit 104.07 ± 4.21 mg/kg, gallik asit 66.98 ± 6.68 mg/kg, kateşin hidrat 25.10 ± 8.56 mg/kg ve asetohidroksamik asit 9.62 ± 2.24 mg/kg olarak ölçülmüştür. Resveratrol, floridzin dihidrat, oleuropein, protokatekuik asit, ellagik asit, mirisetin, 2-hidroksi-1,4-naftokinon, silimarin, bütein, kaempferol, alizarin, kurkumin ve timokinon LOQ altında bulundu ve vanilik asit ise saptanmadı (Çizelge 1).

Sekonder metabolitlerin bir üyesi olan fenolik bileşikler, yapılarındaki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısı ve konumu ile biyoaktivite özelliği gösterir (Al-Mamary ve Moussa, 2021). Bundan dolayı fenolik bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antimutajenik, antienflamatuar ve antikarsinojenik gibi biyoaktivitelere sahiptir (Owen ve ark., 2000). Flavonoidlerin bir üyesi olan luteolin, antioksidan, antikolinesteraz, anti-kanserojen, anti-prolatif, anti-inflamatuar, anti-aterosklerotik ve anti-alerjik etkilere sahiptir (Ahmadi ve ark., 2020). *S. lavandulifolia* ile ilgili daha önce yapılan LC-MS/MS çalışmasında bitkinin dekoksasyon ekstresinde luteolin 304 mg/kg bulunurken maserasyon tekniği ile yapılan bu çalışmada ise majör komponent olarak 5677.31 mg/kg bulunmuştur (Bahadori ve ark., 2020). Buradaki bu fark yüksek sıcaklıkta fenolik bileşiklerin yapısı bozulduğundan dekoksasyon ekstresinde Luteolin düşük çıkmıştır. Çok yönlü biyoaktiviteye sahip fumarik asit, sedef hastalığı, sarkoidoz, granülom, nekrobiyozis lipoidika ve malign melanom gibi deri hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca nöroprotektif, antioksidan, immünomodülatör ve antiinflamatuar etkileri vardır (Kaur ve ark., 2020). Bursal ve ark. rapor ettiğine göre *Stachys annua* fitokimyasal çalışmasında bitkinin su ekstresinde fumarik asit 309.5 mg/kg olarak ölçülmüştür (Bursal ve ark. 2020). *S. lavandulifolia* çalışmasında ise 4023.19 mg/kg bulunarak ikinci majör komponent olmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada kafeik asit, antioksidan, antienflamatuar, antiviral, anti-aterosklerotik ve antikanser özelliklere sahip bir fenolik bileşiktir (Gülçin, 2006). *S. lavandulifolia*'nın etanol (Bingol ve Bursal, 2018) ve dekoksasyon (Bahadori ve ark., 2020) ekstraktlarının LC/MS/MS çalışmasında sırasıyla 0.032 mg/kg ve 148 mg/kg olarak kafeik asit belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise metanol ekstresinde 2042.65 mg/kg olarak üçüncü majör komponent olarak kafeik asit bulunmuştur. Siringik asit, antioksidan, antimikrobiyal gibi biyomedikal sektörde kullanımlara sahip bir bileşiktir. Ayrıca antienflamatuar, antikanser, antidiyabet olmakla beraber kalp, karaciğer ve beyni koruyucu özelliklere de sahiptir. Daha önceki yapılan bir çalışmada *S. lavandulifolia*'nın dekoksasyon ekstresinde siringik asit 78 mg/kg olarak bulunurken bu çalışmada 816.33 mg/kg olarak metanol ekstresinde ölçülmüştür (Bahadori ve ark., 2020).

S. lavandulifolia ekstraktlarının (metanol, su ve heksan) antioksidan aktiviteleri için DPPH serbest radikal yakalama, ABTS katyon radikal temizleme, bakır indirgeme (CUPRAC) ve demir indirgeme (FRAP) testleri yapıldı. DPPH ve ABTS sonuçları yüzde radikal giderme aktivitesi olarak, CUPRAC ve FRAP sonuçları ise absorbans olarak ifade edildi.

Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik AktivitesiÇizelge 1. *S. Lavandulifolia*'nın Fitokimyasal İçeriğinin LC-MS/MS Yönteminde Kullanılan Analitik Parametrelerle Kantitatif Tayini

Bileşikler	Ahkonma zamanı (dak)	Prokesör iyon (m/z)	Ürün iyon (m/z)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Doğrusal regresyon	Doğrusal aralık (µg/L)	R ²	değer±sd mg/kg
Asetohidroksamik asit	0.406	76.15	58	6.90	23.01	y = 216.91x + 6165.8	20-750	0.99 89	9.62±2.24
Kateşin hidrat	2.532	291	139.1	2.05	6.84	y = 1717.9x - 563.99	10-750	0.99 88	25.10±8.56
Vanilik asit	2.762	168.95	65	84.78	282.6 1	y = 48.343x + 662.5	250-1000	0.99 93	-
Siringik asit	3.001	199.1	140.1	2.88	9.61	y = 112.03x + 1316.1	10-500	0.99 94	816.33±6.5 3
Resveratrol	3.606	229	135	41.83	139.4 3	y = 733.34x - 69955	250-1000	0.99 9	< LOQ
Fumarik asit	0.809	115.2	71.1	7.91	26.38	y = 100.9x - 1701.62	40-750	0.99 89	4023.19±7. 34
Gallik asit	1.278	169.1	124.9	3.92	13.06	y = 305.07x - 1859.3	10-100	0.99 81	66.98±6.68
Kafeik asit	2.836	179	135	2.87	9.58	y = 1227.2x - 5396.5	10-100	0.99 48	2042.65±5. 85
Phloridzin dihidrat	3.594	435.1	273.1	81.80	272.6 7	y = 120.23x - 9479.5	250-1000	0.99 89	< LOQ
Oleropin	3.567	539.1	377	7.17	23.90	y = 324.26x - 5388.8	40-750	0.99 97	< LOQ
Protokatekuik asit	3.556	181	108	2.76	9.20	y = 1382.2x - 4393.1	10-500	0.99 67	< LOQ
Salisilik asit	3.558	137.2	93	22.88	76.25	y = 3838.2x - 149277	75-1000	0.99 77	104.07±4.2 1
Ellagik asit	3.681	301.1	228.9	23.74	79.14	y = 18.841x + 911.46	100-1000	0.99 67	< LOQ
Mirisetin	3.644	317	179.1	4.34	14.45	y = 588.4x - 4990.6	20-500	0.99 87	< LOQ
2-hidroksi-1.4 naftakinon	3.664	173.1	145	2.07	6.91	y = 461.45x - 4553.8	10-500	0.99 89	< LOQ
Hidroksibenzoik asit	3.555	137.2	93.1	8.92	29.74	y = 3831.2x - 94423	40-500	0.99 96	109.58±4.4 8
Silymarin	3.996	481.1	453.1	8.00	26.70	y = 199.91x + 950.97	40-750	0.99 97	< LOQ
Kuersetin	3.891	301.1	150.9	7.79	25.98	y = 150.09x - 422.87	20-500	0.99 97	105.33±3.7 5
Naringenin	3.952	271	150.9	68.40	228.1 0	y = 700.8x - 26469	250-1000	0.99 97	82.54±5.37
Bütein	3.935	271	134.9	38.50	128.2 0	y = 62.943x - 2793	100-1000	0.99 6	< LOQ
Luteolin	4.069	285	150.9	6.40	21.40	y = 1389x - 40923	40-1000	0.99 88	5677.31±13 .94
Kaempferol	4.298	285	117	3.90	13.00	y = 62.513x - 821.08	20-1000	0.99 82	< LOQ
Alizarin	4.594	239	211	15.30	51.10	y = 26.512x - 1721	60-2000	0.99 91	< LOQ
Kurkumin	4.672	367.1	216.9	12.80	42.70	y = 1908.9x - 8252.1	40-1000	0.99 94	< LOQ
Timokinon	3.337	165	137	7.64	25.47	y = 349.23x - 2887.4	20-500	0.99 71	< LOQ

R²: determinasyon katsayısı, LOD: Belirleme sınırı LOQ : Tayin sınırı

Metanol ekstraktı, DPPH, ABTS ve CUPRAC testlerinde en yüksek aktivite gösterirken FRAP testinde su ekstraktı en yüksek aktivite gösterdi. Standartlara (BHA, BHT, Trolox) göre değerlendirilen antioksidan aktivite çalışmalarının sonuçları Çizelge 2’de verilmiştir.

Tüylü Çayın (*Stachys lavandulifolia*) Fitokimyasal Analizi ve Antioksidan, Antikolinesteraz ve Antiaterojenik AktivitesiÇizelge 2. *S. Lavandulifolia* Ekstrelerinin Radikal Giderici Ve Metal İndirgeme Aktivitesi

	DPPH [*] (0.2 mg/mL)	ABTS ⁺⁺ (0.2 mg/mL)	FRAP (0.2 mg/mL)	CUPRAC (0.2 mg/mL)
	% ^a		Absorbans ^b	
Metanol ekstresi	50.07±1.01	23.42±0.14	0.134± 0.58	0.587±1.52
Su ekstresi	49.95±0.52	15.96±0.25	0.233± 0.47	0.497±1.22
Hegzan ekstresi	20.36±0.34	6.15±1.12	-	0.145± 0.32
BHA	76.22±3.62	93.65±4.71	1.625±0.38	2.002±0.85
BHT	43.40±3.26	58.21±2.66	1.034±0.23	2.287±1.06
TROLOX	85.35±3.12	90.03±3.07	0.928±0.26	2.025±0.98

BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen.

^aABTS ve DPPH radikal giderme aktivitesinin yüzdesi (%).

^bDeğerler absorbans olarak ifade edildi. Yüksek absorbans, yüksek metal iyonlarını (Fe³⁺ ve Cu²⁺) indirgeme kabiliyetini gösterir.

Oksidatif stres, dejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, yaşa bağlı makula dejenerasyonu), romatizmal, pulmoner, sindirim, kardiyovasküler, metabolik ilerleyici kronik hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarla bağlantılıdır (Liu ve ark., 2017). Antioksidan aktiviteye sahip şifalı bitki ekstraktlarının oksidatif stresin neden olduğu hastalıkları önlediği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Owen ve ark., 2000). Bu çalışmada, *S. lavandulifolia* ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, standart antioksidan olan BHT, BHA ve Trolox ile karşılaştırıldı. En çok tercih edilen spektrofotometrik giderme deneyleri ABTS ve DPPH yöntemleridir. Bu yöntemlerle bitkilerin radikali nötralize etme kapasiteleri belirlenir. Daha önceki yapılan DPPH çalışmasında *S. lavandulifolia* etanol ekstresinin BHT' ye benzer aktivite göstermiştir. *S. lavandulifolia*'nın etanol ve su ekstraktlarında ise ABTS, FRAP ve CUPRAC testleri standart antioksidanlardan düşük çıkmıştır (Bingol ve Bursal, 2018). Yeni yapılan bu çalışmada ise *S. lavandulifolia* metanol ve su ekstraktları BHT'den daha yüksek aktivite göstermiştir. ABTS, FRAP ve CUPRAC testlerinde ise *S. lavandulifolia* ekstraktlarının (metanol, su ve hegzan) standart antioksidanlardan düşük aktivite göstermiştir.

AChE ve hPON 1 enzimlerinin aktivitesini inhibe etmek için *S. lavandulifolia* ekstraktları kullanıldı. *S. lavandulifolia* metanol ekstraktı, AChE enzimine karşı önemli inhibisyon göstermiştir (Çizelge 3). hPON 1 enzimi ise *S. lavandulifolia* ekstraktları tarafından inhibe edilmedi.

Çizelge 3. *S. Lavandulifolia* Ekstrelerinin AChE ve hPON 1 Üzerindeki İnhibitör Etkisi

	AChE inhibisyonu		hPON1 inhibisyonu
	IC ₅₀ (mg/mL)	R ²	
Metanol ekstresi	0.105± 0.17	0.978	NI
Su ekstresi	NI	-	NI

NI: İnhibisyon yok

Alzheimer patogeneğinde öne çıkan parametrelere bakıldığında, artmış amiloid β agregatları ve azalmış asetilkolin nörotransmitterleridir. Aynı zamanda artan amiloid plakları kolinerjik kayıplara neden olmaktadır. Kolinerjik tedavi yaklaşımı asetilkolinesterazı inhibe ederek asetilkolinin sinapslarda daha uzun süre kalmasını sağlar. Böylece hastaların mental fonksiyonlarında kısmi düzelme olmasını sağlar. Nöroprotektif bir ajan olan donepezil gibi kolinerjik ilaçların yan etkileri bilinmektedir. Bu nedenle yan etkisi olmayan ilaç arayışları artmaktadır (Braak ve Del Tredici, 2011). Bu amaçla hem yan etkisi olmayan hem de kolinerjik etkilere sahip tıbbi bitkiler araştırma konusu olmuştur. Daha önceki yapılan bir çalışmada *S. lavandulifolia*'nın metanol ekstresi, 0.211 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeriyle AChE inhibisyonu sergilerken bu çalışmada 0.105± 0.17 mg/mL'lik bir IC₅₀ değeriyle AChE inhibisyonu gösterdi (Tundis ve ark., 2015).

Vücutta oksidan ve antioksidan dengenin oksidan lehine olmasıyla gelişen oksidatif stresin, çeşitli hastalıklara ve kansere neden olduğu bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). İnsan vücudu, serbest radikalleri nötralize etmek için enzimatik mekanizmalara sahiptir. Enzimatik

antioksidan ailesine dahil olan paraoksonaz, lipit peroksidasyonunu önleyerek ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalıkları önlemede önemli bir parametredir (Ferretti ve ark., 2004). *S. lavandulifolia* ekstrelerinin paraoksonaz ile muamelesinde inhibisyon gözlenmedi. Dolayısıyla *S. lavandulifolia*'nın ilaç ve çay olarak kullanılması ateroskleroz açısından bir risk oluşturmayacaktır.

SONUÇ

S. lavandulifolia ekstraktlarının DPPH•, ABTS•+, FRAP ve CUPRAC ile antioksidan aktiviteleri ve antikolinerjik ve antiateroskleroz ile ilişkili enzimlerin inhibisyon potansiyeli belirlendi. Sonuçlar, *S. lavandulifolia* ekstraktlarının önemli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, *S. lavandulifolia* metanol ekstresi AChE üzerinde güçlü inhibisyon göstererek kolinerjik etkili bir drog olduğunu gösterdi. *S. lavandulifolia* metanol ekstraktında luteolin, fumarik asit, kafeik asit, siringik asit, hidroksibenzoik asit, kuersetin, salisilik asit, gallik asit, kateşin hidrat ve asetohidroksamik asit içeren fenolik bileşiklerin miktarı belirlendi. Bu fenolik bileşikler, *S. lavandulifolia*'nın biyoaktiviteye sahip olmasında önemli rol alırlar.

KAYNAKLAR

- Ahmadi, S. M., Farhoosh, R., Sharif, A. , & Rezaie, M. (2020). Structure-antioxidant activity relationships of luteolin and catechin. *Journal of food science*, 85(2), 298–305.
- Al-Mamary, M. A. & Moussa, Z. (2021). Antioxidant activity: The presence and impact of hydroxyl groups in small molecules of natural and synthetic origin. *Antioxidants—Benefits, Sources, Mechanisms of Action*, 318–377.
- Almasieh, M., Zhou, Y., Kelly, M. E., Casanova, C., & Di Polo, A. (2010). Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell death & disease*, 1(2), e27–e27.
- Apak, R., Güclü, K., Özyürek, M., & Celik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413–419.
- Avila, J. (2006). Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS letters*, 580(12), 2922–2927.
- Bahadori, M. B., Zengin, G., Dinparast, L., & Eskandani, M. (2020). The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*)-profiling phenolic and antioxidant activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 36, 101134.
- Bhattacharjee, R. (1980). Taxonomic studies in *Stachys*. II. A new infrageneric classification of *Stachys* L. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh.
- Bingol, M. N., & Bursal, E. (2018). LC-MS/MS analysis of phenolic compounds and in vitro antioxidant potential of *stachys lavandulifolia* vahl. var. *brachydon* boiss. *International Letters of Natural Sciences*, (72).
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200. doi:10.1038/1811199a0
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2011). Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? *Acta neuropathologica*, 121(5), 589–595.
- Bursal, E., Taslimi, P., Gören, A. C., & Gülçin, İ. (2020). Assessments of anticholinergic, antidiabetic, antioxidant activities and phenolic content of *Stachys annua*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 28, 101711.

- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, 132, 19–27.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., & Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 17(2), 194–195.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- El-Ansari, M. A., Abdalla, M. F., Saleh, N. A. M., Barron, D., & Le Quéré, J.-L. (1991). Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry*, 30(4), 1169–1173.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Elmastaş, M., Gülçin, I., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. I., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical Letters*, 39, 47–65. doi:10.1080/00032710500423385
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R. A. & Curatola, G. (2004). Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2957–2962.
- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2–3), 213–220.
- Güzel, A. (2023). Relationship Between Phenolic Content Determined by LC-MS/MS and Antioxidant Capacity and Enzyme Inhibition of *Cyclotrichium Niveum* L. *Chemistry & Biodiversity*, e202300027.
- Güzel, A., Noma, S. A. A., Şen, B., Kazancı, A., Tok, T. T., Kolaç, T., & Gök, Y. (2022). Synthesis, Characterization and Inhibitor Properties of Benzimidazolium Salts Bearing 4-(methylsulfonyl)benzyl Side Arms. *Journal of Molecular Structure*, 134320. doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2022.134320
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Karimi, A., Majlesi, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2015). Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of nephro pharmacology*, 4(1), 27.
- Kaur, G., Shivanandappa, T. B., Kumar, M., & Kushwah, A. S. (2020). Fumaric acid protect the cadmium-induced hepatotoxicity in rats: owing to its antioxidant, anti-inflammatory action and aid in recast the liver function. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(10), 1911–1920.
- Kim, T. Y., Leem, E., Lee, J. M., & Kim, S. R. (2020). Control of reactive oxygen species for the prevention of parkinson's disease: The possible application of flavonoids. *Antioxidants*, 9(7), 583.
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P. & Zuo, L. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

- Maleki, N., Garjani, A., Nazemiyeh, H., Nilfouroushan, N., Sadat, A. T. E., Allameh, Z. & Hasannia, N. (2001). Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2–3), 213–218.
- Miyase, T., Yamamoto, R. & Ueno, A. (1996). Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis*. *Phytochemistry*, 43(2), 475–479.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10), 1235–1247.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307
- Özhatay, N. & Kültür, Ş. (2006). Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey III. *Turkish Journal of Botany*, 30(4), 281–316.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Swerdlow, R. H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 2(3), 347.
- Tundis, R., Bonesi, M., Pugliese, A., Nadjafi, F., Menichini, F. & Loizzo, M. R. (2015). Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and its major constituents. *Records of Natural Products*, 9(1), 81.
- Uğur, Y. (2022). Extraction and Quantification of Melatonin in Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) By Ultra-fast Liquid Chromatography Coupled to Fluorescence Detector (UFLC-FD), *Acta Chromatographica* (published online ahead of print 2022). <https://doi.org/10.1556/1326.2022.01052>
- Uğur, Y. & Güzel, A. (2023). Determination of phytochemical content by LC-MS/MS, investigation of antioxidant capacity, and enzyme inhibition effects of nettle (*Urtica dioica*). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 27(5), 1793–1800. https://doi.org/10.26355/eurrev_202303_31540
- Verma, S. & Singh, S. P. (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, 1(11), 347–350. doi:10.5455/vetworld.2008.347-350
- Yamamoto, R., Miyase, T. & Ueno, A. (1994). Stachyosaponins I–VIII, new oleanane-type triterpene saponins from *Stachys riederi* Chamisso. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(6), 1291–1296.

To Cite: Camadan, Y., Akyıldırım Beğen, H., Ceylan, Ş., Saral Sariyer, A. & Eminağaoğlu, Ö. (2023). Investigating In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different *Sorbus* Species in Artvin Province of Türkiye. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2818-2828.

Investigating *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activity of Different *Sorbus* Species in Artvin Province of Türkiye

Yasemin CAMADAN^{1*}, Hayal AKYILDIRIM BEĞEN², Şule CEYLAN³, Ayşegül SARAL SARIYER⁴, Özgür EMİNAĞAOĞLU⁵

Highlights:

- Different *Sorbus* species were collected and identification
- TPC, TFC, FRAP, CUPRAC and DPPH analysis was performed
- Methanolic extracts showed antioxidant and antimicrobial activities

Keywords:

- Antimicrobial
- Antioxidant
- Methanolic extraction
- *Sorbus*

ABSTRACT:

In the present study, three *Sorbus* species in the Rosaceae family naturally growing in Artvin province of Turkey were collected. To determine the antioxidant activity, total phenolic and flavonoids capacity of the extracts, their scavenging capacity for (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, reducing capacity for Fe³⁺ (FRAP) and copper (II) ions (CUPRAC) were analyzed. Besides, disc diffusion method was used to determine antibacterial activity. It was found that all *Sorbus* fruit, flower, leaf and pedicle methanolic extracts showed different levels of antioxidant activity. Results of the the total polyphenol, total flavonoid, FRAP, CUPRAC and DPPH analysis, the highest activity was measured in *S. persica* pedicle, *S. umbellata* var. *cretica* leaf, *S. persica* leaf, *S. umbellata* var. *cretica* leaf and *S. persica* leaf extracts as 25.7 ± 16.49 mg GAE/g, 7.469 ± 0.4926 mg of quercetin/g, 6.248 ± 0.2374 µmol FeSO₄.7H₂O/g and, 164.4 ± 4.209 mmol TEAC and 46.33 µg/mL, respectively. It was revealed that methanolic extracts of *Sorbus* plant showing antibacterial activity had very high minimum inhibitory concentration (MIC) values compared to ampicillin. Thus, considering the findings of the present study, it could be stated that these species merit further studies as natural antioxidant and antibacterial source.

¹Yasemin CAMADAN ([Orcid ID: 0000-0002-9000-7761](https://orcid.org/0000-0002-9000-7761)) Pharmacy Services, Vocational School of Health Services, Artvin Çoruh University, Artvin, Türkiye

²Hayal AKYILDIRIM BEĞEN ([Orcid ID: 0000-0003-2028-5827](https://orcid.org/0000-0003-2028-5827)) Medical Laboratory Techniques, Vocational School of Health Services, Artvin Çoruh University, Artvin, Türkiye

³Şule CEYLAN ([Orcid ID: 0000-0001-9515-1829](https://orcid.org/0000-0001-9515-1829)) Department of Forest Industrial Engineering, Faculty of Forestry, Artvin Çoruh University, Artvin, Türkiye

⁴Ayşegül SARAL SARIYER ([Orcid ID: 0000-0002-7757-6812](https://orcid.org/0000-0002-7757-6812)) Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Artvin Çoruh University, Artvin, Türkiye

⁵Özgür EMİNAĞAOĞLU ([Orcid ID: 0000-0003-0064-0318](https://orcid.org/0000-0003-0064-0318)) Department of Forest Engineering, Forestry Faculty, Artvin Çoruh University, Artvin, Türkiye

Corresponding Author: Yasemin CAMADAN, e-mail: yaseminc@artvin.edu.tr

INTRODUCTION

Humans live in the presence of various environmental stress factors such as microbes, allergens and polycyclic aromatic hydrocarbons, which can increase the production of reactive oxygen species (ROS) in the body. ROS can be defined as metabolites which carry intermediate oxygen with or without unmatched electrons that oxidize certain compounds and can convert them into free radicals, causing a chain reaction that produces numerous new radicals (Bouayed et al., 2010). Due to the increasing interest on the use of plants in different fields, it is important to discover new plant species and to examine their chemical compositions and biological properties. If not properly regulated by the endogenous defense system, ROS can react with important biomolecules, causing cellular damage, accelerated aging and the development of chronic diseases such as atherosclerosis, coronary diseases, cancer and neurodegenerative brain disorders (Olszewska et al., 2012).

The use of plants as food and medicinal drugs since ancient times is attributed to the biological activity of secondary metabolites with antioxidant activity such as phenolic compounds, vitamins C and E, and carotenoids. Phenolic compounds form a class of secondary metabolites characterized by an aromatic ring and one or more hydroxyl groups (Ndhlala et al., 2010). Polyphenols were reported to exhibit a wide range of biological effects including antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, antiallergic and vasodilatory properties (Cook et al., 1996). Besides the antioxidant effects, in animal and *in vivo* studies, plant polyphenols were shown to remove (scavenge) free radicals, regulate nitric oxide, reduce leukocyte immobilization, induce apoptosis and inhibit cell proliferation (Arts et al., 2005).

Due to the adverse effects of synthetic antioxidants used in foods on human health, interest in fruits and vegetables, which are natural antioxidant sources, has increased. (Aladedunye and Matthäus, 2014). Fruits, leaves and bark of different *Sorbus* L. species are used in the treatment of bronchitis and gastritis, as diuretics, anti-inflammatory, vasorelaxant, anti-diabetic and vitamin source (Raudonis et al., 2014; Bobinaitė et al., 2020). *Sorbus* is a plant genus in the Maloideae subfamily of the Rosaceae family. The genus consists of 100-200 tree and shrub species, and 12 *Sorbus* species and 17 taxa naturally grow in Turkey (Kavak et al., 2019). *Sorbus* is primarily found in small groups in the mixed angiosperm forests in Northern and Northwestern Anatolia. It is a small to medium-sized deciduous tree that typically grows to a height of 8-20 m and can live for more than 100 years. It is very tolerant to a wide variety of soil conditions. The bark is smooth, silvery gray on young trees, turns into scaly pale gray-brown, and sometimes cracks in old trees (Korkut et al., 2009). *Sorbus* berries are used in various processed foods in Northern Europe such as jams, jellies and beverages as they have high nutritional value and potential to improve health (Berna et al., 2011). Flavonoids and phenolic acids found in its berries are important antioxidants that improve food quality by slowing lipid oxidation. In addition, as antioxidants that inhibit lipid oxidation, plant phenolics prevent food spoilage during storage and processing (Kylli et al., 2010). Because they can act as radical scavengers, reductive substances, chain-breaking antioxidants and inhibit lipid oxidation, *Sorbus* extracts can be used as cost-effective natural antioxidants, which are alternatives to synthetic antioxidants (Zymone et al., 2018).

Infection-related deaths are increasing worldwide. The fact that nearly half of the deaths in tropical countries are caused by infection is important for a better understanding of the extent of the situation. Only *E. coli* and *Salmonella* strains cause around 300,000 infection-related child deaths in Africa every year (Akbar et al., 2011). The first experiments on plant antimicrobial activity and chemical composition were conducted later in the 19th century. Extracts of many plant species were

discovered to inhibit microbial growth. As a result of increased microbial resistance to antibiotics, there has also been an increased interest in natural antimicrobial compounds (Liepiņa et al., 2013). Plant-derived compounds with therapeutic value are secondary plant metabolites, which are often used traditionally for medicinal purpose. Due to chemical composition differences associated with the countries in which they are grown, antimicrobial activity of the same plant species could also vary. Phytochemicals with antimicrobial properties in medicinal plants are flavonoids, alkaloids, phenolics, polyphenols, coumarins and terpenes (Savoia et al., 2012). Despite the increased bacterial resistance to antibiotics, a decrease in the discovery of new antimicrobial drugs led researchers to alternative therapies. For the rapid development of new and effective treatment methods to fight antibiotic-resistant pathogens, the importance of natural plant products and plant extracts has increased (Cheesman et al., 2017).

Due to the growing interest towards and the need for natural antioxidants and antimicrobial compounds, we characterized morphologically *Sorbus umbellata* var. *cretica* (Lindl.) C. K. Schneid., *Sorbus persica* Hedl. and *Sorbus subfusca* Boiss. species of the Rosaceae family naturally grown in Artvin Province of Turkey and known as “oltu üvezi”, “eyvaz” and “highland üvezi”, respectively, and determined the amount of total phenols, flavonoids and antioxidant and antibacterial activities of extracts from the fruits, leaves and flowers of these species.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals Used In The Study

Of the chemicals used in the study, methanol, ethanol, neocuproine, NaOH, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid), sodium acetate, ferric chloride, glacial acetic acid, HCl, KCl, sodium carbonate, H₂SO₄ and carbon tetrachloride were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) and Merck (Darmstadt, Germany), while 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu's phenol reagent and 2,4,6-tri(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ) were purchased from Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland).

Land survey

Three different types of *Sorbus* were identified to be used in antioxidant and antimicrobial studies. For the collection of these specimens, land surveys were carried out in predetermined localities. *Sorbus umbellata* var. *cretica* (Lindl.) C.K. Schneid. was collected from Ardanuç District while *Sorbus persica* Hedl. was collected from Ardanuç town and *Sorbus subfusca* Boiss was from Borçka highland. Shoot specimens with leaves, flowers, fruits and seeds were collected using appropriate techniques in certain periods. The flower, fruit and leaf forms of plants are given in Figure I. Detailed photos of the land were taken for habitat information. Clear, detailed photos of the plants were taken in case some parts of the plant could crumple, fold on top of each other and the morphological parts used in identification key could disappear in the herbarium making process. For each plant taxon collected, label information such as aspect, altitude, locality, collection date and GPS coordinates were recorded using a camera that could provide GPS information (Canon Powershot SX70 HS Digital). The leaves and fruits were collected when they were ripened, and were kept in a cool place.



Figure1. Flower, Fruit and Leaf Forms In *S. persica*, *S. subfusca* and *S. umbellata* var. *cretica* Species

Morphological examination

Collected plant specimens were dried between press boards (29 x 41 cm) to be turned into herbarium material and prepared for the identification. Species identifications were performed based on previous publications (Davis et al., 1965) using a stereomicroscope (Nikon SMZ1000). Stereomicroscope was employed to determine size (length-width), shape, color and maturity of fruit. The photos were taken with a digital camera compatible with Trinocular Stereo Zoom light microscope. Morphological evaluations were carried out on herbarium material. Important taxonomic characters crucial for the identification of taxa examined were determined, and leaf, seed, pedicel and fruit measurements were made. The information of the identified samples was recorded in Artvin Çoruh University Herbarium (ARTH). The plants were stuck on white cardboards, labels with all the recording information were printed from the herbarium system, and placed to the lower right corner of the cardboard.

Preparation of samples

After the *Sorbus* samples were dried for 1-2 months, the fruit, stem and flower parts were separated and grounded using a blender. The extraction of powdered samples was carried out through mixing each sample with methanol in a shaker for 24 hours. The extracts were filtered through a regular filter paper and stored in a refrigerator at +4 °C for the assay.

Antioxidant assays

DPPH, FRAP, CUPRAC, total polyphenol and flavonoid capacity were determined in the sample extract.

Total polyphenol assay

In this method, the total soluble phenolic content in the sample reacts with Folin-Ciocalteu's reagent and creates a colored structure that absorbs at 760 nm. The standard curve was prepared with gallic acid (Slinkar et al., 1977).

Total flavonoid assay

The total amount of flavonoids is determined based on the method developed by Chang et al. (2002). In this method, aluminum chloride forms stable complexes with any of C-4 keto group or C-3 or C-5 hydroxyl groups of flavones and flavanols, and unstable complexes with ortho-dihydroxy groups in A and B rings of flavonoid. As standard, quercetin in the range of 0.03125-1.0 mg/mL was

used, and a standard curve was prepared using the absorbance values corresponding to these concentrationS.

Fe³⁺ reduction / FRAP method

In low pH, ferric tripyridyl triazine complex (Fe³⁺-TPTZ) is reduced to ferrous complex (Fe²⁺-TPTZ) due to the action of antioxidantS. The resulting complex is measured at 593 nm (Benzie et al., 1999; Huang et al., 2006). FRAP value of methanolic extracts was calculated as mg quercetin/g sample.

CUPRAC (Copper (II) Ion) reducing antioxidant capacity method

The basis of the method is to calculate the antioxidant capacity using the reduction capability of the copper (II)-neocuproine complex formed by Cu²⁺ ions in the environment to Cu(I)- neocuproine which has maximum absorption at 450 nm (Apak et al., 2004). Trolox (0.03125-1 mM) was used as standard in the analysis. The test results obtained are expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

DPPH free radical scavenging activity assay

In the present study, the method developed by Yu et al. (2002) was modified, and commercially purchased DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was used. A methanolic solution of DPPH radical (4 mg/100 mL) was prepared. Different concentrations of obtained extracts were prepared, mixed with equal volumes (0.750 mL) of DPPH solution and incubated at room temperature. Absorbance readings were made at 517 nm at which DPPH has maximum absorbance. The concentrations corresponding to the absorbance readings were plotted, and IC₅₀ values were calculated as mg/mL.

Determination of minimum inhibition concentrations (MIC) of plant methanolic extracts

Liquid microdilution method was used to determine the minimum inhibition concentrations of plant fruit and leaf methanolic extracts against standard strainS. The concentrations of plant methanol extracts used in the study are given in Table 1. Gram positive standard strains were *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. pyogenes* ATCC 19615. Gram negative standard strains were *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 43288 and *Proteus vulgaris* ATCC 13315. Experiments performed in triplicate using 96-well plateS. Fifty µL Mueller Hinton Broth (MHB) was added to each well except for well 12. Hundred µL MHB was added to well 12 and evaluated as a sterility control. Additionally, well 11 was prepared as a growth control (50 uL MHB + 50 µL bacteria).

Table 1. Concentrations of Plant Methanol Extracts Used in the Study

Plant methanol extracts	Concentrations (mg/mL)	Evaluated concentration range (mg/mL)
<i>S. umbellata</i> var. <i>cretica</i> l.	100.0	0.09800-50.00
<i>S. umbellata</i> var. <i>cretica</i> fr.	447.0	0.4400-223.5
<i>S. subfusca</i> l.	100.0	0.09800-50.00
<i>S. subfusca</i> fr.	446.0	0.4300-223.0
<i>S. persica</i> l.	79.00	0.07700-39.50
<i>S. persica</i> fr.	472.0	0.4600-236.0

*Abbreviations: *S. umbellata* var. *cretica* l., leaf of *S. umbellata* var. *cretica*; *S. umbellata* var. *cretica* fr., fruit of *S. umbellata* var. *cretica*; *S. subfusca* l., leaf of *S. subfusca*; *S. subfusca* fr., fruit of *S. subfusca*; *S. persica* l., leaf of *S. Persic*; *S. persica* fr., fruit of *S. persica*

Serial dilutions (1/2) were made up to well 10. All strains were grown in MHB medium at 37 °C. After the cultures were adjusted according to the 0.5 McFarland standard, 50 µL of inoculum (5 x 10⁵ CFU mL⁻¹) was applied to all wells except for well 12. Ampicillin (0.98-500 µg/mL) was used as

positive control. Plates were incubated at 37 °C. The minimum concentration without growth was considered as the MIC value (Chuah et al., 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

Within the scope of the study. *Sorbus* plant species naturally growing in Artvin province of Turkey were collected, and total phenolic content in methanolic extracts using Folin-Ciocalteu's method, total flavonoid content as quercetin equivalent, ferric reducing antioxidant power (FRAP), CUPRAC and Trolox equivalents of antioxidant capacity (TEAC) and antioxidant activity (spectrophotometrically using DPPH free radical scavenging methods) were determined.

Results of the total polyphenol assay showed that the highest antioxidant activity was 25.7 ± 16.49 mg GAE/g sample in *S. persica* pedicle extract while the lowest was 1.53 ± 0.183 mg GAE/g sample in *S. persica* fruit extract. Based on the results of total flavonoid analysis, *S. umbellata* var. *cretica* leaf extract had the highest level of total flavonoids (7.469 ± 0.4926 mg of quercetin/g) whereas the lowest level was measured in *S. persica* fruit extract (0.3940 ± 0.005671 quercetin/g). In terms of FRAP analysis, the highest activity values were measured in *S. persica* leaf extract (6.248 ± 0.2374 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ sample) and *S. umbellata* var. *cretica* leaf (6.070 ± 0.3125 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ sample). In CUPRAC analysis, the highest activity (164.4 ± 4.209 mmol TEAC/g sample) was observed in *S. umbellata* var. *cretica* leaf extract. Based on the result of the DPPH method, the highest activity was measured in *S. persica* leaf extract as 0.04633 $\mu\text{g/mL}$, followed by *S. umbellata* var. *cretica* leaf and *S. subfusca* leaf extract. Total polyphenol, total flavonoid, CUPRAC and FRAP results of methanolic extracts are given in Table 2. DPPH results of methanolic extracts are given in Figure 2.

Table 2. Polyphenol and FlavonoidC, FRAP and CUPRAC Results of Plant Samples

Extracts	Total polyphenol amounts (mg GAE/g sample)	Total Flavonoid amount (mg quercetin/g sample)	FRAP test ($\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ sample)	CUPRAC test (mmol TEAC/g sample)
Trolox	-	-	-	-
<i>S. persica</i> fr.	1.530 ± 0.1830	0.3940 ± 0.005671	0.09080 ± 0.004786	21.66 ± 5.859
<i>S. persica</i> fl.	5.470 ± 0.5590	2.766 ± 0.1274	1.362 ± 0.03549	63.23 ± 1.575
<i>S. persica</i> l.	10.30 ± 3.405	5.807 ± 0.1498	6.248 ± 0.2374	92.54 ± 10.18
<i>S. persica</i> p.	25.70 ± 16.49	1.187 ± 0.02887	1.797 ± 0.08872	72.64 ± 10.82
<i>S. umbellata</i> var. <i>cretica</i> fr.	2.450 ± 1.570	0.4213 ± 0.003146	0.03309 ± 0.001155	8.398 ± 0.1761
<i>S. umbellata</i> var. <i>cretica</i> l.	13.00 ± 1.267	7.469 ± 0.4926	6.070 ± 0.3125	164.4 ± 4.209
<i>S. subfusca</i> fr	1.570 ± 0.4000	0.6909 ± 0.01287	0.07255 ± 0.002919	15.98 ± 1.435
<i>S. subfusca</i> l.	10.00 ± 1.066	7.147 ± 0.4023	5.322 ± 0.1806	63.93 ± 17.44

Abbreviations: *S. persica* f., fruit of *S. persica*; *S. persica* fl., flower of *S. persica*; *S. persica* l., leaf of *S. persica* leaf; *S. persica* p., pedicle of *S. persica*; *S. umbellata* var. *cretica* fr., fruit of *S. umbellata* var. *cretica*; *S. umbellata* var. *cretica* l., leaf of *S. umbellata* var. *cretica*; *S. subfusca* fr., fruit of *S. subfusca*; *S. subfusca* l., leaf of *S. subfusca*.

None of the plant methanolic extracts showed antibacterial activity against *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. pyogenes* ATCC 19615 strains in the concentration ranges studied. The MIC values of *S. subfusca* fruit methanolic extract and *S. persica* leaf methanolic extract against *E. coli* ATCC 25922 were 111.5 and 39.5 mg/mL, respectively. *S. umbellata* var. *cretica* fruit methanolic extract was found to have a MIC value of 223.5 mg/mL against *P. aeruginosa* ATCC 43288 and *P. vulgaris* ATCC 13315. *S. subfusca* leaf extract inhibited the growth of *P. aeruginosa* ATCC 43288 with 50 mg/mL MIC value. The MIC value of the *S. subfusca* fruit methanolic extract against *P. vulgaris* ATCC 13315 was 111.5 mg/mL. MIC results of methanolic extracts are given in Table 3.

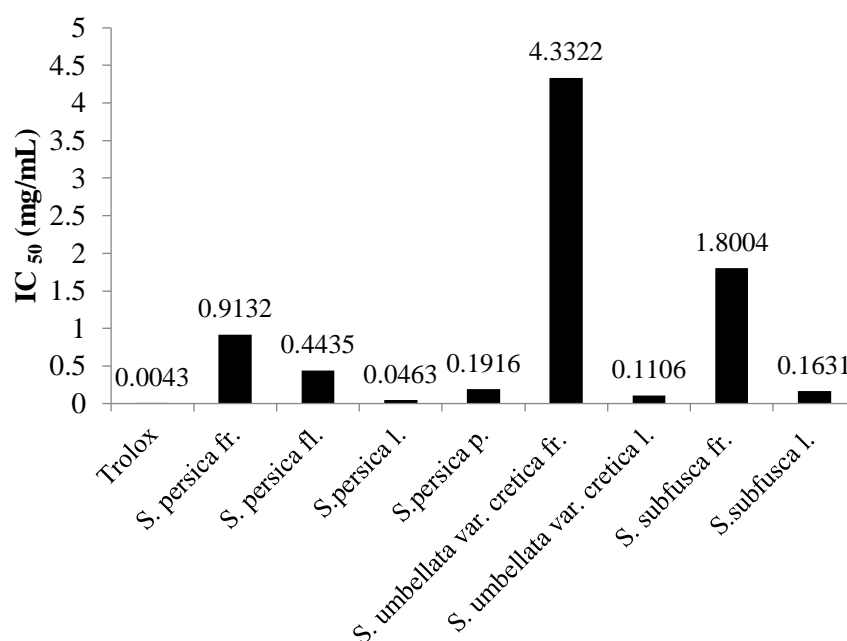


Figure 2. DPPH Results of Plant Samples

Abbreviations: *S. persica* fr., fruit of *S. persica*; *S. persica* fl., flower of *S. persica*; *S. persica* l., leaf of *S. persica*; *S. persica* p., pedicle of *S. persica*; *S. umbellata* var. *cretica* fr., fruit of *S. umbellata* var. *cretica*; *S. umbellata* var. *cretica* l., leaf of *S. umbellata* var. *cretica*; *S. subfusca* f., fruit of *S. subfusca*; *S. subfusca* l., leaf of *S. subfusca*.

Table 3. MIC Values of Plant Methanolic Extracts Against Standard Strains

MIC (mg/mL)							
Methanol extracts							
Standard strains	1	2	3	4	5	6	Amp
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	111.5	39.5	-	0.0078
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 43288	-	223.5	50	-	-	-	0.0039
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	-	223.5	-	111.5	-	-	0.0078
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-	0.25
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	0.0078
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	-	-	-	-	0.0078

Abbreviations: 1: *S. umbellata* var. *cretica* leaf, 2: *S. umbellata* var. *cretica* fruit, 3: *S. subfusca* leaf, 4: *S. subfusca* fruit, 5: *S. persica* leaf, 6: *S. persica* fruit, Amp: Ampicillin

Antioxidant activities of various substances can be evaluated using the scavenging capacity of synthetic radicals. In the present study, we identified the free radical scavenging activities of plant extracts using one of the most widely used methods, i.e. DPPH free radical scavenging method. In addition, semi-maximum effective concentration IC₅₀ was calculated to measure antioxidant activity. IC₅₀ is defined as the efficient sample concentration required to reduce DPPH concentration by 50%. IC₅₀ is similar to EC₅₀ in biological measurements, and IC₅₀ refers to the sample concentration required to reduce radical scavenging activity by 50% (Çoban et al., 2021). The extract with the lowest IC₅₀ values has the largest free radical scavenging activity. Based on the result of the DPPH method, the highest activity was measured in *S. persica* leaf extract as 0,04633 µg/mL and the result was found to be very close to the standard. Total polyphenol, total flavonoid, CUPRAC, FRAP results are given in Table 2 and DPPH results are given in Figure 2. A general evaluation of the results showed that leaf extracts of *S. persica* pedicle, *S. persica* leaf and *S. umbellata* var. *cretica* leaf extracts of *S. persica* had higher antioxidant levels and somewhat similar values in all assay.

In a study dealing with methanolic extracts of flowers and leaves of different *Sorbus* species, DPPH IC₅₀ values ranged from 15.23 ± 0.54 to 57.86 ± 1.63 g/mL while total polyphenol levels varied

between 4.23 ± 0.15 and 11.67 ± 0.05 (GAE%) (Olszewska et al. 2010). Another study with *Sorbus torminalis* found that DPPH EC₅₀ values ranged from 53.49 ± 0.65 to 210.6 ± 1.61 µg/mL, total amounts of polyphenols ranged between 2.14 ± 0.10 and 5.75 ± 0.09 (GAE %) (Olszewska et al., 2011). In their study, Hasbal et al. (2015) found that *Sorbus torminalis* methanolic extracts had total phenolic content of 3.83 ± 0.64 (mg/g), total flavonoid content of 1.73 ± 0.612 (mg/g), semi-maximum effective concentration of DPPH (EC₅₀) value of 32.31 ± 2.615 (mg/mL) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) value of 0.45 ± 0.020 (mM). Thus, the findings of the present study were compatible with previous studies on *Sorbus* species.

As a result of their phenolic contents, various *Sorbus* species were reported to have hypoglycemic, diuretic, vasoprotective, anti-inflammatory and antidiarrheal properties (Tahirovic et al., 2019) and antioxidant activities (Hukkanen et al., 2006). Due to the linear relationship between phenolic compounds and antioxidant activity and due to the antioxidant activity and capacity of these compounds to neutralize reactive oxygen types, they are considered to be beneficial in sustaining human health and preventing diseases (Olszewska et al., 2010).

The rapid spread of bacteria with antibiotic resistance and the decreasing success rate against multiple antibiotic resistance in the treatment of infection indicate the importance of medicinal plants to develop antibiotics and use them as alternatives to drug. In this context, the antibacterial activities of three *Sorbus* species, phytogeographically distributed in certain areas in Artvin province, whose antibacterial activities were not previously studied against standard strains, were evaluated in the present study. For this purpose, methanolic extracts were obtained from the leaves and fruits of *S. umbellata* var. *cretica*, *S. subfusca* and *S. persica*. Liquid microdilution method was used to determine the MIC values of methanolic extract. None of the plant methanolic extracts showed antibacterial activity against *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* ATCC 19615 strains in the concentration ranges studied. *S. subfusca* fruit methanolic extract and *S. persica* leaf methanolic extract inhibited the growth of *E. coli* ATCC 25922 with 111.5 mg/mL and 39.5 mg/mL MIC values, respectively. *S. umbellata* var. *cretica* fruit methanolic extract inhibited the growth of *P. aeruginosa* ATCC 43288 and *P. vulgaris* ATCC 13315 strain. *S. subfusca* leaf methanolic extract inhibited the growth of *P. aeruginosa* ATCC 43288 with a MIC value of 50 mg/mL. The MIC of *S. subfusca* fruit methanolic extract against *P. vulgaris* ATCC 13315 was 111.5 mg/mL. Ampicillin was used as a control in the antibacterial activity assay. Ampicillin appeared to have lower MIC values than plant methanolic extract. This indicates that plant methanolic extracts have antibacterial activity at higher concentration. There is no consensus over the acceptable level of inhibition when comparing natural products to antibiotic standard. Some authors found that natural products are effective only when they have inhibition levels similar to antibiotic. However, others considered the compounds to be effective at lower levels of inhibition than normal levels observed with commercial antimicrobials (Silva et al., 2011).

Based on these findings, it can be stated that the plant methanolic extracts evaluated in the present study have antibacterial effect. Studies were conducted to evaluate the antibacterial activity of extracts of *Sorbus* species. In a study conducted by Liepina et al. (2013) with *S. orbussibirica*, it was determined that the plant extract had an antibacterial effect on *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* strains, but not against *Escherichia coli* strain. Trumtay et al. (2017) evaluated *S. caucasica* and *S. aucuparia* and found that while *S. caucasica* leaf extract had an effect on *P. aeruginosa*, it did not affect *E. coli* or *Typhimurium* strain. They also revealed that the fruit content of *S. aucuparia* did not affect the *S. typhimurium* strain, but was effective on *E. coli* and *P. aeruginosa*. The results

obtained in the present study showed that *Sorbus* species have antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative strains.

CONCLUSION

Antioxidants obtained from plants have been the subject of many studies in recent years due to their positive effects on human health and because they have stronger antioxidant properties compared to the synthetic antioxidants used in food. It could be stated that *Sorbus* species collected from Artvin province in the present study have the capacity to be natural antioxidants. *In vitro* efficacy of combinations of *Sorbus* extracts with commercial antibiotics could be investigated against antibiotic resistant strains in future studies, which may contribute to combating antibiotic resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Scientific Research Project of Artvin Çoruh University of Turkey Grant Number: BAP. 2017.F80.02.02.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Akbar, A. & Anal, K. A. (2011). Food safety concerns and food-borne pathogens, Salmonella, Escherichia coli and Campylobacter. *FUUAST Journal of Biology*, 5, 5-17.
- Aladedunye, F. & Matthäus, B. (2014). Phenolic extracts from *Sorbus aucuparia* (L.) and *Malus baccata* (L.) berries: Antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage. *Food Chemistry*, 159, 273-28.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. & Karademir, E.S. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: cuprac method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Arts, C.W.I & Hollman, C.H.P. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 8, 317-325.
- Benzie, J.F. & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.
- Berna, E., Kampuse, S., Dukalska, L. & Murniece, I. (2001). The chemical and physical properties of sweet rowanberries in powder sugar. *Foodbalt*.
- Bobinaite, R., Grootaert, C., Camp, V.J. & Sarkinas, A. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of the extracts isolated from the pomace of rowanberry (*Sorbus aucuparia* L.). *International Food Research Journal*, 136, 109310. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109310>
- Bouayed, J. (2010). Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Chang, C. C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3), 178-182.

- Cheesman, J.M., Ilanko, A., Blonk, B. & Cock, E.I. (2017). Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy Research*, 11, 57-60.
- Chuah, L.E., Zakaria, A.Z., Suhail, Z., Bakar, A.S. & Desa, M.N.M. (2014). Antimicrobial activities of plant extracts against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology Research*, 4, 6-13. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20140401.02>
- Cook, C.N. & Samman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- Çoban, F., Tosun, M., Özera, H., Güneş, A., Öztürka, E., Atsan, E. & Polat, T. (2021). Antioxidant activity and mineral nutrient composition of *Polygonum cognatum* – a potential wild edible plant. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 20 (1), 221-229.
- Davis, H.P., Cullen, J. & Coode, E. J. M. (1965). Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Hasbal, G., Yılmaz-Ozden, T. & Can, A. (2015). Antioxidant and antiacetylcholin esterase activities of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz (wild service tree) fruit. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23, 57-62.
- Huang, W.Z., Dai, X.J., Liu, Y.Q., Zhang, C.F., Zhang, M. & Wang, Z.T. (2006). Studies on antibacterial activity of flavonoids and diaryl heptanoids from *Alpinia katsumadai*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 15, 37-40.
- Hukkanen, A.T., Pölönen, S.S., Kärenlampi, S.O. & Kokko, H.I. (2006). Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowan berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 112-119.
- Kavak, D.D. & Akdeniz, B. (2019). *Sorbus umbellata* (Desf.) Fritsch var. *umbellata* leaves: optimization of extraction conditions and investigation antimicrobial cytotoxic, and β -glucuronidase inhibitory potential. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74, 364-369. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00743-9>
- Korkut, S., Guller, B., Aytin, A. & Kök, S.A. (2009). Turkey's native wood species: physical and mechanical characterization and surface roughness of rowan (*Sorbus aucuparia* L.). *Wood Research*, 54, 19-30.
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimia, R., Westerlund-Wikstrom, B., McDougall, G., Stewart, D. & Heinonen, M. (2010). Rowanberry phenolics: compositional analysis and bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11985-11992. <https://doi.org/10.1021/jf102739v>
- Liepiņa, I., Nikolajeva, V. & Jākobsone, I. (2013). Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *Environmental and Experimental Botany*, 11, 195-199.
- Ndhlala, R.A., Moyo, M. & Staden, V. J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15, 6905-6930. <https://doi.org/10.3390/molecules15106905>
- Olszewska, A., Nowak, S., Michel, P., Banaszczak, P. & Kłicel, A. (2010). Assessment of the content of phenolics and antioxidant action of inflorescences and leaves of selected species from the genus *Sorbus* sensu stricto. *Molecules*, 15, 8769-8783. <https://doi.org/10.3390/molecules15128769>
- Olszewska, A. M., Presler, A. & Michel, P. (2012). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected *Sorbus* species. *Molecules*, 17, 3093-3113. <https://doi.org/10.3390/molecules17033093>

- Olszewska, A.M. (2011). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of the inflorescences, leaves and fruits of *Sorbus Torminalis* (L.) Crantz. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 66, 945-953.
- Raudonis, R., Raudone, L., Gaivelyte, K., Viskelis, P. & Janulis, V. (2014). Phenolic and antioxidant profiles of rowan (*Sorbus* L.) fruit. *Natural Product Research*. <http://doi.org/10.1080/14786419.2014.895727>
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotic. *Future Microbiology*, 7(8), 979–990.
- Silva, D.M., Costa, A.P., Ribon, O.A., Purgato, A.G., Gaspar, M.D. & Diaz, N. A. M. (2019). Plant Extracts Display Synergism with Different Classes of Antibiotic. *Access Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91(2). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180117>
- Slinkar, K. & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Tahirovic, A., Mehic, E., K Josevski, N. & Basic, N. (2019). Phenolics content and antioxidant activity of three *Sorbus* specie. *Glasnik Hemičarai Tehnologa Bosnei Hercegovine*, 53, 15-21. <https://doi.org/10.35666/ghtbh.2019.53.03>
- Turumtay, H., Midilli, A., Akyuz- Turumtay, E., Demir, A., Kılıçkaya-Selvi, E., Budak, E. E., Er, H., Kocaimamoglu, F., Baykal, H., Beldüz, A. O., Atamov, V. & Sandal, C. (2017). Gram (–) microorganisms DNA polymerase inhibition, antibacterial and chemical properties of fruit and leaf extracts of *Sorbus acuparia* and *Sorbus caucasica* var. *Yaltirikii*. *Biomedical Chromatography*, 31, e3901. <https://doi.org/10.1002/bmc.3901>
- Yu, T., Lee, J. Y., Jang, J.H., Kim, R.A., Hong, S., Kim, T. W., Kim, M. Y., Jaehwi, L., Lee, Y.G., & Cho, J. Y. (2011). Anti-inflammatory activity of *Sorbus commixta* water extract and its molecular inhibitory mechanism. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 493–500. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.032>
- Zymone, K., Raudone, L., Raudonis, R., Marksa, M., Ivanauskas, L., & Janulis, V. (2018). Phytochemical Profiling of Fruit Powders of Twenty *Sorbus* L. *Cultivars*, 23, 2593. <http://doi.org/10.3390/molecules2310259>.

Fabrication of Highly Efficient Fe₃O₄/SSIP/GO Composite Films for Removal of Methylene Blue Dye

Mehmet Salih NAS^{1*}, Mehmet Harbi CALIMLI¹, Özkan DEMİRBAŞ³

Highlights:

- The composite film was synthesized by an extruder device.
- Tested optimum conditions for methylene blue removal
- Adsorption kinetics were performed using three different models

Keywords:

- Sunflower
- Adsorption
- Composite film
- Characterization

ABSTRACT:

In this paper, we report the preparation of a new Fe₃O₄/SSIP/GO composite film for the purification of methylene blue dye from solution media. The preparation process of composite film was carried out to improve the interaction between the inner part of the sunflower stalk (SSIP) and surface matrix using magnetite/Graphene Oxide (Fe₃O₄/GO) minerals at weight ratios (0.2/4/0.2:w/w/w). The characterizations of as-developed Fe₃O₄/SSIP/GO composite film was successfully carried out by some advanced techniques such as FT-IR, SEM, and TGA analyses. Adsorption kinetic studies were evaluated in three different aspects as a pseudo-first-order model, pseudo-second-order model, and intraparticle diffusion-type model. Based on the R² results, it was seen that the Pseudo-second order kinetic model (0.999) acted more harmoniously than the pseudo-first-order (0.960) and intra-particle diffusion technique models (0.974). In the light of these findings, it can be said that the prepared Fe₃O₄/SSIP/GO composite film used for removal of methylene blue dye can be considered as a promising material

¹ Mehmet Salih NAS ([Orcid ID: 0000-0003-1092-5237](https://orcid.org/0000-0003-1092-5237)), Mehmet Harbi CALIMLI ([Orcid ID: 0000-0001-9756-191X](https://orcid.org/0000-0001-9756-191X)), İğdır University, Department of Medical Services and Techniques, Tuzluca Vocational School, İğdır University, İğdır, Türkiye.

³ Özkan DEMİRBAŞ ([Orcid ID: 0000-0001-9548-0227](https://orcid.org/0000-0001-9548-0227)), İğdır University, Department of Chemistry, Faculty of Science and Literature, University of Balıkesir, Türkiye.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Salih NAS, e-mail: msalih.nas@igdir.edu.tr

INTRODUCTION

The sunflower plant, which is an annual and broad-leaved species, constitutes the majority of oil resources worldwide (P. et al. 2009) (Vaithanomsat et al., 2009). Parallel to the increase in the world population, the increase in the amount of oil consumption has resulted in a positive increase in sunflower cultivation areas. After the sunflower plant is harvested, an extremely high significant amount of product is produced as the leaves, heads and stems of the sunflower plant (Follain et al. 2015). If sunflower stalks are not well controlled, a way is followed by burning them. This method leads to environmental pollution with severe consequences and misuse of the source material (Shi and Yang, 2012). However, a high amount of pectin and cellulose is obtained by extracting sunflower stalks (SSP), and a different alternative source is gained for the obtained pectin extraction, biofuel extraction, or cellulose-based materials (Xu et al. 2020), a very large specific surface area, and a special structure compared to lignocellulosic fiber materials (Sun et al., 2013). SSP can be considered an adsorbent source for the removal of polluted wastes in wastewater due to its unique physicochemical structural properties (Oguntimein 2015; Nas 2021), easy degradability (Jalali and Aboulghazi 2013), and cost-effectiveness (Knapik and Stopa 2018). The rapid increase in industrial activities in recent times has led to the formation of wastes that leave serious negative traces on the environmental cycle and human health. Pollutants released into the aquatic environment from different industries are the main serious factors damaging the habitat. Toxic heavy metals, dyestuffs, drugs, organic acid products, phenolic substances, and halogenated compounds are some of the pollutants that negatively pollute the environment. Even in trace amounts, these products have very serious dangerous consequences for humans and aquatic organisms. E. Pollutants have a great role in environmental pollution due to the use of textiles, paper, cosmetics, printing, medicine, food, and leather (Tang et al. 2019). Dyestuffs in wastewater are very dangerous due to their high toxicity. In addition, since the dyes released into the environment give an undesirable color to the water, they prevent the sunlight from being taken sufficiently (Jiang et al. 2019). Before these waste materials are released into the environment, toxic and reactive dyes must be purified using appropriate processes (Nas and Kaya 2020). The adsorption process, membrane separation method, precipitation way, precipitation, ion exchange mechanism, flocculation process, electrochemistry way, photoelectrochemistry method, advanced oxidation process mechanisms (AOPs), and biological treatment method are among the most accepted methods to remove unwanted dyestuffs from the environment (Parvin et al. 2019; Wekoye et al. 2020). Among these treatment type methods, the adsorption method is the most preferred process approach due to its positive features such as being economical, easy to apply, and environmentally friendly (Cheng et al. 2017; Nas 2019; Bingül Reçber et al. 2022). In general, waste biomass products, clay-containing minerals, and activated carbon are used as a source of adsorbent material for dye removal in the adsorption process (Liu et al. 2019; Bayat et al. 2022). This study, the composite film obtained from a mixture of SSP, Fe₃O₄, and GO was used as a vehicle for removing the MB dyestuff. The synthesized composite film samples were characterized by SEM, TGA, and FT-IR analysis techniques, respectively. As a result, we can say that it has been seen that it can be used effectively in the removal of pollutants such as methylene blue by using composite film in a water solution environment.

MATERYAL VE METOT

Chemicals

FeCl₃.6H₂O, FeCl₂.4H₂O, sodium hydroxide compound, ethanol, graphite material, and methylene blue were used from Sigma Aldrich Chemical Company. In this trial study, the inner part of the

sunflower stalk, which is used as a precursor material for dye removal, was obtained from the province of Iğdır in Turkey.

Preparation of Fe₃O₄

0.2 g FeCl₃ and 0.08 g FeCl₂ were mixed in 36 mL deionized water at 50 °C for 15 minutes. Then, NaOH solution (0.1 M) prepared to the reaction medium was added dropwise until the black color disappeared (pH=9), and the solution mixture was stirred vigorously for 1 hour at room temperature. The final product was separated by a supermagnet material by thorough washing with deionized water and ethanol and allowed to dry for 2 hours in an oven at 60 °C (Wei et al. 2012).

Preparation of graphene oxide

Graphene oxide synthesis was prepared with reference to the Hummers process (Benzait et al. 2021). The oxidation was carried out by adding sulfuric acid (360 mL) and phosphoric acid (40 mL) to the graphite flake (3 g) materials, respectively. After stirring for 30 minutes, potassium permanganate (18 g) was added to the medium and stirred for a day so that the oxidation process was efficient. Then 500 ml of water and 10 ml of hydrogen peroxide were added to this mixture. The final mixture was allowed to cool in an ice bath. Then the mixture was washed with copious amounts of HCl solution (1 M) and distilled water and left to dry in an oven at 70 °C for 12 hours.

Preparation of Fe₃O₄/ SSIP /GO composites film

Before mixing, the Fe₃O₄, SSIP, and GO samples were dried at 105 °C for 2 hours. The products were then cooled to room temperature in a desiccator. After mixing the Fe₃O₄/ SSIP/GO composite film at weight ratios (0.2/4/0.2:w/w/w), they were combined in a single screw extrusion apparatus. Composite film was made at a temperature range of 140-170 °C and a screw speed of 15 rpm.

Characterization of prepared composite films

Fourier transforms infrared (FTIR) spectrum measurements of the materials prepared with SSIP, GO, and Fe₃O₄/SSIP/GO, a Perkin Elmer Spectrum brand device was used by taking the wavelength range of 2500-400 as reference. Thermogravimetric measurements and differential thermal analyzes (TG/DTA) of the prepared samples were performed by taking the 25–800 °C temperature range as a reference, taking into account the 15°/min heating rate and nitrogen atmosphere. The morphological structures of the targeted products were analyzed using a scanning electron microscope (SEM) device.

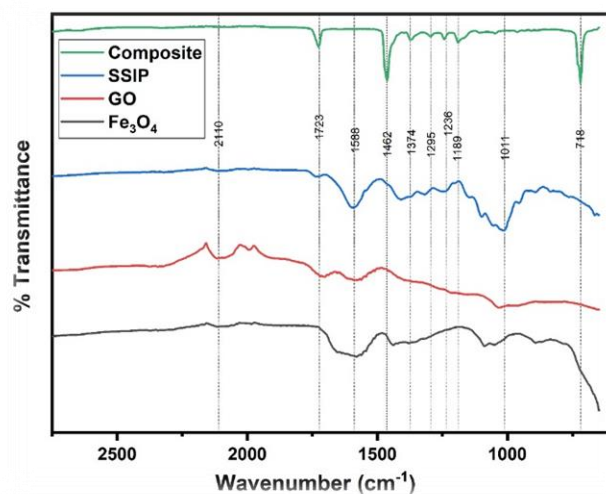


Figure 1. FTIR spectrum of Fe₃O₄, GO, SSIP and Fe₃O₄/ SSIP/GO

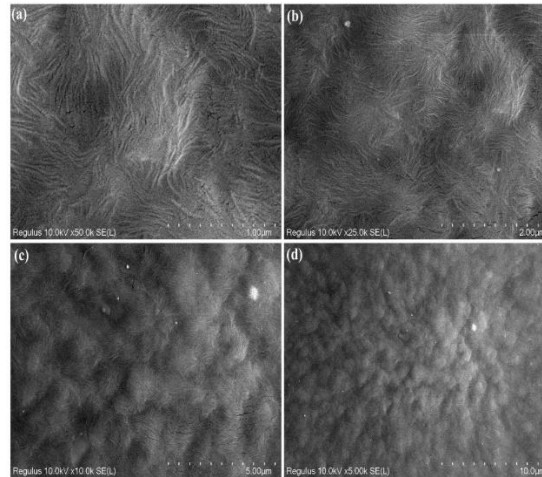


Figure 2. SEM pattern of Fe₃O₄/SSIP/GO

Adsorption test process of methylene blue

Adsorption test analyses are performed by setting up a three-necked laboratory-type glass balloon setup. Methylene blue stock solutions were prepared using the specified amount of distilled water as solvent. Experimental run analyzes were performed at room temperature at a stirring speed of 400 rpm (pH 9) at initial concentration conditions of 5×10^{-6} M methylene blue. The effect of the prepared composite films on the dye removal was tested in a time interval of 1440 minutes and at 400 rpm. It was done using NaOH solution (0,1 M) and HCl solution (0,1 M) to adjust the pH of the methylene blue solution. 3 mL sample was taken from the solution to interpret each adsorption assay. These samples were centrifuged at 5000 rpm (Cary 1E UV-Vis spectrophotometer) for 5 minutes. Adsorption data were instantaneously followed and determined using Equation (1) to test the amount of methylene blue absorbed on the composite film surface as shown below.

$$qt = \frac{(C_0 - C_e)}{m} \times V \quad (1)$$

where qt is the initial amount of the adsorbent dyestuff type, C_0 is the amount of the initial MB concentration value used, C_t is the amount of the MB concentration value at any point, m is the mass of the supporting material type used and V is the volume of the solution used in the process. (Demirbaş et al. 2002).

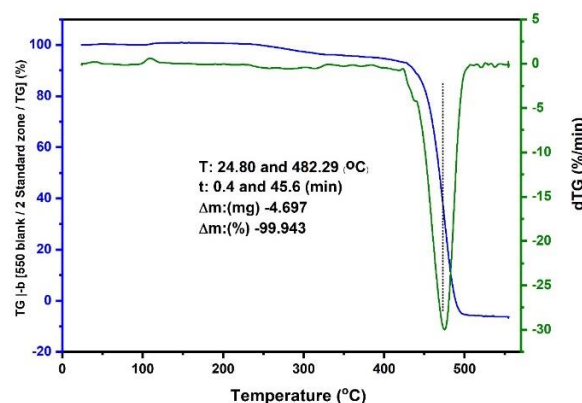


Figure 3. TGA curve of Fe₃O₄/SSIP/GO

BULGULAR VE TARTIŞMA

Investigation of the morphological and chemical structure of the composite film

The FT-IR spectrum of Fe₃O₄, GO, SSIP, and Fe₃O₄/SSIP/GO composite film particles is imaged in Figure 1. The band peak at 1588 cm^{-1} in the FTIR spectrum of SSIP indicates the C—O stretch

vibration peaks of aromatic carbonyl groups C=O, and C=C groups in the raw spectrum. Band peak values close to 1425 cm^{-1} represent the CH₂ asymmetric deformation state and the variation due to aromatic C–C stretching. The peak band values observed between 1390 and 1011 cm^{-1} represent the peaks associated with carboxylic acids, alcohols, esters, and phenolic compounds in lignin (O–H bending, C–O stretching). In the structure of cellulose and hemicellulose, a peak state of C–O–C stretching appeared at 1050 cm^{-1} (Podder & Majumder, 2015). Peak band status was observed between 900 and 600 cm^{-1} due to antisymmetric out-of-plane aromatic ring stretching (Baysal et al., 2018). SEM device was used to define the surface morphology of the targeted materials. The variation in the morphology of the doped iron oxide compound, GO, and crude SSIP were explained using SEM images of samples at different nanoscales in Figure 2. TGA analysis results are given regarding the samples' thermal degradation and mass losses. TGA results were used with the Perkin Elmer Pyres model analyzer. The Fe₃O₄/SSIP/GO composite film was analyzed at 0–500 °C. As indicated in Figure 3, all TGA analysis results were performed in a nitrogen gas environment and at a heating rate of 10 °C/min. Fe₃O₄/SSIP/GO composite film was synthesized using weight ratios (0.2/4/0.2:w/w/w) forming a homogeneous mixture. According to the TG/DTA curves of the Fe₃O₄/SSIP/GP composite film, it is seen that a two-step reaction interaction occurs. The composite film is resistant to temperatures up to 482 degrees, and it was noticed that if it was above this degree, it lost its strength at a high rate and its structure deteriorated. Therefore, a high rate of mass loss was observed.

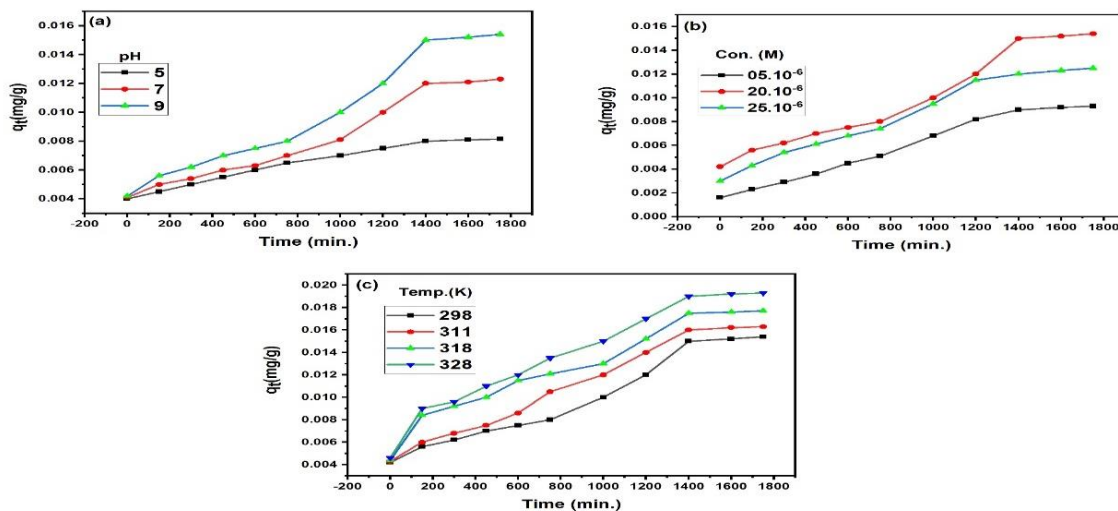


Figure 4. (a) Effect adsorption of pH to MB removal (b) Effect adsorption of initial dye concentration to MB removal (c) Effect adsorption of temperature to MB removal

Effect of different pH on adsorption kinetics

The variation of the adsorption kinetics of the dye solution at different pH ranges is given in Figure 4(a). As the pH increased, the amount of adsorption increased. Generally, there are both negatively and positively charged functional groups on the surface of the composite film used in adsorption kinetic studies (Nandi et al. 2009). The effect of removing methylene blue (MB) from the water solution with the composite film was tested in the pH range of 5-9. The hydrophobic functional groups on the composite film surface interact with MB (Ghaedi et al. 2015). The datas obtained from this result show the presence of very strong electrostatic forces between the positively charged MB and the negative density composite film when the pH value of the solution increases (Li et al. 2010; Çalmlı et al. 2019; Demirbaş et al. 2019).

Effect of dye concentration on adsorption results

Determination of the adsorption effect on MB dye concentration was tested by preparing samples of different concentrations of $0.5 \cdot 10^{-5}$ - $2.5 \cdot 10^{-5}$ M. Experimental analyses in the presence of a contact time of 1440 minutes, pH 7, and a temperature of 25 °C. Increasing the MB dye concentration from $0.5 \cdot 10^{-5}$ M to $2.5 \cdot 10^{-5}$ M resulted in a negative synergistic resulting in a decrease in adsorption efficiency from 90% to 75%. The density of the pore areas available on the composite film is sufficient to adsorb a certain of dyestuff in concentration. The increase in dyestuff concentration above this value is not sufficient for adsorbing. In this case, it causes a slight decrease in the MB removal (Figure 4(b)).

Effect of temperature parameter on adsorption Kinetics

In Figure 4(c), the adsorption kinetic change was tested under constant conditions determined at different temperatures. It has been observed that the temperature function is quite effective in the removal of MB dye adsorption on the composite film. Experimental studies were performed at 25, 38, 45, and 55 °C using pH 9 and 20×10^{-6} M initial methylene blue concentration constant conditions. It was determined that the best efficiency adsorption amount was obtained at 55 °C. This situation can be explained as follows. As the temperature increases, the adsorption value equivalent to the diffusion rate of the molecules on the composite film increases due to the increase in the kinetic energies of the molecules. The pores of the composite film increase in volume depending on the temperature increase. This creates a positive synergistic effect on the adsorption value of MB removal (Dahri et al. 2015). In addition, an image is shown in a lab-tested working example of MB dye removal with composite film (Figure 5) (Şen et al. 2018).

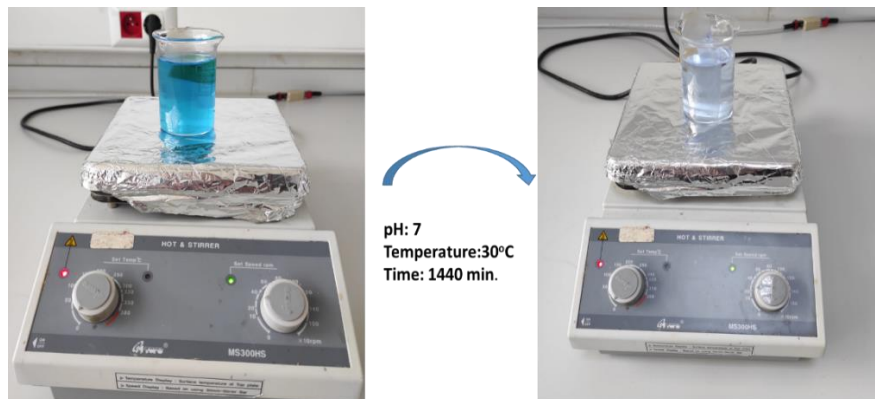


Figure 5. A lab-tested image of MB dye removal with Fe₃O₄/SSIP/GO composite film

Adsorption kinetics

Adsorption kinetics were tested using the following formulas of pseudo-first-order, pseudo-second-order, and intra-particle diffusion model. Based on the R² results, it was seen that the Pseudo-second order kinetic model (0.999) acted more harmoniously than the pseudo-first-order (0.660) and intra-particle diffusion model (0.974)

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (2)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (3)$$

$$q_t = k_{int} t_{1/2} + C \quad (4)$$

Where; the t , q_e , q_t , k_2 and k_{int} ($\text{mg (g min}^{-1/2})^{-1}$) is time (min.), first amount of MB, last amount of MB, and the constant ratios, respectively (Ho and McKay 1999; Demirbaş et al. 2014).

Tablo 1. Isotherm models used for testing adsorption kinetics

Isotherm Model	Model Equation	Parameters	Değişken sabitler
Freundlich	$\log(qe) = \log KF + \frac{1}{n} \log Ce$	R ² =0.996	K_F : Freundlich isotherm constant n : Adsorption intensity
Langmuir	$\frac{Ce}{qe} = \frac{1}{K_L(qmax.)} + \frac{Ce}{qmax.}$	R ² =0,948	K_L : Langmuir isotherm cons. qmax. : maximum adsorption capacity
Temkin	$qe = \frac{RT}{b} (\ln KT + \ln Ce)$	R ² =0.964	b : Temkin isotherm cons. K_T : Temkin isotherm binding cons.

Langmuir, Freundlich, and Temkin adsorption isotherm models were tested to investigate adsorption isotherms. The isotherm parameters of the adsorption are detailed in Table 1. Based on the R² results, it was found to be more compatible than the Freundlich (0.996), Langmuir (0.948), and Temkin (0.964) isotherm models.

CONCLUSION

Composite film consisting of Fe₃O₄/SSIP/GO was successfully prepared and applied to investigate the methylene blue removal efficiency. The kinetic parameters (temperature, initial concentration of methylene blue, and pH) of the adsorption between the Fe₃O₄/SSIP/GO composite film and methylene blue were analyzed. Experimental datas showed that increasing methylene blue concentration has a positive synergistic effect on adsorption efficiency. In addition, it was determined that the adsorption increased when the pH values of the prepared dye solution increased from 5 to 9. Adsorption kinetic studies were carried out at temperatures, contact times, and pH conditions, which determined the adsorption mechanism and isotherm model. As a result of the calculations, it was determined that there is a positive relationship consistent with the adsorption kinetic datas of MB on the Fe₃O₄/SSIP/GO composite film surface, Freundlich isotherm (R² =0.996) and the pseudo-second-order kinetic process model (R² =0.999). In this study, we can say that Fe₃O₄/SSIP/GO composite film can be preferred as an effective adsorbent for dye removal.

TEŞEKKÜR

This study was funded by Iğdır University Scientific Research Projects Commission (No: MÜF0520A12).

Çıkar Çatışması

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Yazar Katkısı

The authors declare that they have contributed equally to the article.

KAYNAKLAR

- Bayat, R., Bingül Reçber, Z., Bekmezci, M., Nas, M. S., Calimli, M. H., Demirbas, O., Akin, M., & Şen, F. (2022). Synthesis and application of AuNi@AC nano adsorbents for the removal of Maxilon Blue 5G azo dye from aquatic mediums. *Food and Chemical Toxicology*, 167, 113303. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2022.113303>
- Baysal, M., Bilge, K., Yılmaz, B., Papila, M., & Yürüm, Y. (2018). Preparation of high surface area activated carbon from waste-biomass of sunflower piths: Kinetics and equilibrium studies on the dye removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 1702–1713. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2018.02.020>
- Benzait, Z., Chen, P., & Trabzon, L. (2021). Enhanced synthesis method of graphene oxide. *Nanoscale Advances*, 3(1), 223–230. <https://doi.org/10.1039/D0NA00706D>

- Bingül Reçber, Z., Burhan, H., Bayat, R., Nas, M. S., Calimli, M. H., Demirbas, Ö., Şen, F., & Hassan, K. M. (2022). Fabrication of activated carbon supported modified with bimetallic-platin ruthenium nano sorbent for removal of azo dye from aqueous media using enhanced ultrasonic wave. *Environmental Pollution*, 302, 119033. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.119033>
- Çalımlı, M. H., Demirbaş, Ö., Aygün, A., Alma, M. H., Nas, M. S., Khan, A., Asiri, A. M., & Şen, F. (2019). Equilibrium, Kinetics and Thermodynamics of Bovine Serum Albumin from Carbon Based Materials Obtained from Food Wastes. *BioNanoScience*, 9(3), 692–701. <https://doi.org/10.1007/S12668-019-00633-Z>
- Cheng, S., Zhang, L., Xia, H., Peng, J., Shu, J., Li, C., Jiang, X., & Zhang, Q. (2017). Adsorption behavior of methylene blue onto waste-derived adsorbent and exhaust gases recycling. *RSC Advances*, 7(44), 27331–27341. <https://doi.org/10.1039/C7RA01482A>
- Dahri, M. K., Kooh, M. R. R., & Lim, L. B. L. (2015). Original Article. *Alexandria Engineering Journal*, 4(54), 1253–1263. <https://doi.org/10.1016/J.AEJ.2015.07.005>
- Demirbaş, O., Alkan, M., & Doğan, M. (2002). The removal of victoria blue from aqueous solution by adsorption on a low-cost material. *Adsorption*, 8(4), 341–349. <https://doi.org/10.1023/A:1021589514766/METRICKS>
- Demirbaş, Ö., Çalımlı, M. H., Demirkan, B., Alma, M. H., Nas, M. S., Khan, A., Asiri, A. M., & Şen, F. (2019). Thermodynamics, Kinetics, and Adsorption Properties of Biomolecules onto Carbon-Based Materials Obtained from Food Wastes. *BioNanoScience*, 3(9), 672–682. <https://doi.org/10.1007/S12668-019-00628-W>
- Demirbaş, Ö., Turhan, Y., & Alkan, M. (2014). Thermodynamics and kinetics of adsorption of a cationic dye onto sepiolite. *New Pub: Balaban*, 54(3), 707–714. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.886299>
- Follain, N., Saiah, R., Fatyeyeva, K., Randrianandrasana, N., Leblanc, N., Marais, S., & Lecamp, L. (2015). Hydrophobic surface treatments of sunflower pith using eco-friendly processes. *Cellulose*, 22(1), 245–259. <https://doi.org/10.1007/S10570-014-0490-1>
- Ghaedi, M., Hajjati, S., Mahmudi, Z., Tyagi, I., Agarwal, S., Maity, A., & Gupta, V. K. (2015). Modeling of competitive ultrasonic assisted removal of the dyes – Methylene blue and Safranin-O using Fe₃O₄ nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 268, 28–37. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2014.12.090>
- Ho, Y. S., & McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34(5), 451–465. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00112-5)
- Jalali, M., & Aboulghazi, F. (2013). Sunflower stalk, an agricultural waste, as an adsorbent for the removal of lead and cadmium from aqueous solutions. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 15(4), 548–555. <https://doi.org/10.1007/S10163-012-0096-3/TABLES/5>
- Jiang, C., Wang, X., Qin, D., Da, W., Hou, B., Hao, C., & Wu, J. (2019). Construction of magnetic lignin-based adsorbent and its adsorption properties for dyes. *Journal of Hazardous Materials*, 369, 50–61. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.02.021>
- Knapik, E., & Stopa, J. (2018). Fibrous deep-bed filtration for oil/water separation using sunflower pith as filter media. *Ecological Engineering*, 121, 44–52. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2017.07.021>
- Li, Y., Liu, F., Xia, B., Du, Q., Zhang, P., Wang, D., Wang, Z., & Xia, Y. (2010). Removal of copper from aqueous solution by carbon nanotube/calcium alginate composites. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1–3), 876–880. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.12.114>

- Liu, J., Wang, N., Zhang, H., & Baeyens, J. (2019). Adsorption of Congo red dye on Fe_xCo_{3-x}O₄ nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 238, 473–483. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.03.009>
- Nandi, B. K., Goswami, A., & Purkait, M. K. (2009). Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 387–395. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.03.110>
- Nas, M. S. (2021). AgFe₂O₄/MWCNT nanoparticles as novel catalyst combined adsorption-sonocatalytic for the degradation of methylene blue under ultrasonic irradiation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(3), 105207. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105207>
- Nas, M. S., & Kaya, H. (2020). Synthesis and sonocatalytic performance of bimetallic AgCu@MWCNT nanocatalyst for the degradation of methylene blue under ultrasonic irradiation. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1799406>, 51(5), 614–626. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1799406>
- Nas, M. salih. (2019). The Investigation of Thermodynamics Parameters and Adsorption Kinetic of The Maxilon Blue 5G Dye on Turkey Green Clay. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 749–758. <https://doi.org/10.21597/JIST.475791>
- Oguntimein, G. B. (2015). Biosorption of dye from textile wastewater effluent onto alkali treated dried sunflower seed hull and design of a batch adsorber. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(4), 2647–2661. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2015.09.028>
- P., V., S., C., & W., A. (2009). *Bioethanol production from enzymatically saccharified sunflower stalks using steam explosion as pretreatment*. <https://ir.swu.ac.th/jspui/handle/123456789/15454>
- Parvin, S., Biswas, B. K., Rahman, M. A., Rahman, M. H., Anik, M. S., & Uddin, M. R. (2019). Study on adsorption of Congo red onto chemically modified egg shell membrane. *Chemosphere*, 236, 124326. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.07.057>
- Podder, M. S., & Majumder, C. B. (2015). SD/MnFe₂O₄ composite, a biosorbent for As(III) and As(V) removal from wastewater: Optimization and isotherm study. *Journal of Molecular Liquids*, 212, 382–404. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2015.09.011>
- Şen, F., Demirbaş, Ö., Çalımlı, M. H., Aygün, A., Alma, M. H., & Nas, M. S. (2018). The dye removal from aqueous solution using polymer composite films. *Applied Water Science*, 8(7). <https://doi.org/10.1007/S13201-018-0856-X>
- Tang, S., Xia, D., Yao, Y., Chen, T., Sun, J., Yin, Y., Shen, W., & Peng, Y. (2019). Dye adsorption by self-recoverable, adjustable amphiphilic graphene aerogel. *Journal of Colloid and Interface Science*, 554, 682–691. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2019.07.041>
- Wei, Y., Han, B., Hu, X., Lin, Y., Wang, X., & Deng, X. (2012). Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and their Magnetic Properties. *Procedia Engineering*, 27, 632–637. <https://doi.org/10.1016/J.PROENG.2011.12.498>
- Wekoye, J. N., Wanyonyi, W. C., Wangila, P. T., & Tonui, M. K. (2020). *Kinetic and equilibrium studies of Congo red dye adsorption on cabbage waste powder*. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2020.01.004>
- Xu, M., Qi, M., Goff, H. D., & Cui, S. W. (2020). Polysaccharides from sunflower stalk pith: Chemical, structural and functional characterization. *Food Hydrocolloids*, 100, 105082. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.04.053>

Atıf İçin: Özden, E.M. (2023). Lanosterolün Bütirilkolinesteraz, Asetilkolinesteraz ve Karbonik Anhidraz Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Taranması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2838-2846.

To Cite: Özden, E.M. (2023). Screening of Butyrylcholinesterase, Acetylcholinesterase and Carbonic Anhydrase Enzyme Inhibition Effects of Lanosterol. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2838-2846.

Screening of Inhibitory Effects Lanosterol on Butyrylcholinesterase, Acetylcholinesterase and Carbonic Anhydrase Enzymes

Eda Mehtap OZDEN^{1*}

Highlights:

- High inhibition
- Enzymes
- Lanosterol

Keywords:

- Lanosterol
- Inhibition
- CA I-II isoenzymes
- Acetylcholinesterase
- Butyrylcholinesterase

ABSTRACT:

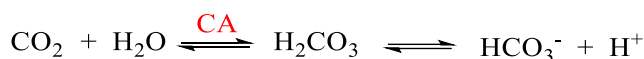
In this study, for the first time, the antiglaucoma and anticholinergic properties from lanosterol were appraised and researched using different bioanalytical methods and compared with standards. Lanosterol is the compound from which entire fungal and animal steroids are derived. Moreover, is a tetracyclic triterpenoid. Lanosterol is a component in over-the-counter ophthalmic products to prohibit cataracts. The inhibition effects of lanosterol were tested against the butyrylcholinesterase (BChE), carbonic anhydrase I and II (CA I and II) and acetylcholinesterase (AChE), which are associated with some global diseases like Alzheimer's disease (AD) and glaucoma. Lanosterol were trialed for the inhibition of BChE, AChE, hCA I and II enzymes and indicated efficient inhibition profiles with K_i values in the range of 61.77 ± 22.32 nM against hCA I, 101.11 ± 49.74 nM against hCA II, 2.03 ± 1.21 nM against acetylcholinesterase and 8.39 ± 2.92 nM against butyrylcholinesterase.

¹ Eda Mehtap OZDEN ([Orcid ID: 0000-0002-9259-5704](https://orcid.org/0000-0002-9259-5704)), Ataturk University, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Erzurum, Türkiye

***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Eda Mehtap ÖZDEN, e-mail: edamehtap3@gmail.com

INTRODUCTION

Carbonic anhydrases (CAs, E.C. 4.2.1.1) are enzymes in the family of metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide (CO₂) and water (H₂O) to a proton (H⁺) and bicarbonate (HCO₃⁻). (Ahmed, 2020) (Figure 1). This reaction is concerned to very important physiological mechanism, including the deregulation of carbonic anhydrases enzyme activity has been connected to diseases like cancer, obesity, glaucoma and epilepsy (Ahmed, 2019; Saeed, 2014). Carbonic anhydrases have recorded as ultimate medicament destinations for the design of specific activators or inhibitors with medical application. Carbonic anhydrase enzymes inhibition has been specified as the expectant initial step in the cure of a range of disorders like cancer, obesity, epilepsy and glaucoma (Imran, 2015; Turkan, 2019).



At every phase of life, we need enzymes. At the molecular level, thousands of reactions take place through enzymes. Acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7) is one of these enzymes (Göçer, 2013; Akıncıoğlu, 2014). As seen in Figure 1, cholinergic receptors (muscarinic receptors (MR), acetylcholine (ACh), butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE), nicotinic receptors (NR)) and cholineacetyltransferase (ChAT) are components of the cholinergic system. The first neurotransmitter identified was acetylcholine (Tripathi, 2008). Acetylcholine (ACh) is a chemical transmitter of the central nervous system. It is also involved in the parasympathetic nervous system of many organisms (Göçer, 2016). When ACh is released in the synaptic space, AChE quickly terminates the resulting neural impulse. AChE removes ACh from the synaptic gap by catalyzing the hydrolysis of acetylcholine to choline and acetate (Schumacher, 1986). This enzyme is a five hundred thirty seven amino acid long peptide monomer talented of hydrolyzing 250,000 ACh molecules in one second (Sussman, 1988). Butyrylcholinesterase is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of butyrylcholine, butyrate and choline in metabolism.

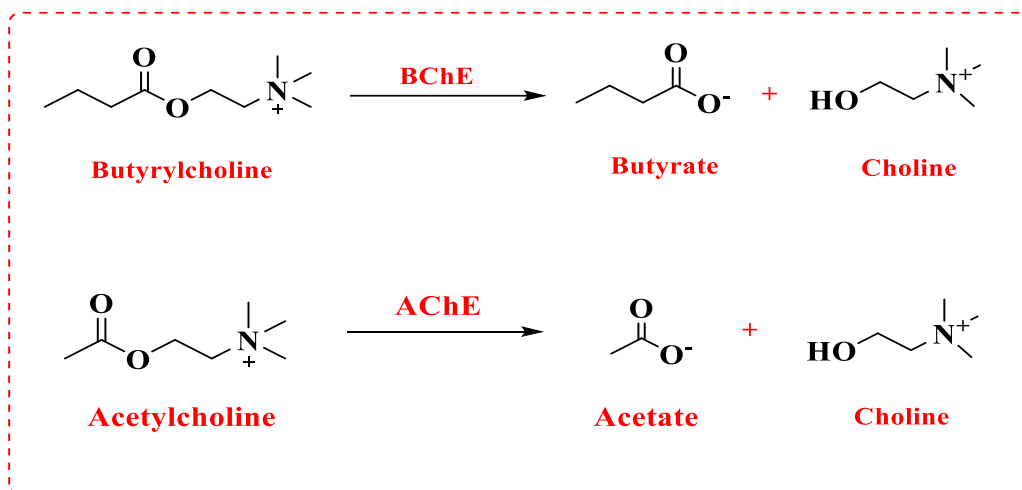


Figure 1. Butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) hydrolysis mechanism

Alzheimer's disease (AD) was defined in 1906 by Dr. Alois Alzheimer (Arsava, 2003). It is a progressive neurodegenerative disease that occurs due to loss of synapses and neurons in various parts of the central nervous system and is characterized by self-care deficiencies, decreased cognitive functions, and various neuropsychiatric and behavioral disorders (Lio, 2006). Acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs), anticholinesterases are used as the most effective drug group in the treatment of AD. Anticholinesterase drugs inhibit the hydrolysis of acetylcholine, an important neuromodulator of the central nervous system, by reversibly or irreversibly inhibiting AChE (Jeger, 2013). Furthermore,

butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine. BChE levels do not decrease in AD disease, there is a possibility that this enzyme may increase (Taslimi, 2017; Köse 2015). In the brains of healthy individuals acetylcholinesterase is dominant however butyrylcholinesterase activity rise while acetylcholinesterase activity remains unmodified or reduce in the brain of Alzheimer's disease (Topal, 2017; Koca, 2023). BChE and AChE are liable for the termination of cholinergic signaling by hydrolyzing acetylcholine. Thus, a medicament inhibiting this enzyme might be preferable to selecting cholinesterase inhibitors. Nowadays, as give in Figure 2, synthetic cholinesterase inhibitors, including donepezil, rivastigmine, galantamine and tacrine have been used for clinical cure of AD When the brain acetylcholine levels of healthy individuals and Alzheimer's patients were compared, the difference was calculated to be around 50% (Gulcin, 2016).

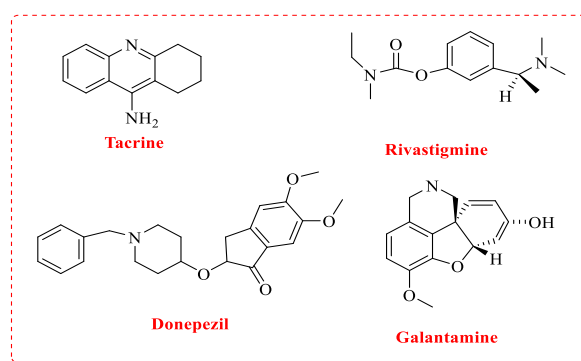


Figure 2. Commonly used cholinesterase inhibitors

Lanosterol is the compound from which all fungal and animal steroids are reproduced (Figure 3). Moreover, is a tetracyclic triterpenoid (Schaller, 2003). The structure of Lanosterol (Lanosta-8,24-diene-3 β -ol) was elucidated by classical methods in 1950 by a Swiss team led by W. Voser (Voser, 1950). Lanosterol plays an important physiological role such as potential activity in cataract treatment (Kolesnikova, 2006; Chen, 2018; Yang, 2018), a metabolic weakness of resistant cells (Staubert, 2016; Nes, 2000) and cancer prevention activity (Rao, 2002). The human eye lens consists of crystal proteins assembled into a highly layout, interacting macrostructure essential for refractive index and lens transparency (Pascolini, 2010; Zhao, 2015). Protein aggregation is the major factor causing cataract. Mutations in oxidative stress are among the factors that cause protein aggregation. (Moreau, 2012). More than half of the blindness cases in the world are caused by cataracts. The treatment of cataract, curtain descending to the eye, is accomplished by surgically removing the opaque lens. In developed countries, cataract surgeries constitute a significant portion of healthcare costs as this disease is quite common among aging populations (Bloemendal, 2004). In Pre-clinical studies have shown which can reverse the aggregation of intracrystalline proteins that lanosterol can be used qua a feasible agent for the prevention of cataracts and is a potential drug for cataracts treatment (Zhao, 2015). In 2018, lanosterol was reported to improve lens clarity in cells with lens clouding due to aging or physical stressors (Shen, 2018). Another study positive results were also obtained as a result of studies on mice with cataracts in the lens of the eye (Wang, 2022). Experiments on dogs indicated important reversal of cataracts of six weeks of lanosterol injection (Zhao, 2015). Another in vitro result revealed that lanosterol can also reduce the aggregation of lens proteins, which greatly improves the clarity of the rabbit opaque lens (Zhao, 2015).

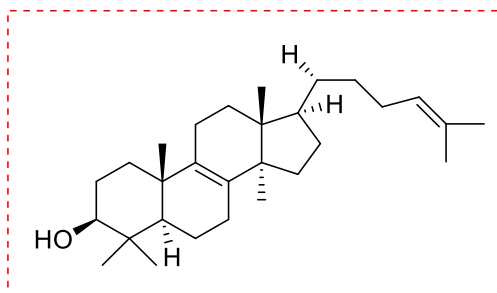


Figure 3. The chemical structure of lanosterol

MATERIALS AND METHODS

Antiglaucoma (hCA I-II) Inhibition Assay

Human erythrocytes were centrifuged at 10000x g for half an hour at 25°C to separate the serum fraction from other blood components. The pH of the serum fraction was set to 8.7 using solid (hydroxymethyl)aminomethane (Burmaoglu, 2022). Isoenzymes were purified to high purity using the Sepharose-4B-L-Tyrosine-sulfanilamide affinity column method (Kucuk, 2016; Akıncıoğlu, 2014). The purity of hCA I-II isoenzymes was defined using sodium dodecyl sulfate–PAGE method, as explained in our previous work (Mutlu, 2023). Isoenzyme's inhibition and purification studies, according to the esterase activity method, the absorbance values were measured spectrophotometrically at 348 nm. (Kocyigit, 2018; Mirzazadeh, 2021).

Anticholinergic (BChE-AChE) Assay

The inhibitory effect of lanosterol against butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase enzymes was performed according to the Ellman's process (1936) with certain modifications (Koca, 2023). Absorbance measurements values were recorded at 412 nm and DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)), BChI (Butyrylcholine iodide), AChI (Acetylthiocholine iodide) were used as substrates for the enzymatic reaction (Bal, 2021; Behcet, 2018).

Determination of IC₅₀ Values

The IC₅₀ values were calculated from activity (%) against lanosterol (Durmaz, 2022). Lineweaver-Burk plots were used to determine the Ki values (Bora, 2022).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study we carried out focuses on biological activity, a widespread problem in medicine and other related fields. Physiologically hCA I, hCA II, BChE and AChE were researched in the enzyme inhibition. In drug studies for the treatment of antiglaucoma disease hCA II isoenzyme, for retinal and cerebral edema CA I enzyme was selected and studies were carried out (Ceylan, 2017; Göcer, 2017). For the CA I- II isoenzymes, lanosterol had Ki values of 61.77±22.32 and 101.11±49.74 nM, and had IC₅₀ values of 49.50 and 69.30 nM, in order of. Acetazolamide, used as a CA inhibitor for the medical therapy of dural ectasia and idiopathic intracranial hypertension, altitude sickness, glaucoma, for CA I and II, showed Ki values of 26.29±6.83 and 37.70±9.79 nM, respectively. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase were strongly inhibited by lanosterol compound. For the AChE and BChE, lanosterol had Ki values of 2.03±1.21 and 1.35±0.54 nM, and had IC₅₀ values of 2.24 and 2.68 nM, in order of. Studies were carried out by selecting Tacrine as the positive control inhibitor for BChE and AChE enzymes; it had Ki values of 54.84±15.83 and 8.39±2.92 nM,

respectively (Table 1). It was concluded that Lanosterol was as effective as standard acetazolamide in inhibiting hCA I-I, and was more effective than the standard Tacrine in inhibiting AChE and BChE.

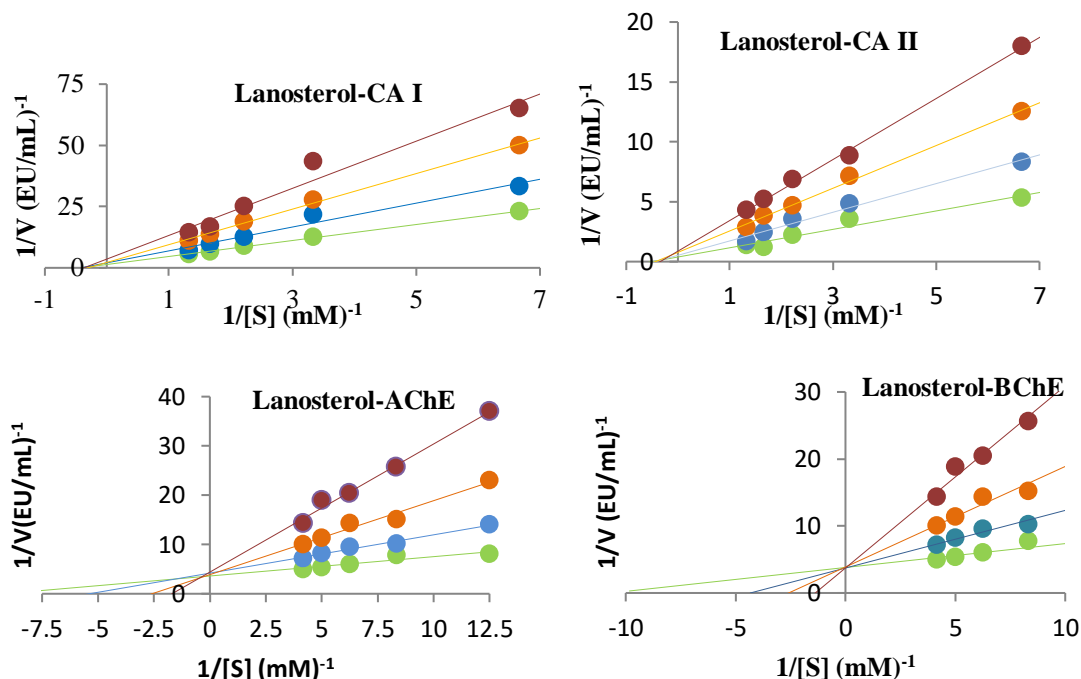
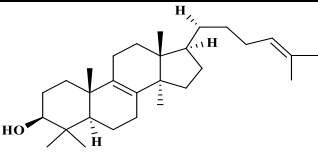
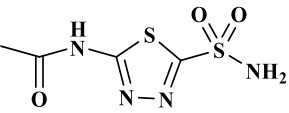
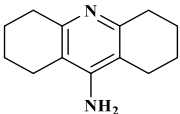


Figure 4. Inhibitory effect of Lanosterol on BChE, AChE and CA I-II isoenzymes activity

Table1. The enzyme inhibition results of lanosterol against metabolic enzymes

Compounds		CA I	CA II	AChE	BChE
 Lanosterol	IC ₅₀ (nM)	49.50	69.30	2.24	2.68
	K _i (nM)	61.77±22.32	101.11±49.74	2.03±1.21	1.35±0.54
	r ²	0.9937	0.9658	0.9047	0.9618
 Acetazolamide	IC ₅₀ (nM)	43.32	53.31	-	-
	K _i (nM)	26.29±6.83	37.70±9.79	-	-
	r ²	0.9921	0,9502	-	-
 Tacrine	IC ₅₀ (nM)	-	-	13.58	22.35
	K _i (nM)	-	-	54.84±15.83	8,39±2,92
	r ²	-	-	0.9401	0.9889

The role of hCA in diseases like epilepsy, edema, obesity and glaucoma has thoroughly been defined. Hyper-secretion of watery humor in the eye reasons enhanced intra-ocular pressures. Finally leading to a situation named as glaucoma (Göçer, 2016; Beydemir, 2004; Akıncıoğlu, 2015). Decline in carbonic anhydrases activity reduces the aqueous humor and secretion of HCO₃⁻, thereby decreasing the pressure (Kose, 2016; Taslimi, 2016). AChEIs are the most efficient approach to therapy the cognitive signs of AD and other important therapeutic applications in the treatment of Parkinson's disease, ataxia and senile dementia (Kocyigit, 2017). Lanosterol inhibited the metabolic enzymes at

nanomolar levels. Therefore, inhibition of hCA isoforms and AChE can have a significant role in drug design and discovery as well as in medicine and toxicology. Also, lanosterol is a drug candidate as an antiepileptic and anticholinergic.

CONCLUSION

Lanosterol can be choosing inhibitor of butyrylcholinesterase, acetylcholinesterase and carbonic anhydrases I and II isoenzymes. Lanosterol can be admissible nominee drugs, the same as carbonic anhydrases inhibitors, for therapy of diseases like osteoporosis, glaucoma, epilepsy and neurological disorders. AD is the common type of dementia in the elderly population, is among the top 10 causes of death worldwide (Li, 2017). AD treatment can be performed by increasing the acetylcholine level in the brain by inhibiting the AChE present in the brain. BChE and AChE play critical roles in the hypothesis of cholinergic harm, and taking BChE and AChE as targets is absolutely the important to the studies on new Alzheimer's disease drugs.

Conflict of Interest

The author declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Ahmed, A., Channar, P.A., Saeed, A., Kalesse, M., Kazi, M.A., Larik, F.A., Abbas, Q., Hassan, M., Raza, H., & Seo, S.Y. (2019). Synthesis of sulfonamide, amide and amine hybrid pharmacophore, an entry of new class of carbonic anhydrase II inhibitors and evaluation of chemo-informatics and binding analysis. *Bioorganic Chemistry*, 86, 624–630.
- Ahmed, A., Shafique, I., Saeed, A., Shabir, G., Saleem, A., Taslimi, P., Tok, T.T., Kırıcı, M., Uc, E. M., & Hashmi, M. Z. (2022). Nimesulide linked acyl thioureas potent carbonic anhydrase I, II and α -glucosidase inhibitors: Design, synthesis and molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 6, 100082.
- Akıncıoğlu, A., Topal, M., Gulcin, I., & Goksu, S. (2014). Novel sulfamides and sulfonamides incorporating tetralin scaffold as carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 347, 68-76.
- Akıncıoğlu, A., Akıncıoğlu, H., Gülçin, İ., Durdagi, S., Supuran, C. T., & Göksu, S. (2015). Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: Novel sulfamoylcarbmates and sulfamides derived from acetophenones. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(13), 3592-3602.
- Arsava, M. (2003). Dr Alois Alzheimer. Selekler, K. (Ed.), In *Alzheimer's and Other Dementias*. Güneş Kitabevi, pp 1-3.
- Bal, S., Demirci, O., Sen, B., Taslimi, P., Aktas, A., Gok, Y., Aygun, M., & Gulcin, I. (2021). PEPPSI type Pd(II)NHC complexes bearing Chloro-/fluorobenzyl group: Synthesis, characterization, crystal structures, α -glycosidase and acetylcholinesterase inhibitory properties. *Polyhedron*, 198:115060.
- Behcet, A., Caglılar, T., Celepci, D., Aktas, A., Taslimi, P., Gok, Y., Aygün, M., Kaya, R., & Gulcin, I. (2018). Synthesis, characterization and crystal structure of 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl and 2-(4-nitrophenyl)ethyl substituted benzimidazole bromide salts: their inhibitory properties against carbonic anhydrase and acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Structure*, 1170, 160–169.
- Beydemir, S. Ü., & Gülçin, İ. (2004). Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(2), 193-197.
- Bloemendal, H. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 86, 407–485.

- Bora, R. E., Bilgicli, H. G., Uc, E.M., Alagöz, M. A., Zengin, M., & Gulcin, I. (2022). Synthesis, characterization, evaluation of metabolic enzyme inhibitors and in silico studies of thymol based 2-amino thiol and sulfonic acid compounds. *Chemico-Biological Interactions*, 366, 110-134.
- Burmaoglu, S., Kazancioglu, A.E., Kazancioglu, M.Z., Saglamtas, R., Yalcin, G., Gulcin, I., & Algul, O. (2022). Synthesis, molecular docking and some metabolic enzyme inhibition properties of biphenyl-substituted chalcone derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1254, 132358.
- Ceylan, M., Kocyigit, U. M., Usta, N. C., Gurbuzlu, B., Temel, Y., Alwasel, S. H., & Gulcin, I. (2017). Synthesis, carbonic anhydrase I and II isoenzymes inhibition properties, and antibacterial activities of novel tetralonebased 1,4-benzothiazepine derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(4), e21872.
- Chen, X. J., Hu, L. D., Yao, K., & Yan, Y. B. (2018). Lanosterol and 25-hydroxycholesterol dissociate crystallin aggregates isolated from cataractous human lens via different mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506 (4), 868-873.
- Durmaz, L., Erturk, A., Akyüz, M., Kose, L. P., Uc, E. M., Bingol, Z., Saglamtas, R., Alwasel, S., & Gulcin, I. (2022) Screening of carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzyme inhibition effects and antioxidant activity of coumestrol. *Molecules*, 27, 3091.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, J.V., & Featherstone R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Gocer, H., Akıncıoğlu, A., Goksu, S., & Gulcin, I. (2017). Carbonic anhydrase inhibitory properties of phenolic sulfonamides derived from dopamine related compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 398-402.
- Gocer, H., Akıncıoğlu, A., Oztaskın, N., Göksu, S., & Gulcin, I. (2013). Synthesis, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine related compounds. *Archiv Der Pharmazie*, 346, 783-792.
- Göçer, H., & Gülçin, I. (2013). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): A potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *International Journal of Academic Research*, 5, 149-154.
- Göçer, H., Topal, F., Topal, M., Küçük, M., Teke, D., Gulcin, İ., Alwasel, S.H., & Supuran, C. T. (2016). Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles of taxifolin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 441-447.
- Gülçin, I., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Koksal, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., Bingol, Z., Huyut, Z., & Alwasel, S. H. (2016). Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 1698– 1702.
- Imran, S., Taha, M., Ismail, N. H., Fayyaz, S, Khan., & Choudhary, K. M. (2015). Synthesis, biological evaluation, and docking studies of novel thiourea derivatives of bisindolylmethane as carbonic anhydrase II inhibitor. *Bioorganic Chemistry*, 62, 83–93.
- Jeger, R. V. (2013). Mens sana in corpore sano revisited. *European Heart Journal*, 34(33), 2580-2581.
- Jiang, Y., Gao, H., & Turdu, G. (2017) Traditional Chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: a review. *Bioorganic Chemistry*, 75, 50–61.
- Koca, M., Gulcin, I., Uc, E. M., Bilginer, S., & Aydın, A. S. (2023). Evaluation of antioxidant potentials and acetylcholinesterase inhibitory effects of some new salicylic acid-salicylamide hybrids. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 1-9.
- Kocyigit, U.M., Budak, Y., Gürdere, M. B., Tekin, Ş., Köprülü, T. K., Ertürk, F. & Ceylan, M. (2017). Synthesis, characterization, anticancer, antimicrobial and carbonic anhydrase inhibition profiles of novel (3aR, 4S, 7R, 7aS)-2-(4-((E)-3-(3-aryl) acryloyl) phenyl)-3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-4, 7-methanoisindole-1, 3 (2H)-dione derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 70, 118-125.

- Kocyigit, U.M., Budak, Y., Gurdere, M.B., Erturk, F., Yencilek, B., Taslimi, P.; Gulcin, I., & Ceylan, M. (2018) Synthesis of chalcone-imide derivatives and investigation of their anticancer and antimicrobial activities, carbonic anhydrase and acetylcholinesterase enzymes inhibition profiles. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124, 61–68.
- Kolesnikova, M. D., Xiong, Q., Lodeiro, S., Hua, L., & Matsuda, S. P. (2006). Lanosterol biosynthesis in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 447(1), 87-95.
- Kose, L. P., Gulcin, I., Gören, AC., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A.L., & Gorinstein, S. (2015). LC–MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarum* Hance) rhizomes. *Industrial Crops and Products*, 74, 712–721.
- Kose, L. P., Gülçin, İ., Özdemir, H., Atasever, A., Alwasel, S. H., & Supuran, C. T. (2016). The effects of some avermectins on bovine carbonic anhydrase enzyme. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(5), 773-778.
- Kucuk, M., & Gulcin, I. (2016) Purification and characterization of carbonic anhydrase enzyme from black sea trout (*Salmo trutta* Labrax Coruhensis) kidney and inhibition effects of some metal ions on the enzyme activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44, 134– 139.
- Li, C., & Wei, C. (2017). DNA-templated silver nanocluster as a label-free fluorescent probe for the highly sensitive and selective detection of mercury ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 242, 563-568.
- Lleo, A., Greenberg, S. M., & Growdon, J. H. (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine*, 57, 513-533.
- Mirzazadeh, R., Asgari, M. S., Barzegari, E., Pedrood, K., Mohammadi K. M., Sherafati, M., Laricani, B., Rastegar, H., Rahmani, H., Mahdavi M., Uc, E. M., & Gulcin, I. (2021). New quinoxalin-1, 3, 4-oxadiazole derivatives: Synthesis, characterization, in vitro biological evaluations, and molecular modeling studies. *Archiv der Pharmazie*, 354(9), 2000471.
- Moreau, K.L., & King, J.A. (2012). Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in Molecular Medicine*, 18, 273–282.
- Mutlu, M., Bingol, Z., Uc, E. M., Köksal, E., Goren, A.C., Alwasel, S.H., & Gulcin, I. (2023) Comprehensive metabolite profiling of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) leaf oil using LC-HR/MS, GC/MS, and GC-FID: Determination of antiglaucoma, antioxidant, anticholinergic, and antidiabetic profiles. *Life*, 13, 136.
- Nes, W. D. (2000). Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529 (1-3), 63-88.
- Pascolini, D., & Mariotti, S. P. (2012). Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*, 96(5), 614-618.
- Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87, 955–979.
- Rao, C. V., Newmark, H. L., & Reddy, B. S. (2002). Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*, 26, 419–425.
- Saeed, A., Al-Rashida, M., Hamayoun, M., Mumtaz, A., & Iqbal, J. (2014). Carbonic anhydrase inhibition by 1-aroyl-3-(4-aminosulfonylphenyl)thioureas, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29, 901–905.
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42 (3), 163–175.
- Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-Quigley, K., Taylor, S. S., & Taylor, P. (1986). Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 319(6052), 407-409.

- Shen, X., Zhu, M., Kang, L., Tu, Y., Li, L., Çang, R., Qin, B., Yang, M., & Guan, H. (2018). Lanosterol synthase pathway alleviates lens opacity in age-related cortical cataract. *Journal of Ophthalmology*, 2018, 1–9.
- Staubert, C., Krakowsky, R., Bhuiyan, H., Witek, B., Lindahl, A., Broom, O., & Nordström, A. (2016). Increased lanosterol turnover: A metabolic burden for daunorubicin-resistant leukemia cells. *Medical oncology*, 33, 1-10.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), 872-879.
- Taslimi, P., Gulcin, I., Ozgeris, B., Goksu, S., Tumer, F., Alwasel, S. H., & Supuran, C. T. (2016). The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and II) inhibition effects of trimethoxyindane derivatives. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(1), 152-157.
- Taslimi, P., Sujayev, A., Garibov, E., Nazarov, N., Huyut, Z., Alwasel, S.H., & Gulcin, I. (2017). Synthesis of new cyclic thioureas and evaluation of their metal-chelating activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibition profiles. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(7) e21897
- Topal, F., Gulcin, I., Dastan, A., & Guney, M. (2017). Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 845–851
- Tripathi, A., & Srivastava, U. C. (2010). Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*, 15(4), 106-111.
- Turkan, F., Cetin, A., Taslimi, P., Karaman, H.S., & Gulçin, I. (2019). Synthesis, characterization, molecular docking and biological activities of novel pyrazoline derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 352, 1800359.
- Voser, W., Montavon, M., Günthard, H. H., Jeger, O., & Ruzicka, L. (1950). Zur Kenntnis der Triterpene. Mitteilung. Zur Konstitution des Lanostadienols. *Helvetica Chimica Acta*, 33(6), 1893-1910
- Wang, K., Hoshino, M., Uesugi, K., Yagi, N., Pierscionek, B.K., & Andley, U.P. (2022). Oxysterol Compounds in mouse mutant α A- and α B-crystallin lenses can improve the optical properties of the lens. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 63
- Yang, X., Chen, X. J., Yang, Z., Xi, Y. B., Wang, L., Wu, Y., & Rao, Y. (2018). Synthesis, evaluation, and structure–activity relationship study of lanosterol derivatives to reverse mutant-crystallin-induced protein aggregation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(19), 8693-8706.
- Yigit, M., Barut, C. D., Taslimi, P., Yigit, B., Cetinkaya, B., Ozdemir, I., Aygun, M., & Gulcin, I. (2022) Selenourea and thiourea derivatives of chiral and achiral enetetramines: Synthesis, characterization and enzyme inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 120, 105566.
- Zhao, L., Chen, X., Zhu, J., Xi, Y., Yang, X., Hu, L., Ouyang, H., Patel, S., Jin, X., Lin, D., Wu, F., Flagg, K., Cai, H., Li, G., Cao, G., Lin, Y., Chen, D., Wen, C., Chung, C., Wang, Y., Qiu, A., Yeh, E., Wang, W., Hu, X., Grob, S., Abagyan, R., Su, Z., Tjondro, H.C., Zhao, X., Luo, H., Hou, R., Jefferson, J., Perry, P., Gao, W., Kozak, I., Granet, D., Li, Y., Sun, Xi., Wang, J., Zhang, L., Liu, Y., Yan, Y., & Zhang, K. (2015). Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*, 523, (7562), 607–611.

To Cite: Adanaş, R., Türkoğlu, V. & Baş, Z. (2023). Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) bioactive peptides on angiotensin-converting enzyme activity purified from human serum. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2847-2860.

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

Resul ADANAŞ¹, Vedat TÜRKOĞLU¹, Zehra BAŞ^{2*}

Highlights:

- Angiotensin converting enzyme
- Purification
- Inhibition

Keywords:

- Angiotensin-converting enzyme (ACE)
- bioactive peptides
- Gly-Arg-Gly-Asp-Ser
- Arg-Gly-Asp
- Inhibition
- Purification

ABSTRACT:

Angiotensin-converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) is a physiological target for researching new antihypertensive drugs, as it is a substantial enzyme in the regulation of blood pressure. Herein, ACE was purified from human serum with affinity chromatography. V_{max} and K_M values were found as 60.98 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/mL and 0.34 mM, respectively. The effects of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) bioactive peptides on purified ACE were researched. Also, captopril, a specific ACE inhibitory, was used as a reference inhibitor. Bioactive peptides, GRGDS and RGD, demonstrated the inhibitory effect on purified ACE with IC_{50} values of 46.39 μM and 456.46 μM , respectively. K_i values and kind of inhibition for GRGDS and RGD by the Lineweaver-Burk chart were found. The kind of inhibitory for these bioactive peptides was calculated as reversible-competitive inhibitory. K_i values for GRGDS and RGD were obtained as 93.28 μM and 435.67 μM , respectively. The IC_{50} value of captopril was designated as 1.57 nM. The inhibitory kind of captopril was designated as reversible non-competitive inhibitory and the K_i value was 0.99 nM. In this study, it was concluded that RGD and GRGDS bioactive peptides have the potential to be utilized as ACE inhibitors.

¹ Resul ADANAŞ ([Orcid ID: 0009-0007-4761-4930](https://orcid.org/0009-0007-4761-4930)), Vedat TÜRKOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-0935-1195](https://orcid.org/0000-0002-0935-1195)), Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Van, Türkiye

² Zehra BAŞ ([Orcid ID: 0000-0002-4071-9744](https://orcid.org/0000-0002-4071-9744)), Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Van, Türkiye

*Corresponding Author: Zehra BAŞ, e-mail: zehrabas@yyu.edu.tr

INTRODUCTION

Hypertension, which influences millions of people around the world, is an important risk reason for many illnesses like chronic kidney diseases, stroke, and heart failure (Bondre et al., 2020). The angiotensin-converting enzyme is a metal carboxypeptidase that regulates blood pressure by hydrolyzing decapeptide angiotensin I (Ang I) to octapeptide angiotensin II (Ang II). Also, in the kallikrein kinin system (KKS), ACE ineffective bradykinin, a potent vasodilator. High ACE activity causes overproduction of the vasoconstrictor Ang II, which leads to hypertension (Lavoie and Sigmund, 2003). Therefore, inhibition of ACE is one of the most significant goals of treating hypertension. ACE inhibitors are extensively utilized to check hypertension. However, long-time utilization of these inhibitors can cause very adverse effects like cough, headache, hyperkalemia, and edema (Hermida et al., 2011).

Bioactive peptides are specific protein components that can affect human health and have an affirmative effect on body functions (Kitts and Weiler, 2003). Bioactive peptides play a significant role in human health as they take part in the metabolic functions of living organisms (Sánchez and Vázquez, 2017). It has been determined that these compounds have antioxidant, antimicrobial, antithrombotic, antihypertensive, opioid, and immunomodulatory properties (Rezzani et al., 2010; Lin et al., 2017). Recently, as a result of research on bioactive peptides, it has been observed that these compounds are efficient in the intercepting and treatment of many illnesses. Therefore, attention to the production and properties of bioactive peptides has increased remarkably in the last few years (Sánchez and Vázquez, 2017). The inhibition effect of many bioactive peptides obtained from natural sources on ACE has been investigated. In a study by Zhang et al., two new ACE inhibitory peptides Leu-Gly-Val-Pro (LGVP) and Val-Thr-Tyr (VTY) were identified from *Spirulina platensis* protein hydrolysates, and their IC_{50} values were obtained to be 45.76 μ M and 23.39 μ M, respectively (Zhang et al., 2022). Seven new ACE inhibitors have been identified from the *Channa striatus*. Among these peptides, LPGPGP and EYFR peptides demonstrated the strongest ACE inhibitory impact by IC_{50} values of 186.3 μ M and 179.2, respectively ($P > 0.05$) (Ma et al., 2021). Bioactive peptides are a more effective alternative to antihypertensive synthetic drugs because they are natural.

Bioactive peptides are compounds with great potential for the intercept and cure of hypertension. In many clinical and experimental studies, it has been designated that bioactive peptides show strongly in vivo antihypertensive effects in both human and animal models (Majumder and Wu, 2014). For example, in a clinical study, little dosages (2.0–10.2 mg/day) of the tripeptides Valine-Proline-Proline (VPP) and Isoleucine-Proline-Proline (IPP) derived from milk casein were observed to reduce diastolic blood pressure (DBP) by -1.9 mmHg (95% CI -3.1 to -0.8 mmHg, $P < 0.001$) and systolic blood pressure (SBP) by -4.0 mmHg (95% CI -5.9 to -2.1 mmHg, $P < 0.001$) in mildly hypertensive human subjects (Turpeinen et al., 2013). In another study, the oral antihypertensive effect of IAK, YAKPVA, LVYPFTGPIPN, HLPLP, and WQVLPNAVPAK peptides isolated from casein fractions was determined in spontaneously hypertensive rats (SHR). DBP and SBP of the rats were evaluated using the tail-cuff process before the implementation and also at 2, 4, 6, 8, and 24 hours after the administration. These peptides significantly lowered DBP and SBP in SHR (Miguel et al., 2010).

The RGD bioactive tripeptide is the cell binding site of numerous blood, adhesive extracellular matrix (ECM), and cell surface proteins. This bioactive peptide is the major integrin-binding domain found in ECM proteins like vitronectin, fibrinogen, fibronectin, bone sialoprotein, and osteopontin (Arnaout et al., 2005). RGD peptide, which plays a significant role in cell recognition and cell adhesion, has been utilized in tissue engineering and tumor treatment with some chemical and

processes recombinant means (Wang et al., 2013). At the same time, RGD peptide has been observed to have a therapeutic effect on pulmonary hypertension and obstructive pulmonary disease (Welschoff et al., 2014).

The GRGDS bioactive pentapeptide was identified as a cell-binding protein domain originating from the cell-connected domain of fibronectin. Osteopontin uses this peptide motif for cell adhesion. Also, the GRGDS bioactive peptide contains the RGD bioactive peptide sequence found in many ECM adhesive proteins (Miyamoto et al., 1995). In a study, the combination of GRGDS+GPRP peptides synergistically inhibited platelet aggregation in plasma. Therefore, it has been observed that the combination of these peptides can be used in antithrombotic therapy (Adelman et al., 1990).

In this work, the inhibitory impact of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser and Arg-Gly-Asp bioactive peptides on ACE purified from human serum was explored. These bioactive peptides showed a substantial *in vitro* inhibitor impact on purified ACE. Also, the IC₅₀ value, the K_i value, and the inhibition kind of captopril, specifically an inhibitory, on purified ACE were found. The impact of GRGDS and RGD bioactive peptides on ACE from human serum has not been researched so far.

MATERIALS AND METHODS

Materials

RGD peptide, GRGDS peptide, lisinopril, captopril, N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycyl-glycine (FAPGG), sodium tetraborate (Na₂B₄O₇·10H₂O), and HepesNa were bought from Sigma-Aldrich.

Obtain the human serum

To achieve human serum, blood was obtained from the Van Red Crescent Blood Center in Turkey. The collected blood was left for half an hour to coagulate and then poured into centrifuge tubes. Human blood was centrifuged at 2500 x *g* for 5 min at chamber temperature. After centrifugation, two phases were formed, the upper phase being yellow-colored serum and the lower part being dark-colored erythrocytes. The serum was attentively divided from the blood and kept in the freezer for utilization in subsequent kinetic studies (Thavasu et al., 1992).

Purification process by the affinity chromatography

NHS (N-hydroxysuccinimide)-activated Sepharose 4 Fast Flow was taken and acquired utilizing the manufacturer's specified procedure. First, the affinity gel was cleansed with cold 1 mM HCl. Subsequently, a coupling buffer (5 mM Lisinopril, 0.2 M NaHCO₃, and 0.5 M NaCl) was added to the affinity gel. This mixture was incubated overnight at 4 °C to bind lisinopril to the affinity gel. The affinity gel was appended to a beaker including 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) buffer and the admixture was carefully stirred for several clocks to avoid unreacted groups on the affinity gel. After this treatment, the affinity gel was cleansed 3 times with a Tris-HCl buffer (pH 8.5, 0.1 M). Next, the affinity gel was cleansed 3 times with an acetate buffer (pH 4.5, 0.1 M).

The affinity gel was appended onto the column (1 cm x 10 cm) with equilibration and cleaning buffer (pH 8.0, 0.3 M NaCl, and 20 mM Tris). The flow rate was adjusted to 40 mL/h utilizing a peristaltic pump to cleanse and equilibrate the affinity column. Human serum was loaded onto the affinity column and then again the column was cleansed by an equilibration buffer. Cleaning of the gel was followed by absorbance at 280 nm and washing continued until the final absorbance was 0.1. Then, elution was taken by passing Na₂B₄O₇·10H₂O (pH 9.0, 50 mM) elution buffer with a peristaltic pump. Elutions were taken in 1.5 mL portions. Pure human serum ACE activity in the portions was determined at 345 nm. The purified ACE was aliquoted and stored in the freezer (Sabeur et al., 2001).

ACE Activity designation

The ACE activity was determined as the decrease in absorbance at 345 nm and 35 °C. The assay cuvette comprised 50 mM HepesNa buffer (pH 7.5, 10 µM ZnCl₂, and 0.3 M NaCl), the ACE, and 1 mM FAPGG (Holmquist et al., 1979).

Protein designation

The protein concentrations of the pure portions and the human serum were determined with Coomassie Brilliant Blue G-250 at 595 nm (Bradford, 1976).

Molecule weight designation by SDS-PAGE

The purity of ACE was identified with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). At the same time, the purity and molecule weight of ACE purified from human serum were characterized by utilizing the SDS-PAGE process. Here, stacking (4% acrylamide) gel and running (10% acrylamide) gel inclosing 1% SDS were made according to the Laemmli process (Laemmli, 1970).

Preparation of RGD, GRGDS bioactive peptides, and captopril solution

2 mg of Arg-Gly-Asp peptide was disentangled in little pure water and it was fulfilled to 1 mL utilizing pure water.

1 mg of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser peptide was disentangled in little pure water and it was fulfilled to 1 mL utilizing pure water.

0.001 mg of captopril was disentangled in little pure water and it was fulfilled to 50 mL utilizing pure water.

In vitro inhibitory impacts of GRGDS and RGD bioactive peptides on ACE

The effects of RGD and GRGDS bioactive peptides on ACE from human serum were researched. Bioactive peptides at various concentrations were attached to the appraisal tube (50 mM HepesNa buffer, 1 mM FAPGG, 100 µL purified ACE) to define the concentration range and ACE activities. Using these concentrations were drawn % activity against inhibitory concentration graphs. Lineweaver-Burk plots were plotted with five different concentrations of FAPGG and three different concentrations of bioactive peptides. Inhibitory kind and K_i constants of RGD and GRGDS bioactive peptides were determined from these charts. At the same time, IC₅₀, K_i values, and inhibition kind of captopril, a specific ACE inhibitor, were found (Lineweaver and Burk, 1934).

RESULTS AND DISCUSSION

ACE is an important enzyme that plays a role in the control of blood pressure by transforming Ang I to Ang II, a vasoconstrictor, due to its participation in the renin-angiotensin system (Perazella et al., 2003). ACE was purified from human serum by affinity chromatography process in one step utilizing NHS (N-hydroxysuccinimide)-activated Sepharose 4 Fast Flow column filler. A specific ACE inhibitory, lisinopril, was utilized as a ligand. The inhibitory impact of some bioactive peptides on the pure ACE was examined.

There are two kinds of ACE: the high molecule weight somatic kind (130-180 kDa) and the smaller molecule weight germinal kind (90-100 kDa) found only in the testis (Bernstein et al., 2018). In a study, the ACE was obtained from rabbit testicles and the molecule weight of this enzyme was detected as 100 kDa (El-Dorry et al., 1982). In another study, only one form (180 kDa) of the ACE was obtained from the pig kidney, and merely two kinds of the ACE (170 kDa and 180 kDa) obtained from the pig striatum were purified by affinity chromatography (Hooper and Turner, 1987). Herein, the

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

purity and molecule weight of the ACE purified from human serum were described with SDS-PAGE, and two bands, 60 kDa and 70 kDa were seen on the gel (Figure 1). At the same time, in our former works, the molecule weights of the ACE obtained from sheep kidneys, human plasma, and sheep lungs were detected to be 60 and 70 kDa (Bas, 2021; Basi and Turkoglu, 2018; Aydin et al., 2021). Here, the molecule weight revealed by the SDS-PAGE method is the molecule weight of the subunits of the ACE. In our study, it was observed that ACE from human serum is a dimer enzyme consisting of two subunits.

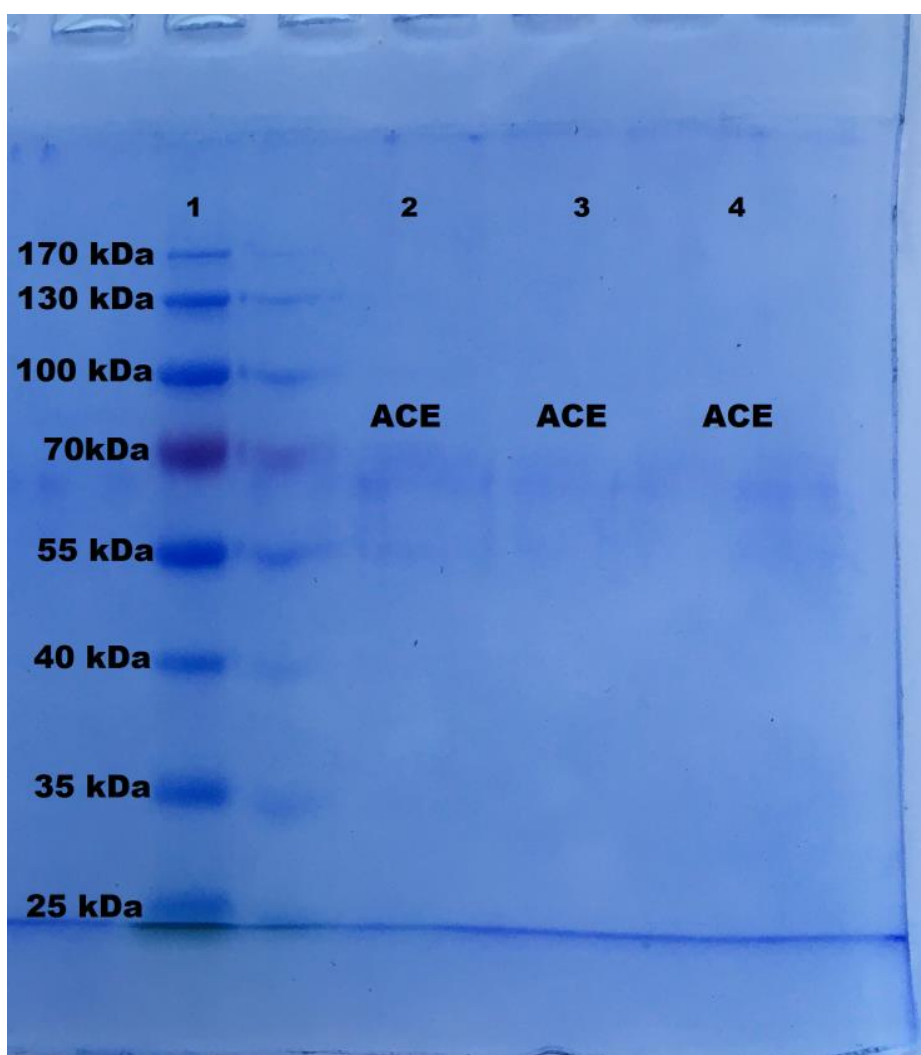


Figure 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of ACE purified by affinity chromatography. Lane 1: Standard proteins (Fermentas unstained protein ladder SM0671). Lanes 2, 3, and 4: purified angiotensin-converting enzyme (ACE) from human serum

Biochemical features were designated to characterize the ACE obtained from human serum. Assessments were taken using 5 different concentrations of FAPGG for the pure ACE. Assessments were performed for the ACE at 5 dissimilar FAPGG values. Then, the Lineweaver-Burk graphic with these values was drawn. V_{max} and K_M constants from this graphic were found to be 60.98 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/mL and 0.34 mM, respectively (Figure 2).

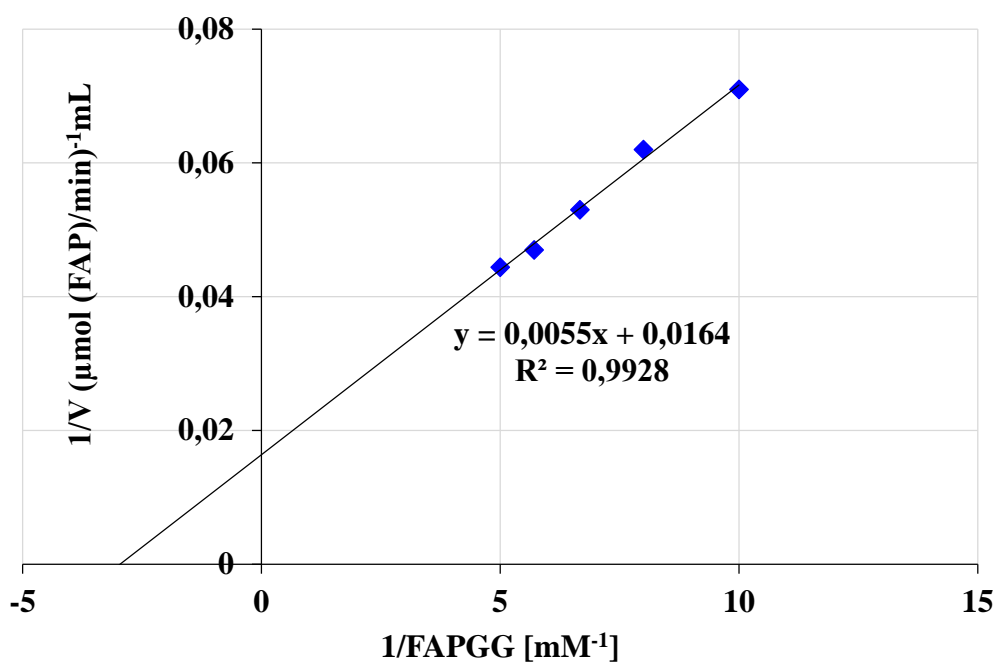


Figure 2. Lineweaver–Burk graph with five dissimilar substrate concentrations (FAPGG) used for the definition of V_{\max} and K_M

High ACE activity is one of the causes of hypertension. As a result, blood pressure rises too much. ACE inhibitors like captopril, enalapril, and fosinopril are generally utilized in the cure of hypertension. However, these inhibitors have been determined to have too many adverse impacts. That's why, in recent studies, the inhibitory effect of bioactive peptides, which are known to be more natural and have fewer adverse effects, on ACE has been determined. In a work by Liang et al., a tripeptide IAF with admissible bioavailability features was identified and this peptide demonstrated a substantial inhibitory impact on ACE with an IC_{50} constant of $19.87 \pm 0.50 \mu\text{M}$ (Liang et al., 2021). In our former work, glutathione (GSH) peptide and lisinopril inactivated ACE purified from human plasma. IC_{50} and K_i values for GSH and lisinopril were found as $16.2 \mu\text{M}$ and 0.781 nM , respectively. K_i values of these compounds were $11.7 \mu\text{M}$ and 0.662 nM , respectively. The kind of inhibitory of these compounds was identified as reversible non-competitive (Basi and Turkoglu, 2019). In our former work, the IC_{50} values of fosinopril, captopril, and lisinopril, which show an inhibitor impact on ACE purified from bovine lung, were determined as $1.159 \mu\text{M}$, 0.835 nM , and 4.085 nM , respectively (Karahan and Turkoglu, 2021). Two novel ACE inhibitor peptides (CDF and EACF) were determined from rabbit meat proteins. The IC_{50} values of CDF and EACF peptides were $192.17 \pm 2.46 \mu\text{M}$ and $41.06 \pm 0.82 \mu\text{M}$, respectively. The kind of inhibitory of these peptides was defined to be competitive and non-competitive, respectively (Chen et al., 2022). It has been observed that bioactive peptides, which have an inhibitory impact on ACE, are agents that can be used instead of synthetic inhibitors in diseases like hypertension, atherosclerosis, and cardiovascular diseases.

Many studies have researched ACE inhibitors from natural resources such as peptides, antioxidant compounds, and vitamins with fewer side effects. For example, in one work, two ACE inhibitor peptides QLLLQQ and TVGMTAKF were identified in horse gram flour. The IC_{50} values of these peptides were $75.0 \mu\text{M}$ and $30.3 \mu\text{M}$, and K_i values were $0.18 \mu\text{M}$ and $0.01 \mu\text{M}$, respectively. The inhibitory kind of QLLLQQ and TVGMTAKF peptides was designated as reversible competitive from the Lineweaver-Burk chart (Bhaskar et al., 2019). In our previous work, reduced glutathione

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

peptide, vitamin B₃ (nicotinamide), and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) compounds showed inhibitory effects on ACE purified from sheep kidneys. IC₅₀ constants for these compounds were designated as 14.3 μM, 7.3 μM, and 244.33 μM, respectively and K_i values were 15.4 μM, 6.7 μM, and 175.08 μM, respectively. The inhibition kind of these compounds was designated as reversible non-competitive (Bas, 2021; Kiylik et al., 2022). The butanol and water extracts of the *Matricaria chamomilla* L. indicated an inhibitory impact on ACE purified from human plasma (Bas et al., 2022).

Herein, the inhibitory impact of GRGDS and RGD bioactive peptides on pure ACE was researched. GRGDS and RGD peptides demonstrated a significant inhibitory impact with IC₅₀ values of 46.39 μM and 456.46 μM, respectively (Figures 3, 4). The IC₅₀, inhibition kind, and K_i values of captopril on ACE from these charts were defined. The IC₅₀ value of captopril was calculated to be 1.57 nM (Figure 5). K_i values and inhibitory kinds of these bioactive peptides were identified from Lineweaver-Burk charts. The kind of inhibitory for RGD and GRGDS bioactive peptides was identified as reversible competitive inhibitory. K_i values for GRGDS and RGD bioactive peptides were calculated as 93.28 μM and 435.67 μM, respectively (Figures 6, 7). The natural substrate of the ACE enzyme, Ang I, is a decapeptide. Since the compounds we used in this study are peptides, they showed a reversible competitive inhibition effect as expected. The inhibitory kind and K_i value of captopril were calculated to be non-competitive and 0.99 nM from the Lineweaver-Burk chart (Figure 8) (Table 1). In many works, it has been determined that the thiol-including captopril inhibitor has a non-competitive inhibition effect by forming powerful bonds with zinc, which is near the active site of the ACE. Also, although inhibitors like enalaprilat, ramiprilat, and captopril are described to be competitive inhibitors, some works have indicated non-competitive and mixed inhibitory impacts (Baudin and Bénétiau-Burnat, 1999). Here, it was detected that GRGDS and RGD bioactive peptides, which indicate an inhibitory impact on ACE, may have both therapeutic effects and protection against hypertension.

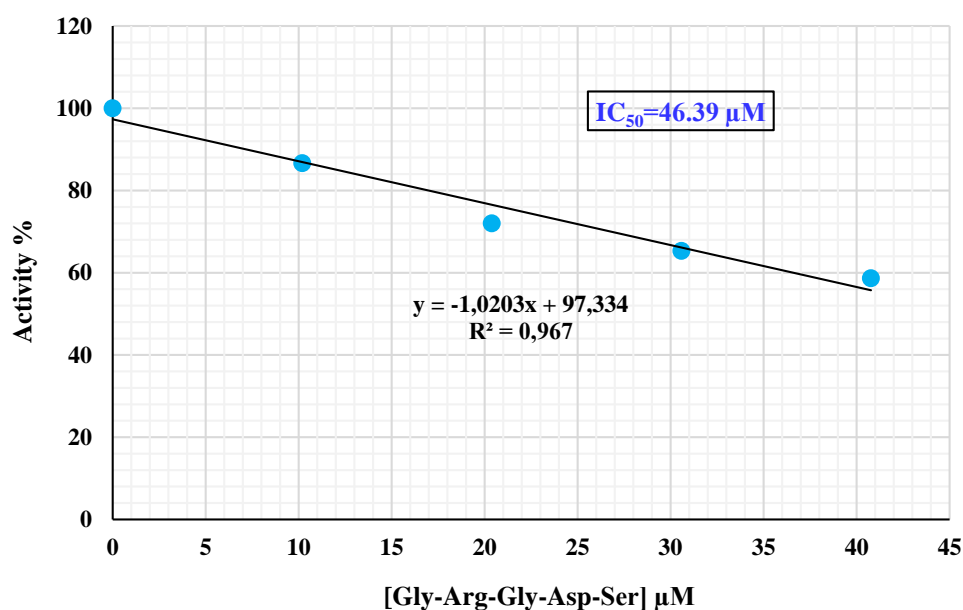


Figure 3. The inhibitory impact of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) bioactive peptide on ACE from human serum. Four dissimilar GRGDS peptide (from 10.20 to 40.78 μM) concentrations on ACE activity were explored

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

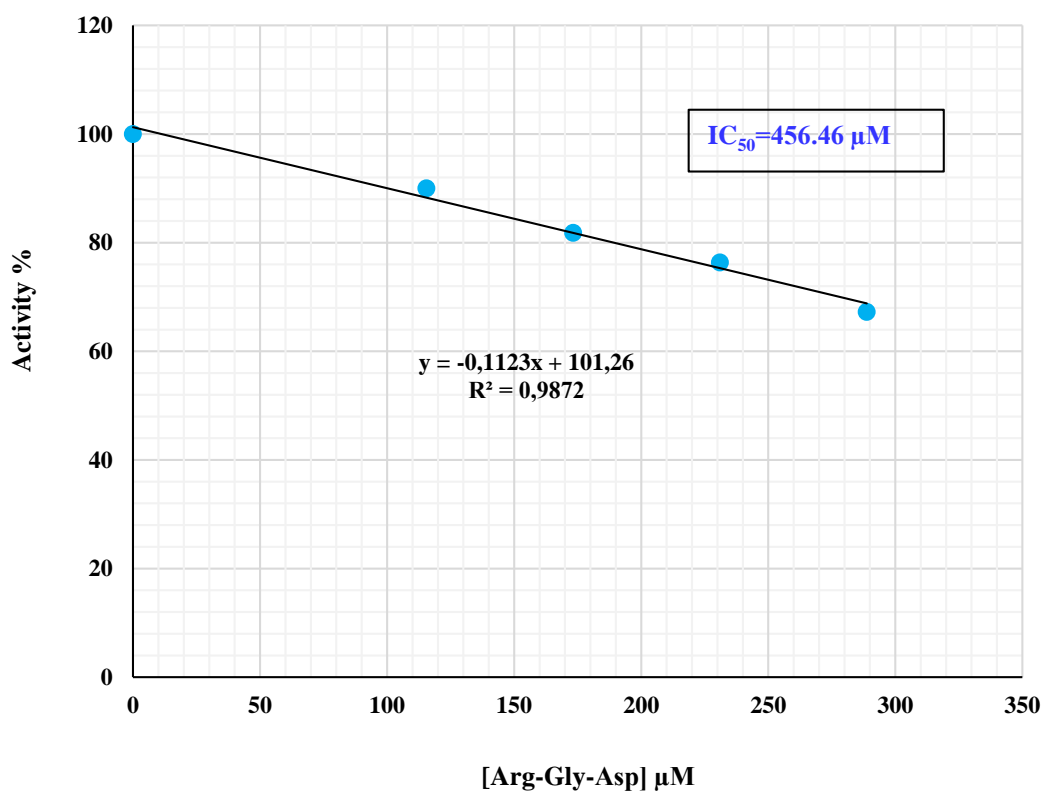


Figure 4. The inhibitory impact of Arg-Gly-Asp (RGD) bioactive peptide on ACE from human serum. Four dissimilar RGD peptide (from 115.5 to 288.75 μM) concentrations on ACE activity were explored

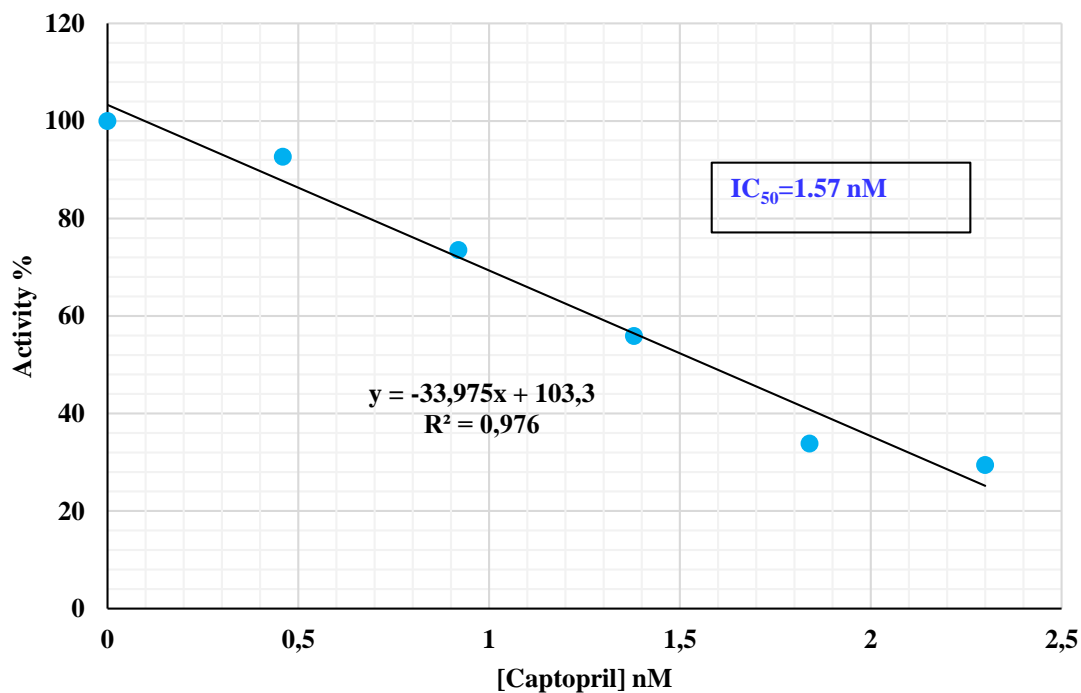


Figure 5. The inhibitory impact of captopril on ACE from human serum. Five dissimilar captopril (from 0.46 to 2.30 nM) concentrations on ACE activity were explored

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

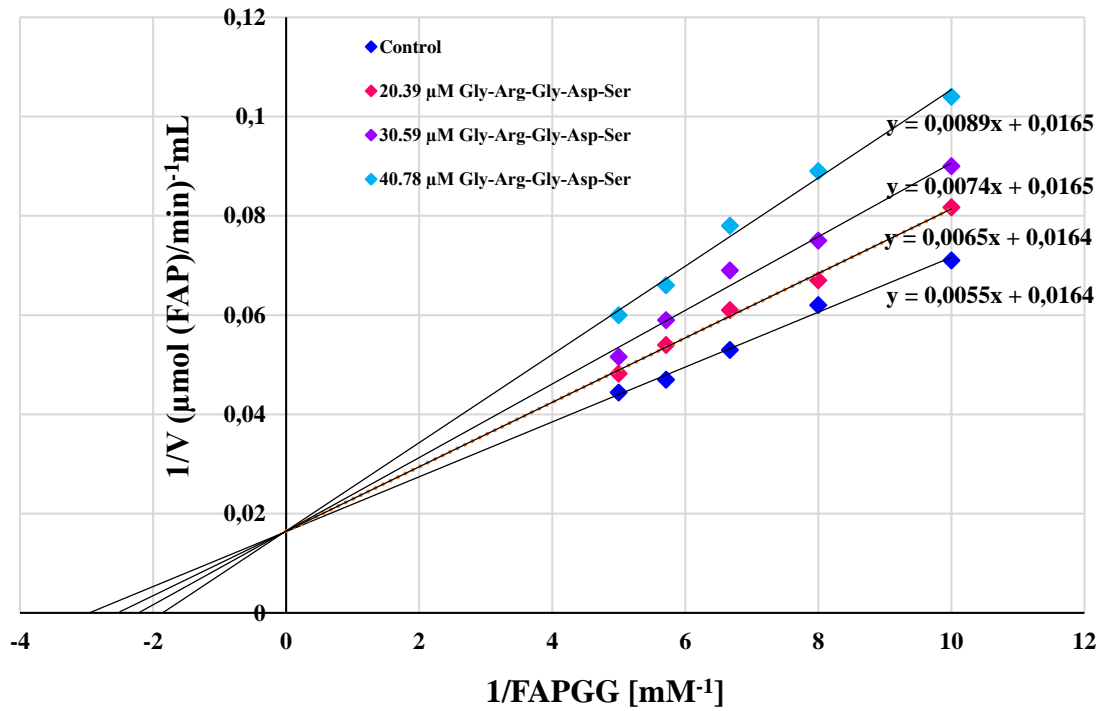


Figure 6. Lineweaver–Burk graph with five dissimilar substrate concentrations (FAPGG) and three dissimilar Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) bioactive peptide concentrations used for the definition of inhibitory kind and K_i

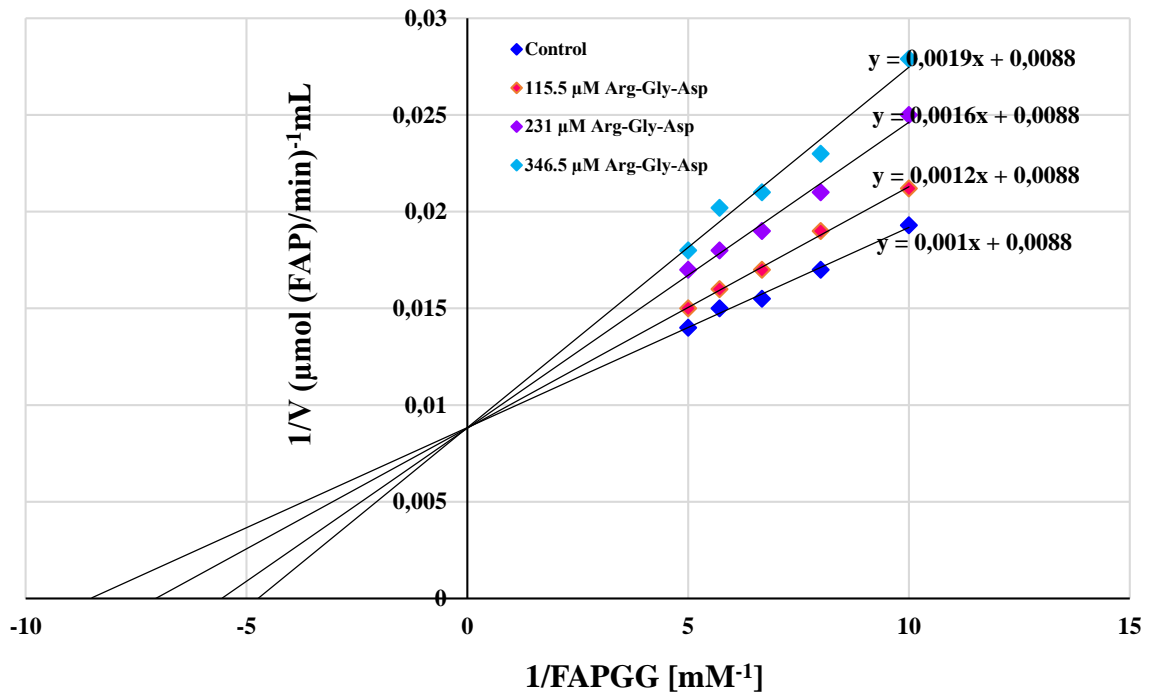


Figure 7. Lineweaver–Burk graph with five dissimilar substrate concentrations (FAPGG) and three dissimilar Arg-Gly-Asp (RGD) bioactive peptide concentrations used for the determination of inhibitory kind and K_i

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

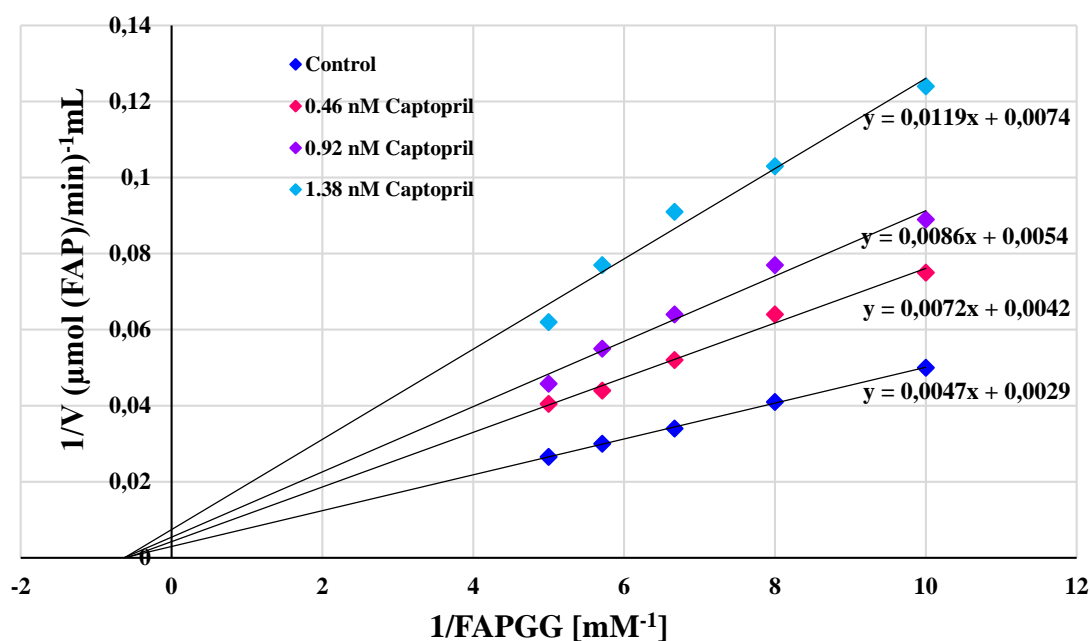


Figure 8. Lineweaver–Burk graph with five dissimilar substrate concentrations (FAPGG) and three dissimilar captopril concentrations used for the determination of inhibitory kind and K

Table 1. IC₅₀, K_i values, and inhibition types were obtained from regression analysis graphs for the ACE in the presence of different Arg-Gly-Asp (RGD), Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) bioactive peptides, and captopril concentrations

ACE Inhibitory	IC ₅₀	K _i	Inhibitory kind
GRGDS peptide	46.39 μM	93.28 μM	Reversible Competitive
RGD peptide	456.46 μM	435.67 μM	Reversible Competitive
Captopril	1.57 nM	0.99 nM	Reversible Non-competitive

In many in vivo works, it has been detected that various bioactive peptides can significantly decrease blood pressure with ACE inhibition upon oral or intravenous implementation (Majumder and Wu, 2014; Balti et al., 2012). In one study, a tri-peptide IRW was identified from the thermolysin-pepsin hydrolyzate of the egg white protein ovotransferrin, which showed a potent inhibitory effect on the ACE. This peptide significantly decreased SBP by 40 mmHg in SHR after 18 days of therapy at a dose of 15 mg/kg body weight. It has also been observed to decrease plasma Ang II levels simultaneously, possibly by ACE inhibition (Majumder et al., 2013). In another study, the milk-derived peptides AYFYPEL and RYLGY from bovine casein hydrolyzate showed ACE inhibitory and antioxidant effects in vivo. Oral implementation of these peptides to SHR at a dosage of 5 mg/kg BW has been found to significantly lower blood pressure (Contreras et al., 2009). A new peptide (GHS or Gly-His-Ser) isolated from the 3 kDa membrane ultrafiltration permeate of a pancreatin+pepsin rapeseed protein showed an inhibition effect on ACE, with an IC₅₀ value of 0.52 ± 0.01 mg/mL. Oral implementation of this peptide to SHR (30 mg/kg body weight) resulted in a maximal blood pressure decrease of -17.29 ± 2.47 mmHg after 6 hours (He et al., 2013).

The RGD bioactive peptide is a cell adherence motif displayed in plasma proteins and many ECM. The RGD is the most studied adhesive peptide in the field of biomaterials. RGD peptide is widely utilized in many different pathological and physiological procedures in the therapy of tumors, the improvement of antithrombotic medicaments, and tissue engineering (Wang et al., 2013; Colombo

and Bianchi, 2010). The GRGDS bioactive peptide contains the RGD peptide, which is a recognition site in interactions between cell membrane receptors and ECM molecules. Recent studies have shown that RGD and GRGDS bioactive peptides inhibit angiogenesis and platelet aggregation (Nicosia and Bonanno, 1991). In a study on mice, it was reported that RGD peptide may be effective in the treatment of hypertension and asthma by showing a relaxing effect on the pulmonary arteries and airways (Welschoff et al., 2014)

CONCLUSION

Hypertension is a chronic health issue that leads to illnesses like atherosclerosis, heart disease, stroke, aneurysm, and kidney failure. ACE inhibitors, which cause a reduction in arterial blood pressure, are usually used in patients with hypertension. However, it has been observed that synthetic drugs like captopril, enalapril, lisinopril, and fosinopril have many adverse effects after long-term use. Since these synthetic drugs are cyclic compounds in their molecular structures, they are difficult to detoxify and excreted in metabolism, and therefore they have too many side effects. It has been observed in recent years that bioactive peptides acquired from natural sources have an inhibitory impact on ACE. Therefore, studies on these peptides have been increasing recently. In many in vivo studies, it has been found that these peptides have antihypertensive effects with oral and intravenous administration of many bioactive peptides. Herein, the ACE was successfully purified from human serum in the only step. The inhibition effect of RGD and GRGDS bioactive peptides on the purified ACE was researched and an important inhibitory effect was found. It has been determined that RGD and GRGDS bioactive peptides, which have specific binding sites between integrins and their ligands, have a strong potential in the treatment of illnesses like cancer, angiogenesis, asthma, cardiovascular disease, and hypertension. In our study, it was concluded that these bioactive peptides have the potential to be utilized to be an ACE inhibitor when compared with a specific ACE inhibitor, captopril.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

Vedat Türkoğlu: Supervision, Conceptualization, and Project Administration. Vedat Türkoğlu, Resul Adanaş, and Zehra Baş: Data curation, Writing-original draft preparation. Resul Adanaş and Zehra Baş: Performed the experiments. Vedat Türkoğlu and Zehra Baş: Visualization, Investigation, Writing-review & editing.

REFERENCES

- Adelman B, Gennings C, Strony J, Hanners E, 1990. Synergistic inhibition of platelet aggregation by fibrinogen-related peptides. *Circulation Research*, 67(4): 941–947.
- Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP, 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 381-410.
- Aydin F, Turkoglu V, Bas Z, 2021. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme (ACE) from sheep lung, *Molecular Biology Reports* 48: 4191-4199.
- Balti R, Bougateg A, Guillochon D, Dhulster P, Nasri M, Nedjar-Arroume N, 2012. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 4(3): 611-617.

- Bas Z, 2021. Inhibition effect of nicotinamide (vitamin B₃) and reduced glutathione (GSH) peptide on angiotensin-converting enzyme activity purified from sheep kidney. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189: 65-71.
- Bas Z, Turkoglu V, Goz Y, 2022. Investigation of inhibition effect of butanol and water extracts of *Matricaria chamomilla* L. on angiotensin-converting enzyme purified from human plasma. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69: 273–280.
- Basi Z, Turkoglu V, 2018. Purification of angiotensin-converting enzyme from human plasma and investigation of the effect of some active ingredients isolated from *Nigella sativa* L. extract on the enzyme activity. *Biomedical Chromatography*, 32: e4175.
- Basi Z, Turkoglu V, 2019. In vitro effect of oxidized and reduced glutathione peptides on angiotensin converting enzyme purified from human plasma. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1104: 190-195.
- Baudin B, Bénétteau-Burnat B, 1999. Mixed-type inhibition of pulmonary angiotensin I-converting enzyme by captopril, enalaprilat and ramiprilat. *Journal of Enzyme Inhibition*, 14(6): 447–456.
- Bernstein KE, Khan Z, Giani JF, Cao DY, Bernstein EA, Shen XZ, 2018. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews. Nephrology*, 14(5): 325–336.
- Bhaskar B, Ananthanarayan L, Jamdar S, 2019. Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour. *LWT*, 103: 155-161.
- Bondre SV, Chavan RS, Raut, ID, Mohite SK, Magdum, CS, 2020. An overview of survey on antihypertensive drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (3): 160–162.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Chen J, Yu X, Chen Q, Wu Q, He Q, 2022. Screening and mechanisms of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from rabbit meat proteins: A combined in silico and in vitro study. *Food Chemistry*, 370: 131070.
- Colombo M, Bianchi A, 2010. Click chemistry for the synthesis of RGD-containing integrin ligands. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(1): 178–197.
- Contreras MDM, Carrón R, Montero MJ, Ramos M, Recio I, 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10): 566-573.
- El-Dorry HA, Bull HG, Iwata K, Thornberry NA, Cordes EH, Soffer RL, 1982. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 257(23): 14128-14133.
- He R, Malomo SA, Girgih AT, Ju X, Aluko RE, 2013. Glycinyln-histidinyln-serine (GHS), a novel rapeseed protein-derived peptide has blood pressure-lowering effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35): 8396–8402.
- Hermida, RC, Ayala, DE, Fernández JR, Portaluppi F, Fabbian F, Smolensky MH, 2011. Circadian rhythms in blood pressure regulation and optimization of hypertension treatment with ACE inhibitor and ARB medications. *American Journal of Hypertension*, 24(4): 383-391.
- Holmquist B, Bünning P, Riordan JF, 1979. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 95 (2): 540-548.
- Hooper NM, Turner AJ, 1987. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *The Biochemical Journal*, 241(3): 625–633.

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

- Karahan F, Turkoglu V, 2021 Enhanced purification protocol for the angiotensin-converting enzyme from bovine systems and investigation of the in vitro effect of some active substances *Chemico-Biological Interactions*, 347: 109604.
- Kitts DD, Weiler K, 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309–1323.
- Kiylik A, Turkoglu V, Bas Z, 2022. Purification of angiotensin-converting enzyme (ACE) from sheep kidney and inhibition effect of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) on purified ACE activity. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 80: 115-122.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lavoie JL, Sigmund, CD, 2003. Minireview: overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*, 144(6): 2179-2183.
- Liang F, Shi Y., Shi J, Zhang T, Zhang R, 2021. A novel Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide IAF (Ile-Ala-Phe) from pumpkin seed proteins: in silico screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms. *European Food Research and Technology*, 247(9): 2227-2237.
- Lin Q, Liao W, Bai J, Wu W, Wu J, 2017. Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-Ser-Trp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells. *Journal of Functional Foods*, 34: 248-253.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56: 658–660.
- Ma T, Fu Q, Mei Q, Tu Z, Zhang L, 2021. Extraction optimization and screening of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Channa striatus* through bioaffinity ultrafiltration coupled with LC-Orbitrap-MS/MS and molecular docking. *Food Chemistry*, 354: 129589.
- Majumder K, Chakrabarti S, Morton JS, Panahi S, Kaufman S, Davidge ST, Wu J, 2013. Egg-derived tri-peptide IRW exerts antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*, 8(11): e82829.
- Majumder K, Wu J, 2014. Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1): 256-283.
- Miguel M, Gómez-Ruiz JÁ, Recio I, Aleixandre A, 2010. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Molecular nutrition & food research*, 54(10): 1422–1427.
- Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada, KM, 1995. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5199): 883–885.
- Nicosia RF, Bonanno E, 1991. Inhibition of angiogenesis in vitro by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptide. *The American Journal of Pathology*, 138(4): 829–833.
- Perazella MA, Setaro JF, 2003. Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, 10(2): 184–196.

Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-Gly-Asp (RGD) Bioactive Peptides on Angiotensin-Converting Enzyme Activity Purified from Human Serum

- Rezzani R, Porteri E, De Ciuceis C, Bonomini F, Rodella LF, Paiardi S, Boari GE, Platto C, Pilu A, Avanzi D, Rizzoni D, Agabiti Rosei E, 2010. Effects of melatonin and Pycnogenol on small artery structure and function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 55 (6) : 1373–1380.
- Sabeur K, Vo AT, Ball BA, 2001. Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(1) : 139–146.
- Sánchez A, Vázquez, A, 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1: 29-46.
- Thavasu PW, Longhurst S, Joel SP, Slevin ML, Balkwill FR, 1992. Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *Journal of Immunological Methods*, 153(1-2) : 115–124.
- Turpeinen AM, Järvenpää, S, Kautiainen H, Korpela R, Vapaatalo H, 2013. Antihypertensive effects of bioactive tripeptides - a random effects meta-analysis. *Annals of Medicine*, 45(1) : 51-56.
- Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie, T, 2013. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7) : 13447–13462.
- Welschoff J, Matthey M, Wenzel D, 2014. RGD peptides induce relaxation of pulmonary arteries and airways via β 3-integrins. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(5): 2281–2292.
- Zhang N, Li F, Zhang T, Li, CY, Zhu L, Yan S, 2022. Isolation, identification, and molecular docking analysis of novel ACE inhibitory peptides from *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 248(4): 1107-1115.

Atf İçin: Yazıcı, G., Akin, M. ve Saki, N. (2023). Bazı Hurma Çeşitlerinde Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Belirlenmesi, Geri Kazanımı ve Antioksidan özelliklerin Araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2861-2874.

To Cite: Yazıcı, G., Akin, M. & Saki, N. (2023). Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2861-2874.

Bazı Hurma Çeşitlerinde Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Belirlenmesi, Geri Kazanımı ve Antioksidan özelliklerinin Araştırılması

Güldeniz Yazıcı¹, Mustafa AKIN², Neslihan ŞAKİ^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Hurma meyvesinin antioksidan aktivitesi ve toplam fenol içeriği ekstraksiyon yöntemlerinden etkilendi
- Hurma ekstraktlarında çok sayıda kalıntı pestisit tespit edildi
- Bazı pestisit kalıntılarının belirlenen limitlerin üzerinde olduğu belirlendi

Anahtar Kelimeler:

- Antioksidan
- Pestisit
- Geri Kazanım
- Hurma
- LC-MS-MS

ÖZET:

Bu çalışmada, hurmaların antioksidan aktivite özelliklerini belirlemek için İran, Medine, Tunus, Kudüs ve Bağdat olmak üzere farklı ülkelerden ithal edilen beş çeşit hurma seçilmiştir. Ayrıca hurma bitkilerinde kullanılan 10 adet pestisit kalıntısı analiz edilmiş ve pestisit kalıntılarının geri kazanım kullanımına etkileri araştırılmıştır. Hurma ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri DPPH ve Folin-Ciocalteu fenol reaktif deneyleri kullanılarak belirlendi. Pestisit kalıntı çalışmaları LC-MS-MS tekniği kullanılarak, geri kazanım çalışmaları ise AOAC.2007.01 ve 15662 Quechers yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hurma meyvesinin antioksidan aktivitesi ve toplam fenol içeriği lokasyon, genetik değişkenlik, çevresel özellikler, olgunlaşma aşamaları ve ekstraksiyon yöntemlerinden etkilenmiştir. Ekstraktlarda çok sayıda kalıntı pestisit tespit edilmiştir. Medine hurma meyvesinde bulunan Dioxacarb kalıntısının tolerans limitinin üzerinde olduğu belirlendi. AOAC 2007.01 Quechers yöntemine göre en yüksek Chlorpyrifos Methylin geri kazanımı Medine hurmasında 57.069 olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada hurma ekstraktlarının standart antioksidanlara oranla daha düşük antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. Hurmalarda yapılan pestisit analizlerinde birçok pestisit kalıntısı tespit edildi ve bazılarının belirlenen limitlerin üzerinde olduğu tespit edildi. Gıda maddelerindeki pestisit kalıntı miktarlarının daha önceden tespit edilip tolerans sınırlarını geçmemesi gerek tüketici sağlığı açısından ve gerekse ihracat gıda ürünlerinin geri dönmemesi açısından büyük öneme sahiptir. Çalışma kapsamında Hurma meyvesinde yaygın kullanılan pestisit kalıntıları analiz edilerek belirlenmiştir.

Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits

Highlights:

- Antioxidant activity and total phenol content of date fruit were affected by extraction methods
- Many residual pesticides were detected in date extracts
- It was determined that some pesticide residues were above the specified limits

Keywords:

- Antioxidant
- Pesticide
- Recovery
- Date fruit
- LC-MS-MS

ABSTRACT:

In this study, five types of dates imported from different countries, namely Iran, Medina, Tunisia, Jerusalem, and Baghdad, were selected to determine the antioxidant activity properties of dates. In addition, 10 pesticide residues used in date plants were analyzed and the effects of pesticide residues on recovery using were investigated. Antioxidant activities of the date extracts were determined by using DPPH and Folin-Ciocalteu phenol reagent assays. Pesticide residue studies were performed by using LC-MS-MS technique and recovery studies were carried out by using AOAC.2007.01 and 15662 Quechers methods. Antioxidant activity and total phenol contents of date fruit were affected by location, genetic variability, environmental characteristics, maturation stages, and extraction methods. A lot of residual pesticides were determined in the extracts. It was determined that the Dioxacarb residue in the Medina date fruit was above the tolerance limit. According to AOAC 2007.01 Quechers method, the highest recovery of Chlorpyrifos Methylin was found as 57.069 in Medina date. In the study, it was determined that date extracts showed lower antioxidant activity compared to standard antioxidants. Many pesticide residues were detected in the pesticide analyzes made on dates, and some of them were found to be above the specified limits. It is of great importance that the pesticide residue amounts in foodstuffs are determined beforehand and not exceed the tolerance limits, both in terms of consumer health and in terms of not returning the exported food products. Within the scope of the study, pesticide residues commonly used in Date fruit were analyzed and determined.

¹ Güldeniz YAZICI (Orcid ID: 0000-0002-0821-6012), Neslihan ŞAKİ (Orcid ID: 0000-0002-2215-1622), Kocaeli University, Faculty of Science and Letters, Chemistry Department, Kocaeli, Türkiye

² Mustafa AKIN (Orcid ID: 0000-0003-4268-6891), Petroyağ ve Kimyasallar San. ve Tic. A. Ş., Ar-Ge Merkezi, Kocaeli, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Neslihan ŞAKİ, e-mail: sakineslihan1@gmail.com

Bu çalışma Güldeniz Yazıcı'nın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

INTRODUCTION

Date fruit is one of the well-known plants in human history and has been consumed as food for about 6000 years due to their taste and concentrated nutrients. It has been played a major role both nutritionally and economically in the Middle East and North Africa regions for many years (Chao & Krueger, 2007). Date fruit, which has hundreds of varieties with different taste, color, and appearance, belongs to *Phoenix dactylifera* L. families (Elshibli, 2009; Abul-Soad et al., 2017). The variety of dates is based on the valuable properties of the fruit; It is mainly rich in dietary abundant soluble sugar, dietary fiber, various phenolic compounds, and antioxidants (Dransfield, et al., 2005; Asmussen, et al., 2006). Date fruit varieties are spread over a wide geography starting from Canary Islands and including Middle East Countries. The most important factor affecting their growth is the warm climate, but differences in soil structure and plant genetic characteristics in the climatic regions where dates are grown cause changes in the antioxidant levels of dates (Al-Yahyai & Manickavasagan, 2012; Hifnawy et al., 2016). As it is known, antioxidants are important and unique compounds for animals, and their function is to prevent or slow down the activities of free radicals, unstable molecules produced by the body in response to metabolic activities and other pressures that damage cells (Gutowski & Kowalczyk, 2013; Phaniendra et al., 2015; Dinesh, 2021). Free radicals are defined as by-products formed during normal metabolic activity of cells. Both Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) collectively form free radicals and other non-radical reactive species. ROS/RNS play a dual role as compounds both beneficial and toxic to living systems (Pham-Huy et al., 2008; Zhang et al., 2013). At moderate or low levels, this ratio plays a role in cell immune tasks, several cellular signaling pathways, and various physiological functions such as mitogenic response and redox regulation. However, when present in higher concentrations, they produce oxidative and nitrosative stress and cause potential damage to biomolecules. High rates of ROS can also damage the integrity of various biomolecules, including lipids, proteins, and DNA (Taysi et al., 2018; Sharma et al., 2019).

Antioxidants are sometimes called "free radical scavengers" and can be produced naturally or artificially (Lorenz et al., 2003; Ahmadinejad et al., 2017). Natural antioxidants are mainly substances such as phenolic compounds, vitamin C, carotenoids and selenium derived from plants. Additionally, it can be given as examples of phenolic compounds originating from plant flavonoid compounds, cinnamic acid derivatives, coumarin and tocopherol (Gil et al., 2002; Siddeeg et al., 2019). Many studies prove that date fruits are rich in phenolic antioxidants (Brand-Williams et al., 1995; Cserhati et al., 2004), thus, have high antioxidant potential, and their content has changed depending on the diversity of dates, agricultural and environmental conditions (Pinelo et al., 2005; Zargoosh et al., 2019). The anti-inflammatory effect of dates is also attributed to polyphenol compounds that scavenge free radicals produced during the inflammatory process and act as antioxidants that prevent unwanted biochemical reactions. Date increases the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes, indicating that dates modulate enzymatic behavior and thus trigger a signal chain of the antioxidant defense system as an anti-inflammatory. As a result of the fractionation and isolation of different extracts of dates, phenolic compounds, flavonoids and flavanols have been identified in its content. These subclasses of polyphenols are seen as antimicrobials and powerful antioxidants and are attributed to structural interactions between phenolic compounds and microorganisms (Puupponen-Pimia et al., 2001; Biglari et al., 2008).

Pesticides are the general name given to substances applied to kill or deter organisms (pests) that threaten the health and welfare of humans and animals or harm plants. While pesticides are supposed to be effective on insects, they can also poison humans and animals (Agrawal et al., 2010). While some of

the pesticides do not cause any toxicological damage, some of them have been found to be toxic, mutagenic and even carcinogenic on the nervous system. Therefore, it is very important to keep pesticides away from the waste stream. They can leak into water channels and contaminate the soil so organic and synthetic pesticides must be disposed of in accordance with the rules. While pesticides and insecticides are technically non-recyclable, it is vital to dispose of them in an environmentally friendly way (Kaur et al., 2019; Narendran et al., 2020). Nowadays, insecticides such as insecticides, herbicides and fungicides are widely used to obtain productive crops during cultivation. The reasons for use are to obtain a more controlled and improved food product by eliminating harmful organisms that will affect the yield of the crop. However, many pesticides which were used in agricultural applications have caused accumulation in the adipose tissues of people (Ntzani et al., 2017). In addition, pesticides pollute the water and soil and damage the environment. In our age, the use of some harmful pesticides has been banned and the use of some pesticides has been limited (Carlile, 2006). Nevertheless, this is not enough, and an urgent action plan needs to be determined and implemented. From the production of pesticides to the use of their packaging and disposal, the necessary protocols to protect the environment and health must be implemented effectively. The course of pesticides after application should be controlled in detail in terms of the importance of consuming pesticide-free foods in national and international consumption and preventing environmental contamination caused by pesticides. The indicator of countries' commitment to this issue is the number of qualified pesticide residue studies (Tiryaki, 2016).

In this study, five types of dates imported from different countries, namely Iran, Medina, Tunisia, Jerusalem, and Baghdad, were selected, and DPPH radical scavenging activity and total phenol content were examined to determine the antioxidant activity properties of dates. In addition, 10 pesticide residues used in date plants were analyzed by LC/MS/MS instrument. The effects of pesticide residues on recovery using AOAC.2007.01 and 15662 Quechers methods were compared.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Folin–Ciocalteu phenol reagent, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, ascorbic acid and analytical grade acetone were purchased from Sigma-Aldrich, and used as received without further purification. Sodium carbonate (Na_2CO_3), analytical grade methanol, acetonitrile, glacial acetic acid and formic acid were purchased from Merck. Disodium hydrogen citrate syrup ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$), trisodium citrate dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Primary Secondary Amine (PSA), magnesium sulphate kit (MgSO_4), sodium acetate kit (CH_3COONa) and sodium chloride (NaCl) were purchased from Agilent. Pesticide mix. standard was purchased from Accu-Standard. Millipore water (Milli-Q, 18,2 M Ω cm⁻¹) was used to prepare all the samples and solutions throughout the experiments.

Preparation of date fruit extracts

Iran, Tunisia, Medina, Jerusalem, and Baghdad dates used in the experiments were purchased from herbalists in Kocaeli province. 1 kg of each type of date was purchased in packaged form. Then the damaged dates are separated. The remaining dates were weighed one by one and those with $\pm 10\%$ difference in weight were selected and used in the experiments. They were separately grinded in the blender and each type of date was weighed to be 100 grams in 500 mL closed flasks. 200 mL of acetone and acetonitrile solvents were added to each date fruit, and they were stirred for 24 hours at room temperature for extraction. Acetonitrile and acetone extracts were filtered through Whatman 2 filter paper then the solvents were evaporated at 40°C. Stock date fruit extract solutions (30 mg/mL) were

prepared by dissolving with the solvents used for the extraction and stored in a refrigerator for further use (Chaira et al., 2009; Al-Harrasi et al., 2014).

DPPH radical scavenging activity

DPPH free radical scavenging activity was determined according to literature (Gezer et al., 2006). Fruit extracts were prepared at different concentrations (100, 200, 300, 400 and 500 µg/mL) and 2.0 mL of each of the date fruit extract at different concentrations were taken into the test tubes and 1.0 mL of 1.0 mM DPPH solution was added on it. After the solutions were mixed with vortex, they were incubated at room temperature for 30 minutes in the dark. In addition, 2.0 mL acetone and acetonitrile and 1.0 mL DPPH solution were taken as control samples. After the incubation was completed, the absorbances of the dates, which were examined at different concentrations in two different solvents, were measured at 517 nm in a UV-Vis spectrophotometer and ascorbic acid was used as a standard for measurements. The % inhibition values according to the absorbance values of the extracts were calculated with the formula given below. All tests were repeated three times and inhibition values were calculated by using the mean values.

$$\% \text{ Inhibition} = [100 \times (A \text{ control} - A \text{ sample}) / A \text{ control}] \quad (1)$$

A control: absorbance of the control

A sample absorbance of the sample

Total phenolic content

Total phenolic content was performed according to the method specified in the literature at different concentrations (Singleton et al., 1999). 1.0 mL of Folin–Ciocalteu phenol reagent was added to 1.0 mL of sample and mixed for 5 minutes. Then, by adding 1.0 mL of 10.0 % Na₂CO₃, it was filled to 10.0 mL with distilled water and incubated for 2 hours at room temperature. Finally, the absorbance was spectrophotometrically measured with a UV/Vis spectrometer at 760 nm, and the results were shown in mg of gallic acid equivalents per volume of sample (mg GAE/g). A calibration curve was created in the range of 50.0-600.0 µg/mL of gallic acid as a standard, and the results were recorded against curve. Tests were carried out triplicate.

LC-MS-MS for pesticide residue analysis

Pesticide residue and recovery studies were carried out on date fruits by using Orbitrap LC/MS/MS instrument of Kocaeli Food Control Laboratory Directorate which is accredited. An LC system consisting of a Thermo Ultimate 3000 liquid chromatography (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and Thermo Accuroce QC18 column (Lot: 15341), (100 x 2.1mm, particle size 2.6 µm) was used for separation and maintained at 35°C. The mobile phase was composed of water (eluent A: H₂O) and methanol (eluent B: MeOH), auto sampler temperature was 15°C and flow rate was 0.3 mL/min and injection volume was 10.0 µL.

MS/MS experiments were performed using Q-Exactive Focus (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) equipped with a heated electrospray ion source (HESI). Positive ion analysis was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The collision gas pressure was 0.2 Pa (nitrogen purity of 99.9995%), while the sheath and auxiliary gas pressures (99.9% purity) were set to 40 and 10 Pa, respectively. The vaporizer and capillary temperatures were set to 350°C and 320°C respectively, with a spray voltage of +4 kV. In the PRM experiments, the normalized collision energy (NCE) was obtained from the inclusion list. The data were collected at a resolution (R) = 17500 @m/z 195.0882.

AOAC 2007.01 Quechers method

AOAC 2007.01 Quechers method was applied to determine pesticide residue in date fruits according to the method specified in the references (Çetinkaya Açar, 2015; Lawal et al., 2018, Varela-Martínez et al., 2019). From the dates that were grinded in a blender and homogenized, 5.0 grams were weighed into 50.0 mL centrifuge tubes. 10.0 mL of distilled water was added on them. According to the document numbered SANTE 11813/2017, the amount of knitting may have to be reduced in products such as flour, dried fruit, honey, and spices with less than 25 % water content, and the amount is completed to 15.0 grams with the addition of water (Petrović et al., 2017). Hence, firstly, acetic acid was dissolved in 15.0 mL of 1 % acetonitrile, then added to the Quechers salt (6.0 g MgSO_4 , and 1.5 g CH_3COONa). The centrifuge tube was shaken for 2 minutes to allow the pesticides present in the sample to pass into the solvent. 8.0 mL of the upper phase of the date fruits which were centrifuged at 4000 rpm for 2 minutes was taken and transferred to a 15.0 mL centrifuge tube containing Quechers salts (1200 mg MgSO_4 and 400 mg PSA). After 30 seconds of agitation, it was centrifuged at 4000 rpm and taken from the upper phases with a 2.0 mL injector and passed through a 0.45 μm filter and 500.0 μl was taken into 1.5 mL vials. Then, 6.7 mM formic acid was added to the vial. Calibration standards for pesticide screening were likewise prepared in the form of 500 μl spike sample (15.0 g weighed sample) and 500 μl formic acid. Therefore, as the dates were studied by weighing 5.0 g, threefold dilution was made in the analysis and the results were evaluated by considering the dilution coefficient. Methanol and water were used as the mobile phase.

Recovery by AOAC 2007.01 Quechers method

According to the SANTE/11813/2017 Food and Feed Pesticide document, the date fruit matrix, which is included in the group of products with high sugar and low water content was homogenized and approximately 7.5 g was weighed into 50.0 mL centrifuge tubes and 7.5 mL distilled water was added. 750 μl (50,0 ppb) from the 500.0 ppb Accu mix pesticide standard were spiked to the dates, then acetonitrile which containing 1.0 % acetic acid was added. In the extraction stage, 6.0 g MgSO_4 and 1.5 g CH_3COONa salts were added. Centrifuge tubes were shaken in a shaker for 2 minutes, then centrifuged at 4000 rpm and 8.0 mL of the upper phase was transferred to the 15.0 mL centrifuge tubes which had Quechers second stage salts (1200.0 mg and 400.0 mg PSA) (Costa et al., 2014). After 30 seconds agitation, the solution was centrifuged 2 minutes at 4000 rpm. The upper phases were passed through a 0.45 μm filter with a 2.0 mL injector and 500.0 μL sample and 500 μL formic acid solution (6.7 mM) were added to the vials. Calibration was also performed with a date matrix, so the results were evaluated without multiplying by the dilution coefficient.

Recovery by EN 15662 Quechers method

In this method, as in the AOAC 2007.01 Quechers method, the same amount of weighing from the homogeneous date fruits and water were added to fortification with 750 μl pesticide standard. Unlike the AOAC 2007.01 Quechers method, in the extraction step, after the solvent addition, 4.0 g magnesium sulphate, 1.0 g sodium chloride, 1.0 g trisodium citrate dihydrate, 0.5 g disodium hydrogen citrate extraction salts were added. In the next stage, the analysis was carried out by following the steps in the AOAC 2007.01 Quechers method (Cieslik et al., 2011).

Quechers recycling methods with a different extraction salt were studied using MeOH (methanol) and H₂O (water) mobile phases in the LC/MS/MS instrument of the dates to understand differences of two versions of Quechers. These solutions, called mobile phases A and B, were prepared as follows. Mobile Phase A: To identify the types of pesticides contained in date fruits, distilled water was added to

a 1000 mL flask and 4.0 mL of ammonium formamide and 1.0 mL of formic acid were added, and the final volume was completed to 1.0 L with distilled water.

Mobile Phase B: To identify the types of pesticides contained in date fruits, methanol was added to 1000 mL volumetric flask and 4.0 mL of ammonium formamide and 1.0 mL of formic acid were added, and the final volume was completed to 1.0 L with methanol.

Acetonitrile and water are the mobile phases of EN 15662 Quechers method. To examine the differences of the mobile phase how to effect on recovery in the Quechers method, date fruits matrices were carried out with the EN 15662 Quechers method. This time, acetonitrile and water were used as a mobile phase at LC/MS/MS. Thus, the same extraction salts were used, and the mobile phases were replaced due to the recycling study was carried out with the same method (Alder et al., 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

DPPH radical scavenging assay

The DPPH method evaluates the capacity of compounds in date fruit extract to reduce DPPH radical. Figures 1 and 2 shows the DPPH free radical scavenging activities of date fruit extracts determined at different $\mu\text{g/mL}$ in acetonitrile and acetone, at 517 nm (Marinova et al., 2011). According to these results, Medina acetone extract had the highest DPPH free radical scavenging activity with $43.57\% \pm 0.37\%$, while the lowest activity was found in Tunisian date acetonitrile extract with $3.37\% \pm 0.14\%$. In our study, the DPPH radical scavenging activity of Medina date fruit was highest in acetone extracts ($43.57\% \pm 0.37\%$), followed by Tunisian date ($24.44\% \pm 0.12\%$), Jerusalem date ($17.04\% \pm 0.38\%$), Baghdad date ($15.42\% \pm 0.53\%$) and Iranian date ($9.70\% \pm 0.12\%$). In acetonitrile extracts DPPH free radical scavenging activity result respectively were found that Medina date fruit ($18.24\% \pm 0.95\%$), Jerusalem date fruit ($13.65\% \pm 1.64\%$), Iran date fruit ($11.66\% \pm 0.41\%$), Baghdad date fruit ($9.07\% \pm 3.32$) and Tunisian date ($3.37\% \pm 0.14\%$). The results of this study showed that date fruit grown in Medina can be a good source of antioxidants as it has higher DPPH scavenging properties than ascorbic acid used as a standard antioxidant. In a study in the literature, the highest DPPH scavenging activity was determined in Allig date extract and the lowest activity in Deglet Nour date extracts. DPPH radical scavenging of Allig, Bejo, and Deglet Nour date extracts were found to be 58.77%, 40.78%, and 23.98%, respectively (Abbes et al., 2013). Another study indicates that the DPPH removal activity of Tunisian date extract was found to be 1.53%. However, in our study, the DPPH removal activity of acetone extract of Tunisian date was detected higher than the literature results (Saafi et al., 2009).

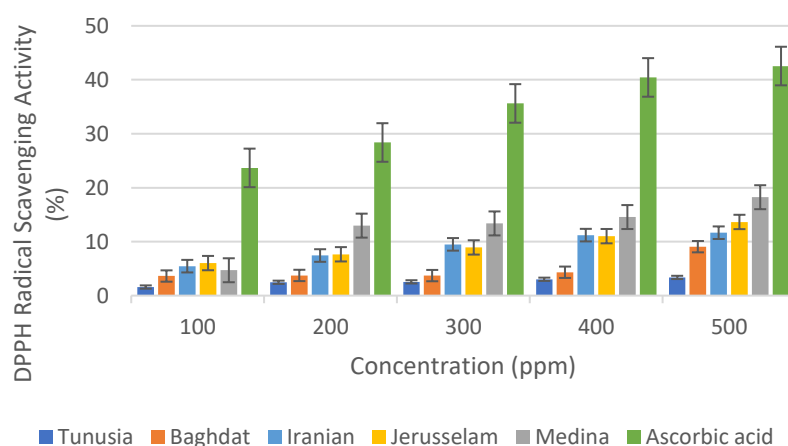


Figure 1. DPPH free radical scavenging activity of acetonitrile extracts (%)

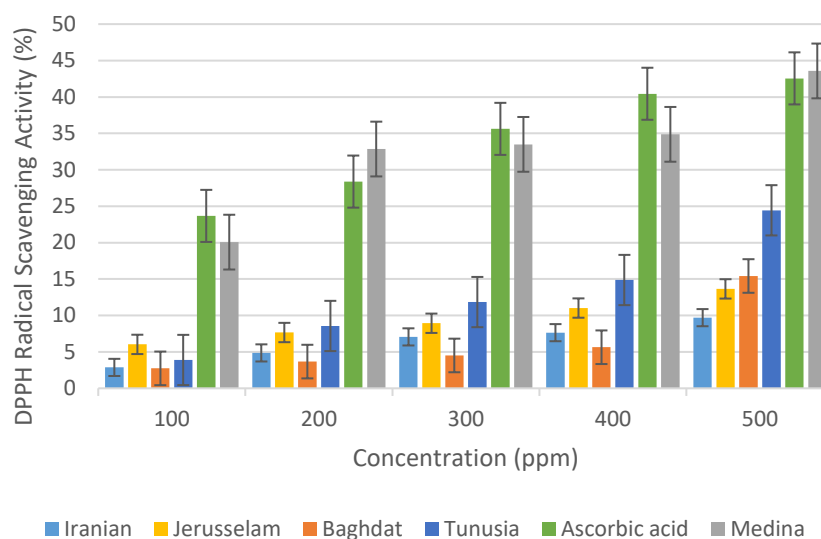


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of acetone extracts (%)

Total phenolic content

To determine total phenolic content in date fruit extracts, a graph of gallic acid used as a standard compound was prepared (Singleton et al., 1965). Total amount of gallic acid in all extracts was calculated from the formula obtained from the standard graph (r^2 : 0.9739). Table 1 shows the total phenol contents of Baghdad (Zahidi), Tunisia (Berni), Jerusalem (Medjoul), Iran (Mazafati) and Medina (Hudri) Phoenix dactylifera L/ 100 g dates. It is seen that the total phenolic contents increase depending on the concentration and the total phenolic contents of the dates give different results. Among varieties, the total phenol contents in 500 ppm of acetonitrile extracts of dates are; Tunisia (15.86 ± 0.09 mg of GAE/100 g), Baghdad (12.89 ± 0.23 mg of GAE/100 g), Jerusalem (8.63 ± 0.07 mg of GAE/100 g), Medina (7.72 ± 0.16 mg of GAE/100 g) and Iran (7.13 ± 0.10 mg of GAE/100 g). The total phenol content of date fruit acetone extracts at 500 ppm; Baghdad (29.24 ± 0.07 mg of GAE/100 g), Iran (16.79 ± 0.17 mg of GAE/100 g), Tunisia (14.81 ± 0.07 mg of GAE/100 g), Jerusalem (13.92 ± 0.18 mg of GAE/100 g), Medina (12.27 ± 0.16 mg of GAE/100 g). While the highest total phenol content was in the Baghdad date acetone extract, the lowest phenolic content was obtained in the Iranian date acetonitrile extract. According to the literature, the total phenolic contents of Allig, Deglet Nour, and Bejo dates were calculated as 505.49 ± 3.36 mg, 240.38 ± 1.12 mg, and 391.94 ± 5.18 mg, respectively. Furthermore, the total phenolic substance content in the dates was determined as 147.14 mg GAE / 100.0 g, while the phenolic substance content was the highest in the history of Iranian date (Rabbi) 250.62 mg GAE / 100 g, the lowest 35.21 mg GAE / 100 g found in the Iranian (Rutab) date (Kchaou et al., 2016). In another study, when the phenolic substance contents in Algerian dates were examined, results showed that the highest phenolic substance was 954.59 mg GAE / 100 g in the Ghazi dates and 225.57 mg GAE / 100 g on Deglet Nour dates (Benmeddour et al., 2013). In the study conducted in 2005, phenolic content of Algerian dates between 2.49-8.36 mg GAE / 100 g were found (Mansouri et al., 2005). All these works clearly demonstrate that the amounts of phenolic compounds and the antioxidant capacities of dates were affected by location, genetic variability, environmental characteristics, maturation stages, and extraction methods.

Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits

Table 1. % Total phenolic content of date extract (mg GAE/100 g date).

Extracts	Concentration (µg/mL)	Total Phenolic Content (mg GAE/100 g date)	Extracts	Concentration (µg/mL)	Total Phenolic Content (mg GAE/100 g date)
	100	5.91±0.11		100	6.61±0.15
Iranian Date	200	6.18±0.09	Iranian Date	200	7.00±0.15
Acetonitrile	300	6.34±0.07	Acetone	300	7.79±0.17
Extract	400	6.61±0.14	Extract	400	8.41±0.19
	500	7.13±0.10		500	16.79±0.17
	100	9.19±0.27		100	18.89±0.29
Baghdad Date	200	9.76±0.21	Baghdad Date	200	19.44±0.10
Acetonitrile	300	11.08±0.29	Acetone	300	20.06±0.09
Extract	400	12.09±0.17	Extract	400	24.17±0.08
	500	12.89±0.23		500	29.24±0.07
	100	6.29±0.11		100	8.47±0.12
Medina Date	200	6.61±0.10	Medina Date	200	9.02±0.15
Acetonitrile	300	6.98±0.15	Acetone	300	10.79±0.13
Extract	400	7.45±0.06	Extract	400	11.84±0.12
	500	7.72±0.16		500	12.27±0.16
	100	7.49±0.08		100	11.25±0.13
Jerusalem Date	200	7.70±0.11	Jerusalem Date	200	11.56±0.11
Acetonitrile	300	8.04±0.09	Acetone	300	12.66±0.26
Extract	400	8.30±0.10	Extract	400	13.03±0.09
	500	8.63±0.07		500	13.92±0.18
	100	7.61±0.13		100	8.08±0.19
Tunisia Date	200	8.14±0.26	Tunisia Date	200	11.71±0.07
Acetonitrile	300	9.11±0.12	Acetone	300	11.95±0.11
Extract	400	9.50±0.07	Extract	400	12.64±0.21
	500	15.86±0.09		500	14.81±0.07

*Data are expressed as mean ± standard deviation; Values within each type of date fruit extract marked with the same letter in the same column are not significantly different.

According to the antioxidant activity results, non-parallel results were obtained when the DPPH and Total phenol content methods were compared. Although DPPH removal activity was high in both solvent extractions in Medina dates, the date extract with the highest total phenol content was obtained in Tunisia and Baghdad dates. The reason for this is that -OH molecules in the structure are active in the method of determining the total phenol content, while in the DPPH method, the reaction takes place by electron transfer. In the studies carried out, it was determined that there was no correlation between the DPPH method and the total phenol content (Yongchou et al., 2014).

Screening of pesticide residues

Table 2 shows the substances detected in date extracts and residual pesticide concentrations. No pesticide residue was found in the Iranian date. Malathion Oxon (0.222 ± 0.111 µg / kg) in Baghdad dates, Cyprodinil (0.189 ± 0.094 µg / kg) and Fenpropimorph (0.423 ± 0.212 µg / kg) in Jerusalem dates, Cyprodinil (0.165 ± 0.082 µg / kg), Dioxacarb (36.384 ± 18.192 µg / kg), Fenpropimorph (0.213 ± 0.106 µg / kg), Malathion Oxon (0.249 ± 0.124 µg / kg) and Terbufos (7.224 ± 3.612 µg / kg) in Medina dates, Cyprodinil (0.249 ± 0.124 µg / kg) and Fenpropimorph (0.189 ± 0.094) in Tunisia dates, residues were detected. Dioxacarb residue was found above the tolerance limit in the Medina dates, and other pesticides are below the tolerance values. Chromatograms of pesticide residues are given in Figure 3.

Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits

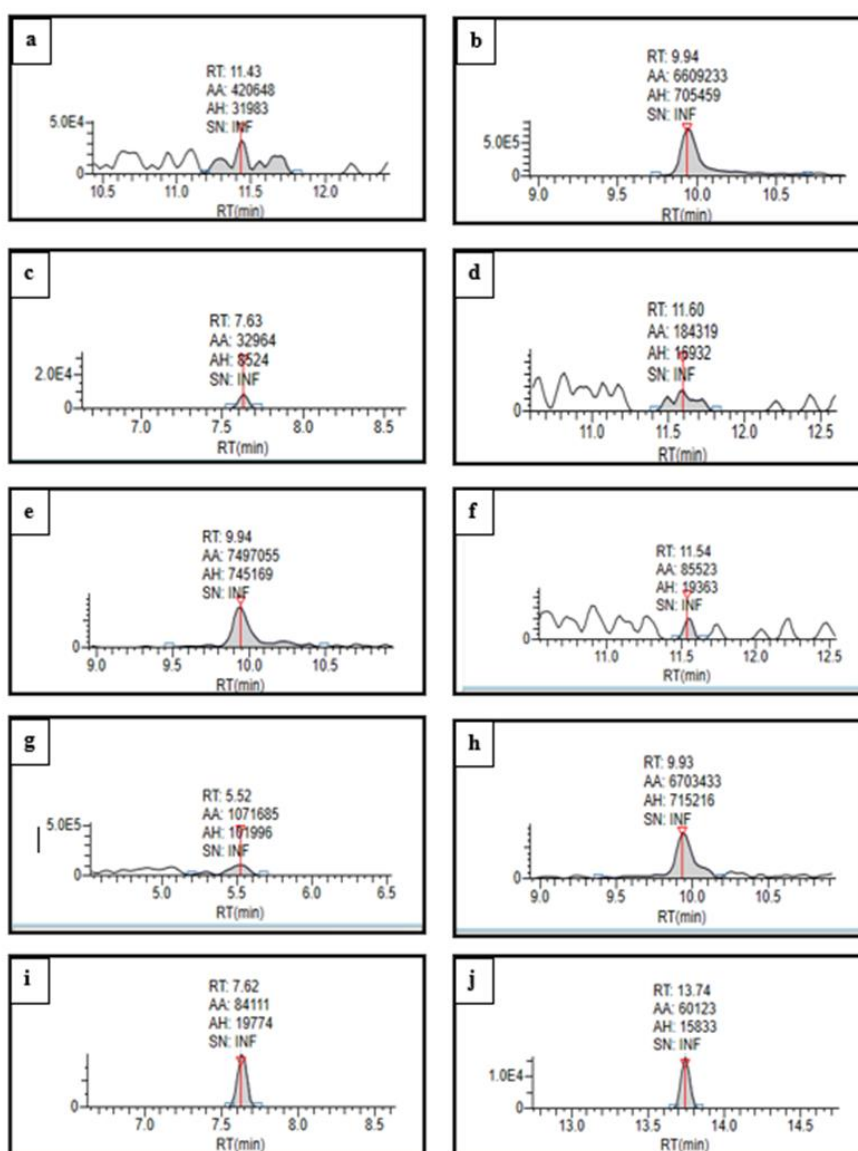


Figure 3. Chromatograms of pesticide residues. a) Tunisian cyprodinil b) Tunisian Fenpropimorph, c) Baghdad Malathion Oxon, d) Jerusalem cyprodinil, e) Jerusalem Fenpropimorph, f) Medina cyprodinil, g) Medina Dioxacarb, h) Medina Fenpropimorph, i) Medina Malathion Oxon, j) Medina Terbufos

The residual amounts detected in dates were calculated by using the peak areas. The results have been evaluated considering the European Commission's Food Safety Maximum Residue Limits list and the Turkish Food Codex Pesticides Maximum Residue Limits Regulation. The maximum residual amounts (MRL) of pesticides that can be found in the date fruit sample are given as ppm (mg/kg) in the TFC regulation annexes. Furthermore, these values are used in Table 2 given by ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) to better interpret the results. Dates pesticide residues were approved according to the Turkish Food Codex Pesticides Maximum Residue Limit (MRL) regulation. However, the active ingredient Dioxacarb, which is one of the banned pesticides in the Medina date, was found to be above the allowable MRL value ($10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) with a residual amount of $36.384 \pm 18.192 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits

Table 2. Pesticide residue concentrations determined in date samples and their evaluation according to The Turkish Food Codex (TFC).

Dates	Detected Compound	Residue Amount (µg/kg)	Analysis Instrument	Method	TFC Tolerant Values (µg/kg)
Iranian	---	ND	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	---
Baghdad	Malathion Oxon	0.222±0.111	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	20*
Jerusalem	Cyprodinil	0.189±0.094	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	20*
	Fenpropimorph	0.423±0.212	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	50*
Medina	Cyprodinil	0.165±0.082	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	20*
	Dioxacarb	36.384±18.192	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	10*
	Fenpropimorph	0.213±0.106	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	50*
	Malathion Oxon	0.249±0.124	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	20*
Tunisian	Terbufos	7.224±3.612	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	10*
	Cyprodinil	0.249±0.124	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	20*
	Fenpropimorph	0.189±0.094	AOAC 2007.01 Orbitrap LC/MS/MS	Quechers	50*

*ND: Not detected. Values with * LOD (Maximum Permitted Detection Limit) The LOD for non-MRL pesticides is specified in Annex 5 of the Turkish Food Codex (TFC) regulations.

Recovery of pesticides

The recovery determination of Chlorpyrifos Ethyl, Dimethoate, Fenazaquin, Fenpyroximate, Fipronil, Hexythiazox, Imidacloprid, Malathion, Pyriproxyfen and Spinosad (Spinosyn A + Spinosyn D) pesticides in dates were carried out AOAC 2007.01 and EN 15662 Quechers method. According to AOAC 2007.01 Quechers method, recovery of Chlorpyrifos Methylene was found as 57.069 in Medina date, 56.430 in Tunisia date, 55.576 in Baghdad date, 50.176 in Iran date and 45.046 in Jerusalem date. Dimethoate recovery 56.689, Fenpyroximate recovery 56.008, Pyriproxyfen recovery 58.896 and Spinosad (A + D) total recovery 53.453 in Medina, Fenazaquin recovery 57.618 in Baghdad, Fipronil recovery 46.384, Hexythiazox recovery 57.328, Malathion recovery 58.503 in Tunisia dates and Imidacloprid recovery was determined as 58.512 in Iran dates. The data of the values are shown in Table 3 below.

Table 3. Recovery values of pesticides by AOAC 2007.01 Quechers method.

Pesticides	Spike Concentration (µg/kg)	Recovery Values of Dates				
		Iran	Jerusalem	Medina	Baghdad	Tunisia
Chlorpyrifos Methyl	50	50.176	45.046	57.069	55.576	56.430
Dimethoate	50	54.905	53.057	56.689	53.943	55.714
Fenazaquin	50	53.984	50.071	54.752	57.618	54.718
Fenpyroximate	50	54.538	50.827	56.008	54.709	55.278
Fipronil	40	40.442	40.184	43.399	42.965	46.384
Hexythiazox	50	56.181	51.136	56.342	56.060	57.328
Imidacloprid	50	58.512	53.976	58.098	56.924	54.569
Malathion	50	54.552	55.670	58.226	58.195	58.503
Pyriproxyfen	50	52.119	53.772	58.896	56.412	55.054
Total Spinosad (A+D)	50	48.362	49.064	53.453	52.238	52.663

* Results were averaged over 3 repetitions. (n = 3) Measurements were taken from the Orbitrap LC/MS/MS instrument in accordance with the AOAC 2007.01. Quechers method.

The recovery determination results of Chlorpyrifos Ethyl, Dimethoate, Fenazaquin, Fenpyroximate, Fipronil, Hexythiazox, Imidacloprid, Malathion, Pyriproxyfen and Spinosad (spinosyn

Determination, Recovery and Investigation of Antioxidant Properties of Commonly Used Pesticides in Some Types of Date Fruits

A + spinosyn D) pesticides in dates with EN 15662 Quechers method are given in Table 4. Chlorpyrifos Methyl recovery was found in Tunisian dates (55.507), Dimethoate (60.256), Fipronil (47.032), Malathion (55.941) in Medina dates, Fenazaquin (55.488), Fenpyroximate (55.958), Hexythiazox (57.829), Pyriproxyfen (57.16). Spinosad (A + D) (53.904) were detected in the Tunisia dates, and Imidacloprid (57.079) pesticide residue was detected in the Iran dates.

Table 4. Recovery values of pesticides by EN 15662 Quechers method.

Pesticides	Spike Concentration (µg/kg)	Recovery Values of Dates				
		Iran	Jerusalem	Medina	Baghdad	Tunisia
Chlorpyrifos Methyl	50	40.361	49.326	53.716	44.042	55.507
Dimethoate	50	54.518	54.512	60.256	55.458	54.776
Fenazaquin	50	39.694	52.046	52.488	45.726	55.488
Fenpyroximate	50	43.947	46.757	53.409	45.652	55.958
Fipronil	40	31.954	38.296	47.032	36.845	43.550
Hexythiazox	50	44.229	50.845	56.994	51.480	57.829
Imidacloprid	50	57.079	53.117	56.468	55.794	55.687
Malathion	50	44.468	50.050	55.941	48.511	53.612
Pyriproxyfen	50	40.032	48.364	55.399	45.126	57.164
Spinosad (A+D)	50	39.238	46.398	52.305	42.668	53.904

* Results were averaged over 3 repetitions. (n = 3) Measurements were taken from the Orbitrap LC/MS/MS instrument in accordance with the EN 15662 Quechers method.

CONCLUSION

In this study, Medina, Tunisia, Iran, Baghdad, and Jerusalem date fruits were studied. Their antioxidant properties were tested by DPPH free radical scavenging activity and total phenolic content assays. Quechers methods were used to specify total residual pesticide of date fruits. Moreover, Quechers method were used to recovery determinations of Chlorpyrifos Methyl, Dimethoate, Fenazaquin, Fenpyroximate, Fipronil, Hexythiazox, Imidacloprid, Malathion, Pyriproxyfen and Spinosad (spinosyn A + spinosyn D) pesticides. Antioxidant activity and total phenol contents of date fruit were affected by location, genetic variability, environmental characteristics, maturation stages, and extraction methods. A lot of residual pesticides were determined in the extracts. It was determined that the Dioxacarb residue in the Medina date fruit was above the tolerance limit. According to AOAC 2007.01 Quechers method, the highest recovery of Chlorpyrifos Methylin was found as 57.069 in Medina date.

ACKNOWLEDGEMENTS

This article was supported by Kocaeli University BAP unit as project number 2019-046.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Abbès, F., Kchaou, W., Blecker, C., Ongena, M., Lognay, G., Attia, H. & Besbes, S. (2013). Effect of processing conditions on phenolic compounds and antioxidant properties of date syrup. *Ind. Crops Prod.*, 44, 634–642.

- Abul-Soad, A. A., Jain, S. M., Jatoi, M. A. (2017). Biodiversity and conservation of woody plants. *Sustainable development and biodiversity*, 17, 313–353.
- Agrawal, A., Pandey, R. S., Sharma, B. (2010). Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. *J. Water Resour. Prot.*, 02(05), 432–448.
- Ahmadinejad, F., Møller, S. G., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhorji, G., Jami, M. S. (2017). Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*, 2017, 6(3), 51.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS. *Mass Spectrom. Rev.*, 25(6), 838–865.
- Al-Harrasi, A., Rehman, N. U., Hussain, J., Khan, A. L., Al-Rawahi, A., Gilani, S. A., Al-Broumi, M., Ali, L. (2014). Nutritional assessment and antioxidant analysis of 22 date palm (*Phoenix dactylifera*) varieties growing in Sultanate of Oman. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 7(S1), 591–598.
- Al-Yahyai, R., Manickavasagan, A. (2012). Dates production, processing, food, and medicinal values an Overview. *Date Palm Prod.*, 24(5), 1–10.
- Asmussen, C. B., Dransfield, J., Deickmann, V., Barfod, A. S., Pintaud, J. C., Baker, W. J. (2016). In A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): Evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(1), 15–38.
- Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Meurlay, D., Louaileche, H. (2013). Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: A comparative study. *J. Funct. Foods.*, 5(1), 346–354.
- Biglari, F., AlKarkhi, A. F. M., Easa, A. M. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chem.*, 107(4), 1636–1641.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Carlile, B. (2006). Pesticide selectivity, health and the environment. Cambridge University Press, doi:10.1017/CBO9780511617874.
- Chaira, N., Mrabet, A., Ferchichi, A. (2009). Evaluation of antioxidant activity, Phenolics, sugar and mineral contents in date palm fruits. *J. Food Biochem.*, 33(3), 390–403.
- Ciešlik, E., Sadowska-Rociek, A., Ruiz, J. M. M., Surma-Zadora, M. (2011). Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. *Food Chem.*, 125(2), 773–778.
- Costa, F. P., Caldas, S. S., Primel, E. G. (2014). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in canned and fresh peach. *Food Chem.*, 165(16), 587–593.
- Cserhádi, T., Forgács, E., Deyl, Z., Miksik, I., Eckhardt, A. (2004). Chromatographic determination of herbicide residues in various matrices. *Biomedical Chromatography*. 18(6), 350–359.
- Çetinkaya, A. Ö. (2015). Pestisit Analizleri Eğitim Notu. *T.C. Gıda Tarım Ve Hayvanc. Bakanl. Ulus. Gıda Ref. Laboratuvari.*, 32, 13.
- Dinesh, R. (2021). The role of antioxidants and ROS scavenging machinery in wild mushrooms. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 245–251.
- Dransfield, J., Uhl, N. W., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M. (2005). A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Kew Bull.*, 60(4), 559–569.
- Elshibli, S. (2009). *Genetic Diversity and Adaptation of Date Palm (Phoenix dactylifera L.)*, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, for public criticism in Viikki, Auditorium B5 on December, 1–77.
- Gezer, K., Duru, M. E., Kivrak, I., Turkoglu, A., Mercan, N., Turkoglu, H., Gulcan, S. (2006). Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey. *African J. Biotechnol.*, 5(20), 1924–1928.

- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Kader, A. A. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J. Agric. Food Chem.*, 50(17), 4976–4982.
- Gutowski, M., Kowalczyk, S. (2013). A study of free radical chemistry: Their role and pathophysiological significance. *Acta Biochimica Polonica*, 60(1), 1–16.
- Hifnawy, M. S., Mahrous, A. M. K., Ashour, R. M. S. (2016). Phytochemical investigation of Phoenix canariensis Hort. ex Chabaud leaves and pollen grains. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 6(12), 103–109.
- Kaur, R., Mavi, G. K., Raghav, S., Khan, I. (2019). Pesticides Classification and its Impact on Environment. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 2019, no. 8(03), pp. 1889–1897.
- Kchaou, W., Abbès, F., Mansour, R., Blecker, C., Attia, H., Besbes, S. (2016). Phenolic profile, antibacterial and cytotoxic properties of second grade date extract from Tunisian cultivars (Phoenix dactylifera L.). *Food Chem.*, 194, 1048–1055.
- Lawal, A., Wong, R. C. S., Tan, G. H., Abdulra'Uf, L. B., Alsharif, A. M. A. (2018). Recent modifications and validation of QuEChERS-dSPE coupled to LC-MS and GC-MS instruments for determination of pesticide/agrochemical residues in fruits and vegetables: Review. *J. Chromatogr. Sci.*, 56(7), 656–669.
- Lorenz, P., Roychowdhury, S., Engelmann, M., Wolf, G., Horn, T. F. W. (2003). Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: Effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide - Biol. Chem.*, 9(2), 64–76.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (Phoenix dactylifera). *Food Chem.*, 89(3), 411–420.
- Marinova, G., Batchvarov, V. (2011). Methods DPPH. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 17(1), 11–24.
- Narendran, S. T., Meyyanathan, S. N., Babu, B. (2020). Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International.*, 133, 109-141.
- Ntzani, E. E., Ntritsos, G. C. M., Evangelou, G. E., Tzoulaki, I. (2017). Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA Support. Publ.*, 10(10), 497.
- Petrović, A., Marinković, D., Zeremski, T. (2019). A simplified LC/MS-MS method for the detection, identification and quantification of over 100 pesticides in sour cherries as a complex matrix. *The Proceedings, ISEM8 October, 2-5, Budva, Montenegro.*
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.*, 30(1), 11–26.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2111–2117.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.*, 90(4), 494–507.
- Saafi, E. B., Arem, A., Issaoui, M., Hammami, M., Achour, L. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of four date palm (Phoenix dactylifera L.) fruit varieties grown in Tunisia. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44(11), 2314–2319.
- Sharma, A., Gupta, P., Prabhakar, P. K. (2019). Endogenous Repair System of Oxidative Damage of DNA. *Curr. Chem. Biol.*, 13(2), 110–119.
- Siddeeg, A., Zeng, X. A., Ammar, A. F., Han, Z. (2019). Sugar profile, volatile compounds, composition and antioxidant activity of Sukkari date palm fruit. *J. Food Sci. Technol.* 56(2), 754–762.

- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, 16(3), 144.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152–178.
- Taysi, S., Tascan, A. S., Ugur, M. G., Demir, M. (2018). Radicals, Oxidative/Nitrosative Stress and Preeclampsia. *Mini-Reviews Med. Chem.*, 19(3), 178–193.
- Tiryaki, O. (2017). Türkiye’de yapılan pestisit kalıntı analiz ve çalışmaları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Fen Bilim. Derg.*, 32(1), 72–80.
- Youchou, Z. (2014). Relationship of Total Phenolic Contents, DPPH Activities and Anti-Lipid-Oxidation Capabilities of Different Bioactive Beverages and Phenolic Antioxidants. B.S., Shanghai Institute of Technology.
- Zargoosh, Z., Ghavam, M., Bacchetta, G., Tavili, A. (2019). Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Sci. Rep.*, 9(1), 1–15.
- Zhang, C. R., Aldosari, S. A., Vidyasagar, P. S. P. V., Nair, K. M., Nair, M. G. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory assays confirm bioactive compounds in ajwa date fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 61(24), 5834–5840.

Atf İçin: Almaz, Z. (2023). *Geranium tuberosum* Metanol Ekstraktının Enzim İnhibitör Özellikleri ve Antimikrobiyal Aktivitesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2875-2882.

To Cite: Almaz, Z. (2023). Enzyme Inhibitory Properties and Antimicrobial Activity of *Geranium tuberosum* Methanol Extract. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2875-2882.

Geranium tuberosum Metanol Ekstraktının Enzim İnhibitör Özellikleri ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Züleyha ALMAZ^{1*}

Öne Çıkanlar:

- *Geranium tuberosum* 'un kök ve yaprak kısımlarının metanol ekstraktları hazırlanmıştır.
- Her ekstrakt için antimikrobiyal aktivite ve enzim inhibitör deneyleri yapılmıştır.
- Genel olarak her iki ekstraktta güçlü aktivitelere sahiptir.

Anahtar Kelimeler:

- *Geranium tuberosum*
- Asetilkolinesteraz
- Bütirikolinesteraz
- Ksantin Oksidaz
- Antimikrobiyal

ÖZET:

Geranium tuberosum kökleri Türkiye'de bazı kırsal bölgelerde taze olarak tüketilmektedir. Bu çalışma, türün geleneksel kullanımını bilimsel olarak ta aydınlatmak için yapılmıştır. *Geranium tuberosum*'un kök ve yaprak kısımlarının enzim inhibisyon etkisi ve antimikrobiyal aktivitesi, metanolik ekstraktlar kullanılarak araştırıldı. Yaprak ekstresi, kök ekstresine göre daha yüksek asetilkolinesteraz ve butirikolinesteraz aktivitesine sahipken, kök ekstresi ksantin oksidaz enzimi üzerinde daha güçlü inhibitör etki gösterdi. Ayrıca ekstraktların antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri içi boş agar tekniği kullanılarak araştırıldı. Her iki ekstraktın da farklı bakteri suşları üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlendi. Bu sonuçlar *Geranium tuberosum*'un doğal bir antibakteriyel olduğunu ve enzim inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu doğruladı.

Enzyme Inhibitory Properties and Antimicrobial Activity of *Geranium tuberosum* Methanol Extract

Highlights:

- Methanol extracts of the root and leaf of *Geranium tuberosum* were prepared.
- Antimicrobial activity and enzyme inhibitory experiments were performed for each extract.
- Overall, both extracts had potent activities.

Keywords:

- *Geranium tuberosum*
- Acetylcholinesterase
- Butyrylcholinesterase
- Xanthine Oxidase
- Antimicrobial

ABSTRACT:

Geranium tuberosum roots are consumed fresh in some areas of the countryside of Turkey. This study was conducted to scientifically validate the traditional use of the species. The enzyme inhibition effect and antimicrobial activity of the root and leaf parts of *Geranium tuberosum* were investigated using a methanol extract. The leaf extract had higher acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity than the root extract, while the root extract showed a stronger inhibitory effect on xanthine oxidase enzyme.. Also, the antifungal and antibacterial activities of the extracts were investigated using the hollow agar technique. It was observed that both extracts gave high antimicrobial activity on different bacterial strains. These results confirmed that *Geranium tuberosum* is a natural antibacterial, and has enzyme inhibitory potential.

¹ Züleyha ALMAZ (Orcid ID: 0000-0002-4532-4311), Muş Alparslan University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Muş, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Züleyha ALMAZ, e-mail: z.turkoglu@alparslan.edu.tr

INTRODUCTION

The use of herbal medicines for therapeutic purposes on various patients has a very old history all over the world and the interest in natural treatments is increasing significantly. In addition to its use as natural medicine, edible wild plants associated with poverty and famine and seen as a last resort in these cases have now become popular in developed countries. Scientific studies on traditional species are needed in order not to lose the existing traditional knowledge about wild medicinal plants, which is transmitted only orally, to contribute to the conservation of biological diversity, and to prove the importance of these edible plants (Graça et al., 2020; Newman & Cragg, 2016). The genus *Geranium*, which is medically important and the leaves and tubers of some species can be consumed as food, includes about 400 species that are distributed in temperate regions in most of the world (İlçim et al., 2008; Şöhretoğlu et al., 2008). This number is 35 in the flora of Turkey (Şöhretoğlu et al., 2012). A significant number of *Geranium* species are used as tonic, diuretic, hemorrhoid, diabetes and antidiarrheal in folk medicine which is reported a decade ago (Sabuncuoğlu & Şöhretoğlu, 2012). Some of these features have been highlighted in various scientific studies over the past two decades. It is possible to find many studies examining the various biological characteristics of a big amount of this genus in the literature. For example, ringworm, diarrhea, hypotensive agent, central depression, cancer, cardiovascular, skin, gastrointestinal ulcers, antibacterial, and antiviral activities have been reported (Kosuge et al., 1985; Ivancheva & Stantcheva, 2000; Chalchat et al., 2002; Williamson, 2002; González-Tejero et al., 2008; Ngezahayo et al., 2015; Oh et al., 2015;).

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by a decline in learning abilities that interferes with personal activities in older people and has no clinical treatment to halt its progression (Güleç et al., 2022). AD, one of the most common causes of death in the elderly population in developed countries, gradually destroys memory and thinking skills (Anil et al., 2022). Since the most dramatic abnormalities in this disease result from loss of cholinergic conduction, they are mainly associated with changes in cholinesterase (ChE) metabolism. While acetylcholinesterases (AChE) hydrolyze acetylcholine to a large extent, butyrylcholinesterases (BChE) play a complementary role (Almaz et al., 2021). Anti-AD drugs prescribed as ChE inhibitors developed so far act by increasing acetylcholine levels by inhibiting these enzymes (Sever et al., 2021; Yaşar et al., 2021). However, since these drugs have many side effects, there is a need to develop anti-ChE drugs of natural origin (Mahmudov et al., 2022). Galantamine was the first compound to be a potent AChE inhibitor isolated from a plant source, but inhibitors such as tacrine, donepezil, and physostigmine are used synthetically (Khan et al., 2018).

Hyperuricemia associated with gout, which has a worldwide distribution, is due to the overproduction or under-excretion of uric acid. This disease, which can be prevented by lowering uric acid plasma levels, can be treated with uricosuric drugs that increase urinary excretion of uric acid or xanthine oxidase (XO) inhibitors, which block the terminal step in uric acid biosynthesis (Nguyen et al., 2004). XO catalyzes the oxidation of xanthine and hypoxanthine to uric acid. Allopurinol, an XO inhibitor used clinically in the treatment of gout, has many side effects such as nephropathy, hepatitis, and allergic reactions (Osada et al., 1993; Ishibuchi et al., 2001).

The use of herbal medicines, which is one of the elements of complementary and alternative medicine, is enhancing swiftly all around the countries. For this reason, scientific evaluation and verification of the properties of these plants, which are also used in traditional medicine, is one of the main goals. Some biological activity studies of *Geranium tuberosum* species have been informed

(Şöhretoğlu et al., 2008; Şöhretoğlu et al., 2009). The current study was planned to evaluate the antimicrobial and enzyme inhibitory activities of *G. tuberosum*, on underexplored species.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Acetylcholinesterase (AChE): lyophilisate from *Electrophorus electricus* (electric eel), Butyrylcholinesterase (BChE): lyophilisate from equine serum, Xanthine oxidase (XO): lyophilisate from bovine milk were provided from Sigma-Aldrich (St. Louise, MO), and stored at -80°C . Acetylthiocholine iodide (ASCh, substrate for the AChE inhibition assay), S-butylthiocholine iodide (BSCh, substrate for the BChE inhibition assay), Xanthine (substrate for the XO inhibition assay), DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, Ellman's reagent) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Merck and Acros Organics.

Preparation of Plant Samples

G. tuberosum samples were gathered from Elazığ province during the vegetation period in 2021 ($38^{\circ} 57' 47.0916'' \text{N}$; $38^{\circ} 38' 7.5588'' \text{E}$) (Figure 1). Classification of the collected plant samples with respect to the flora of Turkey was made by Murat Kürşat (Bitlis, Turkey). The coded (Z. Almaz: 2300) plant sample was turned into herbarium material. The roots and leaves of the plant were removed and left to dry in shade. *G. tuberosum* leaf and root were prepared in 350 mL of methanol by the Soxhlet extraction method in the central laboratory of the Muş Alparslan University. Methanol was eliminated by evaporation. The samples were tagged as methanolic leaf (*GtL*(MeOH)), methanolic root (*GtR*(MeOH)).



Figure 1. Turkey / Elazığ / Agin images by *G. tuberosum*

Determination of Enzyme Inhibition Study

The enzyme activity of XO, in which xanthine used as a substrate, was measured spectrophotometrically using a modification (Tan et al., 2022) of the protocol used by Noro by screening uric acid formation from xanthine at 294 nm (Noro et al., 1983). The inhibition of this enzyme was found by measuring the amount of uric acid, and firstly, various concentrations of the extracts were incubated

at 37°C for 10 minutes with buffer (50mM) and enzyme (0.2U). Then, the reaction was begun by adding 1 mM substrate prepared daily. The measurement of the absorption of the reaction mixture was carried out via the Agilent Cary 60 UV–Vis Spectrophotometer. The standard compound allopurinol was used for XO enzyme inhibition and the IC₅₀ value was determined by the reduction in the amount of uric acid formed. Inhibitory activities of extracts against cholinesterase enzymes were measured by comparison with the standart compound galantamine with an modification of Ellman's technique (Ellman et al., 1961) as previously expressed (Almaz et al., 2021; Köse & Gulcin, 2017). First, 1 mg of each extract was weighed and dissolved in 1 ml of DMSO, and then diluted in distilled water at different concentrations. To determine the inhibitory activity of the enzymes, 5 serial dilutions were carried out as described in the previous study (Almaz, 2023). Absorbance measurement was made within 5 minutes at 412 nm using a Thermo Fisher Scientific Multiskan Go Finland. Percent activity-[I] was plotted to decide the inhibition potential of the extracts on cholinesterases and XO. IC₅₀ values were determined by the plotted graphs.

Antimicrobial Activity Assay

The antifungal and antibacterial activities of the extracts were found by using the hollow agar method (Sagdic et al., 2003). *G. tuberosum* extracts were separately tested against *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (NCTC 5348) bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 834), *Candida albicans* (ATCC 10231) fungi. The bacterial and fungal strains investigated in this work were provided by Yusuf ALAN in Bitlis Eren University. For this purpose, the tested microbial strains were cultured overnight in Nutrient Broth medium at 37 °C and in Sabourand 2% Glucose Broth at 27 °C, respectively. Then, these media were rushed into petri dishes. 9 mm diameter wells were opened in agar after the medium had solidified. Extracts prepared at concentrations of 40 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL dissolved in DMSO were filled into the wells and the petri dishes were incubated for 24 hours at 37 °C and 48 hours at 27 °C for bacterial and fungal strains, respectively (Aras et al., 2018). The diameters average inhibition zones formed were measured after repeating the assay for three times. The inhibition zone values were compared with 5 different standard antibiotic discs used as controls (erythromycin (15), gentamicin (10), amikacin (30), ampicillin (10), and fluconazole) to compare the antimicrobial activities of the extracts.

Statistical Analyses

The antimicrobial activity results determined by the zone diameters formed were compared among themselves with standard antibiotics (Erythromycin, Ampicillin, Gentamicin, Amikacin, and Fluconazole) by using Tukey's Multiple Comparison and t-test after One-Way ANOVA. Those with $p > 0.05$ were not considered statistically significant and $p < 0.05$ were considered statistically significant. The statistical significance levels are designated with the symbol “*” as follows: $p > 0.05$; ns, $0.01 > p < 0.05$; *, $0.001 > p < 0.01$; **, $0.0001 > p < 0.001$; ****.

RESULTS AND DISCUSSION

Discovering and identifying inhibitors of natural catalysts required for all biochemical processes is the first phase of drug discovery research. A healthy human body has normal levels of enzymes, but when enzymes are overexpressed, abnormal biological processes can occur. Due to the negative side effects of synthetic drugs, the importance of medicinal plants is increasing day by day. Plant-derived inhibitors are being studied because of the significant enzyme inhibition potential of compounds isolated from plants (Bayrak et al., 2020; Öztürk et al., 2022). The activity of enzymes related to Alzheimer's

disease (AChE) and (BChE) and Gout disease (XO) of *G. tuberosum* methanolic extracts were studied and the results are given in Table 1.

Table 1. Anticholinesterase and Xanthine oxidase activity of *G. tuberosum* extracts

<i>G. tuberosum</i> Extracts	AChE		BChE		XO	
	IC ₅₀ value	R ²	IC ₅₀ value	R ²	IC ₅₀ value	R ²
<i>GtL</i> (MeOH)	4.03	0.904	7.81	0.928	7.46	0.911
<i>GtR</i> (MeOH)	4.72	0.947	8.44	0.918	4.38	0.904
Galantamine	0.198	0.978	1.734	0.967		
Allopurinol					1.102	0.978

*Galantamine was used as positive control for AChE and BChE enzymes and allopurinol was used as positive control for XO enzyme and determined as µg/mL levels. The enzyme inhibitory activity of the extracts was tested at a concentration of 1 mg/mL

Anticholinesterase activities of *G. tuberosum* extracts were calculated by their inhibitory capacity on AChE and BChE enzymes as mentioned. According to the data of the study, it was found that the extracts showed strong AChE and BChE inhibitory effects. It was found that the methanol leaf extract had the highest IC₅₀ values for AChE and BChE, and these values were calculated as 4.03 (r²: 0.904) and 7.81 (r²: 0.928), respectively. When the IC₅₀ values for AChE and BChE of the standard molecule galantamine were calculated as 0.198 (r²: 0.978) and 1.734 (r²: 0.967), it was observed that extracts exhibited moderate anticholinesterase activity. In the study with *Geranium pyrenaicum* Burm. f., it was found that it showed high anti-AChE (4.49 mg GALAE/g) activity with ethyl acetate and methanol extract, and strong anti-BChE (12.26 mg GALAE/g) activity with ethyl acetate extract. ChE inhibitory activity was expressed as galantamine equivalents (mgGALAE/g extract) (Świątek et al., 2021).

In addition, the extracts were compared with allopurinol, a standard XO inhibitor widely used in the treatment of gout, and it was found to have moderate inhibitory activity. It was determined that root extract 4.38 (r²: 0.904) showed more effective inhibition against XO enzyme than leaf extract 7.46 (r²: 0.911). In the study examining the XO inhibitory effect of polyphenolic compounds extracted from *Geranium sibiricum*, they reported that the IC₅₀ values were lower than the standard allopurinol and in the range of 0.87 to 2.53 µM (Wu et al., 2010). It was determined that xanthine oxidase inhibition of ellagic acid obtained from *Geranium wilfordii* Maxim was higher than that of allopurinol (Liu, Mei, Xiao, & Liu, 2020).

The effects of the antibiotics used for control purposes on microorganisms are given in Table 2. The antimicrobial activities of *GtL*(MeOH) and *GtR*(MeOH) extracts of *G. tuberosum* against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* microorganisms were determined in mm (Table 3).

Table 2. Antimicrobial effects of antibiotic discs on test microorganisms

*MIC.	Erythromycin (15 µg)	Ampicillin Sulbactam (10 µg)	Gentamicin (10 µg)	Amikacin (30 µg)	Fluconazole (25 µg)	
GR + bacteria	B1	30.33±0.57	30.33±0.57	15.00±1.00	20.67±0.57	0.00±0.00
	B2	10.67±1.52	12.67±0.58	10.67±0.58	13.33±0.57	0.00±0.00
	B3	7.50±0.50	14.00±0.00	8.00±0.00	7.50±0.50	0.00±0.00
	B4	0.00±0.00	0.00±0.00	13.33±0.58	15.33±0.58	0.00±0.00
	B5	0.00±0.00	0.00±0.00	15.33±0.57	22.00±1.00	0.00±0.00
	B6	10.33±0.58	0.00±0.00	15.00±1.00	15.67±0.58	0.00±0.00
Fungus	F7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	30.33±0.58
	F8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	25.33±0.57

* B1: *S. aureus*; B2: *E. faecalis*; B3: *L. monocytogenes*; B4: *E. coli*; B5: *P. aeruginosa*; B6: *K. pneumoniae*; F7: *C. albicans*; F8: *S. cerevisiae*, * Diameter of standard discs 5mm

Among the extracts, it was found that the methanol extract indicated high antimicrobial activity against gram-negative bacteria, *E. coli* (30.33±0.57), *P. aeruginosa* (27.67±1.52), and *K. pneumoniae* (30.67±0.57). However, this extract did not show antibacterial activity against *E. faecalis* and *L. monocytogenes*. It was determined that the *GtL*(MeOH) extract exhibited better antibacterial activity against *S. aureus* (25.33±1.52) and *GtR*(MeOH) extract against *E. faecalis* (23.33±0.58), which are Gram-positive bacteria. It was determined that *GtR*(MeOH) extract indicated the best activity against *E. faecalis* (23.33±0.58) and it was determined that this extract showed high antibacterial activity against this bacterium than all antibiotics $p < 0.001$ (highly important).

No activity against *L. monocytogenes* and fungi was observed in any of the two extracts. In addition, it was observed that the activities of the extracts increased depending on the increasing concentration in general. It was determined that *GtL*(MeOH) extract showed high antibacterial activity against *K. pneumoniae* bacteria than all antibiotics ($p < 0.001$).

Table 3. Effect of *G. tuberosum* extracts on test microorganisms

*MIC.		<i>GtL</i> (MeOH)			<i>GtR</i> (MeOH)		
		40 µg/mL	80 µg/mL	100 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL	100 µg/mL
GR (+) bacteria	B1	18.00±0.00 ^{eeede}	20.33±0.57 ^{eeae}	25.33±1.52 ^{ddede}	15.33±0.58 ^{eeae}	21.00±1.00 ^{eeae}	25.00±1.00 ^{eeede}
	B2	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	14.67±0.58 ^{ebae}	20.33±0.58 ^{eeeee}	23.33±0.58 ^{eeeee}
	B3	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}
	B4	19.33±1.15 ^{eeeee}	29.00±2.00 ^{eeeee}	30.33±0.57 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{aeaa}	15.00±1.00 ^{eeae}	21.00±0.00 ^{eeeee}
GR (-) bacteria	B5	15.33±0.57 ^{eeae}	25.33±1.53 ^{eeeee}	27.67±1.52 ^{eeeee}	14.33±0.58 ^{eeae}	20.33±1.52 ^{eeae}	24.33±0.57 ^{eebe}
	B6	17.00±1.00 ^{ebae}	26.67±1.15 ^{eeeee}	30.67±0.57 ^{eeeee}	0.00±0.00 ^{eeeee}	14.67±0.57 ^{eeae}	25.00±1.00 ^{eeeee}
	F7	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}
Fungus	F8	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}	0.00±0.00 ^{aaaae}

* MIC: Microorganisms; GR+ (GR positive), GR- (GR negative), B1: *S. aureus*; B2: *E. faecalis*; B3: *L. monocytogenes*; B4: *E. coli*; B5: *P. aeruginosa*; B6: *K. pneumoniae*; F7: *C. albicans*; F8: *S. cerevisiae*; ns: a; *: b; **: c; ***: d; ****: e

In a study in which the antimicrobial activity of *Geranium thunbergii* was investigated using the minimum inhibitory concentration (MIC) test and the paper disc method, it was reported that the ethyl acetate fraction showed higher antimicrobial activity than the others with the inhibition zone diameters ranging from 13.33 to 15.67 mm. *S. aureus* bacterial strain (15.67±1.04) showed the highest antimicrobial activity, which is similar to the current study (Kwon et al., 2017). It was reported that the leaf extract of *G. macrorrhizum* was not susceptible to pathogenic *C. albicans* (Radulović et al., 2012). A group of researchers examined the antimicrobial effect of *G. wallichianum* and found that the ethyl acetate extract showed a strong effect against *K. pneumoniae* bacteria with a value of 25 µg/ml, but showed less antimicrobial activity against fungal strains such as *C. albicans* (Mir et al., 2022).

CONCLUSION

The genus *Geranium* includes species with scientifically documented biological activities, well known for their traditional uses worldwide. In addition, it develops information about antimicrobial and enzyme-inhibitory effects. However, in order to benefit from these traditional plants medicinally, it is necessary to evaluate the properties of different extracts and support them with in vitro and in vivo studies. Wild plants can be considered a source of with functional properties, not only for their pharmacological properties but also for applications in the food industry. Therefore, more reliable information is needed for their safety and effectiveness. The data from the present study suggest that in the future this plant may serve as fundamental scientific research data for its possible use as a natural source of antibacterial, anticholinesterase, and xanthine oxidase inhibitors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author is thankful to MAUN (Mus Alparslan University, Muş, Turkey) for providing laboratory facilities

Conflict of Interest

The author declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Almaz, Z. (2023). Investigation of biological activities of various 1, 2, 3-triazole compounds: Their effects on cholinesterase enzymes, determination of antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(3), e23277.
- Almaz, Z., Oztekin, A., Tan, A., & Ozdemir, H. (2021). Biological evaluation and molecular docking studies of 4-aminobenzohydrazide derivatives as cholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1244, 130918.
- Anil, D. A., Aydin, B. O., Demir, Y., & Turkmenoglu, B. (2022). Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel 1H-1, 2, 3-Triazole derivatives as potent inhibitors of carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and aldose reductase. *Journal of Molecular Structure*, 1257, 132613.
- Aras, A., Bursal, E., Alan, Y., Turkan, F., Alkan, H., & Kılıç, Ö. (2018). Polyphenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activity of *Satureja boissieri*. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 37(6), 209-219.
- Bayrak, S., Öztürk, C., Demir, Y., Alım, Z., & Küfreviöglü, Ö. İ. (2020). Purification of polyphenol oxidase from potato and investigation of the inhibitory effects of phenolic acids on enzyme activity. *Protein and peptide letters*, 27(3), 187-192.
- Chalchat, J.-C., Petrovic, S., Maksimovic, Z., & Gorunovic, M. (2002). A comparative study on essential oils of *Geranium macrorrhizum* L. and *Geranium phaeum* L., Geraniaceae from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 14(5), 333-335.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- González-Tejero, M., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C., Ramiro-Gutiérrez, J., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., . . . Della, A. (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 341-357.
- Graça, V. C., Ferreira, I. C., & Santos, P. F. (2020). Bioactivity of the *Geranium* genus: a comprehensive review. *Current Pharmaceutical Design*, 26(16), 1838-1865.
- Güleç, Ö., Türkeş, C., Arslan, M., Demir, Y., Yeni, Y., Hacımüftüoğlu, A., . . . Beydemir, Ş. (2022). Cytotoxic effect, enzyme inhibition, and in silico studies of some novel N-substituted sulfonyl amides incorporating 1, 3, 4-oxadiazol structural motif. *Molecular Diversity*, 26(5), 2825-2845.
- İlçim, A., Dadandı, M. Y., & Çenet, M. (2008). Morphological and Palynological Studies on *Geranium tuberosum* L. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(3), 69-73.
- Ishibuchi, S., Morimoto, H., Oe, T., Ikebe, T., Inoue, H., Fukunari, A., . . . Naka, Y. (2001). Synthesis and structure-activity relationships of 1-phenylpyrazoles as xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(7), 879-882.
- Ivancheva, S., & Stantcheva, B. (2000). Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 165-172.
- Khan, H., Amin, S., Kamal, M. A., & Patel, S. (2018). Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 860-870.
- Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K., Yamamoto, T., Ni, M. Y., & Yan, S. C. (1985). Studies on antitumor activities and antitumor principles of Chinese herbs. I. Antitumor activities of Chinese herbs. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 105(8), 791-795.
- Köse, L. P., & Gulcin, I. (2017). Inhibition effects of some lignans on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Rec. Nat. Prod*, 11(6), 558-561.
- Kwon, T.-H., Lee, S.-J., Park, J.-H., Kim, T., Park, J.-J., & Park, N.-H. (2017). Antimicrobial activity and protective effect of *Geranium thunbergii* against oxidative DNA damage via antioxidant effect. *Korean Journal of Food Preservation*, 24(3), 325-333.
- Liu, Y., Mei, S., Xiao, A., & Liu, L. (2020). Xanthine Oxidase Inhibitors Screening, Antioxidation, and DNA Protection Properties of *Geranium wilfordii* Maxim. *eFood*, 1(2), 147-155.
- Mahmudov, I., Demir, Y., Sert, Y., Abdullayev, Y., Sujayev, A., Alwasel, S. H., & Gulcin, I. (2022). Synthesis and inhibition profiles of N-benzyl-and N-allyl aniline derivatives against carbonic anhydrase and acetylcholinesterase—A molecular docking study. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 103645.

- Mir, W. R., Bhat, B. A., Rather, M. A., Muzamil, S., Almilaibary, A., Alkhanani, M., & Mir, M. A. (2022). Molecular docking analysis and evaluation of the antimicrobial properties of the constituents of Geranium wallichianum D. Don ex Sweet from Kashmir Himalaya. *Scientific reports*, 12(1), 12547.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.
- Ngezahayo, J., Havyarimana, F., Hari, L., Stévigny, C., & Duez, P. (2015). Medicinal plants used by Burundian traditional healers for the treatment of microbial diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 338-351.
- Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Le Tran, Q., Watanabe, H., & Kadota, S. (2004). Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(9), 1414-1421.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A., & Fukushima, S. (1983). Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of Daphne genkwa. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31(11), 3984-3987.
- Oh, J.-Y., Lee, K.-J., Wei, B., Roh, J.-H., Kang, M., Cha, S.-Y., & Jang, H.-K. (2015). Antibacterial activities of bark extracts from Fraxinus rhynchophylla Hance and Geranium koreanum Kom. against clinical strains of Clostridium perfringens in chickens. *Korean Journal of Veterinary Research*, 55(2), 117-123.
- Osada, Y., Tsuchimoto, M., Fukushima, H., Takahashi, K., Kondo, S., Hasegawa, M., & Komoriya, K. (1993). Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *European journal of pharmacology*, 241(2-3), 183-188.
- Öztürk, C., Bayrak, S., Demir, Y., Aksoy, M., Alim, Z., Özdemir, H., & İrfan Küfrevioğlu, Ö. (2022). Some indazoles as alternative inhibitors for potato polyphenol oxidase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(5), 2249-2256.
- Radulović, N. S., Stojković, M. B., Mitić, S. S., Randjelović, P. J., Ilić, I. R., Stojanović, N. M., & Stojanović-Radić, Z. Z. (2012). Exploitation of the antioxidant potential of Geranium macrorrhizum (Geraniaceae): hepatoprotective and antimicrobial activities. *Natural product communications*, 7(12), 1934578X1200701218.
- Sabuncuoğlu, S., & Şöhretoğlu, D. (2012). Evaluation of antihemolytic and antioxidant activities of Geranium tuberosum subsp. tuberosum with in vitro models. *Pharmaceutical biology*, 50(11), 1374-1379.
- Sagdic, O., Karahan, A., Ozcan, M., & Ozkan, G. (2003). Note: effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Science and Technology International*, 9(5), 353-358.
- Sever, B., Türkeş, C., Altıntop, M. D., Demir, Y., Akalın Çiftçi, G., & Beydemir, Ş. (2021). Novel metabolic enzyme inhibitors designed through the molecular hybridization of thiazole and pyrazoline scaffolds. *Archiv der Pharmazie*, 354(12), 2100294.
- Świątek, Ł., Sieniawska, E., Sinan, K. I., Maciejewska-Turska, M., Boguszevska, A., Polz-Dacewicz, M., . . . Mahomoodally, M. F. (2021). LC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis, Cytotoxic, Antiviral, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Properties of Four Extracts of Geranium pyrenaicum Burm. f.: A Good Gift from the Natural Treasure. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7621.
- Şöhretoğlu, D., Ekizoğlu, M., Özalp, M., & Sakar, M. K. (2008). Free radical scavenging and antimicrobial activities of some Geranium species. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*(2), 115-124.
- Şöhretoğlu, D., Sakar, M. K., Sabuncuoğlu, S. A., Özgüneş, H., Duman, H., & Sterner, O. (2012). Antioxidant secondary metabolites from Geranium lasiopus Boiss. & Heldr. *Natural product research*, 26(13), 1261-1264.
- Şöhretoğlu, D., Sakar, M. K., Sabuncuoğlu, S. A., Özgüneş, H., & Sterner, O. (2009). Antioxidant galloylated flavonoids from Geranium tuberosum L. subsp. tuberosum. *Turkish journal of chemistry*, 33(5), 685-692.
- Tan, A., Kizilkaya, S., Noma, S. A., Ates, B., & Kara, Y. (2022). Novel hybrid isoindole-1, 3 (2H)-dione compounds containing a 1H-tetrazole moiety: Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, e23015.
- Williamson, E. M. (2002). Use of Geranium species extracts as herbal medicines. In *Geranium and Pelargonium* (pp. 52-58): CRC Press.
- Wu, N., Zu, Y., Fu, Y., Kong, Y., Zhao, J., Li, X., . . . Efferth, T. (2010). Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from Geranium sibiricum L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 4737-4743.
- Yaşar, Ü., Gönül, İ., Türkeş, C., Demir, Y., & Beydemir, Ş. (2021). Transition-metal complexes of bidentate Schiff-Base ligands: In vitro and in silico evaluation as non-classical carbonic anhydrase and potential acetylcholinesterase inhibitors. *ChemistrySelect*, 6(29), 7278-7284.

Atf İçin: Doğan, S., ve Yağmur, S. (2023). Kademeli Bir Dalgıç Pompa Performansının Deneysel ve Sayısal Olarak Karşılaştırılması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2883-2891.

To Cite: Doğan, S., & Yağmur, S. (2023). Experimental and Numerical Comparison of the Multistage Submersible Pump Performance. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2883-2891.

Kademeli Bir Dalgıç Pompa Performansının Deneysel ve Sayısal Olarak Karşılaştırılması

Sercan DOĞAN^{1*}, Sercan YAĞMUR¹

Öne Çıkanlar:

- Dalgıç pompa hidrolik performansı HAD yöntemi ile incelenmiştir
- Realizable k-ε türbülans modeli deneysel çalışma ile doğrulanmıştır

Anahtar Kelimeler:

- Dalgıç
- Pompa,
- HAD,
- Difüzör,
- Realizable
- K-ε

ÖZET:

Bu çalışmada bir dalgıç pompa performansının deneysel ve sayısal analiz çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle performans deneyleri firmada bulunan test düzeneğinde en verimli çalışma noktası 140 m³/h debi olan dört kademeli bir pompa ile yapılmıştır. Daha sonra Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği ile aynı pompanın dört kademeli modeli için sayısal çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada farklı debiler için pompaya ait basma yüksekliği ve verim değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, sayısal analiz sonuçları için pompa kesitinde meydana gelen hız ve basınç değişimleri görsel olarak sunulmuştur. Sonuç olarak, dalgıç pompa optimum çalışma noktası olan 140 m³/h debide, deneysel ve sayısal sonuçlar arasındaki fark basma yüksekliğinde yaklaşık %3.15 mertebesinde iken, verimde %9 civarındadır. Literatüre kazandırılan sonuçlar verim ve basma yüksekliği eğrilerinin birbirleri benzerliği nedeniyle ticari ve akademik çalışmalarda doğrulama amaçlı kullanılacak niteliktedir.

Experimental and Numerical Comparison of the Multistage Submersible Pump Performance

ABSTRACT:

In this study, experimental and numerical analysis studies of a submersible pump performance were carried out. First of all, the performance tests were carried out with a four-stage pump with the most efficient operating point of 140 m³/h in the test setup in the company. Then, numerical studies were made for the four-stage model of the same pump with Computational Fluid Dynamics. In the study, the head and efficiency values of the pump were calculated for different flow rates. In addition, the velocity and pressure changes in the pump section are presented visually for the numerical analysis results. As a result, at 140 m³/h flow rate, which is the optimum operating point of the submersible pump, the difference between the experimental and numerical results is about 3.15% in head, while it is around 9% in efficiency. The results brought to the literature are of the quality to be used for validation in commercial and academic studies due to the similarity of efficiency and head curves.

Highlights:

- The hydraulic performance of the submersible pump was investigated by CFD method
- The realizable k-ε turbulence model was validated by experimental study.

Keywords:

- Submersible
- Pump,
- CFD,
- Diffuser,
- Realizable
- K-ε.

¹Sercan DOĞAN ([Orcid ID:0000-0002-8665-8924](https://orcid.org/0000-0002-8665-8924)), Sercan YAĞMUR ([Orcid ID: 0000-0002-5478-5451](https://orcid.org/0000-0002-5478-5451)), Konya Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Konya, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sercan DOĞAN, e-mail: sercandogan@ktun.edu.tr

GİRİŞ

Dünyadaki nüfus artışına bağlı olarak, kırsal bölgelerdeki tarım arazilerinin sulanması, endüstrideki su talebinin artması ve insanların yaşam konforunun artışı nedeniyle yeraltı su seviyelerinin düştüğü bilinmektedir (Gölcü ve ark., 2008). Bu nedenle dalgıç pompalar, su temini ve zirai sulama işlemlerinin yanı sıra jeotermal kaynakların yeryüzüne çıkarılması için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu pompalar çok kademeli santrifüj pompalardan farklı olarak, sınırlı ve belirli bir radyal boyutta tasarlanarak derin kuyulardan büyük miktarda akışkanın yeryüzüne çıkarılmasını sağlamaktadırlar (Vidoza ve ark. 2019). Çalışma alanı dikkate alındığında, dalgıç pompalar akışın kademeler arasında ilerlemesi için özel tasarımlara sahiptirler. Bu nedenle de pompa veriminin artırılmasının yanı sıra üretim kısıtlamalarının da önemli ölçüde dikkate alınması gerekmektedir.

Geleneksel imalat yöntemleriyle üretilen pompa performansları deneysel yöntemlerle belirlenmektedir. Bu durum hem tasarım ve imalat sürecini artırmakta hem de gelişen endüstri ile rekabet ortamını olumsuz etkilemektedir. Bu sebeple deneysel çalışmalar ile doğrulanmış Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (HAD) yöntemi pompa tasarımı, performans tahmini ve akış yapısının incelenmesi için son zamanlarda alternatif bir araştırma-geliştirme yöntemi olarak kullanılmaktadır (El-Emam ve ark., 2022). Yaygın olarak kullanılan türbülans modellerinin doğruluğu ve farklı uygulamalara uygulanabilirliği nedeniyle türbülanslı akış yapısı, ikincil akış, viskoz kayıp modellenmesi, iki fazlı akış ve kavitasyon nedeniyle pompalardaki akışın karmaşıklığı kolayca modellenilebilmekte, tasarımına ait parametreler kolaylıkla değiştirebilmekte ve akış görselleştirilebilmektedir (Bai ve ark., 2022).

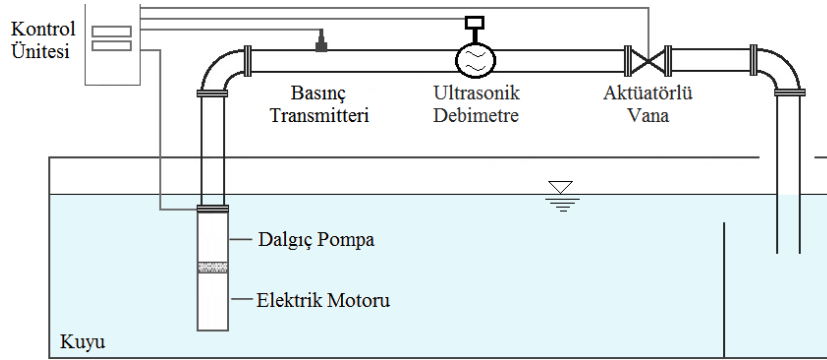
Dalgıç pompalar üzerinde yapılan çalışmalar literatürde genellikle pompa çarkı ve difüzörü üzerinde yapılan geometrik değişiklikler ile performans artırmaya yönelik olmuştur. Zhou ve ark., (2012) yaptıkları çalışmada difüzör tipinin pompa performansına etkisini deneysel ve sayısal olarak incelemişlerdir. Standart k- ω türbülans modelinin kullanıldığı analizlerin deneysel sonuçlar ile uyumlu olduğunu, pompa basma yüksekliği ve verimdeki farkın %5'ten az olduğunu belirlemişlerdir. Yang ve ark., (2021) yaptıkları çalışmada 3 kademeli bir dalgıç pompanın her bir kademesindeki çarkı ve difüzör boyunca basınç değişimini sayısal ve deneysel olarak incelemişlerdir. SST k- ω türbülans modelinin kullanıldığı analizlerde, birinci kademedeki basınç dalgalanmalarının deneysel ve sayısal sonuçlarda yakın çıkmasına rağmen ikinci ve üçüncü çarkta basınç değişiminin benzer yapıda olduğunu ama az da olsa farklılıkların olduğunu belirtmişlerdir. Bai ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada, diğer parametreleri sabit tutarak çark ve difüzör üzerindeki kanat sayısını farklı kombinasyonlarda değiştirerek sayısal analiz ile incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda çark kanat sayısının difüzör kanat sayısından daha düşük olduğu durumlarda pompa veriminin daha yüksek çıktığını vurgulamışlardır. İnceledikleri kombinasyonlar içerisinde çark kanat sayısının yedi ve difüzör kanat sayısının sekiz olduğu durumda dalgıç pompa performansının en yüksek çıktığını belirtmişlerdir. Sirino ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada, akışkan viskozitesinin pompa performansına etkisini sayısal olarak araştırmışlardır. Akışkan viskozitesi arttıkça deneysel ve sayısal sonuçlar arasındaki farkın arttığını ve pompa performansının düştüğünü belirtmişlerdir. Stel ve ark., (2015), SST k- ω türbülans modeli kullanarak yaptıkları analizlerde, kademe sayısının analiz sonuçlarının doğruluğuna etkisini incelemişlerdir. Tek kademeli yapılan analizlerde sınır şartına bağlı olarak analiz sonuçlarının deney sonuçları ile uyuşmadığını belirtmişlerdir. Analiz sonuçlarının deneysel sonuçlar ile uyuşması için kademe sayısının artırılması gerektiğini vurgulamışlardır. Ayrıca, her bir kademedeki akış yapısının aynı olmadığını belirtmişlerdir.

Literatürde yapılan araştırmalar neticesinde dalgıç pompalara ait analizlerde farklı parametrelerin incelendiği görülmüştür. Mevcut çalışma kapsamında da dört kademeli, 140 m³/h optimum çalışma noktasına sahip ve 8" çapındaki derin kuyuda kullanılan bir dalgıç pompa serisi için farklı debilerde sayısal analiz sonuçları ile deneysel sonuçlar karşılaştırılmıştır. Ayrıca, sayısal analiz sonuçları için pompa içerisindeki basınç ve hız dağılımına ait akış görüntüleri de sunulmuştur.

MATERYAL VE METOT

Deneysel Yöntem

ISO 9906 standardına göre Nemutlu Pompa A.Ş.'de kurulan ve dalgıç pompa performans testlerinin yapıldığı deney düzeneğinin şematik görünümü Şekil 1'de verilmiştir. Özgün tasarıma sahip 8" derin kuyu içerisinde çalışan çarkı ve difüzörü hassas döküm ile üretilmiş dört kademeli bir dalgıç pompa açık sistem kapalı devre deney düzeneğinde test edilmiştir. Deneysel çalışmada 6 kanatlı bir çark ve 8 kanatlı bir difüzörü olan pompa kullanılmıştır. Dalgıç pompa, yaklaşık 5 m derinliğindeki kuyuya indirilen 2810 d/dk'da çalışan bir elektrik motoru tarafından tahrik edilmiştir. Deney düzeneğinde ISO standardında da belirtildiği gibi pompa çıkışında dirsekten sonra hassasiyeti ±%0.5 olan KROHNE marka ultrasonik debi ölçer ve ±%0.5 hassasiyete sahip MICROSENSOR marka MPM489 model basınç sensörü kullanılmıştır. Ayrıca, deneyler esnasında su sıcaklığı yaklaşık 15°C olarak ölçülmüştür ve sayısal çalışmalarda da aynı değer için analizler yapılmıştır.



Şekil 1. Dalgıç pompa deney seti şematik görünümü

Elektrik motoru ve pompa birlikte suya daldırıldığı için motor çıkış gücü (mil gücü, \dot{W}_{mil}) doğrudan bir tork ölçer ile ölçülememektedir. Debi değerlerini değiştirmek için elektrik kontrollü aktüatörlü bir vana kullanılmıştır. Aktüatörlü vana kontrolü ile farklı debilerde pompa çıkış basıncı ölçülerek sistem üzerinden kaydedilmektedir. Ölçülen basınç farkı (ΔP) ve debi değeri (\dot{Q}) ile pompa hidrolik verimi (η_{pompa}) aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır. Ayrıca, pompa devir sayısı deney sistemi üzerindeki bir invertör aracılığıyla kontrol edilmektedir.

$$\eta_{pompa} = \frac{\Delta P \dot{Q}}{W_{mil}} \quad (1)$$

Bu denkleme göre ölçülen debi ve basınç farkına bağlı olarak belirsizlik analizi;

$$w_{\eta} = \pm \left[\left(\frac{\partial \eta}{\partial \dot{Q}} w_{\dot{Q}} \right)^2 + \left(\frac{\partial \eta}{\partial \Delta P} w_{\Delta P} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

eşitliği ile hesaplanmıştır (Holman, 2001). Burada $w_{\dot{Q}}$ ve $w_{\Delta P}$ sırasıyla debi ve basınç ölçümünde kullanılan cihazların hassasiyetini ifade etmektedir. Bu denkleme göre en verimli çalışma noktası olan 140 m³/h debi için belirsizlik değeri %8.36 olarak hesaplanmıştır.

Sayısal Modelleme

Sayısal analizler, dört kademeden oluşan dalgıç pompa geometrisi üzerinde Reynolds ortalama Navier-Stokes (RANS) denkleminin çözülmesine dayanmaktadır. ANSYS-Fluent (ANSYS, 2015) programının kullanıldığı dört kademeli dalgıç pompa analizinde akışın daimi, sıkıştırılamaz ve türbülanslı olduğu kabul edilmiştir. Akış çözümü için kullanılan kütle korunumu ve momentum denklemleri aşağıdaki gibi verilmiştir.

Kütle korunumu;

$$\frac{\partial}{\partial x_i} (\bar{u}_i) = 0 \quad (3)$$

Momentum denklemi;

$$\frac{\partial}{\partial x_i} (\bar{u}_i \bar{u}_j) = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial \bar{p}}{\partial x_j} + \frac{\partial \tau_{ij}}{\partial x_j} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\nu \frac{\partial \bar{u}_j}{\partial x_j} \right) \quad (4)$$

Burada u_i ve u_j , kartezyen koordinatlardaki hız bileşenlerini, ρ akışkanın yoğunluğunu, p akışkanın basıncını, τ_{ij} türbülans gerilmesini ve ν ise akışkanın kinematik viskozitesini göstermektedir.

Türbülanslı akış yapısını modellemek için farklı uygulamalarda da kullanılan en yaygın türbülans modellerinden biri olan realizable k- ϵ türbülans modeli kullanılmıştır. Türbülans kinetik enerjisi terimi k , türbülans kinetik enerjisinin yitim oranı ise ϵ ile ifade etmektedir. Realizable k- ϵ türbülans modeli akış fiziği çerçevesinde, normal gerilmeler üzerinde belirli matematiksel sınırlamalar içermektedir (Shih *et al.* 1995). Bu nedenle k- ϵ türbülans modelinin diğer türevlerinden farklıdır. Türbülans kinetik enerji terimi ve yitim oranı için taşınım denklemleri aşağıdaki gibi verilmiştir.

$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho k) + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho k u_i) = \frac{\partial}{\partial x_i} \left[\mu \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + G_k - \rho \epsilon + S_k \quad (5)$$

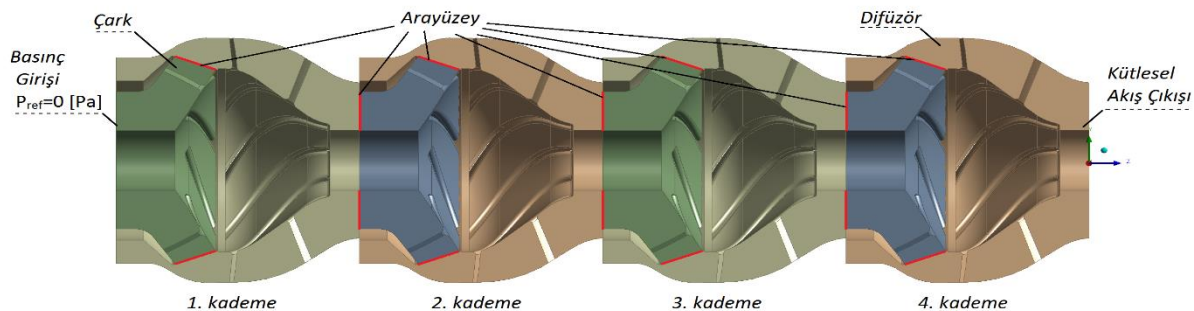
$$\frac{\partial}{\partial t} (\rho \epsilon) + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho \epsilon u_i) = \frac{\partial}{\partial x_i} \left[\mu \frac{\partial \epsilon}{\partial x_j} \right] + \rho C_1 S_\epsilon - \rho C_2 \frac{\epsilon^2}{k + \sqrt{\nu \epsilon}} + S_\epsilon \quad (6)$$

$$C_1 = \max \left[0.43, \frac{\eta}{\eta + 5} \right] \quad (7)$$

Burada G_k , ortalama hız gradyanlarından dolayı türbülans kinetik enerjinin üretimini ifade etmektedir. S_k ve S_ϵ kullanıcı tanımlı kaynak terimlerini, $C_2 = 1.9$, $\sigma_k = 1.0$ ve $\sigma_\epsilon = 1.2$ Shih ve diğ., (1995) tarafından hesaplanan denklem sabitlerini ifade etmektedir.

Akış Hacmi ve Sınır Şartları

Sayısal yöntem ile analiz yapmak için öncelikle geometri modülünde pompadan akış hacmi çıkarılmıştır. Çıkarılan akış hacmi sabit eleman olarak tanımlanan difüzör ve dönen eleman çarktan oluşmaktadır. Ayrıca kademeler arasında bağlantı kurmak amacıyla ara yüzey oluşturulmuştur. Dört kademeli pompa için oluşturulan akış hacmi ve sınır şartları Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Kademeli pompa için akış hacmi ve sınır şartları

Her kademedeki dönen elemanı simüle etmek amacıyla çark bölgesi için dönel akış hacmi tanımlaması yapılmıştır. Dönel akış hacmi için uygulamadaki ile aynı olacak şekilde devir sayısı 2810 d/dk olarak girilmiştir. İlk kademedeki emme ağzına atmosfer basıncı, giriş sınır şartı olarak tanımlanmıştır. Dördüncü kademedeki çıkışta ise kütleli debi çıkış sınır şartı tanımlanmıştır. Kütleli debiler 26.4-55.6 kg/s arasında değiştirilerek çalışmalar yapılmıştır. Aynı zamanda çözümleme için kullanılan sınır şartları Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Sayısal analizler için sınır şartları

Konum	Sınır Şartı Tipi	Sınır Şartı
Giriş	Basınç girişi	$P_{ref} = 0$ Pa
Çıkış	Kütleli akış çıkışı	26.4 - 55.6 kg/s
Çark hacmi	Dönel akış hacmi	2810 dev/dk
Difüzör hacmi	Sabit akış hacmi	-
Çark yan duvarları	Kaymama koşulu duvar	Hacimle birlikte dönel yüzey
Difüzör yan duvarları	Kaymama koşulu duvar	-
Dönel ve sabit hacim arasındaki temas yüzeyi	Ara-yüz	Eş yüzey

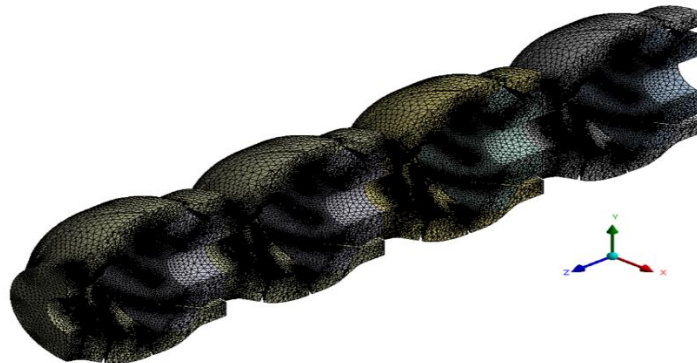
Basınç ve hız eşleşme çözümlerinde “coupled” algoritması kullanılmıştır. Momentum ve basınç denklemlerini ayırklaştırmak için ikinci mertebeden sonlu farklar şeması kullanılmıştır. Akış alanı çözümleri için yakınsama değerleri 10^{-4} mertebesine kadar elde edilmiştir. Analizlerde, giriş ve çıkış arasındaki basınç farkı alan ağırlıklı ortalama yüzey integral modülü ile hesaplanmıştır. Ayrıca çarklar için moment değerleri okunarak hidrolik verimler hesaplanmıştır.

Akış hacmi oluşturulan kademeli dalgıç pompa modeli için ağ yapısı ANSYS-Meshing modülünde yapısal olmayan tetrahedron elemanlardan Şekil 3’te görüldüğü gibi oluşturulmuştur. Boyut olarak küçük olan geçiş bölgeleri ve akış çözümlemesinin kritik olduğu kısımlarda daha detaylı ağ tipi kullanılmıştır.

Çizelge 2’de verilen ağdan bağımsızlaştırma çalışmasında da görüldüğü gibi $2.5 \cdot 10^6$ ile $10.4 \cdot 10^6$ arasında hücre sayısı elde edilmiştir. Akış çözümlerinin ağdan bağımsız hale geldiği durumun tespiti için deneysel sonuçlarda pompanın en verimli çalışma debisi $140 \text{ m}^3/\text{h}$ ’te basma yüksekliği ve verim değerleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre $7.2 \cdot 10^6$ eleman sayısından sonra basma yüksekliğinin yaklaşık %2.2 kadar birbirinden farklılık gösterdiği, verim değerlerinde ise farklılığın %1’in altında olduğu tespit edilmiştir ve bu durum akış çözümlemesi için kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan bu eleman sayısı için yapılan çözümleme sonucunda ortalama y^+ değeri yaklaşık 0.79, en yüksek y^+ değeri de 5.18 olarak elde edilmiştir.

Çizelge 2. Akış hacmi için ağ yapısından bağımsızlaştırma

Eleman Sayısı ($\cdot 10^6$)	2.5	4.1	7.2	8.4	10.4
Basma Yüksekliği (mSS)	53.6	56.9	63.5	64.7	64.9
Verim (%)	69.33	74.67	79.49	79.71	79.28



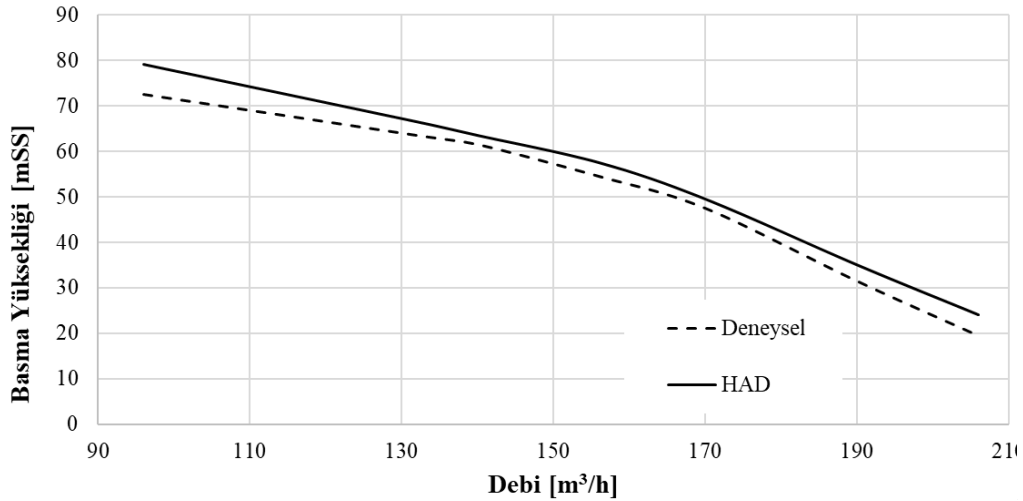
Şekil 3. Akış hacmi için ağ yapısı

Sayısal analizlerde kademe sayısı doğru tasarım sonuçlarını elde etmek için gerekli olan bir diğer parametredir. Literatürde Baysal (1979) ve Stel ve ark., (2015) tarafından da vurguladığı gibi kademeli pompalarda deneylerin ve analizlerinde en az üç kademe önerisi dikkate alınarak performans eğrileri dört kademeli pompa için elde edilmiştir.

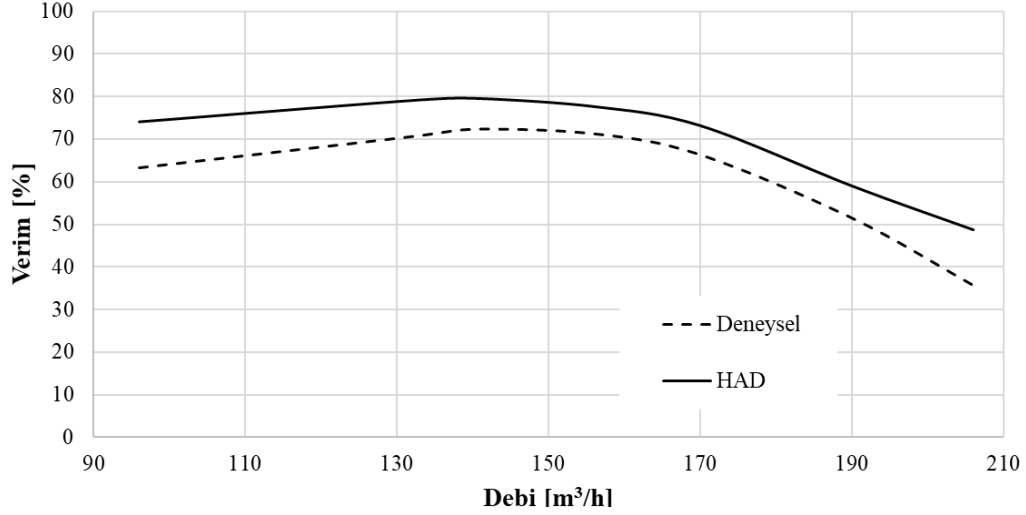
BULGULAR VE TARTIŞMA

Kademeli bir dalgıç pompa performansının belirlenmesi ve sayısal analizlerin doğrulanması amacıyla yapılan deneysel çalışmalar karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Deneysel çalışmalar için firma bünyesinde bulunan test düzeneği kullanılmıştır ve sayısal çalışmalar ANSYS-Fluent programı yardımıyla yapılmıştır. Sayısal çalışmalarda, çark devir sayısı sabit tutulurken pompa debileri değiştirilerek karakteristik çalışma eğrileri elde edilmiştir. Farklı debiler için basma yüksekliği ve verimlerin değişimi sırasıyla Şekil 4 ve Şekil 5'te karşılaştırılmıştır. Ayrıca, grafiklerden pompa çalışma noktası tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra sayısal analiz sonuçlarından elde edilen dört kademe boyunca toplam basınç ve hız değişimlerine ait iki boyutlu kontur sonuçları Şekil 6 ve Şekil 7'de sunulmuştur.

Şekil 4'te kademeli dalgıç pompa için deneysel ve HAD çalışmalarından elde edilen basma yüksekliği-debi değişimi verilmiştir. Pompanın çalışma aralığı 95 m³/h ile 200 m³/h arasında değiştiğinde, deneysel çalışmalarda dört kademe için basma yüksekliği 72.5 mSS ile 19.5 mSS arasında elde edilmiştir. Şekil 5'te verilen grafik incelendiğinde; pompa için en yüksek verimin elde edildiği debi değerinin 140 m³/h olduğu görülmektedir. Bu değer pompa için en verimli çalışma noktası olduğundan; Şekil 4'te basma yüksekliği değeri deneysel ve HAD çalışmalarında dört kademe için sırasıyla 61.5 mSS ve 63.5 mSS olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Bai ve ark. (2022)'nin da vurguladığı gibi deneysel ve HAD çalışma sonuçlarına ait değişim eğrileri birbirine paralel olarak ve çok yakın değerlerde elde edilmiştir.



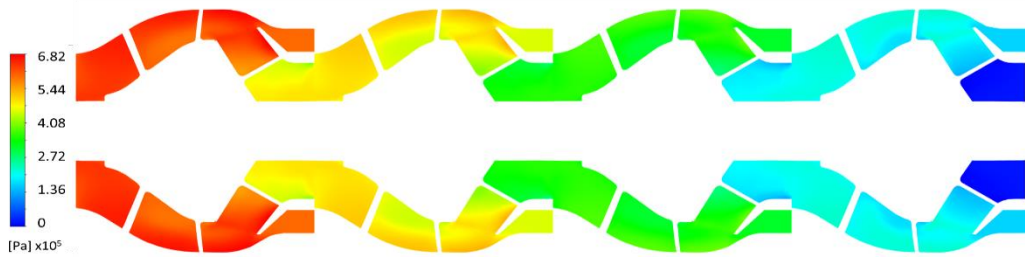
Şekil 4. Dalgıç pompa için deneysel ve HAD çalışmalarından elde edilen basma yüksekliği-debi değişimi



Şekil 5. Dalgıç pompa için deneysel ve HAD çalışmalarından elde edilen verim-debi değişimi

Şekil 5'te kademeli dalgıç pompa için deneysel ve HAD çalışmalarından elde edilen verim-debi değişimi grafiği verilmiştir. Grafikte deneysel çalışma için en yüksek verim değerinin $140 \text{ m}^3/\text{h}$ için %72.33 civarında olduğu görülmektedir. Bu değer sayısal çalışma için ise %79.49 olarak elde edilmiştir. Bu iki verim değeri karşılaştırıldığında yaklaşık %9 civarında fark hesaplanmıştır. Deneysel ve HAD sonuçları verim grafiğine ait değişim eğrileri birbirine paralel olarak değişim göstermiştir. Bu nedenle HAD sonuçlarının literatürde de vurgulandığı gibi kabul edilebilir bir aralıkta olduğu ve pompa tasarımında kullanılabilir bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

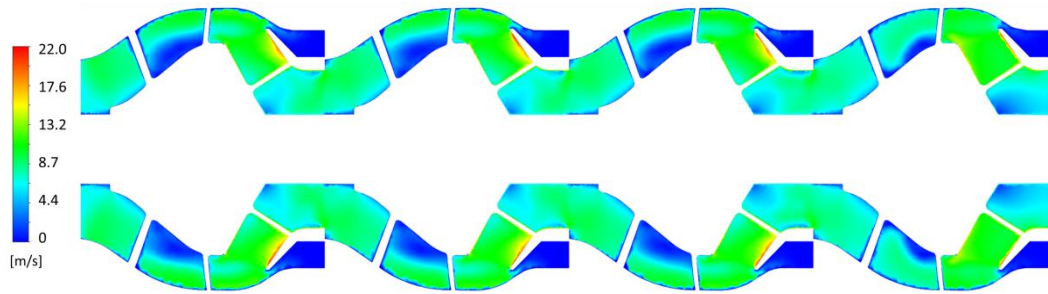
Şekil 6 ve 7'de HAD analiz sonuçlarına ait toplam basınç ve hız kontur değişimlerine ait görseller pompa çalışma noktası olarak belirlenen $140 \text{ m}^3/\text{h}$ debi değerleri için verilmiştir. Toplam basınç değişimlerinin verildiği sonuçlarda en yüksek basınç değeri $6.82 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ civarında elde edilmiştir. Mil gücü etkisiyle pompa çarkında kanat boyunca akışkanın basınçlandığı görülmektedir. Difüzöre geçen akışkan difüzör dış çeper duvarına çarptıktan sonra çıkış ağzına doğru yönelmektedir. Bu esnada iç çeperde bir miktar basınç düşüşü gözlemlenmektedir.



Şekil 6. Toplam basınç (Pa) kontur değerlerinin değişimi

Şekil 7'de verilen hız konturu sonuçlarında, dört kademedeki akış hacminde de yüksek ve düşük hız bölgeleri meydana gelmiştir. Özellikle kanat uç noktalarında hızların düşük değerlerde olduğu ve hareketsiz bölgelerin oluştuğu tespit edilmiştir. Akışkanın çark kanatları arasına girdikten sonra önce hızlandığı ve daha sonra difüzöre doğru ilerledikçe hızların azaldığı tespit edilmiştir. Çarktan difüzöre geçen akış bölgesinde en yüksek hızın 22 m/s değerlerinde olduğu görülmüştür. Difüzör içerisinde bazı bölgelerde geometriye bağlı olarak düşük hız bölgelerinin olduğu belirlenmiştir. Bu bölgeler aynı

zamanda basınç düşüşünün meydana geldiği yerlerdir. Ayrıca, difüzörlerin kaçak akış bölgelerinde de akışın durgunlaştığı görülmektedir.



Şekil 7. Hız (m/s) kontur değerlerinin değişimi

SONUÇ

Dört kademeli bir dalgıç pompa performansını belirlemek için deneysel ve sayısal çalışmalar yapılmıştır. Sabit devirde dönen çark ve sabit eleman difüzör ile çalışan kademeli dalgıç pompanın akış hacmi çıkarılarak HAD yöntemiyle çözümlenmiştir. Pompa performansının değerlendirildiği grafiklerde deneysel ve sayısal sonuçlar karşılaştırılmıştır. Ayrıca, sayısal analizlerden elde edilen akış hacmine ait görsel sonuçlarda sunulmuştur.

Deneysel çalışmalardan elde edilen basma yüksekliği değerleri birbirine çok yakın sonuç sergilerken, hidrolik verim değerleri, sayısal çözümleme sonuçlarında çalışma noktası için yaklaşık %9 fark ile elde edilmiştir. Bu farkın sebeplerinden bir tanesi kaçak kayıplarının sayısal analizlerde dikkate alınmaması, deneysel ölçüm hataları ve deneysel çalışmaya göre sayısal analizlerde yapılan kabuller ve sınır şartlarından kaynaklanmaktadır. Bir diğer sebebi ise deneysel ölçümlerde doğrudan tork ölçümü yapılamamaktadır ve buna bağlı olarak mekanik kayıplar nedeniyle verim değerlerinde farklılıklar oluşmuştur. Ancak pompa debisi ile değişen basma yüksekliği ve verim eğrileri genel olarak birbirine paralel şekilde oluşmuştur. Dört kademeli dalgıç pompa için çalışma noktası olarak tespit edilen 140 m³/h debi değerinde verim deneysel çalışma sonucunda yaklaşık %72.33 olarak hesaplanırken, HAD sonuçlarında %79.49 olarak hesaplanmıştır. Yine çalışma noktasında basma yüksekliği dört kademe için deneysel olarak 61.5 mSS olarak elde edilirken, HAD analizlerinde 63.5 mSS olarak elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda deneysel sonuçların sayısal yöntemle doğrulanması ilerleyen aşamalarda ön tasarım adımlarında maliyet ve zaman tasarrufu sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Deneysel çalışmaların yapılması için destek veren Nemutlu Pompa Döküm Mühendislik San. ve Tic. Anonim Şirketi'ne teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

ANSYS, ANSYS® Fluent Theory Guide, ANSYS, Inc., 2015.

Bai, Y., Kong, F., Xia, B., & Liu, Y. (2017). Effect of blade number matching of impeller and diffuser in high-speed rescue pump. *Advances in Mechanical Engineering*, 9(5), 1687814017703595.

- Bai, L., Yang, Y., Zhou, L., Li, Y., Xiao, Y., & Shi, W. (2022). Optimal design and performance improvement of an electric submersible pump impeller based on Taguchi approach. *Energy*, 252, 124032.
- Baysal, K. (1979). Tam santrifüj pompalar: hesap, çizim ve konstrüksiyon özellikleri. İstanbul Teknik Üniversitesi.
- El-Emam, M. A., Zhou, L., Yasser, E., Bai, L., & Shi, W. (2022). Computational methods of erosion wear in centrifugal pump: A state-of-the-art review. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 1-26.
- Gölcü, M., Ergür, H. S., & Pancar, Y. (2008). Düşük kanat sayılı dalgıç pompa çarklarına ilave edilen ara kanatçıkların pompa performansına etkileri. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 13(1).
- Holman, J. P. (2001). The measurement of temperature. *Experimental Methods for Engineers*. McGraw-Hill International Edition, Mechanical Engineering Series, 355-419.
- Parlak, Z. (2016). En uygun çark tasarımı ile bir santrifüj pompa performansının iyileştirilmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bil Der*, 20(3), 667-676.
- Shih, T. H., Liou, W. W., Shabbir, A., Yang, Z., & Zhu, J., (1995). A new k- ϵ eddy viscosity model for high reynolds number turbulent flows. *Computers & fluids*, 24(3), 227-238.
- Sirino, T., Stel, H., & Morales, R. E. (2013). July. Numerical study of the influence of viscosity on the performance of an electrical submersible pump. In *Fluids Engineering Division Summer Meeting* (Vol. 55553, p. V01BT10A026). American Society of Mechanical Engineers.
- Stel, H., Sirino, T., Ponce, F. J., Chiva, S., & Morales, R. E. (2015). Numerical investigation of the flow in a multistage electric submersible pump. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 136, 41-54.
- Vidoza, J. A., Andreasen, J. G., Haglind, F., dos Reis, M. M., & Gallo, W. (2019). Design and optimization of power hubs for Brazilian off-shore oil production units. *Energy*, 176, 656-666.
- Wei, Q., Sun, X., & Shamseldin, A. Y. (2019). Numerical study on the impact of the coupling of diffuser parameters on the performance of submersible pumps used in town water distribution systems. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, 41(10), 1-15.
- Yang, Y., Zhou, L., Shi, W., He, Z., Han, Y., & Xiao, Y. (2021). Interstage difference of pressure pulsation in a three-stage electrical submersible pump. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 196, 107653.
- Zhou, L., Shi, W., Lu, W., Hu, B., & Wu, S. (2012). Numerical investigations and performance experiments of a deep-well centrifugal pump with different diffusers. *Journal of Fluids Engineering*, 134(7).

Atf İçin: Ünverdi, M., Küçük, H. ve Yılmaz, M.S. (2023). Nanoakışkanların Isıl Sistemlerde Enerji Verimliliğine Etkisi: Deneysel Verilerin Isıl ve Hidrodinamik Performans Ölçütleri ile Değerlendirilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2892-2904.

To Cite: Ünverdi, M., Küçük, H. & Yılmaz, M.S. (2023). The Effect of Nanofluids on Energy Efficiency in Thermal Systems: The Evaluation of the Experimental Data with Thermal and Hydrodynamic Performance Criteria. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2892-2904.

Nanoakışkanların Isıl Sistemlerde Enerji Verimliliğine Etkisi: Deneysel Verilerin Isıl ve Hidrodinamik Performans Ölçütleri ile Değerlendirilmesi

Murat ÜNVERDİ^{1*}, Hasan KÜÇÜK², M. Senan YILMAZ³

Öne Çıkanlar:

- Nanoakışkanların ısı değiştiricilerdeki deneysel verileriyle PDÖ ve VDÖ hesaplanmıştır.
- Geleneksel aracı akışkanların ve nanoakışkanların enerji verimliliği karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

- Isı değiştirici
- Nanoakışkan
- Isı geçişi
- Pompalama gücü
- Performans ölçütü
- Enerji verimliliği

ÖZET:

Sürekli artan enerji maliyetleri nedeniyle, endüstriyel uygulamalarda, ısı değiştiricilerin enerji verimliliği önem kazanmıştır. Bu nedenle, günümüze kadar ısı geçişini iyileştirmek ve süreci hızlandırmak (süreyi kısaltmak), ısı değiştiricilerin boyutunu küçültmek ve enerji (yakıt) verimliliğini artırmak amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. Son yıllarda, geleneksel aracı sıvıların yerine, bu sıvılara nanometre büyüklüğündeki (en az bir boyutta 100 nm’den küçük) parçacıkların eklenmesiyle elde edilen, nanoakışkan süspansiyonlarının, enerji verimliliğini iyileştirmede kullanılması önerilmektedir. Bu çalışmada nanoakışkanların ısı değiştiricilerde aktarılan ısı güce ve gerekli pompalama gücüne etkileri, kaynaklardaki deneysel araştırmaların sonuçları kullanılarak incelenmiştir. Aktarılan ısı gücü ve pompalama gücü arasındaki ilişki, iki farklı değerlendirme ölçütü (Performans Değerlendirme Ölçütü-PDÖ ve Verimlilik Değerlendirme Ölçütü-VDÖ) ile tanımlanmıştır. Böylece, ısı sistemlerde kullanılan geleneksel aracı sıvıların yerine önerilen nanoakışkanların, enerji verimliliğine (enerji tüketimine) etkileri daha gerçekçi bir bakış açısıyla irdelenmiştir. Yapılan değerlendirmelerle, endüstriyel uygulamalarda nanoakışkan kullanmanın, enerji bütçesi bakımından, geleneksel aracı sıvılara göre dezavantajlı olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla nanoakışkanların, bu dezavantajlarının önemsiz olduğu özel uygulamalarda kullanılabileceği sonucu elde edilmiştir.

The Effect of Nanofluids on Energy Efficiency in Thermal Systems: The Evaluation of the Experimental Data with Thermal and Hydrodynamic Performance Criteria

Highlights:

- PEC and EEC were calculated with the experimental data of nanofluids in heat exchangers.
- The energy efficiency of conventional working fluids and nanofluids has been compared.

Keywords:

- Heat exchanger
- Nanofluid
- Heat transfer
- Pumping power
- Performance criteria
- Energy efficiency

ABSTRACT:

The energy efficiency of heat exchangers has become crucial in industrial applications due to ever-increasing energy costs. Therefore, various methods have been developed to enhance heat transfer and accelerate the process (shortening the time), reduce the size of heat exchangers, and increase energy (fuel) efficiency. In recent years, researchers have recommended nanofluid suspensions in place of common heat transfer fluids to improve energy efficiency. Nanofluid suspensions are obtained by adding nanometer-sized particles (less than 100 nm in at least one dimension) to heat transfer fluids. This study focused on experimental data in the literature to investigate the effects of nanofluids on transferred thermal power and required pumping power in heat exchangers. The relationship between the transferred thermal power and the pumping power was defined by two different performance criteria (Performance Evaluation Criterion-PEC and Energy Efficiency Criterion-EEC), allowing us to scrutinize the effects of nanofluids in thermal systems on energy efficiency (energy consumption) from a more realistic perspective. The results show that nanofluids are more disadvantageous than conventional heat transfer fluids in terms of the energy budget in industrial applications. It is concluded that nanofluids can be used in special applications where those disadvantages are insignificant.

¹ Murat ÜNVERDİ (Orcid ID: 0000-0002-7045-509X), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın Meslek Yüksekokulu, Makine ve Metal Teknolojileri Bölümü, Aydın, Türkiye

² Hasan KÜÇÜK (Orcid ID: 0000-0002-8825-7315), Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

³ M. Senan YILMAZ (Orcid ID: 0000-0001-5644-6675), Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Gerede Meslek Yüksekokulu, Makine ve Metal Teknolojileri Bölümü, Bolu, Türkiye

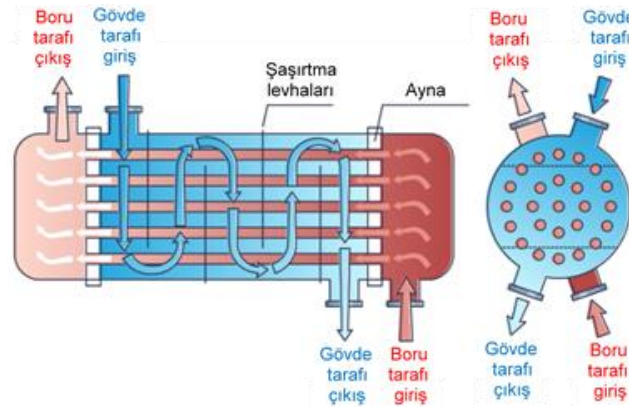
*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Murat ÜNVERDİ, e-mail: munverdi@adu.edu.tr

GİRİŞ

Isı enerjisi ve ısı sistemleri, endüstriyel tesislerde yaygın kullanılmaktadır. Gövde borulu ve levhalı ısı değiştiriciler, bu sistemlerde karşılaşılan cihazların en yaygın örneklerindedir. Isı değiştiricilerin ana işlevi; farklı ısı kaynaklarından sağlanan ancak doğrudan kullanılması mümkün olmayan ısı enerjisinin, daha düşük sıcaklıkta ve kullanım şekline/yerine uygun bir aracı akışkana aktararak, istenilen sıcaklık ve/veya yoğunlukta (ısı akısında) kullanılmasını sağlamaktır. Dolayısıyla ısı değiştiriciler, güç üretim tesislerinde, gıda endüstrisinde, petrol ve kimya endüstrilerinde, atık ısının geri kazanılmasında, soğutma ve ısıtmanın yapıldığı uygulamaların tamamında yaygın kullanılmaktadır (Genceli, 1999; Kakaç ve ark., 2012).

Gövde borulu ısı değiştiriciler, bir gövde (kovan) ve içerisine yerleştirilen, farklı düzenlemelerle (kare, üçgen gibi) bir araya getirilen çok sayıda borudan oluşan, boru demetinden ibarettir (Şekil 1). Gövde ile boru demetinin bağlantısı, üzerinde boruların giriş-çıkış deliklerinin bulunduğu, aynalarla sağlanır. Boru demetindeki borular, aynı zamanda gövde tarafındaki (boruların dış tarafındaki) akışı yönlendiren, akışın ortalama hızını ve türbülans yoğunluğunu dolayısıyla ısı geçişini arttıran, farklı sayıdaki şaşırtma levhaları (perde) ile desteklenir. Boru demetindeki boruların sayısı ve uzunlukları ise istenen ısı güce ve varsa ısı değiştiricinin boyutlarıyla ilgili diğer kısıtlara (imalat, nakliye ve kullanım yeri gibi) göre değişebilir. Sıcak ve soğuk akışkanlar; uygulamanın türüne, akışkanların basınçlarına ve debilerine, izin verilen basınç kayıplarına, aracı akışkanların faz değiştirip değiştirmemelerine ve kirlilik durumlarına (periyodik bakım ve temizlik ihtiyacı) göre, gövde veya boru tarafından geçirilebilir (Serth, 2014; Klaren Tech., 2022).

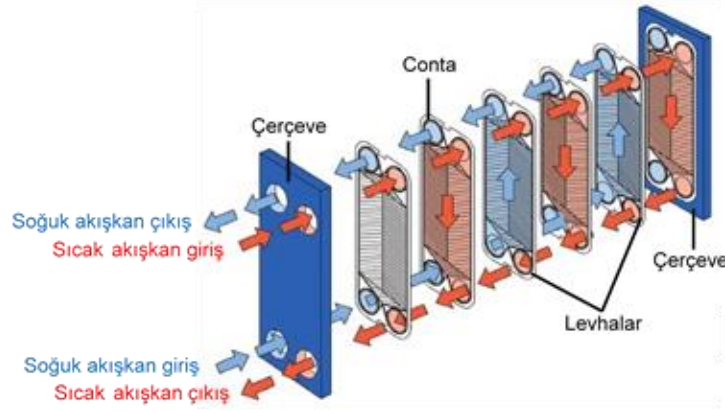
Levhalı ısı değiştiriciler, genellikle art arda dizilen ve her köşesinde bağlantı (akışkan giriş-çıkış) delikleri bulunan, dalga yüzeyli ince metal levhalardan oluşur (Şekil 2). Metal levhaların kenarları, sızdırmazlığı sağlamak amacıyla araya yerleştirilen contalarla çevrilidir ya da küçük boyutlarda ve kapasitelerde lehimle kapatılır. Metal levhalar, her iki taraftaki sabit çerçevelerin arasına dizilip, kılavuz çubuklarıyla sıkıştırılarak sabitlenmektedir. Böylece sıcak ve soğuk akışkanların akış kanalları yan yana (ardışık) dizilmiştir. Başka bir ifadeyle, metal levhaların her birinin bir tarafından sıcak ve diğer tarafından ise soğuk akışkan akmaktadır. Levhaların boyutları ve birbiri ardına dizilen levhaların sayısı, aktarılabilecek ısı güce göre seçilir. Levhaların dalga yüzeyli olması, her iki taraftaki akışın türbülans şiddetini/yoğunluğunu artırır ve akış yollarını uzatır dolayısıyla ısı taşınım katsayısını artırır ve ısı geçişini iyileştirir (Genceli, 1999; Hesselgreaves ve ark., 2016; Alfa Laval, 2022).



Şekil 1. Gövde borulu ısı değiştirici (Klaren Tech., 2022)

Taşınım ile ısı geçişi olan tüm ısı sistemlerinin ve ısı değiştiricilerin performansını etkileyebilecek en önemli değişkenler, ısı geçişi yüzeyinin yapısal ve geometrik özellikleri (akışın türü ve özellikleri) ile aracı akışkanların termofiziksel özellikleridir. Taşınım ile ısı geçişini iyileştirmek amacıyla günümüze

kadar birçok yöntem denenmiştir ve bunlardan bazıları da farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden, aktif olarak nitelendirilenler (elektromanyetik etkiler, yüzeyin ve/veya akışkanın titreştirilmesi gibi) dış güç gerektirirken, pasif yöntemler (genişletilmiş yüzeyler, artırılmış yüzey pürüzlülüğü ve aracı akışkanlar için katı katkı maddeleri gibi) ise dış güç gerektirmezler (Webb ve Kim, 2005).



Şekil 2. Levhalı ısı değiştirici (Alfa Laval, 2022)

Son yıllarda, pasif iyileştirme yöntemlerinden olan nanoakışkanların (aracı akışkan ve nano boyuttaki tozların-katı parçacıkların karışımından oluşan kolloid çözelti) taşınımı ısı geçişine etkilerinin incelendiği araştırmalar, artarak devam etmektedir (Şekil 3). Bazı dezavantajlarına (katı partiküllerin kümelenmesi, çökmeleri, uzun süre stabil/kararlı kalamamaları gibi) rağmen su, etilen glikol, yağ gibi aracı akışkanlara, farklı konsantrasyonlardaki nano boyutlu tozların-katı parçacıkların eklenmesiyle hazırlanan nanoakışkanlarla, geleneksel aracı akışkanın termofiziksel özellikleri (yoğunluk, ısı iletim katsayısı, özgül ısı ve viskozite gibi) değiştirilmektedir. Başka bir ifadeyle, termofiziksel özellikleri değiştirilmiş aracı akışkanlar olan nanoakışkanlardan, ısı sistemlerde ve ısı değiştiricilerde taşınımı ısı geçişinin iyileştirilmesi beklenmektedir (Zhang, 2013; Bianco ve ark., 2015).



Şekil 3. Nanoakışkanların hazırlanması (Yang ve ark., 2022)

Isı enerjisinin dönüştürüldüğü sistemlerde, birçok araştırmacının üzerinde çalıştığı en önemli konularından biri de yüksek verimli ısı geçişidir. Aracı akışkanlar arasındaki ısıl potansiyel (sıcaklık) farkının ne kadar iyi kullanılabilirdiği, etkin (verimli) ısı geçişi ile tanımlanır. Ancak, akış kaynağı basınç kayıplarını yenmek amacıyla harcanan pompalama gücünün büyüklüğü de taşınımı ısı geçişinde enerjinin ne kadar verimli kullanıldığını gösterir ve mutlaka dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, termofiziksel özellikleri değiştirilmiş aracı akışkanlar olan nanoakışkanların, taşınımı ısı geçişinin etkinliği bakımından sağlayacağı faydalarla birlikte, sistemin hidrodinamik performansına muhtemel olumsuz etkileri de kesinlikle değerlendirilmelidir. Başka bir ifadeyle, nanoakışkanların, endüstriyel

tesislerin işletme maliyetleri bakımından son derece önemli olan ısı sistemlerinin enerji verimliliğine etkileri, en doğru şekilde aktarılan ısı güç ve harcanan pompalama güçleri birlikte ele alınarak değerlendirilebilir. Bu nedenle nanoakışkanlarla ilgili kaynaklar arasından, çalışmamızın amacına uygun olarak, ısı güç ve pompalama gücü sonuçlarının birlikte yayımlandığı, ısı değiştiricilerle yapılan dört farklı deneysel çalışma seçilmiştir. Aşağıda kısaca özetlenen bu çalışmalardan ikisinde gövde borulu ısı değiştiriciler, diğer ikisinde ise levhalı ısı değiştiriciler kullanılmıştır.

Araştırmacılar, 28 borusu (6.25 mm dış çaplı, cidar/çeper kalınlığı 0.508 mm ve uzunluğu 354 mm) olan gövde borulu ısı değiştiricide, SiC-su (ortalama çapı 50 nm olan SiC) nanoakışkanlarının (hacimce %0.25, %0.5, %0.75 ve %1 konsantrasyonlu) ısı geçişi ve basınç düşümü performanslarını deneysel incelemiştir. Nanoakışkanların hazırlanmasında; çözeltilere yüzey aktif maddesi ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) ekleyerek, mekanik karıştırma ve yüksek frekanslı titreşim uygulamışlardır. Araştırmacılar, gövde tarafı debisini 180 l/sa.'de sabit tutup, boru tarafındaki nanoakışkan debisini beş farklı (100, 150, 200, 250 ve 300 l/sa.) değere ayarladıkları deneylerde, basınç düşümlerini de ölçmüşlerdir. Tüm nanoakışkanlara aktarılan ısı güçlerinin ve akış kaynaklı basınç düşümlerinin suya göre arttığını ve %1 hacimsel konsantrasyonda en yüksek sonuçların elde edildiğini bildirmişlerdir (Karimi ve ark., 2020).

Araştırmacılar, Kern yöntemi ile tasarlayıp, 2 mm iç çaplı ve 240 mm uzunluğundaki 13 bakır boru ile ürettikleri mini kanallı gövde borulu ısı değiştiricide, Al_2O_3 -su (ortalama çapı 40 nm olan Al_2O_3) nanoakışkanlarının (hacimce %0.2, %0.4 ve %0.8 konsantrasyonlu) ısı geçişi ve basınç düşümü performanslarını deneysel incelemiştir. Nanoakışkanların hazırlanmasında, kimyasal katkı maddesinin kullanılmadığını ve yüksek frekanslı titreşim uygulandığını bildirmişlerdir. Çalışmada, gövde tarafı debisini 180 l/sa.'de ve giriş sıcaklığını 40°C 'de sabit tuttuklarını, boru tarafındaki nanoakışkanların debisini ise 125-600 l/sa. aralığında 16 farklı değere ayarladıklarını ve giriş sıcaklığını 20°C 'de sabit tuttuklarını ifade etmişlerdir. Nanoakışkanların geçirildiği boru tarafındaki basınç düşümünün de ölçüldüğü çalışmada; en yüksek ısı taşınım katsayısının elde edildiği nanoakışkan hacimsel konsantrasyonunun %0.4 ve nanoakışkanların enerji kullanım performanslarının da suya yakın hatta suyun altında olduğunu bildirmişlerdir (Yılmaz ve ark., 2022).

Araştırmacılar, levha sayıları farklı (8, 12 ve 16 levhalı), dalga yüzeyli (60° balıksırtı açılı) levhalı ısı değiştiricilerle; tek bileşenli Al_2O_3 -su (77 nm Al_2O_3) ve CuO-su (78 nm CuO) nanoakışkanları ile Al_2O_3 +CuO-su hibrit nanoakışkanın taşınımıyla ısı geçişi ve basınç düşümü performanslarını deneysel incelemiştir. Tek bileşenli ve hibrit nanoakışkanların her ikisini de ağırlıkça %1 konsantrasyonda hazırlamışlardır. Kararlı nanoakışkanların hazırlanmasında; nanopartiküllerin çökmesini ve kümelenmesini engellemek amacıyla, yüzey aktif maddesi (Triton X-100) kullanmışlar ve yüksek frekanslı titreşim (ultrasonikasyon) uygulamışlardır. Araştırmacılar deneyleri, 3-7 l/dk. aralığında beş farklı hacimsel debide gerçekleştirmişlerdir. Deneysel basınç düşümünün ölçülmediği çalışmada araştırmacılar, ısı değiştiricilerde gerekli ortalama pompalama güçlerini, Pandey ve Nema'nın (Pandey ve Nema, 2012) önerdiği deneysel sürtünme faktörü bağıntısından yararlanarak hesaplamışlardır. Nanoakışkanlarla yapılan deneyler, suyla yapılan deneylerle karşılaştırıldığında; ısı değiştiricilerin ısı güçlerinin Reynolds sayısı ile arttığını ve hibrit Al_2O_3 +CuO-su nanoakışkanıyla diğer tek bileşenli nanoakışkanlara göre daha yüksek ısı güçlerinin aktarılabilirliğini ve nanoakışkanlar için gerekli ortalama pompalama güçlerinin suya göre daha büyük olduğunu elde etmişlerdir (Gürbüz ve ark., 2020).

Araştırmacılar, altı levhalı (balıksırtı açısı 30°), ortalama kanal yüksekliği 2.8 mm ve ısı geçiş alanı 0.3 m^2 olan levhalı ısı değiştiricide, Ni-su (72 nm Ni) nanoakışkanlarının (hacimce %0.1, %0.3 ve %0.6 konsantrasyonlarda) taşınımıyla ısı geçişi ve basınç düşümü performanslarını deneysel incelemiştir.

Kararlı nanoakışkanların hazırlanmasında; karışımın pH ölçümü, mekanik karıştırma ve yüzey aktif maddesi ekleme yöntemlerinin kullanıldığını bildirmişlerdir. Basınç düşümlerinin de ölçüldüğü araştırmada, nanoakışkanların performanslarını; sıcak taraf debisini ve giriş sıcaklığını sırasıyla 3 l/dk.'da ve 80°C'de sabit tutarak, soğuk taraftaki debiyi ise beş farklı değere (3, 4, 5, 6 ve 7 l/dk.) ayarlayarak ve giriş sıcaklığını 30°C'de sabit tutarak incelemişlerdir. Tüm nanoakışkanların ısı güçlerinin ve pompalama güçlerinin suya göre daha yüksek belirlendiği çalışmada, %0.6 hacimsel konsantrasyonda en yüksek değerlerin elde edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, nanoakışkanlarla aktarılan ısı güçlerinin ve pompalama güçlerinin, artan konsantrasyon ve debiyle yükseldiğini, nanoakışkanların enerjii etkin kullanma performansının suya yakın hatta suyun altında olduğunu elde etmişlerdir (Saleh ve Sundar, 2021).

Bu çalışmanın günümüz endüstri ve mühendislik uygulamalarına katkısı, nanoakışkanların kullanıldığı ısı sistemlerin enerji performansına etkilerinin, ısı güç ve pompalama gücü birlikte dikkate alınarak araştırılmasıdır. Isıl sistemlerde nanoakışkanların kullanıldığı kaynaklar hızlı bir şekilde gözden geçirilirse, deneysel performans araştırmalarında genellikle; ısı taşınım katsayısı-toplam ısı geçiş katsayısı ve/veya basınç düşümü-sürtünme faktörüne bağlı değerlendirmelerin yapıldığı görülecektir. Ancak deneysel performans araştırmalarında, ısı güçleri ve pompalama güçleri arasındaki ilişkiye dayanan değerlendirmeler ya hiç yapılmamıştır ya da nadiren yapılmıştır. Diğer bir deyişle çalışmamızda, nanoakışkanların geleneksel aracı akışkanlara göre ısı güçte sağladığı iyileşmenin yanında, akışın sürdürülmesinde gerekli pompalama gücünü artırıcı etkileri birlikte değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerde, çalışmamızın amacına uygun kaynaklar arasından; farklı araştırmacıların, farklı ısı ve hidrodinamik koşullarda ve farklı nanoakışkanlarla gerçekleştirdiği, ısı güçlerinin, pompalama güçlerinin, gerekli diğer verilerin sunulduğu ve en güncel (son üç yılda yayımlanan) deneysel çalışmalar seçilmiştir. Seçilen deneysel çalışmaların ısı güç ve pompalama gücü verileri kullanılarak, nanoakışkanların geleneksel aracı akışkanlara göre enerji verimliliği bakımından genel bir değerlendirilmesi, performans değerlendirme ölçütleriyle yapılmıştır. Bir başka ifadeyle nanoakışkanların ısı sistemlerdeki performansı; seçilen deneysel çalışmalarda yayımlanan sonuçlar, çoğunlukla tercih edilen klasik yaklaşımlardan farklı olarak, endüstriyel mühendislik uygulamaları bakımından daha evrensel ve temel yaklaşımlarla incelenmiştir.

Bu çalışmada, kaynaklar arasından seçilen, gövde borulu ve levhalı ısı değiştiricilerle yapılan, deneysel araştırmalarda elde edilen ısı güç ve pompalama gücü sonuçları kullanılarak, nanoakışkanların ısı sistemlerin enerji verimliliğine etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmede, ısı güç ve pompalama gücü ilişkisinin iki farklı tanımlamayla karşılaştırıldığı; performans değerlendirme ölçütü-PDÖ ve verimlilik değerlendirme ölçütü-VDÖ kullanılmıştır. Başka bir ifadeyle, nanoakışkanların ısı sistemlerin enerji verimliliğine olumlu/olumsuz etkileri, ısı gücün ve pompalama gücünün birlikte dikkate alındığı, iki farklı ısı-hidrodinamik performans ölçütüyle irdelenerek araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmamızın bu bölümünde, nanoakışkanların kullanıldığı ısı sistemlerin, enerji verimliliğine dayalı performans değerlendirme ölçütlerinden bahsedilmiştir.

Enerji Verimliliği Ölçütleri

Isıl sistemlerde; aracı akışkanlarla aktarılan ısı güç ve gerekli pompalama gücünün birlikte ele alındığı, başka bir ifadeyle; sistemin yapısal özellikleri, aracı akışkanın termodinamik özellikleri ve akışın hidrodinamik yapısının genel enerji verimliliğine etkilerinin bir arada değerlendirilmesinde evrensel bir yaklaşım olan ve aşağıda tanım eşitlikleri verilen PDÖ ve VDÖ kullanılmıştır.

Performans değerlendirme ölçütü (Ferrouillat ve ark., 2011):

$$PDÖ = \dot{Q}/\dot{W}_{pp} \quad (1)$$

Burada, PDÖ; performans değerlendirme ölçütüne, $\dot{Q}(W)$; akışkana aktarılan ısı güce ve $\dot{W}_{pp}(W)$; akış için gerekli pompalama gücüne karşılık gelmektedir. Isıl güç ve pompalama gücü sırasıyla:

$$\dot{Q} = \dot{m}c_p\Delta T \quad (2)$$

$$\dot{W}_{pp} = \dot{V}\Delta p \quad (3)$$

şeklinindedir. Burada, \dot{m} (kg/s); kütleli debiye, c_p (J/kgK); sabit basınçtaki özgül ısıya, ΔT (K); sıcaklık farkına, \dot{V} (m³/s); hacimsel debiye ve Δp (Pa); basınç düşümüne karşılık gelmektedir. Verimlilik değerlendirme ölçütü (Ma ve ark., 2014):

$$VDÖ = (\dot{Q}_{nf}/\dot{Q}_{bf})/(\dot{W}_{pp,nf}/\dot{W}_{pp,bf}) \quad (4)$$

Burada, VDÖ; verimlilik değerlendirme ölçütünü, $\dot{Q}_{nf}/\dot{Q}_{bf}$; nanoakışkana aktarılan ısı gücün, geleneksel aracı akışkana (nano tozların-katı parçacıkların kullanılmadığı akışkan) aktarılan ısı güce oranını ve $\dot{W}_{pp,nf}/\dot{W}_{pp,bf}$; nanoakışkana gerekli pompalama gücünün, geleneksel aracı akışkana gerekli pompalama gücüne oranını, alt indisler nf ve bf sırasıyla nanoakışkanı ve geleneksel aracı akışkanı belirtmektedir.

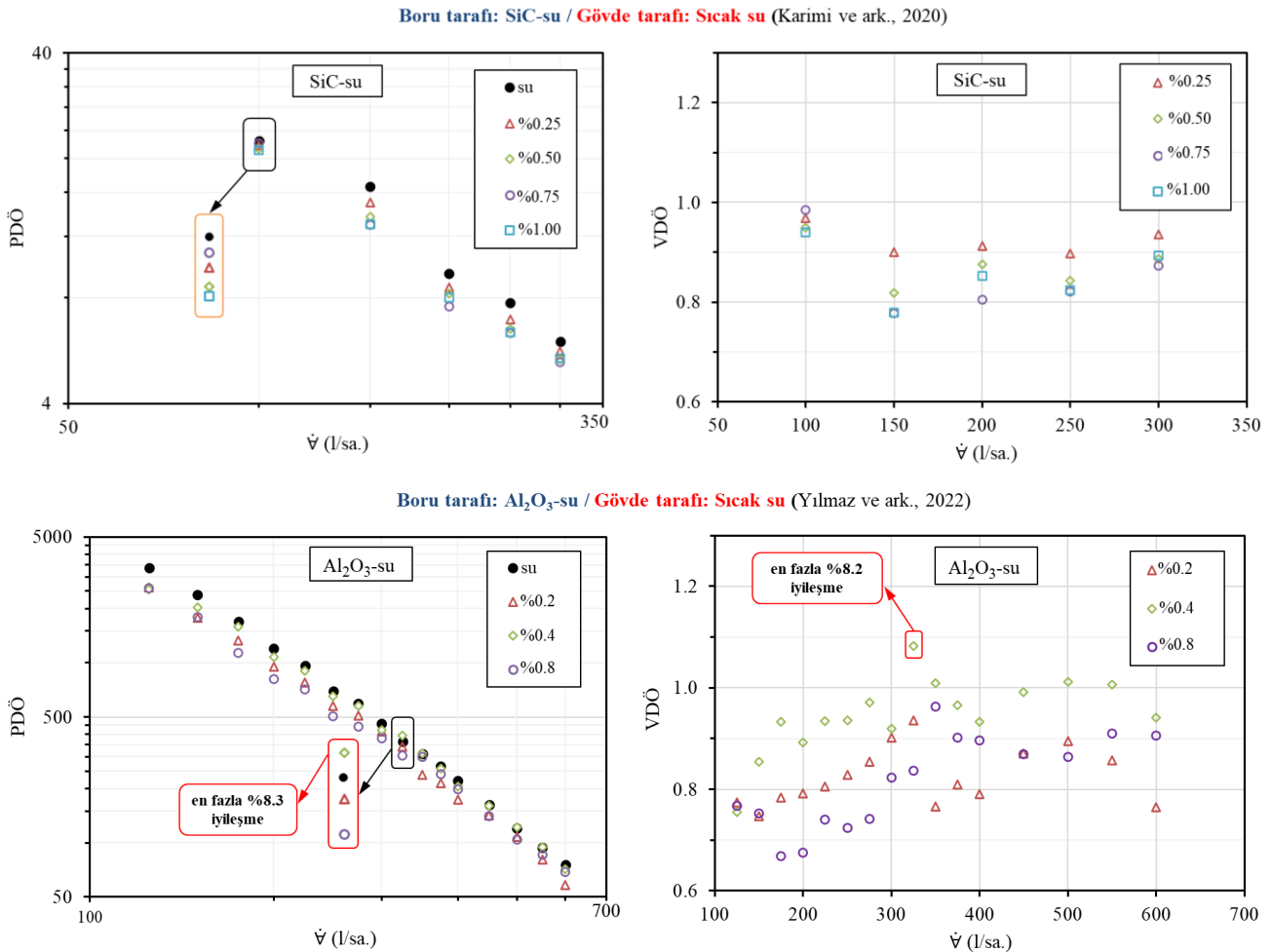
BULGULAR VE TARTIŞMA

Nanoakışkanlarla ilgili kaynaklar hızlı bir şekilde gözden geçirildiğinde, genellikle taşınım ısı geçişinin iyileştiği ve değerlendirmelerin çoğunda nanoakışkanların ısı taşınım katsayısını artırma potansiyelinin yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, üstün özellikli yeni aracı akışkan adayları olarak önerilen nanoakışkanların, ısı sistemlerin genel enerji performansına olası etkileri nadiren tartışılmıştır. Saf geleneksel aracı akışkana nano tozların-katı parçacıkların eklenmesi, beklendiği gibi taşınım ısı geçişini iyileştiren ısı iletim katsayısı gibi termofiziksel özellikleri iyileştirmesinin yanında, akışkanın akışa direncini temsil eden viskozitesini de artırmaktadır. Dinamik viskozitedeki artışın, kayma gerilmelerini ve dolayısıyla akış kaynaklı sürtünme basınç kayıplarını da artıracığı açıktır. Nano tozlar-katı parçacıklar, geleneksel aracı akışkanın ısı iletim katsayısına ve viskozitesine benzer şekilde, özgül ısını ve yoğunluğunu da değiştirmektedir. Isıl sistemlere en uygun aracı akışkanın seçiminde, tüm bu değişimler dikkate alınmalıdır. Viskozitedeki artışla birlikte, aracı akışkana aktarılan ısı güç ile akışın sürdürülebilmesi için gerekli pompalama gücü arasındaki denge, basınç kayıplarının artması nedeniyle olumsuz yönde değişecektir. Dolayısıyla, ısı sistemlerde nanoakışkanlar gibi yeni aracı akışkanlar ya da farklı iyileştirme yöntemleri değerlendirilirken, taşınım ısı geçişindeki iyileşmenin yanında, sistemin genel enerji veriminde etkili, pompalama gücü gibi faktörleri de göz önünde bulunduran bir yaklaşım izlenmelidir. Sonuç olarak, nanoakışkanlarla saf geleneksel aracı akışkana göre taşınım ısı geçişinde bir artış sağlansa da akışın sürdürülmesi için gerekli pompalama gücü oransal olarak daha fazla artabilir.

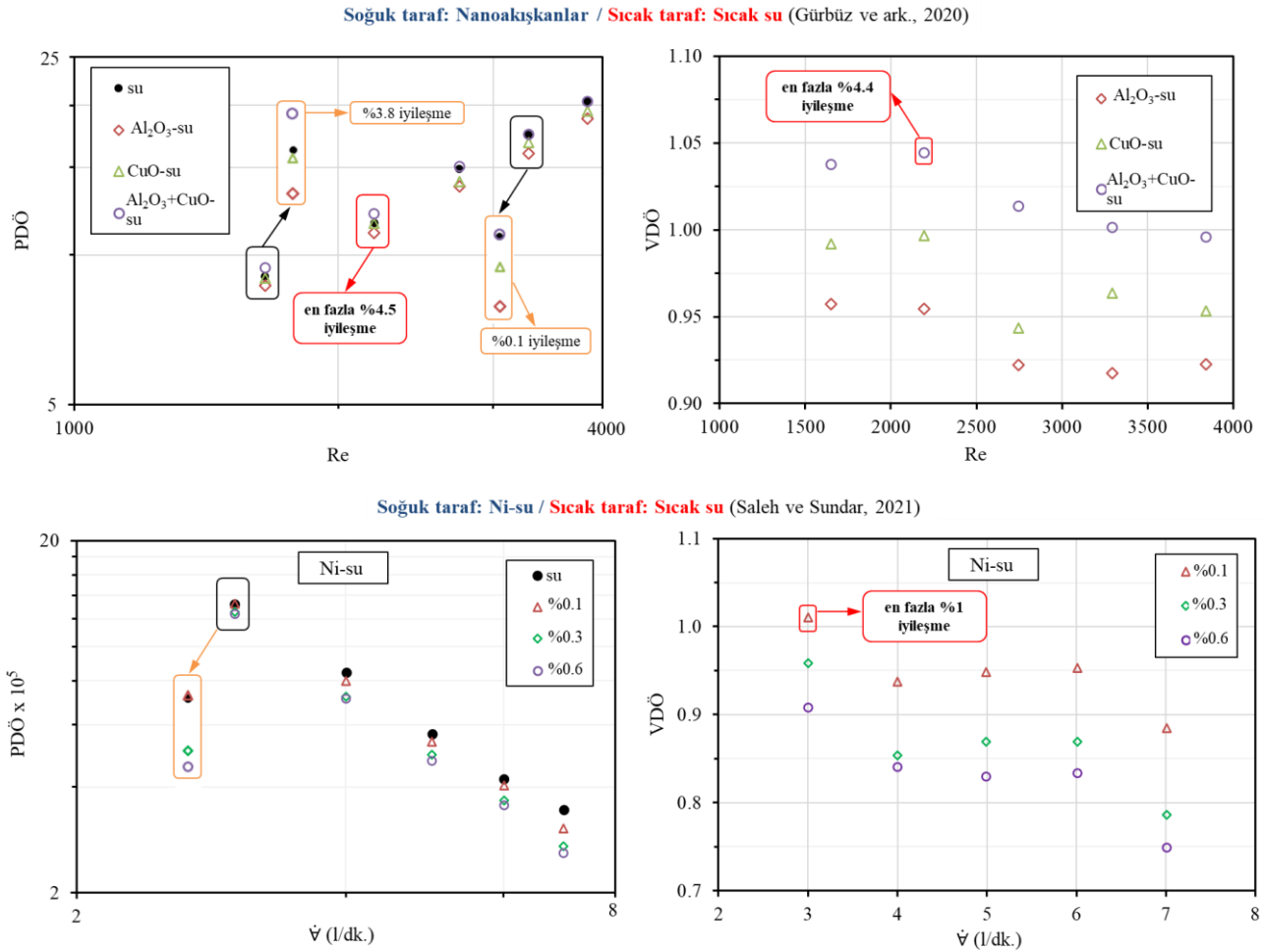
Belirli bir ısı gücün aktarılmasında, yaygın kullanılan saf geleneksel aracı akışkanların yerine nanoakışkanların kullanılmasıyla ilgili değerlendirmelerde, her iki durumda akışın devamında gerekli pompalama güçleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Nanoakışkanlarla ilgili kaynaklardan,

nanoakışkan hazırlamada kullanılan geleneksel aracı akışkanların (su, yağ gibi) hidrodinamik performansı ile ilgili yeterli veriye ulaşılabilen çalışmalar gözden geçirildiğinde; saf geleneksel aracı akışkanlarla belirli bir ısı yükü aktarmak için gerekli pompalama gücünün, tüm nanoakışkanlar için gerekli pompalama güçlerinden daha düşük olduğu açıkça görülmektedir. Diğer bir deyişle, belirli bir ısı gücün taşınması için nanoakışkanlarda kullanılan nano toz-katı parçacık konsantrasyonundaki artış, daha fazla pompalama gücü gerektirmektedir. Ayrıca, tüm ısı sistem ve pompalama devresi (yani tüm borular ve yerel kayıp elemanları; vanalar ve ısı değiştiriciler gibi) dikkate alındığında, bu artışın etkisinin daha da belirginleşeceği açıktır. Diğer bir anlatımla, belirli bir ısı gücünde hem saf geleneksel aracı akışkanın hem de bu akışkana nano tozların-katı parçacıkların ilavesiyle hazırlanan nanoakışkanın, gerekli hacimsel debilerinin eşit olduğu durumda, nanoakışkana gerekli pompalama gücü, saf geleneksel aracı akışkana gerekli pompalama gücünden daha büyüktür.

Kaynaklar arasından farklı araştırmacıların, farklı ısı ve hidrodinamik koşullarda ve farklı nanoakışkanlarla gerçekleştirdiği ve yayımlanan, deneysel ısı geçişi ve basınç düşümü sonuçları kullanılarak hesaplanan, PDÖ ve VDÖ'nün Reynolds sayısına ve hacimsel debiye bağlı değişimleri Şekil 4 ve 5'te verilmiştir.



Şekil 4. Gövde borulu ısı değiştiricilerde nanoakışkanların kullanıldığı deneysel PDÖ ve VDÖ sonuçları



Şekil 5. Levhalı ısı değiştiricilerde nanoakışkanların kullanıldığı deneysel PDÖ ve VDÖ sonuçları

Çalışmada kullanılan PDÖde ve VDÖde, aracı akışkanlara ısı geçişi ve gerekli pompalama gücü birlikte değerlendirilmektedir. Başka bir ifadeyle bu ölçütlerde, belirli bir ısıl güç aktarılırken aynı zamanda akış kaynaklı kayıp hidrodinamik gücün büyüklüğü de dikkate alındığından, taşınım ile ısı geçişi kanallarında harcanan akış enerjisinin ne kadar etkin kullanıldığı görülebilmektedir. Dolayısıyla, nanoakışkanların PDÖ'sü, saf geleneksel aracı akışkanın PDÖ'süne yakın ve hatta altındadır. Bu sonuçlar ise nanoakışkanların, basınç düşümünü (akış enerjisini) taşınım ile ısı geçişine dönüştürme performanslarının, saf geleneksel aracı akışkanlara eşdeğer ve hatta altında olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, saf geleneksel aracı akışkan ve nanoakışkanlara ait deneysel verilerle hesaplanan VDÖ'nün 1'e yakın ve 1'in altında olması, PDÖye benzer şekilde nanoakışkanların performansının, saf geleneksel aracı akışkana eşit ve altında olduğunu göstermektedir.

PDÖ ve VDÖ sonuçlarına göre genel olarak eşdeğer ısıl güçte, gerekli nanoakışkan debisinin artmasıyla artan basınç düşümünden dolayı, nanoakışkanların performansı saf geleneksel aracı akışkanın performansına yaklaşmış ve hatta altına düşmüştür. Başka bir ifadeyle, Şekil 4 ve 5'ten görüldüğü gibi termodinamik özelliklere ve nano toz-katı parçacık konsantrasyonuna bağlı olarak gerekli nanoakışkan debisinin ve viskozitesinin artmasıyla, saf geleneksel aracı akışkana göre daha fazla artan basınç düşümü ve pompalama gücünün etkisiyle, PDÖ ve VDÖ azalmıştır.

Kaynaklar arasından seçilerek ele alınan deneysel çalışmalardan, Karimi ve ark., 2020, Yılmaz ve ark., 2022, Gürbüz ve ark., 2020 ve Saleh ve Sundar, 2021 için Şekil 4 ve 5'te verilen nanoakışkanların tüm PDÖ sonuçları, geleneksel aracı akışkanlara göre sırasıyla; ortalama %12.3, %13.8, %2.6 ve %11.5

daha düşüktür. Benzer şekilde ortalama VDÖ sonuçları; Karimi ve ark., 2020 için 0.88, Yılmaz ve ark., 2022 için 0.86, Gürbüz ve ark., 2020 için 0.97 ve Saleh ve Sundar, 2021 için 0.88'dir.

Çizelge 1, 2, 3 ve 4'te kaynaklar arasından seçilerek ele alınan deneysel çalışmaların sonuçları, detaylı olarak verilmiştir. Bu çizelgelerde, parantez içerisindeki sayısal değerler, ısı değiştiricilerde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki nanoakışkanların saf geleneksel aracı akışkanlara göre yüzde performans değişimlerini göstermektedir. Çizelgelerdeki PDÖ ve VDÖ sonuçlarının neredeyse tamamı, belirli bir pompalama gücünde, saf geleneksel aracı akışkanların yerine nanoakışkanları kullanmanın, harcanan akış enerjisinin, aynı oranda ısı güç aktarımına dönüştürülemediğini göstermektedir. Bir başka deyişle, deneysel sonuçlar kullanılarak hesaplanan PDÖ ve VDÖ sonuçları, belirli bir ısı gücünü (ısı geçişi) aktarılması için nanoakışkanlarla daha fazla akış enerjisi harcamanın/tüketmenin (basınç kaybının taşınımıyla ısı geçişine dönüşümü) verimsiz bir enerji dönüşümü olduğunu göstermektedir.

Çizelge 1. Karimi ve ark., 2020 için PDÖ ve VDÖ sonuçları

PDÖ					
Ḃ (l/sa.)	Su	SiC-su			
	%0	%0.25	%0.50	%0.75	%1.00
100	22.46	21.77 (-%3.1)	21.32 (-%5.1)	22.12 (-%1.5)	21.13 (-%6.0)
150	16.66	14.99 (-%10.0)	13.64 (-%18.2)	12.95 (-%22.3)	12.99 (-%22.1)
200	9.38	8.56 (-%8.8)	8.22 (-%12.4)	7.55 (-%19.5)	8.01 (-%14.7)
250	7.74	6.94 (-%10.3)	6.53 (-%15.7)	6.36 (-%17.9)	6.38 (-%17.5)
300	6.02	5.63 (-%6.5)	5.34 (-%11.3)	5.26 (-%12.7)	5.38 (-%10.6)
Ortalama	12.45	11.58 (-%7.7)	11.01 (-%12.5)	10.85 (-%14.8)	10.78 (-%14.2)
VDÖ					
Ḃ (l/sa.)	Su	SiC-su			
	%0	%0.25	%0.50	%0.75	%1.00
100	-	0.97	0.95	0.98	0.94
150	-	0.90	0.82	0.78	0.78
200	-	0.91	0.88	0.80	0.85
250	-	0.90	0.84	0.82	0.82
300	-	0.94	0.89	0.87	0.89
Ortalama	-	0.92	0.87	0.85	0.86

Nanoakışkanların PDÖ sonuçlarının saf geleneksel aracı akışkanlara göre değişimi; Karimi ve ark., 2020 için en az -%22.3 iken en fazla -%1.5'dir. Yılmaz ve ark., 2022 için en az -%33.1 iken en fazla +%8.3, Gürbüz ve ark., 2020 için en az -%8.2 iken en fazla +%4.4 ve Saleh ve Sundar, 2021 için en az ve en fazla sırasıyla -%24.7 ve +%0.3'dür. VDÖ sonuçları ise; Karimi ve ark., 2020 için 0.78-0.98 aralığında, Yılmaz ve ark., 2022 için 0.67-1.08 aralığında, Gürbüz ve ark., 2020 için 0.92-1.04 aralığında ve Saleh ve Sundar, 2021 için 0.75-1.01 aralığında değişmektedir.

Isı değiştiricilerde saf geleneksel aracı akışkanlara göre ısı güçteki (ısı geçişindeki iyileşme) ve pompalama gücündeki (basınç kaybındaki) artışlar sırasıyla; Karimi ve ark., 2020 için %1.8-%19.3 ve %5.2-%44.5, Yılmaz ve ark., 2022, için %3.9-%18.2 ve %2.6-%62.6, Gürbüz ve ark., 2020 için %2.9-%17.1 ve ortalama %12.1 ve Saleh ve Sundar, 2021 için %3.5-%21.2 ve %4.5-%60.8 aralığındadır. Bu sonuçlara göre, pompalama güçlerindeki yüzde artışların ısı güçlerindeki yüzde artışlara oranlarının ortalaması sırasıyla; Karimi ve ark., 2020 için 3.9 kat, Yılmaz ve ark., 2022, için 3.1 kat, Gürbüz ve ark., 2020 için 1.8 kat ve Saleh ve Sundar, 2021 için 2.3 kat daha fazladır.

Dolayısıyla ilk bakışta, geleneksel saf aracı akışkanlar yerine nanoakışkanların kullanılmasıyla ısı güçte artış (ısı geçişinde iyileşme) sağlanıyor gibi görünse de geleneksel saf aracı akışkanlarla karşılaştırıldığında, nanoakışkanların pompalama gücündeki (basınç kaybındaki) artışlar daha fazladır. Bu nedenle geleneksel saf aracı akışkanlarla karşılaştırıldığında nanoakışkanlar, enerji verimliliği bakımından ısı güç ve pompalama gücü arasındaki dengeyi olumsuz yönde etkilemektedir. Enerji

verimliliğindeki bu olumsuz değişim; kaynaklarda SiO₂-su nanoakışkanı için Ferrouillat ve ark., 2011, Al₂O₃-su nanoakışkanı için Roy ve ark., 2012 ve propilen glikol(%20)/su(%80) içerisine B₄C, TiB₂ ve B₄C/TiB₂ nano tozları-katı parçacıkları ilave edilerek hazırlanan nanoakışkanlar için Vallejo ve ark., 2023 tarafından verilen sonuçlarla da benzerdir.

Çizelge 2. Yılmaz ve ark., 2022 için PDÖ ve VDÖ sonuçları

PDÖ				
Ṡ (l/sa.)	Su	Al ₂ O ₃ -su		
	%0	%0.2	%0.4	%0.8
125	3377.74	2613.55 (-%22.6)	2549.14 (-%24.5)	2591.94 (-%23.3)
150	2382.74	1780.33 (-%25.3)	2036.62 (-%14.5)	1792.98 (-%24.8)
175	1692.69	1326.31 (-%21.6)	1578.87 (-%6.7)	1132.40 (-%33.1)
200	1201.02	950.48 (-%20.9)	1072.36 (-%10.7)	811.50 (-%32.4)
225	961.60	773.99 (-%19.5)	898.62 (-%6.5)	711.67 (-%26.0)
250	697.58	577.82 (-%17.2)	653.22 (-%6.4)	505.56 (-%27.5)
275	594.31	507.71 (-%14.6)	576.98 (-%2.9)	441.09 (-%25.8)
300	461.70	416.33 (-%9.8)	424.32 (-%8.1)	380.00 (-%17.7)
325	364.39	340.86 (-%6.5)	394.63 (+%8.3)	305.01 (-%16.3)
350	311.07	238.47 (-%23.3)	313.94 (+%0.9)	299.74 (-%3.6)
375	266.28	215.50 (-%19.1)	257.17 (-%3.4)	240.12 (-%9.8)
400	220.54	174.36 (-%20.9)	205.66 (-%6.8)	197.79 (-%10.3)
450	162.29	141.34 (-%12.9)	160.97 (-%0.8)	141.12 (-%13.0)
500	120.38	107.74 (-%10.5)	121.81 (+%1.2)	103.99 (-%13.6)
550	94.27	80.73 (-%14.4)	94.92 (+%0.7)	85.77 (-%9.0)
600	75.88	58.06 (-%23.5)	71.44 (-%5.9)	68.77 (-%9.4)
Ortalama	811.53	643.97 (-%17.7)	713.17 (-%5.4)	613.09 (-%18.5)
VDÖ				
Ṡ (l/sa.)	Su	Al ₂ O ₃ -su		
	%0	%0.2	%0.4	%0.8
125	-	0.77	0.75	0.77
150	-	0.75	0.85	0.75
175	-	0.78	0.93	0.67
200	-	0.79	0.89	0.68
225	-	0.80	0.93	0.74
250	-	0.83	0.94	0.72
275	-	0.85	0.97	0.74
300	-	0.90	0.92	0.82
325	-	0.94	1.08	0.84
350	-	0.77	1.01	0.96
375	-	0.81	0.97	0.90
400	-	0.79	0.93	0.90
450	-	0.87	0.99	0.87
500	-	0.89	1.01	0.86
550	-	0.86	1.01	0.91
600	-	0.77	0.94	0.91
Ortalama	-	0.82	0.95	0.81

Nanoakışkanların aynı hacimsel debide (ortalama akış hızında) saf geleneksel aracı akışkana göre daha büyük pompalama gücü gereksinimleri, viskozitenin artmasıyla açıklanabilir. Yani, viskozitesi yüksek nanoakışkanların, artan akış kaynaklı basınç düşümleri nedeniyle, aynı debideki pompalama gücü ihtiyaçları saf geleneksel aracı akışkandan daha büyüktür. Bu da nanoakışkanların PDÖ ve VDÖ sonuçlarını olumsuz etkilemiştir.

Hacimsel debi arttıkça, nanoakışkanların basınç düşümü ve pompalama gücünde görülen artış, nanoakışkanların konsantrasyonu (nano tozların-katı parçacıkların) arttıkça daha belirgin hale gelmektedir. Bu sonuç, performans ölçütlerindeki düşmenin, nanoakışkanların viskozitelerinin saf geleneksel aracı akışkana göre yükselmesinden kaynaklandığını göstermektedir. Nitekim

konsantrasyonu yüksek nanoakışkanların PDÖ ve VDÖ sonuçları, konsantrasyonu düşük nanoakışkanların sonuçlarına göre daha düşüktür. Ayrıca nanoakışkanların konsantrasyonu artıkça, nanoakışkanların yoğunlukları artmakla birlikte, özgül ısıları azalmaktadır. Başka bir ifadeyle, aynı hacimsel debide nanoakışkanların yükselen konsantrasyona bağlı olarak kütleli debileri artarken, ısı kapasiteleri aynı oranda artmamaktadır.

Çizelge 3. Gürbüz ve ark., 2020 için PDÖ ve VDÖ sonuçları

PDÖ				
Re	Su	Al ₂ O ₃ -su	CuO-su	Al ₂ O ₃ +CuO-su
1650	9.07	8.68 (-%4.27)	9.00 (-%0.81)	9.41 (+%3.77)
2200	11.61	11.08 (-%4.53)	11.57 (-%0.33)	12.13 (+%4.45)
2750	14.89	13.73 (-%7.77)	14.04 (-%5.66)	15.09 (+%1.35)
3290	17.46	16.02 (-%8.24)	16.82 (-%3.65)	17.49 (+%0.13)
3840	20.42	18.84 (-%7.74)	19.47 (-%4.67)	20.34 (-%0.42)
Ortalama	14.69	13.67 (-%6.51)	14.18 (-%3.03)	14.89 (+%1.86)
VDÖ				
Re	Su	Al ₂ O ₃ -su	CuO-su	Al ₂ O ₃ +CuO-su
1650	-	0.96	0.99	1.04
2200	-	0.95	1.00	1.04
2750	-	0.92	0.94	1.01
3290	-	0.92	0.96	1.00
3840	-	0.92	0.95	1.00
Ortalama	-	0.93	0.97	1.02

Çizelge 4. Saleh ve Sundar, 2021 için PDÖ ve VDÖ sonuçları

PDÖ				
ṽ (l/dk.)	Su	Ni-su	%0.3	%0.6
	%0	%0.1		
3	13.21	13.25 (%0.32)	12.56 (-%4.92)	12.37 (-%6.39)
4	8.46	7.99 (-%5.62)	7.23 (-%14.60)	7.11 (-%16.00)
5	5.65	5.37 (-%5.08)	4.93 (-%12.77)	4.74 (-%16.09)
6	4.22	4.03 (-%4.43)	3.65 (-%13.44)	3.55 (-%15.98)
7	3.45	3.04 (-%11.88)	2.72 (-%21.33)	2.60 (-%24.66)
Ortalama	7.00	6.74 (-%5.34)	6.22 (-%13.41)	6.07 (-%15.82)
VDÖ				
ṽ (l/dk.)	Su	Ni-su	%0.3	%0.6
	%0	%0.1		
3	-	1.01	0.96	0.91
4	-	0.94	0.85	0.84
5	-	0.95	0.87	0.83
6	-	0.95	0.87	0.83
7	-	0.88	0.79	0.75
Ortalama	-	0.95	0.87	0.83

Bahsedilen nedenlerle; aynı hacimsel debilerdeki nanoakışkanlara ve saf geleneksel aracı akışkanlara ait deneysel ısı geçişi ve basınç düşümü sonuçları birlikte değerlendirilerek elde edilen PDÖ ve VDÖ sonuçları, saf geleneksel aracı akışkanların, akış enerjisini taşınımıyla ısı geçişine dönüştürmede, nanoakışkanlara göre daha başarılı olduklarını göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda, endüstriyel tesislerin enerji bütçesi bakımından, nanoakışkanların dezavantajlı olduğunu da göstermektedir. Dolayısıyla nanoakışkanların kullanılması, enerji verimliliği bakımından bu dezavantajlarının önemsiz (yüksek ısı akılarının enerji maliyetlerinden daha öncelikli) olduğu çok özel uygulamalarda tercih edilebilir.

SONUÇ

Isı geçişini iyileştirmek amacıyla hazırlanan nanoakışkanların, endüstriyel ısı değiştiricilerin ısı ve hidrodinamik performanslarına etkileri, açık kaynaklarda yayımlanmış deneysel araştırmaların

sonuçları kullanılarak değerlendirilmiştir. Başka bir ifadeyle, nanoakışkanların ısı sistemlerinin enerji verimliliğine etkileri gösterilmiştir. Yayınlanmış deneysel veriler kullanılarak yapılan değerlendirmeler ve karşılaştırmalarda, aracı akışkanlara aktarılan ısı gücünün ve akış için gerekli pompalama gücünün birlikte ele alındığı iki farklı değerlendirme ölçütü (PDÖ ve VDÖ) kullanılmıştır.

Yapılan değerlendirmelerde, yaygın kullanılan geleneksel aracı sıvılara aktarılan ısı güç ve akış için gerekli pompalama gücü arasındaki dengenin, nanoakışkanlarla yapılan deneylerde pompalama gücündeki artış nedeniyle, olumsuz yönde değiştiği gösterilmiştir. Diğer bir deyişle, nanoakışkanlarla, geleneksel aracı sıvılara göre ısı geçişinde iyileşme sağlansa da akış için gerekli pompalama gücü oransal olarak daha fazla artmıştır. Dolayısıyla, nanoakışkanlar gibi yeni aracı akışkanların ya da farklı iyileştirme yöntemlerinin ısı sistemlerine etkileri değerlendirilirken, ısı geçişindeki iyileşmenin yanında, pompalama gücü gibi sistemin genel enerji veriminde etkili diğer faktörleri de göz önünde bulunduran yaklaşımlar izlenmelidir.

Sonuç olarak kaynaklar arasından seçilerek ele alınan, yayınlanmış deneysel araştırmaların verileri kullanılarak hesaplanan PDÖ ve VDÖ sonuçları ile yapılan karşılaştırmalara göre; gövde borulu ve levhali ısı değiştiricilerde yaygın kullanılan geleneksel aracı sıvıları, nanoakışkanlarla değiştirmenin genel enerji verimliliği bakımından uygun olmadığı gösterilmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Alfa Laval. (2022, November 21). Erişim adresi: <https://www.alfalaval.my/products/heat-transfer/plate-heat-exchangers/gasketed-plate-and-frame-heat-exchangers/heat-exchanger/how-plate-heat-exchanger-work/>. Erişim adresi: 21 11, 2022).
- Bianco, V., Manca, O., Nardini, S. ve Vafai, K. (2015). *Heat Transfer Enhancement with Nanofluids*. Boca Raton: CRC Press.
- Ferrouillat, S., Bontemps, A., Ribeiro, J.-P., Gruss, J.-A., ve Soriano, O. (2011). Hydraulic and heat transfer study of SiO₂/water nanofluids in horizontal tubes with imposed wall temperature boundary conditions. *International Journal of Heat and Fluid Flow*, 32(2), 424–439. doi: 10.1016/j.ijheatfluidflow.2011.01.003
- Genceli, O. F. (1999). *Isı Değiştiricileri*. İstanbul: Birsen Yayınevi.
- Gürbüz, E. Y., Sözen, A., Variyenli, H. İ., Khanlari, A., ve Tuncer, A. D. (2020). A comparative study on utilizing hybrid-type nanofluid in plate heat exchangers with different number of plates. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, 42(10), 524. doi:10.1007/s40430-020-02601-1
- Hesselgreaves, J.E., Richard, L., ve Reay, D.A. (2016). *Compact Heat Exchangers Selection, Design and Operation (Second)*. United Kingdom: Butterworth-Heinemann.
- Kakaç, S., Liu, H., & Pramuanjaroenkij, A. (2012). *Heat Exchangers Selection, Rating, and Thermal Design (Third)*. New York: CRC Press.
- Karimi, S., Heyhat, M. M., Isfahani, A. H. M., ve Hosseinian, A. (2020). Experimental investigation of convective heat transfer and pressure drop of SiC/water nanofluid in a shell and tube heat exchanger. *Heat and Mass Transfer*, 56(8), 2325–2331. doi:10.1007/s00231-020-02844-7

- Klaren Tech. (2022, November 21). Erişim adresi: <https://klarenbv.com/heat-exchanger-basics/>.(Erişim adresi: 21 11, 2022).
- Ma, L., Yang, J., Liu, W., ve Zhang, X. (2014). Physical quantity synergy analysis and efficiency evaluation criterion of heat transfer enhancement. *International Journal of Thermal Sciences*, 80, 23–32. doi: 10.1016/j.ijthermalsci.2014.01.021
- Pandey, S. D., ve Nema, V. K. (2012). Experimental analysis of heat transfer and friction factor of nanofluid as a coolant in a corrugated plate heat exchanger. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 38, 248–256. doi: 10.1016/j.expthermflusci.2011.12.013
- Roy, G., Gherasim, I., Nadeau, F., Poitras, G., ve Nguyen, C. T. (2012). Heat transfer performance and hydrodynamic behavior of turbulent nanofluid radial flows. *International Journal of Thermal Sciences*, 58, 120-129. doi: 10.1016/j.ijthermalsci.2012.03.009
- Saleh, B., ve Sundar, L. S. (2021). Experimental study on heat transfer, friction factor, entropy and exergy efficiency analyses of a corrugated plate heat exchanger using Ni/water nanofluids. *International Journal of Thermal Sciences*, 165, 106935. doi: 10.1016/j.ijthermalsci.2021.106935
- Serth, R. W. (2014). *Process Heat Transfer*. Elsevier. doi:10.1016/C2011-0-07242-3
- Vallejo, J. P., Ansia, L., Calviño, U., Marcos, M. A., Fernández-Seara, J., ve Lugo, L. (2023). Convection behaviour of mono and hybrid nanofluids containing B₄C and TiB₂ nanoparticles. *International Journal of Thermal Sciences*, 189, 108268. doi: 10.1016/j.ijthermalsci.2023.108268
- Webb, R. L. ve Kim, N. H. (2005). *Principles of Enhanced Heat Transfer (2nd Ed.)*. New York: Taylor and Francis.
- Yang, J., Yang, X., Wang, J., Chin, H. H., ve Sundén, B. (2022). Review on Thermal Performance of Nanofluids With and Without Magnetic Fields in Heat Exchange Devices. *Frontiers in Energy Research*, 10. doi:10.3389/fenrg.2022.822776
- Yılmaz, M. S., Ünverdi, M., Küçük, H., Akcakale, N., ve Halıcı, F. (2022). Enhancement of heat transfer in shell and tube heat exchanger using mini-channels and nanofluids: An experimental study. *International Journal of Thermal Sciences*, 179, 107664. doi: 10.1016/j.ijthermalsci.2022.107664
- Zhang, Y. (2013). *Nanofluids Research, Development and Applications*. Columbia: Nova Publishers.

Atf İçin: Güner, E. (2023). İğdir İlinde Güneş Enerjisi Uygulamaları için Optimum Panel Eğim Açısının Belirlenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2905-2914.

To Cite: Güner, E. (2023). Determination of the Optimal Tilt Angles for Solar Energy Applications in İğdir Province. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2905-2914.

İğdir İlinde Güneş Enerjisi Uygulamaları için Optimum Panel Eğim Açısının Belirlenmesi

Erdoğan GÜNER^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Eğim açısının etkisi gösterilmiştir
- Aylık optimum eğim açıları belirlenmiştir
- Aylık enerji kazancı hesaplanmıştır

Anahtar Kelimeler:

- İğdir
- eğim açısı
- güneş enerjisi
- güneş radyasyonu
- pv panel

ÖZET:

Bu çalışmada İğdir ilinde gerçekleştirilmesi planlanan güneş enerjisi uygulamaları için güneş enerjisinden en etkin bir şekilde yararlanmayı sağlayacak optimum panel eğim açıları aylık olarak belirlenmiştir. Bu amaçla güneş panelleri üzerine gelen aylık ortalama günlük toplam güneş radyasyonu (H_T) değerleri panelin eğim açısına göre hesaplanmıştır. Eğim açısı her ay için 0° ile 90° arasında 1° artımlarla değiştirilmiştir. Her aydaki en yüksek H_T değerini veren açı optimum açı olarak alınmıştır. Daha sonra aylık optimum açılardaki H_T değerleri ile panellerin yatay, enlem açısı ile, enlem açısı $\pm 15^\circ$ ile ve mevsimlik ortalama optimum açı ile yerleştirilmesi durumlarında elde edilen H_T değerleri karşılaştırılmıştır. Haziran ayında optimum açı 0° olarak elde edilirken Ocak ve Aralık aylarında optimum açının 58° olduğu görülmüştür. Panellerin aylık optimum açılar ile yerleştirilmesi durumu diğer durumlara göre %0.02 ile %55.61 arasında yüzeye daha fazla güneş radyasyonunun ulaşmasını sağlamıştır. Enlem açısına göre yerleştirilme durumuna kıyasla Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında sırasıyla %13.35, %20.89 ve %17.46'lık bir enerji kazancı sağlanmıştır. En düşük güneş radyasyonu kazancı mevsimlik ortalama optimum açıyla yerleştirilmesi durumuna göre Ekim ayında, en yüksek kazanç ise panellerin yıl boyunca yatay yerleştirilmesi durumuna göre Ocak ayında elde edilmiştir.

Determination of the Optimal Tilt Angles for Solar Energy Applications in İğdir Province

Highlights:

- The effect of tilt angle is shown
- The monthly tilt angle is determined
- The monthly energy gain is calculated

Keywords:

- İğdir
- tilt angle
- solar energy
- solar radiation
- pv panel

ABSTRACT:

In this study, the optimum panel tilt angles were determined monthly in order to benefit from solar energy more effectively for solar energy applications to be carried out in İğdir province. For this purpose, the monthly average daily total solar radiation (H_T) values on the solar panels were calculated according to the tilt angle of the panel. The tilt angle was changed from 0° to 90° in 1° increments for each month. The angle giving the highest H_T value in each month was taken as the optimum angle. Then, the H_T values at monthly optimum angles and the H_T values obtained when the panels are placed horizontally, with latitude angle, latitude angle $\pm 15^\circ$ and seasonal average optimum angle were compared. While the optimum angle was obtained as 0° in June, it was observed that the optimum angle was 58° in January and December. Placing the panels with monthly optimum angles provided 0.02% to 55.61% more solar radiation to reach the surface compared to other conditions. Compared to the latitude angle, an energy gain of 13.35%, 20.89% and 17.46% was achieved in May, June and July, respectively. The lowest solar radiation gain was obtained in October, compared to the seasonal average optimum angle, and the highest gain was obtained in January, compared to the placing horizontally throughout the year.

¹Erdoğan GÜNER ([Orcid ID: 0000-0003-4604-5485](https://orcid.org/0000-0003-4604-5485)), Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Erdoğan GÜNER, e-mail: erdoganguner@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Dünyadaki nüfus ve enerji artışı ile birlikte enerji ihtiyacı da ortaya çıkmaktadır. Günümüzde bu ihtiyacın önemli bir kısmı hâlâ fosil kökenli yakıtlardan karşılanmaktadır. Fosil yakıtlar aydınlatmadan ulaşım, ısıtma ve soğutma uygulamalarından güç üretiminde kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Ancak bu kullanımlar esnasında çevreye ve dolayısıyla insan sağlığına zararlı gazlar da atmosfere atılmaktadır. Hem sağlık ve çevreye olan duyarlılığın artması hem de fosil kökenli mevcut rezervlerin azalması alternatif, temiz ve yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelme neden olmaktadır. Bunun yanı sıra zaman zaman ortaya çıkan enerji krizleri de ülkeleri dünyanın her tarafında bulunabilecek kaynaklara yönelmektedir.

Güneş enerjisi yenilenebilir enerji kaynaklarından biridir. Diğer enerji türlerine göre bol, temiz ve yerel uygulamalara elverişlidir. Bu avantajları güneş enerjisini oldukça cazip hale getirdiğinden güneş enerjisinden yararlanan sistemlerin sayısı da her geçen gün artmaktadır. Enerji, güneşten radyasyon yoluyla dünyaya ulaştığı için güneş enerjisinin asıl kaynağı da güneş radyasyonudur. Radyasyondan elde edilecek enerji miktarını etkileyen en önemli parametrelerden birisi kaynak ile yüzey arasındaki açıdır. Güneş radyasyonundan daha etkin bir şekilde yararlanılması için dünyanın hareketleri nedeniyle sürekli olarak değişen bu açının optimum değeri belirlenmelidir. Literatürde farklı şehirler ve bölgeler için bu değerleri hesaplayan birçok çalışma mevcuttur.

(Al-Sayyab ve ark., 2019) Basra şehrinde eğim açısının PV panellerdeki güç üretimine etkisini teorik ve deneysel olarak incelemişlerdir. Sonuç olarak eğim açısının yıllık optimum değerinin 28° olduğunu ifade etmişlerdir.

(Conceição ve ark., 2019) Güney Portekiz’de PV bilgi sisteminden elde ettikleri verilerle kirlenmenin de etkisini içeren bir ışınım modeli oluşturmuşlar ve bu model ile kirli bir sistem için optimum eğim açısı hesaplamışlardır. Ayrıca, optimum eğim açısının uygulanmasıyla elde edilecek enerji kazancı ile sistemin eğim açısının değiştirilebilir hale getirilmesi için gerekli maliyet arasındaki dengeyi dikkate alarak optimum tasarımı seçmek için bir ekonomik analiz gerçekleştirmişlerdir.

(Jacobson ve Jadhav, 2018) tüm ülkelerdeki PV panellerin optimum eğim açılarını tahmin etmek üzerine yürüttükleri çalışmada gerekli verileri Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarındaki bir program aracılığıyla elde etmişlerdir. Optimum eğim açısını enlem açısının bir fonksiyonu olarak üçüncü dereceden basit bir eşitlik ile elde etmişlerdir.

Ülkemizdeki iller üzerine yapılan çalışmalardan (Kacira ve ark., 2004) Şanlıurfa’nın eğimli PV yüzey üzerindeki toplam güneş radyasyonunu tahmin etmek ve optimum eğim açısını belirlemek için matematiksel bir model kullanmışlardır. Aylık olarak belirlenen optimum açılarla elde edilecek olan güneş radyasyonu değerlerini mevsimlik ve enlem açısına eşit eğimli yüzeyler ile karşılaştırmışlar ve PV panellerin aylık optimum eğim açılarıyla yerleştirilmesinin sırasıyla %1.1 ve %3.9’luk bir güneş radyasyonu kazancı sağladığını ifade etmişlerdir.

(Ulgen, 2006) İzmir ilinde eğimli yüzeye sahip güneş kolektörü üzerine gelen toplam radyasyon değerlerini tahmin etmek ve optimum eğim açısını belirlemek için matematiksel model kullanmıştır. Optimum açıları Haziran ayı için 0° ve Aralık ayı için 61° olarak bulmuştur. Mevsimlik açıları ve yıllık ortalama sabit açı ile kıyasladığında güneş kolektörünün toplayabileceği en yüksek enerjinin optimum açı ile yerleştirilmesi durumunda elde edilebileceğini görmüştür.

(Bakirci, 2012a) Erzurum ili için optimum eğim açıları hesaplamış ve bu verileri mevsimsel ve yıllık verilerle karşılaştırmıştır. Ayrıca optimum açıları veren korelasyonlar da türetmiştir.

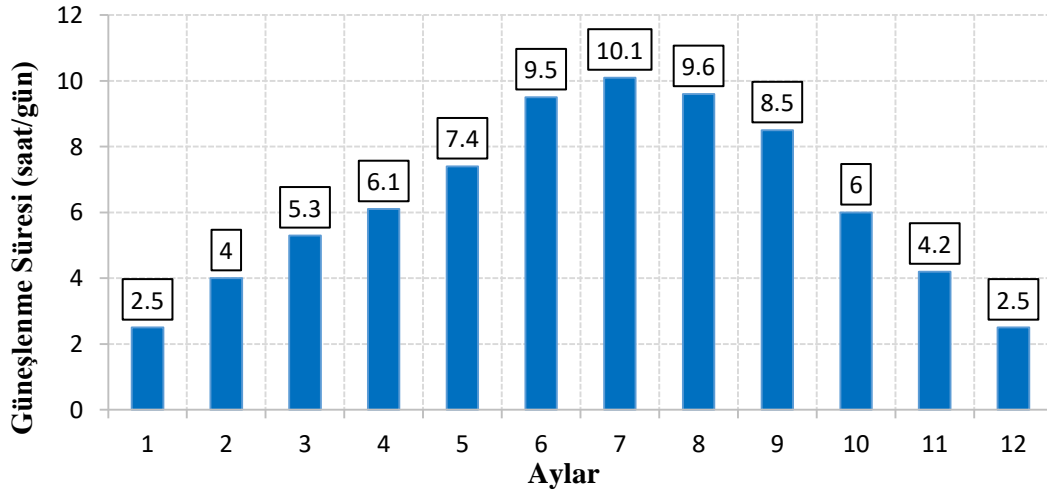
(Şahin, 2019) ise optimum açının belirlenmesi için bir yapay sinir ağı modeli önermiştir. Modelini Sinop, İstanbul, Ankara, Elâzığ, İzmir, Şanlıurfa ve Mersin illerine ait veriler ile eğitmiş ve Eskişehir ilinin verileri ile de test etmiştir.

(Bakirci, 2012b) yürüttüğü çalışmada Türkiye’den belirlediği 8 büyük il için optimum eğim açıları hesaplamış ve bu açıları belirlemek için 1., 2. ve 3. dereceden modeller türetmiştir.

Iğdır ili için ise (Abed ve Al-Salami, 2022)’nin Türkiye üzerinde yaptığı çalışmada sadece kış sezonuna ait optimum açılardan bahsedilmiştir. Yapılan literatür taramasında belirtilen çalışmanın haricinde Iğdır ili için güneş radyasyonundan daha fazla yararlanmayı sağlayacak tüm aylar için aylık optimum açı değerlerini veren başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada Iğdır iline ait aylık optimum eğim açılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Optimum eğim açılarını belirlemek için eğimli yüzey üzerine gelen güneş radyasyonu değerleri kullanılmıştır. Güneş radyasyonu değerleri, eğimli yüzeyin 0° ile 90° arasında 1° artımlarla değiştirilmesiyle hesaplanmıştır. Daha sonra her ay için en yüksek H_T (eğimli yüzey üzerine gelen güneş radyasyonu) değerini veren açı değeri optimum olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu değerler farklı panel konumlandırma durumları için karşılaştırılmıştır. Farklı panel konumlandırma durumları; yıl boyunca yatay, enlem açısında (ϕ), Nisan-Eylül ayları için $\phi-15^\circ$, Ekim-Mart ayları için $\phi+15^\circ$ ve mevsimlik ortalama optimum açılarda konumlandırma durumlarıdır.

MATERYAL VE METOT

Dünyanın kendi etrafında dönmesi ile meydana gelen olaylar sebebiyle güneşten gelen radyasyondan en fazla güneşlenme süresi boyunca etkin bir şekilde yararlanılabilir. Türkiye’nin doğu sınırında bulunan Iğdır iline ait 1941-2022 yılları arası aylık ortalama günlük güneşlenme süreleri Şekil 1’de sunulmuştur.



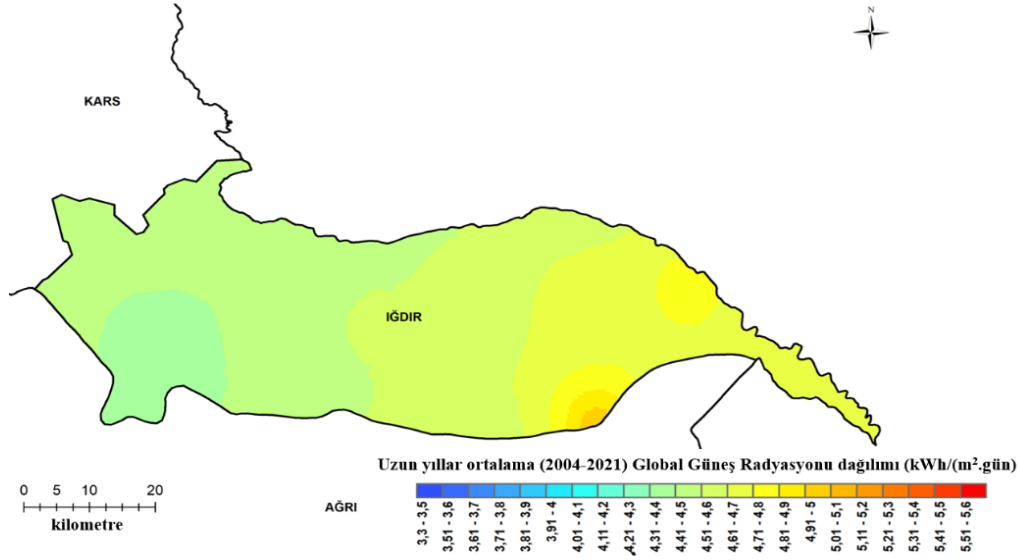
Şekil 1. Iğdır İli Aylık Ortalama Güneşlenme Süreleri

Iğdır ilinin en fazla güneşlenme süresinin 10.1 saat/gün ile Temmuz ayında, en az ise 2.5 saat/gün ile Ocak ve Aralık ayında olduğu Şekil 1’den görülmektedir. Iğdır için güneşlenme süresi yıllık ortalaması 6.3 saat/gün olarak elde edilmiştir. 1991-2021 yılları arası Türkiye ortalaması ise 6.74 saat/gün’dür (Anonim, 2023a). Iğdır’ın yıllık ortalama güneşlenme süresi hemen hemen Türkiye ortalamasına eşittir.

Türkiye’deki tüm iller için Meteoroloji Genel Müdürlüğü’nün internet sitesinde güneş ışınımı şiddeti yapılan bazı analizler ile değerlendirilmektedir. Bu analizlerden birisi de basit istatistiksel eşitliklere dayanan ve güneş ışınım denklemlerini çözen HELIOSAT modelidir. Bu model yardımıyla

global güneş radyasyonu, direkt ve difüz (yayılı) ışınımın açık hava şartlarında hesaplanmasıyla elde edilmektedir.

Şekil 2’de HELIOSAT modele göre İğdir ilinin ortalama global güneş radyasyonu dağılımı gösterilmiştir. İlgili şekilden İğdir ilinin doğu bölgelerinin batıya kıyasla daha fazla güneş radyasyonu aldığı görülmektedir. Özellikle güney doğusuna kalan bir bölgede güneş radyasyonu en üst seviyeye ulaşmıştır.



Şekil 2. İğdir İli Ortalama Global Güneş Radyasyonu Dağılımı (Anonim, 2023b)

Eğimli Yüze Gelen Güneş Işınımı

Eğimli yüzeye gelen toplam güneş radyasyonu, yatay düzleme gelen toplam ve difüz ışınım değerleri kullanılarak hesaplanmaktadır. Bu çalışmada, yatay düzleme gelen günlük toplam güneş ışınım miktarları (H) Meteoroloji Genel Müdürlüğü’nden alınmıştır. Difüz ışınım miktarı (H_d) için ise bazı eşitlikler kullanılmıştır.

Tam güneşe bakan (yüzey azimut açısı (γ) 0° olan) bir eğimli yüzey üzerine gelen aylık ortalama günlük toplam güneş ışınım miktarı (H_T) Eşitlik 1. ile hesaplanmaktadır.

$$H_T = RH \quad (1)$$

Burada R, eğik düzlem üzerine gelen günlük ortalama güneş ışınım değerinin yatay yüzeye gelen günlük ortalama güneş ışınım değerine oranıdır. R değeri (Liu ve Jordan, 1962) tarafından Eşitlik 2.’de verilen denklem ile hesaplanmaktadır.

$$R = \left(1 - \frac{H_d}{H}\right) R_b + H_d \left(\frac{1 + \cos(\beta)}{2H}\right) + \rho \left(\frac{1 - \cos(\beta)}{2}\right) \quad (2)$$

Burada H_d aylık ortalama günlük difüz ışınım miktarıdır. R_b eğik düzlem üzerine gelen direkt ışınımın yatay yüzey üzerine gelen direkt ışınımına oranı, β yüzeyin eğim açısı ve ρ çevrenin yansıtma katsayısıdır. Çevrenin yansıtma katsayısı 0.2 olarak kabul edilir. R_b ise (Liu ve Jordan, 1960) tarafından doğrudan ekvatora bakan yüzeyler için Eşitlik 3.’de verilen denklem ile hesaplanmaktadır.

$$R_b = \frac{\cos(\phi - \beta) \cos(\delta) \sin(\omega'_s) + \omega'_s(\pi/180) \sin(\phi - \beta) \sin(\delta)}{\cos(\phi) \cos(\delta) \sin(\omega_s) + \omega_s(\pi/180) \sin(\phi) \sin(\delta)} \quad (3)$$

Burada ϕ enlem açısı, δ deklinasyon açısı, ω_s güneş batış saat açısı ve ω'_s ise eğik yüzeyin güneş batış saat açısıdır. δ Eşitlik 4.’te gösterildiği gibi (Cooper, 1969) eşitliği ile, güneş batış saat açısı (ω_s) ve eğik yüzeyin güneş batış saat açısı (ω'_s) ise Eşitlik 5. ve Eşitlik 6.’daki ifadeler ile hesaplanır (Duffie ve Beckman, 1991):

$$\delta = 23.45 \sin \left[\frac{360(n+284)}{365} \right] \quad (4)$$

$$\omega_s = \arccos[-\tan(\phi)\tan(\delta)] \quad (5)$$

$$\omega'_s = \min\{\omega_s, \arccos[-\tan(\phi - \beta)\tan(\delta)]\} \quad (6)$$

Yatay yüzey üzerine gelen difüz ışınım (H_d) Eşitlik 7. ile hesaplanır (Page, 1961):

$$H_d = H(1.00 - 1.13K_T) \quad (7)$$

Burada K_T berraklık indeksidir ve Eşitlik 8. ile hesaplanır.

$$K_T = H/H_0 \quad (8)$$

Burada H_0 atmosfer dışındaki bir yatay yüzey üzerine gelen günlük toplam ışınım değeridir ve Eşitlik 9. ile hesaplanır (Duffie ve Beckman, 1991):

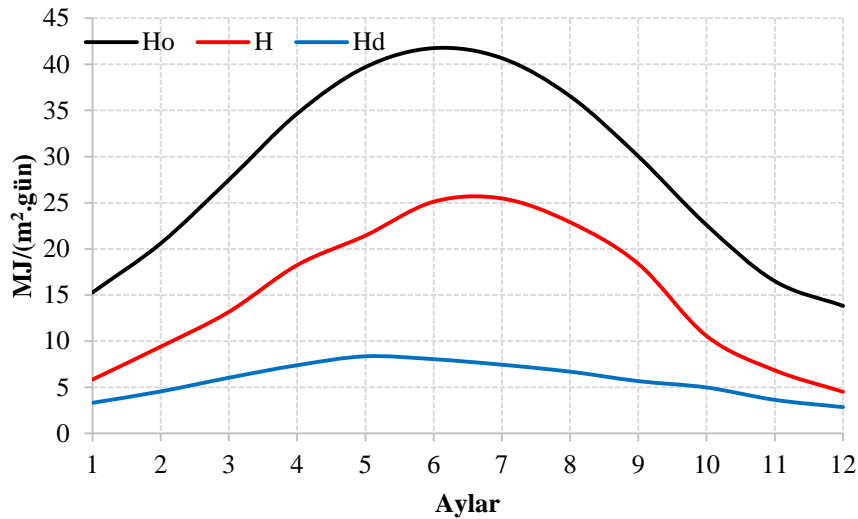
$$H_0 = \frac{24}{\pi} I_{sc} \left(1 + 0.033 \cos \frac{360n}{365}\right) \left(\cos \phi \cos \delta \sin \omega_s + \frac{\pi \omega_s}{180} \sin \phi \sin \delta\right) \quad (9)$$

Burada I_{sc} 1367 W/m² değerine sahip güneş sabitidir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

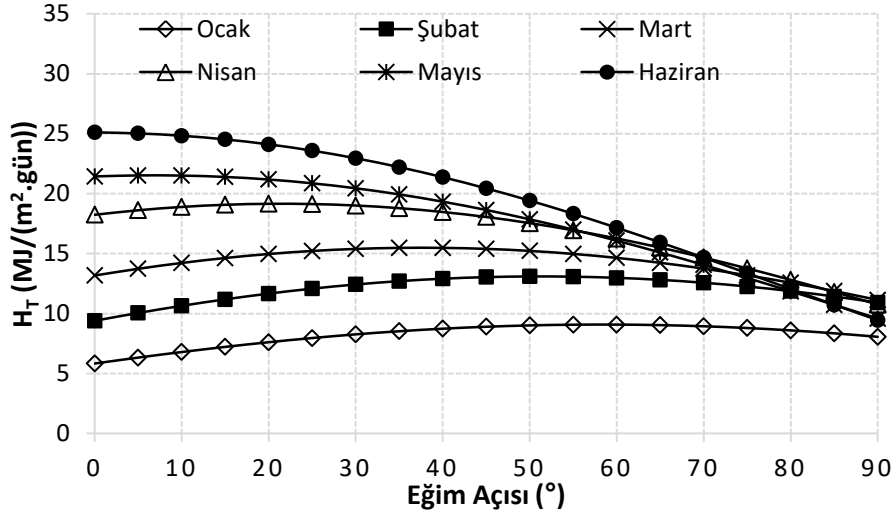
Bu çalışmada İğdır ilinde yürütülecek güneş enerjisi uygulamaları için panellerin hangi açıyla yerleştirilmesi durumunda en etkin bir şekilde güneş enerjisinden yararlanılabileceği araştırılmıştır. Bu nedenle eğik yüzeye gelen güneş radyasyonu (H_T) değerleri enlem açısına (ϕ), (belirtilen aylara göre) $\phi \pm 15^\circ$ açılara, mevsimlik ortalama optimum açılara ve aylık optimum açılara göre hesaplanmıştır. Ayrıca panellerin aylık optimum açılarla yerleştirilmesi durumunda elde edilen H_T değerleri diğer durumlarla elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

Güneş panellerinin yatay konumda iken üzerlerine gelen atmosfer dışı güneş ışınımı (H_0) değerleri ve İğdır ili için aylık ortalama günlük toplam güneş ışınımı (H) değerleri Şekil 3'te gösterilmiştir. Ayrıca difüz radyasyon (H_d) değerleri de ilgili şekilde verilmiştir. H değerleri Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nün ölçüm değerleri olup H_0 ve H_d değerleri gerekli bağıntılarla hesaplanmıştır.

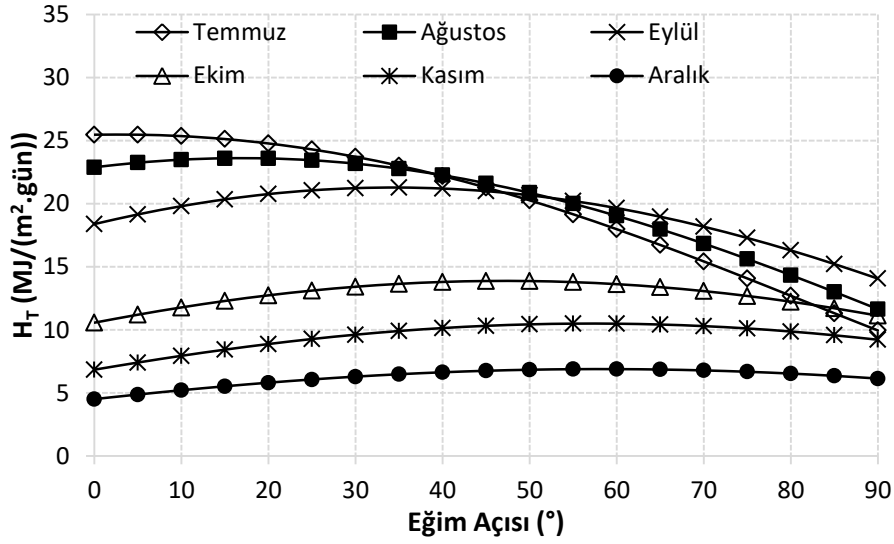


Şekil 3. İğdır İlinde Yatay Yüzeğe Gelen ve Atmosfer Dışı Güneş Radyasyonu ile Difüz Radyasyon Değerleri

Güneş radyasyonundan daha etkin bir şekilde yararlanmak için paneller belirli açılarla yerleştirilmelidir. Bu nedenle paneller genellikle sabit bir eğim açısında veya belirlenen optimum açılara göre yerleştirilirler. İğdır ili için eğimli yüzeye hangi açıda ne kadar güneş radyasyonu (H_T) geldiğini belirlemek için panel açısı 0° - 90° arasında 1° artımlarla değiştirilerek H_T değerleri hesaplanmıştır. Aylara göre H_T değerinin açıyla nasıl değiştiğinin daha iyi görülebilmesi için H_T değerleri 5° artımlarla hesaplanarak Şekil 4'te verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4. Iğdır İlinde Panel Eğim Açısına Göre H_T 'nin Değişimi: Ocak-Haziran İçin (a), Temmuz-Aralık İçin (b)

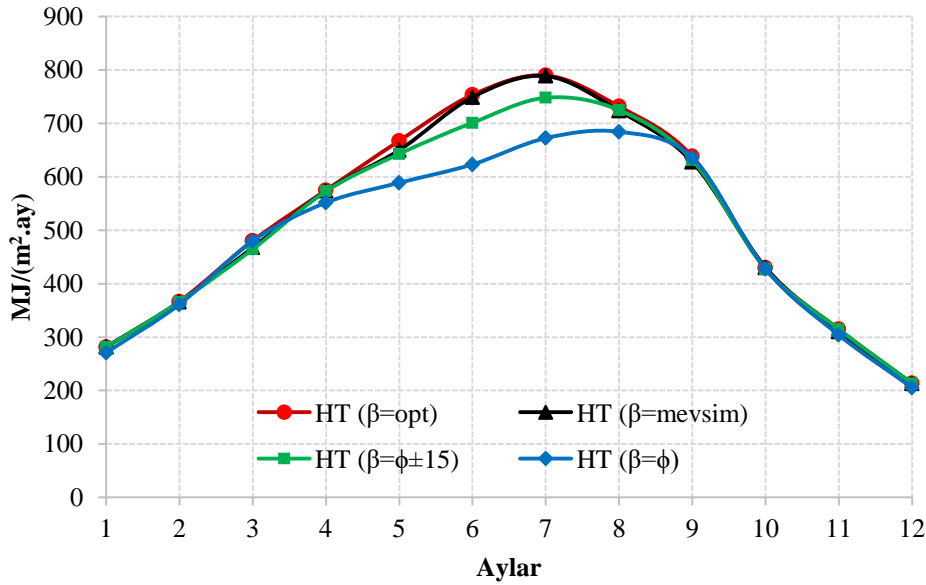
Şekil 4'ten Mayıs, Haziran ve Temmuz ayları için neredeyse 0° eğim açısında, yani paneller yatay konumlandırılmışken, en fazla güneş radyasyonuna maruz kaldığı görülmektedir. Diğer aylar için ise belli bir açı değerine kadar H_T 'de artış, daha sonra ise azalış olduğu ilgili şekilden açıkça anlaşılmaktadır. Her ay için eğim açısı 0° ile 90° arasında 1° artımlarla değiştirilirken maksimum H_T değerini veren açı değeri optimum açı (β_{opt}) olarak belirlenmiş ve bu açılar aylara göre Çizelge 1'de sunulmuştur. Çizelge 1'de gösterilen n değeri (1 Ocak'tan itibaren) bir aydaki toplam güneş radyasyonunun aylık ortalama değerine denk gelen o aydaki gün sayısını göstermektedir (Klein, 1977). Ayrıca, Iğdır ili için yatay yüzeye gelen (H), enlem açısına (ϕ) göre konumlandırılmış eğik yüzeye gelen ($H_T(\beta=\phi)$), Nisan-Eylül ayları için $\phi-15^\circ$ ve Ekim-Mart ayları için $\phi+15^\circ$ ile konumlandırılmış eğik yüzeye gelen ($H_T(\beta=\phi\pm 15)$), mevsimlik ortalama optimum açılara göre konumlandırılmış eğik yüzeye gelen ($H_T(\beta=mevsim)$) ve aylık optimum açılara göre konumlandırılmış eğik yüzeye gelen ($H_T(\beta=opt)$) aylık toplam güneş radyasyonu değerleri de ilgili çizelgede verilmiştir.

Çizelge 1. Iğdır İli İçin Sabit ve Değişken Açılı Bir Yüze Gelen Güneş Radyasyonu Değerleri

Aylar	n	β_{opt}	MJ/(m ² .ay)				
			H	$H_T(\beta=\phi)$	$H_T(\beta=\phi\pm 15)$	$H_T(\beta=mevsim)$	$H_T(\beta=opt)$
1	17	58	181.02	270.84	281.31	281.46	281.68
2	47	51	263.34	361.37	366.19	365.93	366.75
3	75	38	408.48	479.90	464.50	467.50	480.18
4	105	21	547.26	551.68	573.00	573.94	574.77
5	135	7	664.62	588.78	642.82	649.83	667.38
6	162	0	753.42	623.21	701.09	749.07	753.42
7	198	3	789.42	672.41	747.94	788.65	789.84
8	228	17	709.44	684.30	724.80	723.48	731.79
9	258	34	551.46	635.83	631.46	627.89	638.27
10	288	47	327.48	427.52	427.23	430.05	430.12
11	318	57	205.14	304.02	314.61	310.28	314.79
12	344	58	139.80	205.55	213.21	213.31	213.47
Toplam	MJ/(m².yıl)		5540.88	5805.41	6088.16	6181.39	6242.46

*n: Gün Sayısı, β : Eğim Açısı, ϕ : Enlem Açısı

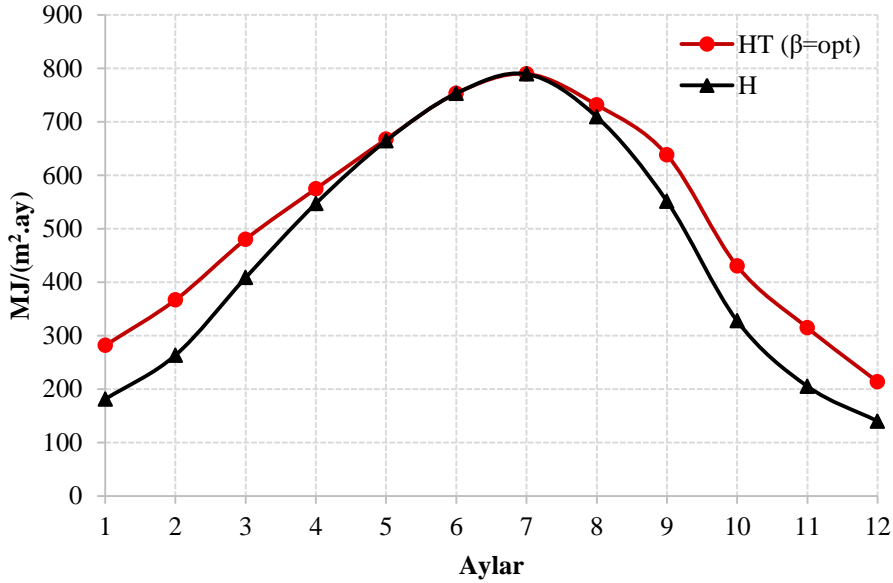
Çizelge 1'den panellerin, yıl boyunca yatay yerleştirilmesi durumunda toplam 5540.88 MJ/(m².yıl), eğim açısında (ϕ) yerleştirilmesi durumunda toplam 5805.41 MJ/(m².yıl), $\phi\pm 15^\circ$ ile yerleştirilmesi durumunda toplam 6088.16 MJ/(m².yıl), mevsimlere göre optimum açı ortalamasıyla yerleştirilmesi durumunda 6181.39 MJ/(m².yıl) ve aylık optimum açı ile yerleştirilmesi durumunda ise 6242.46 MJ/(m².yıl) değerinde bir güneş radyasyonuna maruz kalacağı görülmektedir. Çizelge 1'de farklı açılara göre aylık olarak verilen H_T değerleri Şekil 5'te görselleştirilmiştir.

Şekil 5. Farklı Eğim Açılarına Göre H_T Değerleri

Şekil 5'te Ocak, Şubat, Mart, Nisan, Eylül, Ekim, Kasım ve Aralık ayları için panellerin farklı açı değerine göre konumlandırılmasının yakın sonuçlar ürettiği görülmektedir. Bu aylar için belirtilen açılarla elde edilen H_T değerleri arasındaki farklar Çizelge 1'den detaylı bir şekilde incelenebilir. Ancak enlem açısına (ϕ) ve $\phi\pm 15^\circ$ ile yerleştirilen panellerin özellikle Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında önemli miktarda bir enerjiden yararlanmadığı ilgili şekilden açıkça görülmektedir. Çizelge 1 ve Şekil 5'ten anlaşılacağı gibi paneller üzerine gelen toplam güneş radyasyonu miktarı panellerin aylık optimum açı ile yerleştirilmesi durumunda elde edilebilmektedir.

Şekil 6'da panellerin yıl boyunca yatay yerleştirilmesi durumunda üzerine gelen güneş radyasyonu değeri ile aylık optimum açılara göre yerleştirilmesi durumları karşılaştırılmıştır. Panellerin Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında aylık optimum açı değerleri sırasıyla 7° , 0° ve 3°

olduğundan yatay konumla hemen hemen benzer radyasyon değerlerine sahiptir. Ancak diğer aylarda optimum açıyla yerleştirilmesinin yatay konuma göre önemli miktarda enerji kazancı sağlayacağı da ilgili şekilden açıkça görülmektedir.



Şekil 6. Panellerin Yatay ve Aylık Optimum Açılara Göre Yerleştirilmesi Durumunda Üzerine Gelen Güneş Radyasyonu Miktarı

Panellerin aylık optimum açı ile yerleştirilmesi durumunda ne kadar enerji kazancı sağlanacağı da Çizelge 2’de sunulmuştur.

Çizelge 2. Panellerin Aylık Optimum Açısı ile Yerleştirilmesi Durumundaki Enerji Kazancı (%)

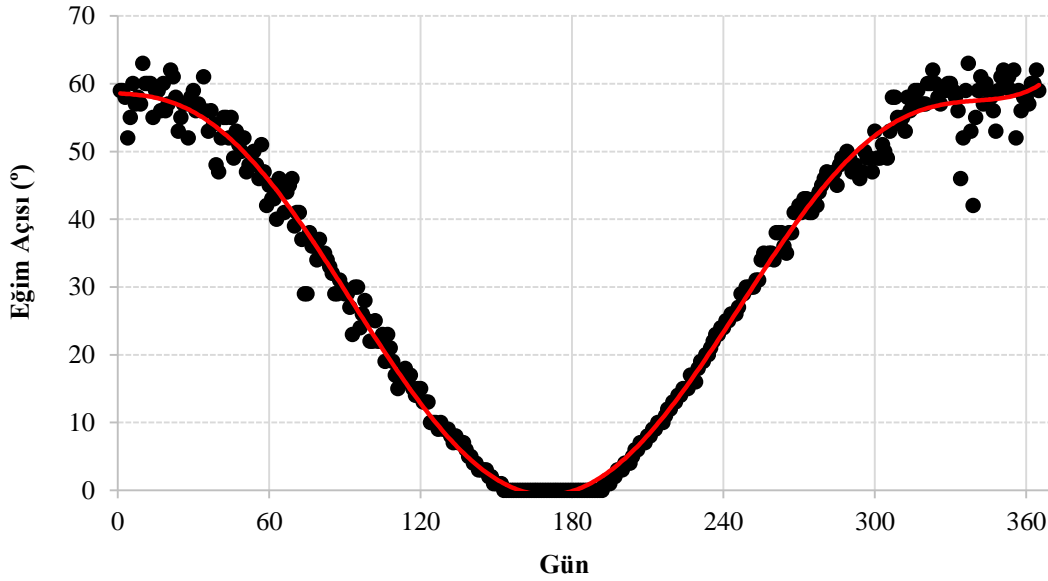
	Aylar											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H	55.61	39.27	17.55	5.03	0.42	0.00	0.05	3.15	15.74	31.34	53.45	52.70
H_T (β=φ)	4.00	1.49	0.06	4.18	13.35	20.89	17.46	6.94	0.38	0.61	3.54	3.85
H_T (β= φ±15)	0.13	0.15	3.38	0.31	3.82	7.46	5.60	0.96	1.08	0.68	0.06	0.13
H_T (β=mevsim)	0.08	0.23	2.71	0.15	2.70	0.58	0.15	1.15	1.65	0.02	1.46	0.08

β: Eğim Açısı, φ: Enlem Açısı

Çizelge 2 panellerin aylık optimum açı ile yerleştirilmesi durumundaki en yüksek kazancın yatay yüzeyle karşılaştırıldığında %55.61 ile Ocak ayında elde edilebileceğini ve en düşük kazancın da mevsimlik ortalama açıyla karşılaştırıldığında %0.02 ile Ekim ayında elde edileceğini göstermektedir. Ayrıca Haziran ayı için hesaplanan optimum açı değeri 0° olduğundan yatay düzleme göre herhangi bir kazanç olmadığı da ilgili çizelgeden görülmektedir.

Yılın günlerine göre optimum panel eğim açılarının değişimi Şekil 7’de, günlük ve aylık optimum açılara göre elde edilen enerji miktarları da Çizelge 3’te gösterilmiştir.

Şekil 7’de optimum eğim açılarının özellikle Ocak-Şubat ve Kasım-Aralık aylarında günlük olarak çok değiştiği ancak grafik üzerinde kırmızı çizgi ile gösterildiği gibi de bir eğilimin olduğu da görülmektedir. Bu değişimin temel sebebi İğdır ili için Meteoroloji Genel Müdürlüğünden alınan günlük güneş radyasyonu değerlerindeki değişimdir. Hava durumunda meydana gelen farklılık (özellikle bulutluluk miktarı) art arda gelen günler arasında radyasyon miktarında belirgin bir değişikliğe sebep olmuş ve bu değişim de optimum eğim açılarında Şekil 7’deki gibi değişime neden olmuştur.



Şekil 7. Yılın Günlerine Göre Optimum Panel Eğim Açılarının Değişimi

Panellerin günlük ve aylık optimum açılara göre yerleştirilmesi durumunda elde edilen enerji miktarları Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Panellerin Günlük ve Aylık Optimum Açılara Göre Yerleştirilmesi Durumunda Enerji Miktarları

H_T (β =günlük optimum)	6296.56 MJ/(m ² .yıl)
H_T (β =aylık optimum)	6242.46 MJ/(m ² .yıl)
Fark	0.86 (%)

Panellerin günlük optimum açılara göre yerleştirilmesi durumunda aylık optimum açılara kıyasla sadece %0.86'lık bir enerji kazancı sağlanacağı ilgili çizelgeden görülmektedir.

SONUÇ

Güneş panelleri çoğunlukla sabit açı ile yerleştirilmekte ve bu açı da genellikle ya enlem açısı olmakta ya da enlem açısına yakın olacak şekilde seçilmektedir. Ancak panel açısının değiştirilebilir olması güneş enerjisinden daha etkin bir şekilde yararlanmayı sağlar. İğdır ilinde gerçekleştirilecek güneş enerjisi uygulamaları için aylık optimum panel açılarının belirlendiği bu çalışmada optimum açılar Ocak ve Aralık ayları için 58°, Haziran ayı için ise 0° olarak bulunmuştur. Diğer aylar ise 0° ile 58° arasında değişmektedir. Aylık optimum açılara göre panellerin konumlandırılması diğer tüm durumlara göre enerji kazancı sağlamıştır. Enlem açısına (ϕ) göre yerleştirilme durumuna kıyasla aylık optimum açı ile Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında sırasıyla %13.35, %20.89 ve %17.46'lık bir enerji kazancı sağlanmıştır. Altı aylık dönemlere göre ($\phi \pm 15$ olacak şekilde) yerleştirilme durumuna kıyasla yine Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında sırasıyla %3.82, %7.46 ve %5.60 oranında bir enerji kazancı sağlanmıştır. Ay bazında optimum açı hesabına yaklaştığı için mevsimlik ortalama optimum açılara göre yerleştirilen panellerden yıl boyunca elde edilen kazanç diğer durumlara göre daha azdır. Bu durumda da en yüksek kazanç Mart ve Mayıs aylarında sırasıyla %2.71 ve %2.70 olarak elde edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yazar global güneş radyasyonu ve güneşlenme süresi verilerini sağladığı için Meteoroloji Genel Müdürlüğüne teşekkür eder.

KAYNAKLAR

- Abed, F. ve Al-Salami, Q. H. (2021). Calculate the best slope angle of photovoltaic panels theoretically in all cities in Turkey. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(10), 9639–9654. doi:10.1007/s13762-021-03797-y
- Anonim. (2023a). T.C. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı/Meteoroloji Genel Müdürlüğü. URL: <https://www.mgm.gov.tr/kurumici/turkiye-guneslenme-suresi.aspx?l=tg> (Erişim tarihi: Mayıs 25, 2023).
- Anonim. (2023b). T.C. Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı/ Meteoroloji Genel Müdürlüğü. URL: https://www.mgm.gov.tr/kurumici/radyasyon_iller.aspx?il=igdir (Erişim tarihi: Mayıs 25, 2023).
- Bakirci, K. (2012a). Correlations for optimum tilt angles of solar collectors: A case study in Erzurum, Turkey. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 34(11), 983–993. doi:10.1080/15567031003735279
- Bakirci, K. (2012b). General models for optimum tilt angles of solar panels: Turkey case study. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(8), 6149–6159. doi:10.1016/j.rser.2012.07.009
- Conceição, R., Silva, H. G., Fialho, L., Lopes, F. M. ve Collares-Pereira, M. (2019). PV system design with the effect of soiling on the optimum tilt angle. *Renewable Energy*, 133, 787–796. doi:10.1016/j.renene.2018.10.080
- Cooper, P. I. (1969). The absorption of radiation in solar stills. *Solar Energy*, 12(3), 333–346. doi:10.1016/0038-092x(69)90047-4
- Duffie, J. A. ve Beckman, W. A. (1991). *Solar Engineering of Thermal Processes*. Hoboken, NY: Wiley.
- Jacobson, M. Z. ve Jadhav, V. (2018). World estimates of PV optimal tilt angles and ratios of sunlight incident upon tilted and tracked PV panels relative to horizontal panels. *Solar Energy*, 169, 55–66. doi:10.1016/j.solener.2018.04.030
- Kacira, M., Simsek, M., Babur, Y. ve Demirkol, S. (2004). Determining optimum tilt angles and orientations of photovoltaic panels in SANLIURFA, Turkey. *Renewable Energy*, 29(8), 1265–1275. doi:10.1016/j.renene.2003.12.014
- Klein, S. A. (1977). Calculation of monthly average insolation on tilted surfaces. *Solar Energy*, 19(4), 325–329. doi:10.1016/0038-092x(77)90001-9
- Liu, B. Y. H. ve Jordan, R. C. (1960). The Interrelationship and characteristic distribution of direct, diffuse and total solar radiation. *Solar Energy*, 4(3), 1–19. doi:10.1016/0038-092x(60)90062-1
- Liu, B. Y. H. ve Jordan, R. C. (1962). Daily insolation on surfaces tilted toward the equator. *American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers*, 67, 526-541.
- Page, J. K. (1961). The Estimation of monthly mean values of daily total short-wave radiation on vertical and inclined surface from sunshine records for latitude 40°N to 40°S. *Proceedings of the UN Conference on New Sources of Energy*, 4, 378-390
- Shaker Al-Sayyab, A. K., Al Tmari, Z. Y. ve Taher, M. K. (2019). Theoretical and experimental investigation of photovoltaic cell performance, with optimum tilted angle: Basra City Case Study. *Case Studies in Thermal Engineering*, 14, 100421. doi:10.1016/j.csite.2019.100421
- Şahin, M. (2019). Determining optimum tilt angles of photovoltaic panels by using artificial neural networks in Turkey. *Tehnicki Vjesnik - Technical Gazette*, 26(3). doi:10.17559/tv-20160702220418
- Ulgen, K. (2006). Optimum tilt angle for solar collectors. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 28(13), 1171–1180. doi:10.1080/00908310600584524

Extension of Pick's Theorem to Spherical Geometry using Girard's Theorem

Halil Rıdvan ÖZ^{1*}

Highlights:

- Combination of Pick's and Girard's theorems for the area of spherical polygon
- Common statements of spherical excess and lattice points
- Extending to a more general theorem

ABSTRACT:

In this article, Pick's theorem is extended to three-dimensional bodies with two-dimensional surfaces, namely spherical geometry. The equation for the area of a polygon consisting of equilateral spherical triangles is obtained by combining Girard's theorem used to find area of any spherical triangle and Pick's theorem used to find area of a simple polygon with lattice point vertices in Euclidian geometry. Vertices of the polygon are represented by integer points. In this way, an equation to find area of a spherical polygon is presented. This equation could give an idea to be applied on cylindrical surfaces, hyperbolic geometry and more general surfaces. The theorem proposed in this article which is the extension of Pick's theorem using Girard's theorem seems to be a special case of a more general theorem.

Keywords:

- Pick's theorem
- Girard's theorem
- Spherical lattice
- Spherical geometry
- Planar geometry

¹Halil Rıdvan ÖZ ([Orcid ID: 0000-0002-3032-1388](https://orcid.org/0000-0002-3032-1388)), Iğdır University, Faculty of Engineering, Department of Mechanical Engineering, Iğdır, Türkiye

*Corresponding Author: Halil Rıdvan ÖZ, e-mail: hridvan.oz@igdir.edu.tr, hllrdvn@gmail.com

INTRODUCTION

This paper is about finding area of a spherical polygon. The polygon consists of equilateral spherical triangles. Areas of simple (containing no holes) polygons whose vertices are lattice points represented by integers in a plane can be calculated using Pick's theorem. The theorem considers the number of points at the boundary and interior of the polygon and it is valid for planes only. Although there are some studies for three-dimensional lattice points, the equation was not applied with general validity. The area of a single spherical triangle can be calculated using Girard's theorem. Although there are other methods for calculating area of any spherical polygo the method presented here is simple and more fundamental due to usage of Pick's theorem. This study unifies two different theorems and presents a way of calculating area of a simple spherical polygon consisting of equilateral triangles in terms of lattice points and excess angle. When the polygon is cut, the equation still holds due to nature of Pick's theorem and this property makes our proposal more general and usable for polygons containing arbitrary spherical triangles.

The pioneering work was done by Pick (1899). He proposed an equation for finding areas of planar polygons and intended to establish number theory on a geometric basis. He mentioned in its article that "...a more modest goal: an attempt is made to place the elements of number theory on a geometric basis from the outset (...bescheidenes ziel: es wird der Versuch gemacht, die elemente der Zahlentheorie von vorn herein auf geometrische basis zu stellen)". This claim could have been found exaggerous, but his theorem has been appreciated greatly and extensively due to its simplicity and beauty. The theorem was mainly used in plane polygons and its theory became even deeper.

Reeve (1958) tried to extend Pick's theorem into three dimensions. Honsberger (1970) proved the theorem using a primitive triangle having area of $1/2$. Triangulation is a method used in geodesy studies since the past. Gaskell et al. (1976) mentioned that Pick's theorem is more than area concept and actually a combinatorial result in topology. According to them, the lattice points may have irregular intervals and mentioned that three arcs can bound a simple closed curve without crossing. Hadwiger and Wills (1976) gave a general formula and used it for translations. Liu (1979) showed that Pick's theorem is topologically equivalent to the formula of Euler (edges, vertices and faces). Varberg (1985) extended Pick's theorem for a general lattice polygon. Scott (1987) presented some formulas from the literature for regular polygons, convex polygons and nonsimple polygons using Pick's theorem. Grunbaum and Shephard (1993) presented an extension to general lattice polygons with multiple vertices using oriented polygons.

Now we present some information about Girard's theorem. Several equations and theorems on spherical geometry were summarized in the great work of Todhunter (1886). Miller (1943) published seven lessons in the history of mathematics mentioning that T. Harriot noted a theorem about area of a spherical triangle in 1603, but A. Girard proved it in 1629. He also gave information about some researchers like Menelaus (70-140 CE), Nasir Eddin (1201-1274), F. Vieta (1540-1603), F. Maurolico (1558), and A. M. Legendre (1752-1853). Bevis and Cambareri (1987) computed the area of a spherical polygon having arbitrary shape using summation equation and numbering its vertices in two directions. Brooks and Strantzen (2005) used a spherical triangle of area π to tile on a sphere and proved that an isosceles tetrahedron can be obtained. These equations directly used spherical geometric equations of Girard's theorem. There are much more studies to mention but to concentrate on what we aim, we avoid lengthy surveys and omit some details. However, spherical geometry is not only a subject of mathematics, astronomy, robotics, quantum mechanics or any close subjects, but also it is a subject of protein structure on viruses, etc. Finding orientation of various proteins on viruses or other structures might benefit from spherical geometry studies. Some examples: Sandeep et al. (2016) discussed the obese-tetrahedral having four pure quantum states. Spherical trigonometry and the

theorem we proposed in this article can be helpful in quantum state studies, especially on Bloch sphere on which effective areas can be calculated. Zandi et al. (2004) presented minimum energy structures on viruses using Monte Carlo simulation. Sarkar and Rashid (2022) discussed the number of proteins on corona virus modelled by a sphere showing points and great circular arcs without considering any geometric equations. Again, the theorem we proposed can be helpful in locating the proteins under some constraints and calculate areas around them, which might be important for protein locations.

In this study, we state two theorems by combining Pick's theorem for planes and Girard's theorem for spherical geometry and a line theorem. Pick's theorem uses lattice points, their numbers and calculates the area of a planar polygon. It is simple, elegant and insightful. Girard's theorem uses summation of angles of a triangle on a sphere and subtracts π to calculate the area of any triangle. This equation can be extended to find any polygon area by dividing it into triangles. For a polygon formed by tessellation of single equilateral triangle on a unit sphere, we can easily find the area of the polygon by combining Pick's theorem and Girard's theorem. The new theorem uses both lattice point properties and primitive triangle thus its angle. Although we assumed equilateral spherical triangles, we hope that information can be used for arbitrary spherical triangles in further studies. Because equilateral triangle assumption limits slightly usability and range of the equation proposed in this article. The polygon can be cut and irregular polygons can be obtained, but the theorem still holds. Usage of only Girard's theorem still needs new angles formed by cut, but the new theorem just uses the lattice points once the polygon was formed at the beginning. This theorem can be extended to hyperbolic geometry and a more general theorem can be obtained. Since we combined two theorems and extended to spherical geometry, both Pick's theorem and Girard's theorem becomes special cases. That is why our theorem although it is more general, should be again a special case since there are other geometries and dimensions as discussed above.

MATERIALS AND METHODS

In this section, two old theorems will be repeated and two new theorems will be introduced.

Plane Geometry

Theorem 1: Pick's Theorem (Pick, 1899)

Area of a simple (no holes) polygon with lattice points (Fig. 1) in plane is (Eq. 1)

$$S = \left(i + \frac{b}{2} - 1 \right) \quad (1)$$

where i and b are the number of points (vertices) in the interior and on the boundary of the polygon. In Fig 1. black dots denote lattice points, blue lines denote the polygon obtained. Here there are 12 points on the boundary and 3 points interior.

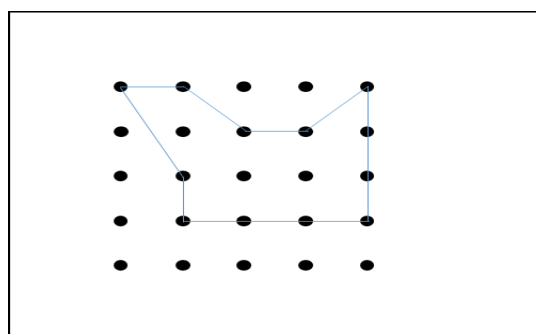


Figure 1. Pick's Theorem

Simple polygon means that it does not intersect itself and there are no holes in polygon. The coordinates of vertices are integers that are called lattice points that arise in different areas. This equation has been applied to planes only since it was established. There are several studies generalizing the equations for translations (Hadwiger and Wills, 1976), using oriented polygons (Grunbaum and Shephard, 1993), showing that Pick's theorem is topologically equivalent to the formula of Euler in terms of edges, vertices and faces (Liu, 1979). There has been several studies to extend Pick's theorem into volume of three-dimensional lattices but none of them has achieved.

Spherical geometry

Now one can consider a spherical arbitrary triangle as shown in Figure 2 and apply Girard's theorem to find its area (Eq. 2).

Theorem 2: Girard's Theorem

Area of any spherical triangle is given by in terms of spherical excess and radius of the sphere using the following formula

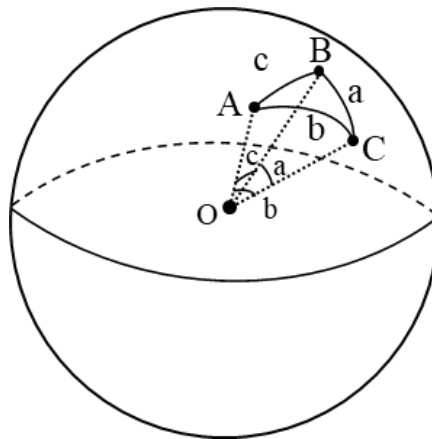


Figure 2. Girard's Theorem

$$S = (A + B + C - \pi)R^2 \quad (2)$$

where A , B and C are the internal angles of the spherical triangle and R is the radius, and O is the center. Lowercase letters are arc lengths of the triangle. If we consider a unit sphere then $R = 1$ and the area is directly equal to $A + B + C - \pi$ which is named as spherical excess E , all angles are measured in radians. This theorem seems to have been noted for the first time by T. Harriot (1603) and was proved by A. Girard in 1629 (Miller, 1943). Arc lengths a , b and c are also in radians since the radius is 1. The spherical excess can also be found from L'Huilier's theorem using arc lengths (Todhunter, 1886, Art. 101-103). Then one can use spherical trigonometric relations to find the unknown quantities.

Another equation for calculating polygon area composed of arbitrary angle angles, if the angles are given is (Todhunter, 1886, Art. 99).

$$S = \sum_{n=1}^N \theta_n - (N - 2)\pi \quad (3)$$

where θ_n is the angle interior to the polygon and N is the number of edges. For arbitrary radius, the equation should be multiplied by R^2 . The number of spherical triangles is always $N - 2$ (Bevis & Cambareri, 1987). Eq. 3 is true as long as the polygon can be decomposed into triangles having each angle less than π (Todhunter, 1886, Art. 99).

Now let us assume a polygon on a sphere (Fig. 3), and let a polygon was formed by equilateral triangles. This assumption is needed for lattice point approach so that the vertices on the sphere behave as integers. This is a spherical lattice. Throughout the study, the sphere will be assumed as a unit sphere.

Theorem 3: (Girard-Pick-Öz, 2023).

The area of equilateral triangular polygon with lattice points on a sphere (spherical lattice) is (Fig. 3)

$$S = 2E \left(i + \frac{b}{2} - 1 \right) R^2 \quad (4)$$

where E is the spherical excess ($= 3A - \pi$), i and b are the number of interior and boundary points, respectively. The term arc was discussed in Gaskell et al. (1976) just for the planar case to define a simple curve using three non-intersecting arcs emphasizing the triangulation that is applied to the spherical surface in our study. Therefore, the important thing is the primitive triangle (Gaskell et al, 1976; Honsberger, 1970) and then the rest can be formed by copying it. In a plane, it is easy, since the plane is infinite. On a sphere, it is not easy due to finite area. Tessellation limits should be kept in mind as discussed in the following section.

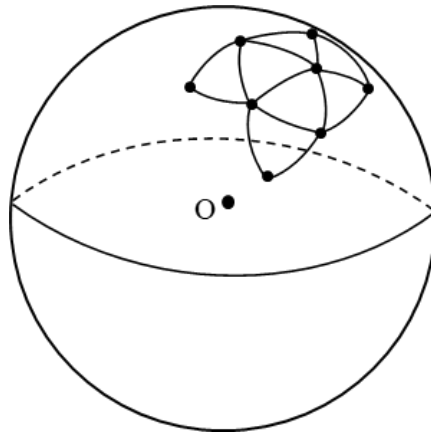


Figure 3. A Polygon Consisting of Equilateral Triangles on a Sphere

There is an important question. Why do we have $2E$ in front of Eq. 4? Twice the spherical excess shows an area of a shape of four sides. The shape can be formed by two adjacent equilateral triangles. That means, two adjacent equilateral triangles with a common side on a sphere is the projection of a parallelogram tangent to the sphere at the middle, so that the projected area is $2E$. A square or a rectangle cannot be projected such that all sides are equal, if the diagonals are also equal. Let us call it the 'parallelogram projected onto a sphere'. Even though all arcs will intersect each other, it is possible to form a shape having four arcs. For our case, all arcs have equal length, for the unit sphere equal angles (Fig.4).

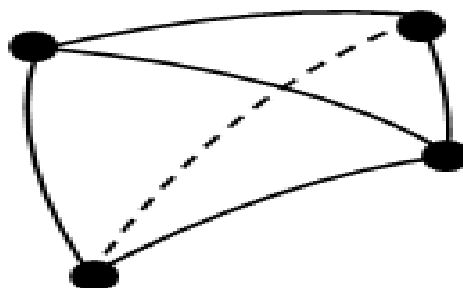


Figure 4. A Parallelogram Consisting of Equilateral Triangles Projected Onto a Sphere

In Fig. 4, all edges are formed by corresponding great circles. All arcs have equal lengths (or angles). All internal angles are equal. This is the spherical excess used in Theorem 3. It tessellates on the sphere for even numbers of triangles completely and changes its orientation. What exactly is the shape of the original parallelogram? This can be calculated using projective geometry backwards. It is for more advanced researchers than the author of this article. However, a simple idea can be given by just doing preliminary analysis. The planar parallelogram must have equal sides and diagonals such that its projection onto sphere has again equal arcs including its diagonals. Alternatively, just an equilateral planar triangle is projected onto sphere giving a spherical triangle just having $1E$. The lengths of the original equilateral planar triangle or planar parallelogram corresponding to the projected one can be calculated for each case using projective geometry tools. Therefore, we place a lattice on a sphere such that the arc angle (length for the unit sphere) between any adjacent vertices is constant. This is achieved by equilateral triangles on the sphere. That guarantees lattice assumption. Lattice area equation comes from Pick's theorem and curvature effect comes from Girard's theorem. Since the smallest lattice is a spherical triangle, we multiply by 2.

We have two equations giving the same answers. Final operation will be against both of them. Equating Eq. 3 and 4 each other, for the unit sphere we get

$$\sum_{n=1}^N \theta_n - (N - 2)\pi = 2E \left(i + \frac{b}{2} - 1 \right) \quad (5)$$

and in open form as follows

$$\sum_{n=1}^N \theta_n - (N - 2)\pi = 2(3A - \pi) \left(i + \frac{b}{2} - 1 \right) \quad (6)$$

θ_n and A can be the same for some cases, but not in general. The number of edges is equal to number of boundary points. Keeping spherical excess in short, the equation is

$$\sum_{n=1}^b \theta_n - (b - 2)\pi = 2E \left(i + \frac{b}{2} - 1 \right) \quad (7)$$

We cannot proceed further with this equation but some researchers might do.

Arbitrary geometry

As mentioned above, up to now there is no analog of Pick's theorem to calculate the volume of three or higher dimensional bodies. Moving forward is locked for the time being, but moving backward is possible. Now comes the last theorem. It is very simple, but necessary to close the gap.

Theorem 4: (Pick-Öz, 2023).

The length of a curve with lattice points in space is equal to (Fig. 3)

$$L = \begin{cases} i + b - 1 & \text{for an open curve} \\ i + b & \text{for a closed curve} \end{cases} \quad (8)$$

where i and b are the number of interior and boundary (or end) points, respectively. Eq. 8 seems to be almost trivial but its resemblance to Pick's theorem for planes is attractive. Extending Eqs. 1 and 8 into three dimensions is possible but some attempts made during this study were unsuccessful similar to the fate of previous studies. Eq. 8 can be used for curves and lines provided that, the arc length or distance between adjacent lattice points is constant. Curvature can be used to arrange lattices on space curve.

Comparison of Eqs. 3 and 4 gives an idea about similarities and differences between them. Eq. 4 is used for any simple polygon on a sphere if the angles and number of edges are known. Eq. 3 can be

used for any simple polygon too, but since the triangles are defined using lattice structure, it can be cut and areas of newly obtained arbitrary polygonal sections can be easily calculated. Usage of Eq. 4 needs determination of newly formed angles. That is one of the advantages of Eq. 3 over Eq. 4. One can easily find the area of any polygon using this equation. If one wants to cut the polygon and find its area, newly formed angles should be measured or calculated (Eq. 4). Its advantage is to deal with arbitrary triangles. However, Eq. 3 does not care for the newly formed angles; it can directly calculate area of the newly formed polygon by simply counting boundary and interior points. Having unique primitive triangle is the bad side of this method compared to Eq. 4, but counting which is one of the most fundamental human operations compensates it. Ability of making arbitrary cuts is also an advantage. Before giving some numerical examples one needs to guarantee that, the vectors connecting origin and the points on the sphere should be linearly independent of each other. This can be done by finding Gram determinant of the vectors (Gantmacher, 1960). Gram determinant and spherical excess are related to each other through Cagnoli's theorem (Todhunter, 1886, Art. 132; Porta et al. 2018). Gram determinant (Eq. 9) is given as follows.

$$G(1,2,3) = \begin{vmatrix} \langle \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_1 \rangle & \langle \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_2 \rangle & \langle \mathbf{p}_1, \mathbf{p}_3 \rangle \\ \langle \mathbf{p}_2, \mathbf{p}_1 \rangle & \langle \mathbf{p}_2, \mathbf{p}_2 \rangle & \langle \mathbf{p}_2, \mathbf{p}_3 \rangle \\ \langle \mathbf{p}_3, \mathbf{p}_1 \rangle & \langle \mathbf{p}_3, \mathbf{p}_2 \rangle & \langle \mathbf{p}_3, \mathbf{p}_3 \rangle \end{vmatrix} \quad (9)$$

where $\langle \mathbf{p}_i, \mathbf{p}_j \rangle$ is the standard Euclidean inner product. This can be easily calculated and seen that it is larger than zero. Gramians are zero precisely when the coordinate vectors are dependent and positive otherwise (Gantmacher, 1984). Therefore, the points on the unit sphere are at different locations.

Numerical examples of these theorems will be given in the next section.

RESULTS AND DISCUSSION

In this section, some numerical examples will be given and various possibilities will be discussed.

Starting with Pick's theorem (Pick, 1899), for the planar polygon in Fig. 1, $i = 3$, and $b = 12$. Substituting them into Eq.1 gives $S = 8 \text{ units}$. This is the area enclosed by blue lines passing through lattice points.

It is possible to tile different triangles on a sphere. Here we are going to discuss two cases with equilateral triangles on a sphere. In the first one, we are going to tabulate various angles and number of triangles than can tile the sphere. In the second one, we are going to tabulate a special case in which around every point (vertex) there are the same number of triangles, so that some numerical examples will be given comfortably.

In Table 1, some of the possible polygons formed by equilateral spherical triangles are listed. By using the angles, the sphere is completely tiled, e.g. the polygon is simple. For example, if the number of triangles is 10, the angle must be 84° . Then one can use Eq. 4 to calculate its area. For other angles corresponding to non-integer triangle numbers such as 110° or 115° , the equation still holds but the polygon is not simple on the sphere, e.g. some holes on the sphere. If one makes sure that the boundary of the polygon obtained with desired cuts do not include any holes, then Eq. 4 can be used safely. Although usage of different cuts changes the angles along the cut, since the lattice is formed by equilateral triangles, there will be no difficulty in using Eq. 4.

Table 1. Number of Equilateral Triangles Tessellating A Sphere and Corresponding Angles

# of ELT's	Angle (deg)
1	300
2	180
3	140
4	120
5	108
10	84
100	62.4
1000	60.24
10000	60.024

*ELT: Equilateral triangle

In this paper, we have no means of presenting a proof that they are going to tile the sphere without any gap even though the numbers of triangles are integers. That is why we need to look at a special case in which we have equilateral triangles that tessellate the sphere such that about any vertex there are the same number of triangles. In this case, one should find possible numbers of triangles (Table 2). An equilateral triangle on a plane has angle that measures 60° so that sum of the angles is 180° . As the first condition, in spherical trigonometry the angle and the total angle should be larger than 60° and 180° , respectively. The second condition is that, an equilateral triangle should tessellate without leaving hole or gap, etc. This can be satisfied by dividing 360° (angle about a vertex) by integers so that the angle for each triangle is larger than 60° .

Table 2. Angle and Number of Equilateral Triangles Tessellating A Sphere with Point Symmetry

# of ELT about a vertex	Angle (deg)	Total # of triangles	Total # of points
1	360	1	1
2	180	2	2
3	120	4	4
4	90	8	6
5	72	20	12

*ELT: Equilateral triangle

These are the only angles larger than 60° . The third column represents the number of triangles on the sphere. The fourth column represents the total number of vertices on the sphere. For example, if there are five equilateral triangles with a common point, then there will be 20 triangles on the sphere, each having 72° . Total number of points will be 12 on the sphere. This configuration is relatively easier to visualize and apply the equation to find the area compared to the case given in Table 1. Given these angles, all the equilateral triangles tessellate on the sphere. The first number is for single triangle, namely sphere, the second one is half sphere, the third one is quarter of a sphere but not regular one, the fourth one is the quarter of half sphere (familiar one) and the last one is as it is. The sphere cannot be divided into more than 20 parts if the polygon about a vertex formed by equilateral triangles has the same number of common points. As seen below, it is possible to cut the triangles and obtain arbitrary polygons.

Equipped with the information listed above, now we can proceed in calculating areas of polygons formed by equilateral triangles, even containing arbitrary triangles obtained by cuts.

Here are some examples using $S = 2E \left(i + \frac{b}{2} - 1 \right)$:

A polygon composed of 120° degree equilateral triangles

This is a projection of a tetrahedron radially onto a unit sphere. The total number of points and triangles are both four. Area of each triangle $S = 4\pi/4 = \pi$. The spherical excess $E = \pi$.

For $i = 0$, $b = 3$, the area $S = \pi$ which is the area of a single triangle. This result confirms a theorem saying that on a unit sphere, for any spherical triangle of area π , four congruent copies of it

tile the sphere (Brooks & Strantzen, 2005) and it is also similar to quantum states (Sandeep et al., 2016).

For $i = 0, b = 4$, the area $S = 2\pi$ which is the area of two adjacent triangles.

For $i = 1, b = 3$, the area $S = 3\pi$ which is the area of three adjacent triangles.

For $i = 1, b = 4$, the area $S = 4\pi$ which is the area of four adjacent triangles (full sphere). Here one of the points is counted twice, one for the boundary and one for the interior. That point is arbitrary. What we obtained in a different way is the same as Brooks and Strantzen (2005).

For this case, only polygon areas given above can be calculated. There is no additional polygon possible. No triangle can be cut into two for this case. This partially hides beauty of Eq. 2 since the results are obvious even though they are obtained in an elegant way. This is in accordance with Michael Atiyah's saying that, "... always to suspect an impressive sounding theorem if it does not have a special case which is both simple and non-trivial."

A polygon formed by 72° degree equilateral triangles:

Now let us proceed with the maximum number of equilateral triangles having maximum number of common points (vertices). The polygon is composed of 72° degree equilateral triangles (Fig. 4): The total number of points and triangles are 12 and 20 respectively. This shape is similar to the shape of corona virus given by Sarkar and Rashid (2022). They drew proteins at the vertices and intermediate locations using just geometry without introducing any spherical trigonometric equations. The cuts given below can pass through intermediate proteins and necessary areas can be calculated using Eq. 4. Area of each triangle $S = 4\pi/20 = \pi/5$. The spherical excess $E = \pi/5$. There are several possibilities for this tessellation. All intermediate cuts between vertices are still arcs of corresponding great circle.

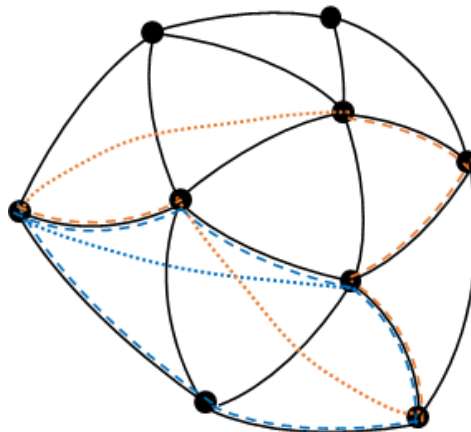


Figure 4. A Polygon Composed of 72° Degree Equilateral Triangles

For $i = 3, b = 6$, the area $S = 2\pi$ which is the area of a hemisphere composed of triangular tessellations.

For $i = 0, b = 4$, the area $S = 2\pi/5$ which is the area of two adjacent triangles.

For $i = 1, b = 5$, the area $S = \pi$ which is the area of five adjacent triangles whose one of the vertices is common. It is also equal to the area of a unit circle.

For $i = 0, b = 5$, the area $S = 3\pi/5$ which is the area of three triangles which are aligned one after another.

For $i = 0, b = 4$, the area $S = 2\pi/5$ which is the area of three adjacent triangles cut by an arc (blue dashed line in Fig. 4, lower part, dotted line is the intermediate cut). This area is also equal to the area of two adjacent triangles. This is a stunning result. The other part (upper) of the tessellation has area $\pi/5$ for $i = 0$ and $b = 3$. The newly formed angles by the cut between two vertices are calculated

using spherical trigonometric equations (Todhunter, 1886, Art. 47) and the areas are in perfect agreement with the result of Eq. 4. This shows us that there is no need to calculate newly formed angles by cuts. The new triangle has angles $144^\circ, 36^\circ, 36^\circ$. Its area is equal to the area of primitive equilateral triangle. Thus, Theorem 3 can be effectively used even there is a cut similar to planar polygons using Pick's theorem.

For $i = 0, b = 6$, the area $S = 4\pi/5$ (brown dashed line in Fig. 4, dotted line is the intermediate cut). This result is stunning since arbitrary polygonal areas can be calculated using cuts made by intermediate great circular arcs.

Similar results can be obtained for various tessellations since this angle has rich combinations although the exact number of possible tessellations was not calculated here. One must be careful about where the great circle should pass when it is desired to find an arbitrary tessellation not to make mistake about the number of boundary and interior points.

CONCLUSION

In this article, we presented two new theorems. The first one is for calculating a polygonal area formed by tessellating equilateral triangles on a sphere. The second one is for calculating length of a line or space curve. This gives very basic and almost trivial information, but it is necessary to close the gap in the completeness of the history and theorems. The first theorem is an extension of Pick's theorem to spherical geometry by combining with Girard's theorem. Pick's theorem is for calculating areas of planar polygons having lattice points and Girard's theorem is for calculating areas of spherical triangles. Girard's theorem was also used in the literature to calculate spherical polygonal areas by a small modification.

Theorem 3 proposed here combines the lattice area equation (Pick's theorem) and the spherical excess (Girard's theorem), and multiplies by 2. Doubling the spherical excess is a clue that it is a projection of a parallelogram onto the sphere. Any polygon can be formed by a spherical equilateral triangle tessellation on the sphere and its area can be calculated using Theorem 3. Arbitrary cuts can be made between any vertices so that arbitrary polygons are formed and the theorem still holds. The triangulation or triangular tessellation used on a sphere could be more fundamental than original square lattices offered by Pick (1899). The formula proposed in our study depends on a primitive triangle. This can be thought as a shift by half distance in consecutive rows horizontally in the planar lattice structure even though it is not compulsory. This phenomenon is inevitable in spherical geometry. The points has to shift so that triangles tessellate on the sphere completely.

After this point, Pick's theorem cannot be thought as stuck to planar geometry, instead it can be used in spherical geometry using Eq. 4. Our problem is still two-dimensional since it is the surface of a three dimensional sphere. Extending Pick's theorem using Girard's theorem brings to light such a possibility that they are special cases of a generality. As Hilbert said, "The art of doing mathematics consists in finding that special case which contains all the germs of generality". We can conclude that not only Pick's theorem and Girard's theorem but also the theorem presented in our article should be a special case of a more general theorem. The general case could be a theorem in Euclidean, Spherical and Hypebolic geometry combined or topology. Any two-dimensional shape in three or more dimensions might be treated using a more general theorem.

Further studies and open questions:

The original shape of the triangle or parallelogram before projection onto sphere.

Triangular approach for volume calculations.

The area equation in hyperbolic lattices

Unification of area equation for lattices in three major geometries.

REFERENCES

- Atiyah, M. <https://mathshistory.st-andrews.ac.uk/Biographies/Atiyah/quotations/>.
- Bevis, M. and Cambareri, G. (1987). Computing the area of a spherical polygon of arbitrary shape. *Mathematical Geology*, 19(4), 335-346.
- Brooks J. B. and Strantzen, J. (2005). Spherical triangles of area π and isosceles tetrahedra. *Mathematics Magazine*, 78(4), 311-314.
- Gantmacher, F. R. (Ed.). (1966). *The theory of matrices*. New York, Chelsea Publishing Co.
- Gaskell, R. W., Klamkin, M. S. Watson, P. (1976). Triangulations and Pick's theorem. *Mathematics Magazine*, 49(1), 35-37.
- Grunbaum B., Shephard, G. C. (1993). Pick's theorem. *The American Mathematical Monthly*, 100(2), 150-161.
- Hadwiger Von H., Wills, J. M. (1976). Neure studien über gitterpolygone. *Journal für die reine und angewandte Mathematik Magazine*, 280, 61-69.
- Hilbert, D. https://www.brainyquote.com/quotes/david_hilbert_181562.
- Honsberger, R., (Ed.). (1970). *Ingenuity in Mathematics*. New York, Random House.
- Liu, A. C. F. (1979). Lattice points and Pick's theorem. *Mathematics Magazine*, 52(4), 232-235.
- Miller, G. A. (1943). A seventh lesson in the history of mathematics. *National Mathematics Magazine*, 18(2), 67-76.
- Pick, G., (1899). Geometrisches zur Zahlenlehre. In: *Sitzungsberichte des deutschen naturwissenschaftlich-medicinischen Vereines für Böhmen "Lotos"*. (Neue Folge). 19, (p.311-319), Prag.
- Porta, J. M., Sarabandi S., Thomas, F. (2018). Angle-bound smoothing with application in kinematics. In: *Asian MMS 2018 Conference*, Paper No. Asian MMS-2018-124 (p. 1-13). Bengaluru, India.
- Reeve, J. E. (1958). A further note on the volume of lattice polyhedra. *Journal London Math. Soc.*, 34, 57-62.
- Sarkar, J., Rashid, M., (2022). Mathematical Musings on the external anatomy of the novel corona virus, Part 4: Models of n-Cov. *Resonance*, 27(10), 1719-1730. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12045-022-1466-3>.
- Sandeep K. G, Simon, B. N., Singh, R. Simon, S., (2016). Geometry of the generalized Bloch sphere for qutrits. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 49(16), 165203. DOI:10.1088/1751-8113/49/16/165203
- Scott, P. R. (1987). The fascination of the elementary. *The American Mathematical Monthly*, 94(8), 759-768.
- Todhunter, I. (Ed.). (1886). *Spherical trigonometry for the use of colleges and schools*. London, MacMillan and Co.
- Varberg, D. E. (1985). Pick's theorem revisited. *The American Mathematical Monthly*, 92(8), 584-587.
- Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R. F., Gelbart, W. M., Rudnick, J., (2004). Origin of icosahedral symmetry in viruses. *PNAS*, 101(44), 15556-15560. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405844101>.

Gauss, Mean and Total Curvature Formulae of Rational Bezier Curves in Minkowski 4-Space

Filiz ERTEM KAYA^{1*}

Highlights:

- Bezier curves
- Rational Bezier curves
- Minovski
- Space

Keywords:

- Gauss Curvature
- Mean Curvature
- Total Curvature
- Minkowski 4-Space
- Rational Bezier Curves

ABSTRACT:

In this paper Gaussian, Mean and total curvature formulae of Rational Bezier Curves with asymptotic frame field are calculated by using its curvatures in 3- dimensional lightlike cone in Minkowski 4- Space. Our main intention is to introduce and investigate some differential geometric properties of the the Rational Bezier Curves with asymptotic frame field in 3- dimensional lightlike cone in Minkowski 4- Space by using its curvatures.

^{1*}Filiz ERTEM KAYA ([Orcid ID: 0000-0003-1538-9154](https://orcid.org/0000-0003-1538-9154)) Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Mathematics, Niğde, Türkiye

***Corresponding Author:** Filiz ERTEM KAYA, e-mail: fertem@ohu.edu.tr

INTRODUCTION

In differential geometry curvatures of curves are easily calculated by using the curve Frenet frame and also it takes special situations where space it is calculated. The first curvature κ (or shown as k_1) and second curvature τ (or shown as k_2) of a curve was known in differential geometry. Also Gauss curvature, Mean curvature and total curvatures can be calculated easily. These curvatures are special properties which belong to curve and these are the basic subjects about curve in differential geometry.

The first study of Bezier curves in Minkowski space was made by Georgiev in 2008 (Georgiev, 2008). Later, Spacelike and Timelike Bezier curves and surfaces in Minkowski space were studied in more detail by Kuşak Samancı and Çelik (Çelik, 2017; Kuşak Samancı, 2018; Kuşak Samancı and Çelik, 2018; Kuşak Samancı, Kalkan and Celik, 2019). Bezier surfaces in Minkowski space were studied by Ugail (Ugail, Márquez and Yılmaz, 2011) and Kuşak Samancı and Çelik calculated the shape operator of the Bezier curve in Minkowski space (Kuşak Samancı, Çelik and İncesu, 2020).

Some Geometric Properties of the Spacelike Bézier Curve with a Timelike Principal Normal are studied by Kuşak Samancı in Minkowski 3-space (Kuşak Samancı, 2018). Asymptotic frame field Rational Bezier curves is a paper that presents the curvatures in Minkowski space which belong to (Özkan Tükel et al., 2021, Yılmaz Ceylan et al., 2021, Yılmaz Ceylan et al., 2020). Elastic curves in a Two-dimensional Lightlike Cone are studied by Özkan Tükel and Yücesan (Özkan Tükel and Yücesan, 2015). More details see all references in this paper (Farin, 2002; Liu, 2004; Marsh, 2005; Liu and Qingxian, 2011; López, 2014; Özkan Tükel and Yücesan, 2015; Kuşak Samancı, 2018; Yılmaz Ceylan et al., 2020; Özkan Tükel et al., 2021; Yılmaz Ceylan et al., 2021; Turhan et al., 2021; Ertem Kaya, 2022).

Now paper presents Gauss, Mean and Total curvatures of the spacelike quadratic rational Bezier curves in Minkowski 4-space.

MATERIALS AND METHODS

Preliminaries

Let K , H and T be the Gauss, Mean and Total curvatures of a curve in Euclidean 3-space. Their formulae in differential geometry are shown as respectively:

$$K = k_1 \cdot k_2 = \kappa \cdot \tau,$$

$$H = \frac{1}{2}(k_1 + k_2) = \frac{1}{2}(\kappa + \tau)$$

and

$$T = \sqrt{k_1^2 + k_2^2} = \sqrt{\kappa^2 + \tau^2}.$$

A rational Bézier curve of degree n with control points b_0, b_1, \dots, b_n and corresponding scalar weights ω_i , $0 \leq i \leq n$, is known as:

$$R(t) = \frac{\sum_{k=0}^n \omega_k b_k B_{k,n}(t)}{\sum_{k=0}^n \omega_k B_{k,n}(t)} \quad t \in [0,1]$$

where

$$B_{k,n}(t) = \begin{cases} \frac{n!}{(n-k)!k!}, & \text{if } 0 \leq k \leq n \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}$$

are called the Bernstein polynomials for $n = 2$ (Farin, 2002; Marsh, 2005; Özkan Tükel et al., 2021; Yılmaz Ceylan et al., 2021).

Let $\kappa(s)$ and $\tau(s)$ be the curvatures. Their formulae are defined by,

$$\kappa(s) = -\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4},$$

and

$$\tau(s) = \frac{1}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}}$$

(Özkan Tükel et al., 2021; Yılmaz Ceylan et al., 2021).

Quadratic rational Bezier curves in 3- dimensional lightlike cone

Let M be a submanifold E_1^4 (4-dimensional pseudo-Euclidean space). Let c is a fixed in E_1^4 . The pseudo-Riemannian lightlike cone (quadric cone) is shown as

$$Q_1^3(c) = \{x \in E_1^4 : g(x - c, x - c) = 0\},$$

that c is the centre of $Q_1^3(c)$ and g is a pseudo Riemannien metric (a degenerate quadratic form).

When $c=0$, we denote $Q_1^3(c)$ by $Q^3(c)$ and call it null cone. Let E_1^4 be 4-dimensional minkowski space and $Q^3(c)$ be the lightlike cone(Liu, 2004, Liu and Qingxian, 2011, Kulahci, Bektas, and Ergüt, 2007, Kulahcı and Almaz, 2017, Almaz, Külahcı and Yılmaz, 2020).

Theorem. If $\kappa(s)$ and $\tau(s)$ be the curvatures, then Mean, Gauss and total curvatures of Bernstein polynomials are obtained as follows:

Gauss curvature is calculated by

$$K = -\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^8 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}},$$

and we have Mean curvature as follows:

$$H = \frac{1}{2 \left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4} \left[\left(-\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} \right) + \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}} \right]$$

and the total curvature is obtained as:

$$T = \sqrt{\left(\frac{1 \left(\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2}{4 \left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^8 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^8} \right) + \left(\frac{1}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^8} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right) \right)^2}.$$

Proof. Firstly let we calculate Gauss curvature, then we have

$$K = k_1 \cdot k_2 = \kappa \cdot \tau$$

$$\begin{aligned} &= -\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} \\ &= \frac{1}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{1/2}, \\ K &= -\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^8 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{1/2}, \end{aligned}$$

Now we calculate Mean curvature easily, so

$$H = \frac{1}{2} (k_1 + k_2) = \frac{1}{2} (\kappa + \tau),$$

$$\begin{aligned} H &= \frac{1}{2} \left(-\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} + \frac{1}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{1/2} \right) \\ H &= \frac{1}{2 \left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4} \left[\left(-\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} \right) + \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right) - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^{1/2} \right] \end{aligned}$$

and total curvature is calculated as:

$$T = \sqrt{k_1^2 + k_2^2} = \sqrt{\kappa^2 + \tau^2}$$

$$T = \sqrt{\left(\frac{1}{2} \frac{\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^4} \right)^2 + \left(\frac{1}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^4} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right)^{\frac{1}{2}} \right)^2 - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^2}$$

$$T = \sqrt{\left(\frac{1}{4} \frac{\left(\sum_{k=0}^5 d_k B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^8 \left(\sum_{j=0}^2 \omega_j B_{j,2}(s) \right)^8} \right)^2 + \left(\frac{1}{\left(\sum_{k=0}^2 \omega_k B_{k,2}(s) \right)^8} \left(\left(\sum_{k,j=0}^{12} B_{k,12}(s) B_{j,12}(s) \langle d_k, d_j \rangle \right)^{\frac{1}{2}} \right)^2 - \left(\sum_{k,j=0}^5 B_{k,5}(s) B_{j,5}(s) \langle c_k, c_j \rangle \right)^2 \right)^2}$$

Corollary 1. The cone Gauss curvature function $K(0) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_0\|^2 (\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_0^{12}}$, cone Mean

curvature function $H(0) = -\frac{\|c_0\|^2 + 2\omega_0^4 (\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{4\omega_0^8}$ and cone total curvature

$$T(0) = \frac{1}{2\omega_0^8} \sqrt{\|c_0\|^4 + 4\omega_0^8 \|d_0\|^2 - 4\omega_0^8 \|c_0\|^4} \text{ at } s = 0.$$

Proof. The cone curvature function $\kappa(0) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_0\|^2}{\omega_0^8}$ and cone torsion $\tau(0) = \frac{(\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_0^4}$ at

$s = 0$ (Özkan Tükel et al., 2021; Yılmaz Ceylan et al., 2021). Thus we can take respectively, Gauss, Mean and Total curvatures are calculated at $s = 0$ are defined by

$$K(0) = \kappa(0) \cdot \tau(0)$$

$$K(0) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_0\|^2}{\omega_0^8} \cdot \frac{(\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_0^4}$$

$$K(0) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_0\|^2 (\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_0^{12}}$$

and

$$H(0) = \frac{1}{2} (\kappa(0) + \tau(0))$$

$$H(0) = \frac{1}{2} \left[-\frac{1}{2} \frac{\|c_0\|^2}{\omega_0^8} + \frac{(\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_0^4} \right]$$

$$H(0) = -\frac{1}{4} \frac{\|c_0\|^2}{\omega_0^8} + \frac{(\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{2\omega_0^4}$$

$$H(0) = -\frac{1}{4} \frac{\|c_0\|^2}{\omega_0^8} + \frac{2\omega_0^4 (\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{4\omega_0^8}$$

$$H(0) = -\frac{\|c_0\|^2 + 2\omega_0^4(\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{4\omega_0^8}$$

and

$$T(0) = \sqrt{\kappa(0)^2 + \tau(0)^2}$$

$$T(0) = \sqrt{\left(-\frac{1}{2} \frac{\|c_0\|^2}{\omega_0^8}\right)^2 + \left(\frac{(\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_0^4}\right)^2}$$

$$T(0) = \sqrt{\frac{1}{4} \frac{\|c_0\|^4}{\omega_0^{16}} + \frac{\|d_0\|^2 - \|c_0\|^4}{\omega_0^8}}$$

$$T(0) = \sqrt{\frac{1}{4} \frac{\|c_0\|^4 + 4\omega_0^8\|d_0\|^2 - 4\omega_0^8\|c_0\|^4}{\omega_0^{16}}}$$

$$T(0) = \frac{1}{2\omega_0^8} \sqrt{\|c_0\|^4 + 4\omega_0^8\|d_0\|^2 - 4\omega_0^8\|c_0\|^4}$$

Corollary 2. The cone Gauss curvature function $K(1) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_5\|^2(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_2^{12}}$, cone Mean

curvature function $H(1) = \frac{-\|c_5\|^2 + 2\omega_2^4(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4)^{\frac{1}{2}}}{4\omega_2^8}$ and cone total curvature

$T(1) = \frac{1}{2\omega_2^8} \sqrt{\|c_5\|^4 + 4\omega_2^8\|d_{12}\|^2 - 4\omega_2^8\|c_5\|^4}$ of the spacelike quadratic rational Bézier curve $R(s)$

parametrized by arclength in 3-dimensional lightlike cone in Minkowski 4-space at $s = 0$.

Proof. The cone curvature function $\kappa(1) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_5\|^2}{\omega_2^8}$ and cone torsion $\tau(1) = \frac{(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_2^4}$ at

$s = 1$ (Özkan Tükel et al., 2021; Yılmaz Ceylan et al., 2021). Thus we can take respectively, Gauss, Mean and Total curvatures are calculated at $s = 0$ are defined by

$$K(1) = \kappa(1).\tau(1)$$

$$K(1) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_5\|^2}{\omega_2^8} \cdot \frac{(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_2^4}$$

$$K(1) = -\frac{1}{2} \frac{\|c_5\|^2(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_2^{12}}$$

and

$$H(1) = \frac{1}{2}(\kappa(1) + \tau(1))$$

$$H(1) = \frac{1}{2} \left[-\frac{1}{2} \frac{\|c_5\|^2}{\omega_2^8} + \frac{(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4)^{\frac{1}{2}}}{\omega_2^4} \right]$$

$$H(1) = \frac{-\|c_5\|^2 + 2\omega_2^4 \left(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4 \right)^{1/2}}{4\omega_2^8}$$

and

$$T(1) = \sqrt{\kappa(1)^2 + \tau(1)^2}$$

$$T(1) = \sqrt{\left(-\frac{1}{2} \frac{\|c_5\|^2}{\omega_2^8} \right)^2 + \left(\frac{\left(\|d_{12}\|^2 - \|c_5\|^4 \right)^{1/2}}{\omega_2^4} \right)^2}$$

$$T(1) = \frac{1}{2\omega_2^8} \sqrt{\|c_5\|^4 + 4\omega_2^8 \|d_{12}\|^2 - 4\omega_2^8 \|c_5\|^4}$$

RESULTS AND DISCUSSION

Gauss, Mean and total curvatures of spacelike quadratic rational Bezier curves are calculated in lightlike cone in Minkowski 4-space. In addition we gave special cases calculations for these curvatures of quadratic rational Bezier curves.

CONCLUSION

After making calculations about Gauss, Mean and total curvatures of spacelike quadratic rational Bezier curves, it can be seen that these curvatures are invariant under Minkowski 4-space

ACKNOWLEDGEMENTS

Kör makalede bu alan boş bırakılmalıdır. Bu bölüm başlık sayfasında yazılmalıdır.

REFERENCES

- Almaz F., Kulaşci, M. A. and Yılmaz, M. Y. (2020). Approximation To The Smarandache Curves in the The Null Cone, *Palestine Journal of Mathematics*, Vol. 9(1), 527-536.
- Georgiev, G.H. (2008). Spacelike Bezier Curves in the Three-dimensional Minkowski Space, *Proceedings of AIP Conference*, 1067(1): 373-380.
- Farin, G. (2002). *Curves and Surfaces for CAGD: a practical guide*, Morgan Kaufmann Publications, USA.
- Kulaşci, M., Bektas, M. and Ergüt, M. (2007). Curves of AW(k)-Type in 3-Dimensional Null Cone, *Physics Letters A* 371, 275-277.
- Kulaşci, M and Almaz, F.(2017). Some Characterizations of Osculating in the Lightlike Cone, *Bol. Soc. Paran. Math.* 35(2), 39-48.
- Marsh, D. (2005). *Applied Geometry for Computer Graphics and CAD*, Springer Science and Business Media, USA, 2005.
- Liu, H. (2004). Curves in the Lightlike Cone. *Contributions to Algebra and Geometry*, 45(1), pp. 291-303, 2004.
- Liu, H. and Qingxian, M. (2011). Representation Formulas of Curves in a Two-and Three dimensional Lightlike Cone. *Results in Mathematics*, 59 (3), pp. 437-451.
- López, R. (2014). Differential Geometry of Curves and Surfaces in Lorentz-Minkowski Space. *International Electronic Journal of Geometry*, 7(1), pp. 44-107.
- Kuşak Samancı, H. (2018). Minkowski 3-uzayında Timelike Rasyonel Bézier Eğrilerinin Eğrilikleri Üzerine. *Bitlis Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), pp. 243-255.

- Kuşak Samancı, H.(2018). Some Geometric Properties of the Spacelike Bézier Curve with a Timelike Principal Normal in Minkowski 3-space. *Cumhuriyet Science Journal*, 39(1), pp. 71-79.
- Çelik, S. (2017). Investigation of Bezier curve and surfaces in Minkowski space from computer aided geometric design elements, Master Thesis, Bitlis Eren University.
- Kuşak Samancı, H. (2018). “Metric Properties of a Space-like Rational Bezier Curve with a Time-like Principal Normal”, *Konuralp Journal of Mathematics*, 6(1), 144-148, 2018.
- Kuşak Samancı, H. and Çelik, S. (2018). “The Curvatures of the Spacelike Bezier Curve with a Spacelike Principal Normal in Minkowski 3-space”, *International Journal of Mathematics and Computation*, (29)4.
- Kuşak Samancı, H., Kalkan, O. and Celik, S. (2019). The Timelike Bezier Spline in Minkowski 3-Space. *Journal of Science and Arts*, 19(2), 357-374.
- Kuşak Samancı, H., Çelik S. and İncesu, M. (2020), The Shape Operator of The Bezier Surfaces in Minkowski 3 space, *Journal of Science and Arts*, vol. 4, no. 53, pp. 865–880.
- Ugail, H., Márquez, MC and Yılmaz A, 2011. On Bézier surfaces in three-dimensional Minkowski space. *Computers & Mathematics with Applications*, 62 (8): 2899-2912.
- Özkan Tükel, G. and Yücesan, A. (2015). Elastic Curves in a Two-dimensional Lightlike Cone. *International Electronic Journal of Geometry*, 8(2), pp. 1-8.
- Özkan Tükel, G., Yücesan, A. and Yılmaz Ceylan, A. (2021). Asymtotic frame field Rational Bezier curves. *Düzce University Journal of Science & Technology*, 9, pp. 259-268.
- Yılmaz Ceylan, A., Turhan, T. and Özkan Tükel, (2021), G. On the Geometry of Rational Bézier Curves. *Honam Mathematical Journal*, 43(1), pp. 88-99.
- Turhan, T., Yılmaz Ceylan, A. and Özkan Tükel, G. (2021). Rational Bézier Curves on 2-dimensional Anti de Sitter Space. *International Asian Congress on Contemporary Sciences-V*, Nakhchivan, Azerbaijan, pp. 467-473.
- Yılmaz Ceylan, A., Turhan, T. and Özkan Tükel, G. (2020). On Non-null Rational Bézier Curves on 2-dimensional de Sitter Space. 4th International Conference on Mathematics ”An İstanbul Meeting for World Mathematicians,” İstanbul, Turkey, pp. 132.
- Ertem Kaya, F. (2022). A special calculations of Rational Bezier curves in Minkowski 3 and 4-Spaces. 1. International Conference on Engineering and Applied Naturel Science [online], 10-13 May.
- Ertem Kaya, F. (2022). Total Curvature Integral Equation type of Spacelike Quadratic Rational Bezier curves in Minkowski 3- Space, IV. International Turkic World Congress on Science and Engineering, June 23-24, 2022, Niğde - TURKEY.

Atf İçin: Sidal, F. ve Altun, Y. (2023). Atık Su Arıtma Tesislerinde Biyokimyasal Oksijen İhtiyacının Yapay Sinir Ağı ve Regresyon Analiziyle Tahmin Edilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2934-2944.

To Cite: Sidal, F.& Altun, Y. (2023). Prediction of Biochemical Oxygen Demand in Wastewater Treatment Plants Using Artificial Neural Network and Regression Analysis. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2934-2944.

Atık Su Arıtma Tesislerinde Biyokimyasal Oksijen İhtiyacının Yapay Sinir Ağı ve Regresyon Analiziyle Tahmin Edilmesi

Furkan SİDAL¹, Yener ALTUN²

Öne Çıkanlar:

- Çoklu regresyon analizi
- Yapay sinir ağları

ÖZET:

Atık su arıtma tesislerinde su kalitesini takip edip müdahale etmek, tesislerin yönetiminde önemli bir rol oynar. Atık su arıtma tesisleri yapılırken ve işletilirken, biyolojik oksijen ihtiyacı değerlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu değerlerin ölçülmesi diğer parametrelere göre daha uzun sürelerde gerçekleşmekte ve deneylerin yapılması da zahmetli ve maliyetli olmaktadır. Bu çalışmada biyolojik oksijen değerinin, atık su arıtma tesislerinde kolayca ölçülebilen diğer parametreler aracılığıyla yapay sinir ağları ve çoklu regresyon analizi teknikleriyle tahmin edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan ölçüm sonuçları 2021-2022 yılları arasında Van iline ait bir atık su arıtma tesisinde ölçülen verileri kapsamaktadır. Kullanılan tahmin girdi parametreleri pH, elektriksel iletkenlik, sıcaklık, çözünmüş oksijen, kimyasal oksijen ihtiyacı, askıda katı madde, toplam azot ve toplam fosfor değerleri bağımsız değişken ve biyolojik oksijen değeri ise bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Yapılan tahminlerde yapay sinir ağı modeli için MAPE değeri %0.12, MAD değeri 0.04, R değeri %99.83 ve R² değeri %99.68 olarak elde edilmiştir. Aynı şekilde çoklu regresyon analizi yöntemi ile BOİ tahmin modelinde MAPE değeri %0.68, MAD değeri 0.06, R değeri %96.40 ve R² değeri %92.92 olarak bulunmuştur. Çalışmada elde edilen bulgular biyolojik oksijen değerinin kolayca ölçülebilen parametreler yardımıyla ileri beslemeli yapay sinir ağları ve doğrusal çoklu regresyon analizi teknikleri ile oluşturulmuş olan modeller kullanılarak tahmin edilmesi mümkündür. Her iki model karşılaştırıldığında ise yapay sinir ağları ile geliştirilmiş olan modelin çoklu regresyon analizi ile geliştirilmiş olan modele göre daha iyi performans sergilediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler:

- Yapay sinir ağları,
- Çoklu regresyon analizi,
- Biyolojik oksijen ihtiyacı,
- Atık su arıtma

Prediction of Biochemical Oxygen Demand in Wastewater Treatment Plants Using Artificial Neural Network and Regression Analysis

Furkan SİDAL¹, Yener ALTUN²

Highlights:

- Artificial neural networks
- Regression analysis

ABSTRACT:

Monitoring and intervening in water quality at wastewater treatment plants play a crucial role in their management. When designing and operating wastewater treatment plants, the biological oxygen demand (BOD) values are essential. However, measuring this parameter takes longer compared to other parameters, and conducting experiments for BOD measurement can be both laborious and costly. In this study, the aim was to predict the biological oxygen demand value using artificial neural networks and multiple regression analysis techniques through easily measurable parameters in wastewater treatment plants. The measurement data used in the study covered the years 2021-2022 and was obtained from a wastewater treatment plant in Van province, Turkey. The selected input parameters for prediction were pH, electrical conductivity, temperature, dissolved oxygen, chemical oxygen demand, suspended solids, total nitrogen, and total phosphorus, while the biological oxygen demand value was chosen as the dependent variable. The results of the predictions using artificial neural network model were as follows: Mean Absolute Percentage Error (MAPE) was 0.12%, Mean Absolute Deviation (MAD) was 0.04, the coefficient of determination (R) was 99.83%, and R-squared (R²) was 99.68%. Likewise, using multiple regression analysis, the prediction model for BOD yielded a MAPE of 0.68%, MAD of 0.06, R of 96.40%, and R² of 92.92%. The findings obtained in the study, it is possible to predict the biological oxygen demand value using feedforward artificial neural networks and linear multiple regression analysis techniques with the help of easily measurable parameters. When comparing both models, it was determined that the model developed using artificial neural networks performed better than the one developed using multiple regression analysis..

Keywords:

- Artificial neural networks,
- Regression analysis,
- Biological oxygen demand,
- Wastewater treatment

¹ Furkan SİDAL ([Orcid ID: 0000-0002-9670-2618](https://orcid.org/0000-0002-9670-2618)), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye

² Doç. Dr. Yener ALTUN ([Orcid ID: 0000-0003-1073-5513](https://orcid.org/0000-0003-1073-5513)), Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yener ALTUN, e-mail: yeneraltun@yyu.edu.tr

GİRİŞ

Su, insanların ve diğer canlıların sağlıklı yaşaması için önemli bir kaynak olduğundan kalitesi, kontrolü ve takibi çok önemlidir. Atık su arıtma tesislerinde de biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) miktarının doğru tahmin edilmesi, su kalitesi yönetimi ve planlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır.

BOİ, atık su yönetim ve planlamasında yararlanılan ana parametrelerden birisidir. BOİ testini inşa etmek, sorumluluk gerektirmekle birlikte hazırlık ve analiz aşamalarını içerir. Bu işlem için yaklaşık beş gün kadar bir zaman gereklidir. Ölçümlerin karmaşıklığı ve uzunluğu da analiz maliyetlerini artırır. Numune alımından sonraki üç saat içinde kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) testi yapılabilir. BOİ değeri kısa bir ölçüm süresi içerisinde diğer parametreler ile ilişkilendirilebiliyorsa atık su arıtma tesisi işletim ve kontrolünde kolaylık sağlayabilecektir (Baki ve Aras, 2018).

BOİ değerini hızlı bir şekilde elde etmek, zaman ve maliyetleri en aza indirmek ve analiz sırasında olumsuz koşulları etkilemek için birçok modelleme çalışmaları yapılmıştır. İstatistiksel modeller hayatın her alanında olduğu gibi bu modellerin geliştirilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, su kalitesi parametreleri arasındaki ilişkileri aydınlatmak için son yıllarda yapay sinir ağları (YSA) teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Son araştırmalara bakıldığında YSA tarafından oluşturulan tahmin modellerinin baskın olduğu ve bu modellemelerde girdi parametresi olarak tesis giriş debisi (Q), sıcaklık (t), KOİ, pH, askıda katı madde (AKM) miktarı gibi parametrelerin kullanıldığı görülmektedir (Erdem, 2021; Sinan, 2010).

Atık su arıtma tesislerinde ön arıtım ile biyolojik arıtım çıkış parametrelerini YSA teknikleri ile tahmin etmek mümkündür (Sinan, 2010).

Literatürdeki çalışmalarda (Yılmaz, 2009), bir atık su arıtma tesisinin girişindeki BOİ değeri YSA kullanılarak modellediği ve ayrıca YSA sonuçlarının çoklu doğrusal regresyon analizi (ÇRA) sonuçları ile karşılaştırmıştır. Performans sonuçları incelendiğinde, YSA modelinin BOİ tahmininde ÇRA'ya göre çok daha etkili bir model olduğu ve gerçeğe çok yakın sonuçlara ulaştığı görülmüştür.

Benzer şekilde Doğan ve arkadaşları (Doğan ve ark., 2008), YSA ve ÇRA kullanarak bir atık su arıtma tesisinin girişindeki BOİ tüketimini modellemiştir. Modellerin karşılaştırılması sonucunda YSA'nın ÇRA'ya göre çok daha doğru ve verimli sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Özkan ve arkadaşları (Özkan ve ark., 2009), Kayseri ilindeki gelişmiş biyolojik atık su arıtma tesisi tarafından 2004-2007 yıllarına ait günlük giriş verileri kullanılarak, çıktı olarak BOİ değerini tahmin etmişlerdir. YSA modelinin oluşturulmasında, t, Z, P, AKM, KOİ ve ÇÖ parametreleri giriş olarak BOİ parametresi ise çıktı olarak kullanılmıştır. Levenberg-Marquardt algoritması kullanılarak 5 girişli ve 2 gizli katmanlı bir YSA modeli en iyi sonucu vermiştir.

BOİ değeri, atık su arıtma tesislerinde su kalitesinin ölçüsünü belirlemek amacıyla rahatlıkla ölçülebilen farklı parametreler aracılığıyla YSA ve ÇRA teknikleriyle tahmin edilmiştir. Çalışmada kullanılan ölçüm sonuçları 2021-2022 yılları arasında Van iline ait bir atık su arıtma tesisinde ölçülen günlük verileri kapsamaktadır. Kullanılan girdi parametreleri pH, t, ÇÖ, Ç, AKM, KOİ, Z ve P değerleri bağımsız değişken, BOİ değeri ise bağımlı değişken olarak seçilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, atık su arıtma tesislerinin yönetiminde kullanılan parametrelerin kullanılarak BOİ değerinin tahmin edilmesine yönelik pratik bir yaklaşım sunmaktır. Çalışmanın literatüre katkısı, atık su arıtma tesislerinde BOİ tahmininde YSA ve regresyon analizinin kullanılabilirliği konusunda bilgi sağlaması ve daha hızlı, ekonomik ve güvenilir bir yöntem sunmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Tahmin Yöntemleri

Tahmin yöntemleri istatistiksel ve akıllı metotlar olarak iki farklı gruba ayrılabilir. İstatistiksel metotlar olarak regresyon analizi, zaman serileri analizi, hareketli ortalamalar analizi, yüzeysel verileri ile tahmin metotları ve ekonomik verilere dayalı tahmin metotları olarak sayılabilir.

Yapay sinir ağları (YSA)

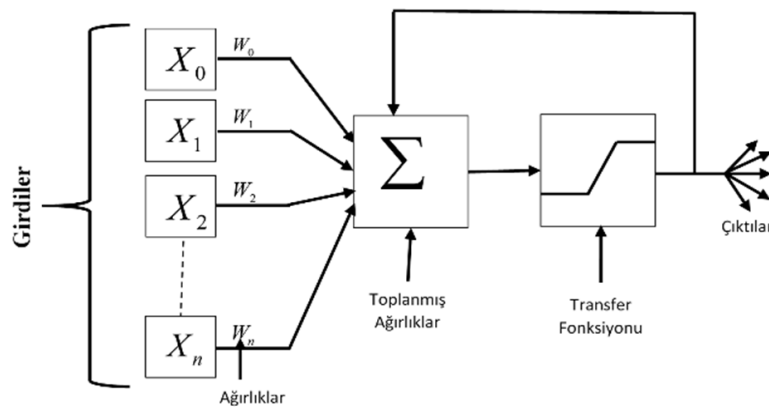
YSA'lar insan beyninin öğrenme yolunu taklit ederek bilgisayarların olayları öğrenmelerini sağlayan ve bu öğrendiği bilgiler ile yeni veriler üreten sistemlerdir. İnsan beyninden esinlenerek, biyolojik ve düşünce özelliklerinin matematiksel modellemesine dayanır. YSA'lar biyolojik sinir yapısıyla canlı organizmalardan esinlenerek oluşturulmuş bir modeldir (Nabiyev, 2021).

İnsanlarda öğrenme, nöronlar arasındaki sinaptik (synaptic) bağlantıları ayarlayarak gerçekleşir. Nöronlar, birçok dendritleri aracılığıyla giriş sinyallerini alır. Dendritlere giriş, harekete geçirici (uyarıcı) veya engelleyici olabilir. Sonuçlar toplanır ve nöronal gövdeye yerleştirilir. Bu girdi belirli bir eşiği aştığında, hücre bu etkiyi aksonu aracılığıyla diğer hücelere iletir. Bu basit açıklama, yapay bir nöron modeli oluşturur (Ersoy ve Karal, 2012).

Çizelge 1. Biyolojik Nöron Yapısı ve YSA Yapısındaki Karşılıkları

Biyolojik Nöron Yapısı	Yapay Nöron Yapısı
Nöron	İşlem Elemanı
Dendrit	Toplama Fonksiyonu
Hücre Gövdesi	Aktivasyon Fonksiyonu
Akson	Çıkış Değeri

YSA'ların temel elemanları, doğal nöronların işleyişlerini taklit eden yapay nöronlardan oluşmaktadır. Bu nöronların aralarında oluşturdukları bağ, katmanlar halinde gruplandırılarak YSA'ları oluşturmaktadır. Şekil 1'de bir beyin hücre yapısını matematiksel olarak modelleyen bir grafik gösterim yer almaktadır (Haykin, 1998).



Şekil 1. Biyolojik Nöronun Matematiksel Gösterimi (Haykin, 1998)

Dış dünyadan gelen bilgiler (X_i) toplanarak girdi katmanına gelir. Yani ağız öğrenmesini istenen bilgiler girdi katmanında toplanır. Ağırlık değerleri (W_i) hücreye gelen girdilerin önemini ve etkisini gösterir. Bu etki pozitif veya negatif olabilir (Caner ve Akarlan, 2009). Bu katmanda her bir girdi değeri kendine ait ağırlıkları ile yani net girdi değeri olarak hücreye bağlanır. Transfer fonksiyonuna gönderilmek için hazırlanan bu net girdi değerleri farklı metotlar ile hesaplanır.

Birleştirme (Toplama) Fonksiyonu yardımıyla girdiler ile ağırlıkların çarpılması sonucu ağa gelen gizli katmandaki her bir hücrenin toplam girdi değeri bulunur. Bu değer hesaplanmasında birkaç yöntem kullanılabilir.

$$NET(S) = \sum_{i=1}^n X_i \cdot W_i \quad (1)$$

Eşitlik 1. X değerleri modelde kullanılan her bir girdiyi W değerleri ise bu girdilerin ağırlıklarını göstermektedir. 1. girdiden n. girdiye kadar her birinin kendilerine verilmiş rastgele ağırlık değerleri ile çarpılıp elde edilen sonuçlar toplanarak değer hesaplanmaktadır.

Birleştirme fonksiyonundan sonra yapay hücrede ulaşılan değer ile bir sonraki aşamadaki aktivasyon fonksiyonuna geçilir. Birleştirme fonksiyonun sonuçları aktivasyon fonksiyonu vasıtası ile çıktıya dönüştürülür. Hücreye gelen bu fonksiyon net girdiyi işleyerek hücrenin bu girdiye karşılık üreteceği çıktıyı ortaya koyar.

Aktivasyon fonksiyonundan çıkan değer hücrenin çıktı değeri olmaktadır. Çıkış katmanından çıkan söz konusu bu bilgi başka bir hücre veya hücrelere girdi olacaktır ya da doğrudan bilgi olarak hücreden çıkacaktır. Bir hücreden uygun sadece bir adet çıktı elde edilir. Sürecin tamamlanması için diğer süreç elemanlarına giden bilgi hep aynıdır. Bir hücrenin çıktısı başka bir hücreye girdi olur. Sürec tamamlandığında YSA görevini başarmış ve üretmesi gereken bilgiyi üretmiştir (Sönmez Çakır, 2020).

YSA'nın modelleme sürecini başarılı bir şekilde uygulayabilmesi için ağ mimarisi çok önemlidir. Bu konfigürasyon sırasında giriş ve çıkış değerlerinin seçimi önemlidir (Erdem, 2021).

Verilerin ağa sunulma aşamasında bölümlendirme işlemi yapılır. Hangi değişkenlerin giriş hangilerinin çıkış değişkenleri olduğunun, verilerin ne kadarlık kısmının eğitim ne kadarlık kısmının test için kullanılacağı kurulacak olan ağa tanıtılır. Çalışmalarda değişken seti; Train (Eğitim), Testing (Test) olmak üzere iki bölüme ayrılmaktadır. Bu bölümlendirme işlemi literatürde genelde %90'ı eğitim verisi, %10'u test verisi; %80'i eğitim verisi, %10'u test verisi, %10'u doğrulama verisi veya %70'i eğitim verisi, %15'i test verisi, %15'i ise doğrulama verisi kullanılmaktadır (Zhange ve ark., 1998).

Regresyon analizi (RA)

En az iki değişken arasındaki ilişki için bir denklem ifadesi regresyon olarak tanımlanır (Çil, 2014). Benzer şekilde regresyon analizinde iki değişkenden birinin bağımlı, diğerinin bağımsız kabul edildiğinde ilişkiyi ifade eden bir denklemi ifade eder (Köksal, 2003).

Doğrusal regresyon “y” olarak adlandırılan sayısal bir bağımlı değişkenle “x” olarak tanımlanan bir veya birden çok bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi modellemenin bir yoludur (Kılıç, 2013). Regresyon analizinde, tüm veriler (ana kitle) yerine, o verilerden seçilen örneklerle analiz yapılır. Bu verilerin miktarı çok büyük olduğu için, zaman ve araştırma maliyetleri göz önünde bulundurularak, ana popülasyondan elde edilen tüm veriler yerine, bu ana popülasyondan rastgele seçilen belirli sayıda veri üzerinde istatistiksel analizler yapılmaktadır. Örnek veriler ile elde edilen sonuçlar ana kitledeki ilişkinin tahmininde kullanılmaktadır (Yüzük, 2019).

Basit doğrusal regresyon modeli, tek bir açıklayıcı(bağımsız) x değişkeni ile açıklanan(bağımlı) Y değişkeni arasında doğrusal(lineer) bir ilişki olduğunda, x değişken yardımıyla Y değişkeni tahmin etmek için kullanılan bir yöntemdir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon \quad (2)$$

Eşitlik 2' de doğrusal bir model kurulabilir. Bu modelde β_0 doğrusal fonksiyonun sabit terimi olup $x=0$ iken regresyon doğrusundaki dikey eksen ile kesiştiği noktayı ifade etmektedir. β_1 ise bu

fonksiyona ait eğimi göstermektedir. Ek olarak regresyon analizindeki bağımsız değişken x 'de meydana gelen bir birimlik değişimin bağımlı değişkende ne kadarlık bir değişime sebep olduğunu ortaya koyan regresyon katsayısıdır. Burada e , hata terimidir (James ve ark., 2021).

Basit regresyon analizinde bağımlı ve bağımsız değişken arasındaki ilişkiler analiz edilirken bazı analizlerde; dikkate alınan bir bağımlı değişkeni birden fazla bağımsız değişken etkileyebilmektedir. Bir bağımlı değişkeni birden çok bağımsız değişkenin etkilemesi durumunda ise çoklu regresyon modeli kurulmalıdır (Okutkan, 2014).

$$Y = b_0 + b_1X_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_nx_{in} + e_i \quad (3)$$

$$Y = b_0 + \sum_{k=1}^p b_kX_{ik} + e_i \quad (4)$$

Eşitlik 3-4' de çok bağımsız değişkenli bir model gösterilmektedir. b_0, b_1, \dots, b_n bilinmeyenleri kısmı regresyon katsayıları veya kısaca regresyon katsayılarıdır (Öztürkcan, 2009).

Yöntem ve veri seti

Yapılan çalışmada YSA ve RA yöntemleri kullanılarak atık su arıtma tesislerindeki BOİ çıkış değeri tahmin edilmiştir. YSA modelinin geliştirilmesi için MATLAB (Neural Network Toolbox) yazılımı içerisinde yer alan YSA modeli kullanılmıştır. RA modeli için ise çoklu lineer (doğrusal) regresyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada Van iline ait bir atık su arıtma tesisinde ölçülen günlük verileri kapsamaktadır. Kullanılan girdi parametreleri pH, Ç, t, ÇÖ, KOİ, AKM, Z ve P değerleri bağımsız değişken BOİ değeri ise bağımlı değişken olarak kullanılmıştır.

Veri olarak Van iline ait bir atık su arıtma tesisinden Ağustos 2021 ile Mayıs 2022 yılları arasındaki 195 adet veri alınmıştır. Öğrenme kümesinin test kümesine oranı 9:1 olarak belirlenmiştir. Böylece rastgele seçilmiş 175 veri öğrenme, 20 veri ise test örnekleri olarak alınmıştır.

$$X_i = 0.8 \frac{(X - X_{\min})}{(X_{\max} - X_{\min})} + 0.1 \quad (5)$$

Veriler ağa sunulmadan önce ayarlanmış minimum maksimum yöntemi ile Eşitlik 5'deki gibi ağların verimliliğini artırmak için 0.1 ila 0.9 aralığında normalize edilerek veri setinin boyutsuz bir form alması sağlanmıştır. Burada X_i normalize edilecek değer, X ölçülen değer, X_{\min} X için en küçük değer, X_{\max} X için en büyük değerdir.

Çalışmada 1 adet model oluşturulmuştur. Oluşturulan modelde bağımsız değişkenlerin birbiri ile ilişkisini anlamlandırmak için korelasyon analizi yapılmıştır. Model parametreleri arasındaki korelasyon değerine göre modele girdi olarak pH, Ç, t, ÇÖ, KOİ, AKM, Z ve P parametreleri tanımlanmıştır. BOİ değerinin tahmini için bu parametreler ile ağ eğitilmiştir. Ağın eğitimini tamamlamasından sonra test verilerinin tahmini BOİ değerleri ile gerçek BOİ değerleri karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Gerçek BOİ değerleri ile YSA ile oluşturulmuş modelin bulunduğu tahmini değerler karşılaştırılarak modellerin performansı ölçülmüştür. Performans değerlendirilmesinde Eşitlik 6'daki Ortalama Mutlak Yüzde Hatası (MAPE) ve Eşitlik 7'deki Mutlak Ortalama Sapma (MAD) formülleri kullanılmıştır.

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n \left| \frac{Y_t - F_t}{Y_t} \right| \times 100 \quad (6)$$

$$MAD = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n |Y_t - F_t| \quad (7)$$

Burada Y gerçek değeri, F , Y için tahmin edilen değeri, n ise toplam tahmin sayısını ifade etmektedir. MAPE, farklı birim değerlere sahip modellerin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Örneğin gerçek değerleri kullanılan bir model ile bu modelde tahmin edilen değerleri karşılaştırmak için kullanılan istatistiktir. MAD, tüm değerlerin aritmetik ortalamadan mutlak farklarının ortalaması olarak hesaplanmaktadır.

Son olarak YSA ile oluşturulan modelin performansı ÇRA yöntemi ile kıyaslanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

YSA Sonuçları

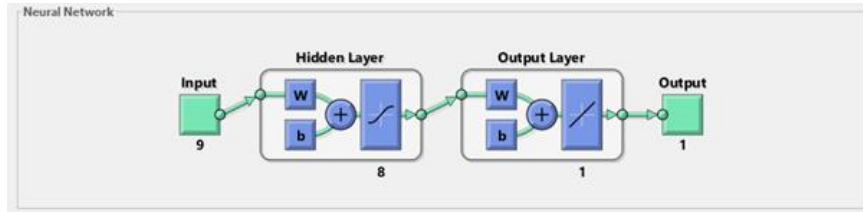
BOİ sonuçlarının tahmini için pH, Ç, t, ÇÖ, KOİ, AKM, Z ve P parametreleri giriş verisi olarak YSA sistemine tanımlanmıştır. YSA sistemi oluşturulmadan önce 195 adet veri normalize edilmiştir. Normalize edilen verilerin içerisinde 20 adet veri oluşturulacak sistemi test etmek için çıkarılmıştır. Geriye kalan 175 adet verinin %80'i eğitim, %10'u test geri kalan %10'u ise doğrulama verisi olarak Şekil 2'deki gibi rastgele bölünmüştür.



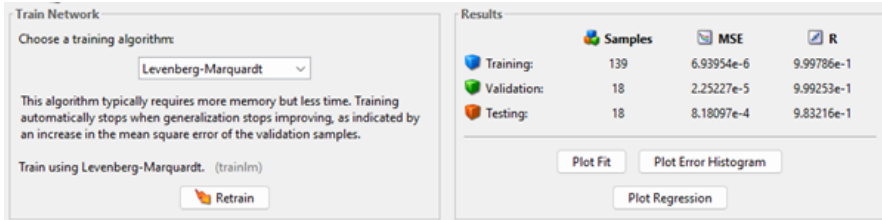
Şekil 2. Veri Seti Bölümlendirmesi

Eğitim algoritması olarak Levenberg-Marquardt (LM) algoritması kullanılmıştır. LM algoritması YSA ile birlikte ileri beslemeli geriye yayımlı algoritmalar arasında kullanılmaktadır. LM algoritması, çeşitli uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır, özellikle az sayıda veri noktası veya daha az eğitim verisi ile çalışılan durumlarda etkili olabilir. Ancak, geniş veri kümeleri veya çok büyük YSA modelleri gibi durumlarda, daha büyük ve daha hızlı algoritmalara ihtiyaç duyulabilir (Okkan ve ark., 2018). YSA'ların gücü, doğrusal olmayan problemleri çözebilmeye yeteneklerinde yatar (Taşova, 2011). Bu nedenle, transfer fonksiyonunun doğrusal olmayan bir yapıya sahip olması önemlidir. Genel olarak çalışmalarda kullanılan doğrusal olmayan transfer fonksiyonları arasında Sigmoid, Hiperbolik Tanjant (tanh) ve Rectified Linear Unit (ReLU) yer alır. Geriye yayılım gibi eğitim algoritmaları, türevlenebilirlik özelliğine ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle, transfer fonksiyonunun

türevlenebilir olması önemlidir. Sigmoid ve tanh gibi geleneksel transfer fonksiyonları türevlenebilirken, ReLU'nun sıfır olduğu noktalarda türevi tanımsızdır. Bu çalışmaya uygun olan transfer fonksiyonu olarak Matlab yazılımında yer alan Lojistik Sigmoid (LogSig) fonksiyonu seçilmiştir. Gizli nöron sayısı, uyguladığımız problemin doğası, veri setinin boyutu ve karmaşıklığı, ağın overfitting eğilimini azaltmak için uyguladığımız düzenlemeler gibi bir dizi faktöre bağlı olarak değişebilir. Dikkatli bir deneme ve hata süreci verilerimize uygun gizli nöron sayısını belirlemek için önemlidir (Ünal ve ark., 2022). Çalışmada gizli nöron sayısı deneme yanılma yoluyla en iyi sonucu veren 8 adet olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. YSA Yapısı



Şekil 4. YSA Tahmin Model Algoritması ve Sonuçları

Modelin eğitimi tamamlandığında eğitim, doğrulama ve test için R değerleri sırasıyla Şekil 4'de olduğu gibi 0.9997, 0.9992 0.9832 olarak bulunurken R değeri ise 0.9972 olarak bulunmuştur. MSE değerleri eğitim, doğrulama ve test için 6.93954e-6, 2.25227e-5 ve 8.18097e-4 olarak belirlenmiştir. YSA ile yapılan BOİ değeri tahmini %99 doğrulukla gerçekleşmiştir. Tahmin sonucunda MAPE değeri 0'a çok yakın, 0.12 olarak bulunmuştur yani %0.12' lik bir hata payı meydana gelmiştir. MAD değeri ise 0.04 olarak bulunmuştur. Tahminlerde MAPE ve MAD değerinin 0'a yakın olması ağın daha gerçekçi sonuçlar vereceği anlamına gelmektedir. Tamamlanan model bu sonuçlar ile daha önce modele hiç tanımlanmamış 20 adet rastgele seçilen veri ile test edilmiştir.

Toplam 9 adet parametreden oluşan bu verilerin YSA ile tahmin edilen BOİ sonucu ile gerçek BOİ sonuçları arasındaki uzaklıkları karşılaştırılmış olup tahmin sonuçlarının gerçek sonuçlara çok yakın olduğu tespit edilmiştir.

ÇRA sonuçları

YSA modeli eğitiminde kullanılan rastgele seçilmiş 175 adet veri ÇRA teknikleri ile analiz edilmiştir. Bağımlı değişken olarak seçilen pH, Ç, t, ÇÖ, KOİ, AKM, Z ve P parametreleri bağımsız BOI parametresi ise bağımlı değişken olarak seçilmiştir.

Çizelge 2. ÇRA İstatistikleri

	Sonuç
Çoklu R	0.9640
R kare	0.9293
Standart Hata	0.9255
Gözlem	175 Adet

ÇRA analizi sonucunda Çizelge 2'de bulunan sonuçlar ortaya çıkmıştır. Her bir değişkene ait BOİ değerini etkileyen katsayılar Çizelge 3'te gösterilmiştir. Eşitlik 8'de bu katsayılar kullanılarak bir

Atık Su Arıtma Tesislerinde Biyokimyasal Oksijen İhtiyacının Yapay Sinir Ağı ve Regresyon Analiziyle Tahmin Edilmesi

regresyon modeli oluşturulmuştur. Örneğin KOİ değişkeninin bir birimlik değişimi BOİ değerini 0,9940 olarak değiştirecektir. Bu katsayılar kullanılarak ilgili parametre değerleri eşitlikte yerine yazıldığında BOİ değeri tahmin edilmektedir. Bu model ile YSA modelini test etmek için ayrılan 20 adet veriye ait BOİ değeri tahmin edilmiştir. ÇRA ile yapılan BOİ değeri tahmini %96 doğrulukla gerçekleşmiştir. Tahmin sonucunda MAPE değeri, 0.68 olarak bulunmuştur yani %0.68' lik bir hata payı meydana gelmiştir. MAD değeri ise 0.06 olarak bulunmuştur. Tahminlerde MAPE ve MAD değerinin 0'a yakın olması ağın daha gerçekçi sonuçlar vereceği anlamına gelmektedir. Tahmin edilen BOİ sonucu ile gerçek BOİ sonuçları arasındaki uzaklıkları karşılaştırılmış olup tahmin sonuçlarının gerçek sonuçlara çok yakın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. ÇRA Katsayıları

	Katsayı
Kesişim	0.0602
Giriş Suyu Debisi (Q)	-0.0389
İletkenlik (ç)	-0.0153
Sıcaklık (t)	0.0161
Çözünmüş Oksijen (ÇO)	-0.0361
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)	0.9940
Askıda Katı Madde (AKM)	-0.0012
Toplam Azot (Z)	-0.0170
Toplam Fosfor (P)	0.0021

$$Y = 0,0602 + (Q * -0,0389) + (\ç * -0,0153) + (t * 0,0161) + (\çO * -0,0361) + (KOİ * 0,9940) + (AKM * -0,0012) + (Z * -0,0170) + (P * 0,0021) \quad (8)$$

YSA modeli ve çra sonuçlarının karşılaştırılması

Çalışma kapsamında 175 adet aynı veri seti kullanılarak YSA ve ÇRA ile iki farklı model geliştirilmiştir. Modellerin geliştirilmesi tamamlandığında YSA ve ÇRA için R değeri sonuçları sırasıyla 0.9972 ve 0.9640 olarak bulunmuştur. R sonuçlarına göre YSA ile geliştirilen modelin ÇRA ile geliştirilen modele göre daha yakın sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Geliştirilen bu modeller, bölünmüş olan 20 adet aynı veri seti ile BOİ değerini tahmin ederek test edilmiştir. Test sonuçları ile ortaya çıkan BOİ tahmin değerleri, gerçek BOİ değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4. Test Giriş Veri Seti

Giriş Suyu Debisi (Q)	pH	İletkenlik	Sıcaklık	Çözünmüş Oksijen	Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)	Askıda Katı Madde (AKM)	Toplam Azot	Toplam Fosfor
1.632	7.57	1.052	18.50	3.50	57.70	7.00	6.91	0.79
1.234	7.53	1.035	18.60	2.30	55.20	5.00	8.10	4.51
1.321	7.78	1.054	15.40	2.50	45.00	11.00	6.42	0.78
1.393	7.64	1.010	13.20	2.40	47.70	7.00	5.91	0.87
1.346	7.34	1.077	13.50	2.60	24.00	16.00	5.75	0.69
967	7.38	1.053	11.20	2.70	32.00	12.00	2.93	0.29
1.045	7.35	1.023	10.80	3.30	42.20	15.00	5.10	0.43
845	7.48	1.024	11.20	2.90	37.40	11.00	4.12	0.70
1.755	7.66	1.079	12.20	2.00	37.20	20.00	9.42	0.99
1.600	7.78	1.055	12.00	2.10	46.70	15.00	8.74	0.98
426	7.71	1.063	12.00	1.40	54.70	9.00	9.10	0.43
1.510	7.54	1.062	12.70	4.20	43.80	13.00	9.24	0.78
1.622	7.69	1.075	13.70	2.70	35.70	12.00	6.89	0.81
1.743	7.64	1.074	13.20	2.40	36.00	11.00	7.82	0.80
1.390	7.49	1.080	15.00	2.80	38.40	14.00	7.23	0.63
1.230	7.53	1.064	15.20	2.80	43.90	12.00	9.57	0.57
1.477	7.52	1.058	14.50	2.90	42.60	8.00	7.56	0.83
1.690	7.58	1.028	15.70	1.70	37.30	13.00	8.12	0.80
1.616	7.67	1.008	15.40	1.70	42.80	13.00	9.13	0.97
1.947	7.66	1.053	11.50	2.40	24.80	14.00	4.62	0.51

Çizelge 5. BOİ Gerçek Değerlerinin YSA ve ÇRA Modelleri ile Karşılaştırılması

BOİ Gerçek Değer	BOİ YSA Tahmini	Gerçek Değer-YSA Sonuç (Mutlak Değer)	BOİ RA Tahmini	Gerçek Değer-RA Sonuç (Mutlak Değer)	En İyi Sonuç YSA-RA
28.85	28.88	0.03	28.73	0.12	YSA
27.60	26.57	1.03	28.15	0.55	RA
22.90	22.53	0.37	22.62	0.28	RA
23.80	23.89	0.09	24.07	0.27	YSA
12.00	11.83	0.17	12.39	0.39	YSA
16.30	16.12	0.18	16.53	0.23	YSA
21.50	21.33	0.17	21.33	0.17	YSA
19.00	18.99	0.01	19.13	0.13	YSA
18.60	18.54	0.06	18.51	0.09	YSA
23.30	23.32	0.02	23.24	0.06	YSA
27.30	27.53	0.23	28.05	0.75	YSA
21.90	22.37	0.47	21.34	0.56	YSA
17.80	17.83	0.03	17.74	0.06	YSA
18.00	17.96	0.04	17.91	0.09	YSA
19.20	19.37	0.17	19.35	0.15	RA
21.90	22.21	0.31	22.08	0.18	RA
21.30	21.36	0.06	21.34	0.04	RA
18.60	18.71	0.11	19.02	0.42	YSA
21.40	21.43	0.03	21.70	0.30	YSA
12.40	12.31	0.09	12.30	0.10	YSA

Çizelge 4'te yer alan giriş parametrelerine ait 20 adet veri kullanılarak YSA ve ÇRA modelleri test edilmiştir. Sırasıyla verilere ait gerçek BOİ sonuçları, her iki modelden elde edilen tahmin sonuçları, gerçek değerler ile tahmin sonuçlarının arasındaki mutlak değer farkları ve gerçek değere en yakın sonuç Çizelge 5'te yer almaktadır. Örneğin herhangi bir dönemde ölçülmüş olan gerçek BOİ değeri 28.88 iken o döneme ait diğer parametreler kullanılarak bu değer YSA modeli sonucunda 28.88, ÇRA modeli sonucunda ise 28.73 olarak tahmin edilmiştir. YSA modelinin tahmin etmiş olduğu değer ile gerçek BOİ değeri arasındaki mutlak fark 0.03, ÇRA modelinin tahmin etmiş olduğu değer ile gerçek BOİ değeri arasındaki mutlak fark ise 0.12 olarak belirlenmiştir. Bu iki fark karşılaştırıldığında YSA ile geliştirilmiş olan model ÇRA ile geliştirilen modele göre gerçek veriye daha yakın değerler ortaya koyduğu tespit edilmiştir. Sonuçlara göre YSA ile geliştirilen model 15 adet ÇRA ile geliştirilen model ise 5 adet veriyi gerçek verilere daha yakın olarak tahmin etmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada atık su yönetim ve planlamasında kullanılan temel parametrelerden olan ve ölçülmesi zor ve uzun olan BOİ değerinin, atık su arıtma tesislerinde su kalitesini belirlemek amacıyla kolayca ölçülebilen diğer parametreler aracılığıyla YSA ve ÇRA teknikleriyle tahmin edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular ışığında BOİ değerinin pH, Ç, t, ÇÖ, KOİ, AKM, Z ve P gibi kolayca ölçülebilen parametreler yardımıyla ileri beslemeli YSA ve doğrusal ÇRA teknikleri ile oluşturulmuş olan modeller kullanılarak tahmin edilmesi mümkündür. Her iki model karşılaştırıldığında ise YSA ile geliştirilmiş olan modelin ÇRA ile geliştirilmiş olan modele göre daha iyi performans göstermiştir. Test için ayrılmış olan verilerin tahmin sonuçları karşılaştırıldığında YSA'nın doğruluk başarısı ÇRA'ne göre %75 daha başarılıdır. ÇRA'da katsayılar yorumlanabilmişken YSA ile sadece performans bakımından bir sonuç çıkarılmıştır.

YSA ile yapılan tahmin sonucunda MAPE değeri 0'a çok yakın 0.12 bulunmuş yani %0.12 hata payı oluşmuştur. Bu değer %10'nun altında olduğu için oluşturulan tahmin modeli yüksek doğruluk değerine sahiptir. Ayrıca başka bir değerlendirme yöntemi olan MAD değeri ise 0.04 olarak bulunmuştur. Bu model ile yapılan hesaplamalar sonucunda R değeri %99,83, R² ise %99,68 olarak

belirlenmiştir. Yani R^2 değeri, çıkış değişkenindeki toplam değişimin %99,68'nin çıkış değişkenleri tarafından açıklandığını göstermiştir.

ÇRA yöntemi ile de BOİ değerinin tahmini yapılarak, geliştirilen modelin sonucunda MAPE değeri 0.68 olarak bulunmuştur yani %0.68 hata payı oluşmuştur. Bu değer %10'nun altında olduğu için oluşturulan tahmin modeli yüksek doğruluk değerine sahiptir. Ayrıca başka bir değerlendirme yöntemi olan MAD değeri ise 0.06 olarak bulunmuştur. Bu model ile yapılan hesaplamalar değerlendirildiğinde ise R %96,40 ve R^2 %92,92 olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre BOİ değerini belirlemek için YSA ve ÇRA'nin kullanımının ümit verici olduğu gözlenmiştir. Yapılan bu çalışma ile herhangi bir atık su arıtma tesisi için YSA'nın başarılı bir şekilde sistemi modelleyebildiği görülmüştür. Bu çalışmanın sınırı çalışma yapılan atık su arıtma tesisinin faaliyetlerine yeni başlamasından ötürü elde edilen veri sayısının az olmasıdır. Her iki model kurulurken veri çeşitliliğinin fazla olması ileride ölçülebilecek farklı verilerin analizini kolaylaştıracaktır. Aksi halde ortaya çıkan yeni veriler modellerin baştan kurulmasına neden olabilir.

Atık su arıtma tesislerinde BOİ değerinin tahmin edilmesi üzerine yapılan bu çalışmanın literatüre birkaç önemli katkısı olabilir. Bu çalışma, BOİ'nin kolayca ölçülebilen diğer parametreler aracılığıyla tahmin edilmesine odaklanmaktadır. Bu, geleneksel olarak uzun süren ve maliyetli olan BOİ ölçümlerinin yerine daha hızlı ve ekonomik bir yöntem sunmaktadır. Bu yöntem yeniliği, atık su arıtma tesislerinin verimli bir şekilde yönetilmesi için önemli bir adımdır. Çalışmada YSA kullanılarak BOİ tahmini yapılmıştır. Bu, literatürdeki diğer çalışmalara bir örnek olarak, YSA'nın atık su arıtma tesislerinde BOİ tahmininde kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu yöntem, çalışmanın literatüre katkısı olarak kabul edilebilir ve araştırmacılara farklı modelleme tekniklerini değerlendirme ve karşılaştırma fırsatı sunmaktadır. YSA modeli ile çoklu regresyon analizi modeli arasında bir performans karşılaştırması yapılmıştır. Bulgular, YSA modelinin daha iyi performans sergilediğini göstermektedir. Bu, BOİ tahmininde YSA'nın daha doğru sonuçlar üretebileceğini ve atık su arıtma tesislerinin yönetiminde daha etkili bir araç olabileceğini gösteren bir bulgudur. Çalışma, ölçüm sonuçları Van iline ait bir atık su arıtma tesisi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ayrıca oluşturulan modeller bu ile ait başka arıtma tesislerinden ölçülen veriler ile test edilmiştir. Test sonucunda diğer veriler üzerinde de aynı derece başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Bu da, çalışmanın bir uygulama örneği sunarak, atık su arıtma tesislerinin yerel veya bölgesel düzeyde BOİ tahmininde kullanabileceği bir model sunmaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Baki, O. T., Aras, E. (2018). Atık Su Arıtma Tesislerinde Biyokimyasal Oksijen İhtiyacının Farklı Regresyon Modelleriyle Tahmin Edilmesi. *Engineering Sciences*, 13(2), 96–105.
- Caner, M., & Akarslan, E. (2009). Mermer Kesme İşleminde Spesifik Enerji Faktörünün ANFIS ve YSA Yöntemleri ile Tahmini. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15(2), 221-226.
- Çil, B. (2014). *İstatistik (8. bs.)*. Ankara: Detay Yayıncılık.

- Doğan, E., Ateş, A., Yılmaz, E. C., & Eren, B. (2008). Application of Artificial Neural Networks to Estimate Wastewater Treatment Plant Inlet Biochemical Oxygen Demand. *Environmental Progress*, 24(4), 439-446.
- Erdem, F. (2021). Modeling Zinc Removal from Wastewater using Artificial Neural Networks (ANN). *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 24(1), 335-342.
- Ersoy, E., Karal, Ö. (2021). Yapay Sinir Ağları ve İnsan Beyni. *İnsan ve Toplum Bilimleri Araştırmaları Dergisi II*, 1(2), 188-205.
- Haykin, S. (1998). *Neural Networks: A Comprehensive Foundation (2. bs.)*. United States: Prentice Hall, Hoboken.
- James, G., Witten, D., Hastie, T., Tibshirani, R. (2021). *An Introduction to Statistical Learning: with Applications in R (1. bs.)*. Almanya: Springer.
- Kılıç, S. (2013). Doğrusal Regresyon Analizi. *İstatistiki İfadeyle*, 3(2), 90-92.
- Köksal, B. A. (2003). *İstatistik Analiz Metotları (1. bs.)*. İstanbul: Çağlayan Kitabevi.
- Nebiyev, V. (2021). *Yapay Zeka (6. bs.)*. Ankara: Seçkin Yayıncılık.
- Okkan, U., Serbeş, Z. A., Gedik, N. (2018). MATLAB ile Levenberg-Marquardt algoritması tabanlı YSA uygulaması: Aylık yağış-akış modellemesi. *DÜMF Mühendislik Dergisi*, 9(1), 351-362.
- Okutkan, C. (2014). *Borsa İstanbul Şirketlerinin Hisse Senedi Getirilerinin Yapay Sinir Ağları ve Çoklu Regresyon Yöntemleri Kullanarak Analizi (Yüksek lisans tezi)* Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 372688).
- Özkan, O., Özdemir, O., Azgın, Ş.T. (2009). Prediction of Biochemical Oxygen Demand in a Wastewater Treatment Plant by Artificial Neural Networks. *ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, 21(6), 4821-4830.
- Öztürkcan, M. (2009). *Regresyon Analizi (1. bs.)*. İstanbul: Maltepe Üniversitesi Yayınları.
- Sinan, R. K. (2010). *Evrensel Atık Su Arıtma Tesislerinde Ön Arıtım ve Biyolojik Arıtım Çıkış Parametrelerinin YSA ile Tahmini (Yüksek lisans tezi)* Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 251411).
- Sönmez Çakır, F. (2020). *Yapay Sinir Ağları Matlab Kodları ve Matlab Toolbox Çözümleri (3. bs.)*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Taşova, O. (2011). *Yapay Sinir Ağları ile Yüz Tanıma (Yüksek lisans tezi)* Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 305570).
- Ünal, T., Çiftçi, Ü., Urgan, N.N. (2022). Bir Gizli Katmanlı Yapay Sinir Ağlarında Optimal Nöron Sayısının İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 17(2), 303-325.
- Yılmaz, E. C. (2009). *Bir Atık Su Arıtma Tesisinin Girişindeki Biyolojik Oksijen İhtiyacının Yapay Sinir Ağları Kullanılarak Modellenmesi (Yüksek lisans tezi)* Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 245247).
- Yüzük, F. (2019). *Bir Atık Su Arıtma Tesisinin Girişindeki Biyolojik Oksijen İhtiyacının Yapay Sinir Ağları Kullanılarak Modellenmesi (Yüksek lisans tezi)* Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi'nden edinilmiştir. (Tez No. 596477).
- Zhang, G., Patuwo, B., & Hu, Y. (1998). Forecasting with Artificial Neural Networks: The State of The Art. *International Journal of Forecasting*, 14(1), 35-62.

Self-Adjoint Sturm-Liouville Dynamic Problem via Proportional Derivative

Tuba GÜLŞEN^{1*}, Mehmet ACAR¹

Highlights:

- Proportional derivative calculus on a time scale and its properties
- The equivalents of important theorems related to spectral theory in the Sturm-Liouville dynamic equation with proportional derivative

Keywords:

- Time Scale Calculus
- Proportional derivative
- Spectral theory
- Sturm-Liouville equation

ABSTRACT:

The concept of a conformable derivative on time scales is a relatively new development in the field of fractional calculus. Traditional fractional calculus deals with derivatives and integrals of non-integer order on continuous time domains. However, time scale calculus extends these concepts to more general time domains that include both continuous and discrete points. The conformable derivative on time scales has several properties that make it advantageous in certain applications. For example, it satisfies a chain rule and has a simple relationship with the conformable integral, which facilitates the development of differential equations involving fractional order dynamics. It also allows for the analysis of systems with both continuous and discrete data points, making it suitable for modeling and control applications in various fields, including physics, engineering, and finance. In this study, the Sturm-Liouville problem and its properties are examined on an arbitrary time scale using the proportional derivative, a more general form of the fractional derivative. Important spectral properties such as self-adjointness, Green formula, Lagrange identity, Abel formula, and orthogonality of eigenfunctions for this problem are expressed in proportional derivatives on an arbitrary time scale.

¹Tuba GÜLŞEN ([Orcid ID: 0000-0002-2288-8050](https://orcid.org/0000-0002-2288-8050)), Mehmet ACAR ([Orcid ID: 0000-0003-1280-8034](https://orcid.org/0000-0003-1280-8034)), Firat University, Faculty of Science, Department of Mathematics, Elazig, Türkiye.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Tuba GÜLŞEN, e-mail: tyalcin@firat.edu.tr

This work is produced from Mehmet ACAR's master's thesis.

INTRODUCTION

Fractional computation means the differentiation and integration of an integer order. Although it lacks several characteristics offered for fractional derivatives (Ortigueira and Machado, 2015), the conformable derivative was initially known as the conformable fractional derivative (Katugampola, 2014; Khalil et al., 2014; Abdeljawad, 2015). It is advisable to think about the proportional derivative on its own, free of the fractional derivative theory, even if the more broad definition of the proportional derivative provided in definition 1 below satisfies some of the features of the fractional derivative. The conformable derivative is a specific case of the proportional derivative.

Conformable fractional derivatives have different meanings depending on the time scale (Gulsen et al., 2017; Gülşen et al., 2018; Yilmaz et al., 2022). It's interesting to note that the conformable fractional derivative operator T_α in (Benkhetou et al., 2016) is defined as $\alpha \in (0, 1]$ in the form of $[[f(\sigma(t) - f(s))t^{1-\alpha} - T_\alpha f(t)[\sigma(t) - s]] \leq \varepsilon |\sigma(t) - s|$;

whereas in (Benkhetou et al., 2015) it is specified as

$$[[f(\sigma(t) - f(s)) - T_\alpha(f^\Delta)(t)[\sigma(t)^\alpha - s^\alpha]] \leq \varepsilon |\sigma(t)^\alpha - s^\alpha|.$$

The truth that $T_0(f) \neq f$ and T_α is not proportional in accordance with definition 1 is evident from both definitions. As a consequence, a new conformable derivative was discovered under the name of the proportional derivative described in (Anderson and Ulness, 2015), and a prospective definition for the proportional derivative on a time scale was discovered in (Segi Rahmat, 2019). When $\alpha = 1$, the Hilger derivative replaces the proportional derivative of a function of order $\alpha \in [0, 1]$ defined on a time scale.

In this research will be used the proportional derivative to analyze the Sturm-Liouville dynamic problem (23). Section 2 contains some basic concepts and notations regarding time scales and proportional derivatives on time scales. We demonstrate a number of spectral features for the problem (23) in Section 3 using various approaches, including self-adjointness, the Green Formula, Lagrange identity, the Abel formula, and orthogonality of eigenfunctions.

MATERIALS AND METHODS

We review the terms and ideas related to the time-scale proportional calculi that are required since they are utilized in the next section.

Definition 1 (Anderson and Ulness, 2015) Let $\alpha \in [0, 1]$. The differential operator \bar{D}^α is only referred to as a proportional derivative if \bar{D}^0 is the unit operator and \bar{D}^1 is the conventional differential operator. Particularly, the operator \bar{D}^α is referred to as being proportional for the derivative function $f=f(t)$, for which only

$$\bar{D}^0 f(t)=f(t) \text{ and } \bar{D}^1 f(t)=\frac{d}{dt} f(t)=f'(t). \quad (1)$$

Remark 2 (Anderson and Ulness, 2015) Based on the employment of a proportional-derivative controller with an controller output u at time t , the fundamental idea of proportional derivative is established. This controller, $u(t)$, has an algorithm (Li et al., 2006)

$$u(t)=\kappa_p E(t) + \kappa_d \frac{d}{dt} E(t).$$

In this case, E represents the error between the state variable and the process variable, while κ_p and κ_d represent the proportional and derivative gains, respectively.

Definition 3 (Anderson and Ulness, 2015) Assume that $\alpha \in [0,1]$, $\kappa_0, \kappa_1: [0,1] \times \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}_0^+$ are continuous functions and that

$$\begin{cases} \lim_{\alpha \rightarrow 0^+} \kappa_0(\alpha, t) = 0, & \lim_{\alpha \rightarrow 0^+} \kappa_1(\alpha, t) = 1, \\ \lim_{\alpha \rightarrow 1^-} \kappa_0(\alpha, t) = 1, & \lim_{\alpha \rightarrow 1^-} \kappa_1(\alpha, t) = 0, \\ \kappa_0(\alpha, t) \neq 0, \alpha \in (0,1], & \kappa_1(\alpha, t) \neq 0, \alpha \in [0,1), \end{cases} \quad (2)$$

are true. In this situation, if the function f is differentiable at t and $f' = \frac{d}{dt}f$, then the differential operator \bar{D}^α defined by

$$\bar{D}^\alpha f(t) = \kappa_1(\alpha, t)f(t) + \kappa_0(\alpha, t)f'(t), \quad (3)$$

is said to be proportional. Here, κ_1 is a type of proportional gain κ_p , κ_0 is a type of derivative gain κ_d , f is the error, and $u = \bar{D}^\alpha f$ is the controller output.

We must remember some basic concepts about time scales in order to get the basic findings for (23). The time scale \mathbb{T} is a closed, non-empty subset of \mathbb{R} in the standard topology of \mathbb{R} . The definitions of the forward and backward jump operators $\sigma, \rho: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{T}$, for $t \in \mathbb{T}$ are as follows:

$$\sigma(t) = \inf \{s \in \mathbb{T} : s > t\}, \quad \rho(t) = \sup \{s \in \mathbb{T} : s < t\}.$$

This definition states that $\inf \emptyset = \sup \mathbb{T}$ and $\sup \emptyset = \inf \mathbb{T}$. If $\sigma(t) > t, \rho(t) < t, \rho(t) < t < \sigma(t)$, t is a right-scattered point, a left-scattered point, an isolated (discrete) point, respectively. On the other hand, if $t < \sup \mathbb{T}$ and $\sigma(t) = t$, t is referred to as right-dense, and if $t > \inf \mathbb{T}$ and $\rho(t) = t$, t is left-dense, and $\rho(t) = t = \sigma(t)$, then t is the dense point. The definition of the graininess function $\mu: \mathbb{T} \rightarrow [0, \infty)$ is $\mu(t) = \sigma(t) - t$. $\mathbb{T}^k = \mathbb{T} - \{m\}$ if there is a maximum point m of \mathbb{T} ; else, $\mathbb{T}^k = \mathbb{T}$. The function $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ is called rd-continuously, provided that \mathbb{T} has a left-sided limit at its right-dense points and at its left-scattered points and $C_{rd}(\mathbb{T})$ will be used to denote the collection of rd-continuous functions $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$. Let $t \in \mathbb{T}^k$ and $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ be a function. $\forall \varepsilon > 0$, and for every s in a neighborhood U of point t , if there is a real number $f^\Delta(t)$, such that

$$|[f(\sigma(t)) - f(s)] - f^\Delta(t)[\sigma(t) - s]| \leq \varepsilon |\sigma(t) - s|, \quad \forall s \in U,$$

$f^\Delta(t)$ is called the delta derivative of f at point t . If t is right-scattered and the function $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ is continuous at t , then

$$f^\Delta(t) = \frac{f(\sigma(t)) - f(t)}{\mu(t)}, \quad (4)$$

and if t is right-dense,

$$f^\Delta(t) = \lim_{s \rightarrow t} \frac{f(t) - f(s)}{t - s}. \quad (5)$$

Let's assume that $f, g: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ is differentiable in $t \in \mathbb{T}^k$. Each rd-continuous function has an inverse derivative F , i.e. $F^\Delta = f(t)$. For $s \in \mathbb{T}$,

$$F(t) = \int_s^t f(\tau) \Delta\tau, \quad \forall t \in \mathbb{T},$$

is an antiderivative of f , i.e.

$$\left(\int_s^t f(\tau) \Delta\tau\right)^\Delta = f(t), \quad (6)$$

and also

$$\int_t^{\sigma(t)} f(t) \Delta t = \mu(t) f(t). \quad (7)$$

(Aulbach and Hilger, 1990; Agarwal et al., 2002; Bohner and Peterson, 2001, 2004; Bohner and Svetlin, 2016; Hilger, 1990) provide comprehensive information on the time scale.

The proportional delta derivative of the function $f : \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ of order $\alpha \in [0, 1]$ at point $t \in \mathbb{T}^k$ will now be defined.

Definition 4 (Segi Rahmat, 2019) Let $f : \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ be a function, $t \in \mathbb{T}^k$, and κ_0 and κ_1 be continuous functions that fulfill the conditions (2). $\forall \varepsilon > 0$, and for every s in a neighborhood U of point t , if there is a real number $D^\alpha f(t)$, $\alpha \in [0, 1]$, such that

$$|\kappa_1(\alpha, t)f(t)[\sigma(t) - s] + \kappa_0(\alpha, t)[f(\sigma(t)) - f(s)] - (D^\alpha f)(t)[\sigma(t) - s]| \leq \varepsilon [\sigma(t) - s], \quad (8)$$

that number is known as the α -th order proportional delta derivative of f at point t .

Let's define

$$\mathfrak{S}(\mathbb{T}) = \{f : \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R} : D^\alpha f(t) \text{ exists and is finite for all } t \in \mathbb{T}^k\},$$

as the collection of all proportional delta differentiable functions (Segi Rahmat, 2019).

Theorem 5 (Segi Rahmat, 2019) Assuming that \mathbb{T} is a time scale, $f : \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ and $t \in \mathbb{T}^k$.

(i) If $f \in \mathfrak{S}(\mathbb{T})$, then f is continuous at t .

(ii) If f is continuous at t , t is right-scattered, and

$$f^\Delta(t) = \frac{f(\sigma(t)) - f(t)}{\sigma(t) - t},$$

exists, then $f \in \mathfrak{S}(\mathbb{T})$. In this case

$$D^\alpha f(t) = \kappa_0(\alpha, t) f^\Delta(t) + \kappa_1(\alpha, t) f(t). \quad (9)$$

(iii) If t is right-dense, and

$$\lim_{t \rightarrow s} \frac{f(t) - f(s)}{t - s} = f'(t),$$

exists as a finite number, then $f \in \mathfrak{S}(\mathbb{T})$, and so

$$D^\alpha f(t) = \kappa_0(\alpha, t) f'(t) + \kappa_1(\alpha, t) f(t). \quad (10)$$

Lemma 6 (Segi Rahmat, 2019) If $f, g : \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ are proportional delta differentiable at the point $t \in \mathbb{T}^k$ and κ_0 and κ_1 satisfy the conditions (2) and are continuous functions, then the following properties are provided:

(i) $D^\alpha[\rho f + \zeta g] = \rho D^\alpha[f] + \zeta D^\alpha[g]$, all $\rho, \zeta \in \mathbb{R}$;

(ii) $D^\alpha[f g] = f^\sigma D^\alpha[g] + D^\alpha[f]g - f^\sigma g \kappa_1(\alpha, \cdot)$;

(iii) $D^\alpha\left[\frac{1}{g}\right] = -\frac{D^\alpha[g]}{g \cdot g^\sigma} + \left(\frac{1}{g} + \frac{1}{g^\sigma}\right) \kappa_1$, $g g^\sigma \neq 0$;

(iv) $D^\alpha\left[\frac{f}{g}\right] = \frac{D^\alpha[f]g^\sigma - f \cdot D^\alpha[g]}{g \cdot g^\sigma} + \frac{f^\sigma}{g^\sigma} \kappa_1(\alpha, \cdot)$, $g g^\sigma \neq 0$.

Definition 7 (Segi Rahmat, 2019) Let $\alpha \in [0, 1]$ and $\kappa_0, \kappa_1 : [0, 1] \times \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}_0^+$ be continuous functions that fulfill (2). $p: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ is regarded as being α -regressive if the requirement

$$1 + \frac{p(\tau) - \kappa_1(\alpha, \tau)}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \mu(\tau) \neq 0, \quad \text{all } \tau \in \mathbb{T}^k,$$

is hold. $\mathfrak{R}_\alpha = \mathfrak{R}_\alpha(\mathbb{T})$ is used to represent the collection of all rd-continuous and α -regressive functions on \mathbb{T} .

Definition 8 (Segi Rahmat, 2019) Let $\alpha \in (0, 1]$ and $p \in \mathfrak{R}_\alpha$. Assume that κ_0, κ_1 are continuous functions and $p/\kappa_0, \kappa_1/\kappa_0$ delta integrable functions on \mathbb{T} , and that (2) is satisfied.

$$\tilde{e}_p(t, s) = \exp \left[\int_s^t \frac{1}{\mu(\tau)} \text{Log} \left(1 + \frac{p(\tau) - \kappa_1(\alpha, \tau)}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \mu(\tau) \right) \Delta\tau \right], \quad (11)$$

$$\tilde{e}_0(t, s) = \exp \left[\int_s^t \frac{1}{\mu(\tau)} \text{Log} \left(1 - \frac{\kappa_1(\alpha, \tau)}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \mu(\tau) \right) \Delta\tau \right], \quad s, t \in \mathbb{T},$$

defines the proportional exponential function on \mathbb{T} for operator D^α , where Log is the fundamental logarithm function. For $\mu(t) = 0$,

$$\tilde{e}_p(t, s) = \exp \left[\int_s^t \left(\frac{p(\tau) - \kappa_1(\alpha, \tau)}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \right) \Delta\tau \right], \quad \tilde{e}_0(t, s) = \exp \left[- \int_s^t \frac{\kappa_1(\alpha, \tau)}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \Delta\tau \right]. \quad (12)$$

Definition 9 (Segi Rahmat, 2019) Let $p : \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ and $\alpha \in (0, 1]$. Let's use \mathfrak{R}_α^+ to define all positive α -regressive components of \mathfrak{R}_α , that is,

$$\mathfrak{R}_\alpha^+ = \left\{ p \in \mathfrak{R}_\alpha : 1 + \frac{p(\tau) - \kappa_1(\alpha, \tau)}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \mu(\tau) > 0, \text{ all } t \in \mathbb{T} \right\}.$$

Lemma 10 (Segi Rahmat, 2019) Assume that $p \in \mathbb{R}$, $\alpha \in (0, 1]$ and $t_0 \in \mathbb{T}$. If $p \in \mathfrak{R}_\alpha^+$, then $\tilde{e}_p(t, t_0) > 0$, $t \in \mathbb{T}$.

Theorem 11 (Segi Rahmat, 2019) If $p \in \mathfrak{R}_\alpha^+$ and $\alpha \in (0, 1]$, the following properties are true:

(i) $\tilde{e}_p(\sigma(t), s) = \left(1 + \frac{p(t) - \kappa_1(\alpha, t)}{\kappa_0(\alpha, t)} \mu(t) \right) \tilde{e}_p(t, s);$

(ii) $\tilde{e}_p(t, s) = \frac{1}{\tilde{e}_p(s, t)};$

(iii) $\tilde{e}_p(t, s) \tilde{e}_p(s, r) = \tilde{e}_p(t, r);$

(iv) $\tilde{e}_p^\Delta(t, s) = \left(\frac{p(t) - \kappa_1(\alpha, t)}{\kappa_0(\alpha, t)} \right) \tilde{e}_p(t, s);$

(v) $\left(\frac{1}{\tilde{e}_p(t, s)} \right)^\Delta = - \left(\frac{p(t) - \kappa_1(\alpha, t)}{\kappa_0(\alpha, t)} \right) \frac{1}{\tilde{e}_p(\sigma(t), s)}.$

Lemma 12 (Segi Rahmat, 2019) Let $\alpha \in (0, 1]$ and $p \in \mathfrak{R}_\alpha$. For fixed $s \in \mathbb{T}$,

$$D^\alpha [\tilde{e}_p(\cdot, s)] = p(t) \tilde{e}_p(\cdot, s),$$

and for the proportional exponential function \tilde{e}_0 ,

$$D^\alpha \left[\int_a^t \frac{f(\tau) \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau))}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \Delta\tau \right] = f(t). \quad (13)$$

Definition 13 (Segi Rahmat, 2019) Assume that $f \in C_{rd}(\mathbb{R})$, $\alpha \in (0, 1]$, and $t_0 \in \mathbb{T}$. The indefinite proportional integral (anti derivative) is defined as

$$\int D^\alpha f(t) \Delta_\alpha \tau = f(t) + c \tilde{e}_0(t, t_0), \quad \forall t \in \mathbb{T}, c \in \mathbb{R},$$

with respect to (12), Lemma 12.

$$\int_a^t f(\tau) \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau)) \Delta_\alpha \tau = \int_a^t \frac{f(\tau) \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau))}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \Delta \tau, \quad \Delta_\alpha \tau = \frac{1}{\kappa_0(\alpha, \tau)} \Delta \tau, \quad (14)$$

describes the definite proportional integral of f on $[a, b]_{\mathbb{T}}$.

Lemma 14 (Segi Rahmat, 2019) Let $\alpha \in (0, 1]$, $f, g \in C_{rd}(\mathbb{R})$, and κ_0, κ_1 be continuous functions and satisfy (2). Then,

$$D^\alpha \left[\int_a^t f(\tau) \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau)) \Delta_\alpha \tau \right] = f(t). \quad (15)$$

Lemma 15 (Segi Rahmat, 2019) If $f, g \in \mathfrak{S}(\mathbb{T})$,

$$(i) \int_a^t D^\alpha [g(\tau)] \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau)) \Delta_\alpha \tau = [g(\tau) \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau))]_{\tau=a}^t.$$

$$(ii) \int_a^b f(t) D^\alpha [g(t)] \tilde{e}_0(b, \sigma(t)) \Delta_\alpha t = [f(t)g(t) \tilde{e}_0(b, \sigma(t))]_{t=a}^b$$

$$\int_a^b g^\sigma(t) \{D^\alpha [f(t)] - \kappa_1(\alpha, t)f(t)\} \tilde{e}_0(b, \sigma(t)) \Delta_\alpha t.$$

Lemma 16 (Segi Rahmat, 2019) Suppose that $\alpha \in (0, 1]$, the function $f : \mathbb{T}^2 \rightarrow \mathbb{R}$ is rd-continuous, κ_0 and κ_1 fulfill (2) and are continuous. In this instance,

$$D^\alpha \left[\int_a^t f(t, \tau) \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau)) \Delta_\alpha \tau \right] = \int_a^t [D_t^\alpha f(t, \tau) - \kappa_1(\alpha, t)f(t, \tau)] \tilde{e}_0(t, \sigma(\tau)) \Delta_\alpha \tau + f(\sigma(t), t), \quad (16)$$

or

$$D^\alpha \left[\int_a^t f(t, \tau) \Delta_\alpha \tau \right] = \int_a^t D_t^\alpha f(t, \tau) \Delta_\alpha \tau + f(\sigma(t), t). \quad (17)$$

Take a look at equation

$$(D^\alpha)^2 y + a(t)D^\alpha y + b(t)y = 0, \quad t \in \mathbb{T}^{k^2}, \quad (18)$$

where $a, b \in C_{rd}(\mathbb{T})$.

Definition 17 (Anderson and Georgiev, 2020) The function $y \in C_{rd}^2(\mathbb{T})$ satisfying equation (18) is referred to as the solution of the equation.

Theorem 18 (Anderson and Georgiev, 2020) Make y_1 and y_2 the results of solving equation (18). Then, $py_1 + qy_2$ is a solution to equation (18) for $p, q \in \mathbb{R}$.

Definition 19 (Anderson and Georgiev, 2020) Any two functions $y_1, y_2 \in C_{rd}^1(\mathbb{T})$ have a proportional Wronskian defined as

$$W(y_1, y_2) = \det \begin{pmatrix} y_1 & y_2 \\ D^\alpha y_1 & D^\alpha y_2 \end{pmatrix}.$$

Definition 20 (Anderson and Georgiev, 2020) If for any $t \in \mathbb{T}^k$ the condition

$$W(y_1, y_2)(t) \neq 0,$$

is hold, the solutions y_1 and y_2 of (18) are said that forms the basic solution set for (18).

Remark 21 (Anderson and Georgiev, 2020) With \wp_c^+ , the collection of functions $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ that provide for the condition

$$\kappa_0 + \mu(f - \kappa_1) > 0, \quad \kappa_0 - \mu\kappa_1 \neq 0,$$

will be shown.

Definition 22 (Bohner and Peterson, 2001) Let $t \in \mathbb{T}^k$ and $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ be a function. $\forall \varepsilon > 0$, and for every s in a neighborhood U of point t , if there is a real number $f^\nabla(t)$, such that

$$|f(\rho(t)) - f(s) - f^\nabla(t)[\rho(t) - s]| \leq \varepsilon |\rho(t) - s|, \quad \forall s \in U,$$

$f^\nabla(t)$ is referred to as the nabla derivative of f at point t .

Definition 23 (Anderson and Georgiev, 2020) Assume that κ_0 and κ_1 provide for (2). On the time scale \mathbb{T} , the derivative \widehat{D}^α defined by

$$\widehat{D}^\alpha f(t) = \kappa_1(\alpha, t)f(t) + \kappa_0(\alpha, t)f^\nabla(t), \quad t \in \mathbb{T}_k, \quad (19)$$

is known as the proportional nabla derivative.

Definition 24 (Anderson and Georgiev, 2020) Suppose that κ_0 and κ_1 provide for (2). When

$$\kappa_0(\alpha, t) - \nu(t)(f(t) - \kappa_1(\alpha, t)) \neq 0, \quad (20)$$

where $\nu(t) = t - \rho(t)$ is the graininess function, the function $f: \mathbb{T} \rightarrow \mathbb{R}$ is said to be proportional ν -regressive for any $\alpha \in (0, 1]$ and any $t \in \mathbb{T}$. $\widehat{\mathfrak{R}}_c$ will stand for the collection of every proportional ν -regressive function on \mathbb{T} .

Definition 25 (Anderson and Georgiev, 2020) If $\alpha \in (0, 1]$, $s, t \in \mathbb{T}$ ve $p \in \widehat{\mathfrak{R}}_c$, then

$$\widehat{e}_p(t, s) = \check{e}_{\frac{p-\kappa_1}{\kappa_0}}(t, s), \quad (21)$$

defines the proportional nabla exponential function with regard to \widehat{D}^α . In this situation, the relationship

$$\widehat{D}^\alpha \widehat{e}_p(t, s) = p(t)\widehat{e}_p(t, s), \quad t \in \mathbb{T}_k, \quad s \in \mathbb{T}, \quad (22)$$

is true and \check{e} represents the exponential function of nabla derivative on the time scale.

RESULTS AND DISCUSSION

Think about the Sturm-Liouville problem for

$$\begin{cases} L^\alpha y \equiv D^\alpha D^\alpha y(t) + q(t)y(t) = \lambda y(t), & \alpha \in (0, 1], \quad t \in [a, b] \cap \mathbb{T}^k, \\ \eta y(a) + \beta D^\alpha y(a) = 0, \\ \delta y(b) + \gamma D^\alpha y(b) = 0, \end{cases} \quad (23)$$

where λ is a spectral parameter, q is a continuous function, $\eta, \beta, \delta, \gamma$ are constant values, and

$$\eta^2 + \beta^2 \neq 0, \quad \delta^2 + \gamma^2 \neq 0.$$

Theorem 26 For L^α and $\alpha \in (0,1]$ given in (23), suppose that

$$\kappa_0^\sigma(\alpha, t) + \mu(t)\kappa_1^\sigma(\alpha, t) \neq 0, \quad t \in \mathbb{T}^k.$$

If $x, y \in \mathbb{D}$, we get

$$x(L^\alpha y) - y(L^\alpha x) = \left(\frac{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}{\kappa_0^\sigma}\right) D^\alpha[W(x, y)] + \frac{\kappa_1^\sigma(\kappa_0 - \mu\kappa_1)}{\kappa_0^\sigma} W(x, y), \quad t \in \mathbb{T}^k. \quad (24)$$

Consequently, we obtain Lagrange identity

$$\hat{e}_0(t, b) D^\alpha \left[\frac{W(x, y)(t)}{\hat{e}_0(t, b)} \right] = x(L^\alpha y) - y(L^\alpha x) \quad (25)$$

for $t, b \in \mathbb{T}^k$.

Proof Assume that $x, y \in \mathbb{D}$ that indicating that $D^\alpha x$, and especially x^Δ is continuous. The proportional delta derivative's product rule on \mathbb{T}^k allows us to determine that

$$\begin{aligned} D^\alpha(W(x, y)) &= x D^\alpha(D^\alpha y) + D^\alpha x (D^\alpha y)^\sigma - \kappa_1 x (D^\alpha y)^\sigma - y D^\alpha(D^\alpha x) - D^\alpha y (D^\alpha x)^\sigma + \kappa_1 y (D^\alpha x)^\sigma \\ &= \kappa_0 [x^\Delta (D^\alpha y)^\sigma - y^\Delta (D^\alpha x)^\sigma] + y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) \\ &= \kappa_0 \kappa_1^\sigma (x^\Delta y - y^\Delta x)^\sigma + y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) \\ &= \kappa_0 \kappa_1^\sigma \left[\left(\frac{D^\alpha x - \kappa_1 x}{\kappa_0} \right) y - \left(\frac{D^\alpha y - \kappa_1 y}{\kappa_0} \right) x \right]^\sigma + y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) \\ &= \frac{\kappa_0 \kappa_1^\sigma}{\kappa_0^\sigma} [(D^\alpha x) y - (D^\alpha y) x]^\sigma + y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) \\ &\Rightarrow D^\alpha(W(x, y)) = y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) - \left(\frac{\kappa_1}{\kappa_0}\right)^\sigma \kappa_0 W(x, y)^\sigma. \end{aligned}$$

$$\kappa_0 f^\sigma = (\kappa_0 - \kappa_1 \mu) f + \mu D^\alpha f,$$

is discovered for any delta differentiable function f . Indeed,

$$\begin{aligned} \kappa_0 f^\sigma &= \kappa_0 (\mu f^\Delta + f) \\ &= \kappa_0 \mu \left(\frac{D^\alpha f - \kappa_1 f}{\kappa_0} \right) + \kappa_0 f \\ &= (\kappa_0 - \kappa_1 \mu) f + \mu D^\alpha f. \end{aligned}$$

Therefore, we follow

$$\begin{aligned} D^\alpha(W(x, y)) &= y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) - \left(\frac{\kappa_1}{\kappa_0}\right)^\sigma [(\kappa_0 - \kappa_1 \mu) W(x, y) + \mu D^\alpha(W(x, y))] \\ &\Rightarrow D^\alpha(W(x, y)) = \frac{\kappa_0^\sigma}{\kappa_0^\sigma + \mu \kappa_1^\sigma} [y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y)] - \frac{\kappa_1^\sigma (\kappa_0 - \kappa_1 \mu)}{\kappa_0^\sigma + \mu \kappa_1^\sigma} W(x, y). \end{aligned} \quad (26)$$

Let

$$\xi(t) = \kappa_1 - \frac{\kappa_1^\sigma \kappa_0}{\kappa_0^\sigma + \mu \kappa_1^\sigma}. \quad (27)$$

Knowing that $\tilde{e}_0 = \hat{\tilde{e}}_\xi$

$$\begin{aligned}\tilde{e}_\xi^\sigma &= \left(1 + \frac{(\xi - \kappa_1)}{\kappa_0} \mu\right) \tilde{e}_\xi \\ &= \left[1 - \frac{\mu\kappa_1^\sigma}{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}\right] \tilde{e}_\xi \\ \Rightarrow \frac{\tilde{e}_\xi}{\tilde{e}_\xi^\sigma} &= \frac{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}{\kappa_0^\sigma}.\end{aligned}$$

Additionally, based on the quotient rule

$$\begin{aligned}\tilde{e}_\xi D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi}\right) &= \tilde{e}_\xi \left[\frac{(D^\alpha W)\tilde{e}_\xi - W(D^\alpha \tilde{e}_\xi)}{\tilde{e}_\xi \tilde{e}_\xi^\sigma} + \kappa_1 \frac{W}{\tilde{e}_\xi}\right] \\ \Rightarrow \tilde{e}_\xi D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi}\right) &= \frac{\tilde{e}_\xi}{\tilde{e}_\xi^\sigma} (D^\alpha W - W\xi) + \kappa_1 W.\end{aligned}\quad (28)$$

(26), replacing it with (28), in our case,

$$\begin{aligned}\tilde{e}_\xi D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi}\right) &= \frac{\tilde{e}_\xi}{\tilde{e}_\xi^\sigma} \left[\frac{\kappa_0^\sigma}{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma} (y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y)) - \left(\frac{\kappa_1^\sigma(\kappa_0 - \kappa_1\mu)}{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}\right) W - \left(\kappa_1 - \frac{\kappa_1^\sigma \kappa_0}{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}\right) W\right] + \kappa_1 W \\ &= y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y) + \left(\frac{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}{\kappa_0^\sigma}\right) W \left[-\frac{\kappa_1^\sigma(\kappa_0 - \kappa_1\mu)}{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma} - \left(\kappa_1 - \frac{\kappa_1^\sigma \kappa_0}{\kappa_0^\sigma + \mu\kappa_1^\sigma}\right)\right] + \kappa_1 W,\end{aligned}$$

and, from here

$$\tilde{e}_\xi D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi}\right) = y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y).$$

Definition 27 Assume that $\alpha \in (0, 1]$ and the condition $\kappa_0^\sigma(\alpha, t) + \mu(t)\kappa_1^\sigma(\alpha, t) \neq 0$ are satisfied where ξ is defined with (27). The formula for the inner product of $f, g \in C_{rd}(\mathbb{T}^k)$ on $[a, b]_{\mathbb{T}} \subseteq \mathbb{T}^k$

$$\langle f, g \rangle = \int_a^b \frac{f(t)g(t)\tilde{e}_0(b, \sigma(t))}{\tilde{e}_\xi(t, b)\kappa_0(\alpha, t)} \Delta t = \int_a^b \frac{f(t)g(t)}{\tilde{e}_\xi(t, b)} \Delta_{a, b} t, \quad \Delta_{a, b} t = \frac{\tilde{e}_0(b, \sigma(t))\Delta t}{\kappa_0(\alpha, t)}.\quad (29)$$

Lemma 28 Assuming $\alpha \in (0, 1]$ and

$$\kappa_0^\sigma(\alpha, t) + \mu(t)\kappa_1^\sigma(\alpha, t) \neq 0, \quad t \in \mathbb{T}^k,$$

let L^α be supplied as in (23). For $x, y \in \mathbb{D}$, Green's formula

$$\langle L^\alpha x, y \rangle - \langle x, L^\alpha y \rangle = W(x, y)(b) - \frac{W(x, y)(a)}{\tilde{e}_\xi(a, b)} \tilde{e}_0(b, a),\quad (30)$$

is provided. Additionally, if $x, y \in \mathbb{D}$, and x, y fulfill the self-adjoint boundary conditions

$$W(x, y)(b) = \frac{W(x, y)(a)}{\tilde{e}_0(a, b)\hat{\tilde{e}}_0(a, b)}\quad (31)$$

Operator L^α is only self-adjoint via inner product (29), i.e.

$$\langle x, L^\alpha y \rangle = \langle L^\alpha x, y \rangle.\quad (32)$$

Proof From Theorem 26 the Lagrangian identity (25) given by

$$\tilde{e}_\xi D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi} \right) = y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y),$$

is true.

$$\int_a^b D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi} \right) \Delta_{a,b} t = \int_a^b \frac{[y(L^\alpha x) - x(L^\alpha y)]}{\tilde{e}_\xi(t, b)} \Delta_{a,b} t,$$

is determined by multiplying both sides of this identity by ξ , then by $\frac{\tilde{e}_0(b, \sigma(t))}{\tilde{e}_\xi(t, b)\kappa_0(\alpha, t)}$, and then by integrating from a to b . Based

$$\frac{W(x, y)(b)}{\tilde{e}_\xi(b, b)} - \frac{W(x, y)(a)}{\tilde{e}_\xi(a, b)} \tilde{e}_0(b, a) = \langle L^\alpha x, y \rangle - \langle x, L^\alpha y \rangle,$$

from Lemma 15, we arrive to Green's formula (30). From this, if $x, y \in \mathbb{D}$ coincide the criteria (31), it could easily deduced the self-adjointness, i.e. $\langle x, L^\alpha y \rangle = \langle L^\alpha x, y \rangle$.

Lemma 29 (Abel Formula) Assume that $\alpha \in (0, 1]$,

$$\kappa_0^\sigma(\alpha, t) + \mu(t)\kappa_1^\sigma(\alpha, t) \neq 0, \quad t \in \mathbb{T}^k,$$

and L^α is supplied by (23). If $x, y \in \mathbb{D}$ are solution of $L^\alpha x = 0$, then the Wronskian is

$$W(x, y)(t) = \frac{W(x, y)(b)}{\tilde{e}_0(b, t)\tilde{e}_0(b, t)} = \frac{W(x, y)(a)}{\tilde{e}_0(a, t)\tilde{e}_0(a, t)}, \quad t \in \mathbb{T}^k, \quad (33)$$

for the constant $a \in \mathbb{T}^k$.

Proof Similar to (25) and the demonstration of Lemma 26, for $x, y \in \mathbb{D}$

$$\tilde{e}_0(t, b) D^\alpha \left[\frac{W(x, y)(t)}{\tilde{e}_0(t, b)} \right] = x(L^\alpha y) - y(L^\alpha x).$$

If x, y are solutions of (23) on \mathbb{T}^k , then $L^\alpha x = 0 = L^\alpha y$ and

$$\tilde{e}_\xi D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi} \right) = 0 \Rightarrow D^\alpha \left(\frac{W}{\tilde{e}_\xi} \right) = 0 \quad (\tilde{e}_\xi \neq 0),$$

$$\Rightarrow \tilde{e}_0(t, b) D^\alpha \left[\frac{W(x, y)(t)}{\tilde{e}_0(t, b)} \right] = 0,$$

thus,

$$D^\alpha \left[\frac{W(x, y)(t)}{\tilde{e}_0(t, b)} \right] = 0,$$

and

$$\frac{W(x, y)(t)}{\tilde{e}_0(t, a)} = c \hat{\tilde{e}}_0(t, b) \hat{\tilde{e}}_0(a, t),$$

where $c = W(x, y)(b)$. According to (33)

$$W(x, y)(t) = \tilde{e}_0(t, a) \hat{e}_0(t, a) W(x, y)(a).$$

Theorem 30 Self-adjointness exists in the proportional Sturm-Liouville problem (23).

Proof According to Green formula (30)

$$\begin{aligned} \langle L^\alpha x, y \rangle &= \frac{W(x, y)(b)}{\tilde{e}_\xi(b, b)} - \frac{W(x, y)(a)}{\tilde{e}_\xi(a, b)} \tilde{e}_0(b, a) + \langle x, L^\alpha y \rangle \\ &= x(b)D^\alpha y(b) - y(b)D^\alpha x(b) - \frac{x(a)D^\alpha y(a) - y(a)D^\alpha x(a)}{\tilde{e}_0(a, b)\hat{e}_0(a, b)} + \langle x, L^\alpha y \rangle \\ &= \langle x, L^\alpha y \rangle, \end{aligned}$$

thereby concluding the proof.

Theorem 31 Eigenfunctions $x(t)$ and $y(t)$ corresponding to different eigenvalues λ_1, λ_2 of the proportional Sturm-Liouville problem (23) are orthogonal, i.e.

$$\int_a^b \frac{x(t)y(t)}{\tilde{e}_\xi(t, b)} \Delta_{a,b} t = 0. \quad (34)$$

Proof From the Green formula (30)

$$W(x, y)(b) - \frac{W(x, y)(a)}{\tilde{e}_\xi(a, b)} \tilde{e}_0(b, a) = \langle L^\alpha x, y \rangle - \langle x, L^\alpha y \rangle,$$

and the conditions $W(x, y)(a) = 0$ and $W(x, y)(b) = 0$ are considered

$$\langle L^\alpha x, y \rangle - \langle x, L^\alpha y \rangle = 0,$$

$$\langle \lambda_1 x, y \rangle - \langle x, \lambda_2 y \rangle = 0,$$

$$\int_a^b \frac{\lambda_1 x(t)y(t)}{\tilde{e}_\xi(t, b)} \Delta_{a,b} t - \int_a^b \frac{\lambda_2 x(t)y(t)}{\tilde{e}_\xi(t, b)} \Delta_{a,b} t = 0,$$

$$(\lambda_1 - \lambda_2) \int_a^b \frac{x(t)y(t)}{\tilde{e}_\xi(t, b)} \Delta_{a,b} t = 0,$$

since $\lambda_1 \neq \lambda_2$, (34) is found.

Theorem 32 Any two solutions to the proportional Sturm-Liouville problem (23) are linearly dependent if and only if $W = 0$.

Proof If any two solutions of the proportional Sturm-Liouville problem (23) are linearly dependent, then $y(x) = cz(x)$, and from here

$$W(y, z)(x) = \det \begin{pmatrix} y(x) & z(x) \\ D^\alpha y(x) & D^\alpha z(x) \end{pmatrix} = \det \begin{pmatrix} cz(x) & z(x) \\ cD^\alpha z(x) & D^\alpha z(x) \end{pmatrix} = 0,$$

and then

$$D^\alpha y = D^\alpha (cz) = \kappa_1 (cz) + \kappa_0 (cz)^{\Delta} = (\kappa_1 + \kappa_0 z^{\Delta})c \Rightarrow D^\alpha y = cD^\alpha z.$$

CONCLUSION

As a generic instance of a conformable derivative, the proportional derivative was used to analyze the Sturm-Liouville dynamic problem. Several spectrum properties were proven for this problem utilizing a variety of techniques, such as self-adjointness, the Green Formula, Lagrange identity, the Abel formula, and orthogonality of eigenfunctions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is a part of second author's master's thesis, which is carried out at Firat University, Türkiye.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Abdeljawad, T. (2015). On conformable fractional calculus. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 279, 57–66.
- Agarwal, R., Bohner, M., O'Regan, D., & Peterson, A. (2002). Dynamic equations on time scales: a survey. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 141(1-2), 1-26.
- Anderson, D. R., & Georgiev, S. G. (2020). *Conformable Dynamic Equations on Time Scales*. Chapman and Hall/CRC.
- Anderson, D. R., & Ulness, D. J. (2015). Newly defined conformable derivatives. *Advances in Dynamical Systems and Applications*, 10(2), 109-137.
- Aulbach, B., & Hilger, S. (1990). A unified approach to continuous and discrete Dynamics. in: *Qualitative Theory of Differential Equations* (Szeged, 1988), 37–56, Colloq. Math. Soc. János Bolyai, 53 North-Holland, Amsterdam.
- Benkhetto, N., Brito da Cruz, A. M. C., & Torres, D. F. M. (2015). A fractional calculus on arbitrary time scales: Fractional differentiation and fractional integration. *Signal Processing*, 107, 230–237.
- Benkhetto, N., Hassani, S., & Torres, D. F. M. (2016). A conformable fractional calculus on arbitrary time scales. *Journal of King Saud University (Science)*, 28(1), 93-98.
- Bohner, M., & Peterson, A. (2001). *Dynamic equations on time scales, An introduction with applications*. Boston, MA: Birkhauser.
- Bohner, M., & Peterson, A. (2004). *Advances in Dynamic Equations on Time Scales*. Boston: Birkhauser.
- Bohner, M., & Svetlin, G. (2016). *Multivariable dynamic calculus on time scales*. Springer.
- Gulsen, T., Yilmaz, E., & Goktas, S. (2017). Conformable fractional Dirac system on time scales. *Journal of Inequalities and Applications*, 2017(1), 161.
- Gülşen, T., Yilmaz, E., & Kemaloğlu, H. (2018). Conformable fractional Sturm-Liouville equation and some existence results on time scales. *Turkish Journal of Mathematics*, 42(3), 1348-1360.
- Hilger, S. (1990). Analysis on measure chains a unified approach to continuous and discrete calculus. *Results in mathematics*, 18(1).

- Katugampola, U. (2014). A new fractional derivative with classical properties, arXiv:1410.6535v2.
- Khalil, R., Horani, M. Al., Yousef, A., & Sababheh, M. (2014). A new definition of fractional derivative. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 264, 57–66.
- Li, Y., Ang, K. H., Chong, G. C. (2006). PID control system analysis and design. *IEEE Control Systems Magazine*, 26(1), 32-41.
- Ortigueira, M. D., & Machado, J. T. (2015). What is a fractional derivative?. *Journal of computational Physics*, 293, 4-13.
- Segi Rahmat, M. R. (2019). A new definition of conformable fractional derivative on arbitrary time scales. *Advances in Difference Equations*, 2019 (1), 1-16.
- Yilmaz, E., Gulsen, T., & Panakhov, E. S. (2022). Existence Results for a Conformable Type Dirac System on Time Scales in Quantum Physics, *Applied and Computational Mathematics an International Journal*, 21(3), 279-291.

Atf İçin: Şahan, T. ve Kendir, E. (2023). Çaprazlanmış Cat^1 -Modüller. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2958-2972.

To Cite: Şahan, T. & Kendir, E. (2023). Crossed Cat^1 -Modules. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2958-2972.

Çaprazlanmış Cat^1 -Modüller

Tunçar ŞAHAN^{1*}, Emre KENDİR²

Öne Çıkanlar:

- Yeni cebirsel model
- Homotopi 3-tipler
- Denklik

Anahtar Kelimeler:

- Çaprazlanmış modül
- cat^1 -grup
- çaprazlanmış kare
- cat^2 -grup

ÖZET:

Gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllerin homotopi 2-tipten bağlantılı uzayların bir cebirsel modeli olduğu iyi bilinen bir gerçektir. Ayrıca cat^1 -gruplar ve grupların kategorisindeki iç kategoriler, diğer bir ifadeyle 2-gruplar veya grup-grupoidler, kategoriksel olarak gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllere denktirler. Bu çalışmada, homotopi 3-tipten bağlantılı uzayların yeni bir cebirsel modeli olarak cat^1 -grupların kategorisindeki çaprazlanmış modül, yani çaprazlanmış cat^1 -modül, cebirsel yapısı karakterize edilip bazı özellikleri incelenmiştir. Ayrıca çaprazlanmış cat^1 -modüllerin kategoriksel olarak gruplar üzerindeki çaprazlanmış karelere ve böylece cat^2 -gruplara denk oldukları gösterilmiştir.

Crossed Cat^1 -Modules

Highlights:

- New algebraic model
- Homotopy 3-types
- Equivalence

Keywords:

- Crossed module
- cat^1 -group
- crossed square
- cat^2 -group

ABSTRACT:

It is well known that crossed modules over groups are an algebraic model of homotopy 2-type connected spaces. Moreover, cat^1 -groups and internal categories in the category of groups, i.e. 2-groups or group-groupoids, are categorically equivalent to crossed modules over groups. In this study, as a new algebraic model of homotopy 3-type connected spaces, the algebraic structure of the crossed module on the category of cat^1 -groups, i.e. the crossed cat^1 -module, is characterized and some of its properties are studied. It is also shown that crossed cat^1 -modules are categorically equivalent to crossed squares over groups and hence to cat^2 -groups.

¹ Tunçar ŞAHAN ([Orcid ID: 0000-0002-6552-4695](https://orcid.org/0000-0002-6552-4695)), Aksaray Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Matematik Bölümü, Aksaray, Türkiye

² Emre KENDİR ([Orcid ID: 0000-0002-7790-8688](https://orcid.org/0000-0002-7790-8688)), Aksaray Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Matematik Bölümü, Aksaray, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Tunçar ŞAHAN, e-mail: tuncarsahan@aksaray.edu.tr

Bu çalışma Emre KENDİR'in Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

Makale 31 Ağustos-3 Eylül 2021 tarihlerinde İstanbul'da düzenlenen "33. Ulusal Matematik Sempozyumu'nda" sözlü olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Çaprazlanmış modüller ilk kez 1946 yılında İngiliz matematikçi John Henry Constantine Whitehead tarafından tanıtıldı ve Whitehead bu yapıları homotopi teorisi ve cebirsel topoloji üzerine yaptığı çalışmalarında kullandı (Whitehead, 1946). Whitehead çaprazlanmış modül kavramını, bir uzayın temel grubunu incelemek için bir araç olarak tanıttı ve bir uzayın birinci homotopi grubunun, uzayla ilişkili belirli bir çaprazlanmış modülün otomorfizm grubu olarak elde edilebileceğini gösterdi (Whitehead, 1948, 1949). Çaprazlanmış modül kavramı diğer matematikçiler tarafından daha da geliştirildi ve kavram, cebirsel topoloji, homotopi teorisi ve kategori teorisi dahil olmak üzere matematiğin çeşitli alanlarında uygulandı (Brown ve Spencer, 1976; Brown ve Higgins, 1978; Brown, 1984; Loday, 1982; Brown ve Loday, 1987a; Porter, 1987). Çaprazlanmış modüller ayrıca uzayların homotopi gruplarını, liflerin (fibrations) homotopi teorisini ve grupların gruplar tarafından genişlemelerinin sınıflandırılmasını incelemek için kullanıldı (Brown, 1987). Ayrıca yüksek boyutlu cebir çalışmalarında ve topolojik kuantum alan teorilerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır (Ellis, 1988; Yetter 1992, 1993). Çaprazlanmış modüller fizikte, özellikle ayar (gauge) teorilerinin incelenmesinde de kullanılmıştır (Dijkgraaf ve Witten, 1990). Genel olarak, çaprazlanmış modül kavramının farklı cebirsel yapılar arasındaki ilişkileri anlamak için yararlı bir araç olduğu kanıtlanmış ve modern matematikte aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (Higgins, 1956; Orzech 1792a, 1972b; Akız ve ark., 2020).

Çaprazlanmış modüller, cebirsel yapıları grup seviyesinin ötesinde genelleştirmeyi amaçlayan daha büyük bir yüksek boyutlu cebir teorisinin parçasıdır. Yüksek boyutlu cebirin temel fikri, yalnızca öğeleri ve işlemleri değil, aynı zamanda bu öğeler arasındaki yüksek boyutlu ilişkileri de içeren cebirsel yapıları incelemektir. Yüksek boyutlu cebirin kalbinde, kategori kavramını genelleştiren matematiksel bir yapı olan n –kategori kavramı vardır. 0 –kategori sadece bir kümedir, 1 –kategori bir kategoridir, 2 –kategori morfizmler arasındaki ilişkileri içeren ekstra yapıya sahip bir kategoridir. Yüksek boyutlu cebirin temel kavrayışlarından biri, geleneksel olarak kümeler ve fonksiyonlar açısından tanımlanan birçok cebirsel yapının doğal olarak n –kategorileri olarak yeniden yorumlanabilmesidir. Örneğin, bir grup tek bir nesneye sahip bir 1 –kategori olarak düşünülebilir, burada morfizmler grup elemanlarıdır ve kompozisyon işlemi grup işlemi ile verilir. Benzer şekilde, bir topolojik uzay, nesnelere noktalar olan ve morfizmleri noktalar arasındaki eğriler olan bir 1 –kategori olarak düşünülebilir.

Brown ve Spencer (1976) grupoidlerin, yani her morfizmin bir izomorfizm olduğu kategorilerin, kategorisinde grup objeleri karakterize edip bu tip bir yapıyı grup-grupoid olarak adlandırmışlardır. Ayrıca grup-grupoidlerin kategorisi ile gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllerin kategorisinin doğal olarak denk olduklarını göstermişlerdir. Bu denklik sayesinde çaprazlanmış modüller için tanımlanmış birçok kavram grup-grupoidlerin kategorisinde yorumlanmıştır (Brown ve Mucuk, 1994; Mucuk ve ark., 2014; Mucuk ve Şahan, 2019, Şahan, 2019). Brown ve Spencer (1976) tarafından verilen denklik, çok işlemli gruplar olarak adlandırılan, çok daha genel cebirsel kategoriler için Porter (1987) tarafından elde edilmiştir. Bu denklik sonucunda benzer yorumlama çalışmaları çok işlemli gruplar için de verilmiştir (Akız ve ark., 2013; Mucuk ve Şahan, 2014; Akız ve ark., 2020; Şahan ve Mucuk, 2020).

Çaprazlanmış kompleksler teorisi, çoklu grup etkimleri ve daha yüksek boyutlu ilişkiler içeren daha yüksek boyutlu cebirsel yapıları incelemek için bir çerçeve sağlar. Çaprazlanmış kompleksler, çaprazlanmış modüllerin doğal bir genellemesidir ve karmaşık bir şekilde etkileşime giren bir grup kulesi ve grup etkimleri olarak tanımlanır (Norrie, 1987, 1990; Brown ve Higgins, 1991; Mutlu ve Porter, 2000). Çaprazlanmış modüller ayrıca cebirde normal altgrupların, modüllerin ve merkezsiz genişlemelerin bir genellemesidir. Ayrıca son zamanlarda çaprazlanmış modül kavramı diferensiyel

geometri ve Galois teoride kullanılmaya başlamıştır (Jurčo, 2011; Martins ve Picken, 2011; Mackenzie, 1987).

1982 yılında Loday (1982) tarafından cat^1 -grup (1-cat-grup) olarak adlandırıldığı yeni bir cebirsel yapı tanımlanmıştır. Bir cat^1 -grup; bir G grubu ve Tanım 11’de hatırlatılan iki özel şartı sağlayan bu grubun $s, t: G \rightarrow G$ şeklinde iki endomorfizminden oluşur. Cat^1 -gruplar, çaprazlanmış modüllere göre daha basit bir cebirsel yapı olarak düşünülebilir. Loday (1982) aynı çaprazlanmış modüller gibi cat^1 -grupların da 2 –tipler için bir cebirsel model olduğunu gösterip, cat^1 -grupların kategorisi ile çaprazlanmış modüllerin kategorisinin denk olduğunu göstermiştir.

Porter (1987) çok işlemler grupları kategorisi olarak adlandırılan bazı cebirsel kategorilerde bir çaprazlanmış modülün nasıl elde edileceğini açık olarak tarif etmiştir. Porter’ın yöntemi kullanılarak birçok cebirsel yapı için çaprazlanmış modül kavramı tanımlanmıştır. Örneğin, çaprazlanmış modüller kategorisi de çok işlemler grupları kategorisi olduğundan çaprazlanmış modüllerin kategorisindeki çaprazlanmış modüller Conduché (1984) tarafından karakterize edilip bu yapılar çaprazlanmış kare olarak adlandırılmıştır (Arvasi, 1997).

Bu çalışmada, materyal ve yöntem bölümünde Porter (1987) tarafından verilen çok işlemler grupları kategorisinde çaprazlanmış modüllerin elde edilmesi yöntem grupları kategorisi özelinde hatırlatılmış ve gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllerin kategorisi elde edilmiştir. Ayrıca çaprazlanmış modüllerin; alt objeleri, normal alt objeleri (idealleri), morfizimleri ve morfizimlerinin çekirdeği ile görüntüsü hatırlatılmıştır. Yine bu bölümde, ayrıntılı olarak cat^1 -grup tanımı Loday (1982) tarafından tanımlandığı haliyle verilmiş, cat^1 -grupların kategorisi tarif edilmiş ve cat^1 -grupların kategorisi ile çaprazlanmış modüllerin kategorisinin denkliği detaylı olarak verilmiştir. Bulgular bölümünde ise Porter (1987) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak, cat^1 -grupların kategorisi de çok işlemler grupları kategorisi olduğundan, cat^1 -grupların kategorisinde çaprazlanmış modüller elde edilmiş ve bu cebirsel yapılar çaprazlanmış cat^1 -modül olarak adlandırılmıştır. Daha sonra çaprazlanmış cat^1 -modüllerin bazı özellikleri incelenip çaprazlanmış cat^1 -modüllerin kategorisi elde edilmiştir. Bununla birlikte, çalışmanın en önemli sonuçlarından biri olan, çaprazlanmış cat^1 -modüllerin kategorisinin çaprazlanmış karelerin kategorisine doğal olarak denk olduğu gösterilmiştir. Böylece, çaprazlanmış kareler 3-tipler için bir cebirsel model olduğundan çaprazlanmış cat^1 -modüller de yine 3-tipler için bir başka cebirsel model olarak gösterilmiştir. Ayrıca, iyi bilinen bir sonuç olarak, çaprazlanmış kareler ile cat^2 -gruplar kategorik olarak denk olduğundan çaprazlanmış cat^1 -modüllerin de cat^2 -gruplara kategorik olarak denk olduğu gösterilmiştir. Son olarak, sonuç bölümünde, bu çalışmanın devamı olarak yapılabilecek çalışmalardan kısaca bahsedilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Porter (1987) çok işlemler grupları kategorisi olarak adlandırılan bazı cebirsel kategorilerde bir çaprazlanmış modülün nasıl elde edileceğini ayrıntılı bir biçimde tarif etmiştir. Bu bölümde öncelikle Porter’ın yöntemi grupları kategorisinde detaylı olarak gösterilmiş ve bu yapıların cat^1 -gruplar ile olan ilişkisinden bahsedilmiştir.

Tanım 1. A ve B birer grup olmak üzere $B \times A \rightarrow A$, $(b, a) \mapsto b \cdot a$ şeklinde gösterilen fonksiyon her $b, b_1 \in B$ ve $a, a_1 \in A$ için aşağıdaki Eşitlik (1)-(3) ‘te verilen şartları sağlıyorsa B grubu A grubu üzerine etkir denir:

$$(b + b_1) \cdot a = b \cdot (b_1 \cdot a) \quad (1)$$

$$b \cdot (a + a_1) = b \cdot a + b \cdot a_1 \quad (2)$$

$$0_B \cdot a = a \quad (3)$$

Tanım 2. G ve H iki grup olsun. Şekil 1’de verilen grup homomorfizmleri dizisinde her bir homomorfizmin görüntüsü bir sonrakinin çekirdeğine eşit ise bu dizi, grupların bir kısa tam dizisi olarak adlandırılır.

$$\{0\} \longrightarrow G \xrightarrow{i} E \xrightarrow{p} H \longrightarrow \{0\}$$

Şekil 1. Grup homomorfizmlerinin bir dizisi

Şekil 1’de verilen grup homomorfizmleri dizisinde $\{0\} \rightarrow G$ ve $H \rightarrow \{0\}$ sıfır homomorfizmler, $i: G \rightarrow E$ bir monomorfizm, $p: E \rightarrow H$ bir epimorfizm ve $i(G) = \ker p$ ise, yani bu dizi bir kısa tam dizi ise E ye H grubunun G grubu ile bir genişlemesi denir.

Tanım 3. E grubu, H grubunun bir G grubu ile bir genişlemesi olsun. Eğer $ps = 1_H$ olacak şekilde bir $s: H \rightarrow E$ grup homomorfizmi varsa E ye H nin G ile bir ayrık (split) genişlemesi denir.

Burada $i: G \rightarrow E$ bir monomorfizm olduğundan G grubunu E grubunun bir alt grubu, hatta $i(G) = \ker p$ olduğundan bir normal alt grubu olarak düşünebilir ve böylece her $g \in G$ için $i(g) = g$ olarak alınabilir.

E grubu, H grubunun bir G grubu ile bir ayrık genişlemesi olmak üzere $H \times G \rightarrow G$, $(h, g) \mapsto h \cdot g = s(h) + g - s(h)$ şeklinde tanımlanan fonksiyon bir grup etkimesi belirtir. Ayrıca $G \times H$ kümesi ile E kümesinin elemanları arasında birebir bir eşleme vardır. Bu eşlemeler ise Eşitlik (4) ve Eşitlik (5)’te verilen fonksiyonlarla tanımlanır.

$$\theta: G \times H \rightarrow E, (g, h) \mapsto \theta(g, h) = g + s(h) \quad (4)$$

$$\theta^{-1}: E \rightarrow G \times H, e \mapsto \theta^{-1}(e) = (e - sp(e), p(e)) \quad (5)$$

Bu birebir eşleşmeler yardımıyla, bu eşleşmeler birer grup homomorfizmi (izomorfizmi) olacak şekilde, $G \times H$ üzerinde bir grup yapısı oluşturulabilir. Bu grubun işlemi ise Eşitlik (6)’daki gibi bulunur.

$$(g, h) + (g_1, h_1) = (g + h \cdot g_1, h + h_1) \quad (6)$$

Böylece Eşitlik (6)’da verilen ikili işlemle $G \times H$ üzerinde, E grubuna izomorf olan, bir grup yapısı oluşturulur. Bu $G \times H$ grubuna G ile H gruplarının yarı-direkt çarpımı denir ve bu grup genelde $G \rtimes H$ ile gösterilir. Bu grupta birim eleman $(0_G, 0_H)$ elemanı ve bir (g, h) elemanının tersi ise $((-h) \cdot (-g), -h)$ dır.

E grubu, B grubunun bir A grubu ile bir ayrık genişlemesi ve E_1 grubu, B_1 grubunun bir A_1 grubu ile bir ayrık genişlemesi olsun. Bu durumda $f_A: A \rightarrow A_1$, $f_E: E \rightarrow E_1$ ve $f_B: B \rightarrow B_1$ birer grup homomorfizmi olmak üzere

$$(i) f_E i = i_1 f_A,$$

$$(ii) f_B p = p_1 f_E \text{ ve}$$

$$(iii) f_E s = s_1 f_B$$

ise (f_A, f_E, f_B) üçlüsüne grupların kategorisinde bir ayrık genişleme dönüşümü denir.

Bir B grubunun bir A grubu üzerine bir grup etkimesi verilmişse bu etkimededen elde edilen yarı-direkt çarpım grubunun B nin A ile bir ayrık genişlemesi olduğunu görmüştük. Ayrıca her A grubunun kendi üzerine konjügasyon etkimesi ile de bir ayrık genişlemesi elde edilebilir.

Tanım 4. $B \times A \rightarrow A$, $(b, a) \mapsto b \cdot a$ fonksiyonu bir grup etkimesi ve $\alpha: A \rightarrow B$ bir grup homomorfizmi olsun. Bu durumda eğer $(1_A, 1_A \times \alpha, \alpha)$ ve $(\alpha, \alpha \times 1_B, 1_B)$ üçlüleri sırasıyla A grubunun konjügasyon etkimesi tarafından üretilen ayrık genişlemesinden B nin A üzerine yukarıda verilen etkimededen elde edilen ayrık genişlemesine ve B nin A üzerine yukarıda verilen etkimededen elde edilen ayrık genişlemesinden B grubunun konjügasyon etkimesi tarafından üretilen ayrık genişlemesine birer ayrık genişleme dönüşümü ise (A, B, α) üçlüsüne bir çaprazlanmış modül denir (Porter, 1987).

Yukarıdaki tanımda verilen $(1_A, 1_A \times \alpha, \alpha)$ ve $(\alpha, \alpha \times 1_B, 1_B)$ dönüşümlerinin birer ayrık genişleme dönüşümü olması için $1_A \times \alpha$ ve $\alpha \times 1_B$ dönüşümlerinin birer grup homomorfizmi olması yeterlidir. Yani; her $a_1, a_2 \in A$ ve her $b \in B$ için $\alpha(a_1) \cdot a_2 = a_1 + a_2 - a_1$ ve $\alpha(b \cdot a_1) = b +$

$\alpha(a_1) - b$ olmalıdır. Böylece çaprazlanmış modül tanımını Porter (1987) aşağıdaki şekilde karakterize etmiştir.

Önerme 5. $\alpha: A \rightarrow B$ dönüşümü A ve B grupları arasında bir grup homomorfizmi olsun ve B grubunun A grubu üzerine etkimesi $b \cdot a$ ile gösterilsin. Eğer her $a, a_1 \in A$ ve $b \in B$ için;

$$(i) \alpha(b \cdot a) = b + \alpha(a) - b,$$

$$(ii) \alpha(a) \cdot a_1 = a + a_1 - a$$

şartları sağlanıyorsa (A, B, α) üçlüsü grupların kategorisinde bir çaprazlanmış modül olur.

Örnek 6. Her G grubu iki farklı biçimde bir çaprazlanmış modül olarak düşünülebilir.

(i) G nin herhangi bir N normal alt grubu için G nin N üzerine konjügasyon etkimesi ile birlikte $\text{inc}: N \rightarrow G$ içine dönüşümü bir çaprazlanmış modüldür.

(ii) G nin tüm otomorfizmlerinin grubu $\text{Aut}(G)$ nin G üzerine $f \cdot x = f(x)$ şeklinde tanımlı etkimesiyle birlikte $\Phi: G \rightarrow \text{Aut}(G)$ iç otomorfizm dönüşümü bir çaprazlanmış modül belirtir.

(A, B, α) ve (A', B', α') birer çaprazlanmış modül, $f_A: A \rightarrow A'$ ve $f_B: B \rightarrow B'$ birer grup homomorfizmi olsun. Eğer

$$(i) f_B \alpha = \alpha' f_A \text{ ve}$$

$$(ii) \text{ her } a \in A \text{ ve } b \in B \text{ için } f_A(b \cdot a) = f_B(b) \cdot f_A(a)$$

şartları sağlanırsa $\langle f_A, f_B \rangle: (A, B, \alpha) \rightarrow (A', B', \alpha')$ ikilisine (A, B, α) dan (A', B', α') ya bir çaprazlanmış modül morfizmi denir.

Gruplar üzerinde tanımlanmış çaprazlanmış modüller ve aralarındaki çaprazlanmış modül morfizmleri $\mathbf{XMod}(\mathbf{Gp})$ ile gösterilen bir kategori yapısına sahiptir.

Tanım 7. Herhangi iki (A, B, α) ve (C, D, γ) çaprazlanmış modülü için eğer;

(i) C ve D sırasıyla A ve B nin birer alt grubudur,

(ii) γ dönüşümü α dönüşümünün C üzerine kısıtlamasıdır ve

(iii) D grubunu C grubu üzerine etkimesi, B grubunun A grubu üzerine etkimesinin kısıtlamasıdır;

şartları sağlanıyorsa (C, D, γ) çaprazlanmış modülü (A, B, α) çaprazlanmış modülünün bir alt objesi ya da alt çaprazlanmış modülü olarak adlandırılır (Norrie, 1987).

Önerme 8. Herhangi bir $\langle f_A, f_B \rangle: (A, B, \alpha) \rightarrow (A', B', \alpha')$ çaprazlanmış modül morfizmi için bu çaprazlanmış modül morfizminin görüntüsü olan $\text{Im} \langle f_A, f_B \rangle = (\text{Im } f_A, \text{Im } f_B, \alpha' |_{\text{Im } f_A})$ bir çaprazlanmış modüldür. Bununla birlikte $(\text{Im } f_A, \text{Im } f_B, \alpha' |_{\text{Im } f_A})$ çaprazlanmış modülü (A', B', α') çaprazlanmış modülünün bir alt çaprazlanmış modülüdür (Norrie, 1987, 1990).

Tanım 9. Herhangi bir (A, B, α) çaprazlanmış modülü verilsin ve (S, T, σ) bu çaprazlanmış modülün bir alt çaprazlanmış modülü olsun. Eğer

$$(i) T \leq B,$$

$$(ii) \text{ her } s \in S \text{ ve } b \in B \text{ için } b \cdot s \in S,$$

$$(iii) \text{ her } t \in T \text{ ve } a \in A \text{ için } t \cdot a - a \in S$$

şartları sağlanıyorsa (S, T, σ) çaprazlanmış modülüne (A, B, α) çaprazlanmış modülünün bir normal alt objesi ya da normal alt çaprazlanmış modülü ya da kısaca bir ideali denir (Norrie, 1987).

Önerme 10. Herhangi bir $\langle f_A, f_B \rangle: (A, B, \alpha) \rightarrow (A', B', \alpha')$ çaprazlanmış modül morfizmi için bu çaprazlanmış modül morfizminin çekirdeği olan $\text{ker} \langle f_A, f_B \rangle = (\text{ker } f_A, \text{ker } f_B, \alpha |_{\text{ker } f_A})$ bir çaprazlanmış modüldür. Ayrıca $(\text{ker } f_A, \text{ker } f_B, \alpha |_{\text{ker } f_A})$ çaprazlanmış modülü (A, B, α) çaprazlanmış modülünün bir idealidir.

Tanım 11. G bir grup ve $s, t \in \text{End}(G)$ dönüşümleri G grubunun birer endomorfizm olmak üzere aşağıdaki şartlar sağlanıyorsa (G, s, t) üçlüsüne bir cat^1 -grup denir (Loday, 1982).

- (i) $st = t, ts = s$ ve
- (ii) $[\ker s, \ker t] = \{0\}$.

Burada (ii) şartı şu anlama gelmektedir: G nin $\ker s$ ve $\ker t$ notmal altgruplarının elemanları değişmelidir.

Önerme 12. (G, s, t) bir cat^1 -grup olmak üzere

- (i) $ss = s$,
- (ii) $tt = t$ ve
- (iii) $\text{Im } s = \text{Im } t$ dir.

Her tek elemanlı $\{0\}$ grubu $s = 1_{\{0\}}$ ve $t = 1_{\{0\}}$ endomorfizmleri ile beraber bir cat^1 -grup olur. Bu cat^1 -gruba sıfır cat^1 -grup denir. Ayrıca, daha genel olarak, her G grubu için $(G, 1_G, 1_G)$ üçlüsü de bir cat^1 -gruptur.

Tanım 13. (G, s, t) ve (G', s', t') birer cat^1 -grup olsun. Bir $f: G \rightarrow G'$ grup homomorfizmi için aşağıdaki şartlar sağlanıyorsa bu f dönüşümüne bir cat^1 -grup morfizmi denir (Loday, 1982).

- (i) $fs = s'f$ ve
- (ii) $ft = t'f$.

$f: (G, s, t) \rightarrow (G', s', t')$ bir cat^1 -grup morfizmi olmak üzere eğer $f: G \rightarrow G'$ grup homomorfizmi bir monomorfizm (epimorfizm, izomorfizm) ise bu $f: (G, s, t) \rightarrow (G', s', t')$ cat^1 -grup morfizmi monomorfizm (epimorfizm, izomorfizm) olarak adlandırılır.

Tüm cat^1 -gruplar ve yukarıda tanımlandığı şekilde cat^1 -gruplar arasındaki dönüşümler ile birlikte $\mathbf{Cat}^1 - (\mathbf{Gp})$ ile gösterilen olan bir kategori yapısına sahiptir.

Loday (1982) gruplar üzerinde tanımlanan çaprazlanmış modüller ile cat^1 -grup yapılarının kategorik anlamda doğal olarak denk olduğunu göstermiştir. Şimdi bazı detaylara ihtiyacımız olduğundan bu denkliği ispatının taslağını da vererek hatırlatalım.

Teorem 14. Grupların üzerinde tanımlanmış çaprazlanmış modüllerin kategorisi $\mathbf{XMod}(\mathbf{Gp})$ ile cat^1 -grupların kategorisi $\mathbf{Cat}^1 - (\mathbf{Gp})$ doğal olarak denktir (Loday, 1982).

İspat: Öncelikle bir $F: \mathbf{XMod}(\mathbf{Gp}) \rightarrow \mathbf{Cat}^1 - (\mathbf{Gp})$ fanktoru tanımlayalım: (A, B, α) herhangi bir çaprazlanmış modül olmak üzere $G = A \rtimes B$, $s(a, b) = (0, b)$ ve $t(a, b) = (0, \alpha(a) + b)$ olmak üzere $F_0((A, B, \alpha)) = (G, s, t)$ dir. Ayrıca bir çaprazlanmış modül morfizmi $\langle f_A, f_B \rangle: (A, B, \alpha) \rightarrow (A', B', \alpha')$ için $F_1(\langle f_A, f_B \rangle) = f_A \times f_B$ dir.

Şimdi, tersine olarak, bir $H: \mathbf{Cat}^1 - (\mathbf{Gp}) \rightarrow \mathbf{XMod}(\mathbf{Gp})$ fanktoru tanımlayalım: Bir (G, s, t) cat^1 -grubu için $\text{Im } s \times \ker s \rightarrow \ker s$, $(x, g) \mapsto x \cdot g = x + g - x$ şeklinde tanımlı fonksiyon bir grup etkimesidir ve bu etkiye ile birlikte $t|_{\ker s}: \ker s \rightarrow \text{Im } s$ dönüşümü bir çaprazlanmış modül yapısına sahiptir. Yani; $H_0((G, s, t)) = (\ker s, \text{Im } s, t|_{\ker s})$ olarak tanımlanır. Ayrıca bir $f: (G, s, t) \rightarrow (G', s', t')$ cat^1 -grup morfizmi için $\langle f|_{\ker s}, f|_{\text{Im } s} \rangle: (\ker s, \text{Im } s, t|_{\ker s}) \rightarrow (\ker s', \text{Im } s', t'|_{\ker s'})$ bir çaprazlanmış modül morfizmidir. Yani; $H_1(f) = \langle f|_{\ker s}, f|_{\text{Im } s} \rangle$ dir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Cat^1 -Grupların Kategorisinde Genişlemeler ve Yarı-Direkt Çarpım

Bu kısımda Porter (1987) tarafından verilen tekniğe göre öncelikle Cat^1 -grupların kategorisinde genişlemeler ve yarı-direkt çarpım kavramları verilmiştir. Yazım kolaylığı açısından makalenin devamında cat^1 -gruplar $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$, $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$, ... şeklinde gösterilmiştir.

$\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$, $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ ve $\mathcal{E} = (E, s_E, t_E)$ birer cat^1 -grup olmak üzere sıfır cat^1 -grup $\mathcal{O} = (\{0\}, 1_{\{0\}}, 1_{\{0\}})$ ile gösterilsin. $i: \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{E}$ bir cat^1 -grup monomorfizmi, $p: \mathcal{E} \rightarrow \mathcal{B}$ bir cat^1 -grup epimorfizmi ve $k: \mathcal{B} \rightarrow \mathcal{E}$ ise $pk = 1_{\mathcal{B}}$ olacak şekilde bir cat^1 -grup monomorfizmi olsun. Bu durumda

$\mathcal{E} = (E, s_E, t_E)$ cat^1 -grubuna $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ nin $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ tarafından bir ayrık cat^1 -grup genişlemesi denir.

Bu şekilde bir ayrık genişlemeden $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ nin $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ üzerine Eşitlik (7)'deki şekilde tanımlanan bir türetilmiş etkimesi elde edilir.

$$B \times \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}, (b, a) \mapsto b \cdot a = k(b) + a - k(b) \quad (7)$$

Bu etkime aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- (i) her $b, b_1 \in B$ ve $a \in A$ için $(b + b_1) \cdot a = b \cdot (b_1 \cdot a)$,
- (ii) her $b \in B$ ve $a, a_1 \in A$ için $b \cdot (a + a_1) = b \cdot a + b \cdot a_1$,
- (iii) her $a \in A$ için $0_B \cdot a = a$,
- (iv) her $b \in B$ için $b \cdot 0_A = 0_A$,
- (v) her $b \in \ker s_B$ ve $a_1 \in \ker t_A$ için $b \cdot a_1 = a_1$,
- (vi) her $b_1 \in \ker t_B$ ve $a \in \ker s_A$ için $b_1 \cdot a = a$.

Burada dikkat edelim ki (iv) şartı (ii) şartından elde edilebilmektedir. Böylece cat^1 -grupların kategorisinde etkime tanımını verebiliriz.

Tanım 15. $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ birer cat^1 -grup olmak üzere Eşitlik (8)'deki şekilde gösterilen bir

$$B \times A \rightarrow A, (b, a) \mapsto b \cdot a \quad (8)$$

fonksiyonu verilsin. Eğer

- (i) her $b, b_1 \in B$ ve $a \in A$ için $(b + b_1) \cdot a = b \cdot (b_1 \cdot a)$,
- (ii) her $b \in B$ ve $a, a_1 \in A$ için $b \cdot (a + a_1) = b \cdot a + b \cdot a_1$,
- (iii) her $a \in A$ için $0_B \cdot a = a$,
- (iv) her $b \in \ker s_B$ ve $a_1 \in \ker t_A$ için $b \cdot a_1 = a_1$,
- (v) her $b_1 \in \ker t_B$ ve $a \in \ker s_A$ için $b_1 \cdot a = a$,

şartları sağlanıyorsa bu fonksiyona \mathcal{B} nin \mathcal{A} üzerine bir cat^1 -grup etkimesi denir.

Bir $\mathcal{E} = (E, s_E, t_E)$ cat^1 -grubu bir $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ cat^1 -grubunun bir $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ cat^1 -grubu tarafından bir ayrık cat^1 -grup genişlemesi ve bir $\mathcal{E}' = (E', s_{E'}, t_{E'})$ cat^1 -grubu bir $\mathcal{B}' = (B', s_{B'}, t_{B'})$ cat^1 -grubunun bir $\mathcal{A}' = (A', s_{A'}, t_{A'})$ cat^1 -grubu tarafından bir ayrık cat^1 -grup genişlemesi olsun. Eğer $f_{\mathcal{A}}: \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}'$, $f_{\mathcal{B}}: \mathcal{B} \rightarrow \mathcal{B}'$ ve $f_{\mathcal{E}}: \mathcal{E} \rightarrow \mathcal{E}'$ ayrık cat^1 -grup genişlemesi yapısını oluşturan dönüşümlerle uyumlu birer cat^1 -grup morfizmi iseler bu durumda $(f_{\mathcal{A}}, f_{\mathcal{E}}, f_{\mathcal{B}})$ üçlüsüne bir ayrık cat^1 -grup genişlemesi morfizmi denir.

Tüm ayrık cat^1 -grup genişlemeleri ve bunlar arasındaki ayrık cat^1 -grup genişlemesi morfizmlerinin kategori yapısına sahip olduğu kolaylıkla görülebilir. Ayrık cat^1 -grup genişlemelerinin kategorisi $\mathbf{SpExt}(\mathbf{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ ile gösterilir.

Tanım 16. $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ birer cat^1 -grup olmak üzere \mathcal{B} nin \mathcal{A} üzerine Eşitlik (9)'deki şekilde gösterilen bir

$$B \times \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}, (b, a) \mapsto b \cdot a \quad (9)$$

cat^1 -grup etkimesi verilsin. Bu durumda $A \rtimes B$ grubu $s_{A \rtimes B}(a, b) := s_A \times s_B(a, b) = (s_A(a), s_B(b))$ ve $t_{A \rtimes B}(a, b) := t_A \times t_B(a, b) = (t_A(a), t_B(b))$ dönüşümleri ile birlikte bir cat^1 -grup yapısına sahiptir.

Gerçekten $s_{A \rtimes B} t_{A \rtimes B} = t_{A \rtimes B}$ ve $t_{A \rtimes B} s_{A \rtimes B} = s_{A \rtimes B}$ olduğunu görmek kolaydır. Şimdi $[\ker s_{A \rtimes B}, \ker t_{A \rtimes B}] = \{(0, 0)\}$ olduğunu da görelim. $(a, b) \in \ker s_{A \rtimes B}$, yani $a \in \ker s_A$, $b \in \ker s_B$ ve $(a_1, b_1) \in \ker t_{A \rtimes B}$, yani $a_1 \in \ker t_A$, $b_1 \in \ker t_B$, olsun. Bu durumda etkime tanımının (iv) ve (v) şartlarından $[\ker s_{A \rtimes B}, \ker t_{A \rtimes B}] = \{(0, 0)\}$ dir (Eşitlik (10)).

$$\begin{aligned}
(a, b) + (a_1, b_1) &= (a + b \cdot a_1, b + b_1) \\
&= (a + a_1, b + b_1) \\
&= (a_1 + a, b_1 + b) \\
&= (a_1 + b_1 \cdot a, b_1 + b) \\
&= (a_1, b_1) + (a, b)
\end{aligned} \tag{10}$$

Bu $(A \rtimes B, s_{A \rtimes B}, t_{A \rtimes B})$ cat^1 -grubuna $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ cat^1 -gruplarının yarı-direkt çarpımı denir ve $\mathcal{A} \rtimes \mathcal{B}$ ile gösterilir. $\mathcal{A} \rtimes \mathcal{B}$ yarı-direkt çarpım cat^1 -grubu \mathcal{B} nin \mathcal{A} tarafından bir ayrık cat^1 -grup genişlemesi olur.

Örnek 17. $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ bir cat^1 -grup olsun. A nın konjügasyon etkimesi aslında $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ nın kendi üzerine bir cat^1 -grup etkimesidir. Gerçekten $a \in \ker s_A$ ve $a_1 \in \ker t_A$ olmak üzere Eşitlik (11)'de görüldüğü gibi $a_1 \cdot a = a$ dir.

$$a_1 \cdot a = a_1 + a - a_1 = a + a_1 - a_1 = a \tag{11}$$

Diğer şartların sağlandığı kolaylıkla görülebilir. Bu etkiye ile birlikte \mathcal{A} nın kendisi ile yarı-direkt çarpımı $\mathcal{A} \rtimes \mathcal{A}$ elde edilir. $\mathcal{A} \rtimes \mathcal{A}$ yarı-direkt çarpım cat^1 -grubu \mathcal{A} nın kendisi tarafından bir ayrık cat^1 -grup genişlemesi olur.

Çaprazlanmış Cat^1 -Modüller

Tanım 18. $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ birer cat^1 -grup olmak üzere \mathcal{B} nin \mathcal{A} üzerine Eşitlik (12)'deki şekilde gösterilen bir

$$\mathcal{B} \times \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}, (b, a) \mapsto b \cdot a \tag{12}$$

cat^1 -grup etkimesi verilsin. Ayrıca bir $\alpha: \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{B}$ cat^1 -grup morfizmi bulunsun. Eğer $(1_{\mathcal{A}}, 1_{\mathcal{A}} \times \alpha, \alpha)$ ve $(\alpha, \alpha \times 1_{\mathcal{B}}, 1_{\mathcal{B}})$ üçlülere sırasıyla \mathcal{A} nın konjügasyon etkimesi tarafından oluşturulan ayrık cat^1 -grup genişlemeden \mathcal{B} nin \mathcal{A} üzerine yukarıda verilen etkimededen elde edilen ayrık genişlemesine ve \mathcal{B} nin \mathcal{A} üzerine yukarıda verilen etkimededen elde edilen ayrık genişlemesinden \mathcal{B} nin kendi üzerine konjügasyon etkimesi ile elde edilen ayrık genişlemesine birer ayrık genişleme dönüşümü ise $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ üçlüsüne bir cat^1 -grupların kategorisinde bir çaprazlanmış modül ya da kısaca bir çaprazlanmış cat^1 -modül denir.

Yukarıdaki tanımda belirtilen şartlar incelendiğinde çaprazlanmış cat^1 -modül tanımı elemanlar cinsinden de verilebilir.

Önerme 19. $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ birer cat^1 -grup ve $\alpha: \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{B}$ bir cat^1 -grup morfizmi olmak üzere Eşitlik (13)'deki şekilde gösterilen fonksiyon bir cat^1 -grup etkimesi olsun.

$$\mathcal{B} \times \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}, (b, a) \mapsto b \cdot a \tag{13}$$

Eğer her $a, a_1 \in A$ ve $b \in B$ için;

$$(i) \quad \alpha(b \cdot a) = b + \alpha(a) - b,$$

$$(ii) \quad \alpha(a) \cdot a_1 = a + a_1 - a$$

şartları sağlanıyorsa $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ üçlüsü bir çaprazlanmış cat^1 -modül olur.

Sonuç 20. $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ birer cat^1 -grup ve $\alpha: \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{B}$ bir cat^1 -grup morfizmi olmak üzere Eşitlik (14)'deki şekilde gösterilen fonksiyon bir cat^1 -grup etkimesi olsun.

$$\mathcal{B} \times \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}, (b, a) \mapsto b \cdot a \tag{14}$$

Eğer bu etkiye ile birlikte (A, B, α) gruplar üzerinde bir çaprazlanmış modül yapısına sahip ise $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ üçlüsü bir çaprazlanmış cat^1 -modül olur. Diğer bir ifadeyle bir çaprazlanmış cat^1 -modül gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllerin kategorisinde bir cat^1 -obje olarak da düşünülebilir.

Örnek 21. G bir grup ve N de bunun bir normal alt grubu olsun. Bu durumda $(G, 1_G, 1_G)$ ve $(N, 1_N, 1_N)$ üçlülerinin birer cat^1 -grup olduklarını biliyoruz. Ayrıca G nin N üzerine konjügasyon etkimesi aslında bir cat^1 -grup etkimesi olur. Böylelikle $\text{inc}: N \rightarrow G$ içine dönüşümü bir cat^1 -grup morfizmi olup $((N, 1_N, 1_N), (G, 1_G, 1_G), \text{inc})$ bir çaprazlanmış cat^1 -modüldür.

Tanım 22. $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ ile $(\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')$ üçlüleri birer çaprazlanmış cat^1 -modül ve $f: A \rightarrow A'$ ile $g: B \rightarrow B'$ birer grup homomorfizmi olsun. Eğer

- (i) $f s_A = s_{A'} f, f t_A = t_{A'} f,$
- (ii) $g s_B = s_{B'} g, g t_B = t_{B'} g,$
- (iii) $g \alpha = \alpha' f$ ve
- (iv) her $a \in A$ ve $b \in B$ için $f(b \cdot a) = g(b) \cdot f(a)$

şartları sağlanıyorsa (f, g) ikilisine $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ dan $(\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')$ ne bir çaprazlanmış cat^1 -modül morfizmi denir ve bu $\langle f_A, f_B \rangle: (A, B, \alpha) \rightarrow (A', B', \alpha')$ şeklinde gösterilir.

Dikkat edelim ki burada (i) şartı $f: \mathcal{A} \rightarrow \mathcal{A}'$ dönüşümünün bir cat^1 -grup morfizmi olduğu, (ii) şartı $g: \mathcal{B} \rightarrow \mathcal{B}'$ dönüşümünün bir cat^1 -grup morfizmi olduğu, (iii) ve (iv) şartları ise $\langle f, g \rangle: (A, B, \alpha) \rightarrow (A', B', \alpha')$ dönüşümünün gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüller arasında tanımlı bir morfizmi olduğu anlamına gelmektedir.

Objeleri tüm çaprazlanmış cat^1 -modüller, morfizmleri ise tüm çaprazlanmış cat^1 -modül morfizmleri olan bir kategori oluşturulabilir. Bu kategori $\mathbf{XMod}(\mathbf{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ ile gösterilir.

Kategori Denkliği

Çaprazlanmış kareler, cebir, topoloji ve kombinatorik dahil olmak üzere çeşitli alanlarda incelenen cebirsel bir kavramdır. Cebirde, grupların yapısını ve grup genişlemelerini incelemek için çaprazlanmış kareler kullanılmıştır. Ayrıca, çaprazlanmış modüller ve çift grupoidler gibi yeni cebirsel yapılar oluşturmak için de çaprazlanmış modüller kullanılmıştır. Topolojide, homotopi teorisini ve daha yüksek boyutlu cebirleri incelemek ve homotopi 3-tipleri için yeni modeller oluşturmak için çaprazlanmış kareler kullanılmıştır. Genel olarak, çaprazlanmış kareler, çeşitli alanlarda uygulamaları olan çok yönlü matematiksel objelerdir. Çaprazlanmış kareler üzerine daha fazla araştırma, cebir, topoloji ve kombinatorikte yeni anlayışlara ve uygulamalara yol açabilir.

Şimdi öncelikle çaprazlanmış kare tanımını Brown ve Loday (1987b) tarafından verildiği şekilde hatırlayalım.

Tanım 23. L, M, N ve P birer grup, $\lambda: L \rightarrow M, \lambda': L \rightarrow N, \mu: M \rightarrow P$ ve $\nu: N \rightarrow P$ birer grup homomorfizmi ve P grubunun L, M ve N grupları üzerine birer etkimesi bulunsun. Bu etkimler sayesinde; M nin N ve L üzerine μ tarafından $m \cdot n = \mu(m) \cdot n$ ve $m \cdot l = \mu(m) \cdot l$ şeklinde tanımlı ve N nin M ve L üzerinde ν tarafından $n \cdot m = \nu(n) \cdot m$ ve $n \cdot l = \nu(n) \cdot l$ şeklinde tanımlı etkimleri elde edilir. Ayrıca P grubu kendi üzerine konjügasyon etkimesi ile ele alınsın.

$$h: M \times N \rightarrow L, (m, n) \mapsto h(m, n) \quad (15)$$

Eğer Eşitlik (15)'te verilen h fonksiyonu ile beraber $\mathcal{X} = (L, M, N, P)$ dördlüsü aşağıdaki şartları sağlıyorsa bu $\mathcal{X} = (L, M, N, P)$ dördlüsüne grupların kategorisinde bir çaprazlanmış kare denir. Her $l \in L, m, m' \in M, n, n' \in N$ ve $p \in P$ için

- (i) λ ve λ' dönüşümleri P -invarianttır, yani, $\lambda(p \cdot l) = p \cdot \lambda(l)$ ve $\lambda'(p \cdot l) = p \cdot \lambda'(l)$ dir. Ayrıca $(M, P, \mu), (N, P, \nu)$ ve $(L, P, \kappa = \mu\lambda = \nu\lambda')$ birer çaprazlanmış modüldür.
- (ii) $\lambda h(m, n) = m + n \cdot (-m), \lambda' h(m, n) = m \cdot n - n,$
- (iii) $h(\lambda(l), n) = l + n \cdot (-l), h(m, \lambda'(l)) = m \cdot l - l,$
- (iv) $h(m + m', n) = m \cdot h(m', n) + h(m, n),$
 $h(m, n + n') = h(m, n) + n \cdot h(m, n')$ ve
- (v) $h(p \cdot m, p \cdot n) = p \cdot h(m, n).$

$\mathcal{X} = (L, M, N, P)$ ve $\mathcal{X}' = (L', M', N', P')$ birer çaprazlanmış kare ve f_L, f_M, f_N ve f_P birer grup homomorfizmi olsun. Eğer bu f_L, f_M, f_N ve f_P grup homomorfizmleri tüm etkimler ve $h: M \times N \rightarrow L$ ile $h': M' \times N' \rightarrow L'$ fonksiyonları ile uyumlu ise $f = \langle f_L, f_M, f_N, f_P \rangle$ dördlüsüne \mathcal{X} den \mathcal{X}' ne tanımlı bir

çaprazlanmış kare morfizmi denir. Gruplar üzerinde tanımlanan tüm çaprazlanmış kareler ile bunlar arasında yukarıdaki gibi tanımlanan çaprazlanmış kare morfizmleri grup homomorfizmlerinin uygun bileşkesi işlemi ile birlikte $\mathbf{X}^2\mathbf{Mod}$ ile gösterilen bir kategori yapısına sahiptir.

Teorem 24. Cat^1 -grupların kategorisindeki çaprazlanmış modüllerin kategorisi $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ ile gruplar üzerindeki çaprazlanmış karelerin kategorisi $\mathbf{X}^2\mathbf{Mod}(\mathbf{Gp})$ doğal olarak denktir.

İspat: Öncelikle bir $\theta: \mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp}) \rightarrow \mathbf{X}^2\mathbf{Mod}(\mathbf{Gp})$ fanktoru tanımlayalım. θ fanktoru objeler üzerinde şöyle tanımlansın: $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ üçlüsü $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisinde bir obje olsun. O halde $L = \ker s_A, M = \ker s_B, N = \text{Im } s_A, P = \text{Im } s_B, \lambda = \alpha|_{\ker s_A}, \lambda' = t_A|_{\ker s_A}, \mu = t_B|_{\ker s_B}, \nu = \alpha|_{\text{Im } s_A}$ ve $h(m, n) = m \cdot n - n$ olmak üzere $\theta_0((\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)) = \mathcal{X} = (L, M, N, P)$ bir çaprazlanmış karedir. Önce h fonksiyonunun iyi tanımlı olduğunu gösterelim. $m \in M = \ker s_B$ ve $n \in N = \text{Im } s_A$ için $s_B(m) = 0$ ve $s_A(a) = n$ olacak şekilde bir $a \in A$ vardır. Böylece $s_A(m \cdot s_A(a) - s_A(a)) = 0$ dır (Eşitlik (16)).

$$\begin{aligned} s_A(m \cdot s_A(a) - s_A(a)) &= s_A(m \cdot s_A(a)) - s_A s_A(a) \\ &= s_B(m) \cdot s_A s_A(a) - s_A s_A(a) \\ &= 0 \cdot s_A(a) - s_A(a) \\ &= s_A(a) - s_A(a) \\ &= 0 \end{aligned} \quad (16)$$

Yani $m \cdot n - n \in \ker s_A = L$ dir. Şimdi (i)-(v) şartlarının sağlandığını gösterelim. Gerçekten, $l \in L, m \in M, n \in N$ ve $p \in P$ olmak üzere P nin M üzerine etkimesi ve N nin L üzerine etkimesi sırasıyla $p \cdot m = p + m - p$ ve $n \cdot l = n + l - n$ şeklinde tanımlıdır.

Şimdi $l \in L, m, m' \in M, n, n' \in N$ ve $p \in P$ olsun.

(i) Önce λ ve λ' dönüşümlerinin P -invariant olduğunu (Eşitlik (17)) gösterelim.

$$\lambda(p \cdot l) = \alpha(p \cdot l) = p + \alpha(l) - p = p \cdot \alpha(l) = p \cdot \lambda(l) \quad (17)$$

ve $p \in P = \text{Im } s_B$ olduğundan $p = s_B(b)$ olacak şekilde bir $b \in B$ vardır. O halde $\lambda'(p \cdot l) = p \cdot \lambda'(l)$ dir (Eşitlik (18)).

$$\lambda'(p \cdot l) = t_A(s_B(b) \cdot l) = t_B s_B(b) \cdot t_A(l) = s_B(b) \cdot t_A(l) = p \cdot \lambda'(l) \quad (18)$$

Böylece λ ve λ' dönüşümlerinin P -invariant olduğunu göstermiş olduk. Şimdi $(M, P, \mu), (N, P, \nu)$ ve $(L, P, \kappa = \mu\lambda)$ üçlülerinin birer çaprazlanmış modül olduğunu gösterelim. (M, P, μ) üçlüsünün bir çaprazlanmış modül olduğunu zaten biliyoruz. Ayrıca $(N, P, \nu) = \langle s_A, s_B \rangle(A, B, \alpha)$ görüntü çaprazlanmış modüldür. O halde sadece $(L, P, \kappa = \mu\lambda)$ üçlüsünün bir çaprazlanmış modül olduğunu göstermek yeterlidir.

(a) $l \in L$ ve $p \in P$ olmak üzere

$$\kappa(p \cdot l) = \mu(\lambda(p \cdot l)) = \mu(p \cdot \lambda(l)) = p + \mu(\lambda(l)) - p = p + \kappa(l) - p \quad (19)$$

(b) $l, l' \in L$ olmak üzere

$$\kappa(l) \cdot l' = \mu(\lambda(l)) \cdot l' = \lambda(l) \cdot l' = l + l' - l \quad (19)$$

olup (L, P, κ) da bir çaprazlanmış modüldür.

(ii) Şimdi $\lambda h(m, n) = m + n \cdot (-m)$ ve $\lambda' h(m, n) = m \cdot n - n$ olduğunu gösterelim.

$$\begin{aligned} \lambda h(m, n) &= \lambda(m \cdot n - n) = \alpha(m \cdot n - n) \\ &= m + \alpha(n) - m - \alpha(n) = m + \alpha(n) \cdot (-m) \\ &= m + \nu(n) \cdot (-m) = m + n \cdot (-m) \end{aligned} \quad (20)$$

ve $n \in N = \text{Im } s_A$ olduğundan $n = s_A(a)$ olacak şekilde bir $a \in A$ vardır. O halde

$$\begin{aligned}\lambda' h(m, n) &= \lambda'(m \cdot s_A(a) - s_A(a)) = t_A(m \cdot s_A(a) - s_A(a)) \\ &= t_A(m \cdot s_A(a)) - t_A(s_A(a)) = t_B(m) \cdot t_A(s_A(a)) - s_A(a) \\ &= \mu(m) \cdot s_A(a) - s_A(a) = \mu(m) \cdot n - n = m \cdot n - n\end{aligned}\quad (21)$$

(iii) Şimdi $h(\lambda(l), n) = l + n \cdot (-l)$ ve $h(m, \lambda'(l)) = m \cdot l - l$ olduğunu gösterelim.

$$h(\lambda(l), n) = \lambda(l) \cdot n - n = \alpha(l) \cdot n - n = l + n - l - n = l + n \cdot (-l) \quad (22)$$

ve

$$h(m, \lambda'(l)) = m \cdot \lambda'(l) - \lambda'(l) = t_B(m) \cdot t_A(l) - t_A(l) = t_A(m \cdot l - l) \quad (23)$$

olup $m \cdot l - l \in N = \text{Im } s_A$ olduğundan $m \cdot l - l = s_A(a)$ olacak şekilde bir $a \in A$ vardır.

Böylece

$$h(m, \lambda'(l)) = t_A(m \cdot l - l) = t_A(s_A(a)) = s_A(a) = m \cdot l - l \text{ dir.} \quad (24)$$

(iv) Şimdi $h(m + m', n) = m \cdot h(m', n) + h(m, n)$ ve $h(m, n + n') = h(m, n) + n \cdot h(m, n')$ olduğunu gösterelim.

$$\begin{aligned}h(m + m', n) &= (m + m') \cdot n - n = m \cdot (m' \cdot n) - n \\ &= m \cdot (m' \cdot n) - m \cdot n + m \cdot n - n \\ &= m \cdot (m' \cdot n - n) + (m \cdot n - n) = m \cdot h(m', n) + h(m, n)\end{aligned}\quad (25)$$

ve

$$\begin{aligned}h(m, n + n') &= m \cdot (n + n') - (n + n') = m \cdot n + m \cdot n' - n' + n \\ &= m \cdot n - n + n + (m \cdot n' - n') + n \\ &= h(m, n) + (n + h(m, n') + n) = h(m, n) + n \cdot h(m, n) \text{ dir.}\end{aligned}\quad (26)$$

(v) Son olarak $h(p \cdot m, p \cdot n) = p \cdot h(m, n)$ olduğunu gösterelim.

$$\begin{aligned}h(p \cdot m, p \cdot n) &= h(p + m - p, p \cdot n) = (p + m - p) \cdot (p \cdot n) - p \cdot n \\ &= (p + m - p + p) \cdot n - p \cdot n = p \cdot (m \cdot n) - p \cdot n \\ &= p \cdot (m \cdot n - n) = p \cdot h(m, n) \text{ dir.}\end{aligned}\quad (27)$$

Böylece $\mathcal{X} = (L, M, N, P)$ gerçekten bir çaprazlanmış karedir. Şimdi $(\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')$ üçlüsü $\mathbf{XMod}(\mathbf{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisinde herhangi bir obje, $\theta_0((\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')) = \mathcal{X}' = (L', M', N', P')$ ve $\langle f, g \rangle: (\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha) \rightarrow (\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')$ ise $\mathbf{XMod}(\mathbf{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisinde herhangi bir morfizm olsun. O halde $f_L = f|_{\ker s_A}$, $f_M = g|_{\ker s_B}$, $f_N = f|_{\text{Im } s_A}$ ve $f_P = g|_{\text{Im } s_B}$ olmak üzere $\theta_1(\langle f, g \rangle) = \langle f_L, f_M, f_N, f_P \rangle: \mathcal{X} = (L, M, N, P) \rightarrow \mathcal{X}' = (L', M', N', P')$ bir çaprazlanmış kare morfizmdir. $\theta = (\theta_0, \theta_1)$ dönüşümünün bir fanktor olduğu kolaylıkla görülebilir. Şimdi bir $\psi: \mathbf{X}^2\mathbf{Mod}(\mathbf{Gp}) \rightarrow \mathbf{XMod}(\mathbf{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ fanktoru tanımlayalım. ψ fanktoru objeler üzerinde şöyle tanımlansın: $\mathcal{X} = (L, M, N, P)$ bir çaprazlanmış kare, $l \in L$, $m \in M$, $n \in N$ ve $p \in P$ olmak üzere $A = L \rtimes N$, $B = M \rtimes P$, $s_A(l, n) = (0, n)$, $t_A(l, n) = (0, \lambda'(l) + n)$, $s_B(m, p) = (0, p)$, $t_B(m, p) = (0, \mu(m) + p)$, $\alpha = \lambda \times \nu$ ve B grubunun A grubu üzerine etkimesi $(m, p) \cdot (l, n) = (m \cdot (p \cdot l) + h(m, p \cdot n), p \cdot n)$ olarak tanımlansın. O halde $\psi_0(\mathcal{X}) = (\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ $\mathbf{XMod}(\mathbf{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisinde bir objedir. Gerçekten $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ nin birer cat^1 -grup ve (A, B, α) nın bir çaprazlanmış modül olduğunu biliyoruz. O halde sadece etkimenin bir cat^1 -grup etkimesi olduğunu göstermemiz yeterlidir. $(m, p) \in B$ ve $(l, n) \in A$ olmak üzere

$$\begin{aligned}s_A((m, p) \cdot (l, n)) &= s_A(m \cdot (p \cdot l) + h(m, p \cdot n), p \cdot n) = (0, p \cdot n) = (0, p) \cdot (0, n) \\ &= s_B(m, p) \cdot s_A(l, n)\end{aligned}$$

ve

(28)

$$\begin{aligned}
t_A((m, p) \cdot (l, n)) &= t_A(m \cdot (p \cdot l) + h(m, p \cdot n), p \cdot n) \\
&= (0, \lambda'(m \cdot (p \cdot l) + h(m, p \cdot n)) + p \cdot n) \\
&= (0, \lambda'(m \cdot (p \cdot l)) + \lambda' h(m, p \cdot n) + p \cdot n) \\
&= (0, \lambda'((\mu(m) + p) \cdot l) + m \cdot (p \cdot n) - p \cdot n + p \cdot n) \\
&= (0, \lambda'((\mu(m) + p) \cdot l) + m \cdot (p \cdot n)) \\
&= (0, (\mu(m) + p) \cdot \lambda'(l) + (\mu(m) + p) \cdot n) \\
&= (0, (\mu(m) + p) \cdot (\lambda'(l) + n)) \\
&= (0, \mu(m) + p) \cdot (0, \lambda'(l) + n) \\
&= t_B(m, p) \cdot t_A(l, n)
\end{aligned} \tag{29}$$

dır. Şimdi $\mathcal{X}' = (L', M', N', P')$ üçlüsü $\mathbf{X}^2\text{Mod}(\mathbf{Gp})$ kategorisinde herhangi bir çaprazlanmış kare, $\theta_0(\mathcal{X}' = (L', M', N', P')) = (\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')$ ve $\langle f_L, f_M, f_N, f_P \rangle: \mathcal{X} \rightarrow \mathcal{X}'$ ise bir çaprazlanmış kare morfizmi olsun. O halde $f = f_L \times f_N$ ve $g = f_M \times f_P$ olmak üzere $\psi_1(\langle f_L, f_M, f_N, f_P \rangle) = \langle f, g \rangle: (\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha) \rightarrow (\mathcal{A}', \mathcal{B}', \alpha')$ $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisinde bir morfizmdir. $\psi = (\psi_0, \psi_1)$ dönüşümünün bir fanktor olduğu kolaylıkla görülebilir. Şimdi $\eta: \psi\theta \Rightarrow 1_{\text{Cat}^1 - \mathbf{XMod}}$ ve $\varphi: \theta\psi \Rightarrow 1_{\mathbf{X}^2\text{Mod}}$ doğal izomorfizmlerini tanımlayalım. $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisindeki her $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ objesi için

$$f_A: \ker s_A \times \text{Im } s_A \rightarrow A, (a, x) \mapsto a + x \tag{30}$$

ve

$$f_B: \ker s_B \times \text{Im } s_B \rightarrow B, (b, y) \mapsto b + y \tag{31}$$

olmak üzere $\eta_{(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)} = (f, g)$ izomorfizmidir. Ayrıca $\mathbf{X}^2\text{Mod}(\mathbf{Gp})$ kategorisindeki herhangi bir çaprazlanmış kare $\mathcal{X} = (L, M, N, P)$ için

$$f_L = \pi_1: L \times \{0\} \rightarrow L, (l, 0) \mapsto l \tag{32}$$

$$f_M = \pi_1: M \times \{0\} \rightarrow M, (m, 0) \mapsto m \tag{33}$$

$$f_N = \pi_2: \{0\} \times N \rightarrow N, (0, n) \mapsto n \tag{34}$$

$$f_P = \pi_2: \{0\} \times P \rightarrow P, (0, p) \mapsto p \tag{35}$$

olmak üzere $\varphi_{\mathcal{X}} = \langle f_L, f_M, f_N, f_P \rangle$ izomorfizmidir. Diğer detaylar kolaylıkla görülebilir. Böylece ispat tamamlanmış olur.

Tanım 25 G bir grup ve $i \in \{1, 2\}$ olmak üzere $s_i, t_i: G \rightarrow G$ dört grup endomorfizmi olmak üzere eğer

$$(i) \text{ her } i \in \{1, 2\} \text{ için } s_i t_i = t_i, t_i s_i = s_i,$$

$$(ii) \text{ } i \neq j \text{ olacak şekilde her } i, j \in \{1, 2\} \text{ için } s_i s_j = s_j s_i, t_i t_j = t_j t_i, s_i t_j = t_j s_i,$$

$$(iii) \text{ her } i \in \{1, 2\} \text{ için } [\ker s_i, \ker t_i] = \{0\}$$

şartları sağlanıyorsa (G, s_1, t_1, s_2, t_2) beşlisine bir cat^2 -grup denir (Loday, 1982).

Açıkça görülüyor ki bir (G, s_1, t_1, s_2, t_2) cat^2 -grubu aslında aynı G grubu üzerinde birbirinden bağımsız fakat birbirleriyle uyumlu iki cat^1 -gruptan, (G, s_1, t_1) ve (G, s_2, t_2) , oluşur.

(G, s_1, t_1, s_2, t_2) ve $(G', s'_1, t'_1, s'_2, t'_2)$ birer cat^2 -grup olsun. Eğer bir $f: G \rightarrow G'$ grup morfizmi

$$(i) \text{ her } i \in \{1, 2\} \text{ için } f s_i = s'_i f,$$

$$(ii) \text{ her } i \in \{1, 2\} \text{ için } f t_i = t'_i f$$

şartlarını sağlıyorsa bu f dönüşümüne cat^2 -grupların bir morfizmi denir. Diğer bir deyişle f grup homomorfizminin bir cat^2 -grup morfizmi olabilmesi için gerek ve yeter şart $f: (G, s_1, t_1) \rightarrow (G', s'_1, t'_1)$ ve $f: (G, s_2, t_2) \rightarrow (G', s'_2, t'_2)$ dönüşümlerinin birer cat^1 -grup morfizmi olmasıdır. Objeleri cat^2 -gruplar, morfizmleri ise yukarıda tanımlandığı şekilde cat^2 -grup morfizmleri olan bir kategori oluşturulabilir. Bu kategori ise $\text{Cat}^2 - \mathbf{Gp}$ sembolü ile gösterilir.

Aşağıdaki teorem 1988 yılında Ellis (1988) tarafından verilmiştir.

Teorem 26 Cat^2 -grupların kategorisi $\text{Cat}^2 - \mathbf{Gp}$ ile gruplar üzerindeki çaprazlanmış karelerin kategorisi $\mathbf{X}^2\text{Mod}(\mathbf{Gp})$ doğal olarak denktir (Ellis, 1988).

Bu denkliklerin ispatlarında verilen fonktörler birlikte göz önüne alındığında $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisindeki bir $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ objesi için $G := (\ker s_A \rtimes \text{Im } s_A) \rtimes (\ker s_B \rtimes \text{Im } s_B)$ dersek

$$s_1: G \rightarrow G, ((a, x), (b, y)) \mapsto s_1((a, x), (b, y)) = ((0, x), (0, y)) \quad (36)$$

$$t_1: G \rightarrow G, ((a, x), (b, y)) \mapsto t_1((a, x), (b, y)) = ((0, t_A(a) + x), (0, t_B(b) + y)) \quad (37)$$

$$s_2: G \rightarrow G, ((a, x), (b, y)) \mapsto s_2((a, x), (b, y)) = ((0, 0), (b, y)) \quad (38)$$

$$t_2: G \rightarrow G, ((a, x), (b, y)) \mapsto t_2((a, x), (b, y)) = ((0, 0), (\alpha(a), \alpha(x)) + (b, y)) \quad (39)$$

olmak üzere (G, s_1, t_1, s_2, t_2) beşlisi bir cat^2 -grup olur. Tersine olarak (G, s_1, t_1, s_2, t_2) bir cat^2 -grup ise $A = \ker s_2$, $B = \text{Im } s_2$, $\alpha = t_2|_A$, $s_A = s_1|_A$, $t_A = t_1|_A$, $s_B = s_1|_B$ ve $t_B = t_1|_B$ olmak üzere $\mathcal{A} = (A, s_A, t_A)$ ve $\mathcal{B} = (B, s_B, t_B)$ birer cat^1 -grup ve (A, B, α) bir çaprazlanmış modüldür. Hatta $(\mathcal{A}, \mathcal{B}, \alpha)$ üçlüsü $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ kategorisinin bir objesidir.

O halde yukarıdaki verilmiş olan sonuçlar ışığında bizde aşağıdaki teoremi verebiliriz.

Teorem 27 Çaprazlanmış cat^1 -modüllerin kategorisi $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ ile cat^2 -grupların kategorisi $\text{Cat}^2 - \mathbf{Gp}$ doğal olarak denktir.

Ayrıca Şahan ve Mohammed (2019) çaprazlanmış modüllerin kategorisindeki iç kategorileri karakterize edip bu tip cebirsel yapılar ile çaprazlanmış karelerin kategoriksel olarak denk olduklarını göstermişlerdir. Bu sonuca dayanarak aşağıdaki teoremi elde ederiz.

Teorem 28 Cat^1 -grupların kategorisindeki çaprazlanmış modüllerin kategorisi $\mathbf{XMod}(\text{Cat}^1 - \mathbf{Gp})$ ile çaprazlanmış modüllerin kategorisindeki iç kategorilerin kategorisi $\mathbf{Cat}(\mathbf{XMod})$ doğal olarak denktir.

SONUÇ

Bu çalışmada öncelikle cat^1 -grupların kategorisindeki çaprazlanmış modüller tanımlanmış ve elemanlar, işlemler ve etkimler yardımı ile karakterize edilmiştir. Bu tip cebirsel yapılar çaprazlanmış cat^1 -modüller olarak adlandırılmış ve çeşitli özellikleri incelenerek çaprazlanmış cat^1 -modüllerin kategorisi oluşturulmuştur. Bir çaprazlanmış cat^1 -modülün aslında gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllerin kategorisinde bir cat^1 -obje olduğu görülmüştür. Son olarak, bu çalışmanın asıl amacı içinde, çaprazlanmış cat^1 -modüller kategorisinin gruplar üzerindeki çaprazlanmış karelerin kategorisi ile doğal olarak denk olduğu ispatlanmış ve böylece yeni oluşturulan bu cebirsel yapının, çaprazlanmış cat^1 -modüllerin, homotopi 3-tipleri için yeni bir cebirsel model olduğu ortaya çıkarılmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalardan bilindiği üzere gruplar üzerindeki çaprazlanmış karelerin kategorisi ile cat^2 -grupların kategorisi doğal olarak denktir. Bu denklik bu çalışmada elde edilen sonuç ile birleştirildiğinde çaprazlanmış cat^1 -modüllerin kategorisinin de cat^2 -grupların kategorisine denk olduğu sonucuna varılır.

Daha sonra yapılabilecek çalışmalara örnek olarak, bu çalışmada tekrar edilen teknikler kullanılarak, benzer sonuçlar, yalnızca cat^1 -gruplar için değil, aynı zamanda daha genel ve daha yüksek boyutlu cebirsel kategoriler için de gösterilebilir. Ayrıca grup teorisinde bildiğimiz; normallik, bölüm, merkez, komütatör, vb. kavramları, gruplar üzerindeki çaprazlanmış modüllerde elde edildiği gibi, çaprazlanmış cat^1 -modüller için de elde edilebilir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Akız, H. F., Alemdar, N., Mucuk, O. ve Şahan, T. (2013). Coverings of internal groupoids and crossed modules in the category of groups with operations. *Georgian Mathematical Journal*, 20(2), 223 – 238.
- Akız, H. F., Mucuk, O. ve Şahan, T. (2020). Liftings of crossed modules in the category of groups with operations. *Boletim da Sociedade Paranaense de Matemática*, 38(7), 181 – 193.
- Alp, M. (1998). Pullbacks of crossed modules and cat^1 -groups. *Turkish Journal of Mathematics*, 22, 273 – 281.
- Arvasi, Z. (1997). Crossed squares and 2-crossed modules of commutative algebras. *Theory and Applications of Categories*, 3(7), 160 – 181.
- Brown, R. (1984). Coproducts of crossed P –modules: Applications to second homotopy groups and to the homology of groups. *Topology*, 23(3), 337 – 345.
- Brown, R. (1987). From groups to groupoids: a brief survey. *Bulletin of the London Mathematical Society*, 19, 113 – 134.
- Brown, R. ve Higgins, P. J. (1978). On the connection between the second relative homotopy groups of some related spaces. *Proceedings of the London Mathematical Society*, 36, 193-212.
- Brown, R. ve Higgins, P. J. (1991). The classifying space of a crossed complex. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 110(1), 95 – 120.
- Brown, R. ve Loday, J. L. (1987a). Homotopical excision, and Hurwicz theorems, for n –cubes of spaces. *Proceedings of the London Mathematical Society*, 54(3), 176 – 192.
- Brown, R. ve Loday, J. L. (1987b). Van Kampen theorems for diagrams of spaces. *Topology*, 26(3), 311 – 335.
- Brown, R. ve Spencer, C. B. (1976). G –groupoids, crossed modules and the fundamental groupoid of a topological group. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen series A*, 79(4), 296 – 302.
- Conduché, D. (1984). Modules croisés généralisés de longueur 2. *Journal of Pure and Applied Algebra*, 34(2-3), 155 – 178.
- Dijkgraaf, R. ve Witten, E. (1990). Topological gauge theories and group cohomology. *Communications in Mathematical Physics*, 129(2), 393 – 429.
- Ellis, G. J. (1988). Higher dimensional crossed modules of algebras. *Journal of Pure and Applied Algebra*, 52, 277 – 282.
- Higgins, P. J. (1956). Groups with multiple operators. *Proceedings of the London Mathematical Society*, 3(6), 366 – 416.
- Jurčo, B. (2011). Crossed module bundle gerbes; classification, string group and differential geometry. *International Journal of Geometric Methods in Modern Physics*, 8(05), 1079 – 1095.
- Loday, J. L. (1982). Spaces with finitely many non-trivial homotopy groups. *Journal of Pure and Applied Algebra*, 24, 179 – 202.
- Mac Lane, S. ve Whitehead, J. H. C. (1950). On the 3-types of a complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36(1), 41 – 48.
- Mackenzie, K. C. H. (1987). Lie groupoids and Lie algebroids in differential geometry. London Mathematical Society Lecture Note Series 124, Cambridge University Press.
- Martins, J. F. ve Picken, R. (2011). The fundamental Gray 3-groupoid of a smooth manifold and local 3-dimensional holonomy based on a 2-crossed module. *Differential Geometry and its Applications*, 29(2), 179 – 206.

- Mucuk, O. ve Şahan, T. (2014). Coverings and crossed modules of topological groups with operations. *Turkish Journal of Mathematics*, 38(5), 833 – 845.
- Mucuk, O. ve Şahan, T. (2019). Group-groupoid actions and liftings of crossed modules. *Georgian Mathematical Journal*, 26(3), 437 – 447.
- Mucuk, O., Şahan, T. ve Alemdar, N. (2014). Normality and quotients in crossed modules and group-groupoids. *Applied Categorical Structures*, 23, 415 – 428.
- Mutlu, A. ve Porter, T. (2000). Freeness conditions for crossed squares and squared complexes, *Kluwer Academic Publishers*, 20(8), 345 – 368.
- Norrie, K. (1987). Crossed modules and analogues of groups theorems. Dissertation, King's College, University of London.
- Norrie, K. (1990). Actions and automorphisms of crossed modules. *Bulletin de la Société Mathématique de France*, 118(2), 129 – 146.
- Orzech, G. (1972a). Obstruction theory in categories. I. *Journal of Pure and Applied Algebra*, 2, 287 – 314.
- Orzech, G. (1972b). Obstruction theory in categories. II. *Journal of Pure and Applied Algebra*, 2, 315 – 340.
- Porter, T. (1987). Extensions, crossed modules and internal categories in categories of groups with operations. *Proceedings of the Edinburgh Mathematical Society*, 30, 373 – 381.
- Porter, T. (1998). Topological quantum field theories from homotopy n –types. *Journal of the London Mathematical Society*, 58(3), 723 – 732.
- Şahan, T. (2019). Further remarks on liftings of crossed modules. *Haceteppe Journal of Mathematics and Statistics*, 48(3), 743 – 752.
- Şahan, T. ve Mucuk, O. (2020). Normality and quotient in the category of crossed modules within the category of groups with operations. *Boletim da Sociedade Paranaense de Matemática*, 38(7), 169 – 179.
- Whitehead, J.H.C. (1946). Note on a previous paper entitled "On adding relations to homotopy groups. *Annals of Mathematics*, 47(4), 806 – 810.
- Whitehead, J.H.C. (1948). On operators in relative homotopy groups. *Annals of Mathematics*, 49, 610 – 640.
- Whitehead, J.H.C. (1949). Combinatorial homotopy. II. *Bulletin of the American Mathematical Society*, 55, 213 – 245.
- Yetter, D.N. (1992). Topological quantum field theories associated to finite groups and crossed G –sets. *Journal of Knot Theory and Its Ramifications*, 1, 1–20.
- Yetter, D.N. (1993). TQFT's from homotopy 2-types. *Journal of Knot Theory and Its Ramifications*, 2, 113 – 123.

Atf İçin: Yaka, H. ve Engin, K. E. (2023). AISI D2 Soğuk İş Çeliğinin Delinmesinde Deneysel ve Sonlu Elemanlar Analizi Yoluyla Delik Kalitelerinin İyileştirilmesi ve İşleme Parametrelerinin Optimizasyonu. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2973-2985.

To Cite: Yaka, H. & Engin, K. E. (2023). Improvement of Hole Qualities and Optimization of Machining Parameters Through Experimental and Finite Element Analysis in Drilling Of AISI D2 Cold Work Steel. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2973-2985.

AISI D2 Soğuk İş Çeliğinin Delinmesinde Deneysel ve Sonlu Elemanlar Analizi Yoluyla Delik Kalitelerinin İyileştirilmesi ve İşleme Parametrelerinin Optimizasyonu

Harun YAKA^{1*}, Kaan Emre ENGİN²

Öne Çıkanlar:

- İtme kuvveti
- Optimizasyon
- Yüzey pürüzlülüğü

Anahtar Kelimeler:

- AISI D2
- ANOVA
- Delme
- Sonlu eleman
- Yüzey pürüzlülüğü
- Taguchi

ÖZET:

Son yıllarda artan tedarik sorunları birçok alanda maliyetlere olumsuz yansımaktadır. Global çapta meydana gelen krizlerden dolayı ham madde fiyatları artmış ve imalat sektörü de ciddi etkilenmiştir. İmalat sektöründe zararları minimize etmek için üretim planlaması ve malzeme tasarrufu doğru yapılmalıdır. Üretim giderlerini düşürmenin en verimli yolu da uygun kesici takım kullanmak ve doğru işleme parametrelerini seçmektir. Bu çalışmada kalıp sektöründe yaygın olarak kullanılan AISI D2 çeliğinin delinmesi incelenmiş ve optimum işleme parametreleri belirlenmiştir. Delme işlemleri için TiN kaplamalı matkaplar kullanılmıştır. İşleme parametrelerinin yüzey pürüzlülüğü (Ra) ve itme kuvveti (Fz) üzerindeki etkileri Taguchi ve ANOVA ile incelenmiştir. Delme işleminde oluşan yüzey pürüzlülüğü ve itme kuvveti değerleri ölçülmüştür. Ayrıca itme kuvveti değerleri sonlu elemanlar (FE) yöntemi ile de sayısal olarak incelenmiştir. Düşük ilerleme ve kesme hızlarında Ra ve Fz düşük çıkmıştır. Ra'ya en çok ilerleme oranı etki ederken Fz'ye en çok kesme hızı etki etmiştir. En düşük Ra ve Fz, 30 mm/dak. ilerleme oranı ve 25 m/dak. kesme hızında olmuştur. ANOVA analizine göre, belirlenen işleme parametrelerinin hem Ra hem de Fz üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Ra ve Fz için R² değerleri %95'in üzerinde hesaplanmıştır.

Improvement of Hole Qualities and Optimization of Machining Parameters Through Experimental and Finite Element Analysis in Drilling Of AISI D2 Cold Work Steel

Highlights:

- Thrust force
- Optimization
- Surface roughness

Keywords:

- AISI D2
- ANOVA
- Drilling
- Finite Element
- Surface roughness
- Taguchi

ABSTRACT:

Increasing supply chain problems in recent years have a negative impact on costs in many areas. Due to the global crisis, raw material prices increased and the manufacturing sector was seriously affected. Production planning and material saving should be done correctly in order to minimize the losses in the manufacturing sector. The most efficient way to reduce production costs is to use suitable cutting tools and choose the right machining parameters. In this study, the drilling of AISI D2 steel, which is widely used in the mold industry, was examined and optimum machining parameters were determined. TiN coated drills are used for drilling operations. The effects of machining parameters on Surface Roughness (Ra) and Thrust Force (Fz) were investigated by Taguchi and ANOVA. Surface roughness and thrust force values during drilling were measured. Thrust force values were also analyzed numerically by the Finite Element (FE) method. Ra and Fz were also low at low feed rate and low cutting speeds. While the feed rate affected Ra the most, the Fz affected the cutting speed the most. The lowest Ra and Fz were at 30 mm/min feed rate and 25 m/min cutting speed. According to the ANOVA, it was determined that the machining parameters were effective on both Ra and Fz. R² values for Ra and Fz are calculated over 95%.

¹Harun YAKA (Orcid ID: 0000-0003-4859-9609), Amasya University, Mechanical Engineering Department, Amasya, Türkiye

²Kaan Emre ENGİN (Orcid ID: 0000-0002-6439-7700), Adıyaman University, Mechanical Engineering Department, Adıyaman, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Harun Yaka, e-mail: harun.yaka @amasya.edu.tr

INTRODUCTION

Cold work tool steels are a type of steel that is characterized by high carbon content and relatively low levels of manganese, tungsten, molybdenum, and chromium. The material exhibits favorable dimensional stability and hardenability, abrasion resistance, high tensile strength, and thermal softening resistance. Machining operations aim to achieve high surface quality and accuracy, reduce energy consumption, and prolong tool life. Cold work tool steels have a distinct machining behavior compared to other materials. The materials' high strength affects the cutting tool during chip removal, hindering the use of optimal cutting techniques. (Anthony, 2015). The need to optimize the machinability of these steels arises as a result of the current situation.

AISI D2 is a cold work tool steel that is gaining attention in die fabrication. Drilling is an important part of die manufacturing, used to make assembly easier or create cooling channels within the die (Shapiro, 2009). Assessing surface roughness and thrust forces is important when drilling AISI D2 material.

Surface roughness is a crucial indicator of drilling precision. Several factors influence surface roughness, including the properties of the drilling bit (geometry, materials coating etc.) and cutting conditions (cutting speed, feed rate, shape of chips and process temperature, etc.). Any change in these parameters directly affect surface roughness (Çiçek et al., 2012).

Thrust force is another significant output factor to consider in drilling. Thrust forces impact energy consumption and surface outcomes such as hole diameter errors, roundness, and surface roughness. (Duran&Acır, 2004; Akıncıoğlu et al., 2013). Metal-cutting process can achieve high speeds with advanced coating technology. Tool coatings enhance tool life, surface smoothness, and decrease thrust forces. Titanium nitride (TiN) coatings have improved drilling tools by providing better crater wear resistance, low friction, chemical stability, and longer tool life. (Chou & Liu, 2000; Sharif & Rahim, 2007). Consequently, it is important to provide optimal cutting parameters to obtain lower thrust forces (Çakır, 2000; Basavarajappa et al., 2008).

The machinability of AISI D2 has become an important research topic due to its increasing use in manufacturing and the tool industry, particularly in drilling operations. Experimental studies are conducted and optimization techniques are applied by other researchers. The study focuses on Taguchi method and the Analysis of Variance (ANOVA) as an optimization approach. The Taguchi method is a statistical approach used for optimizing design problems by determining the significance of various factors for the target function. The methodology can be used for various research paradigms, including experimental, numerical, and theoretical methods (Bademlioglu et al., 2020). The ANOVA method is a well-established technique that is commonly used in conjunction with the 'Taguchi' approach to determine the proportionate impact of each process parameter on the desired outputs (Mustapha et al., 2021).

Aized and Amjad deep drill AISI D2 material. Peck-drilling technique is used during drilling and its effect on drilling parameters such as speed, feed rate, and depth of drilling step is assessed for roundness, cylindricity, diameter errors, and surface roughness. The response surface methodology is used to optimize drilling efficiency. It is found out that spindle speed and feed rate have a significant impact on the quality of a drilled hole (Aized & Amjad, 2013).

Akıncıoğlu et al. (2013), conducted experiments using various drill bit coatings and cutting parameters to drill AISI D2 workpiece with a fixed depth of cut. ANN is used to predict hole diameters and thrust forces. They state that TiAlN/TiN multi-layer coated drills are the most effective in reducing thrust forces and hole diameters.

Akıncıoğlu et al. (2017), use the Taguchi method to optimize drilling parameters for AISI D2 workpiece with carbide drills. Three types of drill bits, untreated, cryo-treated, and cryo-treated and tempered, are used for experiments. CTT drills outperform in Ra and Fz based on experimental findings. Carbide drills show improved wear resistance after undergoing cryogenic treatment. Feed rate has the highest impact on Ra and Ff parameters, with a significant percentage contribution of 66.97% and 80.07%, respectively, according to the ANOVA analysis.

Osman et al. (2017), perform dry drilling on an AISI D2 workpiece to determine the optimal parameters for creating holes with high accuracy of diameter. Spindle speeds of 482, 550, and 627 RPM are used for drilling. Feed rates are set at 68 mm/min, 103 mm/min, and 146 mm/min. Different drill bit materials are used, including High Speed Steel (HSS) coated with TiN, HSS coated with Titanium Carbon Nitride (TiCN), and HSS coated with TiAlN. Taguchi method and ANOVA are used for output analysis. Drill bit coating has the most significant influence on diameter accuracy, followed by feed rate and spindle speed. Optimal parameters are achieved by using TiCN-coated HSS, with a feed rate of 103 mm/min and spindle speed of 627 RPM. Coated drill bits provide the best performance results.

Osman et al. (2018), investigate the dry drilling of AISI D2 using drill bits with a diameter of 10 mm and different coatings (uncoated TiN and TiCN) at three spindle speeds and feed rates. The authors use a L9 array, S/N ratio, and ANOVA to determine the importance of each parameter for achieving minimal surface roughness. Drilling tools have the greatest influence on surface roughness at 95%, followed by spindle speed at 3% and feed rate at 0.4%. The optimal combination for HSS-TiCN drilling tools is found to be a spindle speed of 680 rpm and a feed rate of 206.25 mm/min, as revealed by ANOVA.

Ulaş (2018) conduct an experimental study on the relationship between drilling parameters (cutting speed, feed rate, drill bit, and workpiece material) and maximum thrust force and torque. The author drills AISI D2 and AISI D3 cold work tool steels using uncoated HSS and carbide drill bits. The drilling process is done without coolant, using a CNC vertical machining center at different cutting speeds and feed rates. Carbide drill bits result in less thrust force than HSS drill bits. He states that feed rate affects maximum thrust forces, but cutting speed does not. AISI D3 cold work tool steel requires higher forces in drilling than AISI D2 cold work tool steel.

Kumar et al. (2018) conduct abrasive assisted high-speed drilling on AISI D2 cold work tool steel. Abrasive slurry containing SiC and Al₂O₃ with mesh sizes of 800, 1200, and 1500 is used. Slurry concentrations vary from 20% to 35%. The study aims to optimize surface roughness and material removal rate by investigating process factors such as abrasive type, abrasive mesh size, spindle speed, slurry concentration, and feed rate using an L18 orthogonal array. The surface roughness of the hole is significantly affected by the type and concentration of the abrasive, as shown by ANOVA analysis. The feed rate and type of abrasive used have a significant impact on the material removal rate.

Drilling parameter optimization is usually based on empirical data from experimental outcomes, as shown in existing literature. Performing experiments for each condition type is expensive, time-consuming, and inefficient. Finite Element (FE) analysis has the potential to decrease these manufacturing expenses and time requirements, making it a feasible choice for implementation. (Uğur et al., 2022; Luo et al., 2021). FE analysis can simulate drilling under different conditions, including various drill bit types and workpiece materials.

The present study involves the drilling process of AISI D2 cold work tool steel, which has a thickness of 15 mm. The drilling operation is carried out using a carbide drill coated with Titanium Nitride (TiN), having a diameter of 6 mm and a tip angle of 118°. The drilling process involves

performing the material from end to end, while utilizing a coolant consisting of 10% boron oil. The study employs three distinct sets of cutting speeds (15, 20, 25 m/min) and three varying feed rates (30, 40, 50 mm/min). Simultaneously, finite element analyses are performed to simulate identical process conditions and materials with the aim of comparing the outcomes with experimental data. The experimental thrust force values were compared with those obtained through FE analysis. Furthermore, the Taguchi method and ANOVA are utilized for optimization purposes in order to identify the optimal parameters.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Work

The experimental study employs AISI D2 steel, which has a size of 150x48x15 mm as illustrated in Figure 1. The process involves drilling holes along the entire thickness of the material, while utilizing a coolant containing 10% boron oil. The chemical composition of the AISI D2 steel used in the experiments is given in Table 1.

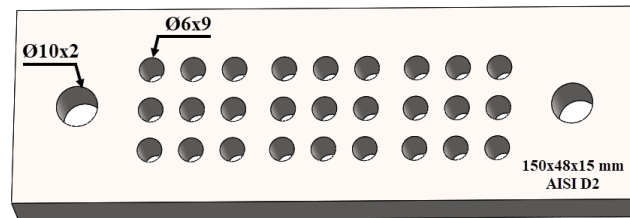


Figure 1. Illustration AISI D2 cold work steel and related hole diameters

Table 1. Chemical Composition of AISI D2

Element	C	Mn	Si	Cr	Ni	Mo	V
Weight %	1.40-1.60	0.6	0.6	11-13	0.3	0.7-0.12	1.1

In the experiments, Karcen brand M8DF060095 coded Titanium Nitride (TiN) coated carbide drill bit with a diameter of 6 mm and a point angle of 118° supplied from Karcen Cutting Tools company is used. Table 2 presents the specifications of the drill utilized in the experiments.

Experiments are conducted using the TAKUMA brand JVH710 CNC vertical machining center maintained by Amasya University. A bench and a test set are used for the experiments use, as shown in Figure 2. Drilling factors are adjusted according to cutting tool catalog specifications and literature review findings. Drilling of AISI D2 workpiece is carried out at 15 mm cutting depth with 3 different cutting speeds (15, 20, 25 m/min) and 3 feed rates (30, 40, 50 mm/min). The experiments have been performed on three plates under the same conditions. Experimental results are obtained by averaging measured Ra and Fz values. Cutting parameters used for hole drilling are shown in Table 4.

Table 2. Technical Specifications of the Drill Used in the Experiments

Helix angle	30°	
Coating type	TiN	
Point angle	118°	
Coating thickness	0.25-1.2 Micron	
Coating method	PVD	
Coating melting Temperature	2950°C	

The surface roughnesses of the specimens are measured using a Mitutoya SJ-310S surface roughness measuring device, which abides by ISO 1997 standards. The device has a measuring length of 8 mm and a measuring speed of 0.5 mm/sec. The hole surface is measured from three distinct points, and subsequently, the means of these measurements are recorded. An S type loadcell manufactured by

Puls Elektronik is utilized to measure the thrust forces generated during the drilling process under varying process factors. It is positioned beneath the workpiece to facilitate the measurements.

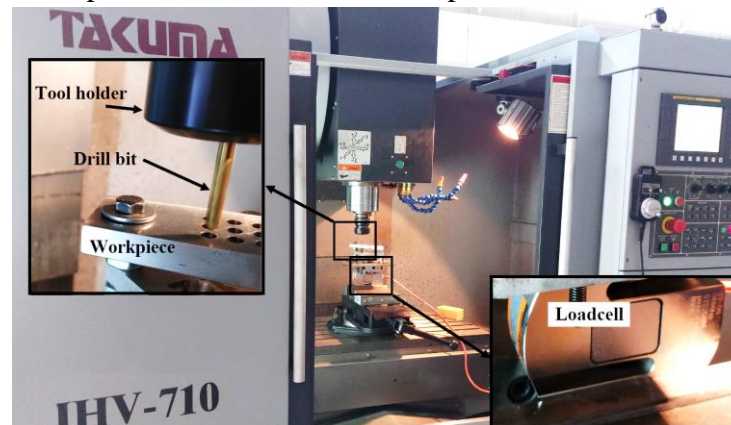


Figure 2. CNC vertical machining center and experimental set

Taguchi Method

The analysis's effectiveness depends on choosing process parameters that are correlated with the objective function. The established parameters and levels for statistical analysis are given in Table 3. The Taguchi method is used to optimize machining parameters for minimizing surface roughness and thrust force during the drilling of AISI D2 cold work tool steel. Ra and Fz outcomes are converted into Signal-to-Noise (S/N) ratio. S/N ratio calculation involves three performance characteristics. Jena et al. (2021) identifies three categories: smallest best, largest best, and nominal best. Smallest best is chosen as the performance characteristic to minimize Ra and Fz values. Equation 1 is used to compute S/N ratios based on the smallest best.

$$SNRs = -10 \log \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n y_i^2 \right] \quad (1)$$

Table 3. Drilling Factors and Factor Levels

Factors	Unit	Code	Factor levels		
Drill bit			TiN Coated Drill		
Cutting speed (Vc)	m/min	A	15	20	25
Feed rate (f)	mm/min	B	30	40	50

Finite Element (FE) Analysis

Deform-3D Machining Software Package (Def3D-Machsp), developed by STFC, is used to generate finite element models based on implicit Lagrangian for simulating manufacturing processes like turning, milling, boring, and drilling. Simulating the drilling process in Def3D-Machsp is a time-intensive task due to the complexity of chip formation and the need to simulate both rotational and linear displacement movements. The paper only analyzes stresses on the drill and does not study heat transfer or related configurations hence the simulation methodology employed entails the acquisition of thrust forces.

SolidWorks software is used to create 3D models of the workpiece and the drill. A cylindrical workpiece with a diameter of 10 mm and a thickness of 15 mm is modeled to decrease computing time and mesh number. Drills are modeled using data from the tool manufacturer's catalogue considering all important aspects. Solid models are imported into Def3D-Machsp. The X, Y, and Z axes orientations are determined. The software is programmed with movement parameters such as feed rate and cutting speeds. The selection of the object type for the workpiece is plastic. The software's material library

provides data on coated drills, such as coating thickness, modulus of elasticity, and Poisson's ratio. The drills are made of cemented carbide (WC). The drill is coated with TiN layers of 5 μm thickness.

Def3D-Machsp generates multiple meshes during metal drilling simulation due to material and mesh distortion. Novel meshes are created based on user-specified parameters to maintain fine elements in high-resolution areas and coarse elements in other regions.

The size ratio determines the dimensions of significant elements in areas where additional details are unnecessary. A size ratio of 10 is commonly used in metal cutting simulations and the same trend is followed for the study. The mesh number for AISI D2 workpiece is 26.128 with an element size of 0.025 mm. Drill bit's minimum element size is 0.2 mm with a mesh number of 20,000. Figure 3 shows the figure obtained from the Deform software.

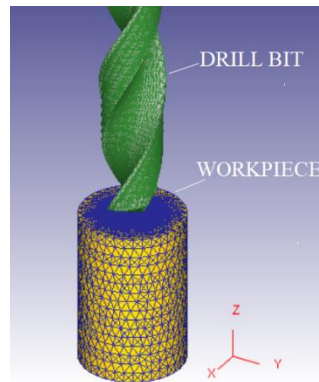


Figure 3. FE modelling of drilling in Deform-3D machining package

The speed of the workpiece in the X, Y, and Z axes is set to 0 in three directions during the boundary condition setting to restrict the workpiece's motion. The drill operates in the -Z orientation and revolves about the Z-axis. Simultaneously, the surfaces of the tool and workpiece, as well ambient temperatures are assumed to be 20°C, while the heat transfer coefficient and convection coefficient of coolant are determined to be 45 kW/m²K and 0.02 kW/m²K, respectively. The workpiece is subject to a contact condition characterized by shear friction, with a corresponding friction coefficient of 0.6 (Raju & Swamy, 2012; Li et al., 2017). The drill bit is not subject to any tool wear condition carrying the purpose to reduce computation time. Johnson and Cook constitutive equation is used as the plasticity model. Johnson and Cook equation is given in Equation 2 as;

$$\sigma = (A + B\varepsilon^n) \left\{ 1 + C \log\left(\frac{\dot{\varepsilon}}{\dot{\varepsilon}_0}\right) \right\} \left\{ 1 - \left(\frac{T-293}{T_m-293}\right)^m \right\} \quad (2)$$

which A, B, C are material constants, n is the strain hardening index, ε and $\dot{\varepsilon}$ are the strain and strain-rate, $\dot{\varepsilon}_0$ is the initial strain rate, T is the operating temperature, T_m is the melting temperature of the material and m the strain rate sensitivity exponent.

ANOVA Method

ANOVA is carried out to assess the reliability of the experimental study (Çırakoğlu et al., 2021). In studies applying variance analysis, it is common practice to consider the confidence level of the model to be 95%. It is anticipated that the experimental study's confidence level will either meet or approach this threshold. The significance of the factor can be assessed by utilizing the p-value presented in the table. A factor is considered statistically significant if its p-value is less than 0.05. (Nyugen et al., 2014; Malo and Yaka, 2023).

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental Results

Machining operations can cause surface roughness that negatively affects the durability of the workpiece material. Processing defects such as excessive surface roughness and micro cracks can occur due to insufficient determination of processing parameters and cutting conditions. Exposure to high temperatures or significant forces can cause rapid corrosion and wear in susceptible components. Optimizing machining parameters is crucial to address these issues (La Monaca et al., 2021). The Taguchi method is employed in the present investigation to optimize the thrust forces and surface roughness. Table 4 presents the test list generated using Taguchi L9 sequencing and the corresponding Ra and Fz values. The Ra values range from 2.04 to 1.53 μm . The experimental results indicate that the lowest surface roughness value of 1.53 μm is obtained in the seventh experiment. The minimum Fz value of 370 N is observed in the 7th experiment, while the maximum value of 625 N is recorded in the 3rd experiment.

Table 4. Experimental results of Ra and Fz Values

Exp. No	A	B	Ra 1	Ra 2	Ra 3	Average Ra (μm)	Fz 1	Fz 2	Fz 3	Average Fz (N)
E1	15	30	1.78	1.81	1.93	1.84	399	410	403	404
E2	15	40	1.88	2.01	1.87	1.92	515	499	498	504
E3	15	50	1.94	2.10	2.08	2.04	639	624	612	625
E4	20	30	1.74	1.57	1.55	1.62	372	374	364	373
E5	20	40	1.69	1.80	1.79	1.76	430	429	443	434
E6	20	50	1.90	1.75	1.78	1.81	531	515	520	522
E7	25	30	1.49	1.52	1.58	1.53	376	379	364	370
E8	25	40	1.56	1.76	1.52	1.61	416	399	427	414
E9	25	50	1.59	1.77	1.68	1.68	512	481	486	493

Figure 4 shows the Ra and Fz values obtained during the L9 test using line and bar graphs. Ra and Fz increase at E1-E3, E4-E6, and E7-E9. The phenomenon is due to an increase in the feed rate. Ra and Fz show a positive correlation with progression. Fz increases at lower cutting speeds in experiments. Fz decreases with increased cutting speeds. Figure 5 presents the impact of cutting speed and feed rates on Ra and Fz. Upon examination of Figure 5a, it is evident that an increase in the feed rate has an adverse impact on Ra. Furthermore, it is observed that Ra exhibited a greater value under conditions of low cutting speeds. The minimum surface roughness (Ra) is observed at a cutting speed of 25 m/min and a feed rate of 30 mm/min. The maximum surface roughness (Ra) is observed at a cutting speed of 15 m/min and a feed rate of 50 mm/min.

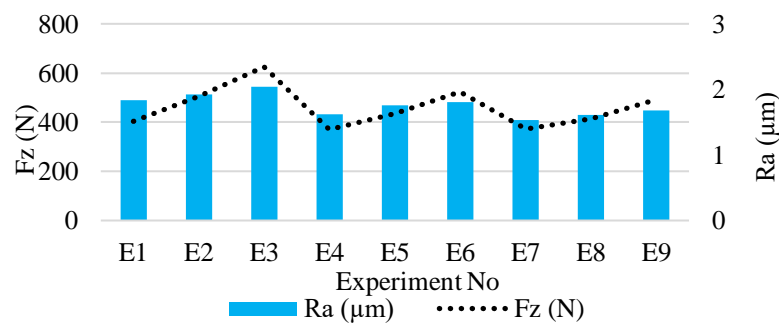


Figure 4. Graph of Fz and Ra values gathered from experiments

It is generally observed that an increase in cutting speed during machining operations leads to a reduction in surface roughness (Akıncioğlu et al., 2013a; Akkuş and Yaka, 2021; Özlü et al., 2023). This phenomenon can be attributed to the reduction in Fz at moderate cutting speeds, which has a beneficial impact on the surface roughness (Shapiro, 2009; Özlü, 2021). Fz increases with higher feed rate and

lower cutting speed, as shown in Figure 5b. The Ra measurement shows that the minimum Fz occurs at a cutting speed of 25 m/min and a feed rate of 30 mm/min.

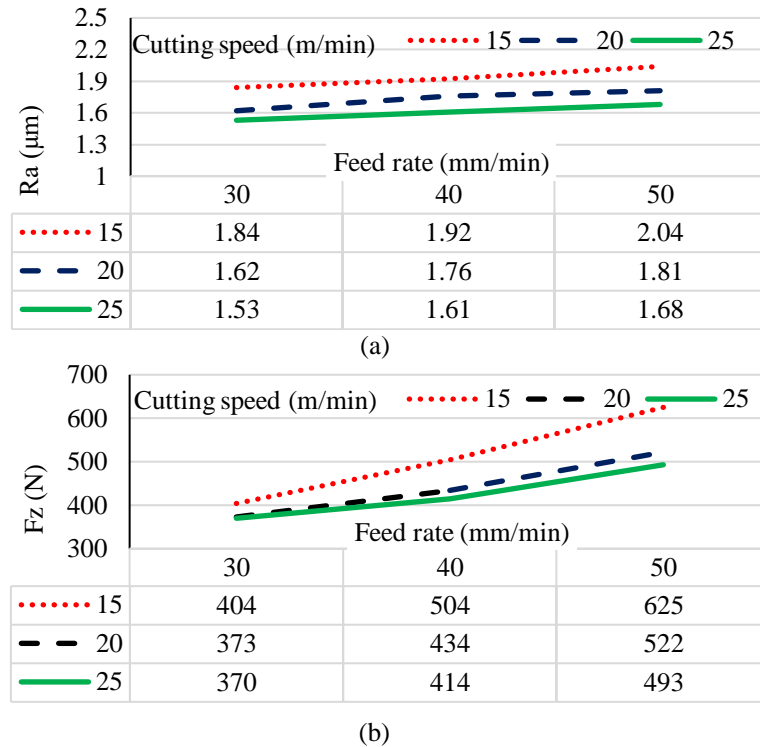


Figure 5. Effect of cutting speed according to feed rate a) Effect on Ra b) Effect on Fz

Finite Element (FE) Results

Experimental and simulation results are compared for maximum thrust forces. It has been observed that there is a difference of about 7%-8% between the results obtained from the simulation and experimental data. Figure 6 shows the thrust force distribution along the -Z axis for a cutting velocity of 15 m/min and a feed rate of 30 mm/min. Table 5 shows the results.

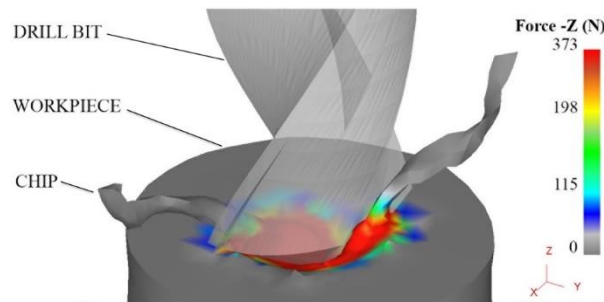


Figure 6. The visualization of thrust force generated by Deform- 3D Machining software package

Table 5. The comparison of maximum thrust force values between experimental and simulation results

Exp. No	Vc (m/min)	f (mm/min)	Thrust force (N)- Experimental	Thrust force (N)- Simulation	Percentage Error
E1	15	30	404	373	8.31 %
E2	15	40	504	464	8.62 %
E3	15	50	625	581	7.57%
E4	20	30	370	340	8.82 %
E5	20	40	434	403	7.69 %
E6	20	50	522	485	7.63 %
E7	25	30	373	343	8.75 %
E8	25	40	414	381	8.66 %
E9	25	50	493	459	7.41 %
Total Average	-	-	459.89	425.45	8.09 %

Table 5 illustrates that the simulation outcomes exhibit a minor deviation from the experimental findings. The occurrence of disparities between numerical and experimental findings is a frequently observed phenomenon in the literature (Nosouhi et al., 2017, Luo et al., 2021). The observed phenomenon can be attributed to the external factors that impact the experimental apparatus, such as inaccuracies in load cell measurements, compression of the chips, vibrations, and additional friction in the tools. It is worth noting that the simulation environment is devoid of these extraneous effects. Numerical analysis has been found to be a more efficient and cost-effective method for examining the impact of process parameters on thrust force during drilling, compared to experimental approaches. Implementing an experimental methodology requires a special setup, considerable effort, resource allocation, and material consumption. The approach lacks economic efficiency. The study shows that numerical analysis eliminates the need for the previously mentioned requirements. The main drawback of numerical analysis is the lengthy time needed to run simulations for approximating real operating conditions outcomes.

Taguchi Results

The experimental list's Ra and Fz values are converted into signal-to-noise (S/N) ratio using the Taguchi method. The objective is to optimize the cutting factors, as shown in Table 6. The S/N ratio is chosen as smallest best for achieving the lowest values in both outcomes. In the 7th experiment, the maximum S/N ratio value of -3.69383 dB for Ra is found to be the most significant. The experiment yields a Fz measurement of -51.3640 dB.

Table 6. Experimental Ra and Fz Values

Exp. No	A	B	Ra (μm)	Ra (μm) - S/N (dB)	Fz (N)	Fz (N) - S/N (dB)
E1	15	30	1.84	-5.29636	404	-52.1276
E2	15	40	1.92	-5.66602	504	-54.0486
E3	15	50	2.04	-6.19260	625	-55.9176
E4	20	30	1.62	-4.19030	370	-51.4342
E5	20	40	1.76	-4.91025	434	-52.7498
E6	20	50	1.81	-5.15357	522	-54.3534
E7	25	30	1.53	-3.69383	373	-51.3640
E8	25	40	1.61	-4.13652	414	-52.3400
E9	25	50	1.68	-4.50619	493	-53.8569

Taguchi's findings on the order of effectiveness of the shear factors concerning Ra and Fz are presented in Table 7. The study reveals that the feed rate (B) has the greatest impact on surface roughness (Ra), while the cutting speed (A) is the most significant factor in determining Fz.

Table 7. Signal-to-Noise (S/N) Ratio Response Table by Smallest Best

Control factors	Ra					Fz (N)				
	Level 1	Level 2	Level 3	Delta	Rank	Level 1	Level 2	Level 3	Delta	Rank
S/N (dB)										
Cutting speed (A)	-5.718	-4.751	-4.112	1.606	1	-54.03	-52.85	-52.52	1.51	2
Feed rate (B)	-4.393	-4.904	-5.284	0.891	2	-51.64	-53.05	-54.71	3.07	1
Means										
Cutting speed (A)	1.933	1.730	1.607	0.327	1	511.0	443.0	425.7	85.3	2
Feed rate (B)	1.663	1.763	0.180	0.180	2	382.3	450.7	546.7	164.3	1

Figures 7 and 8 present the optimal parameter values for Ra and Fz. Figure 7 illustrates that the optimal cutting speed (A) for achieving Ra is 25 m/min, while the optimal feed rate (B) is 30 mm/min.

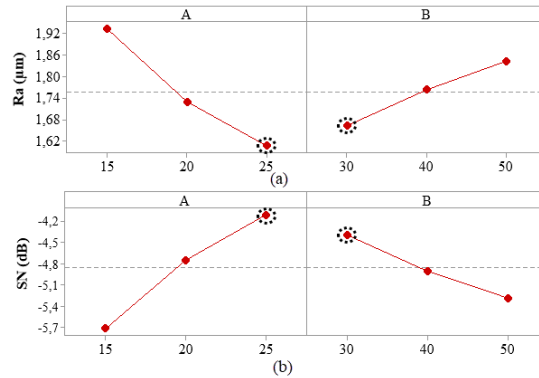


Figure 7. Optimum levels of control factors on Ra

The optimal values for the Fz can be observed in Figure 8, where a cutting speed of 25 m/min (A) and a feed rate of 30 mm/min (B) were found to be ideal, as indicated by the Ra values. The A3B1 index for Ra and Fz can be derived from the obtained results, indicating the sequence of optimal control factor levels.

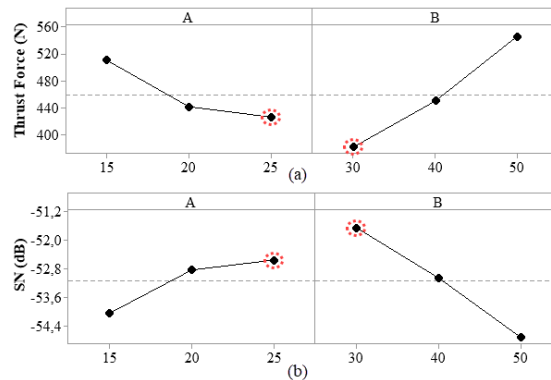


Figure 8. Optimum levels of control factors on Fz

ANOVA Results

Table 8 presents the ANOVA outcomes for Ra and Fz. The table displays the percentage effect degree of the cut-off factors for each factor. The cutting speed (A) contributes to 76.22% of Ra, while the feed rate (B) contributes for 22.78%. The contribution of feed rate (B) to Fz is 73.42%, while cutting speed (B) contributes 21.92%. All factors are found to be significant for both Ra and Fz. In ANOVA results, cutting speed contributed the most to Ra (Yaka 2021), feed rate contributed the most to Fz (Sur and Erkan 2018).

Table 8. Analysis of Variance (ANOVA) Results

Source	Degree of Freedom (df)	Contribution %	Sum of squares (SS)	Mean square (MS)	F Value	P
Ra						
A	2	76.22	0.163267	0.081633	153.06	0.0002
B	2	22.78	0.048800	0.024400	45.75	0.0018
Error	4	1.00	0.002133	0.000533		
Total	8	100.00				
Fz						
A	2	21.92	12206	6103.1	9.41	0.031
B	2	73.42	40891	20445.4	31.53	0.004
Error	4	4.66	2594	648.4		
Total	8	100.00	55691			

Table 9 presents a concise overview of the results obtained from the analysis of variance. The R² value presented in Table 9 indicates the degree of confidence in the model. The model developed for Ra was established with a confidence level of 99%, while the model for the Fz was established with a

confidence level of 95.34%. Given that the aforementioned values exceed the 95% confidence threshold, it is reasonable to assert that the research is reliable.

Table 9. Summary of ANOVA Model

	S	R ²	R ² mean	PRESS	R ² (pred)	AICc	BIC
Fz	25.4646	95.34%	90.69%	13131	76.42%	130.51	89.70
Ra	0.0230940	99.00%	98.01%	0.0108	94.96%	4.42	-36.40

CONCLUSION

This study examines the experimental and finite element analysis of drilling AISI D2 cold work steel using a TiN coated drill. The Fz values during drilling were evaluated and compared with the Fz values obtained in the finite element analysis. In addition, as a result of the experimental study, the surface roughness of the hole surfaces was measured. Machining parameters were determined for minimum Ra and Fz.

- Fz values measured by the finite element method were 7% and 8% lower than the Fz values obtained by experimental results. In the experimental study, the high Fz was caused by the compression of the chips during drilling, the tool wear and vibrations.
- The cutting speed (A) was the most significant factor in determining Fz.
- The feed rate (B) was the greatest impact on surface roughness (Ra).
- Ra and Fz values were smaller at low feed rate and high cutting speeds.
- The results obtained for the Fz measurements were close to the experimental and simulation results.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Aized, T., & Amjad, M. (2013). Quality improvement of deep-hole drilling process of AISI D2. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 69, 2493-2503.
- Akıncioğlu, S., Mendi, F., Çiçek, A., & Akıncioğlu, G. (2013). Prediction of thrust forces and hole diameters using artificial neural networks in drilling of AISI D2 tool steel with cemented carbide tools. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, 1(2), 11-20.
- Akıncioğlu, G., Mendi, F., Çiçek, A., & Akıncioğlu, S. (2017). Taguchi optimization of machining parameters in drilling of AISI D2 steel using cryo-treated carbide drills. *Sādhanā*, 42, 213-222.
- Akkuş, H., & Yaka, H. (2021). Optimization of cutting parameters in turning of titanium alloy (grade 5) by analysing surface roughness, tool wear and energy consumption. *Experimental Techniques*, 1-12.
- Anthony, X. M. (2015). Analysis of cutting force and chip morphology during hard turning of AISI D2 steel. *Journal of Engineering Science and Technology*, 10(3), 282-290.
- Bademlioglu, A. H., Canbolat, A. S., & Kaynakli, O. (2020). Multi-objective optimization of parameters affecting Organic Rankine Cycle performance characteristics with Taguchi-Grey Relational Analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117.

- Basavarajappa, S., Chandramohan, G., & Davim, J.P. (2008). Some studies on drilling of hybrid metal matrix composites based on Taguchi techniques. *Journal of Materials Processing Technology*, 196, 332–338.
- Chou, C.W.C., Liu, X.D. (2000). Study on the various coated twist drills for stainless steels drilling. *Journal of Materials Processing Technology*, 99, 226-230.
- Çakır, M.C. (2000). *Modern talaşlı imalat yöntemleri*. Bursa: Vipaş.
- Çırakoğlu, F., Özlü, B., Demir, H. (2021). Hardox 450 çeliğinin lazerle delinmesinde kesme parametrelerinin delik kalitesi üzerine etkisinin incelenmesi ve kesme parametrelerinin optimizasyonu. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 913-923.
- Çiçek, A. Kıvak, T. & Samtaş, G. (2012). Application of Taguchi method for surface roughness and roundness error in drilling of AISI 316 stainless steel”. *Strojniški Vestnik - Journal of Mechanical Engineering*, 58(3), 165-174.
- Duran, A.& Acır, A. (2004). HSS torna kalemindeki talaş açısının kesme kuvvetlerine etkisi. *Polytechnic Journal*, 211-215.
- Jena, S. P., Mahapatra, S., & Acharya, S. K. (2021). Optimization of performance and emission characteristics of a diesel engine fueled with Karanja biodiesel using Grey-Taguchi method. *Materials Today: Proceedings*, 41, 180-185.
- Kumar, P., Singh, G., Jain, V., & Gupta, D. (2018). Optimization of process parameters for improving drilling quality and machining performance of abrasive assisted drilling on AISI D2 steel. *Indian Journal of Engineering & Materials Sciences*, 25, 33-41.
- La Monaca, A., Murray, J. W., Liao, Z., Speidel, A., Robles-Linares, J. A., Axinte, D. A., ... & Clare, A. T. (2021). Surface integrity in metal machining-Part II: Functional performance. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, 164, 103718.
- Li, G., Huang, Z., & Wang, X. (2017). The FEM simulation on end mill of plastic doors and windows corner cleaning based on deform-3D. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 272(1), 012009.
- Luo, H., Fu, J., Wu, T., Chen, N., & Li, H. (2021). Numerical simulation and experimental study on the drilling process of 7075-t6 aerospace aluminum alloy. *Materials*, 14(3), 553.
- Malo, Y., Yaka, H. (2023). Evaluating the parameters for electrode wear rate in electrical discharge machining of H13 steel. *Selcuk University Journal of Engineering Sciences*, 22(1), 33-37.
- Mustapha, A. N., Zhang, Y., Zhang, Z., Ding, Y., Yuan, Q., & Li, Y. (2021). Taguchi and ANOVA analysis for the optimization of the microencapsulation of a volatile phase change material. *Journal of Materials Research and Technology*, 11, 667-680.
- Nosouhi, M., Nosouhi, R., Paktinat, H., & Amini, S. (2017). Finite element analysis and experimental investigation on the conventional and vibration assisted drilling. *Journal of Modern Processes in Manufacturing and Production*, 6(4), 23-33.
- Nguyen, T. C., Miska, S., Saasen, A., & Maxey, J. (2014). Using Taguchi and ANOVA methods to study the combined effects of drilling parameters on dynamic barite sag. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 121, 126-133.
- Raju, B. P., & Swamy, M. K. (2012). Finite element simulation of a friction drilling process using deform-3D. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 2(6), 716-721.
- Shapiro, A. (2009). Finite element modeling of hot stamping. *Steel Research International*, 80, 658.
- Sharif, S., & Rahim, E.A. (2007). Performance of coated and uncoated-carbide tools when drilling titanium alloy-Ti–6Al4V. *Journal of Materials Processing Technology*, 185, 72-76.

- Osman, M. H., Hadzley, M., Tamin, N. F., Mohamad, N. J., Wahid, M. K., Ahmad, M. N., ... & Ab Rahman, M. H. (2017). Optimization of drilling parameters in diameter accuracy on dry drilling process of AISI D2 tool steel. *Proceedings of Mechanical Engineering Research Day*, 105-106.
- Osman, M. H., Tamin, N. F., Ahmad, M. N., Rahman, M. A., Wahid, M. K., Maidin, N. A., ... & Azahar, A. A. (2018). Effect of cutting parameters on surface roughness in dry drilling of AISI D2 tool steel by using Taguchi method. *Journal of Advanced Manufacturing Technology (JAMT)*, 12(1 (2)), 535-546.
- Özlü, B. (2021). Investigation of the effect of cutting parameters on cutting force, surface roughness and chip shape in turning of Slepner cold work tool steel. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 36(3), 1241-1251.
- Özlü, B., Çelik, U., Demir, H. (2023). Serbest Formlu İnce Cidarlı AA 5083-H111 Alaşımının Frezelenmesinde Kesme Parametrelerinin Yüzey Pürüzlülüğü Üzerine Etkilerini Deneysel ve İstatiksel Değerlendirilmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 23(2), 512-522.
- Sur., G., Erkan, Ö. (2018). Cutting tool geometry in the drilling of CFRP composite plates and Taguchi optimisation of the cutting parameters affecting delamination. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 36(3), 619-628.
- Uğur, L., Kazan, H., Özlü, B. (2022). Investigation of the Impacts of Cutting Parameters on Power Usage in Cryogenic-Assisted Turning of AISI 52100 Bearing Steel by FEM. *İmalat Teknolojileri ve Uygulamaları*, 3(3), 55-61.
- Ulaş, H. B. (2018). AISI D2 ve AISI D3 soğuk iş takım çeliklerinin delinmesinde kesme parametrelerinin kesme kuvvetleri üzerindeki etkisinin incelenmesi. *Polytechnic Journal*, 21(1), 251-256.
- Yaka, H. (2021). Measurement of Surface Quality and Optimization of Cutting Parameters in Slot Milling of Gfrp Composite Materials with Different Fiber Ratios Produced by Pultrusion Method. *Surface Review and Letters*, 28(10), 2150095.

Atf İçin: Aylaz, G. (2023). Tetrasiklin Antibiyotikleri ve Bromelain Enzimi Arasındaki Etkileşimlerin Kenetleme Araçları Kullanılarak İncelenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2986-2996.

To Cite: Aylaz, G. (2023). Investigation of Interactions Between Tetracycline Antibiotics and Bromelain Enzyme Using Docking Tools. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2986-2996.

Tetrasiklin Antibiyotikleri ve Bromelain Enzimi Arasındaki Etkileşimlerin Kenetleme Araçları Kullanılarak İncelenmesi

Gülgün AYLAZ^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Bromelain
- Moleküler kenetleme
- Antibiyotikler

Anahtar Kelimeler:

- Bromelain,
- Moleküler kenetleme,
- Demeklosiklin
- Minosiklin
- Tetrasiklin

ÖZET:

Ananas sapından ekstrakte edilen bromelain, farklı amaçlar için kullanılan kompleks bir enzimdir. Bromelain takviyeleri genellikle sindirimi kolaylaştırmak, dolaşım sistemini iyileştirmek ve ağrı kesici özelliğinden dolayı artrit semptomlarını hafifletmek için kullanılır. Ancak antibiyotik kullanımı veya kanama riski olan bazı durumlarda bromelain kullanımı veya doğrudan ananas tüketimi sınırlandırılmalıdır. Bu amaçla antibiyotik bromelain etkileşiminin hangi mekanizma ile gerçekleştiğini göstermek amacıyla bu çalışma yapılmıştır. İlk olarak UCSF Chimera görselleştirme programında bromelain molekülü ve demeklosiklin, minosiklin ve tetrasiklin antibiyotikleri hazırlanmıştır. Etkileşimler, Auto Dock Molecular Modeling Toolkit moleküler modelleme programında görüntülenmiştir. Bu etkileşimlerin serbest bağlanma enerjileri de Auto Dock'ta hesaplanmıştır. Moleküler modelleme sonuçlarına göre, bromelain ve demeklosiklin, minosiklin, tetrasiklin antibiyotikleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler ile etkileşime girmiştir. Bromelain ve antibiyotikler arasındaki bu etkileşimler, serbest bağlanma enerjisi hesaplamalarına dayalı olarak enerjisel olarak uygun bulunmuştur.

Investigation of Interactions Between Tetracycline Antibiotics and Bromelain Enzyme Using Docking Tools

Highlights:

- Bromelain
- Molecular docking
- Antibiotics

Keywords:

- Bromelain,
- Molecular docking,
- Demeclocycline
- Minocycline
- Tetracycline

ABSTRACT:

Bromelain, extracted from the stem of the pineapple, is a complex enzyme used for different purposes. Bromelain supplements are often used to facilitate digestion, improve the circulatory system and relieve arthritis symptoms due to its pain relief. However, in some cases where there is a risk of antibiotic use or bleeding, the use of bromelain or direct consumption of pineapple should be limited. For this purpose, this study was carried out to show the mechanism by which the antibiotic bromelain interaction occurs. Firstly, the bromelain molecule and demeclocycline, minocycline, and tetracycline antibiotics were prepared in the UCSF Chimera visualizing program. The interactions were monitored in the Auto Dock Molecular Modelling Toolkit molecular modeling program. The free binding energies of these interactions were also calculated in Auto Dock. According the molecular modelling results, bromelain and demeclocycline, minocycline, tetracycline antibiotics were interact with hydrogen bonds and hydrophobic interactions. These interactions between bromelain and antibiotics were energetically favorable based on free binding energy calculations.

¹Gülgün AYLAZ ([Orcid ID: 0000-0003-0900-035X](https://orcid.org/0000-0003-0900-035X)), Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Engineering, Department of Nanotechnology Engineering, Sivas, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gülgün AYLAZ, e-mail: gulgunaylaz@gmail.com

INTRODUCTION

The discovery of penicillin is accepted as the beginning of the antibiotic era. Penicillin group antibiotics are used in the treatment of quite different types of infections, have a bactericidal effect, have low toxicity, and can easily penetrate tissues. Tetracycline is an antibiotic produced by *Streptomyces rimosus* bacteria (Petkovic et al., 2006). Tetracyclines is the general name given to a group of antibiotics, and tetracycline is one of these antibiotics. Tetracycline antibiotics are a group of broad-spectrum antibiotics that are widely used for the treatment of various bacterial infections. They work by inhibiting bacterial protein synthesis through binding to the bacterial ribosome, thus preventing the attachment of transfer RNA (tRNA) molecules to the ribosome-messenger RNA (mRNA) complex. This mechanism of action makes tetracyclines effective against a wide range of bacteria (LaPlante et al., 2022). Tetracyclines have a broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as against certain atypical pathogens (Leichtweis et al., 2022). Bacterial resistance to tetracyclines can arise through various mechanisms, including efflux pumps that expel the antibiotic from the cell, ribosomal protection proteins, and enzymatic inactivation (Hu et al., 2023; Hao Li et al., 2022). Tetracyclines are used to treat a wide range of infections, including respiratory tract infections, skin and soft tissue infections, urinary tract infections and some transmitted infections. Tetracyclines have a common basic structure consisting of four rings. They are classified into different generations based on their development and modifications over time (Angelette et al., 2023). Since the molecular structure differences of the antibiotics in this group and their interactions with the proteins are different, their antibacterial activities are also different (Li et al., 2019). Minocycline hydrochloride, or Minocycline, is a tetracycline antibiotic class. It is often used in the treatment of acne. Minocycline is the longest-acting type of tetracycline. Demeclocycline is another antibiotic from the tetracycline class (Singh et al., 2022). Demeclocycline produced by *Streptomyces aureofaciens* is frequently used in the treatment of acne and bronchitis. It binds to bacterial RNA and inhibits translation, thus preventing the development of bacteria. Therefore, its effect is biostatic (Allahverdiyeva et al., 2021; Wang et al., 2022).

Bromelain is an enzyme with protein breakdown feature obtained from the root, stem, and fruit parts of pineapple. The main component of the bromelain enzyme, also called pineapple extract or extract, is the sulfhydryl proteolytic fraction (Jancic & Gorgieva, 2022). That is, it is a small part of enzymes that help break down protein. In addition to being used primarily as a digestive support, bromelain is frequently preferred in the treatment of edema, relieving inflammation, accelerating the healing process, after skin burns, in the treatment of colon cancer, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, constipation and allergic asthma (Kumar et al., 2022; Pereira et al., 2023). A daily average of 500-800 milligrams is recommended, and although bromelain is generally well tolerated, there are some situations where it is not safe to use this enzyme. Bromelain promotes wound healing as it acts on cellular depolymerization and vascular permeability. Particularly, care should be taken when using bromelain supplements, as they can increase the risk of bleeding in situations such as accidents or surgery (Gupta et al., 2022; Sharma et al., 2022). Similarly, due to their effects on antibiotic absorption, caution should be exercised when using antibiotics and bromelain together. Bromelain has been observed to increase the absorption of antibiotics, whether administered orally, by subcutaneous or intramuscular injection (Chisci & Fredianelli, 2022). In short, it can increase the effectiveness of antibiotics and cause higher serum and tissue levels, as well as cause undesired side effects. There are many studies showing that bromelain alone has antimicrobial and antifungal properties. The use of bromelain with antibiotics has been found to have a synergistic effect and it has been found to be more

effective in chronic bronchitis, staph infection, thrombophilia, perirectal and rectal ulcers, sinus infections and bladder infections compared to the use of antibiotics alone (Kumar et al., 2020; Maher et al., 2021). There are studies showing that bromelain affects the absorption mechanism of antibiotics in the body. However, the interactions between bromelain and antibiotics can be complex and may vary depending on the specific antibiotic and the formulation of bromelain used. It's important to note that interactions between dietary supplements, enzymes like bromelain, and pharmaceutical drugs can have different effects based on individual differences, dosages, and other factors (Maher et al., 2021). It may increase the absorption dose of amoxicillin or tetracycline antibiotics used or the side effects of antibiotics (Mameli et al., 2021; Maheshwari et al., 2023).

Thanks to computational molecular modeling programs, they provide information about the interaction sides of the molecules, the interaction profile, and the conformation of the molecules. Thanks to these molecular modeling tools, researchers see molecular binding patterns without the need for long, laborious, and costly experimental studies (Aylaz & Andaç, 2022). In molecular docking studies, the interaction between the stable form receptor molecule and the flexible ligand is monitored. There are many computational modelling programs developed for these purposes (Elton et al., 2019). In this study, molecular docking calculations and conformation of molecules were investigated with AutoDockTools. AutoDock is a widely used molecular docking software that plays a crucial role in pharmaceutical research for drug discovery and design. It allows scientists to predict and analyze the interactions between a ligand and a protein target, which is essential for understanding drug binding and optimizing drug candidates (Yong Yang, 2010; Wang et al., 2004). While using this tool, variables such as different interaction lattice coordinates of protein and ligand molecules and scoring parameters can be determined (Li et al., 2019; Sabe et al., 2021; Solis-Vasquez et al., 2022). For these purposes, the molecular interactions of bromelain and tetracycline group antibiotics were examined with AutoDockTools, and the interaction profile was investigated by calculating their free binding energies.

MATERIALS AND METHODS

Operating System and Software

UCSF Chimera Biocomputing software developed by UCSF Biocomputing, Visualization, and Informatics Resource (RBVI) (Pettersen et al., 2004; Ji et al., 2023), University of California, San Francisco, CA, USA was used in this study. AutoDockTools, a molecular modeling simulation program developed by the Scripps Research Institute, was operated as GUI (graphical user interface) (Morris et al., 2009). In addition, AutoGrid was also used as a grid calculation module developed by the Scripps Research Institute. Chimera-v1.15-win64 and AutoDockTools-v4.2.6 versions were used under a Windows 10 Home Single Language, Lenovo Ideapad 110-15ISK 80UD workstation with an Intel® Core (TM) i5-6200U CPU @ 2.30GHz processor, 4 GB RAM and 240 GB solid state drive running a Windows operating system. The molecules were prepared in Chimera using Protein Data Bank ID (PDB ID) from The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) and PubChem Compound Identifier (CID) number.

Molecular Docking Preparation

The antibiotic and bromelain molecules' PDB files were prepared and minimalized in Chimera. The clear structure of bromelain was directly obtained using the PDB ID 1W0Q. Bromelain was prepared for molecular modeling via Chimera with this specific ID, as using the clear state of the molecule allows for more realistic modeling of interactions that occur in biological systems. And PubChem CID numbers were 54675776, 54680690, and 54675783 for tetracycline, demeclocycline (dimethylchlortetracycline) and minocycline, respectively. Antibiotics and bromelain molecules were

prepared in Chimera for molecular modeling with the Molecular Modeling Toolkit. The antibiotic and bromelain molecules' PDB files were prepared and minimized in Chimera. The PDB ID was 1W0Q for bromelain (Sorokin et al., 2023; Pankovaa et al., 2022). And PubChem CID numbers were 54675776 (Liang et al., 2023), 54680690 (Bharadwaj et al., 2020), and 54675783 (Juhi et al., 2023) for tetracycline, demeclocycline (dimethylchlortetracycline) and minocycline, respectively. Antibiotics and bromelain molecules were prepared for molecular modeling in Chimera with the Molecular Modeling Toolkit using the specified special codes. Non-standardized ligands in the bromelain structure were not removed to observe their interaction with antibiotics. However, other solvent, water and unwanted ligands were removed from the molecules (Olshannikova et al., 2022). During this dock preparation, hydrogen addition and removal steps were performed with the AddH and AddCharge commands (Kılıç et al., 2021). In addition, the Gasteiger charge, in which the energies are calculated according to the stationary and mobile atoms in the molecules, was applied. While analyzing which bonds in proteins and ligands are rotatable with AutoDockTools, the size of the molecules interacting in a cage was determined with AutoGrid (grid box dimensions) (Salha et al., 2020). In AutoDock v4.2.6, active interaction sites of minocycline, demeclocycline, and tetracycline antibiotics and bromelain were investigated by applying various insertion parameters. Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) v4.2 was used for the insertion. Defaultly, the rate of gene mutation was 0.02, the rate of crossover was 0.8, and it was used with various configurations such as 2.5×10^6 evaluate number. Target coordinates were used as a 126, 126 and 126 points grid box where values were counted along the x, y, and z axes for minocycline. These coordinates were 124, 126, 126 points for demeclocycline and 116, 126, 126 points for tetracycline along the x, y, and z axes, respectively. Grid point spacing was 0.375 Å. For all conformations, bromelain was preserved during the insertion process, while antibiotics were flexible. Ten iterations were performed for each calculation.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular Docking of Bromelain and Antibiotics

Bromelain is a proteolytic enzyme and has a structure containing various functional groups. When bromelain comes into contact with surfaces, it has the potential to generate features like pockets or clefts on the surface, creating suitable areas for tetracycline to adsorb. The binding sites formed by bromelain may be suitable for formation hydrogen bonding, van der Waals interactions, and electrostatic interactions. Since tetracycline has multiple functional groups, it can easily adsorb to these binding sites on both bromelain and the surface. As a result of this interaction, the presence of bromelain can amplify the adsorption of tetracycline onto the surface (Chakraborty et al., 2021; Ke et al., 2022). Bromelain inhibits bradykinin formation at the inflammatory site through depletion of the plasma kallikrein system. It is also known that inhibition of the arachidonic acid pathway inhibits plasma exudation. The beneficial anti-inflammatory effects of bromelain have also been reported in the literature in Human Immunodeficiency Virus (HIV) and cancer patients. Thirty-six patients with chlamydia infection were treated with tetracycline-bromelain complex or doxycycline for a period of 14 days. At the end of the seventh day, improvement was observed in 66.7% of the patients treated with bromelain-tetracycline complex, while 55.6% improved in those administered doxycycline (Romm et al., 2010). Although the mechanism by which bromelain increases antibiotic absorption in the human body is not fully understood, some experimental and clinical applications have made predictions. Dighe et al., in their study, thought that by using bromelain, a proteolytic enzyme, it enables the food to be easily broken down in the digestive system (especially the stomach) and thus increases the absorption of antibiotics. In addition, since bromelain is a proteolytic enzyme, it can

affect the speed of digestion in the stomach and the rate of passage of the contents into the small intestine. Similarly, in a rapidly emptied stomach, antibiotics may reach the small intestine in a shorter time and their possible absorption may increase (Dighe et al., 2010; Banihashemrad et al., 2020). The interactions of the bromelain molecule with minocycline, demeclocycline, and tetracycline antibiotics were monitored by molecular docking studies. Preparation and minimization of molecules before docking operations were performed at UCSF Chimera software (v1.16, developed by the UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI), University of California, San Francisco, CA, USA). The dock prepped molecules are shown in Figure 1.

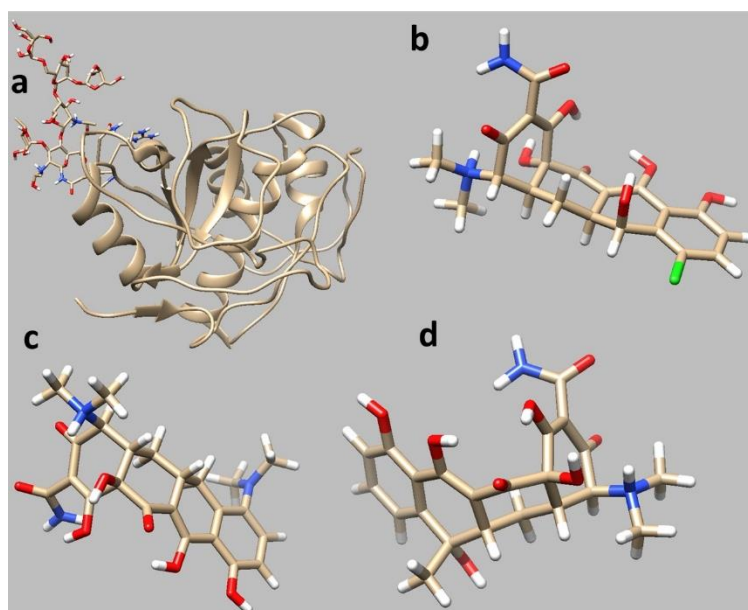


Figure 1. Molecular structures of Bromelain (a), demeclocycline (b), minocycline (c), and tetracycline (d)

The number of distinct conformational clusters were calculated according to the cluster analysis made with the molecular docking of bromelain and antibiotics. This value was found as 8 for each antibiotic in 10 runs using root-mean-square deviation (RMSD) tolerance of 2.0 Å. These clusters were evaluated according to their binding energies. In the clustering histogram, the lowest binding energies between bromelain and antibiotic molecules were -8.26, -8.61, and -8.48 kcal/mol for minocycline, demeclocycline, and tetracycline, respectively. The binding energy value refers to the energy released by the interaction of molecules, and the lower binding energy, the greater the interest in binding (Table 1).

These clusters were evaluated according to their free energy of statistical mechanical analysis. It was seen that the lowest free energy (-1371.31 kcal/mol) between bromelain and demeclocycline at 298.15 °K. The free energies of the other interactions were found as -1371.13 and -1370.47 kcal/mol for tetracycline and minocycline, respectively at 298.15 °K. These values indicated that the interaction between bromelain and demeclocycline, minocycline, and tetracycline antibiotics were energetically favorable. Table 1 summarizes the theoretical lowest binding and free energies of bromelain and three different antibiotics.

Table 1: The calculated lowest binding energy and free energy data of bromelain and antibiotics

	Bromelain	
	Lowest Binding Energy (kcal/mol)	Free Energy (kcal/mol)
Demeclocycline	-8.61	-1371.31
Minocycline	-8.26	-1370.47
Tetracycline	-8.48	-1371.13

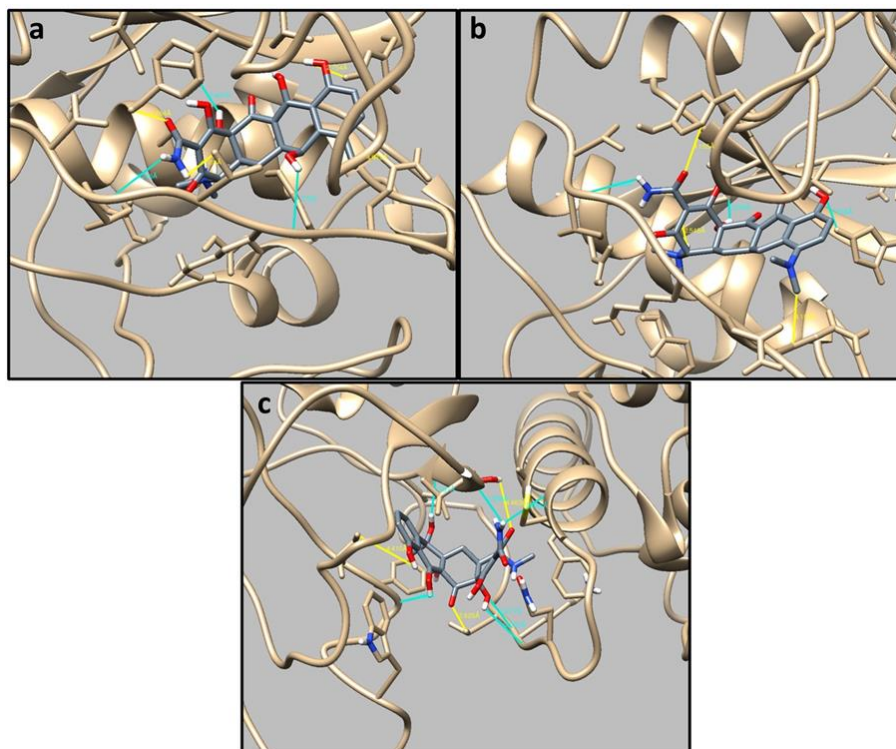


Figure 2. Molecular modelling of bromelain to demeclocycline (a), minocycline (b), and tetracycline (c)

It is important to note that the interactions between bromelain and antibiotics are complex and can vary depending on factors such as the specific antibiotic, dosage, bromelain formulation, and individual variations in digestion and metabolism (Chisci & Fredianelli, 2022; Pavan et al., 2012). The binding sites of bromelain to demeclocycline, minocycline, and tetracycline antibiotics are shown in Figure 2. Molecular interactions between bromelain and antibiotics mainly occurred through hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Hydrogen bonds are shown in blue in figure 2 and other interactions are shown with yellow lines. Table 2 summarizes these interaction points and intermolecular distances. In particular, the presence of hydrogen bonds has been evidence of the strong interaction between antibiotics and bromelain. In addition, hydrophobic interactions may contribute to the interaction of bromelain and its hydrophobic structure with demeclocycline, minocycline, and tetracycline antibiotics. As seen in Figure 3, the surface of bromelain is an interacting hydrophobic solid surface. This view has a "hydrophobicity surface" preset. In this preset, hydrophilic areas are identified as dodger blue and hydrophobic areas are orange-red-white. The area where antibiotics bind to bromelain appears to be both hydrophilic and hydrophobic (depends on their dodger blue and orange colors) (Azarkan et al., 2020; Pang et al., 2020). Both the conformation in Figure 3 and the negative binding free energy values given in Table 2 indicate that antibiotics are of molecular interest in bromelain.

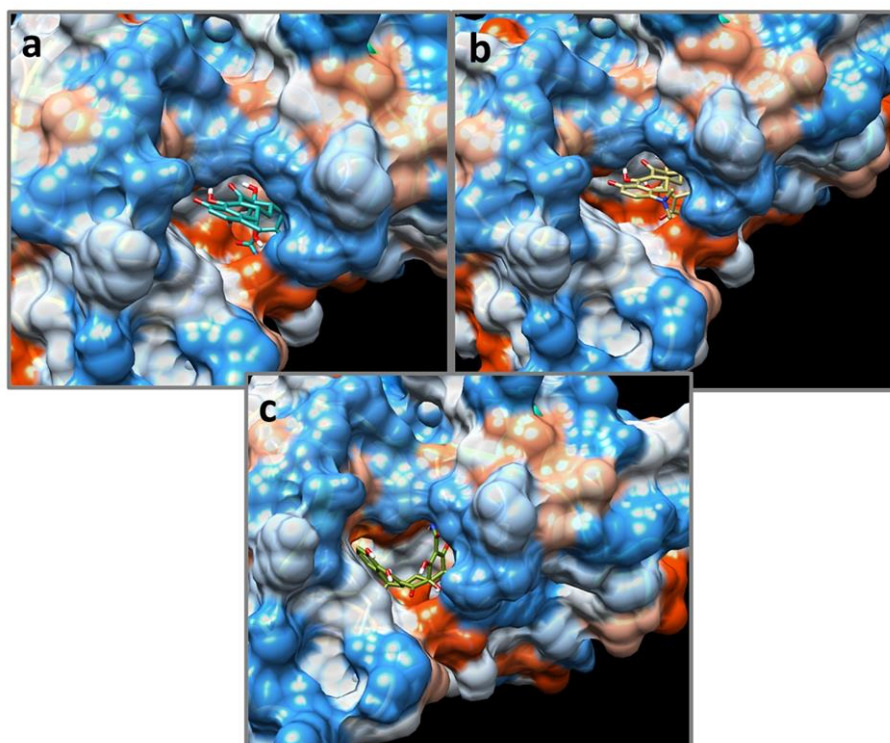


Figure 3: Conformation of demeclocycline (a), minocycline (b), and tetracycline (c) antibiotics with bromelain interactive hydrophobicity solid surface. (Dodger blue signs more hydrophilic surface and orange-red- white signs more hydrophobic surface)

In recent years, it has been understood that bromelain can enhance the tissue permeability of penicillin and tetracyclines following oral using. This results in increased absorption and improved diffusion when these antibiotics are administered intramuscularly. This approach leads to higher levels of antibiotics in both serum and tissues, while also reducing potential side effects. One remarkable study conducted by Neubauer involved 53 hospitalized patients with various conditions such as pneumonia, bronchitis, staphylococcus infections, thrombophlebitis, pyelonephritis, and rectal abscesses (Maurer, 2001). Among them, 23 patients had previously undergone antibiotic therapy without success. Interestingly, when treated with a combination of bromelain and antibiotics, 22 of these patients responded positively. In all disease cases, a significant decrease in morbidity was observed compared to antibiotic treatment alone.

Table 2. Molecular interactions of bromelain with demeclocycline, minocycline, and tetracycline antibiotics

Molecules	H-bonds	Intramolecular Distances
Bromelain – Demeclocycline (LIG)	THR15.B O - LIG H20 LYS 18.B O - LIG H14	VAL 17.B CGA – LIG H19 (4.108 Å) TYR 185.B HH – LIG O8 (4.264 Å) H21 – LIG HIS 158.B (2.754 Å) GLN 20.B – LIG C11 (4.94 Å)
Bromelain – Minocycline (LIG)	THR 15.B O - LIG H20 THR 161.B OG1 - LIG H8 HIS 158.B – LIG O6	TYR 185.B CD1 – LIG O7 (4.155 Å) GLN 20.B CB – LIG C22 (4.195 Å) ALA 33.B – LIG HN (2.545 Å)
Bromelain – Tetracycline (LIG)	CYS 26.B O - LIG H23 ALA 159.B O - LIG H23 LYS 18.B O – LIG H9 THR 161.B O - LIG H10 GLY 184.B O - LIG H19 LYS 18.B NH – LIG O1	VAL 17.B C61 – LIG O3 (2.820 Å) ILE 186.B CD1 – LIG H24 (4.410 Å) THR 161.B HG1 – LIG O6 (4.463 Å)

Similarly, Ryan's double-blind clinical study on acute sinusitis revealed that 83% of patients who received bromelain achieved complete resolution of nasal mucosal inflammation, as opposed to 52% in

the placebo group (Maurer, 2001). All these results proved that there is a favorable interaction between bromelain and tetracycline antibiotics. Looking at the clinical research reports and experimental research in the literature, it has not been precisely explained how bromelain and antibiotic interactions occur. Therefore, thanks to this molecular modeling study, it has been shown how and from which regions the interactions of bromelains and tetracycline antibiotics take place.

CONCLUSION

Especially in recent years, the rapid improvements of biotechnological developments has become both inevitable and mandatory. The basis of this requirement is the desire to advance clinical studies. In experimental studies, process optimization sometimes takes months, which causes both loss of work and high costs (Olivera et al., 2021). At this point, the importance of using computer-based modeling and advanced forecasting has been understood. With these techniques, many experimental and clinical applications can be simulated and evaluated quickly under desired conditions. In this way, pharmaceutical technology, biotechnological innovative approaches, biomaterial applications and medical research studies have gained momentum. Protein-ligand or protein-protein interactions are evaluated in molecular modeling studies (Jones et al., 2021).

In this study, molecular modeling of the interaction between bromelain molecule and demeclocycline, minocycline, and tetracycline antibiotics was performed. It is known that bromelain increases the effectiveness of these three antibiotics in the tetracycline antibiotics group and causes excessive absorption in the body. The structures were seen with free binding energy values calculated for AutoDock computerized molecular modeling studies, where the interactions of bromelain and antibiotics occur spontaneously. No changes were observed in the folding of the two subdomains of the bromelain molecule during the interaction. The interaction mechanism between bromelain and antibiotics was investigated by using the conformational information obtained by molecular modeling studies and the binding energy calculations.

REFERENCES

- Allahverdiyeva, S., Yardım, Y. & Şentürk, Z. (2021). Electrooxidation of tetracycline antibiotic demeclocycline at unmodified boron-doped diamond electrode and its enhancement determination in surfactant-containing media. *Talanta*, 223, 121695.
- Angelette, A.L., Rando, L.L., Wadhwa, R.D., Barras, A.A., Delacroix, B.M., Talbot, N.C., Ahmadzadeh, S., Shekoohi, S., Cornett, E.M., Kaye, A.M., Kaye, A.D. (2022). Tetracycline-, Doxycycline-, Minocycline-Induced Pseudotumor Cerebri and Esophageal Perforation. *Advances in Therapy*, 40, 1366–1378.
- Aylaz, G. & Andac, M. (2022). Affinity Recognition Based Gravimetric Nanosensor for Equilin Detection. *Chemosensors*, 10 (172), 1-21.
- Azarkan, M., Maquoi, E., Delbrassine, F., Herman, R., Rabet, N., Esposito, R.C., Charlie, P. & Kerff, F. (2020). Structures of the free and inhibitors-bound forms of bromelain and ananain from *Ananas comosus* stem and in vitro study of their cytotoxicity. *Scientific Reports*, 10, 19570.
- Banihashemrad, S.A., Nasrabadi, N., Rajabi, O., Kanafi, A.R., Taher, M. (2020). Impact of Bromelain on wound healing and complications after periodontal surgery. *Arch Pharma Pract*, 11(S1), 38-41.
- Bharadwaj, S., Lee, K.E., Dwivedib, V.D., Kanga, S.G. (2020). Computational insights into tetracyclines as inhibitors against SARS-CoV-2 M^{pro} via combinatorial molecular simulation calculations. *Life Sciences*, 257, 118080.
- Chakraborty, A.J., Mitra, S., Tallei, T.E., Tareq, A.M., Nainu, F., Cicia, D., Dhama, K., Emran, T., Gandara, J.S., Capasso, R. (2021). Bromelain a Potential Bioactive Compound: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Life*, 11, 317.

- Chisci, G. & Fredianelli, L. (2022). Therapeutic Efficacy of Bromelain in Alveolar Ridge Preservation. *Antibiotics*, 11, 1542.
- Dighe, N.S., Pattan, S.R., Merekar, A.N., Laware, R.B., Bhawar, S.B., Nirmal, S.N., Gaware, V.M., Hole1, M.B., Musmade, D.S. (2010). Bromelain A Wonder Supplement: A Review. *Pharmacologyonline*, 1, 11-18.
- Elton, D.C., Boukouvalas, Z., Fuge, M.D. & Chung, P.W. (2019). Deep learning for molecular design-a review of the state of the art. *Molecular Systems Design & Engineering*, 4, 828-849.
- Gupta, A.A., Kambala, R., Bholra, N. & Jadhav, A. (2022). Comparative efficacy of bromelain and aceclofenac in limiting post-operative inflammatory sequelae in surgical removal of lower impacted third molar: a randomized controlled, triple blind clinical trial. *Journal of Dental Anesthesia and Pain Medicine*, 22(1), 29-37.
- Hu, X., Zhang, Y., Chen, Z., Gao, Y., Teppen, B., Boyd, S.A., Zhang, W., Tiedje, J.M., Li H. (2023). Tetracycline accumulation in biofilms enhances the selection pressure on Escherichia coli for expression of antibiotic resistance. *Science of the Total Environment*, 857, 159441.
- Jancic, U. & Gorgieva, S. (2022). Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine. *Pharmaceutics*, 14(76), 1-39.
- Ji, S., Gavande, P.V., Choudhury, B. & Goyal, A. (2023). Computational design and structure dynamics analysis of bifunctional chimera of endoxylanase from Clostridium thermocellum and xylosidase from Bacteroides ovatus. *3 Biotech*, 13(59), 2-19.
- Jones, D., Kim, H., Zhang, X., Zemla, A., Stevenson, G., Bennett, W.F.D., Kirshner, D., Wong, S.E., Lightstone, F.C. & Allen, J.E. (2021). Improved Protein-Ligand Binding Affinity Prediction with Structure-Based Deep Fusion Inference. *ACS Journal of Chemical Information and Modeling*, 61, 1583-1592.
- Juhi, Baghel, N., Singh, R., Sharma, P. (2023). A Systematic Review of Toxicity of Antibiotics Used in the Treatment of STIs with Special Emphasis on Web-based Toxicity Analyzing Software. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 12, 1.
- Ke, K., Pillai, K., Mekki, A.H. Akhter, J., Badar, S., Valle, S.J., Morris, D.L. (2022). Physical and chemical factors affecting the loading and release of bromelain from DC beads. *American Journal of Translational Research*, 14(10), 7135-7146.
- Kılıç, S., Andaç, M. & Denizli, A. (2021). Binding modes of cibacron blue with albumin in affinity chromatography using docking tools. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 110-118.
- Kumar, P.K., Jha, I., Sindhu, A., Venkatesu, P., Bahadur, I. & Ebenso, E.E. (2020). Experimental and molecular docking studies in understanding the biomolecular interactions between stem bromelain and imidazolium based ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 297, 111785.
- Kumar, R., Kumar, R., Sharma, N., Khurana, N., Singh, S.K., Satija, S., Mehta, M. & Vyas, M. (2022). Pharmacological evaluation of bromelain in mouse model of Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 2022, 90, 19-34.
- LaPlante, K.L., Dhand, A., Wright, K., Lauterio, M. (2022). Re-establishing the utility of tetracycline class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. *Annals of Medicine*, 54:1, 1686-1700.
- Leichtweisa, J., Vieirab, Y., Weltera, N., Silvestria, S., Dottob, G.L., Carissimia, E. (2022). A review of the occurrence, disposal, determination, toxicity and remediation technologies of the tetracycline antibiotic. *Process Safety and Environmental Protection*, 160, 25-40.
- Liang, G., Zhao, J., Gao, Y., Xie, T., Zhen, J., Pan, L., Gong, W. (2023). Application and evaluation of molecular docking for aptamer and small molecular interaction - A case study with tetracycline antibiotics. *Talanta*, 266, 124942.
- Li, J., Fu, A. & Zhang, L. (2019). An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 11, 320-328.

- Li, N., Zhou, L., Jin, X., Owens, G. & Chen, Z. (2019). Simultaneous removal of tetracycline and oxytetracycline antibiotics from wastewater using a ZIF-8 metal organic-framework. *Journal of Hazardous Materials*, 366, 563-572.
- Li, Z.H., Yuan, L., Wang, L., Liu, Q., Sheng, G.P. (2022). Coexistence of silver ion and tetracycline at environmentally relevant concentrations greatly enhanced antibiotic resistance gene development in activated sludge bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127088.
- Maher, H.M., Almomen, A., Alzoman, N.Z., Shehata, S.M. & Alanazi, A.A. (2021). Development and validation of UPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of anaplastic lymphoma kinase inhibitors, alectinib, ceritinib, and crizotinib in Wistar rat plasma with application to bromelain-induced pharma cokinetic interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 204, 114276.
- Maheshwari, D.G., Shah, J.S., Shah, D.B., Patel, P.K. & Singh, Y.R. (2023). Emerging trends in extraction and analytical techniques for bromelain. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 45(9), 107-119.
- Mameli, A., Natoli, V. & Casu, C. (2021). Bromelain: an Overview of Applications in Medicine and Dentistry. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 8165-8170.
- Mauer, H.R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 1234–1245.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. & Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Software News and Updates*, 30, 2785-2791.
- Olivera, O.V., Rocha, G.B., Paluch, A.S. & Costa, L.T. (2021). Repurposing approved drugs as inhibitors of SARS-CoV-2 S-protein from molecular modeling and virtual screening. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39 (11), 3924-3933.
- Olshannikova, S.S., Malykhina, N.V., Lavlinskaya, M.S., Sorokin, A.V., Yudin, N.E., Vyshkvorkina, Y.M., Lukin, A.N., Holyavka, M.G., Artyukhov, V.G. (2022). Novel Immobilized Biocatalysts Based on Cysteine Proteases Bound to 2-(4-Acetamido-2-sulfanilamide) Chitosan and Research on Their Structural Features. *Polymers*, 14, 3223.
- Pang, W.C., Ramli, A.M. & Hamid, A.A.A. (2020). Comparative modelling studies of fruit bromelain using molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Modeling*, 26, 142.
- Pankovaa, S. M., Holyavkaa, M.G., Kondrat'evd, M.S., Vyshkvorkinae, Y.M., Lukina, A.N., Artyukhova, V.G. (2022). A Chitosan Matrix as a Photomodulator for Bromelain. *Biology Bulletin*, 49, 11, 2126–2133.
- Pavan, R., Jain, S., Shraddha, Kumar, A. (2012). Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review. *Biotechnology Research International*, 976203, 6 pages.
- Pereira, I.C., Satiro, E.E., Torres, L.R.O., Silva, F.C.C., Sousa, J.M.C. & Leal, F.L.T. (2023). Bromelain supplementation and inflammatory markers: a systematic review of clinical trials. *Clinical Nutrition Espen*, 55, 116-127.
- Petkovic, H., Cullum, J., Hranueli, D., Hunter, I. S., Concha, N., Pigac, J., Thamchaipenet, A., Vujaklija, D. & Long, P. F. (2006). Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 704-728.
- Pettersen E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblat, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Wiley InterScience*, 25, 1605-1612.
- Romm, A., Burgess, I., Winston, D., Zick, S.M., Crawford, A.M.Q. (2010). Conditions of the Reproductive Organs. *General Gynecologic and Menstrual Health Concerns*, Chapter 7, 211-255.
- Sabe, V.T., Ntombela, T., Jhamba, L.A., Maguire, G.E.M., Govender, T., Naicker, T. & Kruger, H.G. (2021). Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113705.

- Sharma, M., Chaudhary, D. & Pharm, M. (2022). In vitro and in vivo implications of rationally designed bromelain laden core-shell hybrid solid lipid nanoparticles for oral administration in thrombosis management. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 42, 102543.
- Salha, D., Andaç, M. & Denizli, A. (2020). Molecular docking of metal ion immobilized ligands to proteins in affinity chromatography. *Journal of Molecular Recognition*, 34, e2875.
- Singh, T., Thapliyal, S., Bhatia, S., Singh, V., Singh, M., Singh, H., Kumar, A. & Mishra, A. (2022). Reconnoitering the transformative journey of minocycline from an antibiotic to an antiepileptic drug. *Life Sciences*, 293, 120346.
- Solis-Vasquez, L., Tillack, A.F., Martins, D.S., Koch, A., LeGrand, S. & Forli, S. (2022). Benchmarking the performance of irregular computations in AutoDock-GPU molecular docking. *Parallel Computing*, 109, 102861.
- Sorokin, A.V., Goncharova, S.S., Lavlinskaya, M.S., Holyavka, M.G., Faizullin, D.A., Zuev, Y.F., Kondratyev, M.S., Artyukhov, V.G. (2023). Complexation of Bromelain, Ficin, and Papain with the Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and N-Vinylimidazole Enhances Enzyme Proteolytic Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 11246.
- Wang, K.M., Zhou, L.X., Ji, K.F., Xu, S.N. & Wang, J.D. (2022). Evaluation of a modified internal circulation (MIC) anaerobic reactor for real antibiotic pharmaceutical wastewater treatment: Process performance, microbial community and antibiotic resistance genes evolutions. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 102914.
- Wang, R., Fang, X., Lu, Y., Wang, S. (2003). The PDBbind Database: Collection of Binding Affinities for Protein-Ligand Complexes with Known Three-Dimensional Structures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 12, 2977-2980.
- Yang, S.Y. (2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, 15, 11/12, 444-450.

To Cite: Suicmez, M., Namalir, G. & Ozdil, H. (2023). In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2997-3006.

In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines

Menderes SUICMEZ^{1*}, Gamze NAMALIR¹, Hilal OZDIL¹

Highlights:

- Alternative treatment strategy for breast cancer
- Drug combination analysis on breast cancer cell lines
- qPCR analysis of *Bcl-2*, *Mapt*, *Mrp1* genes

Keywords:

- Combinationtherapy anticancer drug
- *Bcl-2*
- *Mapt*
- *Mrp1*

ABSTRACT:

The combination therapy of breast cancer has preferred for the patients to minimize possible side effects, drug resistance, recurrence and toxic effects. In this study, we aim to investigate the cytotoxic and antitumor activities the tamoxifen and doxorubicin combination in breast cancer cell lines, MCF-7 and BT-474. Tamoxifen (Tam) and doxorubicin (Dox) and their combination with different concentrations (0.625–20 µM Tam; 0.0625–2 µM Dox and 5 µM Tam+ 0.5/1.0/1.5 µM Dox combination were applied to MCF-7 and BT-474 cells for 48 hours. Afterthat, their cytotoxic activities were analyzed with MTT assay. *Bcl-2*, *Mapt* and *Mrp1* are genes that induce cell proliferation, inhibit apoptosis and play role in drug resistance in cancer cells. To evaluate the antitumor activities of these genes in combination treatment, mRNA levels were analyzed by quantitative PCR. According to the MTT assay, it was determined that IC₅₀ values as 17.26 µM and 16.65 µM for tamoxifen on MCF-7 and BT-474 breast cancer cell lines. IC₅₀ values of doxorubicin in MCF-7 and BT-474 cells were 1.65 µM and 1.57 µM, respectively. It was found that the application of the combination drugs (15 µM tamoxifen and 1.5 µM doxorubicin) in MCF-7 and BT-474 cells have the lowest combination index values as 1.09 and 1.26, respectively. Therefore, the combination of 15 µM tamoxifen and 1.5 µM doxorubicin was selected and applied to both breast cancer cell lines for gene expression analysis. It was found that while *Mrp1* and *Mapt* genes expressions were significantly upregulated, *Bcl-2* gene expression was downregulated in MCF-7 cells. However, *Bcl-2*, *Mrp1* and *Mapt* genes expressions in BT-474 cells were not significantly regulated. Altogether, these findings suggest that the combination of these two drugs may have a potential antagonistic interaction according combination index values.

¹ Menderes SUICMEZ ([Orcid ID: 0000-0003-0890-8235](https://orcid.org/0000-0003-0890-8235)) Gamze NAMALIR ([Orcid ID: 0000-0001-6588-8504](https://orcid.org/0000-0001-6588-8504)), Hilal OZDIL ([Orcid ID: 0000-0003-3477-3610](https://orcid.org/0000-0003-3477-3610)) Hitit University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Çorum, Türkiye

Corresponding Author: Menderes SUICMEZ, e-mail: menderessuicmez@hitit.edu.tr

INTRODUCTION

Doxorubicin (Dox) is an effective chemotherapeutic drug and anthracycline type antibiotic used for treatment of metastatic breast cancer (BC) (Thomadaki & Scorilas, 2008). Tamoxifen (Tam) is also drug that preferred to treat estrogen receptor positive BCs including postmenopausal women of metastatic sites (Zheng et al., 2007). However, long term usage of of them may lead to serious side effects. For example, as the doxorubicin causes the cardiotoxicity, it could be preferred to use with adjuvants. Besides, tamoxifen leads to hot flushes, vaginal discharge and vaginal dryness. Multi-drug treatments such as combination of Tam and Dox may be more effective in the treatment of BC, rather than long-term treatment with a single drug (Sheppard et al., 1977). It has been shown that doxorubicin combination with tamoxifen may be a good choice after relapse in BC patients (Das et al., 2022).

The antitumor activity of both doxorubicin and tamoxifen has been associated the drug resistance. The difference on the regulation of drug transporter proteins such as P-glycoprotein, members of the multidrug resistance protein (MRP1) may activate drug resistance mechanism (Müller et al., 1998; Borst et al., 2000; Dallavalle et al., 2020). It was reported that MRP1 protein expressions were higher in doxorubicin drug-treated MCF-7 cell lines than in untreated cell (Kocdogan et al., 2020). B-cell lymphoma 2 gene (*Bcl-2*) could have been considered as antiapoptotic and drug resistance marker in cancers. Furthermore, chemotherapeutic agents could result in apoptosis through inhibiting overexpression of *Bcl-2* gene (Seong et al., 2015). In tamoxifen treated MCF-7 cells, *Bcl-2* was downregulated that activates Tp53 signaling during apoptosis (Sheppard et al., 1974). Microtubule-associated protein tau (MAPT) shows sensitivity to the some taxel group drugs in BC (Rodrigues-Ferreira et al., 2019). Therefore, the low level of expression of MAPT could creat antitumor activity for BC cells (Drechsel et al., 1992; Park et al., 2007).

Several studies have demonstrated that there are different results about the effect of Tam/Dox combination in human BC cells. For example, while Chuang et al. (2013) reported that combination of tamoxifen and doxorubicin had synergistic effect on the inhibition of proliferation BT-483, Woods et al. (1994) reported that the combined drug of Tam/Dox combination had antagonistic interaction and did not significantly change the antitumor effects of the cells (Woods et al., 1994; Chuang et al., 2013). In this study, firstly, we aimed to determine the cytotoxic activities of the tamoxifen and doxorubicin in both MCF-7 and BT-474 cells. After the determination of the concentration Tam/Dox combination, antitumor activities of Tam/Dox combination in MCF-7 and BT-474 cells were determined by quantitative PCR (qPCR) assay.

MATERIALS AND METHODS

Drugs

Dox was purchased as vials from Adooq Bioscience (California; USA, cat. No: A14403). Dox hydrochloride was soluble in DMSO. Tam was obtained from MedChemExpress (New Jersey; USA, cat. No: ICI 47699) and was also solved in DMSO.

Cell culture

Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) and BT-474 cells in this study were **given by Dr. Bala**. MCF-7 cells were grown in DMEM/ high glucose (Capricorn Scientific GmbH, Germany) including 10% FBS and %1 pen/strep and 2 mM L-glutamin. However, BT-474 cells were grown in RPMI media (Capricorn Scientific GmbH, Germany). All cells were cultured in a 5% CO₂, 37 °C incubator. In experiment set, the cells were grouped into four; the control group was treated with 0.5% DMSO in

DMEM/RPMI medium; the two cell groups were treated with Dox (0.5/1.0/1.5 μM) or Tam (10-15 μM) and their combination.

Cytotoxicity analysis

The cell viability was processed by using the MTT (USA, Sigma cat. No: M5655) method described by Kazan's group (Kazan et al., 2020). Different concentrations of the drugs as the following ranges: tamoxifen (0.625–20 μM); dox (0.0625–2 μM); tam + dox in different concentrations with combination (15 μM Tam + 0.5/1.0/1.5 μM Dox concentrations and 10 μM Tam + 0.5/1.0/1.5 μM Dox) were applied to both cell lines. After 48 hours, MTT test was performed. Each plate was read spectrophotometrically (Evolution-201/Thermo Scientific /USA) at the wavelength of 570 nm. While the control group cells were assumed viable as 100%, viable cells ratio of other groups were calculated relatively according to absorbance values of them to control groups. The determination of IC_{50} values were processed by the help of GraphPad Prism 8.0 software. The effect of combination of drugs as Combination index (CI) was calculated according to Chou et al. method (Chou & Talalay, 1984).

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA was extracted from the cells using a Ribospin II (Korea, GeneAll cat. No: 314-150) RNA isolation kit. In order to synthesize complementary DNA (cDNA), A.B.T. KİT P protocol was performed (Turkey, A.B.T. cat. No: C03-01-05). The reaction was set with *Bcl-2*, *Mapt* and *Mrp1* primers as shown and cited in Table 1 and mix with SYBR Green Mastermix (Turkey, A.B.T. cat. No: Q03-02-01) using Biorad CFX96 qPCR system. The fold change of each gene was calculated using comparative threshold cycle (C_t) method as normalized to that of *Gapdh* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). All experiment reactions were done in triplicate.

Table 1. Primer Sequences for qPCR Analysis

Primer	Forward 5'----->3'	Reverse 5'----->3'
<i>Bcl-2</i> (Boyle et al., 2015)	CTGCACCTGACGCCCTTCACC	CACATGACCCACCGAACTCAAAGA
<i>Mapt</i> (Young, 2021)	TAGGCAACATCCATCATAAACCA	TCGACTGGACTCTGTCCTTGAA
<i>Mrp1</i> (Gao et al., 2016)	GTCGGGGCATATTCCTGGC	GGGCATCCTCTTTTAAGGCTG
<i>Gapdh</i> (universal)	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT

Statistical data analysis

All experiments were replicated in triplicate. Means of replicates and their standard deviations were calculated. Data normality was done using IBM SPSS 22.0 program.

RESULTS AND DISCUSSION

The Cytotoxicity Results

The viability assay is usually performed measuring the toxic effect of a drug which can be determined the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value (AL-Jailawi et al., 2015). When the IC_{50} values of Tam in the MTT assay was analyzed, MCF-7 and BT-474 cells have 17.26 μM and 16.65 μM , respectively (Figure 1A). However, the IC_{50} values of Dox in two cell lines were 1.65 μM and 1.57 μM , respectively (Figure 1B).

According to our results, combination index (CI) was calculated and the combined doxorubicin and tamoxifen effects was determined in terms of having drug synergism ($\text{CI} < 1$), additive effect ($\text{CI} = 1$), or antagonism ($\text{CI} > 1$). The cell viability results of MTT assay in both MCF-7 and BT-474 cells were used to calculate CI value of with Dox and Tam. We found that the combined drug effects of Tam and Dox had antagonistic effect in MCF-7 cells because the CI values of all combination treatment were higher than 1 (Table 2). Thus, the antagonist effect was observed along tamoxifen and doxorubicin combination.

In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines

Table 2. Combination Index (CI) Values After Tam/Dox Exposure.

Cell Line	Combination	Combination Index
MCF-7	0.5 μ M Dox/15 μ M Tam	1.74
	1.0 μ M Dox/15 μ M Tam	1.83
	1.5 μ M Dox/15 μ M Tam	1.09
	0.5 μ M Dox/10 μ M Tam	1.67
	1.0 μ M Dox/10 μ M Tam	1.54
	1.5 μ M Dox/10 μ M Tam	1.50
BT-474	0.5 μ M Dox/15 μ M Tam	1.54
	1.0 μ M Dox/15 μ M Tam	1.46
	1.5 μ M Dox/15 μ M Tam	1.26
	0.5 μ M Dox/10 μ M Tam	1.50
	1.0 μ M Dox/10 μ M Tam	1.41
	1.5 μ M Dox/10 μ M Tam	1.46

*The combination index (CI) for two drugs can be defined based on Chou and Talalay (14) median effect equation

The lowest CI values in both MCF-7 cells and BT-474 cells were 1.09 and 1.26, respectively, in the combination of 15 μ M Tam and 1.5 μ M Dox. Therefore, the combined drug concentration for the gene expression experiments was chosen as 15 μ M Tam/1.5 μ M Dox. Two drugs with separately and different concentration combination were cultured for 48 hours incubation. 20 μ M tamoxifen treatments on the cells alone decreased the number of viable cells in MCF-7 and BT-474 below 50% ($p < 0.05$). The cells were cultured in 2 μ M doxorubicin for 48 hours, the viabilities of MCF-7 and BT-474 cells were 43% and 41%. However, when the doxorubicin concentration was decreased to 1 μ M, the viabilities of the MCF-7 and BT-474 were 61%, 59% respectively. The exposure of 10 μ M Tam alone to MCF-7 and BT-474 cells, viability ratios of cells were 68% and 65%. Therefore, culturing concentrations of the combination of tamoxifen and doxorubicin was determined based on viability ratios of cells. At all different concentrations of combination of Tam/Dox on the cells, the number of viable cells never vitally decreased. When combined with 1.5 μ M Dox, 15 μ M Tam could exhibit low cytotoxic effect that decreased the viability of cells to 55%. In addition, it was found that the sensitivity of cells to the other combinations of Tam/Dox did not increase dramatically.

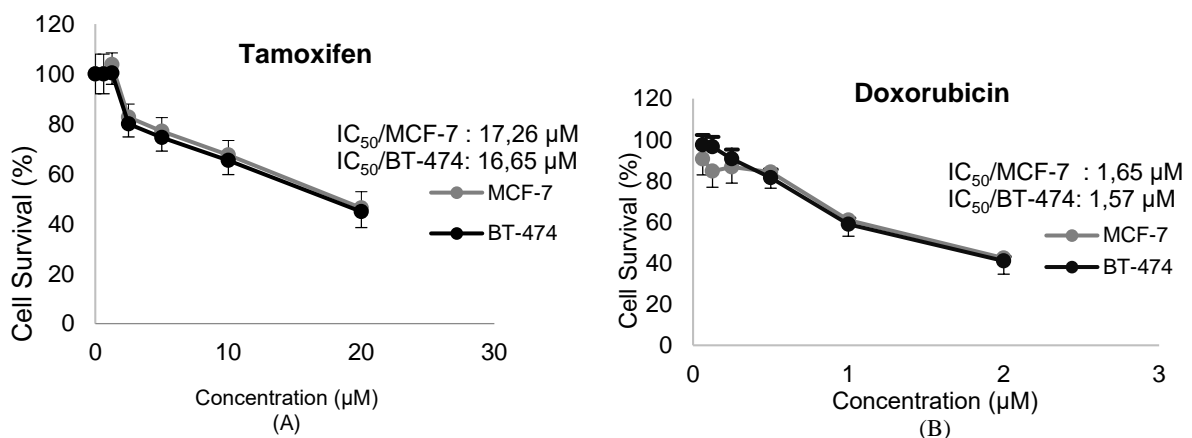


Figure 1. Cell Viability With MTT Assay. Dose Response Curve of Tamoxifen (A), and Doxorubicin (B), for 48 Hours (black and gray diamonds) on MCF-7 and BT-474 cells. All Experiments Were in Triplicate

At concentrations of 15 μ M Tam/1.5 μ M Dox, the ratio of the viable cells did not essentially change at both the combination of Tam/Dox and Dox alone (1.5 μ M Dox).

Figure 2 showed that the culturing of BT-474 cells at any of combinations of Tam/Dox did not decrease of the growing of the cells while Tam/Dox combination had a slight effect on cell proliferation of MCF-7 cells. It was observed that the drugs were antagonistic to each other because the treatment of the drugs alone was more effective on decreasing of the viable cells.

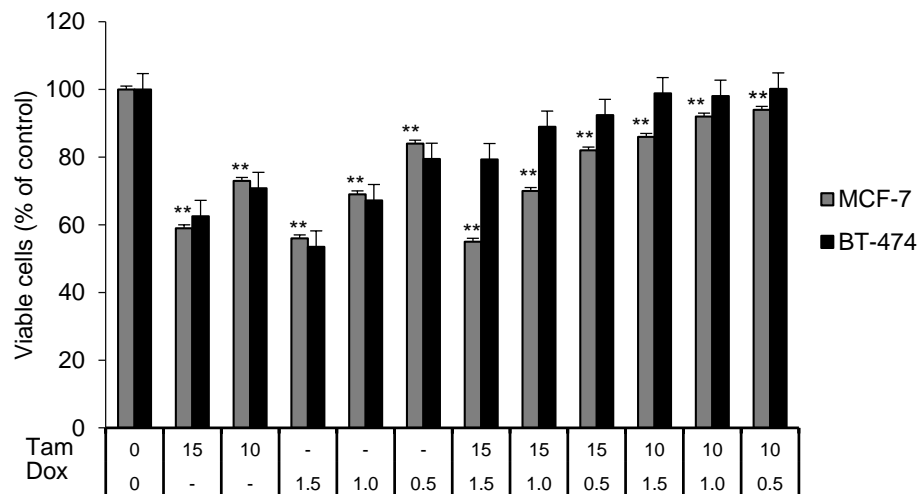


Figure 2. The Viability Ratios of Two Cell Lines Exposed to the Combination of Tamoxifen (Tam) and Doxorubicin (Dox) (**p<0.01)

In previous studies, it has been reported that tamoxifen reduced the number of viable MCF-7 cells by becoming toxic or apoptotic effect (Ajabnoor et al., 2012). It has been previously documented that tamoxifen targeted the disruption of cell membrane integrity by altering in the composition of plasma membrane (Salgueiro et al., 2014; Khadka et al., 2015). It has been also shown that IC50 value of tamoxifen in MCF-7 and BT-474 cells were 3.2 µM and 5.7 µM, respectively (Pawlik et al, 2016). Besides, IC50 values of doxorubicin in MCF-7 and BT-474 cells were 0.69 µM and 1.14 µM, respectively (Wen et al., 2018). Our results were supported, which is consistent with previous literature.

Ouyang and Li reported that cell proliferation of MG63 was inhibited by Tam and Dox alone. They also found that the combination of Tam and Dox had significantly antagonistic effect on MG63 cell lines (Ouyang & Li, 2013). Ahmann et al. (1985) found the synergistic effect of Tam, Dox and cyclophamide combination in clinical patients with ER+positive tumors (Ahmann et al., 1985). In another study, the combination of Tam/Dox with radiotherapy had relapsed the improvement of tumors in ER+ patients (Blomqvist et al, 1992).

QPCR results of *Bcl-2*, *Mapt*, *Mrp1* genes

The treatment of combined doxorubicin and tamoxifen changed the mRNA expression levels of *Bcl-2*, *Mapt*, *Mrp1* genes in MCF-7 cells. In our study, qPCR analysis of the expression of *Bcl-2*, *Mapt*, *Mrp1* genes was processed in order to figure out the antagonistic effect between Dox and Tam. The mRNA expression level of *Bcl-2*, *Mapt*, *Mrp1* genes were analysed by qPCR.

In our study, the mRNA gene expression levels of *Bcl-2* statistically significantly decreased 2.4 fold in MCF-7 for Tam/Dox combination (Table 3). Interestingly, MCF-7 cells were exposed to 15 µM Tam and 1.5 µM Dox alone, only Tam were caused statistically significant 1.2 fold decrease in *Bcl-2* expression. However, when both were applied together (15 µM Tam + 1.5 µM Dox), it was determined that there was a statistically significant 2.4-fold decrease in *Bcl-2* expression. However, BT-474 cell lines did not show same pattern. Although *Bcl-2* gene expression was not statistically significantly decrease (0.85 fold) in Tam/Dox combination, on the contrary, down regulation was not increased compared to the 15 µM Tam (1.1 fold) and 1.5 µM Dox (1.0 fold) alone application.

In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines

Table 3. qPCR Results of *Bcl-2* on Two Cell lines. Treatment with 15 μ M tamoxifen (Tam)/1.5 μ M doxorubicin (Dox) combination compared to their control group cell lines without exposure to drugs and incubated for 48 hours. (\downarrow : downregulation) (* $p < 0.05$)

Drug Concentration	MCF-7 Fold Change	BT-474 Fold change
15 μ M Tam	\downarrow 1.2*	* \downarrow 1.1*
1.5 μ M Dox	\downarrow 0.8	\downarrow 1.0*
15 μ M Tam+ 1.5 μ M Dox	\downarrow 2.4*	\downarrow 0.85

In this study, it was found that *Mapt* gene expression levels showed 1.2, 1.1 and 1.44 fold statistically significant upregulation in MCF-7 cells in the presence of tamoxifen, doxorubicin and Tam/Dox, respectively (Figure 3). On the other hand, when BT-474 cells treated in a similar way, *Mapt* expression did not show statistically significant upregulation.

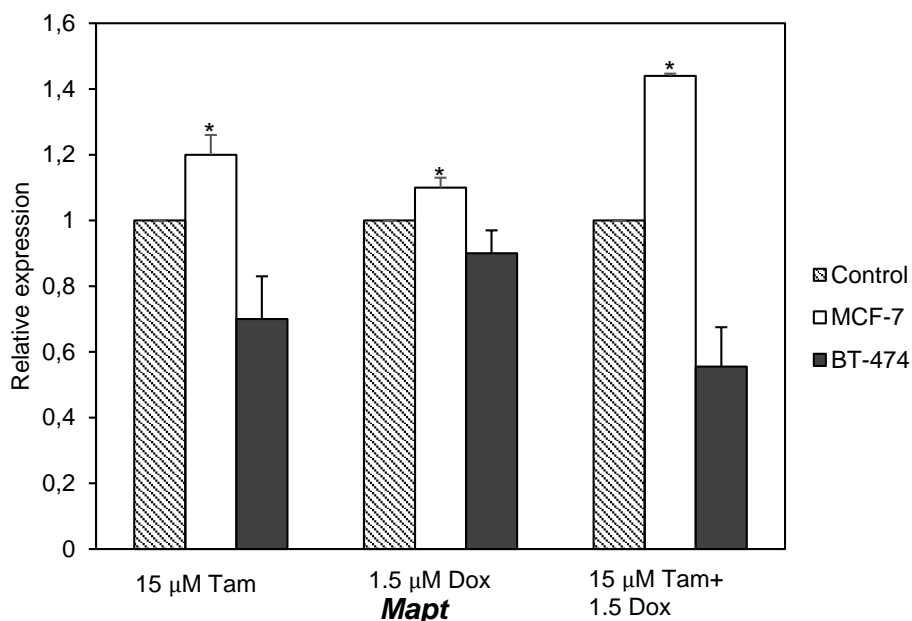


Figure 3. qPCR results of relative mRNA levels of *Mapt* on two cell lines. Treatment with 15 μ M tamoxifen (Tam)/1.5 μ M doxorubicin (Dox) combination compared to their control group cell lines without exposure to drugs and incubated for 48 hours (* $p < 0.05$)

In our study, it was found 1.46 and 1.2 fold statistically increase in *Mrp1* gene expression in MCF7 and BT-474 cells, respectively, when 1.5 μ M doxorubicin treated to cultures. Similar to doxorubicin, 15 μ M tamoxifen treatment caused statistically increase in *Mrp1* gene expression 2.6 and 2.23 fold in MCF-7 and BT-474 cells, respectively. According to our results, Tam/Dox treatment caused 3,8 fold statistically increase in *Mrp1* gene expression level in MCF-7 cells, whereas it did not change in BT-474 cells.

The higher upregulation of *Mrp1* gene expression was found than treated with Dox as the MCF-7 and BT-474 cells were treated with Tam. Furthermore, it was determined that there was a significant increase the mRNA level of *Mrp1* gene in MCF-7 cells treated by Tam/Dox combination, which could not be determined the similar increase expression of *Mrp1* gene for BT-474 cells. As a result, it could be concluded that *Mrp1* expression was associated with both anthracycline and endocrine therapy. It is also suggested that *Mrp1* activation and *Bcl-2* inactivation probably contributes to decrease of viability of MCF-7 cells by the exposure of Tam/Dox.

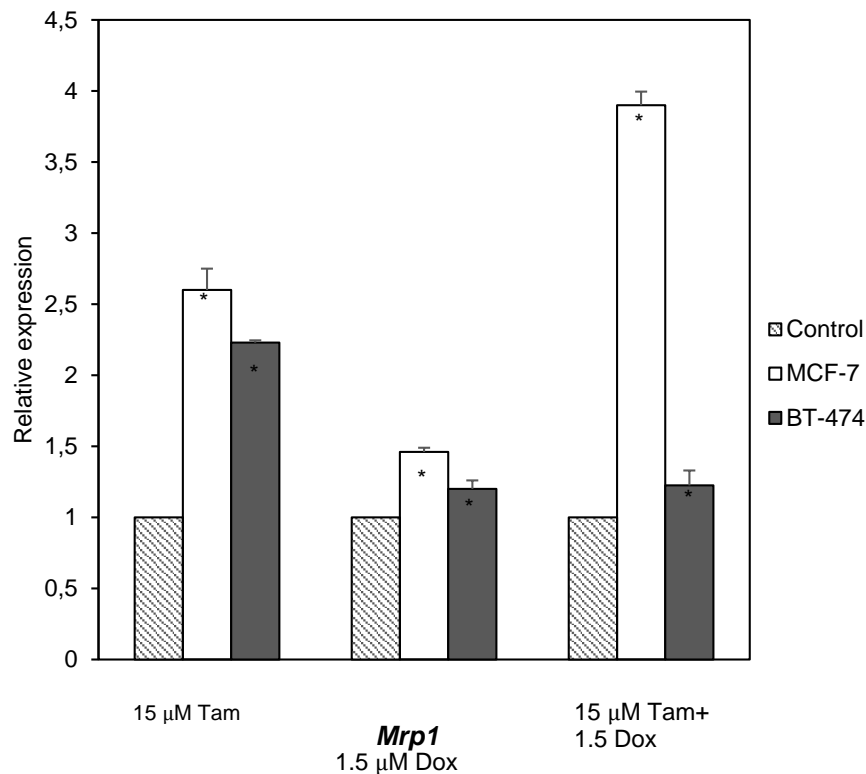


Figure 4. qPCR results of relative mRNA levels of *Mrp1* on two cell lines. (* $p < 0.05$)

The results indicated that, while the mRNA expression levels of *Bcl-2* gene were downregulated, *Mapt* expression did not change vitally and *Mrp1* expression was upregulated significantly when MCF-7 cells exposed to Tam/Dox combination. However, it was not determined any regulation of those genes in BT-474 cells. We compared the mRNA profiles *Bcl-2*, *Mapt*, *Mrp1* genes that exposure of Tam, Dox, Tam/Dox treatment to MCF-7 and BT-474 cells. According to our results, it was pointed out as follows: (a) the combination of tamoxifen and doxorubicin may contribute to antagonism according to Combination index values (b) the mRNA levels of *Bcl-2* were statistically significantly downregulated in the treatment of the combination of Tam/Dox in MCF-7 cells (c) the mRNA levels of *Mapt* gene was upregulated statistically significantly in MCF-7 cells (d) the levels of *Mrp1* mRNA were statistically significant increase in MCF-7 and BT474-cells.

Apoptosis stemming from Dox activates the Bcl-2 family of proteins activating caspases was shown by different studies (Rossé et al., 1998; Zhang et al. 1999; Hawkin et al, 2000; Salami & Karami-Tehrani, 2003). However, it was shown that tamoxifen regulates the apoptotic changes in cells by downregulating of Bcl-2 expression in cells. Apoptosis induced by chemotherapeutic drugs has been determined through down regulation of Bcl-2. The decreasing of Bcl-2 expression in our experiment is reasonably consistent with related literature. In addition, the upregulation of Bcl-2 expression is related tumor growth (Kocdogan et al., 2020). *Mapt* expression was positively correlated with ER expression and ER signaling has an effect on *Mapt* expression (Andre et al., 2007). Similar to our MCF-7 results, a research team observed that protein expression of MAPT was increased by exposure with tamoxifen (Ikeda et al, 2015). In addition, Rouzier et al. found that paclitaxel and 5-fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide drug combination resulted in down regulation of *Mapt* expression (Rouzier et al., 2005). Chemotherapeutic drugs could be exported from cancer cells by *Mrp1* whose expression is upregulated (Kim, 2015). The regulation of *Mrp1* gene expression has become differently in various cells including BC cells. The overexpression of *Mrp1* is the proof of the resistance of different cancer cells to chemotherapy drugs

(Wind & Holen, 2011). Wang et al. reported that the Mrp1 gene expression had higher regulated in MCF-7/Dox cells than that in MCF-7/Docetaxel and MCF-7/wild type (Wang et al., 2014).

CONCLUSION

The combination treatment of Tam/Dox caused antagonistic effect on MCF-7 and BT-474 cancer cell lines, thus the number of tested cells reduce by more than 40%. This combination regimen (15 μ M Tam/ 1.5 μ M Dox) exposed to both MCF-7 and BT-474 cell lines resulted in the increase of mRNA expression of *Mrp1* and decrease of *Bcl-2* gene expression. It is considered that the antitumor properties of the cells might be regulated by these two genes. It was determined no correlation in expression level of *Mapt* gene in MCF-7 cells after treating with Tam/ Dox. Our study may be a candidate to be one of the current approaches to use various drugs together with anti-cancer drugs. Tam/Dox combination regiment for ER+ breast cancer could be applied in futher studies related with breast cancer studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported the Scientific Research Projects Department (BAP) of Hitit University with project number of FEF19001.20.002.

Conflict of Interest

The author declared that they have no conflict of interest and all authors have read and approved of the manuscript being submitted.

Author's Contributions

Menderes SUICMEZ and Gamze NAMALIR prepared the manuscript's backbone and wrote the original draft of the manuscript. Hilal OZDIL helps to the other authors about conducting experiments.”

REFERENCES

- Ahmann, F. R., Jones, S. E., Moon, T. E., Hammond, N., Miller, T. P., & Durie, B. G. M. (1985). Chemohormonal therapy for advanced breast cancer with tamoxifen, adriamycin, and cyclophosphamide (TAC). *Cancer*, 56, 730–7. -
- Ajabnoor, G. M. A., Crook, T., & Coley, H. M. (2012). Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 3. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.139>.
- AL-Jailawi, M. H., Mansor, Nas, H., & Munaim Azi, G. (2015). Characterization of biosurfactant produced by a novel Thermophillic Strain (*Geobacillus thermoleovorans* JQ 912239). *Asian Journal of Biotechnology*, 7, 96–107. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2015.96.107>.
- Andre, F., Hatzis, C., Anderson, K., Sotiriou, C., Mazouni, C., Mejia, J., Wang, B., Hortobagyi, G., Symmans, W., & Pusztai, L. (2007). Microtubule-associated protein-tau is a bifunctional predictor of endocrine sensitivity and chemotherapy resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 13, 2061–7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2078>.
- Blomqvist, C., Tiusanen, K., Elomaa, I., Rissanen, P., Hietanen, T., Heinonen, E., & Gröhn, P. (1992). The combination of radiotherapy, adjuvant chemotherapy (Cyclophosphamide-doxorubicin-ftorafur) and tamoxifen in stage 2 breast cancer. Long-term follow-up results of a randomised trial. *British Journal of Cancer*, 66, 1171–6. <https://doi.org/10.1038/bjc.1992.430>.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., & Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1295–302. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>.
- Boyle, Michael., Chun, Crystal., Strojny, Chelsea., Narayanan, Raghuvaran., Bartholomew, Amelia., Sundivakkam, Premanand., Alapati, S. (2015). Chronic Inflammation and Angiogenic Axis Impairs Differentiation of Dental-Pulp Stem Cells. *PLoS ONE*, 9(11): e113419. doi:10.1371/journal.pone.0113419

In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines

- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4).
- Chuang, P. Y., Huang, C., & Huang, H., C. (2013). The use of a combination of tamoxifen and doxorubicin synergistically to induce cell cycle arrest in BT483 cells by down-regulating CDK1, CDK2 and cyclin D expression. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 2, 12. <https://doi.org/10.7243/2050-120x-2-12>.
- Dallavalle, S., Dobričić, V., Lazzarato, L., Gazzano, E., Machuqueiro, M., Pajeva, I., Tsakovska, I., Zidar, N., Fruttero, R. (2020). Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. *Drug Resistance Updates*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100682>.
- Das, G., Oturkar, C., Adams C., Park, J., Dolan, Melissa., Mastri, Michalis., Oshi, Masanori, Tokumaru, Yoshihisa., Mukhopadhyay, Utpal., Abha, Kalyani., Jung, Kwang Hwa., Yang, Sukjin., Kim, Suna., Ebos, John., Takabe, Kazuaki., Kaiparettu, Benny. (2022). Combination of tamoxifen and doxorubicin targets estrogen receptor beta-mutant p53-p73 axis: A novel therapeutic strategy for triple negative breast cancer. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2022. *Cancer Research*, 82, 3986-3986. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-3986>.
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M.H., & Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Molecular Biology of the Cell*, 3, 1141–54. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1141>.
- Gao, M., Miao, L., Liu, M., Li, C., Yu, C., Yan, H., Yin, Y., Wang, Y., Qi, X., Ren, J. (2016). miR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1. *Oncotarget*, 13, 7(37), 59714-59726. doi: 10.18632/oncotarget.10845.
- Hawkin, R. A., Arends, M. J., Ritchie, A. A., Langdon, S., & Miller, W. R. Tamoxifen increases apoptosis but does not influence markers of proliferation in an MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Breast*, 9, 96–106. <https://doi.org/10.1054/brst.2000.0140>.
- Ikeda, H., Taira, N., Hara, F., Fujita T, Yamamoto, H., Soh, J., Toyooka, S., Nogami, T., Shien, T., Doihara, H., Miyoshi, S. (2010). The estrogen receptor influences microtubule-associated protein tau (MAPT) expression and the selective estrogen receptor inhibitor fulvestrant downregulates MAPT and increases the sensitivity to taxane in breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1186/BCR2598/TABLES/2>.
- Kazan, H. H, Urfali-Mamatoglu, C., Yalcin, G. D., Bulut, O., Sezer, A., Banerjee, S., & Gündüz, U. (2020). 15-LOX-1 has diverse roles in the resensitization of resistant cancer cell lines to doxorubicin. *Journal of Cellular Physiology*, 235, 4965–78. <https://doi.org/10.1002/jcp.29375>.
- Khadka, N. K., Cheng, X., Ho, C. S., Katsaras, J., Pan, J. (2015). Interactions of the Anticancer Drug Tamoxifen with Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 108:2492–501. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.010>.
- Kim, B., Stephen, S. L., Hanby, A. M., Horgan, K., Perry, S.L, Richardson, J., Roundhill, E. A., Valleley, E. M. A., Verghese, E. T., Williams, B. J., James, L., & Thorne & Thomas, A. (2015). Hughes Chemotherapy induces Notch1-dependent MRP1 up-regulation, inhibition of which sensitizes breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Cancer*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1625-y>.
- Kocdogan, A., Oğuztüzün, S., Simsek, G., & Mustafa, T. (2020). Investigation of GST isoenzymes, multi-drug resistance proteins and apoptotic effect in MCF-7 human breast cancer cell line before and after doxorubicin treatment. *Istanbul Gelisim University Journal of Health Sciencens*, 10, 1–18.
- Müller, M., De Vries, E. G. E., & Jansen, P. L. M. (1996). Role of multidrug resistance protein (MRP) in glutathione-conjugate transport in mammalian cells. *Journal of Hepatology*, 24, 100–8.
- Ouyang, Z. X., & Li, X. A. (2013). Inhibitory effects of tamoxifen and doxorubicin, alone and in combination, on the proliferation of the MG63 human osteosarcoma cell line. *Oncology Letters*, 6, 970–6. <https://doi.org/10.3892/OL.2013.1487>.
- Park, S., Tournell, C., Sinjoanu, R., & Ferreira, A. (2007). Caspase-3- and calpain-mediated tau cleavage are differentially prevented by estrogen and testosterone in beta-amyloid-treated hippocampal neurons. *Neuroscience*, 144, 119–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.012>.

In Vitro Evaluation of Cytotoxic and Antitumor Activities of The Tamoxifen and Doxorubicin Combination on MCF-7 and BT-474 Breast Cancer Cell Lines

- Pawlik, A., Słomińska-Wojewódzka, M., & Herman-Antosiewicz, A. (2016). Sensitization of estrogen receptor-positive breast cancer cell lines to 4-hydroxytamoxifen by isothiocyanates present in cruciferous plants. *European Journal of Nutrition*, 55, 1165–80. <https://doi.org/10.1007/S00394-015-0930-1>.
- Rodrigues-Ferreira, S., Nehlig, A., Moindjie, H., Monchecourt, C., Seiler, C., Marangoni, E., Chateau-Joubert, S., Dujaric, M.E., Servant, N., Asselain, B., Cremoux, P., Triki, M. L., Arnedos, M., Pierga, J. Y., André, F., & Nahmias, C. (2019). Improving breast cancer sensitivity to paclitaxel by increasing aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 116, 23691–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910824116>.
- Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., & Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391, 496–9. <https://doi.org/10.1038/35160>.
- Rouzier, R., Rajan, R., Wagner, P., Hess, K. R., Gold, D. L., Stec, J., Mark Ayers, Jeffrey S. Ross, Zhang, P., Buchholz, T.A., Kuerer, H., Green, M., Arun, B., Hortobagyi, G. N., Symmans, W. F., & Pusztai, L. (2005). Microtubule-associated protein tau: A marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102, 8315–20. https://doi.org/10.1073/PNAS.0408974102/SUPPL_FILE/08974FIG5.JPG.
- Salami, S., & Karami-Tehrani, F. (2003) Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clinical Biochemistry*, 36, 247–53. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00007-9).
- Salgueiro, S. R., Núñez, L. G., del Barco Herrera, D. G., Febles, E. S., Ares, D. M., López, R. M., & Acosta, J. B. (2014). Role of epidermal growth factor and growth hormone-releasing peptide-6 in acceleration of renal tissue repair after kanamycin overdosing in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 8, 382–8.
- Seong, M. K., Lee, J. Y., Byeon, J., Sohn, Y. J., Seol, H., Lee, J. K., Kim, E. K., Kim H. A., & Noh, W. C. (2015). Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150, 141–8. <https://doi.org/10.1007/S10549-015-3305-7>.
- Sheppard, C., Beyel, V., Fracchia, J., & Merlis, S. (1974). Polypharmacy in psychiatry: a multi state comparison of psychotropic drug combinations. *Diseases of the nervous system*, 35, 183–9.
- Thomadaki, H., & Scorilas, A. (2008). Molecular profile of breast versus ovarian cancer cells in response to treatment with the anticancer drugs cisplatin, carboplatin, doxorubicin, etoposide and taxol. *Journal of Biological Chemistry*, 389, 1427–34. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.161>.
- Wang, H., Vo, T., Hajar, A., Li, S., Chen, X., Parissenti, A. M., Brindley, B. N., Wang, Z. (2014). Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-37>.
- Wen, S. H., Su, S. C., Liou, B.H, Lin, C. H., & Lee, K. R. (2018). Sulbactam-enhanced cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Cell International*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0625-9>.
- Wind, N. S., & Holen, I. (2011). Multidrug resistance in breast cancer: from in vitro models to clinical studies. *International Journal of Breast Cancer*, 2011, 1–12. <https://doi.org/10.4061/2011/967419>.
- Woods, K. E, Randolph, J. K, & Gewirtz, D. A. (1994). Antagonism between tamoxifen and doxorubicin in the MCF-7 human breast tumor cell line. *Biochemical Pharmacology*, 47, 1449–52. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90346-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90346-8).
- Young, K. M. (2021). Relating Mechanical and Genetic Data at Single Cell Level across the Genome to Investigate Metastasis. Doctoral Thesis, Emory University, 57.
- Zhang, G. J., Kimijima, I., Onda, M., Kanno, M., Sato, H., Watanabe, T., Tsuchiya, A., Abe, R., & Takenoshita, S. (1999). Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clinical Cancer Research*, 5, 2971–7.
- Zheng, A., Kallio, A., & Härkönen, P. (2007). Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology*, 148, 2764–77. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1269>.

To Cite: Savacı, G. & Doğan, Y. (2023). The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3007-3020.

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Türkiye

Gamze SAVACI^{1*}, Yunus DOĞAN²

Highlights:

- TOC and TA stocks changed in different stand development stages of tree species
- The amount of litter decreased in stages from reproduction to medium wood for Kazdağı fir stands
- Litter and soil have been the two main factors contributing to TOC stocks for all tree species

Keywords:

- Stand development stages
- C accumulation, mineral soil, tree species
- Taşköprü

ABSTRACT:

The influence of stand development stages on soil organic carbon (SOC) and total nitrogen (TN) stocks was examined in black pine (*Pinus nigra* Arnold.), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), and Kazdağı fir (*Abies nordmanniana* subsp. *equi-trojani* (Aschers. & Sint. ex Boiss) Coode et Cullen), differing in the mean tree diameters in which reproduction stages (RS)=<8 cm, sapling or pole stages (SPS)= 8-19.9 cm, large pole stages (LPS)= 20-35.9 cm, and medium wood stages (MWS)=36-51.9 cm in three tree species located in northwestern Turkey. A total of 216 soil samples were collected and analyzed for pH, organic matter, bulk density, maximum water holding capacity, carbon, and nitrogen concentrations, and the SOC and TN stocks were calculated. SOC and TN stocks varied significantly among the four stand development stage classes. The SOC stock at 0-30 cm increased significantly due to an increase in the diameter of black stands (BP_{LPS} and BP_{MWS}). SOC stocks in all stand development stages peaked in the large pole (44.94 Mg/ha) and declined as the sapling or pole (37.71 Mg/ha) was replaced by medium wood stands (30.17 Mg/ha), and a low point (27.94 Mg/ha) was found in the reproduction stages of stand development for Scots pine. The TN stock at a soil depth of 0-30 cm ranged from 1.66 to 6.46 Mg/ha. The highest TN stock was observed in the SP_{SPS} (6.46 Mg/ha) and Fir_{RS} (5.48 Mg/ha), and the lowest was observed in the BP_{LPS} (1.66 Mg/ha) stands. The results illustrate that soil was the main storage of C and N in all different stand development stages of tree species.

¹ Gamze SAVACI ([Orcid ID: 0000-0003-4685-2797](https://orcid.org/0000-0003-4685-2797)), Kastamonu University, Faculty of Forestry, Department of Forest Engineering, Kastamonu, Türkiye

² Yunus DOĞAN ([Orcid ID: 0000-0001-8960-6161](https://orcid.org/0000-0001-8960-6161)), Beyşehir Forest Enterprise Directorate, Üzümlü Forest Sub-district Directorate, Konya, Türkiye

*Corresponding Author: Gamze SAVACI, e-mail: gsavaci@kastamonu.edu.tr

This study was given to Yunus DOĞAN as a Master's thesis.

INTRODUCTION

Globally, carbon reservoirs in soils store between 1500 and 2400 Gt C (1 gigaton = 1 billion tonnes) and approximately three to four times more carbon (C) than plants (450-650 Gt C) (Friedlingstein et al., 2020). The global soil carbon pool to a one-meter depth, estimated at 1500 Gt C, is soil organic carbon (FAO, 2017; Abdullahi et al., 2018). Therefore, soils are the largest carbon reservoirs of the terrestrial carbon cycle (Das 2019; Ozlu et al., 2022). The residence or accumulation time of C in the soil is longer than that in vegetation (Santonja et al. 2022). The soil holds this large carbon stock and prevents the accumulation of carbon dioxide in the atmosphere, which will increase the problem of climate change (Poeplau et al., 2021). Studies have shown that forest soils, a key element of the global C cycle, contribute approximately 70%-73% of the global SOC pool (Liu et al., 2016; Shen et al., 2018; Sun et al., 2021).

Global warming is an environmental problem that threatens the world. To prevent this threat, interest in forest soils, tree species, and management practices, which store most of the CO₂ in the atmosphere, has increased (Leuschner et al., 2013). Therefore, many studies on the effect of climate change on forest ecosystems have attracted increasing interest in Turkey (Sariyildiz et al., 2015; Lee et al., 2016; Güner and Makineci 2017; Savacı and Sariyıldız 2020; Özbay and Tolunay, 2021; Işık ve Göl, 2021) and other countries (Wasak and Drewnik 2015; Bangroo et al., 2017; Angst et al., 2019; Dong et al., 2021; Nath et al., 2021; Nave et., 2022). They play an important role in C storage in forests, which bind most of the CO₂ in the atmosphere to aboveground (such as tree branches, leaves, trunk, and organic matter) and underground (roots, soil) biomass structures and regulate the climate regime.

In Turkey, Black Sea forests represent approximately 24.4% of the total forest cover (5.593.342 ha) and rank first in terms of forest assets compared to other geographical regions (OGM, 2020), with almost 27% dominated by black pine (*Pinus nigra* Arnold. - 237.600 ha), 7% dominated by Scots pine (*Pinus sylvestris* L.- 63.365 ha) and 5% dominated by Kazdağı fir (*Abies nordmanniana* subsp. *equitrojani*) - 43.264 ha) (Kastabil, 2019). Black sea forests dominated by tree species may constitute an important C sink for the future. Understanding organic carbon inputs to soils as SOC in reducing climate change is extremely important. Many scientific studies have revealed that the C accumulated in the soil changes depending on many factors. In these studies, the amount of C in the soils was affected by latitude (Feeney et al., 2021; Wang et al., 2021), litter quantity and decomposition rate (Prietzl and Bachmann, 2012; Lukić et al., 2015), different land use (Li et al., 2015b), tree species (Prietzl and Bachmann, 2012; Sariyildiz et al., 2015), the chemical structure of litter (Sevgi et al., 2011), bulk density (Topa et al., 2021), and climate characteristics (Schrumpf et al., 2011). However, little is known about their carbon storage in different stand development stages of trees.

To enhance our knowledge of the contributions of these tree species to global C and N stocks, this study aimed to understand the impact of different stand development stages on the TN and SOC stocks of these forest ecosystems. We examined litter and soil C contents in four different stages of stand development (reproduction stage (RS), sapling or pole stage (SPS), large pole stage (LPS), and medium wood stage (MWS)) of pure black pine, Kazdağı fir, and Scots pine stands in Kastamonu, Turkey. We hypothesized a positive effect of diameter increase in trees on SOC and TN stocks in Black Sea ecosystems.

MATERIALS AND METHODS

Study Site Description and Sampling

This study was carried out in Taşköprü, which is 44 km away from Kastamonu in Turkey (Figure 1). The silvicultural characteristics of the stands, soil properties, and geology were investigated in pure Kazdağı fir, Scots pine, and black pine-dominated stands around the town of Taşköprü.



Figure 1. Location of the Study Areas on the Map of Türkiye

The main characteristics of the stands, geological, and soil properties are given in Table 1. Study areas were located on the west (W), south (S), northeast (NE), and north (N) aspects, and their altitudes varied from 1186 m to 1620 m. The average slope was between 0% and 35%. According to the stand canopy classification, the study areas are usually in the "very dense forest" (>70%). According to the 1:1.250.0000 scale geological map, the bedrock of the study areas is schists covered with clay (Akbaş et al., 2011). According to the FAO's soil classification system, soils are Eutric Cambisols (FAO and UNESCO, 1978). These soils contain eutric A horizons and have a base saturation of 50% or less at depths between 20 and 50 cm from the surface (Atalay, 2006). The humus layers of the Scots pine, Kazdağı fir, and black pine stands were mull. The mean annual temperature and rainfall were 12.9°C and 643 mm, respectively (DMİ, 2021).

Black pine, Scots pine, and Kazdağı fir are economically and ecologically important tree species in Turkey (Savacı et al., 2021). All trees are distributed over 4.199.623 hectares, 1.410.177 hectares, and 511.703 hectares, which account for 18.31%, 6.15%, and 2.23% of the overall forest coverage, respectively (OGM, 2020). Even-aged black pine, Scots pine, and Kazdağı fir stands were selected in 2020 for the four stages of stand development. These stands have been classified into the following stages of stand development classes according to tree diameters.

Reproduction stage (RS): Saplings are short in length, the number of lateral branches is low, and their length is short. This stage does not have a specific age and height range. Generally, the reproduction period continues until the saplings reach 100-150 cm. The age of density in the stands ended when the average breast height diameter of the individuals reached 8 cm (< 8 cm diameter). At the end of the density period, strong natural branch pruning and stem separation were observed in the stands.

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

Table 1. Geological and Stand Characteristics of the Study Areas at Four Different Stand Development Stages in Black Pine, Scots Pine, and Kazdağı Fir

Site Factors	Stand Development Stages			
	Reproduction Stage (<8 cm diameter)	Sapling & Pole Stage (8 cm -19.9 cm)	Large Pole Stage (20 cm -35.9 cm)	Medium Wood Stage (36 cm-51.9 cm)
Black pine				
Latitude				
Longitude	41°25'25"	41°25'23"	41°24'08"	41°24'02"
Aspect	34°25'34"	34°24'33"	34°18'36"	34°18'35"
Altitude (m)	South	Northeast	West	West
Slope (%)	1228	1186	1207	1205
Bedrock type	10%	10%	30%	15%
Soil	Schist	Schist	Schist	Schist
Total soil samples	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols
Tree number	18	18	18	18
Mean stand diameter (cm)	47	43	50	32
Stand density (%)	<8	19.1	27.3	38.7
	71%-100%	71%-100%	71%-100%	41%-70%
Scots pine				
Latitude	41°20'27"	41°19'28"	41°20'29"	41°19'12"
Longitude	34°13'41"	34°20'59"	34°13'42"	34°18'45"
Aspect	West	South	West	South
Altitude (m)	1270	1620	1253	1619
Slope (%)	20%	10%	15%	30%
Bedrock type	Schist	Schist	Schist	Schist
Soil	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols
Total soil samples	18	18	18	18
Tree number	Planting area	83	65	30
Mean stand diameter(cm)	<8	16.2	25.2	38.5
Stand density (%)	71%-100%	71%-100%	71%-100%	71%-100%
Kazdağı Fir				
Latitude	41°19'03"	41°19'10"	41°19'00"	41°19'19"
Longitude	34°20'03"	34°21'42"	34°21'38"	34°19'54"
Aspect	South	Northeast	North	South
Altitude (m)	1619	1596	1614	1603
Slope (%)	5%	0%	35%	30%
Bedrock type	Schist	Schist	Schist	Schist
Soil	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols	Eutric Cambisols
Total soil samples	18	18	18	18
Tree number	74	35	25	26
Mean stand height (m)	<8	19.9	35.9	39.5
Stand density (%)	71%-100%	71%-100%	71%-100%	71%-100%

Sapling or Pole Stage (SPS): These stages, which start with the natural pruning of branches and strong stem separation in the stands and continue until the increase in diameter as well as the height increase, are considered the sapling-pole stages (varied 8.1 cm to 19.9 cm diameter).

Large Pole Stage (LPS): The breast height diameters of trees are between 20 cm and 35.9 cm.

Medium Wood Stage (MWS): It is between 36 cm and 51.9 cm in the medium wood stage.

The stages of stand development were divided into four parts, as described above. Three subplots (20 m × 20 m = 400 m²) were selected for each stage of stand development. The area measurements and sampling were carried out in September 2020. The canopy closure and diameter of trees for each subplot were determined. Diameter at breast height measurements of all trees at each stage of the stand development class were determined using a diameter taper.

A total of 216 soil samples (36 subplots \times 3 soil depths \times 2 replicates) were taken at different stand development stages, and soil samples were collected at 0-30 cm and randomly selected from black pine, Scots pine, and Kazdağı fir stands. A steel cylinder of 10 cm height and 100 cm³ was used to take soil samples up to 30 cm depth. Soil samples were taken from three different soil depths (0-10 cm, 10-20 cm, and 20-30 cm) and passed through a 2 mm sieve for analysis. To determine the litter content of each tree, litter samples were taken from thirty-six subplots (3 replicates \times 4 stages of stand development classes \times 3 tree species = 36 subplots) on the forest floor. They were oven-dried at 65°C for 48 hours to determine the ratio of fresh weight to dry biomass.

Analysis of soils

The organic matter content in the soil was determined by an ash furnace method (Gülçür, 1974). Soil reaction was measured using a LaMotte-branded pH meter in a 1:2.5 mixture of distilled water and soil (Jackson, 1962). The maximum water holding capacity (MWHC) was calculated from the difference between the wet and dry weights of the cylinder samples (Özyuvacı, 1975). Bulk density was calculated by weight loss after drying the steel cylinder (Blake and Hartge, 1986). The concentrations of C and N were analyzed by a Eurovector (EA 3000) branded CHN-S elementary analyzer at Kastamonu University Central Laboratory. SOC and TN stocks were obtained by multiplying the bulk density, soil volume, and C or N contents (Lee et al., 2009; Sariyildiz et al., 2015). Soil mass was calculated as follows (equation 1):

$$M = BD \times T_i \times 10^4 \quad (1)$$

where M: dry soil mass (Mg/ha), BD: bulk density (Mg m⁻³), T_i: the thickness of the ith soil layer (m), and 10⁴: conversion factor (m² ha⁻¹). The SOC and TN stocks are calculated as follows (equation 2):

$$SOC \text{ or } TN = ([C \ %] \text{ or } [N \ %]) \times M \quad (2)$$

where C: carbon content, N: nitrogen content.

Statistical analysis

A two-way ANOVA test (SPSS program Version 22.0) was used to analyze the impacts of stand development stages and soil depths on SOC and TN stocks. Tukey's honestly significant difference test was used for multiple comparisons ($\alpha=0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Soils

Some soil properties of the black pine, Scots pine, and Kazdağı fir stand development stage classes are shown in Table 2. In general, the sapling or pole stage of black pine stands (BP_{SPS}) had the lowest organic matter content (2.8%), maximum water holding capacity (4.2%), N concentration (0.14%), C concentration (1.65%), and SOC stock (24.86 Mg/ha), while it had the highest bulk density (1.03 g cm⁻³). The reproduction stage of Kazdağı fir stands (Fir_{RS}) had the highest organic matter content (8.2%), C concentration (4.97%), and SOC stock (52.44 Mg/ha) compared to the other stands. The N concentration was similar in all stages of stand development in black pine stands (Table 2).

Organic matter in soils, especially in Scots pine and Kazdağı fir stands, was the highest in the reproduction stages, and the sapling or pole stage decreased by approximately 50% and increased approximately 2.5 times in the large pole stages and decreased approximately 1.8 times in the medium wood stages. The pH range of soils under the 3 tree species varied. Scots pine soils in the reproduction stages were strongly alkaline, and Kazdağı fir stands were neutral. In other stand development stages,

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

they were generally light or moderately acidic soils (Table 2). The bulk density in the soils of the tree species in each stand development quite low values (Table 2). There was a statistically significant difference in the water-holding capacity of the three tree species at different stand development stages. However, no statistically significant difference was observed in the different stand development of black pine (Table 2).

Table 2. Soil Properties of Four Different Stages of Stand Development in Black Pine, Scots Pine, and Kazdağı Fir

Tree species & Stand development stages	Organic matter (%)	pH	Bulk density (g cm ⁻³)	MWHC (%)	N (%)	C (%)	TN stock (Mg/ha)	SOC stock (Mg/ha)
Black pine (BP)								
RS	4 ^c ±1.8	5.6 ^a ±0.8	0.88 ^h ±0.13	9.5 ^d ±7.16	0.21 ^a ±0.05	2.33 ^d ±1.3	2.7 ^e ±0.22	29.86 ^e ±4.41
SPS	2.8 ^a ±1.2	5.9 ^d ±0.4	1.03 ^k ±0.17	4.2 ^a ±1.5	0.14 ^a ±0.05	1.65 ^a ±1.2	2.15 ^b ±0.26	24.86 ^a ±3.75
LPS	6.4 ^g ±1.5	6.7 ^e ±0.3	0.70 ^b ±0.15	16.0 ⁱ ±4.9	0.17 ^a ±0.07	3.75 ^h ±2.1	1.66 ^a ±0.22	36.3 ^g ±4.39
MWS	5.5 ^f ±0.9	6.6 ^f ±0.2	0.84 ^g ±0.18	14.4 ^h ±4.9	0.21 ^a ±0.02	3.22 ^g ±0.9	2.59 ^e ±0.18	39.92 ^h ±2.8
Scots pine (SP)								
RS	3.6 ^b ±0.9	8.4 ⁱ ±0.08	0.9 ⁱ ±0.11	10.3 ^f ±4.7	0.21 ^a ±0.04	2.06 ^b ±0.6	2.93 ⁱ ±0.2	27.94 ^c ±2.85
SPS	6.9 ⁱ ±2.2	5.8 ^c ±0.1	0.65 ^a ±0.11	14.4 ^h ±3.1	0.58 ^{cd} ±0.28	4.03 ^j ±1.5	6.46 ^k ±1.07	37.71 ^g ±3.33
LPS	6.5 ^h ±1.0	5.9 ^d ±0.5	0.84 ^g ±0.1	10.3 ^f ±3.2	0.23 ^a ±0.04	3.79 ⁱ ±1.2	2.86 ^h ±0.15	44.94 ⁱ ±2.78
MWS	3.6 ^b ±0.4	6.2 ^e ±0.07	0.96 ^j ±0.20	10.7 ^g ±2.9	0.17 ^a ±0.03	2.11 ^c ±0.6	2.43 ^d ±0.22	30.17 ^f ±2.12
Kazdağı fir (Fir)								
RS	8.2 ^k ±2.4	7.0 ^h ±0.2	0.75 ^d ±0.11	9.0 ^c ±4.6	0.49 ^{bc} ±0.3	4.97 ^l ±1.9	5.48 ^j ±1.09	52.44 ^k ±5.60
SPS	4.7 ^e ±1.3	5.6 ^a ±0.3	0.73 ^c ±0.17	10.2 ^e ±2.2	0.22 ^a ±0.06	2.68 ^f ±1.2	2.31 ^c ±0.21	27.18 ^b ±2.62
LPS	7.2 ⁱ ±1.9	5.8 ^c ±0.1	0.77 ^e ±0.19	15.1 ⁱ ±4.3	0.23 ^a ±0.07	4.2 ^k ±1.2	2.62 ^f ±0.26	46.73 ⁱ ±4.73
MWS	4.2 ^d ±1.5	5.7 ^b ±0.1	0.80 ^f ±0.13	7.7 ^b ±2.6	0.25 ^a ±0.02	2.42 ^e ±1.0	2.92 ⁱ ±0.16	28.2 ^d ±3.24

Values represent the mean ± standard error (SE). *In cases where the letters in the superscript are different, the data differ significantly ($P < 0.001$).

RS: Reproduction Stage, SPS: Sapling & Pole Stage, LPS: Large Pole Stage, MWS: Medium Wood Stage

The sapling or pole stages of Scots pine stands (SP_{SPS}) had the highest N concentration (0.58%), and TN stock (6.46 Mg/ha) and the lowest bulk density (0.65 g cm⁻³) compared to the other three stand development stage classes (Table 2). The reproduction stages of Scots pine stands (SP_{RS}) had the highest pH (8.4), and the lowest pH values were in the Fir_{SPS} (5.6) and BP_{RS} (5.6) stands. The highest water holding capacity was 15.1% in the Fir_{LPS} stands (Table 2). For black pine stands, the distribution of SOC for different stages of stand development of the trees was in the order of medium wood stage (39.92 Mg/ha) > large pole stage (36.3 Mg/ha) > reproduction stage (26.86 Mg/ha) > saplings or pole stage (24.86 Mg/ha).

TN stocks in the topsoil (0–10 cm) varied among stand development stages ($P < 0.001$) and between the Fir_{RS}, SP_{SPS}, and other stages (Fig. 2). In general, the highest TN stock was observed in SP_{SPS} stands (6.46 Mg/ha), with significantly lower values in thick-diameter trees (SP_{MWS}-Table 2). In black pine, Scots pine, and Kazdağı fir stands at 4 different stand development stages, the TN stock at 0-10 cm was the highest in Fir_{RS} (2.16 Mg/ha), followed by Fir_{MWS} (0.92 Mg/ha), Fir_{LPS} (0.86 Mg/ha), and Fir_{SPS} (0.77 Mg/ha), respectively. TN stocks at the 0-10 cm soil depth were the highest in SP_{SPS} (2.26 Mg/ha), followed by SP_{RS} and SP_{LPS} (0.75 Mg/ha) and SP_{MWS} (0.73 Mg/ha). The highest TN stocks of black pine were observed in BP_{RP} (0.97 Mg/ha), and the lowest were observed in BP_{LPS} (0.68 Mg/ha). TN stocks of black pine at 4 different development stages in soils from 10-20 to 20-30 cm tended to increase and decrease (BP_{LPS} and BP_{RS}) or to decrease and increase (BP_{MWS} and BP_{SPS}). The TN stock increased as the depth increased in all stand development stages of Scots pine. For TN stocks of Kazdağı fir stands, Fir_{LPS} and Fir_{MWS} tended to increase and decrease according to soil depth (Figure 2). The TN stock at 0-30 cm ranged from 1.66 to 6.46 Mg/ha. The highest TN stock was observed in

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

the SP_{SPS} (6.46 Mg/ha) and Fir_{RS} (5.48 Mg/ha) stands, and the lowest was observed in the BP_{LPS} (1.66 Mg/ha) stands (Figure 2).

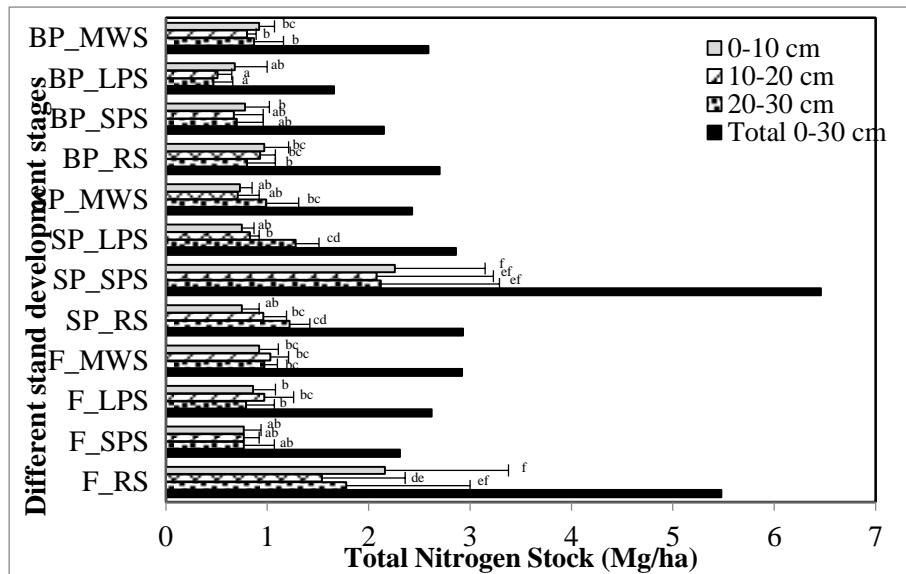


Figure 2. Total Nitrogen (TN) Stock at Different Soil Depths in Four Stages of Stand Development of Black Pine, Scots Pine, and Kazdağı Fir. The Differences between Tree Species at Different Development Stages and Soil Depths are Expressed in Different Lowercase Letters ($P < 0.05$)

The SOC stock at 0-10 cm for the three tree species varied between 7.83 Mg/ha and 23.4 Mg/ha. The highest stock of SOC was in Fir_{RS} (23.4 Mg/ha), followed by Fir_{LPS} (17.22 Mg/ha), Fir_{SPS} (11.36 Mg/ha), and Fir_{MWS} (10.51 Mg/ha). The reproduction stage of the Scots pine and black pine stands at 0-10 cm had the lowest SOC stock, followed by the trees in the order of SP_(MWS) < BP_(SPS) < SP_(SPS) < SP_(LPS) < BP_(LPS) < BP_(MWS) (Figure 3).

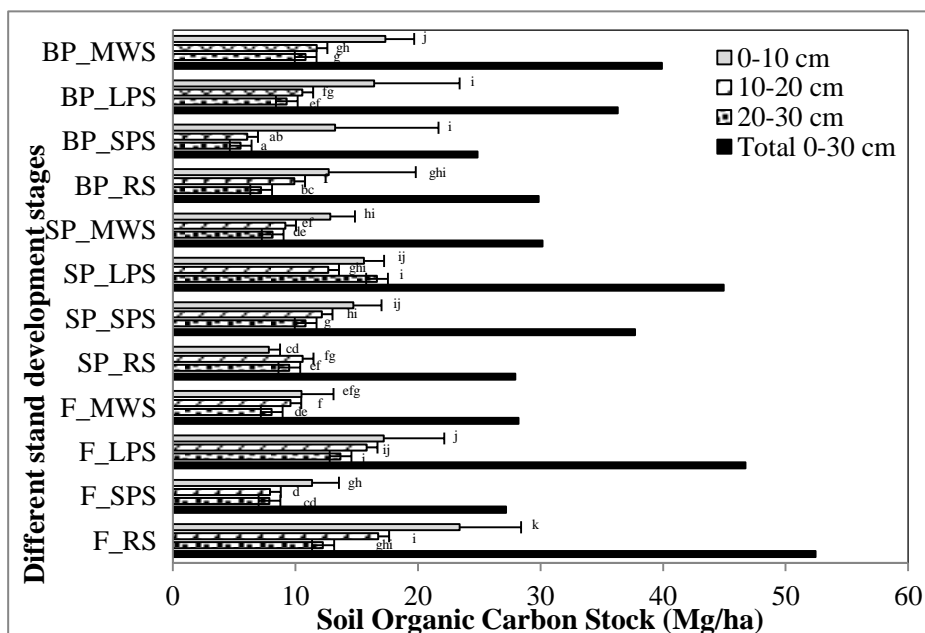


Figure 3. Soil Organic Carbon (SOC) Stock at Different Soil Depths in Four Stages of Stand Development of Black Pine, Scots Pine, and Kazdağı Fir. The Differences between Tree Species at Different Development Stages and Soil Depths are Expressed in Different Lowercase Letters ($P < 0.05$)

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

At 10-20 and 20-30 cm, SOC stocks for Scots pine stands were the highest SP_{LPS} stands according to the stand development stage, and SP_{SPS} , SP_{RS} , and SP_{MWS} were ranked from highest to lowest. At 0-30 cm, SOC stocks for black pine stands were the highest BP_{MWS} stands according to the stand development stage, and BP_{LPS} , BP_{RS} , and BP_{SPS} were ranked from highest to lowest (Figure 3).

The distribution of SOC at different mineral soil depths is shown in Fig. 4. Approximately 83% of the SOC was deposited in topsoil in Kazdağı fir and black pine trees, indicating that a higher SOC stock was sequestered in the upper layer. The percentage of SOC at 0-10 cm was the highest in the sapling or pole stages of the black pine stands (48.27%). The highest SOC percentages at three different soil depths were determined in the stages of stand development of black pine. For the reproduction stage of black pine stands, the percentages of SOC at different soil depths were 38.15%, 29.73%, and 21.61%, respectively, and decreased with increasing soil depth. Similarly, it was observed that the C content decreased as soil depth increased under Kazdağı fir and Scots pine (only SP_{SPS} and SP_{MWS}) at different stand development stages (Figure 4).

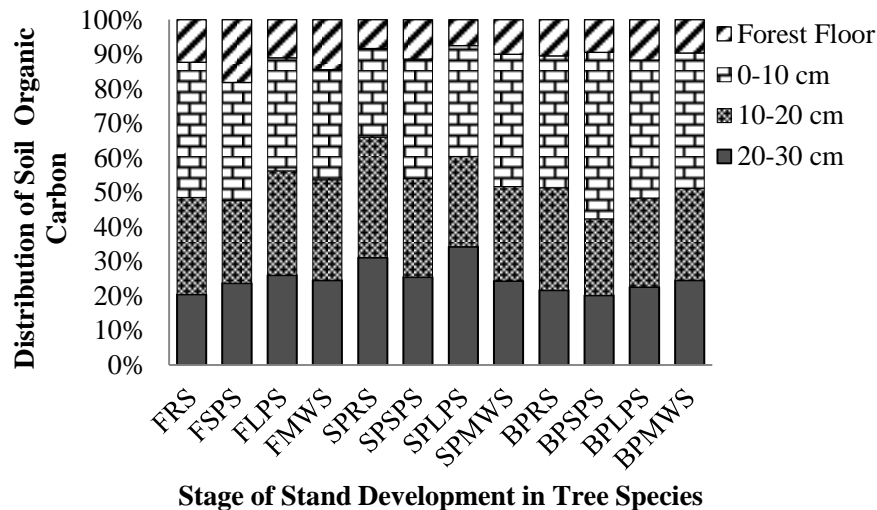


Figure 4. Percentage Contribution of the Carbon Pool in the Forest Floor and Different Mineral Soil Depths in Four Stand Development Stages (RS, SPS, LPS, MWS) in Black Pine (BP), Scots Pine (SP), and Kazdağı Fir (Fir)

Litter on the forest floor

The C concentration of litter samples ranged from 2.56 Mg/ha in the reproduction stage of Scots pine stands to 7.04 Mg/ha in the reproduction stage of Kazdağı fir stands. While the C concentration of the litter samples of Kazdağı fir stands decreased according to the stage of stand development, it showed an increasing and decreasing trend in other stands. The percentage of C within different stages of stand development is shown in Fig. 4. Litter on the forest floor was predominant, representing 18.18 % of SOC stocks in the sapling or pole stage of fir stands. Additionally, the percentage of C in the litter was the highest in the sapling or pole stage of fir (18.18%) and Scots pine stands (11.46 %), and the lowest in the large pole stage of fir (11.0%) and Scots pine (7.51%) stands, whereas the percentage of C was the lowest in the sapling or pole stage of black pine stands (9.44%) and the highest in the large pole stage of black pine stands (Figure 4). For Kazdağı fir, Scots pine, and black pine stands, the percentages of C for different stages of stand development were in the order of $Fir_{SPS} > Fir_{MWS} > Fir_{RS} > BP_{LPS} > SP_{SPS} > Fir_{LPS} > BP_{RS} > SP_{MWS} > BP_{MWS} > BP_{SPS} > SP_{RS} > SP_{LPS}$ (Figure 4).

Effects of different stand development stages on soil organic carbon stocks

The study showed that tree species, different stages of stand development, and soil depth changes can have significant effects on SOC stocks. In our study, SOC stocks at 0-30 cm increased significantly due to the increase in the diameter of black pine trees (except for BP_{SPS}). That is, the highest SOC storage capacity was observed in soils under medium wood stages and large pole stages of stand development (Table 2). These results are in line with the findings of previous studies. That is, SOC stocks in mature stands were higher than those in young stands (Cao et al., 2012; Miao et al., 2014; Li et al., 2015a; Sariyildiz et al., 2015). Similarly, Davis et al. (2003) found that the SOC stock varied with the stage of *Nothofagus* stand development in New Zealand. The high SOC storage capacity of middle-aged and extremely mature trees can be explained by the interactions between factors such as canopy, stand density, soil characteristics (Miao et al., 2014; Li et al., 2015a), and thinning interventions (Jandl et al., 2007). However, our results for Scots pine and fir stands showed no increase in SOC stocks from the reproduction stage to the medium wood stage but a tendency of increase-decrease or decrease-increase. SOC stocks in all stand development stages peaked in large pole stands (44.94 Mg/ha) and declined as sapling or pole stands (37.71 Mg/ha) were replaced with medium wood stands (30.17 Mg/ha) and reached a low point (27.94 Mg/ha) in the reproduction stages of stand development for Scots pine stands (Table 2 and Fig. 3). Growth and yield charts of even-aged trees can often be the effect of a significant reduction in stand productivity in mature trees (Jandl et al., 2007; Chen et al., 2013). Our study reported that litterfall in the medium wood stage for Kazdağı fir and Scots pine stands was lower than that in young-old trees. Decreases in forest floor litter accumulation in medium-aged stands might cause a decrease in total SOC. However, the results of our study have been opposed to the results of Harmon et al. (1990) and Zimmermann et al. (2000), who reported that mature and old-year-old Scots pine stands in the USA transferred a higher portion of C to the soil than in the early stages of stand development and that SOC accumulated in the soil. Savacı and Sariyıldız (2020) found that the SOC stock (0-30 cm) in Kazdağı fir stands ranged from 166.7 Mg/ha (57-year-old fir stands) to 94.1 Mg/ha (90-year-old fir stands) in Turkey. Peichl and Arain (2006) stated in their study that C accumulation in the soil for *Pinus strobus* trees between 2 and 65 years old ranged from 30.1 to 37.2 Mg/ha, which is consistent with Scots pine and black pine stands in our study. Sariyildiz et al. (2015) found that the SOC stock was lower in young fir stands (61.3 Mg/ha) than in mature fir stands (70.9 Mg/ha) at 0-20 cm. On the other hand, Makineci et al. (2015) stated in their study in Turkey that SOC stock increased due to the increase in stand development ages. Mao et al. (2010) stated that SOC stock contributes to total C storage in the ecosystem, first increasing and then decreasing with increasing stand age. Additionally, the upper soil layers had higher SOC than the lower soil layers. In addition, plant biomass gradually increases with stand age, but soil carbon may indicate different trends (Du et al., 2015).

Effects of different stand development stages on total nitrogen stocks

TN stocks in mineral soil varied widely because we obtained several stand development stages of three tree species from the reproduction to medium wood stages. The TN stock at 0-30 cm ranged from 1.66 to 6.46 Mg/ha. The highest TN stock was observed in the reproduction stages of black pine (2.7±0.22 Mg/ha) and Kazdağı fir (5.48±1.09 Mg/ha) stands, whereas the highest TN stock was in the sapling or pole stages of Scots pine (16.46±1.07 Mg/ha) stands (Table 2). However, TN stocks in each tree species reached the lowest and highest values at different stand development stages. Differences in TN stocks between tree species in this study could be attributed to differences in litter quality and

quantity of tree species (Sariyildiz et al., 2015). This might be due to the low organic matter input during the early stage of stand development (Peichl and Arain, 2006). Similarly, Savacı and Sariyıldız (2020) found that TN stocks also fluctuated due to increased stand age. These results showed that the change in TN stocks at stand development stages (stand age) was not always linearly increasing or decreasing. This study has demonstrated that the reproduction stages of fir stand development had higher TN stocks (5.48 ± 1.09 Mg/ha) than the other stages of fir stand development (Table 2). Similarly, Sariyildiz et al. (2015) indicated that a young fir stand had a higher TN stock (6.82 Mg/ha) than a mature fir stand (5.93 Mg/ha) at 0-20 cm. However, Yuan and Chen (2010) observed in their study that there was an increase in TN stock in the soil with stand development for *Populus tremuloides*. They stated that the amount of N increased in the soil with stand development, as well as the biological inputs of N fixation and accumulated atmospheric N. Yan et al. (2018) determined in their study that larch stands (*Larix kaempferi*) under an increase in soil TN stock were observed across the stand age.

Changes in different stand development stages on the forest floor

The amount of litter decreased in stages from reproduction to medium wood for Kazdağı fir stands. The reproduction stage of fir stands had approximately two times more litterfall than the medium wood stages of fir stands, indicating that litterfall decreases with stand age. The carbon content of litter was higher at the reproduction stage (7.40 Mg/ha) than at the sapling-pole stage (6.04 Mg/ha), larger pole stage (5.78 Mg/ha), and medium wood stage (4.77 Mg/ha) (Fig. 4). Similarly, Clinton et al. (2002) and Davis et al. (2003) assumed that the C accumulation of *N. solandri* var. *cliffortioides* litter was higher at the seedling stage than at other stages. This increase may be because the amount of litterfall was high on the forest floor. Çepel et al. (1988) (for *P. brutia*) and Köhler et al. (2008) (for *Q. copeyensis*) stated that litter was the highest in moderate-aged stands. Savacı and Sariyıldız (2020) found that *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* stands (> 100 years old) had higher litter than young fir stands in Turkey. However, in Scots pine stands, the lowest carbon content of litter was observed at the reproduction stage (2.56 Mg/ha) and medium wood stage (3.36 Mg/ha), whereas the highest carbon content of litter was at the sapling or pole stage (4.88 Mg/ha). Çömez et al. (2019) found that the lowest litterfall occurred in young stands, while the highest litterfall occurred in pole Scots pine stands in Turkey. With similar results to our study, Blanco et al. (2006) stated a total litterfall of 3.99 Mg ha^{-1} for the pole stage of Scots pine stands in Spain. Güner and Özkan (2019) reported that the amount of N was between 23.6 and 188.0 kg ha^{-1} in the litter of *Pinus nigra* at different stand development stages. Davis et al. (2003) stated that the carbon inputs from coarse woody debris decaying up to the polar stage may be higher. However, there may be a decrease in the carbon inputs due to less or limited material to decompose under the mature stage. Our study showed that the amount of litter carbon in the black pine stands under the forest floor decreased from the reproductive stage to the sapling & pole stage and then increased and decreased again during the medium mature stages. The C concentration of black pine litter samples ranged from 2.59 Mg/ha in the sapling and pole stage to 4.81 Mg/ha in the larger pole stage. Li et al. (2015a) reported that the amount of dead branches and fallen leaves increased with stand age. Depending on stand development, there is C accumulation in the litter and forest floor. C input to the soil is provided by the ingestion of organic matter by microfauna or the leaching of dissolved organic carbon (Yang et al., 2011). Differences in forest floor litter between stand development stages in this study could be attributed to differences in tree species. The reason for the difference in the amount of litter accumulated under old and young

stands may affect the variability of the litter material (Savacı and Sarıyıldız, 2020). In addition, Binkley (1986) stated that the amount of litterfall in young stands was mainly composed of needle casts, while the old stand was composed of branches and shoots.

CONCLUSION

Our results indicate that the stages of stand development affected the SOC and TN stocks. However, TN and SOC stocks increased at different stages in Scots pine, black pine, and fir stands at different stand development stages. We concluded that these tree species have considerable C stock potential at different stand development stages. The results showed that litter decreased in stages from reproduction to medium wood for Kazdağı fir stands. Litter on the forest floor and soil were the two main contributors to the total C stock for all tree species and showed the greatest variation in C stocks throughout the stand development stages. Litter quantity on the forest floor, SOC, and TN stocks in the soil can be used strategically in new afforestation processes and management practices. SOC and TN stocks have high values for the studied stand, making these results very important for C and N cycles. The information provided by our study may be used to apply C budget management, and different stand development ages should be considered when calculating C stocks and dynamics in forests. More comprehensive studies on the effects on C and N stocks will be needed by studying other tree species with different stand development stages.

ACKNOWLEDGMENTS

This article contains a part of the master's thesis by Yunus DOĞAN (Doğan, 2022). We are thankful to Taşköprü State Forest Enterprise for permitting us to collect the soil data in the forest areas.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article

REFERENCES

- Abdullahi AC, Siwar C, Shaharudin MII, Anizan I, 2018. Carbon sequestration in soils: the opportunities and challenges. *Carbon Capture, Utilization and Sequestration*, 1.
- Akbaş B, Akdeniz N, Aksay A et al. 2011. 1:1.250.000 ölçekli Türkiye Jeoloji Haritası. Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü Yayını, Ankara-Türkiye.
- Angst G, Mueller KE, Eissenstat DM, Trumbore S, Freeman KH, Hobbie SE et al., 2019. Soil organic carbon stability in forests: distinct effects of tree species identity and traits. *Global Change Biology* 25(4): 1529-1546.
- Atalay İ, 2006. Toprak oluşumu, sınıflandırılması ve coğrafyası. Meta Basım Matbaacılık, Çevre ve Orman Bakanlığı, İzmir.
- Bangroo SA, Najar GR, Rasool A, 2017. Effect of altitude and aspect on soil organic carbon and nitrogen stocks in the Himalayan Mawer Forest Range. *Catena* 158: 63-68.
- Binkley D, 1986. Forest nutrition management. John Wiley & Sons.
- Blake GR, Hartge KH, 1986. Bulk density 1. *Methods of soil analysis: part 1-physical and mineralogical methods, (methodsofsoilan1)*, 363-375.
- Blanco JA, Imbert JB, Castillo FJ, 2006. Influence of site characteristics and thinning intensity on litterfall production in two *Pinus sylvestris* L. forests in the western Pyrenees. *For. Ecol. Manag.* 237(1-3): 342-352.

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

- Cao J, Wang X, Tian Y, Wen Z, Zha T, 2012. Pattern of carbon allocation across three different stages of stand development of a Chinese pine (*Pinus tabulaeformis*) forest. *Ecol Res* 27(5): 883-892.
- Çepel N, Dündar M, Özdemir T, Neyişçi T, 1988. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) ekosistemlerinde iğne yaprak dökümü ve bu yolla toprağa verilen besin maddeleri miktarları. Ormançılık Araştırma Enstitüsü Yayınları.
- Chen GS, Yang ZJ, Gao R, Xie JS, Guo JF, Huang ZQ, Yang YS, 2013. Carbon storage in a chronosequence of Chinese fir plantations in southern China. *For. Ecol. Manag.* 300: 68-76.
- Clinton PW, Allen RB, Davis MR, 2002. Nitrogen storage and availability during stand development in a New Zealand *Nothofagus* forest. *Can J For Res* 32(2): 344-352.
- Çömez A, Tolunay D, Güner ŞT, 2019. Litterfall and the effects of thinning and seed cutting on carbon input into the soil in Scots pine stands in Turkey. *Eur J For Res* 138(1): 1-14.
- Das SK, 2019. Soil carbon sequestration strategies under organic production system: a policy decision. *Agrica* 8(1):1-6
- Davis MR, Allen RB, Clinton PW, 2003. Carbon storage along a stand development sequence in a New Zealand *Nothofagus* forest. *For. Ecol. Manag.* 177(1-3): 313-321.
- DMİ 2021. Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü, Kastamonu Meteoroloji İl Müdürlüğü, Taşköprü Meteoroloji İstasyonu Verileri, 2010-2021, Kastamonu.
- Doğan Y, 2022. The effect of stand development ages and tree species on soil organic carbon and total nitrogen stocks: The case of Taşköprü, Kastamonu. Kastamonu University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Forest Engineering, Master Thesis (Printed).
- Dong J, Zhou K, Jiang P, Wu J, Fu W, 2021. Revealing horizontal and vertical variation of soil organic carbon, soil total nitrogen and C: N ratio in subtropical forests of southeastern China. *Journal of Environmental Management* 289: 112483.
- Du H, Zeng F, Peng W, Wang K, Zhang H, Liu L, Song T, 2015. Carbon storage in a *Eucalyptus* plantation chronosequence in Southern China. *Forests* 6: 1763-1778.
- FAO & UNESCO, 1978. Soil Map of the World 1:5.000.000, 10 vols. Paris: UNESCO.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2017. Soil organic carbon unlocking the potential of mitigating and adapting to a changing climate. Global symposium on soil organic carbon (GSOC17) 21- 23 March 2017 FAO HQ, Rome, Italy.
- Feeney C., Cosby J, Robinson D, Thomas A, Emmett B, 2021. A comparison of soil organic carbon concentration maps of Great Britain. In EGU General Assembly Conference Abstracts (pp. EGU21-4700).
- Friedlingstein P, O'sullivan M, Jones MW, Andrew RM, Hauck J, Olsen A et al., 2020. Global carbon budget 2020. *Earth System Science Data* 12(4): 3269-3340.
- Gülçür F, 1974. Toprağın fiziksel ve kimyasal analiz metodları. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayın No: 201, İstanbul.
- Güner D, Özkan K, 2019. Determining the nutrient stocks in black pine plantation areas in Turkey. *Turkish Journal of Forest Research*, 6(2): 192-207.
- Güner Ş, Makineci E, 2017. Türkmen Dağı (Eskişehir, Kütahya) sarıçam ormanlarında toprak ve ölü örtüde biriken yıllık organik karbon miktarının belirlenmesi. *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University* 67 (2): 109-115.
- Harmon ME, Ferrell WK, Franklin JF, 1990. Effects on carbon storage of conversion of old-growth forests to young forests. *Science* 247(4943): 699-702.
- İşık E, Göl C, 2021. Yarı kurak bölgelerde doğal ve plantasyon karaçam ormanlarının bazı toprak özellikleri ile organik karbon ve toplam azot depolama kapasitelerinin değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Forestry* 22(3): 202-210.
- Jackson ML, 1962. Soil chemical analysis. (Constable and Company, Ltd: London).
- Jandl R, Lindner M, Vesterdal L, Bauwens B, Baritz R, Hagedorn F et al., 2007. How strongly can forest management influence soil carbon sequestration?. *Geoderma* 137(3-4): 253-268.

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

- Kastabil, 2021. Ağaç Türlerine Göre Orman Alanı Dağılımı (2021). Kastamonu Valiliği Veri tabanı. <https://www.kastabil.gov.tr/veritablolari/kastamonu/tarim-ve-orman/agac-turlerine-gore-orman-alani-dagilim>
- Köhler L, Hölscher D, Leuschner C, 2008. High litterfall in old-growth and secondary upper montane forest of Costa Rica. *Plant Ecol* 199(2):163-173.
- Lee J, Hopmans JW, Rolston DE, Baer SG, Six J, 2009. Determining soil carbon stock changes: simple bulk density corrections fail. *Agric Ecosyst Environ* 134(3-4): 251-256.
- Lee J, Tolunay D, Makineci E, Çömez A, Son YM, Kim R, Son Y, 2016. Estimating the age-dependent changes in carbon stocks of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stands in Turkey. *Annals of forest science* 73(2): 523-531.
- Leuschner C, Wulf M, Bäuchler P, Hertel D, 2013. Soil C and nutrient stores under Scots pine afforestations compared to ancient beech forests in the German Pleistocene: The role of tree species and forest history. *For. Ecol. Manag.* 310: 405-415.
- Li S, Su J, Liu W, Lang X et al., 2015a. Changes in biomass carbon and soil organic carbon stocks following the conversion from a secondary coniferous forest to a pine plantation. *PLOS one*, 10(9): e0135946.
- Li Y, Xia Y, Lei Y, Deng Y et al., 2015b. Estimating changes in soil organic carbon storage due to land use changes using a modified calculation method. *iForest* 8(1): 45.
- Liu Y, Li S, Sun X, Yu X, 2016. Variations of forest soil organic carbon and its influencing factors in east China. *Annals of forest science* 73(2): 501-511.
- Lukić S, Pantić D, Simić SB, Borota D, Tubić B, Djukić M, Djunisijević-Bojović D, 2015. Effects of black locust and black pine on extremely degraded sites 60 years after afforestation-a case study of the Grdelica Gorge (southeastern Serbia). *iForest* 9(2): 235.
- Makineci E, Ozdemir E, Caliskan S, et al., 2015. Ecosystem carbon pools of coppice-originated oak forests at different development stages. *Eur J For Res* 134(2): 319-333.
- Mao R, Zeng DH, Hu YL et al., 2010. Soil organic carbon and nitrogen stocks in an age-sequence of poplar stands planted on marginal agricultural land in Northeast China. *Plant Soil* 332(1): 277-287.
- Miao J, Zhou CY, Li SJ, Yan JH, 2014. Accumulation of soil organic carbon and total nitrogen in *Pinus yunnanensis* forests at different age stages. *The J Appl Ecol* 25(3): 625-631.
- Nath PC, Nath AJ, Reang D, Lal R, Das AK, 2021. Tree diversity, soil organic carbon lability and ecosystem carbon storage under a fallow age chronosequence in North East India. *Environmental and Sustainability Indicators* 10:100122.
- Nave LE, DeLyser K, Domke GM, Holub SM, Janowiak MK, Kittler B et al., 2022. Disturbance and management effects on forest soil organic carbon stocks in the Pacific Northwest. *Ecological Applications* 32(6): e2611.
- OGM, 2020. Türkiye orman varlığı. Orman Genel Müdürlüğü Ofset Yayınevi, s.56, Ankara, Türkiye.
- Ozlu E, Arriaga FJ, Bilen S, Gozukara G, Babur E, 2022. Carbon footprint management by agricultural practices. *Biology*, 11(10): 1453.
- Özbay S, Tolunay D, 2021. Karışık baltalık ormanların sahil çamına dönüştürülmesinin toprak ve ölü örtüdeki organik karbon ve besin maddesi stoklarına etkisi. *Ormancılık Araştırma Dergisi* 8(1):12-26.
- Özyuvacı N, 1975. Topraklarda erozyon eğiliminin tahmini açısından yapılan bazı değerlendirmeler. TÜBİTAK V. Bilim Kongresi, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu Tebliği Ormancılık Seksiyonu, 29 Eylül-2 Ekim, 123-134. İzmir.
- Peichl M, Arain MA, 2006. Above-and belowground ecosystem biomass and carbon pools in an age-sequence of temperate pine plantation forests. *Agric For Meteorol* 140(1-4): 51-63.
- Poeplau C, Don A, Schneider F, 2021. Roots are key to increasing the mean residence time of organic carbon entering temperate agricultural soils. *Global Change Biology* 27(19):4921-4934.

The Effects of Stand Development Stages on Soil Carbon and Nitrogen Stocks in Black Pine, Scots Pine and Fir Stands in Turkey

- Prietzl J, Bachmann S, 2012. Changes in soil organic C and N stocks after forest transformation from Norway spruce and Scots pine into Douglas fir, Douglas fir/spruce, or European beech stands at different sites in Southern Germany. *For. Ecol. Manag.* 269: 134-148.
- Santonja M, Pereira S, Gauquelin T, Quer E, Simioni G, Limousin JM et al., 2022. Experimental precipitation reduction slows down litter decomposition but exhibits weak to no effect on soil organic carbon and nitrogen stocks in three mediterranean forests of southern france. *Forests* 13(9):1485.
- Sariyıldız T, Savacı G, Kravkaz IS, 2015. Effects of tree species, stand age and land-use change on soil carbon and nitrogen stock rates in northwestern Turkey. *iForest* 9(1): 165.
- Savacı G, Sariyıldız T, 2020. Determination of changes in soil organic carbon and total nitrogen stocks under different stand age of kazdağı fir (*Abies nordmanniana* subsp. *equi-trojani* (Steven) Spach). *Bartın Orman Fakültesi Dergisi* 22(2): 532-543.
- Savacı G, Sariyıldız T, Çağlar S, Kara F, Topal E, 2021. The effects of windthrow damage on soil properties in Scots pine, black pine and Kazdağı fir stands in the northwest Turkey. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 21(3): 229-243.
- Schrumpf M, Schulze ED, Kaiser K, Schumacher J, 2011. How accurately can soil organic carbon stocks and stock changes be quantified by soil inventories?. *Biogeosciences* 8(5): 1193-1212.
- Sevgi O, Makineci E, Karaoz O, 2011. The forest floor and mineral soil carbon pools of six different forest tree species. *Ekoloji* 20(81): 8-14.
- Shen Y, Cheng R, Xiao W, Yang S, Guo Y, Wang N et al., 2018. Labile organic carbon pools and enzyme activities of *Pinus massoniana* plantation soil as affected by understory vegetation removal and thinning. *Scientific reports* 8(1): 1-9.
- Sun X, Wang G, Ma Q, Liao J, Wang D, Guan Q, Jones DL, 2021. Organic mulching promotes soil organic carbon accumulation to deep soil layer in an urban plantation forest. *Forest Ecosystems* 8(1): 1-11.
- Topa D, Cara IG, Jitoreanu G, 2021. Long term impact of different tillage systems on carbon pools and stocks, soil bulk density, aggregation and nutrients: A field meta-analysis. *Catena*, 199: 105102.
- Wang G, Singh M, Wang J, Xiao L, Guan D, 2021. Effects of marine pollution, climate, and tidal range on biomass and sediment organic carbon in Chinese mangrove forests. *Catena* 202: 105270.
- Wasak K, Drewnik M, 2015. Land use effects on soil organic carbon sequestration in calcareous Leptosols in former pastureland—a case study from the Tatra Mountains (Poland). *Solid Earth* 6(4): 1103-1115.
- Yan T, Lü XT, Zhu JJ et al., 2018. Changes in nitrogen and phosphorus cycling suggest a transition to phosphorus limitation with the stand development of larch plantations. *Plant Soil* 422(1): 385-396.
- Yang Y, Luo Y, Finzi AC, 2011. Carbon and nitrogen dynamics during forest stand development: a global synthesis. *New Phytologist*, 190(4): 977-989.
- Yuan ZY, Chen HYH, 2010. Changes in nitrogen resorption of trembling aspen (*Populus tremuloides*) with stand development. *Plant Soil* 327(1): 121-129.
- Zimmermann R, Schulze ED, Wirth C et al., 2000. Canopy transpiration in a chronosequence of Central Siberian pine forests. *Glob. Change Biol.* 6(1): 25-37.

Atf İçin: Canan, S. (2023). İşletmelerde Hayvan Refahının Ekonomik Yönlerinin Değerlendirilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 3021-3029.

To Cite: Canan, S. (2023). Assessment of Economic Aspects of Animal Welfare in Farm. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3021-3029.

İşletmelerde Hayvan Refahının Ekonomik Yönlerinin Değerlendirilmesi

Selime CANAN^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Hayvan refahını sağlama amacı ile ekonomik esaslara dayalı çalışma amaçları bazen çelişkilere yol açabilir.
- Hayvan refahı ile ekonomik hedefler arasında doğru dengeyi kurmak, sürdürülebilir tarımsal faaliyetler için esastır.
- İşletmeler hayvan refahı ile sağlıklı gıda talebini karşılamanın finansal faydalarından yararlanabilir

Anahtar Kelimeler:

- Hayvan refahı
- Tarım
- İşletme ekonomisi

Highlights:

- The aim of ensuring animal welfare and working objectives based on economic principles can sometimes lead to contradictions.
- Striking the right balance between animal welfare and economic objectives is essential for sustainable agricultural.
- Farms can benefit from the financial benefits of meeting demand for healthy food with animal welfare

Keywords:

- Animal welfare
- Agriculture
- Farm economics

ÖZET:

Bu çalışmada, işletmelerde hayvan refahını dikkate alan uygulamaların ekonomik sonuçlarını değerlendirmek amaçlanmıştır. Çalışmanın verileri daha önce yapılmış bilimsel çalışmalardan, ulusal ve uluslararası kuruluşların raporlarından elde edilmiştir. Çalışmada hayvan refahı kavramına kısaca değinildikten sonra hayvan refahını dikkate alan çiftlik uygulamaları hakkında bilgi verilmiş ve bu uygulamaların işletmedeki ekonomik sonuçları üzerine tartışılmıştır. Hayvan refahını dikkate alan uygulamalar ilk yatırımlar, işletme maliyetleri, etkinlik ve verimlilik, pazar talebi, yasal uyumluluk, risk yönetimi ve uzun vadeli sürdürülebilirlik dâhil olmak üzere birçok açıdan işletmelerin ekonomisi etkilemektedir. İşletmeler gelişmiş hayvan refahına yatırım yaparak potansiyel olarak verimliliğini artırabilir, hastalıkla ilgili maliyetleri azaltabilir, ürün kalitesini iyileştirebilir, etik açıdan bilinçli tüketicileri çekebilir, yasal ve düzenleyici standartlara uyum sağlayabilir. Bunlar da işletmelerin karlılığını arttırmasına, pazarlamada rekabet gücüne ve uzun vadede sürdürülebilir olmasına neden olur.

İşletmelerde hayvan refahını dikkate alan uygulamalarının ekonomik açıdan değerlendirilmesi, çiftçilerin hayvan refahı uygulamalarına ilişkin bilinçli kararlar alırken işletme yönetimlerinin finansal uygulanabilirliğini sağlamaları için çok önemlidir. İşletmelerde hayvan refahının ekonomik yönlerini anlamak, çiftçilerin hayvan refahı ile finansal hususlar arasında bir denge kurmasına yardımcı olabilir ve sonuçta hem hayvanlara etik muameleyi hem de iş başarısını arttırmayı teşvik eder.

Assessment of Economic Aspects of Animal Welfare in Farm

ABSTRACT:

The economic considerations associated with implementing animal welfare measures on farm was aimed in this study. The data of the study were obtained from previous scientific studies and reports of national and international organizations. In the study, after briefly mentioning the concept of animal welfare, information about farm practices that take into account animal welfare was given and the economic consequences of these practices on the farm were discussed. Several key factors influence the economic impact of animal welfare, including initial investments, operating costs, productivity and efficiency, market demand, legal compliance, risk management, and long-term sustainability. By investing in improved animal welfare, farms can potentially enhance production efficiency, reduce disease-related costs, improve product quality, attract ethically conscious consumers, and comply with legal and regulatory standards. These benefits can lead to increased profitability, market competitiveness, and long-term sustainability.

The assessment of these aspects is crucial for farmers to make informed decisions regarding animal welfare practices while ensuring the financial viability of their operations. However, it is important to evaluate the specific context, species, and farming system when assessing the economic implications of animal welfare practices. Understanding the economic aspects of animal welfare in farm settings can help farmers strike a balance between animal well-being and financial considerations, ultimately promoting both the ethical treatment of animals and business success.

¹ Selime CANAN ([Orcid ID: 0000-0002-8041-3272](https://orcid.org/0000-0002-8041-3272)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü, Samsun, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selime CANAN, e-mail: selime.canan@omu.edu.tr

Makale 6-9 Eylül 2023 tarihlerinde Çanakkale’de düzenlenen “15. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi’nde” sözlü olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Tarım işletmeleri faaliyet gösterdikleri topluluklarda önemli bir rol oynamaktadır. İşletmeler gıda, lif veya diğer tarımsal amaçlar için yetiştirilen hayvanların refahını ve insanca muamele edilmesini sağlamak için etik bir sorumluluğa sahiptir. Ayrıca, resmi kurum/kuruluşlar veya sertifikasyon programları tarafından uygulanan hayvan refahı düzenlemelerine ve standartlarına uyması gerekmektedir. Hayvan refahı standartlarını karşılayamayan işletmeler, yasal ve düzenleyici sonuçlarla karşılaşabilir. Dahası işletmeler, belirli pazarları işletmek veya bunlara erişmek için gereken sertifikaları veya lisansları kaybetme riskiyle karşı karşıya kalabilir ve bu da finansal veya operasyonel kesintilere yol açabilir.

İşletmelerin hayvan refahına bağlılık göstermesi yalnızca toplumsal beklentileri karşılamakla kalmaz, aynı zamanda halkın, tüketicilerin ve diğer paydaşların gözünde olumlu bir imajın korunmasına da yardımcı olur. Hayvan refahı uygulamaları yetersiz olan işletmeler, hayvan refahı kuruluşları, medya ve ilgili vatandaşlar tarafından kamu incelemesine tabi tutulabilir. Teşhirler, sosyal medya kampanyaları veya protestolar olumsuz tanıtıma, itibar zedelenmesine ve işletmenin ürünlerine yönelik olası bojkotlara yol açabilir. Son zamanlarda tüketiciler de çiftlik hayvanlarının refahı konusunda giderek daha fazla endişe duymakta ve hayvan refahına öncelik veren işletmelerden gelen ürünleri seçme eğilimindedir.

Hayvan refahı, etik sorumluluklarla uyumlu olduğu, tüketici taleplerini karşıladığı ve mevzuata uygunluğu sağladığı için çiftlikler için önemlidir. Ancak işletmeler her ne kadar sorumluluğunu aldığı çiftlik hayvanlarının refahını önemseseye de ekonomik prensip üzerine çalışmaktadır. Hayvan refahını amaç edinen işletmeler ekonomik esaslara dayalı çalışma prensipleri ile bazen çelişebilir bazen de aynı amaca hizmet edebilirler. Bu nedenle bu araştırmanın amacı hayvan refahı standartlarını karşılamak için çabalayan işletmeleri ne gibi ekonomik sonuçların beklediğini ortaya koymaktır. Bu amaç doğrultusunda çalışmanın diğer bölümlerinde hayvan refahı kavramına kısaca değinildikten sonra hayvan refahını dikkate alan çiftlik uygulamaları hakkında bilgi verilecek ve bu uygulamaların işletmedeki ekonomik sonuçları üzerine tartışılacaktır.

Hayvan Refahına Kısa Bir Giriş

Hayvan refahı, hayvanların insan bakımı altında deneyimlediği refah ve yaşam kalitesini ifade etmekte ve hayvanlara fiziksel ve psikolojik ihtiyaçlarını göz önünde bulundurarak saygı, merhamet ve anlayışla davranmanın etik ve ahlaki sorumluluğunu vurgulamaktadır (Duncan, 2002). Hayvan refahı kavramı, bir hayvanın esaret altında veya insan etkisi altında yaşarken genel sağlık durumuna ve halinden memnun olmasına katkıda bulunan çok çeşitli faktörleri kapsamaktadır. Hayvan refahı fiziksel sağlık ve rahatlık, acı ve ızdıraptan uzak olma, doğal davranışları ifade edebilme, korku ve stresten uzak olma, sosyal refah, hareket özgürlüğü, taşıma ve yönetim uygulamaları ve etik hususlar gibi temel bileşenlerden oluşmaktadır (Grandin, 2000; Bartussek, 2001; Seo et al., 2007; OIE, 2008; WQ, 2009; EFSA 2012; EFSA 2012b). Hayvanların yeterli beslenmeye, temiz suya, uygun barınağa ve aşırı hava koşullarından korunmaya erişiminin sağlanması fiziksel sağlık ve rahatlık bileşeni olarak ifade edilebilir. Uygun veteriner bakımı sağlamak ve hastalıklara maruz kalmayı en aza indirmek, fiziksel refahı geliştirmenin temel yönleridir. Gereksiz acı, sıkıntı ve ızdırabın önlenmesi, hayvan refahının sürdürülmesi için çok önemlidir. Bunun yolu, hayvanlara fiziksel zarar veya psikolojik sıkıntı veren uygulamalardan kaçınmayı içerir. Hayvanların doğuştan gelen davranışlarını ifade etmelerine izin vermek, onların zihinsel ve duygusal esenlikleri için çok önemlidir. Doğal ortamlarını taklit eden zenginleştirme faaliyetleri ve uygun yaşam ortamları, zihinsel uyarımı desteklemekte ve stresi azaltmaktadır. Hayvanlara korku, endişe ve stresi en aza indiren bir ortam sağlamak, hayvanların

refahı için şarttır. Korkutucu veya caydırıcı uyarılara maruz kalmalarını azaltmak duygusal refahlarını sağlamak açısından çok önemlidir. Çoğu hayvan gibi özellikle evcilleştirilmiş çiftlik hayvanları sosyal varlıklardır ve türdeşleriyle veya uygun arkadaşlıklarla etkileşimler onların refahı için hayati öneme sahiptir. Tecrit veya sosyal yoksunluk, psikolojik sağlıkları için zararlı olabilmektedir. Hayvanlara hareket etmeleri ve egzersiz yapmaları için yeterli alan sağlamak, onların fiziksel sağlıkları ve zihinsel uyarıları için önemlidir. Normal hareketi kısıtlayan kapatma, fiziksel sağlık sorunlarına ve davranış sorunlarına yol açabilmektedir. Hayvanların stresi en aza indirecek ve gereksiz acı çekmeyi önleyecek şekilde taşınması ve yönetilmesini sağlamak, hayvan refahını geliştirmenin ayrılmaz bir parçasıdır. Hayvan refahı, hayvanların duyguları, acıyı ve ızdırabı deneyimleyebilen duyarlı varlıklar olduğunun kabul edilmesini içermektedir. Hayvanlara saygılı davranmak ve gereksiz yere zarar vermekten kaçınmak etik hususlarla uyumludur. Hayvan refahının kapsamına bakıldığında teknik, ekonomik ve etik yönleri ile öne çıkan önemli bir kavram olduğu aşikardır. Teknik açıdan ele alındığında; hayvan refahı gerekli koşulların sağlanması konusunu kapsamaktadır. Etik açıdan ele alındığında; hayvanların fiziksel, ruhsal ve sosyal açıdan karşılanması gereken ihtiyaçları olan canlılar olduğu konusunu kapsamaktadır. Ekonomik açıdan ele alındığında ise; hayvan refahı dikkate alındığında işletmenin mevcut sistemlerinin değişim maliyetleri, işletme kuruluş maliyetleri, ürün maliyetleri, verimlilik, üretici gelirleri ve tüketici beklentileri ve harcamaları gibi pek çok konuyu içine almaktadır (Savaş vd., 2009). Dolayısıyla hayvan refahı gıda yoluyla insan refahını etkilemektedir. Hayvan refahı standartlarının iyileştirilmesi, insan sağlığını olumlu anlamda etkileyecek ve refahını artıracaktır.

Hayvan Refahının Tarihi Gelişimi

Eski Yunanistan ve eski Hindistan gibi bazı eski uygarlıkların kanunlarında ve dini öğretilerinde hayvan refahı ile ilgili endişelerin ilk yansımaları görülmektedir. Bu toplumlar, hayvanların değerini kabul etmiş ve onlara karşı şefkatli muameleyi savunmuştur. Hayvan refahı girişimlerinin tarihi gelişimi eski uygarlıklara kadar uzanmakla birlikte modern hayvan refahı hareketi 19. ve 20. yüzyıllarda şekillenmeye başlamıştır. Bu hareket, çeşitli sosyal, etik ve bilimsel etkiler yoluyla gelişmiş ve hayvanların şefkat ve insancıl muameleyi hak eden duyarlı varlıklar olarak tanınmasına yol açmıştır. İngiltere'de Hayvanlara Zulmü Önleme Kraliyet Derneğinin (RSPCA) kurulması, organize hayvan refahı çabalarının başlangıcı olmuştur. Dernek, atlara ve diğer çalışan hayvanlara yönelik zulmü önlemeyi amaçlayarak dünyanın ilk hayvan refahı yasası olan Sığırlara Muamele Yasasının 1822'de çıkarılmasına yol açmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde araştırma hayvanlarına yapılan muamele konusunda kamuoyunun endişelerini gidermek için ABD Kongresi, 1966'da Hayvan Refahı Yasasını kabul etmiştir. Bu yasa, araştırma, sergileme ve nakliye sırasında hayvanlara yönelik muameleyi düzenlemekte ve Hayvan Refahı Bilgi Merkezini kurulmasına vesile olmuştur. 20. yüzyıl boyunca, hayvan deneylerine ilişkin artan farkındalık, laboratuvar hayvanlarının refahını iyileştirmek için yönetmeliklerin ve yönergelerin oluşturulmasına yol açmıştır. Çeşitli ülkeler, acıyı azaltmak ve sorumlu bilimsel uygulamaları teşvik etmek amacıyla araştırmalarda kullanılan hayvanları korumak için yasalar geliştirmiştir. 20. yüzyılın ikinci yarısında, çiftlik hayvanlarına yönelik muameleyle ilgili endişeler hız kazanmıştır. Bilimsel araştırmalar ve halkı bilinçlendirme kampanyaları, yoğun tarım uygulamalarının hayvan refahı üzerindeki etkisine yoğunlaşmıştır. Çiftlik hayvanı refahı girişimleri, barınma koşullarının, yönetim uygulamalarının ve hayvanların taşınmasına odaklanmıştır. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) gibi uluslararası kuruluşlar, hayvan refahı için uluslararası standartların belirlenmesine dahil olmuştur. OIE, çeşitli hayvan türlerinin refahı için kılavuzlar geliştirmiş ve hayvan refahını veterinerlik bakımının ayrılmaz

bir parçası olarak desteklemiştir. Günümüzde hayvan refahı, çiftçilik, araştırma, eğlence ve evcil hayvan bakımı dahil olmak üzere çeşitli sektörlerde hayvanların yaşamlarını iyileştirmeye yönelik devam eden çabalarla birlikte önemli bir küresel endişe olmaya devam etmektedir.

Avrupa Birliği'nde Hayvan Refahı

Avrupa Birliğinde (AB) çiftçilik, araştırma, ulaşım ve diğer sektörlerde hayvan refahını ele alan çeşitli direktifler ve yönetmelikler uygulamıştır. Ayrıca hayvan refahını teşvik etmek ve çeşitli bağlamlarda hayvanlara yönelik muamele için standartlar belirlemek için uluslararası çabalara aktif olarak katılmıştır. AB'de özellikle çiftlik hayvanlarının korunması ile ilgili çok sayıda yasal düzenlemeler bulunmaktadır. İlk yasal dayanak 1987 yılında Avrupa Tek Senedi ile hayvanları duyarlı varlıklar olarak tanıyan ve tarım bağlamında refah gereksinimlerine tam olarak dikkat edilmesi gerektiğini kabul eden hayvan refahı ilkesini AB politikasına dâhil etmiştir. 1992'de kabul edilen Maastricht Antlaşması, hayvan refahını resmi olarak AB ve üye devletler arasında paylaşılan bir yetki alanı olarak kabul etmiş ve AB'ye hayvan refahı konularında yasama yapması için yasal bir dayanak oluşturmuştur. 1977'de onaylanan Amsterdam Antlaşması, AB'nin ve üye devletlerin duyarlı varlıklar olarak hayvanların refah gereksinimlerine tam olarak saygı göstereceklerini belirterek AB'nin hayvan refahına olan bağlılığını güçlendirmiştir. Çiftçilik Amaçlı Beslenen Hayvanların Korunmasına İlişkin Avrupa Sözleşmesi (1998), AB'den ayrı ancak AB politikası üzerinde önemli etkiye sahip bir kuruluş olan Avrupa Konseyi'nin himayesinde kabul edilmiştir. Sözleşme, çiftçilik amacıyla tutulan hayvanların korunması için asgari standartları belirlemiştir. AB, kilit eylem alanlarını belirleyen ve AB'de hayvan refahı standartlarını iyileştirmek için bir plan ortaya koyan ilk hayvan refahı stratejisini AB Hayvan Refahı Stratejisi (1999-2004) ile kabul etmiştir. Dayanağı bu strateji olan ancak güncellenmiş AB Hayvanların Korunması ve Refahı Stratejisi (2006-2010), farklı sektörlerdeki hayvan refahı konularını ele almayı ve üye devletlerde hayvan refahı mevzuatının uygulanması için yönergeler oluşturmayı amaçlamıştır. 2009'da yürürlüğe giren Lizbon Antlaşması, hayvan refahını kendi başına tam bir politika alanı olarak açıkça tanımış ve AB'nin hayvan refahı konusundaki eyleminin yasal temelini daha da güçlendirmiştir. Yeniden geliştirilen AB Hayvanların Korunması ve Refahı Stratejisi (2012-2015) hayvan refahı mevzuatının uygulanmasının iyileştirilmesi, tüketici bilgilerinin geliştirilmesi ve uluslararası iş birliğinin geliştirilmesi gibi alanlara odaklanarak AB'de hayvan refahını teşvik etmek için bir çerçeve oluşturmuştur. 2016-2020 stratejisinde ise, hayvan refahı göstergelerinin geliştirilmesi, hayvan testlerine alternatiflerin kullanımının teşvik edilmesi ve taşıma sırasında hayvanların refahını ele almıştır. AB'de bir politika alanı olarak hayvan refahı, tarihi boyunca giderek daha fazla kabul görmüştür.

Türkiye'de Hayvan Refahı

Türkiye yasal çerçevede, hayvan refahı kavramını erken kabul eden ülkelerdendir. 1926 yılında çıkarılan Türk Medeni Kanunu, hayvanları korunmayı ve bakıma muhtaç canlılar olarak kabul etmiştir. Ancak, hayvan refahı önlemlerinin uygulanması ve yaptırımı sınırlı kalmıştır. 1970'ler ve 1980'lerde Türkiye'de başta sokak hayvanları olmak üzere hayvanların refahının iyileştirilmesini savunan hayvan koruma dernekleri oluşmaya başlamıştır. Bu kuruluşlar, hayvan refahı konularında halkın bilinçlendirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. 1994 yılında Türkiye, hayvanları zulüm, istismar ve ihmalden korumayı amaçlayan Hayvanları Koruma Kanunu'nu (Kanun No. 5199) çıkarmıştır. Yasa, hayvanlara karşı işlenen suçlar için cezalar belirlemiş ve ülkedeki hayvan refahı konularını ele almak için yasal dayanak oluşturmuştur. 2000'li yılların başında Türkiye sahipsiz hayvan popülasyonlarıyla ilgili önemli sorunlarla karşı karşıya kaldığından belediyeler, kısırlaştırma ve aşılama programları da dahil olmak üzere, sahipsiz hayvanların yönetimi ve bakımı için çeşitli önlemler uygulamıştır.

2010'larda Türkiye'de hayvan refahı konularında artan bir farkındalık yaşanmıştır. Kamu ve sivil toplum kuruluşları, daha güçlü hayvan refahı mevzuatı ve uygulaması için taleplerini daha sesli dile getirir hale getirmiştir. 2010 yılında yürürlüğe giren 5996 sayılı Veteriner Hizmetleri Bitki Sağlığı Gıda ve Yem Kanunu halk sağlığı, bitki ve hayvan sağlığı ile hayvan ıslahı ve hayvan refahını, tüketici menfaatleri ile çevrenin korunması da dikkate alınarak korumak ve sağlamak amaçlarıyla hayvan refahı konusunu da kapsamaktadır. 2014 yılında, Hayvanları Koruma Kanununda (5199 sayılı Kanun) yapılan bir değişiklik, hayvanlara eziyet suçları için daha sert cezalar getirmiş ve hayvanların yasal olarak korunmasını iyileştirmeye çalışmıştır. Bu yasal gelişmelere rağmen, Türkiye hala hayvan refahı yasalarını uygulama ve hayvanları etkili bir şekilde koruma konusunda zorluklarla karşılaşmaktadır. Başboş hayvan yönetimi, farklı belediyeler tarafından alınan farklı yaklaşımlarla tartışmalı bir konu olmaya devam etmektedir. Türkiye'de çiftlik hayvanı refahı ile ilgili uygulamalar özellikle AB ile uyum sürecinin başlamasıyla dikkatleri iyice üzerine çekmiştir (Ünal, 2011). 24.12.2011 Tarihli 28152 Sayılı Hayvanların Nakilleri Sırasında Refahı ve Korunması Yönetmeliği, 22.11.2014 Tarihli 29183 Sayılı Çiftlik Hayvanlarının Refahına İlişkin Genel Hükümler Hakkında Yönetmelik ve 22.11.2014 Tarihli 29183 Sayılı Buzagauların Korunması ile İlgili Asgari Standartlara İlişkin Yönetmelik'in kabul edilmesi çiftlik hayvanı refahı konusunda yapılan önemli girişimler olmuştur. Tarım ve Orman Bakanlığı 2018-2022 Stratejik Planı'nda güvenilir gıda arzını temel alan hayvan sağlığı uygulamaları aracılığıyla; hastalık ve zararlılardan dolayı oluşacak ekonomik kayıpları azaltarak hedeflenen üretim seviyelerine ulaşmak, hayvan refahını korumak, üreticilerin gelirlerini arttırarak iç ve dış ticareti kolaylaştırmak, gibi hedefler hayvan refahı konusunda atılmış adımlar arasında yer almıştır (Tarım ve Orman Bakanlığı,2017). Türkiye hayvan refahı uygulamalarını geliştirmek için çaba sarf etmekle birlikte hayvan refahına yaklaşımı, devam eden tartışmaların ve gelişen mevzuatın da konusudur.

Ekonomik Bir Kavram Olarak Hayvan Refahı

Hayvancılık ekonomisinde hayvan refahı, arazi, işgücü, sermaye gibi kaynakların kullanılması ile hayvansal ürün üretiminin etik koşullar altında yapılma sürecidir. Ancak hayvan refahının ekonomik bir süreçte nasıl değerlendirildiği ya da değerlendirilmesi gerektiği konusu kavramsal olarak irdelenmeden hayvan refahının pratikte beklenen ekonomik sonuçlarını anlamlandırmak yetersiz kalacaktır. McInerney, 2004 yılında yaptığı çalışmada hayvan refahı, ekonomisi ve politikasını teorik çerçevede incelemiş ve hayvan refahının ekonomide nasıl değerlendirildiği konusunda öngörüler sunmuştur. Bu çalışmaya göre hayvan refahı, hayvansal üretim sayesinde elde edilen hayvansal ürünlerin kullanım değeri ve algılanan kullanım dışı değerinin ifade etmektedir. Ekonomide bir malın kullanım değeri piyasa fiyatı ile belirlenmektedir. Ancak etik, kültürel, kişisel hassasiyet, tercih, rahatsızlık veya endişe duygusu gibi algılanan fayda olarak ifade edilen kullanım dışı değeri ölçülebilir bir değeri yoktur. Örneğin, yaşlı ve sakat bakımı, sosyal yardım hizmetleri, işsizlik ödemeleri gibi maliyetler, kullanım değerinden bağımsız yalnızca toplumsal normlardaki değer unsurlardır. İnsanlar bazı amaçlara finansal olarak gönüllü katkıda bulunur; nesli tükenen hayvanları kurtarmak gibi. Bu insanlar için var olduğunu bilmekten kaynaklı sağlanan faydayı ve bunun için yapılan maliyetler varoluş değerini ifade etmektedir. Yani toplumlarda doğrudan kullanılmayan şeylerinde değeri vardır. Öyleyse doğrudan kullanım ya da kullanım dışı fayda yoluyla ortaya çıkan değerler arasında kaynakların nasıl dağıtılacağı noktasında ekonomi bilimi devreye girmektedir.

Bireylerin, grupların ve hükümetin uygun refah standartlarına ilişkin görüşleri olsa da, bunun pratikte nasıl olduğunu belirleyenler hayvancılık işletmeleridir. Çünkü bir hayvancılık işletmesini, yetiştiriciliğini yaptığı hayvan türü için refah-verimlilik marjinal ikame oranıyla karşı karşıyadır ve hayvan refahı standardı ve üretim düzeyine karar vermek zorundadır. Yine McInerney'e göre

İşletmelerde algılanan hayvan refahı değeri ile verimlilik arasında ters bir ilişki vardır. Ancak burada işletmelerin maksimum gelir seviyesinde verimliliklerini artırırken makul oranlarda hayvan refahında azaltma yapacakları beklenmektedir. Çünkü hem toplumun hem de işletmelerin hayvan refahı değeri yalnızca kullanım değerine göre değil, algılanan kullanım dışı faydaya göre de belirlendiği kabul edilmektedir.

İşletmelerde Hayvan Refahı Uygulamaları ve Ekonomik Sonuçları

İşletmelerde hayvan refahının uygulamalarının ekonomik yönleri birkaç faktör üzerinden değerlendirilebilir. Bu faktörler; ilk yatırım maliyeti, işletme maliyeti, kalite, verimlilik ve etkinlik, tüketici talebi, yasal/mevzuata uygunluk ve sürdürülebilirlik olarak sıralanabilir (Çizelge 1).

Hayvan refahı önlemlerinin uygulanması, altyapı, ekipman ve tesislerde bir ilk yatırım gerektirmektedir. Örneğin, daha geniş yaşam alanları, iyileştirilmiş havalandırma sistemleri sağlamak veya hayvanlar için zenginleştirme öğeleri kurmak maliyetli olabilmektedir. Bu yatırımların mali sonuçlarını değerlendirmek ve bunları, geliştirilmiş üretim, ürün kalitesi ve pazar rekabet gücü açısından sağlayabilecekleri potansiyel faydalar ve getirilerle karşılaştırmak önemlidir. Ayrıca iyileştirilmiş refah uygulamalarını sürdürmek ve yönetmek için altyapı yükseltmeleri, ek işçilik, personel eğitimi beslenme, veterinerlik ve bakım giderleri gibi işletme maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır.

Hayvan refahı önlemlerinin tarımsal üretimin verimliliği ve işletmenin etkinliği üzerinde etkileri vardır. Bazı refah iyileştirmeleri daha iyi hayvan sağlığına, stresin azalmasına ve üretimin artmasına yol açmaktadır (Enting et al. 1997; Kossabati and Esslemont, 1997; Bennett et al. 1999; McInerney, 2004). Sağlıklı ve mutlu hayvanların genetik kapasitelerine ulaşma olasılıkları daha yüksektir, bu da daha iyi büyüme oranları, daha yüksek üreme performansı ve gelişmiş yem dönüşüm oranları ile sonuçlanmaktadır. Bu da girdi maliyetlerini en aza indirirken üretim çıktısını en üst düzeye çıkararak artan karlılığa yol açmaktadır (Mialon, et al., 2013). Öte yandan, yeni barınak sistemlerine geçiş veya besleme uygulamalarının ayarlanması gibi işletmenin etkinliği üzerinde kısa vadeli etkilere sahiptir.

Etkili hayvan refahı uygulamaları belirli risklerin azaltılmasına yardımcı olmaktadır. İşletmeler uygun barınma, sanitasyon ve biyogüvenlik protokolleri sağlayarak salgın hastalık ve nihai ürünlerin tadını, dokusunu ve genel kalitesini artırabilen stres riskini azaltabilir, bu da daha düşük veterinerlik maliyetleri, azalan ilaç kullanımı ve hastalık veya ölüm nedeniyle üretim kayıplarını azaltmaktadır (Honkavaara, 1989, Esslemont, 1990). Ayrıca sağlıklı gıdaya ulaşma konusunda tüketiciler giderek daha fazla endişe duymaktadır. Hayvan refahı endişelerinin dikkate alınmaması, itibar zedelenmesine, tüketici güveninin azalmasına ve potansiyel olarak pazardan dışlanmaya neden olmaktadır. Refah standartlarını karşılamak, bir işletmenin ürünlerini pazarda farklılaştırmakta, bilinçli ve daha yüksek fiyatları ödemeye razı tüketicileri çekmektedir (Bennett, 1996). McInerney'in 2004'te yaptığı çalışmaya göre tüketicilerin hayvan refahı standartları yüksek koşullarda üretilen ürünlere ödeme istekliliğindeki artış, refahın piyasadaki önemli etkileri arasındadır. İyi hayvan refahı standartlarında üretilen ürünlere dünyanın farklı yerlerindeki tüketiciler yüksek fiyatları ödeme eğilimindedir (AAA, 2004; Makdisi et al., 2011; Spooner, 2014; Lama et al, 2017). Turan 2018'de Bursa iline bağlı üç merkez ilçe olan Nilüfer, Osmangazi ve Yıldırım'da 500 kişiyle yaptığı çalışmada, tüketicilerin büyükbaş ve kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde hayvan refahını arttırmaya ödeme isteklilikleri ölçmüş, kanatlıdaki miktarın çok düşük, besideki miktarın ise ölçülemeyecek kadar düşük olduğunu ifade etmiştir.

İşletmeler bağlı buldukları kurum, kuruluşlar veya sertifikasyon programları tarafından uygulanan hayvan refahı düzenlemelerine ve standartlarına uymalıdır. Bu gereksinimlerin

karşılanmaması cezalara, yasal ihtilaflara veya pazar ve teşvik erişiminin kaybedilmesine neden olmaktadır.

İşletmeler, hayvanların refahına öncelik vererek, işletme için sosyal ağlarını artırmakta, paydaşlarla olumlu ilişkiler kurmakta, piyasa dalgalanmalarına, tüketici taleplerine ve düzenleyici değişikliklere karşı dayanıklılıklarını artırmakta, işletmenin itibarına ve finansal istikrarına zarar verebilecek olumsuz çevresel etki riskini azaltmaktadır. Dolayısıyla hayvan refahı uygulamaları işletmenin uzun vadeli sürdürülebilirliğine katkıda bulunmaktadır.

Hayvan refahı önlemlerinin ekonomik etkisinin belirli bağlama, türlere ve işletmecilik sistemine bağlı olarak değişebileceğini vurgulamak önemlidir. Bazı iyileştirmeler anında maliyet tasarrufu veya artan üretkenlikle sonuçlanırken, diğerleri ekonomik faydalarını gerçekleştirmek için daha uzun vadeli bir bakış açısı gerektirmektedir.

Çizelge 1. Hayvan refahı temel bileşenlerini sağlamanın işletmeye ekonomik etkileri

Hayvan refahı temel bileşenleri	Hayvan refahı temel bileşen örneği	İşletmeye negatif etkisi	İşletmeye pozitif etkisi
Fiziksel sağlık ve rahatlık	Yeterli beslenme, temiz su, uygun barınak, uygun veteriner bakımı sağlamak	İlk yatırım maliyeti ve işletme masraflarında artış	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı, veteriner masraflarında ve ölüm oranlarında azalış
Acı ve ızdıraptan uzak olma	Fiziksel zarar veya psikolojik sıkıntı veren uygulamalardan kaçınmak	-	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı, veteriner masraflarında ve ölüm oranlarında azalış
Doğal davranışları ifade edebilme	Doğuştan gelen davranışlarını ifade etmelerine izin vermek	-	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı
Korku ve stresten uzak olma	Korkutucu veya caydırıcı uyaranlara maruz kalmalarını azaltmak	-	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı
Sosyal refah	Türdeşlerle veya uygun arkadaşlıklarla etkileşimler	-	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı
Hareket özgürlüğü	Hareket etmeleri ve egzersiz yapmaları için yeterli alan sağlamak	İlk yatırım maliyeti ve işletme masraflarında artış	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı
Taşıma ve yönetim uygulamaları	Stresi en aza indirecek ve gereksiz acı çekmeyi önleyecek şekilde yükleme ve taşımayı sağlamak	İlk yatırım maliyeti ve işletme masraflarında artış	Verim, kalite ve tüketici talebi artışı, ölüm oranlarında ve veteriner masraflarında azalış
Etik hususlar	Hayvanların duyguları, acıyı ve ızdırabı deneyimleyebilen duyarlı varlıklar olduğu kabul etmek	-	Para cezaları, lisans veya sertifikaların kaybindan kaçış, Uzun vadeli sürdürülebilirlik

SONUÇ

Hayvan refahını amaç edinen işletmeler ile ekonomik esaslara dayalı çalışma amaçları bazen çelişkilere yol açabilmektedir. İşletmeler genellikle ekonomik olarak ayakta kalabilmek için karlarını en üst düzeye çıkarmayı ve maliyetleri en aza indirmeyi amaçlamaktadır. Buna karşılık, hayvan refahı daha iyi barınak, sağlık ve yönetim uygulamaları için ek yatırımlar gerektirmekte ve bu durum işletme maliyetlerini artırmaktadır. Ayrıca ekonomik ilkeler genellikle kısa vadeli kazanımlara ve verimliliğe öncelik vermektedir. Bu da uzun vadeli yatırımlar ve zaman içinde hayvanların refahını iyileştirmek için kademeli değişiklikler gerektirebilen hayvan refahı ile çelişmektedir. Ekonomik ilkeler işletmeleri maliyet düşürücü önlemler almaya zorlamaktadır. Bu durumda işletmeler potansiyel olarak hayvan refahı standartlarından ödün verebilir. Bu kapsamda hayvan refahı uygulamalarına destekleme veya teşvik projeleri kapsamında yatırım desteklemeleri işletmeleri cesaretlendirecektir.

İşletmelerin, hayvan refahı ile ekonomik esaslara dayalı çalışma amaçları bazen de paralellik göstermektedir. İyi hayvan refahı uygulamalarının sağlanması, işletmeler için olumsuz ekonomik sonuçlara yol açabilecek hastalık salgınları, ürünlerin geri çağırılması ve itibarın zarar görmesi riskini azaltmaktadır. Tüketiciler satın alma kararlarında hayvan sağlığına giderek daha fazla öncelik

verdiğinden, işletmeler bu talepleri karşılamanın finansal faydalarından yararlanabilir. Ancak düşük gelirli tüketicilerin çoğunlukta olduğu bir ekonomide artan fiyatlara rağmen satışların maliyetleri karşılayabileceği varsayımı her zaman geçerli olmayabilir. Bu nedenle Türkiye’de ulusal tüketici profilini yansıtan, her hayvansal üretim çeşidine ait hayvanların refahını artırmaya tüketicilerin, ödeme istekliliği konusunda diğer ülkelerin tüketicilerinin tercihlerini kıyaslamaya imkân veren araştırmalar artırılmalıdır. Bu soruların cevaplanması kolay olmasa da sonuçlar beklentiler karşısında gerçek durumu yansıtmada yararlı olacaktır.

Hayvan refahı ve ekonomik ilkelere bazen çatışan çıkarlarını dengelemek işletmeler için karmaşık olabilir. Ancak hayvan refahı ile ekonomik hedefler arasında doğru dengeyi kurmak, sorumlu ve sürdürülebilir tarımsal faaliyetler için esastır. Hayvan refahı, hayvan sağlığını ve performansını optimize etmeyi amaçlarken, işletmeler çıktıyı ve karlılığı en üst düzeye çıkarmaya çalışmaktadır. Motivasyonları farklı olsa da hem hayvan refahı savunucuları hem de işletmeler verimli ve etkin işletme faaliyetini kabul etmektedir. Ayrıca işletmeler hayvan refahı girişimleri amacıyla hem inovatif hem de sürekli iyileştirme içerisinde olacaktır. Yeni teknolojiler, araştırma ve yönetim uygulamaları hem işletmenin ekonomik performansını hem de hayvanların refahını artıracaktır.

Hem hayvan refahı hem de ekonomik ilkelere odaklanan işletmeler, uzun vadeli sürdürülebilirliğin önemini farkındadır. Hayvanların refahını sağlamak ve istikrarlı bir tarımsal faaliyeti sürdürmek, bir işletmenin başarısı ve uzun ömürlülüğüne aynı anda katkıda bulunacaktır.

Çıkar Çatışması

İlgili yazarın verilerin yorumunu etkileyebilecek herhangi bir olası çıkar çatışması bulunmamaktadır. Çıkar çatışması yaratabilecek herhangi bir finansal destek veya ilişkinin yoktur.

KAYNAKLAR

- Animal Agriculture Alliance (A.A.A.). (2004). Consumers Attitudes About Animal Welfare: 2004 National Public Opinion Survey.
- Bartussek, H. (2001). An historical account for the development of the Animal Needs Index ANI-35L as part of the attempt to promote and regulate farm animal welfare in Austria: An example of the interaction between animal welfare science and society. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 30: 34–41.
- Bennett, R.M., Christiansen, K., Clifton-Hadley, R.S. (1999). Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 66, 455-459.
- Bennett, R. M. (1996). People's Willingness to Pay for Farm Animal Welfare. *Animal Welfare*, 5 (1), 3-11.
- Duncan, I.J.H. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Rev Sci Tech*, 24 (2), 483-492.
- EFSA, (2012a). *Scientific opinion on the welfare of cattle kept for beef production and the welfare in intensive calf farming systems*, EFSA J, 10 (5): 2669.
- EFSA, (2012b). *Statement on the use of animal-based measures to assess the welfare of animals*, EFSA J, 10, 2767. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2767.
- Enting, H., Kooij, D., Dijkhuizen, A.A., Huirne, R.B.M., Noordhuizen Stassen, E.N. (1997). Economic losses due to clinical lameness in dairy cattle. *Livestock Production Science*, 49, 259-267.
- Esslemont, R.J. (1990). The cost of lameness in dairy herds. Update in cattle lameness. *Proc. 6th Int. Symp. On Diseases of the Ruminant Digest, Liverpool*, 237-251.
- Grandin, T. (2000). Management and economic factors of handling and transport. In: *Grandin, T.(ed.) Livestock Handling and Transport, 2nd edn.* CAB International, Wallingford, UK,pp. 1–14.

- Honkavaara, M. (1989). Effect of porcine stress on the development of PSE meat, its characteristics and influence on the economics of meat products manufacture. *Dissertation University of Turku, Finland*.
- Kossaibati, M.A., Esslemont, R.J. (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. *Veterinary Journal*, 154, 41-51.
- Lama, G.C.M., Estevez-Moreno, L.X., Sepulveda, W.S., Estradachavero, M.C., Rayas-Amor, A.A., Villarroel, M. And Maria, G.A. (2017). Mexican Consumers' Perceptions and Attitudes Towards Farm Animal Welfare and Willingness to Pay for Welfare Friendly Meat Products, *Meat Science*, 125:106–113.
- Makdisi, F., Marggraf, R. (2011). Consumer Willingness to Pay for Farm Animal Welfare in Germany- The Case of Broiler, Department of Agricultural Economics and Rural Development, University of Göttingen, Platz der Göttinger Sieben, Göttingen, Germany.
- McInerney J.P. (2004). Animal welfare, economics and policy. Report to Defra.Retrieved from:<http://archive.defra.gov.uk/evidence/economics/foodfarm/reports/documents/animalwelfare.pdf>
- Mialon, M. M., Lherm, M., Micol, D., Doreau, M., Martin, C. (2013). Improving animal welfare and economic sustainability in bull fattening systems in France: A comparison of three different feeding programmes. In *Harinder P. S. Makkar (Ed.)*, Enhancing animal welfare and farmer income through strategic animal feeding — Some case studies. FAO Animal Production and Health Paper No. 175. Rome, Italy.
- OIE, (2008). Terrestrial Animal Health Code, Article 7.1.1, Introduction to the recommendations for animal welfare, *World Organization for Animal Health (OIE)*, Paris, France. http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.7.1.pdf. (Erişim tarihi: 03.02.2022).
- Savaş, T., Yurtman, İ. Y., Tölu, C. (2009). Hayvan Hakları ve Hayvan Refahı: Felsefi Bakış - Nesnel Arayışlar. *Hayvansal Üretim*, 50(1):54-61.
- Seo, T., Date, K., Daigo, T., Kashiwamura, F. Sato, S. (2007). Welfare Assessment on Japanese Dairy Farms Using the Animal Needs Index, *Universities Federation for Animal Welfare*, 16: 221-223, UK.
- Spooner, J.M., Schuppli, C.A. And Fraser, D. (2014). Attitudes of Canadian Citizens toward Farm Animal Welfare: A Qualitative Study, *Livestock Science*, 163:150–158.
- Tarım ve Orman Bakanlığı, 2017. <https://www.tarimorman.gov.tr/SGB/Belgeler/2013-2017/GTHB%202018-2022%20STRATEJI%CC%87K%20PLAN.PDF> (Erişim tarihi: 18.04.2023)
- Turan, Ö. (2018). Büyükbaş ve Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliğinde Olası Hayvan Refahı Uygulamalarına Yönelik Tüketici Tercihlerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Ünal, N. (2011). Avrupa Birliği ve Türkiye’de yetiştiricilikte hayvan refahıyla ilgili yasal düzenlemeler. *Anadolu Üniversitesi Yayını*, No:2332, Web-Ofset Tesisleri, Eskişehir, s. 159.
- WQ, 2009. Welfare Quality Assessment Protocols (for Cattle, Calf, Poultry and Pig). *Welfare Quality Consortium*: Lelystad, the Netherlands.

Atf için: Yıldırım, H.G. ve Yılmaz, N. (2023). Çeltik (*Oryza sativa L.*)’de Farklı Vermikompost Uygulamalarının Bazı Bitkisel Özellikler Üzerine Etkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 3030-3039.

To Cite: Yıldırım, H.G. & Yılmaz, N. (2023). Effect of Different Vermicompost Applications on Some Plant Characteristics in Paddy (*Oryza sativa L.*). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3030-3039.

Çeltik (*Oryza sativa L.*)’de farklı vermicompost uygulamalarının bazı bitkisel özellikler üzerine etkisi

Gözde Hafize YILDIRIM^{1*}, Nuri YILMAZ²

Öne Çıkanlar:

- Bu sera denemesi şeklinde yürütülen bu çalışmada, farklı solucan gübrelere kullanılmıştır.
- Solucan gübresinin uygulandığı tüm plastik saksılarda biyokütle oldukça yükselmiştir.
- Çeltikte organik gübre uygulamaları ile yeni ilerlemeler kaydedilmiştir.

ÖZET: Bu araştırma, farklı solucan gübresi uygulamasının ve dozlarının, çeltik bitkisinde bazı bitkisel özelliklere etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada yapraktan ve topraktan olmak üzere iki farklı uygulama ve dört farklı doz; (0.5-1-2-3 litre sıvı gübre/100 litre su) üç farklı çeltik çeşidinde (Osmancık-97, Aslı ve Terme Baldo) uygulanmıştır. Çalışma serada ve 21.9 litrelik (35 cm çap 30 cm yükseklik) plastik saksılarda (30 tohum/saksı) kurulmuştur. Deneme tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak yürütülmüştür. Çalışma sonucunda bitki boyu 41.81-57.19 cm, sap sayısı 19.33-26.67 adet, bitki yaş ağırlığı 70.00-113.33 g., salkım sayısı 18.00-25.67 adet, salkım yaş ağırlığı 1.88-4.23 g., salkım kuru ağırlığı 0.10-0.31 g., salkım boyu 7.17-11.64 cm., sap yaş ağırlığı 6.63-28.33 g, sap kuru ağırlığı 6.17-13.88 g, yaprak sayısı 3.03-3.73 adet, yaprak yaş ağırlığı 11.93-25.00 g., yaprak kuru ağırlığı 11.70-19.38 g, gövde çapı 3.78-5.69 mm ve salkımda tane sayısı 33.93-52.33 adet olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, solucan gübresinin çeltik bitkisinde bazı bitkisel özelliklerin artmasına neden olduğu ancak yapraktan ya da topraktan yapılan uygulama şekillerinin ise etkili olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler:

- Çeltik
- Sera
- Solucan gübresi

Effect of different vermicompost applications on some plant characteristics in paddy (*Oryza sativa L.*)

Highlights:

- In this study, which was conducted in a greenhouse trial, different types of worm manure were used.
- The biomass was significantly increased in all plastic pots in which worm manure was applied.
- New advances have been made in the use of organic fertilizers in paddy.

ABSTRACT: The study was conducted to determine the effects of different applications and doses of worm manure on some plant characteristics of paddy. Two different applications, foliar and soil, and four different doses (0.5-1-2-3 liters of liquid fertilizer/100 liters of water) were applied in three different paddy varieties (Osmancık-97, Aslı and Terme Baldo). The study was conducted in a greenhouse in 21.9-liter (35 cm diameter x 30 cm height) plastic pots (30 seeds/pot). The trial was carried out in a factorial experiment design with three replications in randomized plots. As a result of the study, plant height was determined to be 41.81-57.19 cm, stem number was 19.33-26.67, plant fresh weight was 70.00-113.33 g, panicle number was 18.00-25.67, panicle fresh weight was 1.88-4.23 g, panicle dry weight was 0.10-0.31 g, panicle length was 7.17-11.64 cm, stem fresh weight was 6.63-28.33 g, stem dry weight was 6.17-13.88 g, leaf number was 3.03-3.73, leaf fresh weight was 11.93-25.00 g, leaf dry weight was 11.70-19.38 g, stem diameter was 3.78-5.69 mm, and the number of grains per panicle was 33.93-52.33. According to the findings, worm manure increased some plant characteristics in paddy plants, but the application methods, foliar or soil, were not effective.

Keywords:

- Greenhouse
- Paddy
- Vermicompost

¹ Gözde Hafize YILDIRIM ([Orcid ID: 0000-0002-0557-6442](https://orcid.org/0000-0002-0557-6442)), Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ordu, Türkiye

² Nuri YILMAZ ([Orcid ID: 0000-0002-0597-6884](https://orcid.org/0000-0002-0597-6884)), Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ordu, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gözde Hafize YILDIRIM, e-mail: gozdehafizeyildirim@odu.edu.tr

GİRİŞ

Anavatanı Güneydoğu Asya olan çeltiğin Türkiye’ye girişi, günümüzden yaklaşık 500 yıl öncesine dayanır. Çeltikten elde edilen pirinç ile dünya nüfusunun üçte biri beslenmektedir (Akay, 2020). Bu yüzden dünyada çeltik üretim miktarında azalmalar görüldüğü zaman pirinç fiyatları yükselerek tüketiciyi doğrudan etkilemektedir. Günümüzde olan üretim kaynaklarına rağmen tüketim ihtiyaçları gün geçtikçe artmaktadır. Bunun üstesinden gelebilmek için insanlar, ellerindeki kısıtlı kaynaklarla daha fazla üretim yapmanın çeşitli yollarını aramaktadır (Özer, 2018).

Kaliteli bir üretim ve yüksek verimin alınabilmesi için kullanılan girdilerin en önemli payını gübreleme almaktadır (Kant ve ark., 2006). Ancak çok yüksek kimyasal gübre kullanımı, toprak yapısında bulunan humusun azalmasına ve bitki besin elementlerinin alınmasında güçlükler neden olmaktadır (Boz, 2019). Son yıllarda önemi gittikçe artan organik tarım içerisinde de yer alan önemli gübrelere biri de solucan gübresidir. Organik bir materyal olan solucan gübresini, toprak özelliklerini iyileştirici etkisinin yanında bitkilere besin maddeleri sağladığından, organik yetiştiricilik yapılan bütün alanlara uygulanabilmektedir (Demir ve ark., 2010). Bu nedenlerden dolayı bu çalışmanın amacı, farklı yoğunluklarda yapraktan ve topraktan uygulanan vermikompost gübresinin, üç farklı çeltik çeşidi üzerinde etkilerinin gözlenmesi ve bitkisel özelliklerine katkısının incelenmesi olarak belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Deneme 2020 yılında, Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Arazisindeki Sera Alanı’nda saksı çalışması olarak kurulmuştur (Saksı boyutu; çap: 35cm, yükseklik:30 cm.). Üç farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidi (Osmancık-97, Aslı, Terme Baldo) kullanılmıştır. Osmancık-97, orta boylu, kısa saplı, erkenci, sert taneli, beyaz, yüksek verim potansiyeline sahip bir çeşittir. Adaptasyon kabiliyeti yüksektir ve farklı iklim koşullarında yetiştirilebilir. Aslı, orta boylu, uzun saplı, orta erkenci, sert taneli, beyaz, yüksek verim potansiyeline sahip bir çeşittir. Adaptasyon kabiliyeti yüksektir ve farklı iklim koşullarında yetiştirilebilir. Terme Baldo, orta boylu, uzun saplı, orta erkenci, sert taneli, beyaz, yüksek verim potansiyeline sahip bir çeşittir. Yapılan çalışmada gübre olarak, yapraktan ve topraktan uygulanan solucan gübresinin (vermikompost) farklı dozları (%0.5 ml, %1 ml, %2 ml, %3 ml) kullanılmıştır. Vermikompostların içeriği, %2-4 organik madde, %2-4 toplam (Humik+Fulvik) asit, 0.4-1.8 organik azot, 6.5-7.7 pH ve 4-7 EC değerlerine sahiptir. Deneme tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre 3 tekrarlı olarak kurulmuştur. Denemede her bir saksıda toprağın suyla karıştırılarak çamurlaştırılmasıyla toprak hazırlığı yapılmış, metrekaresine tohum hesabına göre 30 adet tohum 1 cm derinliğe ekilmiştir. Tohumların çimlenmesi sağlandıktan sonra “topraktan uygulanacak olan Vermikompost uygulamalar” için aşağıdaki tabloda verilen oranlarda gübreler saksılara verilmiştir. Hasattan yaklaşık 10-15 gün öncesine kadar su miktarı 5 cm altına düşürülmemiştir. Yapraktan olan uygulama, sırt tipi pülverizatör ile püskürtme yöntemiyle verilirken, topraktan olan uygulama doğrudan toprağa verilmiştir. Bu hususta topraktan olan gübre uygulaması ekim ile tek seferde verilirken, yapraktan olan gübre uygulamasına, yapraklar oluştuktan hemen sonra başlanmış ve salkım oluşma başlangıcına kadar her on günde bir uygulamaya devam edilmiştir. Denemede ölçümler hassas terazi ve kumpas ile, kurutma ise etüvde 70°C sıcaklıkta 48 saat sürede yapılmıştır. Bitkiler 02.12.2020 tarihinde sap, yapraklar ve salkımın sarardığı dönemde hasat edilmiştir. Ölçüm ve gözlemler, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü’nün “Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı” ile Uluslararası Çeltik Araştırma Enstitüsü (IRRI)’nün çeltik için hazırlamış olduğu “Standart Değerlendirme Sistemi” birlikte dikkate alınarak, bitki boyu, sap sayısı, bitki yaş ağırlığı, salkım sayısı, salkım kuru ağırlığı, salkım yaş ağırlığı, salkım boyu, yaprak sayısı, yaprak yaş ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, sap yaş ağırlığı, sap kuru ağırlığı, gövde çapı, salkımda tane sayısı gibi özellikler

ele alınmıştır (Anonim, 2003; Anonim, 2002). İstatistiksel analizler, JMP programında yapılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar Tukey testi ile yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Solucan gübresinin farklı uygulama ve dozlarının, üç farklı çeltik çeşidinde bazı bitkisel özelliklere etkileri incelenmiştir. Yapılan istatistiki analizlere göre elde edilen bulgular, hem çizelgelerde (1 ve 2) hem de ayrı ayrı başlıklar altında ayrıntılı olarak verilmiştir.

Bitki boyu (cm)

Çizelge 1 incelendiğinde, bitki boyu bakımından çeşitler arasında istatistiksel olarak, çok önemli ($P \leq 0.01$), dozlar arasında ise önemli ($P \leq 0.05$) farklar bulunmuştur. Bitki boyuna ait değerler, çeşit etkisiyle 52.48-43.94 cm arasında değişiklik göstermiştir. 52.48 cm ile en yüksek bitki boyu Osmancık-97’ye aittir. En düşük bitki uzunluğu ise Aslı çeşidinden elde edilmiştir. Farklı dozların bitki boyuna etkisi ile bulunan ortalama değerler 48.96-43.94 cm arasında değişmiş ve dozlar arttıkça bitki boyları artmıştır. Keza en yüksek bitki boyu %3 dozunda, en düşük ise %0.5 dozunda tespit edilmiştir. (Çizelge 1). Ramesh, (2018), (52.64-107.64 cm); Krishnapriya ve Padmadevi (2011), (179-117 cm); Balasubramanian 2019, (68.9-108.7 cm) değerlerini elde etmiştir. Söz konusu araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalar ile solucan gübresinin bitki boyunu artırdığını bildirmektedirler. Bu da mevcut çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Yaş ağırlığı (g/saksı)

Çizelgeden anlaşılacağı üzere deneme faktörlerinin bitki yaş ağırlığı ortalamaları 70.00-113.33 g arasında tespit edilmiş ve çeşit, vermicompost dozları ve uygulamaların yaş ağırlığı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Buna rağmen Vermikompostun bitki ağırlıklarına etkisinin pozitif yönde olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Aktaş 2018; Yaviç ve ark., 2020; Özkan ve ark., 2016; Sridhar ve ark., 2006; Küçükyumuk ve ark., 2014; Ateş ve ark., 2019). Araştırmalar arasındaki bu farklılığın çeşit ve uygulama farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sap kuru ağırlık (g/saksı) ve sap yaş ağırlık (g/saksı)

Araştırmada ele alınan çeltik çeşitlerinin, solucan gübresi dozları ve uygulamaların sap kuru ağırlığı ve sap yaş ağırlığına etkilerine ait ortalamalar ve gruplandırmalar çizelge 1’ de verilmiştir. Sap kuru ağırlığı bakımından çeşitler arasında istatistiksel olarak önemli fark çıkmış ve en yüksek sap kuru ağırlığı 11.37 g ile Osmancık-97 çeşidinden alınmış, bunu sırasıyla 8.64 g ile Aslı ve 8.33 g ile Terme baldo izlemiş, Aslı çeşidi ile Terme Baldo arasında istatistiksel olarak önemli fark çıkmamıştır. Vermikompost dozları, uygulamalar ve interaksiyonların sap kuru ağırlığına etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Sap yaş ağırlığı bakımından ise çeşitler arasında istatistiksel olarak çok önemli farklılık tespit edilmiştir. Ayrıca çeşit* Vermikompost dozları*uygulamalar interaksiyonu ise önemli çıkmıştır. Vermikompost dozlarının sap yaş ağırlığı üzerine etkisi ise istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Sap yaş ağırlığı 6.63g-28.33 g arasında değişim göstermiştir. En yüksek sap yaş ağırlığı Osmancık çeşidinde %1 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamadan alınmıştır. En düşük ise Terme Baldo çeşidinden yine %1 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamadan alınmıştır. Vermikompost dozları ve uygulamaların sap yaş ağırlığı üzerine de belirgin bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Konuyla ilgili yapılan araştırmalarda Vermikompostun bitki ağırlıklarına etkisinin pozitif yönde olduğu belirtilmektedir (Sridhar ve ark., 2006; Küçükyumuk ve ark., 2014; Özkan ve ark., 2016; Aktaş, 2018; Ateş ve ark., 2019; Yaviç ve ark., 2020). Araştırmalar arasındaki bu farklılık çeşit ve uygulama farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Salkım sayısı (adet/saksı)

Denemede kullanılan çeltik çeşitlerinin, Vermikompost dozlarının ve uygulamaların salkım sayısına etkisine ait ortalama değerler ve istatistiksel gruplar çizelge 1’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere, araştırmada salkım sayısı 18.00-25.00 adet arasında tespit edilmiş ve çeşitlerin, Vermikompost dozlarının, uygulamaların ve interaksiyonların salkım sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Konuyla ilgili olarak Krishnapriya ve Padmadevi (2011), Sezer (1993); Şavşatlı (2006); Tuna (2012) ve Ünan (2016) bulgularımızdan farklı olarak solucan gübresinin salkım sayısını arttırdığını belirtmişlerdir.

Salkım kuru ağırlığı (g/bitki) ve salkım yaş ağırlığı (g/saksı)

Çizelge 2’de görüldüğü gibi denemede kullanılan çeltik çeşitlerinin ve interaksiyonların salkım kuru ağırlığına etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmış, Vermikompost dozlarının ise etkisi önemli çıkmamıştır. Salkım kuru ağırlığı 0.10-0.31 g arasında değişim göstermiştir. En yüksek salkım kuru ağırlığı Osmancık-97 çeşidinde %1 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamasından elde edilmiştir. En düşük salkım kuru ağırlığı ise Terme Baldo çeşidinde yine %1 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamasından elde edilmiştir. Verilerden anlaşılacağı üzere salkım kuru ağırlığına çeşit faktörünün etkisinin daha önemli olduğu görülmektedir. Söz konusu çizelge incelendiğinde, salkım yaş ağırlığına çeşitlerin etkisi çok önemli ($P \leq 0.01$), Vermikompost dozları ve uygulamaların etkisi ise önemli bulunmuştur. Salkım yaş ağırlığı; 1.88-4.23 g arasında değişmiş ve en yüksek Osmancık-97 çeşidinde %3 Vermikompost dozunda ve yapraktan uygulamadan (4.23 g) ve yine Osmancık-97 çeşidinde % 1 Vermikompost dozunda ve topraktan uygulamadan (4.22 g) alınmıştır. En düşük salkım yaş ağırlığı ise Terme Baldo çeşidinde %0.5 Vermikompost dozunda topraktan uygulamadan alınmıştır (1.88 g). Salkım yaş ağırlığı bakımından çeşitler arasında önemli farklılıkların olduğu görülmektedir. Ayrıca Vermikompost gübresinin salkım yaş ağırlığını artırdığı ancak yapraktan ve topraktan uygulama farklılığının etkisinin olmadığı görülmüştür. Salkım yaş ağırlığı ile ilgili, yapılan diğer çalışmalarda, Akay ve ark., (2017) 3.32 g., İdikut ve ark. (2010) 5.27-6.11 gr.; Sakaroğlu, E. (2011) 2.8-3.86 gr. değerlerini bulmuştur. Bu sonuçlar elde ettiğimiz sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Yaprak sayısı (adet/bitki)

Çizelge 2’de görüldüğü gibi çeltik çeşitlerinin, Vermikompost dozlarının ve çeşit*Vermikompost dozları*Uygulama interaksiyonlarının bitkide yaprak sayısına etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bitkide yaprak sayısı 3.03-3.73 adet arasında değişim göstermiştir. En fazla bitkide yaprak sayısı Aslı çeşidinde %2 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamadan (3.73 adet) alınmış ve Aslı çeşidinde %1 Vermikompost dozunda yapraktan uygulama (3.72 adet) ile yine aslı çeşidinde %3 Vermikompost dozunda topraktan uygulama (3.63 adet) interaksiyonları ile aynı grupta yer almıştır. En düşük bitkide yaprak sayısı ise 3.03 adet ile Osmancık-97 çeşidinde %0.5 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamadan alınmıştır. Bu değerlerden de anlaşılacağı üzere Aslı çeşidinde yaprak oluşumunun daha fazla olduğu, ayrıca %1 veya 2 Vermikompost uygulamasının topraktan veya yapraktan uygulaması fark etmeden yaprak oluşumunu artırdığı görülmektedir. Konuyla ilgili olarak Tavalı ve ark. 2013; Tejada ve ark. 2009; Aktaş, (2018). Tavalı, (2014); Gizem, (2017); Altunlu (2021) yaptıkları araştırmalarda bulgularımıza benzer şekilde vermicompost uygulamalarının yaprak sayısını artırdığını belirtmişlerdir.

Çizelge 1. Çeşit, çeşit*uygulama interaksyonunu, doz, çeşit*doz, uygulama*doz ve çeşit*uygulama*doz interaksyonunun çeltiğin bazı bitkisel özellikleri üzerindeki etkileri

	BB	SS	BYA	Salkım S.	Sap YA	Sap KA	Salkım B.
Çeşit	**	ö.d.	ö.d.	ö.d.	**	**	**
Aslı	43.95 ^b	24.13	90.42	23.00	11.23 ^b	8.64 ^b	8.93 ^b
Osmancık 97	52.48 ^a	23.46	94.58	22.21	14.52 ^a	11.37 ^a	11.27 ^a
Terme baldo	45.18 ^b	22.88	85.00	21.42	8.49 ^c	8.33 ^b	9.23 ^b
Çeşit*Uygulama	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.
Aslı,Topraktan	43.33	24.25	89.17	23.50	11.50	8.67	8.68
Aslı,Yapraktan	44.56	24.00	91.67	22.50	10.96	8.60	9.18
Osmancık-97,Topraktan	53.39	21.75	96.67	21.33	13.23	12.09	11.24
Osmancık-97,Yapraktan	51.58	25.17	92.50	23.08	15.80	10.65	11.31
Terme Baldo,Topraktan	44.93	23.00	86.25	21.58	9.28	8.78	9.33
Terme Baldo,Yapraktan	45.44	22.75	83.75	21.25	7.70	7.88	9.14
Doz	*	ö.d.	ö.d.	ö.d.	*	ö.d.	*
0.5	45.77 ^b	24.72	87.78	22.83	10.37 ^{ab}	9.00	9.78 ^{ab}
1	47.57 ^{ab}	22.89	87.22	21.83	13.26 ^a	9.54	9.90 ^{ab}
2	46.52 ^{ab}	23.44	88.33	22.33	9.88 ^b	8.90	9.38 ^b
3	48.96 ^a	22.89	96.67	21.83	12.14 ^{ab}	10.34	10.20 ^a
Çeşit*Doz	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	**	*	ö.d.
Aslı,0.5	43.43	25.83	91.67	23.83	11.51 ^b	10.22 ^{ab}	9.01
Aslı,1	43.94	22.83	87.50	23.50	9.98 ^b	10.01 ^{ab}	9.24
Aslı,2	43.28	23.33	86.67	21.67	10.70 ^b	9.21 ^{ab}	7.99
Aslı,3	45.13	24.50	95.83	21.67	12.73 ^b	7.91 ^b	9.48
Osmancık-97,0.5	50.13	26.50	95.83	21.50	12.22 ^b	7.68 ^b	11.23
Osmancık-97,1	54.89	23.33	95.83	21.33	22.55 ^a	6.87 ^b	11.32
Osmancık-97,2	50.83	22.83	90.83	22.33	10.55 ^b	13.83 ^a	11.02
Osmancık-97,3	54.09	21.17	95.83	21.83	12.75 ^b	9.81 ^{ab}	11.53
Terme Baldo,0.5	43.75	21.83	75.83	20.33	7.39 ^b	10.80 ^{ab}	9.09
Terme Baldo,1	43.89	22.50	78.33	25.00	7.25 ^b	11.03 ^{ab}	9.12
Terme Baldo,2	45.44	24.17	87.50	24.33	8.40 ^b	8.95 ^{ab}	9.12
Terme Baldo,3	47.66	23.00	98.33	19.17	10.93 ^b	7.02 ^b	9.60
Uygulama*Doz	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	*	ö.d.	ö.d.
Topraktan,0.5	45.39	24.33	86.11	23.83	10.90 ^{ab}	9.28	9.70
Topraktan,1	47.60	22.67	91.67	23.50	11.28 ^{ab}	9.68	9.85
Topraktan,2	45.97	22.56	85.00	21.67	10.02 ^{ab}	8.64	9.11
Topraktan,3	49.90	22.44	100.00	21.67	13.14 ^{ab}	11.78	10.32
Yapraktan,0.5	46.15	25.11	89.44	21.50	9.84 ^b	8.72	9.85
Yapraktan,1	47.54	23.11	82.78	21.33	15.24 ^a	9.39	9.94
Yapraktan,2	47.06	24.33	91.67	22.33	9.74 ^b	9.16	9.64
Yapraktan,3	48.02	23.33	93.33	21.83	11.13 ^{ab}	8.91	10.07
Çeşit*Uygulama*Doz	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	*	ö.d.	ö.d.
Aslı,Topraktan,0.5	42.51	26.00	90.00	25.67	11.18 ^b	7.93	9.10
Aslı,Topraktan,1	41.81	22.67	78.33	21.33	9.22 ^b	7.58	9.12
Aslı,Topraktan,2	42.86	23.00	88.33	22.33	11.17 ^b	8.32	7.17
Aslı,Topraktan,3	46.15	25.33	100.00	24.67	14.43 ^b	10.85	9.32
Aslı,Yapraktan,0.5	44.36	25.67	93.33	24.33	11.83 ^b	9.97	8.91
Aslı,Yapraktan,1	46.07	23.00	96.67	21.67	10.75 ^b	8.23	9.36
Aslı,Yapraktan,2	43.69	23.67	85.00	21.00	10.23 ^b	7.05	8.81
Aslı,Yapraktan,3	44.12	23.67	91.67	23.00	11.02 ^b	9.17	9.63
Osmancık-97,Topraktan,0.5	50.46	26.33	98.33	25.00	14.65 ^b	13.47	10.82
Osmancık-97,Topraktan,1	57.19	22.00	113.33	22.33	16.77 ^b	13.88	11.22
Osmancık-97,Topraktan,2	51.96	19.33	85.00	19.00	10.00 ^b	9.18	11.26
Osmancık-97,Topraktan,3	53.94	19.33	90.00	19.00	11.50 ^b	11.81	11.64
Osmancık-97,Yapraktan,0.5	49.79	26.67	93.33	23.67	9.78 ^b	8.58	11.64
Osmancık-97,Yapraktan,1	52.58	24.67	78.33	22.33	28.33 ^a	13.78	11.43
Osmancık-97,Yapraktan,2	49.70	26.33	96.67	24.67	11.10 ^b	10.43	10.77
Osmancık-97,Yapraktan,3	54.24	23.00	101.67	21.67	14.00 ^b	9.80	11.41
Terme Baldo,Topraktan,0.5	43.19	20.67	70.00	18.00	6.87 ^b	6.43	9.19
Terme Baldo,Topraktan,1	43.82	23.33	83.33	22.00	7.87 ^b	7.57	9.21
Terme Baldo,Topraktan,2	43.09	25.33	81.67	24.67	8.90 ^b	8.43	8.89
Terme Baldo,Topraktan,3	49.62	22.67	110.00	21.67	13.50 ^b	12.68	10.01
Terme Baldo,Yapraktan,0.5	44.30	23.00	81.67	20.33	7.92 ^b	7.60	9.00
Terme Baldo,Yapraktan,1	43.96	21.67	73.33	21.33	6.63 ^b	6.17	9.03
Terme Baldo,Yapraktan,2	47.79	23.00	93.33	22.33	7.90 ^b	6.98	9.34
Terme Baldo,Yapraktan,3	45.70	23.33	86.67	21.00	8.37 ^b	7.75	9.18

(**p<0.01, *p<0.05, ö.d.: önemli değil). **BB:** Bitki Boyu, **SS:** Sap Sayısı, **YA:** Yaş Ağırlık, **Salkım S.:** Salkım Sayısı, **Sap KA:** Sap Kuru Ağırlığı, **Salkım YA:** Salkım Yaş Ağırlığı, **Salkım B.:** Salkım Boyu.

Çizelge 2. Çeşit, çeşit*uygulama interaksyonunu, doz, çeşit*doz, uygulama*doz ve çeşit*uygulama*doz interaksyonunun çeltiğin bazı bitkisel özellikleri üzerinde etkileri

	BB	SS	BYA	Salkım S.	Sap YA	Sap KA	Salkım B.
Çeşit	**	**	**	**	**	**	ö.d.
Aslı	0.14 ^b	2.94 ^b	3.58 ^a	16.24 ^b	5.10 ^b	14.75 ^b	46.30
Osmancık 97	0.20 ^a	3.85 ^a	3.25 ^c	19.16 ^a	4.78 ^c	17.00 ^a	41.33
Terme baldo	0.13 ^b	2.54 ^b	3.43 ^b	13.55 ^c	5.39 ^a	12.87 ^c	42.99
Çeşit*Uygulama	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.	ö.d.
Aslı,Topraktan	0.14	2.98	3.60	15.76	4.94 ^{bc}	14.37	45.87
Aslı,Yapraktan	0.14	2.90	3.56	16.72	5.27 ^{ab}	15.14	46.73
Osmancık-97,Topraktan	0.20	3.82	3.32	17.51	5.04 ^b	16.77	39.13
Osmancık-97,Yapraktan	0.21	3.87	3.18	20.81	4.51 ^c	17.24	43.53
Terme Baldo,Topraktan	0.14	2.63	3.44	13.65	5.25 ^{ab}	12.76	41.83
Terme Baldo,Yapraktan	0.12	2.45	3.42	13.46	5.53 ^a	12.98	44.15
Doz	ö.d.	ö.d.	*	*	**	ö.d.	ö.d.
0.5	0.15	3.16	3.32 ^b	16.27 ^{ab}	4.78 ^b	15.08	40.29
1	0.17	3.01	3.48 ^a	17.53 ^a	5.09 ^{ab}	15.00	43.46
2	0.14	2.89	3.47 ^{ab}	15.18 ^b	5.13 ^{ab}	14.16	43.13
3	0.17	3.37	3.41 ^{ab}	16.30 ^{ab}	5.36 ^a	15.27	47.29
Çeşit*Doz	**	*	ö.d.	**	*	ö.d.	ö.d.
Aslı,0.5	0.14 ^{cde}	3.31 ^{abc}	3.55	16.73 ^{bcd}	4.93 ^{abc}	14.98	41.97
Aslı,1	0.14 ^{cde}	2.80 ^{abc}	3.62	16.24 ^{bcd}	5.27 ^{ab}	14.94	51.20
Aslı,2	0.12 ^{cde}	2.38 ^{bc}	3.67	15.29 ^{bcd}	5.13 ^{ab}	14.06	45.63
Aslı,3	0.15 ^{bcde}	3.28 ^{abc}	3.48	14.86 ^{bcd}	5.09 ^{ab}	13.92	46.40
Osmancık-97,0.5	0.18 ^{bc}	4.02 ^a	3.12	13.78 ^{cd}	4.16 ^c	13.14	38.63
Osmancık-97,1	0.26 ^a	3.97 ^a	3.34	12.55 ^d	4.65 ^{bc}	11.91	36.30
Osmancık-97,2	0.18 ^{bcd}	3.56 ^{ab}	3.27	23.30 ^a	4.96 ^{ab}	18.12	44.47
Osmancık-97,3	0.21 ^{ab}	3.84 ^a	3.27	16.47 ^{bcd}	5.33 ^{ab}	15.42	45.93
Terme Baldo,0.5	0.12 ^{de}	2.14 ^c	3.29	17.81 ^{bc}	5.25 ^{ab}	16.81	40.27
Terme Baldo,1	0.12 ^e	2.28 ^{bc}	3.49	19.08 ^{ab}	5.35 ^{ab}	17.68	42.87
Terme Baldo,2	0.13 ^{cde}	2.75 ^{abc}	3.46	16.69 ^{bcd}	5.30 ^{ab}	15.18	39.30
Terme Baldo,3	0.15 ^{bcde}	2.98 ^{abc}	3.48	13.03 ^{cd}	5.65 ^a	12.38	49.53
Uygulama*Doz	ö.d.	ö.d.	*	*	*	ö.d.	ö.d.
Topraktan,0.5	0.15	3.13	3.40 ^{ab}	15.55 ^{ab}	4.85 ^{ab}	14.98	36.44
Topraktan,1	0.16	3.13	3.55 ^a	16.50 ^{ab}	5.10 ^{ab}	15.09	44.09
Topraktan,2	0.15	2.88	3.41 ^{ab}	14.46 ^b	5.05 ^{ab}	13.50	42.36
Topraktan,3	0.18	3.42	3.46 ^{ab}	16.04 ^{ab}	5.31 ^a	14.96	46.22
Yapraktan,0.5	0.14	3.18	3.24 ^b	16.98 ^{ab}	4.71 ^b	15.17	44.13
Yapraktan,1	0.18	2.89	3.42 ^{ab}	18.55 ^a	5.07 ^{ab}	14.91	42.82
Yapraktan,2	0.14	2.91	3.52 ^a	15.89 ^{ab}	5.21 ^{ab}	14.81	43.91
Yapraktan,3	0.16	3.32	3.36 ^{ab}	16.56 ^{ab}	5.40 ^a	15.58	48.36
Çeşit*Uygulama* Doz	**	*	*	*	*	*	ö.d.
Aslı,Topraktan,0.5	0.15 ^{bcd}	3.35 ^{abc}	3.62 ^{ab}	16.03 ^{bcde}	4.90 ^{abc}	14.45 ^{ab}	36.80
Aslı,Topraktan,1	0.14 ^{bcd}	2.67 ^{abc}	3.53 ^{abc}	14.73 ^{bcde}	4.95 ^{abc}	13.33 ^{ab}	50.07
Aslı,Topraktan,2	0.12 ^{bcd}	2.57 ^{abc}	3.61 ^{ab}	15.27 ^{bcde}	4.93 ^{abc}	14.07 ^{ab}	46.33
Aslı,Topraktan,3	0.15 ^{bcd}	3.33 ^{abc}	3.63 ^a	17.00 ^{abcde}	4.99 ^{abc}	15.62 ^{ab}	50.27
Aslı,Yapraktan,0.5	0.13 ^{bcd}	3.27 ^{abc}	3.47 ^{abc}	17.35 ^{abcde}	4.97 ^{abc}	15.90 ^{ab}	47.13
Aslı,Yapraktan,1	0.14 ^{bcd}	2.93 ^{abc}	3.72 ^a	18.72 ^{abcde}	5.59 ^a	16.62 ^{ab}	52.33
Aslı,Yapraktan,2	0.12 ^{bcd}	2.18 ^{abc}	3.73 ^a	15.32 ^{bcde}	5.33 ^{abc}	13.77 ^{ab}	44.93
Aslı,Yapraktan,3	0.16 ^{bcd}	3.23 ^{abc}	3.33 ^{abc}	15.48 ^{bcde}	5.19 ^{ab}	14.27 ^{ab}	42.53
Osmancık-97,Topraktan,0.5	0.18 ^{bcd}	4.17 ^{ab}	3.21 ^{abc}	16.93 ^{abcde}	4.55 ^{abc}	15.37 ^{ab}	36.07
Osmancık-97,Topraktan,1	0.20 ^{bc}	4.22 ^a	3.60 ^{ab}	21.60 ^{ab}	5.16 ^{ab}	19.38 ^a	33.93
Osmancık-97,Topraktan,2	0.20 ^{bc}	3.45 ^{abc}	3.24 ^{abc}	15.98 ^{bcde}	5.13 ^{ab}	14.75 ^{ab}	45.13
Osmancık-97,Topraktan,3	0.21 ^b	3.45 ^{abc}	3.22 ^{abc}	15.53 ^{bcde}	5.33 ^{ab}	14.58 ^{ab}	41.40
Osmancık-97,Yapraktan,0.5	0.18 ^{bcd}	3.87 ^{abc}	3.03 ^c	21.22 ^{abc}	3.78 ^c	16.98 ^{ab}	41.20
Osmancık-97,Yapraktan,1	0.31 ^a	3.72 ^{abc}	3.08 ^{bc}	25.00 ^a	4.13 ^{bc}	16.85 ^{ab}	38.67
Osmancık-97,Yapraktan,2	0.15 ^{bcd}	3.67 ^{abc}	3.30 ^{abc}	16.95 ^{abcde}	4.79 ^{abc}	16.08 ^{ab}	43.80
Osmancık-97,Yapraktan,3	0.20 ^{bc}	4.23 ^a	3.32 ^{abc}	20.08 ^{bcde}	5.33 ^{ab}	19.03 ^{ab}	50.47
Terme Baldo,Topraktan,0.5	0.12 ^{bcd}	1.88 ^c	3.36 ^{abc}	13.68 ^{cde}	5.11 ^{ab}	12.13 ^{ab}	36.47
Terme Baldo,Topraktan,1	0.13 ^{bcd}	2.52 ^{abc}	3.51 ^{abc}	13.17 ^{cde}	5.19 ^{ab}	12.55 ^{ab}	48.27
Terme Baldo,Topraktan,2	0.12 ^{cd}	2.63 ^{abc}	3.38 ^{abc}	12.13 ^{de}	5.08 ^{ab}	11.70 ^{ab}	35.60
Terme Baldo,Topraktan,3	0.18 ^{bcd}	3.48 ^{abc}	3.52 ^{abc}	15.60 ^{bcde}	5.60 ^a	14.67 ^{ab}	47.00
Terme Baldo,Yapraktan,0.5	0.11 ^{cd}	2.40 ^{abc}	3.23 ^{abc}	12.38 ^{de}	5.39 ^a	12.62 ^{ab}	44.07
Terme Baldo,Yapraktan,1	0.10 ^d	2.03 ^{bc}	3.46 ^{abc}	11.93 ^e	5.50 ^a	11.27 ^b	37.47
Terme Baldo,Yapraktan,2	0.15 ^{bcd}	2.87 ^{abc}	3.55 ^{abc}	15.42 ^{bcde}	5.52 ^a	14.57 ^{ab}	43.00
Terme Baldo,Yapraktan,3	0.12 ^{bcd}	2.48 ^{abc}	3.44 ^{abc}	14.12 ^{bcde}	5.69 ^a	13.45 ^{ab}	52.07

(**p<0.01, *p<0.05, ö.d.: önemli değil). **Salkım KA:** Salkım Kuru Ağırlığı, **YS:** Yaprak Sayısı, **YYA:** Yaprak Yaş Ağırlığı, **GÇ:** Gövde Çapı, **YKA:** Yaprak Kuru Ağırlığı, **Sap YA:** Sap Yaş Ağırlığı, **STS:** Salkımda Tane Sayısı.

Yaprak yaş ağırlığı (g/saksı) ve yaprak kuru ağırlığı (g/saksı)

Denemede ele alınan çeltik çeşitlerinin, farklı Vermikompost dozları ve uygulamalarının yaprak yaş ağırlık ve yaprak kuru ağırlığına ait ortalama değerleri ve istatistiksel önem seviyeleri Çizelge 2’de verilmiştir. Çizelgeden görüleceği gibi çeltik çeşitlerinin yaprak yaş ağırlığına etkisi istatistiksel olarak

çok önemli, Vermikompost dozları ve Çeşit*Vermikompost dozları*uygulamalar interaksyonu ise istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Yaprak yaş ağırlığı değerleri ortalama 11.93 g-25.00 g arasında değişmiş ve en yüksek yaprak yaş ağırlığı Osmancık-97 çeşidinde %1 Vermikompost dozunun yapraktan uygulamasından elde edilmiştir. En düşük yaprak yaş ağırlığı ise Terme Baldo çeşidinde %0.5 Vermikompost dozunun yine yapraktan uygulanmasından alınmıştır. Bulgulardan anlaşıldığı gibi yaprak yaş ağırlığına çeşitlerin ve Vermikompost uygulamalarının etkisi olmuş fakat uygulama yöntemlerinin etkisi olmamıştır. Öte yandan yaprak kuru ağırlığı bakımından çeşitler arasında istatistiksel olarak önemli farklılık tespit edilmiş ancak Vermikompost dozlarının etkisi ise önemli çıkmamıştır. Çeşit* Vermikompost dozları*uygulamalar interaksyonu ise istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Araştırma sonucunda yaprak kuru ağırlığı 11.27 g -19.38 g arasında değişim göstermiştir. En yüksek yaprak kuru ağırlığı; Osmancık-97 çeşidinin %1 Vermikompost dozunda topraktan uygulamasında ve en düşük ise Terme Baldo çeşidinin yine %1 Vermikompost dozunda topraktan uygulamasından elde edilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi yaprak kuru ağırlığına çeşitlerin ve Vermikompost dozlarının etki ettiği ancak uygulamalar arasında herhangi bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Yaprak yaş ağırlığı ve yaprak kuru ağırlığı ile ilgili bulgularımız, Kalender ve Doğan (2021)'in çalışmasıyla benzer iken, Toksoy (2019)'un sonucuna uyumlu bulunmamıştır.

Gövde çapı (mm)

Araştırma konusu faktörlere ait gövde çapı ortalama değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi Çeltik çeşitlerinin ve Vermikompost dozlarının gövde çapına etkisi istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur. Çeşit*Vermikompost dozları*uygulamalar interaksyonu ise istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Araştırma sonuçlarına göre gövde çapı ortalama değerleri 3.78 mm-5.69 mm arasında değişim göstermiştir. En yüksek gövde çapı Terme baldo çeşidinde %3 Vermikompost dozunun yapraktan uygulamasından elde edilmiştir. Ancak yine Terme baldo çeşidinin yapraktan uygulanan diğer Vermikompost dozları arasında istatistiksel olarak fark çıkmamış ve aynı gruba oluşturmuşlardır. Ayrıca Terme baldo çeşidine topraktan uygulanan % 3 Vermikompost dozu da aynı grupta yer almıştır. En düşük gövde çapı ise Osmancık-97 çeşidinde % 0.5 Vermikompost dozunda yapraktan uygulamadan elde edilmiştir. Terme baldo çeşidinin diğer çeşitlere göre genetik yapısından kaynaklanan daha kalın bir gövde yapısına sahip olduğu görülmektedir. Öte yandan Vermikompost dozları arttıkça bütün çeşitlerde gövde çapının arttığı belirlenmiştir. Çeltikte solucan gübresinin gövde çapına olan etkilerini belirlemek amacıyla yürütülen bazı çalışmalarda gövde çapını, Ünán, (2011) 4.53-4.92 mm; Sonkaya, (2017) 2.80-4.99 mm; Temür, (2016) 3.30-3.74 mm değerleri arasında bulmuşlar ve Vermikompostun gövde çapını artırdığını belirtmişlerdir.

Salkımda tane sayısı

Araştırma da ele alınan faktörlerin salkımda tane sayısına etkisine ait ortalama değerler Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi çeşitlerin, Vermikompost dozlarının ve uygulamaların salkımda tane sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Salkımda tane sayısı 33.93-52.25 adet arasında tespit edilmiştir. Nishi ve ark., (2019), benzer bir çalışmada bitki başına en yüksek salkımda tane sayısını 70.33-153.33 adet ve Krishnapriya ve Padmadevi (2011) 187-192 adet arasında tespit etmişlerdir. Belirtilen araştırmacıların sonuçlarındaki değerlerin bulgularımızdan oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Salkım boyu (cm)

Deneme faktörlerine ait salkım boyu ortalama değerleri ve istatistiksel gruplandırmalar çizelge 1 de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi çeltik çeşitlerinin ve Vermikompost dozlarının salkım boyuna etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmış, interaksyonların etkisi ise önemli çıkmamıştır. En yüksek

salkım boyu 11.23 cm ile Osmancık-97 çeşidinden elde edilmiş bunu sırasıyla 9.23 cm ile Terme Baldo ve 8.93 cm ile Aslı çeşidi izlemiştir. Terme Baldo ile Aslı çeşidi aynı grupta yer almıştır. Öte yandan Vermikompost dozlarında en yüksek salkım boyu 10.20 cm ile %3 dozundan en düşük ise 9.38 cm ile %2 dozundan elde edilmiştir. Ancak %2 lik doz ile %1 ve %0.1 dozları arasında istatistiksel olarak önemli fark görülmemiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere artan solucan gübresi dozunun salkım uzunluğuna oldukça etkili olduğu görülmektedir. Solucan gübresinin çeltikte salkım uzunluğuna etkilerinin incelendiği bazı çalışmalarda benzer şekilde solucan gübresinin başak uzunluğunu artırdığı görülmüştür (Nishi ve ark., 2019; Ünan, 2011; ve Saha ve ark., 2013; Ramesh 2018). Ancak farklı tahıl türlerinde (buğday) yapılan çalışmalarda, solucan gübresinin başak uzunluğuna etkili olmadığını bildirilmiştir (Günhan, 2020; Yousefi ve Sadeghi, 2014).

Sap sayısı (adet/saksı)

Denemede yapılan uygulama, doz ve çeltik çeşitlerin sap sayısına etkisine ait ortalama değerler ve istatistiksel gruplar çizelge 1’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere, araştırmada sap sayısı 19.33-26.67 arasında tespit edilmiş ve uygulama, doz, çeşit ve interaksiyonların sap sayısına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Sap sayısı, daha çok türün veya çeşidin genetik yapısından kaynaklı olarak ortaya çıkan bir özellik olması nedeniyle, bu çalışmada yapılan uygulamaların etkili olmadığı görülmüştür. Yapılan benzer çalışmalarda, solucan gübresinin, bulgularımıza benzer şekilde metrekaresine sap veya kardeşlenme sayısına etkili olmadığı bildirilmiştir (Irmak, 2019; Kahraman, 2006). Ancak Kumar ve ark., (2022), Meena ve ark., (2020); Nayak ve ark., (2019) yaptıkları çalışmalar da bulgularımızdan farklı olarak solucan gübresinin sap veya kardeş sayısını artırdığını bildirmişlerdir.

SONUÇ

Bu araştırma ile farklı vermikompost uygulamasının ve uygulanan dozların, üç farklı çeltik çeşidindeki bitkisel özelliklere etkileri, Ordu ekolojik koşullarında ve sera şartlarında incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre çeşitlerin bitki boyuna, sap kuru ağırlığına, salkım yaş ağırlığına, salkım boyuna, salkım kuru ağırlığına, yaprak sayısına, yaprak yaş ağırlığına, gövde çapına, yaprak kuru ağırlığına ve sap yaş ağırlığına etkisi önemli, sap sayısına, bitki yaş ağırlığına, salkım sayısına ve salkımda tane sayısına etkisi önemsiz çıkmıştır. Vermikompost dozlarının bitki boyuna, salkım boyuna, yaprak sayısına, yaprak yaş ağırlığına, gövde çapına ve sap yaş ağırlığına etkisi önemli, diğer gözlemlere ise etkisi önemli çıkmamıştır. Vermikompost dozları arttıkça belirtilen özelliklerde artış olduğu görülmüştür. Öte yandan, çeşit*uygulama*doz interaksiyonu salkım yaş ağırlığı, salkım kuru ağırlığı, yaprak sayısı, yaprak yaş ağırlığı, gövde çapı, yaprak kuru ağırlığı ve sap yaş ağırlığı özellikleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgulara göre, solucan gübresinin çeltik bitkisinde bazı bitkisel özellikleri olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Bu nedenle çeltik yetiştiriciliğinde solucan gübresinin tavsiye edilebileceği kanaatine varılmıştır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

Adiloğlu, A., Eryılmaz A.F., Adiloğlu, S., Solmaz, Y. (2015). Akuakültür Atığı ve Solucan Gübresi Uygulamalarının Salata (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) Bitkisinin Verim, Bazı Bitki Besin Elementi İçeriği İle Bazı Agronomik Özellikleri Üzerine Etkisi. Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: NKUBAP.00.24.AR.15.11. <https://hdl.handle.net/20.500.11776/3230>

- Akay, H. (2020). Bazı Çeltik Çeşitlerinin Fiziksel, Kimyasal ve Pişme Özelliklerinin Belirlenmesi, *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 35, 438-445. <https://doi.org/10.7161/omuanajas.789227>
- Aktaş, T. (2018). Vermikompostun Farklı Tekstüre Sahip Topraklarda Bitki Gelişimine ve Toprakların Fiziksel Kimyasal Özelliklerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/20.500.11776/2610>
- Altunlu, H. (2021). Mikrobiyal Gübre ve Vermikompost Uygulamalarının Baş Salata (*Lactuca sativa* L. Var *sapitata*) Yetiştiriciliğinde Bitki Gelişimi, Verim ve Nitrat İçeriğine Etkisi, *Mediterranean Agricultural Sciences*, 34(1), 135-140. <https://doi.org/10.29136/mediterranean.801439>
- Anonim. (2002). Reference Guide-Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Philippines.
- Anonim. (2003). Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı, Çeltik, Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Ankara.
- Ateş, K. A., Demirkıran, A. R., Orhan, İ. (2019). Toprağa Bazı Doğal ve Yapay Gübre İlavelerinin Çilek Bitkisinin Verim Parametreleri Üzerine Olan Etkileri, *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 8(2), 23-28.
- Balasubramanian, A. (2019). Effect of Integrated Nutrient Management on Growth and Yield of Rice (*Oryza Sativa* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 1047-1049.
- Boz, F. (2019). Farklı azot formlarının ve hümitik asit dozlarının çeltikte (*Oryza sativa* L.) verim ve verim öğeleri üzerine etkisi, *Akademik Ziraat Dergisi*, 11(1), 91-98. <https://doi.org/10.29278/azd.898755>
- Demir, H., Polat, E., Sönmez, İ. (2010). Ülkemiz İçin Yeni Bir Organik Gübre: Solucan Gübresi, *Tarım Aktüel Dergisi*, 14, 54-60.
- Gizem, A., Köksal, S. B., Altay, H. (2017). Vermikompostun Bazı Toprak Özellikleri ve Pazı Bitkisinde Verim Üzerine Etkisi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(2):123-128.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Cakmak, I. (2006). Genotypic Variation in Phosphorus Efficiency Between Wheat Cultivars Grown Under Greenhouse and Field Conditions, *Soil Science and Plant Nutrition*, 52, 470-478. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00068.x>
- Günhan, T. (2020). Azaltılmış Azot Gübresi Uygulamaları ve Solucan Gübresi Kombinasyonlarının Pehlivan Ekmeklik Buğday Çeşidinde (*Triticum Aestivum* L.) Verim ve Verim Öğeleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi (Doktora Tezi). Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <http://acikerisim.uludag.edu.tr/jspui/handle/11452/11141>
- Inal, A., Gunes, A., Sahin, O., Taskin, M. B., Kaya, E. C. (2015). Impacts of Biochar and Processed Poultry Manure, Applied to A Calcareous Soil on The Growth of Bean and Maize. *Soil Use and Management*, 31, 106-113. <https://doi.org/10.1111/sum.12162>
- Irmak, H. (2019). Edirne Ekolojik Koşullarında Ekmeklik Buğdayda (*Triticum Aestivum* L.) Farklı Üst Gübre Uygulamalarının Verim ve Kalite Üzerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/20.500.11776/3515>
- İdikut, L., Akkaya A, Dokuyucu T, Bozok H. (2010). Agronomic Characters of Landrace Yellowrice (*Oryza sativa* L.) Selected According to Plant Height and Panicle Properties, *Pakistan Journal Botany*, 42(5), 3165-3171.
- Kahraman, T. (2006). Bazı Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Farklı Ekim Zamanı ve Azotlu Gübreleme Uygulamalarının, Tane Dolu Süresi ve Tane Dolu Oranı ile Verim ve Kalite Unsurlarına Etkilerinin Belirlenmesi (Doktora Tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <file:///C:/Users/g%C3%B6zde/Downloads/183287.pdf>
- Kalender, N., Doğan, Y. (2021). Determination of The Effects of Worm Fertilizer on Yield and Yield Traits of Durum Wheat (*Triticum Durum* L.) Cultivars, *Mas Journal of Applied Sciences*, 6(5), 1149-1159. <https://doi.org/10.52520/masjaps.176>
- Kant C., Aydın, A., Barik, K. (2006). Erzurum Daphan ve Pasinler Ovası Toprak Örneklerine Suya Doygun Koşullarda Uygulanan Değişik Azotlu Gübrelerin Çeltik Bitkisinin Gelişimine, Mineral İçeriğine, Besin Maddesi Alımı ve Yıkanmasına Etkisi, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 37(2), 145-152.
- Krishnapriya, K., Padmadevi, S. N. (2011). Effect of Panchagavya on The Growth and Biochemical Contents of *Oryza Sativa* var. Ponni. *Asian Journal of Bio Science*, 6(2), 258-259.
- Kumar, A., Singh, S. K., Kumar, R., Sanwal, P., Gautam, S. K. (2022). Effect of Different Nitrogen Sources on Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa*). *International Journal of Plant & Soil Science*, 34(24), 430-439.
- Küçükymuk, Z., Gültekin, M., Erdal, İ. (2014). Vermikompost ve Mikorizanın Biber Bitkisinin Gelişimi ile Mineral Beslenmesi Üzerine Etkisi. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(1), 51-58.
- Meena, H., Singh, M. K., Rani, M. (2020). Influence of Varying Seed Rates and Integrated Nutrient Management on Performance of Direct-Seeded Hybrid Rice (*Oryza Sativa*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 90(11), 2059-2063.

- Nayak, M., Swain, D. K., Sen, R. (2019). Strategic Valorization of De-Oiled Microalgal Biomass Waste as Biofertilizer for Sustainable and Improved Agriculture of Rice (*Oryza Sativa* L.) Crop. *Science of The Total Environment*, 682, 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.123>
- Nishi, K. N., Rahman, S., Nakamura, K., Rahman, M. K. (2019). Influence of Vermicompost and NPK on The Growth and Protein Content of Boro Rice (*Oryza Sativa* L.). *Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management*, 5(2), 69-74. <https://doi.org/10.3329/jbcbm.v5i2.44916>
- Özer, S. (2018). Çeltik (*Oryza sativa* L.) Yetiştiriciliğinde Bitki Su Tüketimi Bileşenleri ile Su-Üretim Fonksiyonlarının Farklı Sulama Yöntemleri Altında Belirlenmesi (Doktora Tezi). Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/20.500.11776/3592>
- Özkan, N., Dağlıoğlu, M., Ünser, E., Müftüoğlu, N. M. (2016). Vermikompostun Ispanak (*Spinacia Oleracea* L.) Verimi ve Bazı Toprak Özellikleri Üzerine Etkisi. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(1), 1-5.
- Ramesh, S. (2018). Influence of Various Organic Sources of Nutrients on Productivity Enhancement in Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 5(3), 2010-2013.
- Saha, R., Saieed, M., Chowdhury, M. (2013). Growth and Yield of Rice (*Oryza Sativa*) as Influenced by Humic Acid and Poultry Manure. *Universal Journal of Plant Science*, 1(3), 78-84. <https://doi.org/10.13189/ujps.2013.010304>
- Sakaroğlu, E. (2011). Çeltikte (*Oryza sativa* L.) Farklı Ekim Sıklıklarının Kardeşlenme Kapasitesi ile Verim ve Kalite Unsurlarına Etkisi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. <https://hdl.handle.net/20.500.11776/839>
- Sezer, İ. (1993). Çeltiğin verim, verim unsurları ile bazı kalite karakterlerine ekim yöntemi ve bitki sıklığının etkileri üzerine bir araştırma (Doktora Tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, <http://libra.omu.edu.tr/tezler/37252.pdf>
- Sezer, İ., Şenocak, H., Akay, H. (2017). Bazı çeltik çeşitlerinde fideleme ve serpme ekim yöntemlerinin karşılaştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 20, 292-296. <https://doi.org/10.18016/ksudobil.349263>
- Sonkaya, M. C. (2017). Bazı Çeltik (*Oryza sativa* L.) Çeşitlerinde Çinkonun Verim, Verim Ögeleri ve Kaliteye Etkilerinin Belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. <http://earsiv.odu.edu.tr:8080/xmlui/handle/11489/965>
- Sridhar, K. R., Ashwini, K. M., Seena, S., Sreepada, K. S. (2006). Manure Qualities of Guano of Insectivorous Cave Bat *Hipposideros Speoris*, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 6, 103-110.
- Şavşatlı, Y., Köycü, C., Gülümser, A. (2006). Fideleme ve Serpme Ekim Yöntemlerinin Bazı Çeltik Çeşitlerinde Verim ve Verim Unsurlarına Etkileri, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(1), 6-13.
- Tavalı, İ. E., İlker, U. Z., Orman, Ş. (2014). Vermikompost ve Tavuk Gübresinin Yazlık Kabağın (*Cucurbita Pepo* L. Cv. Sakız) Verim ve Kalitesi ile Toprağın Bazı Kimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(2).
- Temür, G. (2016). Bazı çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşitlerinde silisyumun verim, verim ögeleri ve kaliteye etkilerinin belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <http://earsiv.odu.edu.tr:8080/xmlui/handle/11489/873>
- Toksoy, E. (2019). Ispanakta Vermikompost (*Solucan Gübresi*) ve Karaizopot (*Porcellio Laevis*) Gübresi Uygulamalarının Bitki Gelişimi ve Besin İçerikleri Üzerine Etkisi, (Doktora Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tuna, B. (2012). Trakya Koşulları Çeltik (*Oryza sativa* L.) Tarımında Farklı Sulama Uygulamaları ve Su-Verim-Kalite İlişkilerinin Belirlenmesi, (Doktora Tezi). Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/20.500.11776/274>
- Ünan, R. (2011). Çeltikte (*Oryza sativa* L.), *Trinexapac-Ethyl Dozları ve Ekim Sıklığının Yatma ile Bazı Agronomik ve Kalite Özelliklerine Etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: [file:///C:/Users/g%C3%B6zde/Downloads/299224%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/g%C3%B6zde/Downloads/299224%20(1).pdf)
- Ünan, R. (2016). Çeltikte (*Oryza sativa* L.) Soğuk Stresinin Verim ve Kalite Unsurlarına Etkileri ile Soğuk Stresine Toleranslı Genotiplerin Morfolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi (Doktora Tezi). Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erişim adresi: <https://hdl.handle.net/20.500.11776/438>
- Yaviç, Ş., Demir, S., Boyno, G. (2020). Solucan Gübresi (Vermikompost)'nin Domates (*Solanum lycopersicum*)'te *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary'un Neden Olduğu Kök Çürüklüğü Hastalığına Etkileri, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1), 13-20.
- Yousefi, A. A., Sadeghi, M. (2014). Effect of Vermicompost and Urea Chemical Fertilizers on Yield and Yield Components of Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field condition. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(12), 1227-1230.

Atf İçin: Gökdere, H. İ., Yılmaz, A. B., Tekin, M., Yeken, M. Z. ve Çiftçi, V. (2023). Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Dane Verimi ve Bazı Önemli Kalite Özellikleri için Trakya Bölgesinde Bulunan Farklı Çevrelerde Testlenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 3040-3052.

To Cite: Gökdere, H. İ., Yılmaz, A. B., Tekin, M., Yeken, M. Z. & Çiftçi, V. (2023). Multienvironment Testing of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Grain Yield and Some Important Quality Traits in Thrace region in Türkiye. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3040-3052.

Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Dane Verimi ve Bazı Önemli Kalite Özellikleri için Trakya Bölgesinde Bulunan Farklı Çevrelerde Testlenmesi

Halil İbrahim GÖKDERE¹, Ali Baran YILMAZ¹, Mehmet TEKİN², Mehmet Zahit YEKEN^{3*}, Vahdettin ÇİFTÇİ³.

Öne Çıkanlar:

- GGE biplot
- AMMI
- Islah

Anahtar Kelimeler:

- Ekmeklik buğday
- Çevre
- Genotip
- Etkileşim

ÖZET:

Bu çalışma, toplamda 27 çeşit ve çeşit adaylarının dane verimi ve bazı önemli kalite özellikleri bakımından genotip x çevre etkileşimi temel bileşen, GGE biplot ve AMMI analizleri değerlendirmek amacıyla Trakya bölgesini temsil eden dört farklı çevrede 2020-2021 sezonunda yürütülmüştür. Denemeler tesadüf blokları deneme desenine göre dört tekerrürlü yürütülmüş olup ve tarımsal ve kalite özelliklerinden başaklanma gün sayısı, bitki boyu, dane verimi, bin dane ağırlığı, hektolitre ağırlığı, dane sertliği, protein oranı, Zeleny sedimentasyon, Alveograf enerji değeri, yaş gluten oranı ve gluten indeksi çalışma kapsamında incelenmiştir. Çalışmada, dane veriminde en yüksek varyasyon Tekirdağ çevresinde belirlenmiş olup en yüksek verim ise Edirne çevresinde belirlenmiştir. GGE biplot analizine göre iki farklı mega çevre oluşmuş ve iki temel bileşen toplamda %89.97 genotip x çevre ilişkisini açıklamıştır. AMMI temelli varyans analizi sonucunda ise genotip, çevre, tekerrür ve genotip x çevre etkileşimini bakımından istatistiki olarak önemli etkiler tespit edilmiştir. En stabil genotipler ise Ez11 ve Rumeli olarak belirlenirken LG Arnova çeşidi dört çevrede de öne çıkan dört genotipten biri olmuştur. Korelasyon analizine sonucunda kalite özellikleri arasında istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) pozitif ilişkiler tespit edilirken dane verimi ile diğer tarımsal ve kalite özellikleri arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. İlk dört temel bileşen 1'in üzerinde eigen değerine sahip olarak bulunmuş ve varyasyonun %74'ünden fazlasını açıklamıştır. LG Arnova, Artek, Axum, Alpan ve Vassa çeşit/çeşit adayları özellikle dane verimi bakımından ilgili çevrelerde öne çıkan çeşitler olmuşlardır. Bu konuda daha detaylı sonuçlar elde etmek için genotiplerin ilgili çevrelerde daha uzun süreyle denemesi gerekmektedir.

Multienvironment Testing of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes for Grain Yield and Some Important Quality Traits in Thrace Region in Türkiye

Highlights:

- GGE biplot
- AMMI
- Breeding

Keywords:

- Bread wheat
- Environment
- Genotype
- Interaction

ABSTRACT:

This study was conducted in four different environments representing the Thrace region during the 2020-2021 season to evaluate genotype x environment interaction (GEI) using the principal component (PC), genotype x environment biplot (GGE biplot) and AMMI analyses for a total of 27 varieties and candidate varieties for grain yield and some important quality traits. The experiments were carried out in a randomized complete block design with four replications. Agricultural and quality traits including heading date, plant height, grain yield, thousand grain weight, volume weight, grain hardness, protein ratio, Zeleny sedimentation, Alveograph energy value, wet gluten content, and gluten index were examined in this study. The highest variation in grain yield was determined in Tekirdağ, while the highest yield was in Edirne in average. GGE biplot analysis revealed that two different mega-environments were determined, and two main components explained a total of 89.97% of the GEI. The AMMI-based variance analysis also revealed statistically significant effects for genotype, environment, replication, and GEI. The most stable genotypes were determined as Ez11 and Rumeli, with the LG Arnova variety being one of the four genotypes prominent in all four environments. Correlation analysis resulted in statistically significant positive relationships ($p<0.05$) between quality traits, whereas no significant relationships were observed between grain yield and other agricultural and quality traits. The first four PCs had eigenvalues exceeding 1, explaining more than 74% of the total variation. LG Arnova, Artek, Axum, Alpan, and Vassa varieties/candidate varieties have particularly stood out for grain yield in all environments. To obtain more concrete data in this regard, further studies need to be conducted for a longer period in these environments.

¹Halil İbrahim GÖKDERE (Orcid ID: 0000-0002-0948-1109), Ali Baran YILMAZ¹ (Orcid ID: 0009-0006-3806-7755), Tarım ve Orman Bakanlığı, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

²Mehmet TEKİN (Orcid ID: 0000-0002-3447-1586), Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya, Türkiye

³Mehmet Zahit YEKEN (Orcid ID: 0000-0003-0490-371X), Vahdettin ÇİFTÇİ (Orcid ID: 0000-0003-0547-9527), Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bolu, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet Zahit YEKEN, e-mail: yekenzahit@gmail.com

GİRİŞ

Buğday gerek dünyada gerekse ülkemizde ekimi en çok yapılan tahıldır ve dünyadaki yıllık üretimi 770 milyon ton civarındadır (FAOSTAT, 2023). Günümüze dek üretilen buğday miktarı insan nüfusunu beslemede yeterli iken hızla artan insan nüfusu ve özellikle küresel ısınmaya bağlı olarak yaşanan kuraklıklar üretilen buğdayın insan nüfusuna oranla artmadığını göstermiştir. Ayrıca Çin gibi yüksek nüfuslu ülkelerin de gelir artışına paralel buğday tüketimine yönelmeleri dünyada buğday üretimini stratejik hale getirmektedir. Her ne kadar son yıllarda yıllık yağış rejimindeki dalgalanmadan kaynaklı olarak sıralamadaki yeri değişse de Türkiye buğday üretiminde dünyada ortalama olarak 10. sırada yer almaktadır. Ülkemizdeki yıllık buğday üretimi iklimsel ve coğrafik koşullara bağlı olarak 16 ile 21 milyon ton arasında değişmektedir (TÜİK, 2023). 2022 yılı TÜİK verilerine göre, ülkemizde yaklaşık 6.6 milyon ha alanda buğday ekimi yapılmış ve 20 milyon ton ürün elde edilmiştir. Bunun yaklaşık 4 milyon tonu makarnalık, 16 milyon tonu ise ekmeklik buğdaydır. Ülkemiz nüfusunun artmasına paralel olarak, buğday üretiminin de artırılması bir zorunluluktur.

Buğdayda dane verimi ve kalite özellikleri gibi kantitatif özellikler, birçok gen tarafından kontrol edilmekte ve çevresel faktörlerden yüksek oranda etkilenmektedir (Nadeem ve ark., 2021). Dolayısıyla çeşitlerin farklı çevrelerde performansları değişiklik gösterebilmektedir. Genotip x çevre interaksyonu olarak tanımlanan performanstaki bu farklılıkların tespit edilmesi ve yüksek değerli genotiplerin seçilmesinin önemi yüksek olup bu performans farklılığını en az düzeyde gösterecek kararlı genotiplerin seçilmesi de oldukça önemlidir. Aynı coğrafi bölgede yer alan çevrelerde bile oldukça yüksek farklılıklar bulunan ülkemizde; değişen çevre şartlarında aynı performansı sürdürebilen kararlı çeşitler yetiştirilmesi de verim ve kalite özelliklerinde istenen düzeye ulaşmada oldukça kritiktir (Aydoğan, 2021). Farklı çevrelerde ve/veya yıllarda yürütülen denemelerin sonuçlarının değerlendirilmesi için genellikle tanımlayıcı istatistikler hesaplanmakta veya varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden faydalanılmaktadır. Ancak bu testler genotiplerin farklı çevre şartlarına verdikleri tepkilerin değerlendirilmesinde tek başına yetersiz kalmaktadır. Bunun yerine birden çok yıl ve çevre koşullarında yürütülen çalışmalarda her bir genotipin dane verimi gibi kantitatif özellikler bakımından kararlılık durumlarını tahmin etmek için geliştirilen birçok istatistik metod bulunmaktadır.

Bunlardan en yaygın kullanılanları ise GGE ve AMMI biplot yöntemleridir. GGE analizleri Genotip ve Genotip x Çevre interaksyonlarının birlikte incelenebildiği, temel bileşenler analizlerine (PCA) dayanan yöntemlerdir. AMMI analizleri ise eklemeli etki ve interaksyona ilişkin (multiplicative) etkileri birlikte ele alan analiz yöntemleridir (Frutos ve ark., 2014). GGE ve AMMI biplot grafikleri ile hem genotiplerin çevrelerdeki durumu hem de çevrelerin birbirleri ile olan farklılıkları ve hangi genotipin hangi çevrede öne çıktığı gibi ilave bilgilere ulaşılacak analizlerdir. Son yıllarda varyans analizinin yanında GGE biplot ve AMMI analizlerinin uygulandığı buğday ve diğer bitki türlerini konu alan araştırma sayısı ülkemizde de artmaya başlamıştır (Ilker ve ark., 2009; Akcura ve ark., 2011; Kendal ve ark., 2016; Erdemci, 2018; Karaman ve ark., 2023).

Trakya bölgesi ülkemizde yaygın olarak ekmeklik buğday üretiminin yapıldığı kritik bölgelerden biridir ve ülkemiz üretimine ortalama olarak 2.5 milyon ton katkı sağladığı bilinmektedir (Konyalı ve Gaytancıoğlu, 2007; Anonim, 2022). Bölgede ortalama yağış miktarı yıldan yıla değişkenlik gösterse de ortalama uzun yıllık toplam yağış 718.8 mm olduğu bilinmektedir. Ayrıca, uzun yıllar iklim verileri incelendiğinde ekmeklik buğday yetiştiriciliğinde verimi belirleyen çimlenme-çıkış, kardeşlenme, sapa kalkma ve çiçeklenme gibi fizyolojik dönemlerini kapsayan sonbahar, kış ve ilkbahar aylarında aylık yağış ve sıcaklık değerlerinde oldukça yüksek varyasyon bulunduğu ve ortalama ve maksimum sıcaklıklarda artan yönde, yağışlarda ise azalan yönde bir trend olduğu belirlenmiştir (Delibaş ve ark.,

2016). Abiyotik stres faktörlerindeki değişimlerden dolayı yıldan yıla fungal kökenli septorya yaprak lekesi ve pas hastalıkları bakımından da verimi olumsuz yönde etkileyecek boyutta epidemiler yaşanmaktadır (Öztürk ve ark., 2018). Dolayısıyla Trakya bölgesinde değişen çevre şartlarına uyum sağlayabilen kararlı çeşitlerin seçilmesi ve yetiştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, ekmeklik buğday ıslah programlarında geliştirilen çeşit adaylarının ve bölgede yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan çeşitlerin farklı çevrelerde dane verimi özelliği için GGE biplot ve AMMI analizleri kullanılarak değerlendirilmesi ve farklı çevrelerde yüksek verim ve kalite özelliklerine sahip genotiplerin belirlenmesi amaçlanmıştır

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada Trakya bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen 5 ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi (Gelibolu, Esperia, Rumeli, Krasunia Odes'ka ve Glosa) ve 22 çeşit adayı (Alpan, Sancaktar, Kurşun, Artek, Axum, Huntaş 59, Primus, DT Odrisa, DT 22, Raifbey, Simten, Hektaş 3, Hektaş 4, BBVD7-2019, Üçyıldız, Dört yıldız, Beşyıldız, Altıyıldız, Onbiryıldız, Ez11, Vassa ve LG Arnova) olmak üzere toplamda 27 genotip genetik materyal olarak kullanılmıştır (Çizelge 1). Denemeler, 2020-2021 yetiştirme sezonunda Edirne, Keşan, Lüleburgaz ve Tekirdağ olmak üzere dört farklı çevrede tesadüf blokları deneme desenine göre dört tekerrürlü her denemede 108 parsel olacak şekilde yürütülmüştür. Bu çevrelere ait iklim verileri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan genetik materyallere ait bilgiler

No	Çeşit/Çeşit adayı	Islah eden kurum/kuruluş	Not
G1	Alpan	Som Un San. ve Tic. Ltd. Şti	Çeşit adayı
G2	Sancaktar	Bama Tohum Tarım Ürünleri San. ve Tic. Ltd. Şti.	Çeşit adayı
G3	Kurşun	Bama Tohum Tarım Ürünleri San. ve Tic. Ltd. Şti.	Çeşit adayı
G4	Artek	Huntaş Hayrabolu Un San. ve Tic. A.Ş	2022 yılında tescil edilmiştir
G5	Axum	Huntaş Hayrabolu Un San. ve Tic. A.Ş	2022 yılında tescil edilmiştir
G6	Huntaş 59	Huntaş Hayrabolu Un San. ve Tic. A.Ş	2022 yılında tescil edilmiştir
G7	Primus	Tarar Un Ve Gıda San. Tic. Ltd.Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G8	Dt Odrisa	Deviren Tarım Ltd. Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G9	Dt 22	Deviren Tarım Ltd. Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G10	Raifbey	Ezzi Tarım Ticaret Sanayi A.Ş.	Çeşit adayı
G11	Simten	Ezzi Tarım Ticaret Sanayi A.Ş.	Çeşit adayı
G12	Hektaş 3 (Kahraman)	Hektaş Ticaret Türk A.Ş.	2022 yılında tescil edilmiştir
G13	Hektaş 4	Hektaş Ticaret Türk A.Ş.	Çeşit adayı
G14	BBVD7-2019 (Harman 22)	Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2022 yılında tescil edilmiştir
G15	Üçyıldız	13 Yıldız Tohumculuk Ltd. Şti.	Çeşit adayı
G16	Dört yıldız	13 Yıldız Tohumculuk Ltd. Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G17	Beşyıldız	13 Yıldız Tohumculuk Ltd. Şti.	Çeşit adayı
G18	Altıyıldız	13 Yıldız Tohumculuk Ltd. Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G19	Onbiryıldız	13 Yıldız Tohumculuk Ltd. Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G20	Ez11 (Kemaller)	Ezzi Tarım Ticaret Sanayi A.Ş.	Çeşit adayı
G21	Vassa	Akçakaya Tarım Tic. ve San. Ltd. Şti.	2022 yılında tescil edilmiştir
G22	LG Arnova	Limagrain Tohum Islah ve Üretim San. Tic. A.Ş	2022 yılında tescil edilmiştir
G23	Gelibolu*	Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2005 yılında tescil edilmiştir
G24	Esperia*	Tasaco Tarım ve San. A.Ş.	2011 yılında tescil edilmiştir
G25	Rumeli*	Trakya Tarım ve Veterinerlik Tic. Ltd. Şti.	2012 yılında tescil edilmiştir
G26	Krasunia Odes'ka*	Marmara Tohum Geliştirme A.Ş.	2008 yılında tescil edilmiştir
G27	Glosa*	Tareks A.Ş.	2014 yılında tescil edilmiştir

*Standart çeşit

Her bir parsel 5 m uzunluğunda 6 sıralı olarak ayarlanmış ve ekimler m²'ye 400 tohum gelecek şekilde deneme mibzeri ile gerçekleştirilmiştir. Sapa kalkma dönemi öncesi 3 g/da metilamin içerikli ilaçlarla yabancı ot mücadelesi yapılmıştır. Ekimle birlikte dekara 5 kg N (%46 N: Üre) ve 5 kg P₂O₅

(18-46-0: DAP) uygulaması yapılmış, kullanılan azotun yarısı ekimde yarısı da sapa kalkma öncesinde verilmiştir. Hasat olgunluğuna gelen parseller, parsel biçerdöveri yardımıyla hasat edilmiştir.

Çizelge 2. Çalışmanın yürütüldüğü çevrelere ait iklim verileri*

Aylar	Çevreler	Aylık toplam yağış (mm)	Aylık ortalama nisbi nem (%)	Aylık minimum sıcaklık (°C)	Aylık maksimum sıcaklık (°C)	Aylık ortalama sıcaklık (°C)
Ekim	Edirne	84.38	73.56	5.30	34.13	17.46
	Keşan	73.80	74.70	4.95	33.60	17.50
	Lüleburgaz	84.38	74.25	5.28	33.79	17.21
	Tekirdağ	68.55	73.62	7.49	32.44	18.76
Kasım	Edirne	5.27	81.38	-0.64	18.19	8.68
	Keşan	0.00	81.20	0.45	18.50	9.19
	Lüleburgaz	5.27	82.75	0.90	17.56	9.04
	Tekirdağ	0.00	81.00	2.87	18.46	11.08
Aralık	Edirne	89.65	89.25	-3.60	17.67	7.77
	Keşan	100.20	89.00	-4.24	17.86	8.45
	Lüleburgaz	52.73	89.69	-2.23	17.54	7.86
	Tekirdağ	63.28	87.38	1.01	17.33	9.65
Ocak	Edirne	200.39	87.44	-7.09	17.74	5.65
	Keşan	253.10	87.50	-6.30	17.86	6.36
	Lüleburgaz	147.66	86.88	-7.50	17.89	5.48
	Tekirdağ	163.48	84.31	-4.57	17.60	7.25
Şubat	Edirne	73.83	85.69	-10.49	18.39	5.81
	Keşan	126.60	86.12	-9.25	18.21	6.04
	Lüleburgaz	52.73	84.12	-8.74	18.51	5.62
	Tekirdağ	63.28	83.00	-5.07	17.63	6.87
Mart	Edirne	31.64	82.94	-4.79	18.12	5.51
	Keşan	42.20	83.90	-4.25	17.00	5.67
	Lüleburgaz	36.91	82.88	-4.56	17.38	5.20
	Tekirdağ	47.46	81.12	-1.71	16.30	6.64
Nisan	Edirne	57.79	78.31	-2.08	26.58	10.51
	Keşan	42.90	79.60	-2.36	26.20	10.70
	Lüleburgaz	54.75	78.38	-2.28	25.66	10.01
	Tekirdağ	50.08	78.19	0.48	24.67	11.07
Mayıs	Edirne	59.74	74.19	4.22	28.52	17.10
	Keşan	88.00	74.80	4.23	28.50	17.20
	Lüleburgaz	51.96	75.31	4.33	27.78	16.59
	Tekirdağ	71.70	74.62	6.94	27.24	17.46
Haziran	Edirne	62.58	71.06	8.31	35.72	21.38
	Keşan	65.60	71.60	8.61	34.90	21.20
	Lüleburgaz	60.37	72.62	7.84	34.19	20.53
	Tekirdağ	54.07	70.88	9.96	32.94	21.53

*İklim verileri Global Modelling and Assimilation Office (GMAO) MERRA-2 sisteminden alınmıştır (<https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>).

Denemeler süresince başaklanma süresi ve bitki boyu özellikleri alınmış olup hasat işleminden sonra dane verimi ve bin dane ağırlığı, hektolitre ağırlığı, protein oranı, Zeleny sedimantasyon, beklemeli Zeleny sedimantasyon, Alveograf enerji değeri, yaş gluten ve gluten indeksi gibi kalite özellikleri belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen özelliklerden dane verimi için tüm çevrelerden elde edilen verilerin istatistiki değerlendirilmesi yapılırken dane verimi dışındaki tüm özellikler iki çevre üzerinden değerlendirilmiştir. Dane verimi için elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde ise öncelikli olarak varyans analizi sonrasında ise temel bileşenler analizine dayanan ve genotip ve genotip × çevre etkileşimlerinin birlikte değerlendirebildiği GGE analizi ile eklemeli etki ve etkileşime ilişkin etkilerin birlikte değerlendirilebildiği AMMI analizi uygulanmıştır. Bu analizlere ek olarak kalite özellikleri arasındaki ilişkilerin daha ayrıntılı değerlendirilmesi için korelasyon ve temel bileşenler analizleri uygulanmıştır. Korelasyon analizi ‘corrplot’(Wei ve Simko, 2021), temel bileşenler analizi ‘factoextra’ (Kassambara ve Mundt, 2017) ve ‘FactoMineR’ (Husson ve ark., 2017),

AMMI analizi ‘metan’ (Olivoto ve Lúcio, 2020) ve GGE analizi ise ‘GGEbiplotGUI’ (Frutos ve ark., 2014) paketleri kullanılarak R ortamında gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışılan Özelliklerin Basit İstatistiki Tanımlayıcıları

Çalışma kapsamında test edilen 27 çeşit/çeşit adayının çalışmanın yürütüldüğü her bir çevreye ait dane verimi istatistikleri Çizelge 3’de verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde en yüksek varyasyon katsayısı Tekirdağ (%17.0) çevresinde belirlenmiş olup diğer çevrelerin ise benzer varyasyona (\approx %13.0) sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan genotiplerin en yüksek dane verimine Edirne (982.3 kg/da) çevresinde ulaştığı bunu sırasıyla Lüleburgaz (836.7 kg/da), Keşan (781.1 kg/da) ve Tekirdağ (762.8 kg/da) çevrelerinin izlediği belirlenmiştir. Her bir genotipin dört çevre ortalamaları karşılaştırıldığında, en yüksek dane verimine LG Arnova’nın (1024.1 kg/da) sahip olduğu ve bunu Artek’in (1017.5 kg/da) takip ettiği, en düşük dane veriminin ise Kurşun’dan (640.8 kg/da) alındığı ve bunu Hektaş 4’ün (699.6 kg/da) takip ettiği belirlenmiştir (Çizelge 3). Benzer çevrede (Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ) üç yıl süreyle yürütülen bir başka çalışmada elde edilen dane verimi değerlerinin bu çalışmada elde edilen değerlerden daha düşük bulunmuştur (Kahraman ve ark., 2021) Bu sonucun ortaya çıkmasında yağış rejiminde meydana gelen dalgalanmaların etkili olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 3. Çeşit/çeşit adaylarının her bir çevre için dane verimine (kg/da) ait basit istatistiki tanımlayıcıları

Genotipler	Çevreler				Ortalama
	Edirne	Keşan	Lüleburgaz	Tekirdağ	
Alpan	1154.0 ± 37.7	863.9 ± 31.9	965.6 ± 19.0	906.0 ± 62.8	972.4 ± 34.0
Sancaktar	1009.6 ± 41.8	749.5 ± 32.4	675.0 ± 33.5	684.6 ± 30.0	779.7 ± 38.3
Kurşun	899.3 ± 8.8	517.3 ± 13.1	598.3 ± 37.5	548.3 ± 35.5	640.8 ± 41.1
Artek	1136.8 ± 21.4	943.3 ± 43.7	1017.1 ± 29.8	972.8 ± 50.5	1017.5 ± 25.5
Axum	1201.3 ± 36.1	875.8 ± 46.2	918.7 ± 31.1	841.0 ± 39.8	959.2 ± 40.6
Huntaş 59	902.8 ± 8.0	859.0 ± 36.1	850.3 ± 17.1	741.4 ± 30.0	838.4 ± 19.1
Primus	1178.8 ± 41.6	909.0 ± 31.1	894.2 ± 13.9	740.8 ± 33.6	915.4 ± 37.4
Dt Odrisa	885.1 ± 18.7	820.6 ± 25.1	855.8 ± 9.4	759.7 ± 19.4	830.3 ± 14.8
Dt 22	813.4 ± 32.5	761.1 ± 31.9	822.0 ± 11.8	655.5 ± 17.3	763.0 ± 20.5
Raifbey	975.7 ± 30.9	615.9 ± 37.9	859.0 ± 27.9	684.7 ± 34.6	783.8 ± 39.5
Simten	908.9 ± 32.9	771.3 ± 38.7	768.1 ± 42.3	680.6 ± 82.6	782.2 ± 31.7
Hektaş 3 (Kahraman)	889.2 ± 60.2	870.6 ± 25.0	864.0 ± 17.1	760.9 ± 39.8	846.2 ± 21.8
Hektaş 4	733.2 ± 35.8	725.4 ± 26.4	752.6 ± 29.0	587.2 ± 37.4	699.6 ± 22.3
BBVD7-2019	898.5 ± 13.1	718.0 ± 16.8	792.5 ± 13.6	759.8 ± 24.5	792.2 ± 19.0
Üçyıldız	1057.0 ± 19.9	761.5 ± 41.7	835.5 ± 47.4	831.8 ± 39.5	871.4 ± 33.5
Dörtü yıldız	923.4 ± 37.4	757.5 ± 17.8	878.7 ± 20.6	805.5 ± 19.7	841.3 ± 20.0
Beşyıldız	906.1 ± 29.5	743.8 ± 16.2	823.5 ± 41.7	801.3 ± 24.2	818.7 ± 20.0
Altıyıldız	936.5 ± 36.6	763.6 ± 16.3	837.7 ± 35.0	690.8 ± 47.5	807.1 ± 28.4
Onbiryıldız	1063.6 ± 69.4	707.7 ± 28.1	798.9 ± 51.9	851.2 ± 21.8	855.3 ± 39.7
Ez11 (Kemaller)	955.4 ± 51.4	775.4 ± 8.5	852.4 ± 19.1	778.0 ± 33.2	840.3 ± 23.8
Vassa	1056.2 ± 32.6	857.6 ± 30.9	952.0 ± 49.9	957.1 ± 37.1	955.7 ± 25.0
LG Arnova	1186.0 ± 55.9	890.2 ± 27.6	1046.1 ± 32.3	974.1 ± 50.1	1024.1 ± 34.0
Gelibolu	1057.0 ± 57.3	785.8 ± 41.4	813.4 ± 36.6	771.3 ± 67.9	856.9 ± 38.1
Esperia	986.2 ± 14.6	757.7 ± 35.2	731.9 ± 15.9	717.4 ± 57.8	798.3 ± 32.4
Rumeli	901.7 ± 23.3	759.3 ± 16.1	844.6 ± 33.6	636.5 ± 34.5	785.5 ± 28.6
Krasunia Odes’ka	1029.3 ± 21.9	784.0 ± 34.8	796.1 ± 47.0	701.3 ± 48.8	827.7 ± 36.1
Glosa	939.3 ± 62.8	744.9 ± 10.3	747.2 ± 60.6	756.5 ± 43.6	797.0 ± 30.5
Çevre ortalaması	982.3 ± 12.6	781.1 ± 9.9	836.7 ± 10.7	762.8 ± 12.5	840.7 ± 7.1
Varyasyon katsayısı (%)	13.4	13.1	13.3	17.0	-

Çalışma kapsamında ölçülen diğer tarımsal ve kalite özelliklerinin değerlendirilmesinde Edirne ve Lüleburgaz çevrelerinden elde edilen veriler kullanılmıştır. Bu özelliklerin basit istatistiki tanımlayıcıları Çizelge 4’de verilmiştir. Her iki çevre ortalamaları dikkate alınarak yapılan analizler sonucunda en yüksek varyasyon katsayısı Alveograf enerji (%33.7) değerinde belirlenirken en düşük

varyasyon katsayıları hektolitreye ağırlığı (%2.6) ve başaklanma gün sayısında (%3.8) belirlenmiştir. Özelliklerin değişim aralığına bakılacak olursa bitki boyunun 80.0 cm ile 107.5 cm, başaklanma gün sayısının 119.5 gün ile 136.5 gün, bin dane ağırlığının 31.0 g ile 43.2 g, hektolitreye ağırlığının 71 kg/hL ile 79.1 kg/hL, dane sertliğinin %11.4 ile %62.1, protein oranının %12.6 ile %15.7, Zeleny sedimantasyonunun 41.0 mL ile 68.5 mL, beklemeli Zeleny sedimantasyonunun 40.5 mL ile 75.0 mL, Alveograf değerinin 151.0 10⁻⁴ joule ile 338.0 10⁻⁴ joule, yaş gluten oranının %18.6 ile %32.3 ve gluten indeksinin %60.4 ile %99.9 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4). İlgili özellikler bakımından ortalama olarak en düşük ve yüksek değerlere bakıldığında en uzun genotipin Kurşun (107.5 cm) olduğu ve en kısa genotipin ise Esperia (80.0 cm) olduğu belirlenmiştir. Bilindiği üzere boğum arası kısalığı genetik olarak bodurluk (*Rht*) genleri ile kontrol edilmektedir ve Esperia çeşidinde boğum arası kısalığı ve düşük kök hacmine etki eden *Rht-D1b* allelinin olduğu bilinmektedir (Tekin, 2021). Dolayısıyla en düşük bitki boyunun Esperia çeşidinde tespit edilmesi beklenen bir sonuçtur. Başaklanma gün sayısı özelliği bakımından en erkenci çeşit Gelibolu (119.5 gün) olurken en geççi çeşitler Raifbey (136.5 gün) ve Kurşun (135.0 gün) olmuştur. En yüksek bin dane ağırlığı (BDA) Altıyıldız (43.2 g) ve Vassa (43.1 g) genotiplerinde tespit edilirken en düşük BDA Onbiryıldız (31.0 g) genotipinde bulunmuştur. En düşük hektolitreye ağırlığı 71 kg/hL ile LG Arnova çeşidinde en yüksek 79.1 kg/hL ile Kahraman çeşidinde belirlenmiştir (Çizelge 4). Yüksek un verimi ve düşük kül oranı ile çok yakından ilişki olan hektolitreye ağırlığı, hem un sanayisi hem de ihracat bakımından oldukça önemli bir parametredir. Avrupa Birliği ülkelerinde ticarete konu olması için bir buğday çeşidinin en az 76 kg/hL hektolitreye ağırlığına sahip olması gerekmektedir (Crepon ve Duyme, 2020). Bu çalışmada genotiplerin hektolitreye ağırlığının ortalaması 76.3 kg/hL olması bu açıdan oldukça önemlidir.

Bir diğer önemli kalite özelliğinden biri de dane sertliğidir. Dane sertliği ve yüksek dane protein içeriğinin hamur dayanımı ve somun hacmi üzerine oldukça yüksek etkisinin olduğu bilinmektedir (Lafiandra ve ark., 2022) Ancak sert ya da çok sert olarak sınıflandırılan daneler zor parçalandığı ve daha fazla enerji gerektirdiği için değirmencilikte yarı-sert dane yapısına sahip çeşitler tercih sebebidir. Öte yandan yüksek gluten kalitesine sahip baklava, börek endüstrisi için ve paçalda yumuşak buğdayları düzeltmek için de daha çok sert ekmeklik buğdaylara ihtiyaç duyulmaktadır (Tekin, 2021). Bu çalışmada en sert dane yapısına sahip çeşit Harman 22 (%11.4) olarak belirlenirken en yumuşak dane Rafibey (%62.1) çeşit adayında tespit edilmiştir. Genotiplerin ortalaması ise %50.5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). Ortalama değere bakıldığında çeşit/çeşit adaylarının birçoğunun dane sertliği bakımından değirmencilik için uygun olduğu söylenebilir (Çizelge 4).

Çalışmada kullanılan genotiplerin protein oranları istatistikleri incelendiğinde ortalama protein oranının %13.9 olduğu ve varyasyon katsayısının %11.6 olduğu tespit edilmiştir. Primus ve Hektaş 4 çeşit adayları %12.6 ile en düşük protein oranlarına sahip olurken Harman 22 çeşidi %15.7 ile en yüksek protein oranına sahip bulunmuştur. Kalite özellikleri arasında en düşük varyasyon protein oranında belirlenmiştir (Çizelge 4). Buğdayda protein oranı, çevre ve yetiştirme koşullarından yüksek derecede etkilendiği için kalıtım derecesi düşüktür. Dolayısıyla ıslah çalışmaları sonucunda yeni geliştirilen çeşit adaylarında istenen genetik ilerleme tam olarak sağlanamamaktadır (Malalgoda ve ark., 2018; Tekin, 2021). Bu çalışmada da kullanılan çeşit adaylarının standart çeşitler ile benzer veya daha düşük protein oranlarına sahip olması bu şekilde açıklanabilir. Sedimantasyon değeri de ıslah çalışmalarında bir seçim kriteri olarak yoğun olarak çalışılmaktadır. Bu çalışmada genotiplerin ortalama sedimantasyon değeri 54.7 mL olurken varyasyon katsayısı %20.8 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). Son yıllarda benzer ekolojik koşullarda yürütülen ve ortak standart çeşitlerin kullanıldığı

çalışmalarda ortalama sedimantasyon değeri 47.6 mL (Kahraman ve ark., 2021) ve 52.7 mL (Gülhan ve ark., 2023) belirlenmiştir ve bu çalışmanın sonuçları ile uyum içerisindedir.

Yaş gluten oranı bakımından elde edilen sonular incelendiğinde genotiplerin ortalama olarak %26.7 yaş glutenin oranına sahip olduğu ve varyasyon katsayısının %22.0 olduğu belirlenmiştir. En düşük yaş gluten oranı %18.6 ile Primus çeşit adayında en yüksek %32.3 ile Üçyıldız çeşidinde belirlenmiştir (Çizelge 4). Yaş gluten oranı da özellikle olum dönemindeki iklim koşullarına göre değişkenlik gösterdiğinden beklenen bir varyasyon oranı tespit edilmiştir. Gluten indeksinde de gluten oranında olduğu gibi çeşitler arasında geniş bir varyasyon tespit edilmiştir. Gluten indeksi, değirmencilik açısından oldukça önemli bir özelliktir ve unun kuvvetinin bir ölçüsüdür (Köksel ve ark., 2020). Dolayısıyla ıslah çalışmalarında çok önemli bir ıslah kriteridir. Çalışmada kullanılan genotiplerin ortalama olarak %90.8 gluten indeksine sahip olması ıslah çalışmalarının başarısının bu konudaki bir göstergesidir. Her ne kadar incelenen kalite özellikleri buğday danesindeki kalite içeriğini bir miktar açıklasa da değirmencilik için kritik olan reolojik özellikler hakkında yeterli bilgi veremeyebilir (Köksel ve ark., 2020). Hamurun elastikiyeti, viskozitesi, uzayabilme kabiliyeti gibi reolojik parametreler için yapılan Alveograf analizleri bu sebeple çok önemlidir. Çalışmada genotiplerin ortalama enerji değeri 252.4 10⁻⁴ joule olarak tespit edilmiştir. En yüksek enerji değeri 338.0 10⁻⁴ joule ile Dt Odrisa çeşidinde belirlenirken en düşük enerji 151.0 10⁻⁴ joule ile Kurşun çeşit adayında belirlenmiştir.

Çizelge 4. Çeşit/çeşit adaylarının diğer tarımsal ve kalite özelliklerinin tanımlayıcı istatistikleri

Genotipler	BB (cm)	BGS (gün)	BDA (g)	HA (kg/hL)	DS (%)	PO (%)	ZS (mL)	BZS (mL)	W (10 ⁻⁴ joule)	YG (%)	Gİ (%)
Alpan	86.5 ± 3.5	130.0 ± 4.0	38.3 ± 1.2	74.6 ± 0.3	52.7 ± 5.2	13.3 ± 1.0	43.0 ± 3.0	40.5 ± 4.5	174.5 ± 36.5	27.5 ± 3.8	60.4 ± 9.8
Sancaktar	95.0 ± 5.0	131.0 ± 4.0	39.2 ± 2.6	77.3 ± 1.3	58.6 ± 0.0	13.7 ± 1.3	44.5 ± 16.5	52.5 ± 20.5	189.5 ± 38.5	23.5 ± 2.3	98.4 ± 0.1
Kurşun	107.5 ± 7.5	135.0 ± 3.0	40.9 ± 2.7	77.4 ± 1.1	46.8 ± 0.2	13.7 ± 2.0	43.0 ± 3.0	41.0 ± 2.0	151.0 ± 12.0	29.9 ± 7.1	61.9 ± 12.1
Artek	81.5 ± 1.5	128.5 ± 4.5	36.9 ± 0.8	74.8 ± 0.8	40.4 ± 5.8	13.5 ± 1.9	54.5 ± 13.5	60.5 ± 11.5	319.0 ± 12.0	24.0 ± 6.8	99.0 ± 0.5
Axum	86.0 ± 1.0	128.5 ± 4.5	32.5 ± 1.0	77.5 ± 0.3	44.7 ± 8.2	13.3 ± 1.8	56.5 ± 12.5	62.5 ± 10.5	296.3 ± 11.3	23.6 ± 7.5	98.4 ± 1.0
Huntaş 59	85.0 ± 5.0	129.0 ± 5.0	40.9 ± 1.2	74.4 ± 0.3	46.3 ± 3.6	14.0 ± 1.9	60.0 ± 13.0	68.0 ± 8.0	334.0 ± 13.0	24.7 ± 6.6	99.5 ± 0.5
Primus	98.5 ± 1.5	124.5 ± 2.5	35.9 ± 2.1	77.1 ± 0.1	49.8 ± 4.6	12.6 ± 1.6	59.5 ± 13.5	68.0 ± 8.0	197.0 ± 40.0	18.6 ± 5.5	99.9 ± 0.1
Dt Odrisa	89.0 ± 4.0	127.0 ± 2.0	41.2 ± 0.7	74.9 ± 0.8	50.6 ± 2.8	14.4 ± 1.6	63.5 ± 9.5	72.0 ± 4.0	338.0 ± 13.0	26.9 ± 5.5	98.9 ± 1.1
Dt 22	82.5 ± 2.5	124.0 ± 2.0	42.4 ± 1.3	76.9 ± 0.5	58.3 ± 1.9	14.6 ± 1.7	57.0 ± 8.0	67.5 ± 0.5	240.5 ± 14.5	31.1 ± 6.5	82.1 ± 11.7
Raifbey	104.0 ± 4.0	136.5 ± 5.5	37.1 ± 2.4	74.6 ± 1.3	62.1 ± 5.1	13.9 ± 1.6	54.0 ± 11.0	63.0 ± 7.0	288.0 ± 8.4	26.9 ± 6.0	96.3 ± 2.5
Simten	89.0 ± 1.0	122.5 ± 3.5	40.9 ± 1.5	75.0 ± 1.0	46.0 ± 1.7	13.9 ± 1.2	56.5 ± 6.5	70.0 ± 3.0	225.0 ± 42.0	25.5 ± 2.5	98.7 ± 0.3
Hektaş 3 (Kahraman)	95.0 ± 5.0	127.0 ± 3.0	39.9 ± 0.1	79.1 ± 0.3	54.1 ± 2.7	14.3 ± 1.1	50.5 ± 6.5	56.0 ± 7.0	263.5 ± 56.5	27.6 ± 4.2	87.3 ± 2.2
Hektaş 4	95.0 ± 5.0	127.0 ± 3.0	34.5 ± 0.5	78.5 ± 0.6	50.7 ± 2.6	12.6 ± 0.9	49.5 ± 6.5	58.0 ± 4.0	220.0 ± 31.0	22.2 ± 3.5	97.5 ± 1.2
BBVD7- 2019	81.5 ± 3.5	126.5 ± 2.5	36.5 ± 0.8	74.2 ± 1.0	11.4 ± 1.5	15.7 ± 1.2	65.5 ± 4.5	72.0 ± 2.0	281.5 ± 14.5	29.0 ± 3.3	98.0 ± 1.6
Üçyıldız	100.0 ± 1.0	129.0 ± 3.0	31.1 ± 0.3	78.5 ± 0.4	59.0 ± 0.8	14.3 ± 1.5	52.0 ± 4.0	49.0 ± 2.0	237.5 ± 20.5	32.3 ± 5.5	80.2 ± 11.7
Dörtü yıldız	98.5 ± 8.5	126.5 ± 2.5	36.8 ± 1.2	77.7 ± 0.9	57.4 ± 1.4	15.6 ± 1.4	68.5 ± 4.5	75.0 ± 1.0	314.0 ± 56.0	29.5 ± 3.9	98.1 ± 0.4
Beşyıldız	97.5 ± 7.5	125.5 ± 2.5	38.4 ± 0.5	76.5 ± 0.2	56.2 ± 1.4	14.8 ± 1.1	61.0 ± 7.0	64.0 ± 6.0	263.0 ± 38.0	27.4 ± 6.1	97.2 ± 1.0
Altıyıldız	99.0 ± 4.0	122.0 ± 3.0	43.2 ± 0.4	74.7 ± 0.5	39.5 ± 3.7	14.4 ± 0.7	54.5 ± 4.5	65.0 ± 2.0	213.0 ± 65.0	27.9 ± 3.0	96.0 ± 1.4

Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Dane Verimi ve Bazı Önemli Kalite Özellikleri için Trakya Bölgesinde Bulunan Farklı Çevrelerde Testlenmesi

Çizelge 4'ün devamı: Çeşit/çeşit adaylarının diğer tarımsal ve kalite özelliklerinin tanımlayıcı istatistikleri

Onbıryıldız	95.0 ± 5.0	128.5 ± 1.5	31.0 ± 0.3	78.7 ± 0.4	59.5 ± 0.5	14.7 ± 1.1	52.0 ± 4.0	52.5 ± 4.5	248.5 ± 9.5	32.1 ± 4.2	72.8 ± 12.1
Ez11 (Kemaller)	85.0 ± 0.0	126.0 ± 3.0	32.9 ± 1.6	76.7 ± 0.2	53.9 ± 3.7	14.1 ± 1.4	47.5 ± 3.5	58.5 ± 2.5	209.5 ± 30.5	28.7 ± 5.3	85.8 ± 9.9
Vassa	96.5 ± 6.5	126.5 ± 1.5	43.1 ± 3.0	77.4 ± 0.2	52.8 ± 2.9	12.8 ± 1.4	41.0 ± 5.0	45.0 ± 9.0	176.0 ± 38.0	26.3 ± 4.7	77.2 ± 7.9
LG Arnova	84.0 ± 4.0	127.5 ± 1.5	31.8 ± 2.1	71.0 ± 0.8	58.5 ± 8.2	13.5 ± 1.7	46.0 ± 7.0	44.0 ± 8.0	206.0 ± 46.0	26.8 ± 6.4	79.9 ± 13.0
Gelibolu	91.5 ± 3.5	119.5 ± 4.5	41.5 ± 0.1	78.9 ± 0.4	48.5 ± 1.8	13.4 ± 0.6	51.5 ± 6.5	62.5 ± 8.5	296.5 ± 36.5	25.0 ± 2.1	96.2 ± 1.3
Esperia	80.0 ± 0.0	128.0 ± 4.0	35.1 ± 0.7	75.2 ± 0.0	52.8 ± 2.2	14.5 ± 1.4	59.0 ± 12.0	68.5 ± 6.5	300.0 ± 7.5	24.9 ± 5.2	99.0 ± 0.5
Rumeli	101.5 ± 6.5	126.0 ± 2.0	37.5 ± 0.3	78.3 ± 1.3	57.2 ± 3.2	14.9 ± 1.5	64.0 ± 8.0	75.0 ± 1.0	301.0 ± 10.1	27.2 ± 4.7	99.5 ± 0.3
Krasunia Odes'ka	94.0 ± 6.0	128.0 ± 4.0	36.5 ± 2.3	75.7 ± 0.4	48.6 ± 1.3	14.2 ± 1.0	64.5 ± 4.5	71.5 ± 0.5	257.5 ± 23.5	28.0 ± 2.9	97.8 ± 0.8
Glosa	99.0 ± 4.0	127.0 ± 3.0	36.7 ± 1.2	75.8 ± 0.4	48.8 ± 3.2	13.6 ± 1.7	59.0 ± 10.0	68.5 ± 4.5	276.0 ± 10.1	26.6 ± 5.1	98.1 ± 0.3
Ortalama	92.5 ± 1.2	127.3 ± 0.7	37.5 ± 0.5	76.3 ± 0.2	50.5 ± 1.4	13.9 ± 0.2	54.7 ± 1.6	61.1 ± 1.7	252.4 ± 11.6	26.7 ± 0.8	90.8 ± 1.8
Varyasyon katsayısı (%)	9.8	3.8	10.4	2.6	20.5	11.6	20.8	20.4	33.7	22.0	14.5

BB: Bitki boyu, BGS: Başaklanma gün sayısı, BDA: Bin dane ağırlığı, HA: Hektolitire ağırlığı, DS: Dane sertliği, PO: Protein oranı, ZS: Zeleny sedimantasyon, BZS: Beklemeli Zeleny sedimantasyon, W: Alveograf enerji değeri, YG: Yaş gluten oranı, Gl: Gluten indeksi.

Genotip x Çevre İnteraksiyonu ve Özellikler Arasındaki İlişkiler

Çalışma dane verimi için dört çevrenin sonuçları GGE ve AMMI analizleri kullanılarak yorumlanmaya çalışılmıştır. Dane verimi özelliği için yapılan GGE biplot analizi sonucunda 7 farklı sektör ortaya çıkmıştır (Şekil 1a). Bilindiği üzere biplot grafiğinde vektörler arasındaki yakın açılar (0° ile 90°) pozitif ilişkiyi vurgularken 90°'lik açı iki vektör arasında ilişki bulunmadığını daha geniş açılar ise negatif ilişkiyi ortaya koymaktadır. Buna göre Keşan ve Lüleburgaz çevreleri bir mega çevrede Tekirdağ ve Edirne çevreleri ise bir diğer mega çevrede gruplanmıştır. Birinci temel bileşen %75.58 ve ikinci temel bileşen %14.39 ve toplamda %89.97 genotip x çevre interaksiyonu arasındaki ilişki açıklanmıştır. Keşan ve Lüleburgaz çevrelerinin oldukça yakın ilişkide olduğu birinci mega çevrede Vassa ve Artek çeşitleri öne çıkarken Tekirdağ ve Edirne çevrelerinin yer aldığı mega çevrede sırasıyla LG Arnova, Alpan ve Primus çeşitleri öne çıkmıştır (Şekil 1a). Birçok çeşit orijine yakın bulunduğundan dolayı her bir çevrede ortalama değerlere sahip olduğu söylenebilir. Benzer yıllarda Trakya bölgesinde farklı çeşit ve hatlarla yürütülen bir çalışmada ölçülen kalite özellikleri değerleri bu çalışmada ölçülen değerler ile uyum içerisindedir (Gülhan ve ark., 2023). Ayrıca araştırmacılar GGE biplot analizi sonucunda bu çalışmada da standart olarak kullanılan Gelibolu çeşidinin hektolitire ağırlığı ve gluten indeksi bakımından çevrelere iyi uyum gösterdiğini rapor etmişlerdir. 2015-2016 ve 2016-2017 yıllarında Trakya bölgesinde 7 farklı çevrede yürütülen bir başka araştırmada GGE biplot analizi sonucunda Rumeli çeşidinin hem yüksek verimli hem de stabil çeşitlerden biri olduğu rapor etmişlerdir (Güngör ve ark., 2022). Bu çalışmada ise Rumeli çeşidinin yüksek verimli olmasa da kararlı çeşitlerden biri olduğu söylenebilir.

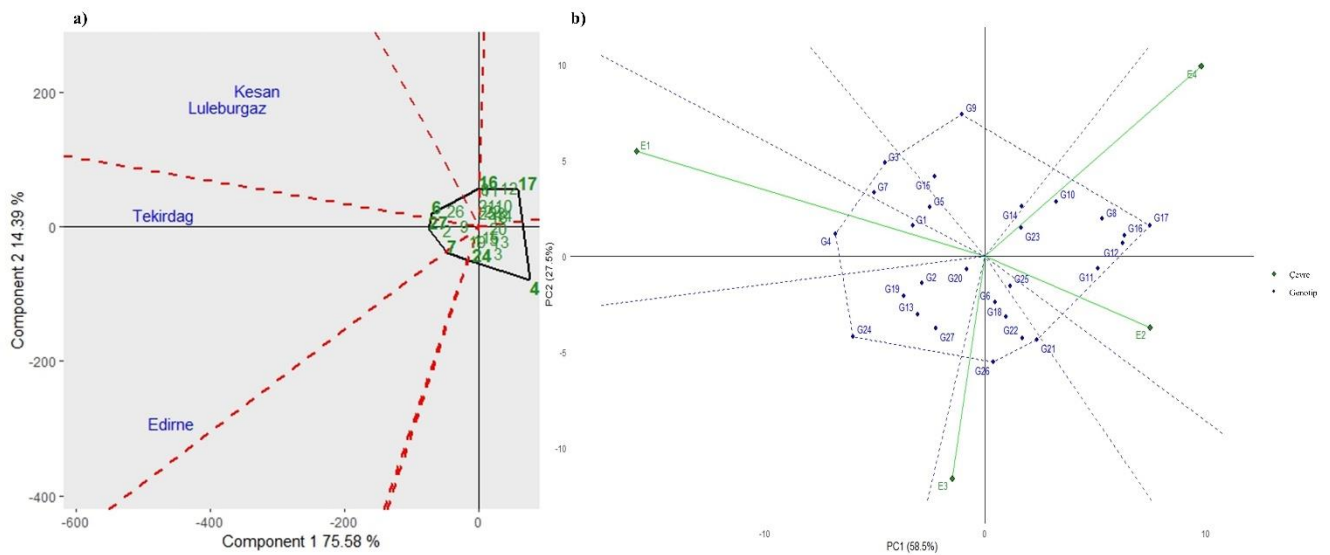
AMMI temelli varyans analizi sonucunda genotip, çevre, tekerrür ve genotip x çevre interaksiyonu bakımından istatistiki olarak önemli etkiler tespit edilmiştir (Çizelge 5). Genotip x çevre etkileşiminin varlığı farklı çevrelerde genotiplerin yaklaşık sıralamalarındaki farklılıklardan etkilenmiştir. Ayrıca ilk iki temel bileşen (TBEI ve TBEII) istatistiki olarak önemli olup etkileşime ilişkin varyansın %58.5'u TBEI ve %27.5'u ise TBEII'den karşılanmıştır (Şekil 1b). AMMI temelli varyans analiz tablosuna baktığımızda ise oluşan bu varyasyona yüksek oranda genotip (%35.1) ve çevrenin (%34.5) etki ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 5). AMMI biplot grafiğinde TBEI ve TBEII

bakımından 0 değerinden geçen doğruların kesiştiği orijine yakın değerlerdeki genotiplerin ilgili özellik bakımından stabil olarak yorumlandığı bilinmektedir. Buna göre Şekil 1b incelendiğinde Ez11 (G20) ve Rumeli (G25) genotiplerinin diğer genotiplere göre daha kararlı oldukları söylenebilir. Diğer bir taraftan orijinden uzak olan çevre ve genotiplerin de genotip x çevre etkileşimine yüksek katkı sağladığı bilinmektedir. Buna göre değerlendirilecek olursa Kurşun (G3), Artek (G4), Dt 22 (G9), Beşyıldız (G17), Vassa (G21), Esperia (G24) ve Krasunia Odes'ka (G26) genotipleri ile Edirne (E1), Keşan (E4) ve Tekirdağ (E3) çevrelerinin genotip çevre interaksiyonunda daha büyük etkiye sahip olduğu söylenebilir. 2015-2016 yetiştirme sezonunda Trakya bölgesini temsilen 5 farklı çevrede yürütülen bir çalışmada Gelibolu çeşidinin tüm çevrelere iyi uyum sağladığını belirtmiştir (Öztürk, 2022). Bu çalışmada da Gelibolu çeşidi iyi uyum sağlayan çeşitlerden biri olmuştur. Güngör ve ark. (2022) da Trakya bölgesinin benzer ekolojik koşullarında ve ortak standart çeşitler ile yürüttükleri çalışmalarında bu çalışmada olduğu gibi genotip, çevre ve genotip x çevre interaksiyonu bakımından istatistiki olarak önemli ($p<0.01$) farklılıklar tespit etmişlerdir.

Çizelge 5. Araştırmanın yürütüldüğü dört çevrede dane veriminin AMMI analizi sonuçları

Varyasyon kaynağı	SD	KT	KO	F	Varyasyona etkisi (%)
Genotipler	26	3261289	125434	24.87**	35.1
Çevreler	3	3207070	1069023	96.06**	34.5
Tekerrür(Çevre)	12	133545	11129	2.21*	1.4
Etkileşimler	78	1116723	14317	2.84**	12.0
Temel bileşen eksenleri interaksiyonu I (TBEI)	28	653216	23329	4.62**	-
Temel bileşen eksenleri interaksiyonu II (TBEII)	26	306561	11791	2.34**	-
Temel bileşen eksenleri interaksiyonu III (TBEIII)	24	156947	6539	1.30 ^{öd}	-
Hata	312	1573892	5045	-	-

* $p<0.05$, ** $p<0.01$. öd: önemli değil



Şekil 1. GGE biplot ve AMMI analizi sonuçlarına ait görseller (a) Hangi genotipin hangi çevrede kazandığını (Which Where Won) gösteren GGE biplot görseli, (b) Dane verimi bakımından test edilen çevreler ile genotipler arasındaki ilişkiyi gösteren AMMI biplot modeli. (E1: Edirne, E2: Lüleburgaz, E3: Tekirdağ, E4: Keşan)

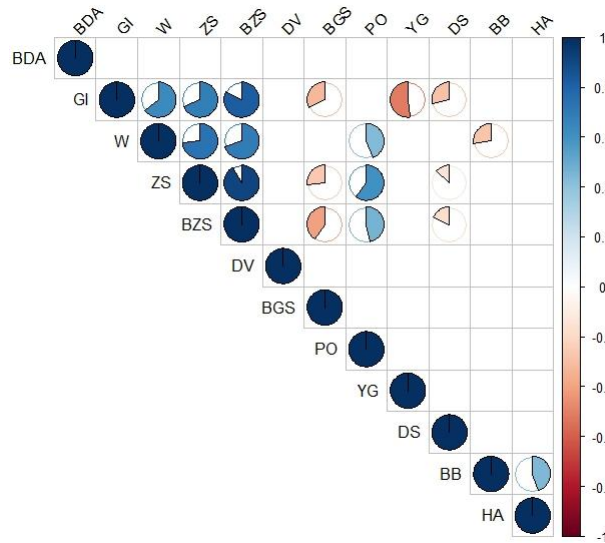
AMMI analizi sonucunda her bir çevrede öne çıkan ilk dört çeşide bakılacak olursa Keşan çevresinde sırasıyla Artek, Primus, LG Arnova ve Axum, Lüleburgaz çevresinde sırasıyla LG Arnova, Artek, Alpan ve Vassa, Tekirdağ çevresinde sırasıyla LG Arnova, Artek, Vassa ve Alpan, Edirne çevresinde ise sırasıyla Axum, LG Arnova, Alpan ve Artek çeşitlerinin öne çıktığı belirlenmiştir

(Çizelge 6). Buna göre LG Arnova ve Artek dört çevrede de öne çıkan ilk dört çeşitten biri olmayı başarmıştır. GGE biplot analizi ve AMMI analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde oldukça benzer sonuçlar ortaya çıktığı ve her iki analizde de LG Arnova ve Artek çeşitlerinin öne çıkan çeşitlerden olduğu söylenebilir. Bursa şartlarında 2019-2020 yıllarında yürütülen bir çalışmada da bu çalışmada olduğu gibi LG Arnova çeşidi en yüksek dane verimine sahip genotiplerden biri olarak belirlenmiştir (Koç ve Aydoğan Çifci, 2022).

Çizelge 6. AMMI'ye göre her bir çevrede öne çıkan ilk dört çeşit

Çevre	Ortalama (kg/da)	Çevre skoru	1. çeşit	2. çeşit	3. çeşit	4. çeşit
Keşan	781.1	9.81	Artek	Primus	LG Arnova	Axum
Lüleburgaz	836.7	7.48	LG Arnova	Artek	Alpan	Vassa
Tekirdağ	762.8	-1.48	LG Arnova	Artek	Vassa	Alpan
Edirne	982.3	-15.81	Axum	LG Arnova	Alpan	Artek

Dane verimi dışındaki tüm tarımsal ve kalite özelliklerinin analizinde ise Edirne ve Lüleburgaz çevrelerinin verileri kullanılmıştır. Dolayısıyla bu özellikler için GGE ve AMMI analizleri yapılmamış olup temel istatistikler dışında sadece korelasyon ve temel bileşenler analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki çevreden elde edilen verilerin ortalamaları ile yapılan korelasyon analizinde gluten indeksi, beklemeli Zeleny sedimantasyon, Zeleny sedimantasyon, gluten indeksi, Alveograf enerji değeri ve protein oranı arasında istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) pozitif ilişkiler tespit edilmiştir (Şekil 2). Ayrıca yaş gluten oranı ile gluten indeksi arasında istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) ortalama düzeyde negatif ilişki tespit edilmiştir. Dane verimi ile diğer tarımsal ve kalite özellikleri arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir.



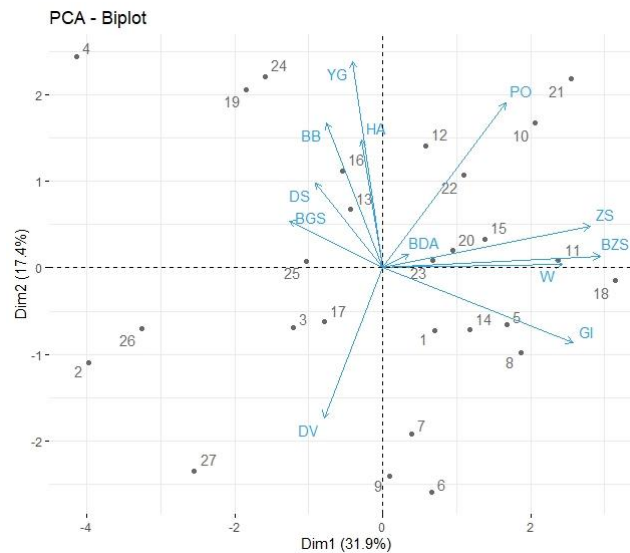
Şekil 2. Çalışılan özelliklerin arasındaki ilişkileri gösteren korelogram

Her bir genotipe ait dane verimi ve diğer tarımsal ve kalite özelliklerinin Edirne ve Lüleburgaz çevrelerinde elde ettikleri ortalama değerler kullanılarak gerçekleştirilen temel bileşenler analizinde ilk dört temel bileşen 1'in üzerinde eigen değerine sahip olarak bulunmuş ve toplam varyasyonun %74'ünden fazlasını açıklamıştır (Çizelge 7). İlk iki bileşen ise Şekil 3 ve Çizelge 7'de de belirtildiği gibi %49.3 varyans açıklamışlardır. Her bir özelliğin temel bileşenlere katkısı değerlendirildiğinde beklemeli Zeleny sedimantasyon, Zeleny sedimantasyon, gluten indeksi ve Alveograf enerji değeri özellikleri temel bileşen 1'e yüksek derecede katkıda bulunmuşlardır. İkinci temel bileşende yüksek katkı sağlayan özellikler ise yaş gluten oranı, protein oranı, dane verimi ve bitki boyu olarak belirlenmiştir (Çizelge 7).

Çizelge 7. İncelenen tüm özellikler için her bir temel bileşenin eigenvektörleri

Özellik	PC1	PC2	PC3	PC4
BZS	0.960	0.045	-0.108	0.087
ZS	0.916	0.157	0.126	0.139
GI	0.841	-0.281	-0.254	0.215
W	0.792	0.013	0.256	0.264
BGS	-0.411	0.176	0.263	0.133
YG	-0.134	0.779	0.482	-0.258
PO	0.544	0.622	0.419	-0.257
DV	-0.259	-0.565	0.484	0.288
BB	-0.250	0.546	-0.487	0.316
HA	-0.092	0.483	-0.499	0.382
DS	-0.297	0.320	0.113	0.632
BDA	0.115	0.05	-0.552	-0.561
Eigen değeri	3.82	2.09	1.67	1.33
Açıklanan varyans (%)	31.85	17.42	13.96	11.16
Kümülatif varyans (%)	31.85	49.27	63.24	74.41

BB: Bitki boyu, BGS: Başaklanma gün sayısı, BDA: Bin dane ağırlığı, BZS: Beklemeli Zeleni sedimantasyon, DS: Dane sertliği, DV: Dane verimi, HA: Hektolitre ağırlığı, PO: Protein oranı, ZS: Zeleni sedimantasyon, W: Alveograf enerji değeri, YG: Yaş gluten oranı, GI: Gluten indeksi.



Şekil 3. Genotipler ve özellikler arasındaki ilişkileri ortaya koyan temel bileşenler analizi

SONUÇ

Dane verimi için yapılan genotip x çevre etkileşimi analizleri sonucunda Keşan ve Lüleburgaz çevrelerinin oldukça yakın ilişkide olduğu birinci mega çevrede Vassa ve Artek çeşitleri öne çıkarken Tekirdağ ve Edirne çevrelerinin yer aldığı mega çevrede sırasıyla LG Arnova, Alpan ve Primus çeşitleri öne çıktığı belirlenmiştir. En stabil genotipler ise Ez11 ve Rumeli olmuştur. GGE biplot analizi ve AMMI analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde oldukça benzer sonuçlar ortaya çıktığı ve her iki analizde de LG Arnova ve Artek çeşitlerinin öne çıkan çeşitlerden olduğu söylenebilir. Ancak dane verimi için yapılan genotip x çevre etkileşimi analizleri ile kalite özellikleri için uygulanan basit istatistikler, korelasyon ve temel bileşenler analizleri incelendiğinde bu çeşitlerden Artek çeşidinin hem verim hem de kalite açısından öne çıktığı söylenebilir. Bu yeni çeşitler ve çeşit adayları hakkında daha net bir bilgiye ulaşmak için daha uzun süreli çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Makaledeki ilk iki yazar T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü (TTSM)'nde çalışmaktadır. Çalışmada kullanılan ham veriler, TTSM tarafından kurulan tescil denemelerinden elde edilmiştir. Bu imkân sağladığı için TTSM'ye teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler

Yazar Katkısı

H.İ.G. ve A.B.Y. denemelerin yürütülmesine katkı sağlamışlardır. M.T., V.Ç. ve M.Z.Y verilerin düzenlenmesi, istatistiki analizler ve makale yazımına katkı sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

- Akcura, M., Taner, S., & Kaya, Y. (2011). Evaluation of bread wheat genotypes under irrigated multi-environment conditions using GGE biplot analyses. *Žemdirbystė=Agriculture*, 98(1), 35-40.
- Anonim. (2022). Trakya'da bu yıl buğday rekoltesi 2 milyon 280 bin ton oldu. Erişim adresi: <https://www.aa.com.tr/tr/ekonomi/trakyada-bu-yil-bugday-rekoltesi-2-milyon-280-bin-ton-oldu/2695870> (Erişim tarihi: Ağustos 30.2023).
- Aydoğan, S. (2021). *İleri Kışlık Yemlik Arpa Hatlarının Seleksiyonunda Farklı Seleksiyon İndeksi ve Stabilitate Yöntemlerinin Kullanılması*. (Doktora Tezi). Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Crepon, K. ve Duyme, F. (2020). Efficiency of grain cleaner to increase test weight in wheat (*Triticum aestivum*). *Cereal Chemistry*, 97(6), 1263-1269.
- Delibaş, L., Albut, S., & Bağdatlı, M. C. (2016). Trakya bölgesinde uzun yıllar yağış ve sıcaklık değişimlerinin coğrafi bilgi sistemleri (CBS) kullanılarak kuraklık açısından değerlendirilmesi. Erişim adresi: <https://acikerisim.nku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.11776/1086> (Erişim tarihi: 23.08.2023).
- Erdemci, I. (2018). Investigation of genotype x environment interaction in chickpea genotypes using AMMI and GGE Biplot analysis. *Turkish Journal of Field Crops*, 23(1), 20-26.
- FAOSTAT. (2023). Crops and livestock products. Erişim adresi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Erişim tarihi: Ağustos 01, 2023).
- Frutos, E., Galindo, M. P., & Leiva, V. (2014). An interactive biplot implementation in R for modeling genotype-by-environment interaction. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, 28,1629-1641.
- Güngör, H., Cakir, M. F., & Dumlupınar, Z. (2022). Evaluation of wheat genotypes: genotype x environment interaction and GGE Biplot analysis. *Turkish Journal of Field Crops*, 27(1), 149-157.
- Gülhan, L., Akçura, M., & Öztürk, İ. (2023). Bazı ekmeklik buğday genotiplerinin bazı kalite özellikleri yönünden Trakya bölgesine adaptasyonunun incelenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 10(3), 622-630.
- Husson, F., Josse, J., Le, S., & Mazet, J. (2017). Multivariate exploratory data analysis and data mining. Access address: <https://cran.r-project.org/web/packages/FactoMineR/FactoMineR.pdf> (Accessed date: August 30, 2023).
- Ilker, E., Aykut Tonk, F., Caylak, O., Tosun, M., & Ozmen, I. (2009). Assessment of genotype x environment interactions for grain yield in maize hybrids using AMMI and GGE Biplot analyses. *Turkish Journal of Field Crops*, 14(2), 123-135.
- Kahraman, T., Güngör, H., Öztürk, İ., Yüce, İ., & Dumlupınar, Z. (2021). Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinde genotip ve çevrenin tane verimi ve bazı kalite özellikleri üzerine etkisinin temel bileşen ve GGE Biplot analizleri ile değerlendirilmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(5), 992-1002.

- Karaman, M., Bayram, S., & Satana, E. (2023). Assessment of bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) with GGE biplot and AMMI model in multiple environments. *Romanian Agricultural Research*, 40, 189-198.
- Kassambara, A. ve Mundt, F. (2017). Extract and visualize the results of multivariate data analyses. Access adress: <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/factoextra.pdf> (Accessed date: August 03, 2023).
- Kendal, E., Sayar, M. S., Tekdal, S., Aktas, H., & Karaman, M. (2016). Assessment of the impact of ecological factors on yield and quality parameters in triticale using GGE Biplot and AMMI analysis. *Pakistan Journal of Botany*, 48(5), 1903-1913.
- Koç, S. ve Aydoğan Çifci, E. (2022). Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) hat ve çeşitlerinin farklı çevrelerde bazı tarımsal özellikler yönünden incelenmesi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36(1), 103-118.
- Konyalı, S. ve Gaytancıoğlu, O. (2007). Türkiye’de buğdayda uygulanan tarım politikaları ve Trakya bölgesi buğday üreticilerinin sorunları. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(3), 249-259.
- Köksel, H., Özer, S., & Yazıcı, N. (2020). Kalite ölçütleri. T. Akar (Ed.), *Buğday Tarımı* (s. 32-49). İzmir: Nobel Yayıncılık.
- Lafiandra, D., Sestili, F., Sissons, M., Kiszonas, A., & Morris, C. F. (2022). Increasing the versatility of durum wheat through modifications of protein and starch composition and grain hardness. *Foods*, 11(11), 1532.
- Malalgoda, M., Ohm, J. B., Meinhardt, S., & Simsek, S. (2018). Association between gluten protein composition and breadmaking quality characteristics in historical and modern spring wheat. *Cereal Chemistry*, 95(2), 226-238.
- Nadeem, M. A., Yeken, M. Z., Tekin, M., Mustafa, Z., Hatipoğlu, R., Aktaş, H., ... & Baloch, F. S. (2021). Contribution of Landraces in Wheat Breeding. *Wheat Landraces*, 215-258.
- Olivoto, T. ve Lúcio, A. D. (2020). metan: An R package for multi-environment trial analysis. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(6), 783-789.
- Öztürk, İ. (2022). Environment by genotype interaction and stability of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under rainfed conditions in Trakia region. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 8(2), 118-127.
- Öztürk, İ., Kahraman, T., Avcı, R., Girgin, V. Ç., Çiftçigil, T. H., Seidi, M., Tülek, A., Akın, K., & Tuna, B. (2018). Ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinde çevre koşullarının agronomik karakterler ve biyotik stres faktörlerine etkisi. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 7(1), 14-22.
- Tekin, M. (2021). *Eski ve modern ekmeklik buğday çeşitlerinin tarımsal ve kalite özellikleri bakımından genotipik ve fenotipik tanımlanması* (Doktora Tezi). Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- TÜİK. (2023). Bitkisel Üretim İstatistikleri. Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: Ağustos 01, 2023).
- Wei, T. and Simko, V. (2021). R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.92). Access adress: <https://github.com/taiyun/corrplot> (Accessed data: August 20, 2023).

Atf İçin: Arabacı, O. ve Tan, U. (2023). Farklı Mikrobiyal Gübre Dozları ve Köklendirme Ortamlarının Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Çelikleri Üzerine Etkileri. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 3053-3063.

To Cite: Arabacı, O. & Tan, U. (2023). The Effects of Different Microbial Fertilizer Doses and Rooting Media on Cuttings of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Plant. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3053-3063.

Farklı Mikrobiyal Gübre Dozları ve Köklendirme Ortamlarının Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Çelikleri Üzerine Etkileri

Olçay ARABACI, Uğur TAN*

Öne Çıkanlar:

- Köklenme ortamı bakımından perlit-torf ortamı öne çıktı.
- Köklenme oranı %100'e ulaştı.
- Mikrobiyal gübrenin etkisi IBA'ya alternatif olabilir.

Anahtar Kelimeler:

- Çelik
- Biberiye
- Köklenme
- Mikrobiyal Gübre
- Köklendirme Ortamı

ÖZET:

Tohumla üretimde genellikle gelişme yavaş olmakta, tohum çimlenme sorunları oluşabilmektedir. Çelikle çoğaltım güçlü fideler oluşturması ve hızlı üretimi nedeniyle uygulanan bir yöntemdir. Kökün oluşumunda büyüme düzenleyici oksinler olumlu etki yapmaktadır. Oksinin görevi kök oluşumu ve köklenmenin başlamasını sağlamaktadır. Bitki gelişmesinde düzenleyici maddelerin, çeliklere muamele etmenin amacı; çeliklerde kök oluşumunu sağlamak, köklenmeyi hızlandırmak ve çelik başına düşen kök kalitesini artırmaktır. Bu çalışmanın hedefi farklı köklendirme ortamları ve farklı mikrobiyal gübre dozlarının biberiye çeliklerinin köklenmesi üzerine etkilerini inceleyerek uygun ortam ve dozları belirlemektir. Deneme 24'lü viyollere 4 farklı ortam (perlit, torf, perlit-torf (1:1) ve perlit-torf-vermikülit (1:1:1)) olarak ve 5 farklı mikrobiyal gübre dozu uygulanıp 4 tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Mikrobiyal gübre EM Agrition marka olup 5 farklı dozda önerilen doz üzerinden 0 kat, 0.5 kat, 1 kat, 1.5 kat ve 2 kat doz olacak şekilde dikim öncesi çeliklere uygulanmıştır. Araştırmada, köklenme oranı (%), kök uzunluğu (cm), sürgün sayısı(adet), sürgün uzunluğu(cm), sürgün çapı(mm), yaprak sayısı (adet), yaş kök ağırlığı (g) ve kuru kök ağırlığı (g) fide özellikleri ölçülmüştür. Elde edilen değerler sırasıyla %16.67-100, 13.22-25.30, 3.69-5.64 adet, 4.53-9.16 cm, 1.996-2.618 mm, 7.20-20.80 adet, 1.52-4.64 g ve 0.26-0.92 g arasındadır. Çalışmada, elde ettiğimiz değerlere göre ortamlar bakımında perlit-torf ortamı ve mikrobiyal gübre tavsiye edilen dozun 1-2 kat arasında dozların kullanılması iyi bir köklenme ve fide kalitesi oluşumu için tavsiye edilebilir.

Effects Of Different Microbial Fertilizer Doses and Rooting Media on Cuttings Of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Plant

Highlights:

- Perlite-peat media was effective in terms of rooting media.
- Rooting ratio reached 100% value.
- Microbial fertilizer can be used as an alternative or instead of IBA hormone.

Keywords:

- Cutting
- Rosemary
- Rooting
- Microbial Fertilizer
- Rooting Media

ABSTRACT:

Cultivation from seed is generally slow and germination problems may occur. However propagation with cuttings produces faster and strong seedlings for plant production. Growth-regulating auxins have a positive effect on the formation of the root and provides initiation of rooting and root development. The purpose of plant growth regulators are providing root formation in cuttings, accelerates rooting and increases root quality for cuttings. Aim of this study examine the effects of different rooting media and different microbial fertilizer doses on the rooting of rosemary cuttings to determines the appropriate media and doses. The experiment was conducted as 4 different rooting media (perlite, peat, perlite-peat (1:1) and perlite-peat-vermiculite (1:1:1)) and 5 different microbial fertilizer doses were used in 4 repetitions. The microbial fertilizer is EM Agrition brand and was applied to the cuttings before planting with 5 different doses; 0 times, 0.5 times, 1 times, 1.5 times and 2 times the recommended dose. Rooting ratio (%), root length (cm), shoot number (per plant), shoot length (cm), shoot diameter (mm), leaf number (per plant), fresh root weight (g) and dry root weight (g) were determined. The values were obtained as between 16.67-100%, 13.22-25.30, 3.69-5.64 per plant, 4.53-9.16 cm, 1.996-2.618 mm, 7.20-20.80 per plant, 1.52-4.64 g and 0.26-0.92 g, respectively. According to the values we have obtained from study it can recommended to use perlite-peat medium and microbial fertilizer 1-2 times of recommended dose for healthy rooting and seedling quality.

¹ Olçay ARABACI ([Orcid ID: 0000-0001-8257-9834](https://orcid.org/0000-0001-8257-9834)), Uğur TAN ([Orcid ID: 0000-0002-9592-2790](https://orcid.org/0000-0002-9592-2790)), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Aydın, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Uğur TAN, e-mail: ugur.tan@adu.edu.tr

GİRİŞ

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), çalı formunda, iğne benzeri yapraklara sahip çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları ince, dar ve 2.5–5 cm uzunluğuna kadar büyüyebilen, yemeklere tat vermek ve peyzaj alanlarında süs bitkisi olarak kullanılan bir bitkidir. Tıbbi açıdan biberiye antiseptik, antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahiptir (Etter, 2004). Biberiye uçucu yağları damıtma yöntemi ile elde edilir ve genellikle romatizmal ve kas ağrılarına yardımcı olmak için masaj yağları ve kremlerinde kullanılır (Simon ve ark. 1984).

Biberiye bitkisinin yetiştiriciliği, tohum veya çelikle çoğaltma yöntemiyle elde edilen bitkilerle gerçekleştirilir. Ancak biberiye tohumlarının çimlenmeleri yavaş olduğundan nadiren kullanılırlar, çıkışlar 3-4 hafta sürmesi dışında %10-20 gibi düşük çimlenme oranlarına sahiptir (De Guzman, 1999). Çelikle yetiştirilen biberiye bitkileri hızlı bir şekilde köklenebilmekte, bu sayede kısa sürede çok sayıda bitki yetiştirilebilme imkanı sağlamaktadır. Ayrıca çelikler anaç bitki ile aynı genetik yapıya sahip olmaktadır. Büyüme hormonu kullanılmadan biberiye çeliklerinin köklendirilmesi zordur (Alvarez-Herrera ve ark., 2007; Chaturvedi ve ark. 2007). Bu nedenle daha sağlıklı ve iyi bir köklenme için bitki büyüme düzenleyicisi olan oksinler (özellikle NAA ve IBA), kök oluşumunu uyarmak için yaygın olarak kullanılırlar (Loach, 1988a).

Hakim ve ark. (2018) biyolojik gübreler ve IBA dozlarının *Punica granatum* L. bitkisinin çelik köklenme ve kalitesi üzerine yaptıkları çalışmalarında bitki kök özelliklerinin hem oksin hemde biogübrelerden pozitif olarak önemli derecede etkilendiklerini saptamışlardır. Çalışma sonuçlarına göre biyolojik gübreler ve IBA uygulamalarının kombine olarak kullanılmasının en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir.

Şener ve Duran (2020), farklı mikrobiyal gübrelerin boysenberry çeliklerinin köklenmesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ise ticari firmalardan temin edilen SimBacil (%2, %4, %8), SimDerma (5 g, 10 g, 20 g), OrgaStar (%2, %4, %8) isimli preparatlarını kullandıkları çalışmalarında elde ettikleri sonuçlara göre, mikrobiyal gübrelerin çeliklerinin köklenmesi üzerine kontrol grubuna göre önemli düzeyde etki ettiği saptanmıştır.

Sarı ve Kaçar (2019) biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin çelikle çoğaltımı üzerine yürüttükleri çalışmada farklı IBA dozları ve köklendirme ortamları kullanılmıştır. Buna göre köklendirme ortamları değerlendirildiğinde genel olarak torf ve perlitin öne çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca incelenen özelliklerde artan IBA dozlarına paralel olarak yükselen değerler elde edilmiştir. Araştırmanın sonucunda biberiyenin çelikle çoğaltılmasında 4500 ppm IBA dozunun ve tarla toprağı haricinde tüm ortamların köklendirme için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Genel olarak kök ortamı kullanılan ortamın fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerinden etkilenir. Bu üç özellik arasındaki etkileşim bir kompleks oluşturmakla birlikte bitki ve kök sağlığı üzerinde etkileri bulunmaktadır. Köklenme oranı ve elde edilen köklerin kalitesi yetiştirildiği köklendirme ortamından direkt olarak etkilenmektedir (Loach, 1988b). Ayrıca biyolojik gübrelerin sağlıklı bir köklenme ve kök gelişimi açısından önemli olduğu belirtilmektedir (Hakim ve ark. 2018, Şener ve Duran 2020). Bu çalışmanın amacı farklı köklendirme ortamları ve farklı mikrobiyal gübre dozlarının biberiye çeliklerinin köklenmesi üzerine etkilerini inceleyerek uygun ortam ve dozları belirlemektir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmanın materyalinde çelik olarak *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi kullanılmıştır. Çelikler ADÜ Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinin bahçesinden temin edilmiş ve ADÜ Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinin Tıbbi Bitkileri serasında yürütülmüştür.

Metod

Deneme ayrılmış 24'lü viyollere 4 farklı ortam (perlit, torf, perlit+torf (1:1) ve perlit+torf+vermikülit (1:1:1)) olarak kurulmuş ve 5 farklı EM5 gübresi dozları uygulanıp 4 tekrarlı (her tekerrürde 24 çelik-1 viyol) olacak şekilde 24 gözlü 210 cc hacimli viyollere dikim 18.11.2021 tarihinde yapılmıştır. Mikrobiyal gübre EM Agrition marka olup içeriği *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Serratia* spp., *Aspergillus* spp.'den oluşmaktadır. Dozları 5 farklı doz olmak üzere önerilen doz üzerinden 0 kat, 0,5 kat, 1 kat, 1,5 kat ve 2 kat doz olacak şekilde hazırlanmış ve dikim öncesi çelikler bu mikrobiyal gübre konsantrasyonlarında 60 dk olacak şekilde bekletilerek uygulanmıştır. Dikim işlemi 960 çelikten gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çeliklerin köklendiği ortama herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) dikim gerçekleştikten sonra can suyu verilip seraya alınmıştır. Sulama haftada iki kez, her viyol gözüne 100 cc olacak şekilde, beher yardımıyla ile Pazartesi ve Cuma günleri yapıldı. Fide ölçüm işlemleri bitkinin olgunlaştığı dönemde 01.04.2022 tarihinde yapılmaya başlanmıştır. Araştırmada, köklenme oranı (%), kök uzunluğu (cm), sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), sürgün çapı (mm), yaprak sayısı (adet), yaş kök ağırlığı (g) ve kuru kök ağırlığı (g) fide özellikleri ölçülmüştür.

Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler, özellikler için ayrı ayrı olmak üzere İki faktörlü tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizleri Jmp Pro istatistiksel paket programına göre yapılmıştır. İstatistiksel anlamda önemli bulunan özellikler LSD testine göre gruplandırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada, araştırılan özelliklerden elde edilen değerler ile bu değerlerin varyans analiz sonuçları verilmiştir (Çizelge 1.). Varyans analiz sonucu, faktörlerin önemlilik durumlarını belirlemek için LSD testi uygulanmıştır.

Çizelge 1. Biberiye bitkisinde farklı ortam ve dozların fide özelliklerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

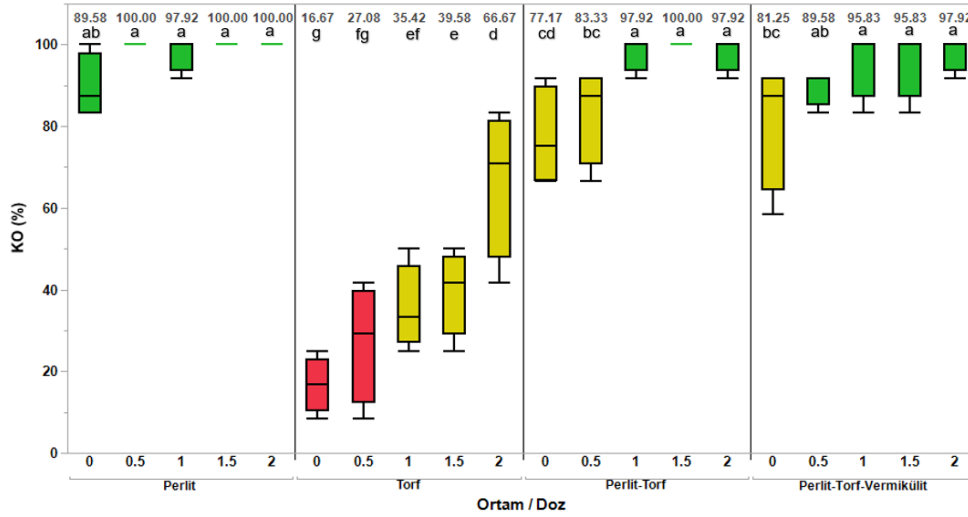
Varyasyon Kaynakları	Kareler Ortalaması							
	KO (%)	KU (cm)	SS (adet)	SU (cm)	SÇ (mm)	YS (adet)	YKA (g)	KKA (g)
Ortam	16133.11**	266.11**	12.90**	20.54**	1.31**	179.92**	49.92**	1.48**
Doz	1383.63**	45.22**	2.02	2.32	0.27	30.94**	4.10**	0.04
O*D	237.08**	12.75*	1.38	7.43**	0.10	13.58**	1.25	0.06
Hata	73.29	5.88	1.14	2.59	0.14	4.31	1.11	0.04

KO: Köklenme Oranı, KU: Kök Uzunluğu, SS: Sürgün Sayısı, SU: Sürgün Uzunluğu, SÇ: Sürgün Çapı, YS: Yaprak Sayısı, YKA: Yaş Kök Ağırlığı, KKA: Kuru Kök Ağırlığı, (**P<0.01, *P<0.05).

Köklenme Oranı

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)'nin köklenme oranına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 1'de ortalama değerleri ise Şekil 1'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre ortam, doz ve O*D interaksiyonunun (P<0.01) önemli derecede etki ettiği belirlenmiştir. Köklenme oranları %16.67-100.00 arasında değişmiş olup perlit köklendirme ortamının tüm dozları genel olarak %100 köklenme

değerlerine ulaştığı görülmektedir (Şekil 1). Bunun yanı sıra diğer köklendirme ortamlarında ise mikrobiyal gübre uygulama oranlarının artması ile birlikte köklenme oranlarının arttığı saptanmıştır. Torf köklendirme ortamı %16.67-66.67 aralığındaki köklenme oranı ile diğer ortamlara göre en düşük köklenme oranlarına sahip olmuştur. Köklenme oranları önerilen dozun 0.5 kat gübre dozu uygulaması ile birlikte artmaya başlamış olup 1, 1.5 ve 2 dozlarında maksimum değerlerine ulaştığı görülmektedir (Şekil 1).



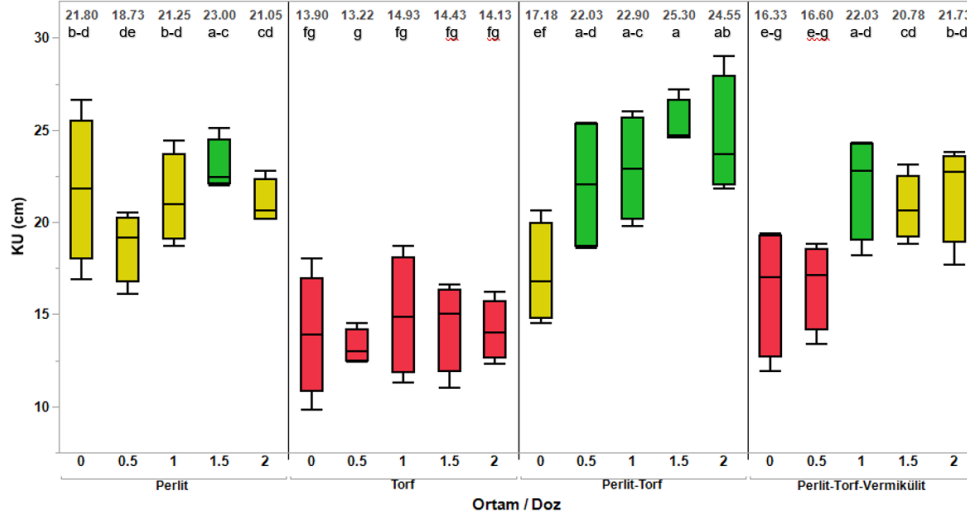
Şekil 1. Köklendirme ortamları ve gübre dozlarının köklenme oranı (%) üzerine etkisi

Kara ve ark. (2011), biberiye çeliklerinde farklı IBA dozlarının köklenmeye etkisini inceledikleri çalışmalarında köklenme oranını %36.33-75.66 arasında saptamışlardır. Parađiković ve ark. (2013) uyguladıkları IBA dozunun biberiye bitkisi çeliklerinin köklenme oranlarını %93 değerlerine ulaştırdığını bildirmişlerdir. Sarı ve Kaçar (2019), farklı köklendirme ortamları ve IBA dozlarının biberiye çeliklerindeki köklenmeye etkisini inceledikleri çalışmalarında en yüksek köklenme yüzdesini ortalaması %93.33 ile kokopitten elde ederlerken bunu aynı istatistiksel grupta yer alan %88.66 ile perlit ve %88.27 ile torf ortamlarının izlediğini bildirmişlerdir. Bu değerler ile birlikte vermikülit %82.42 değerini verirken en düşük köklenme oranı ise %62.64 değeri ile tarla toprağından saptamışlardır. İzgi (2020), farklı ortam ve IBA dozlarının biberiye çeliklerinde köklenmesine etkisini incelediği çalışmada, en yüksek köklenme oranı değerlerini %88.33 ve %86.67 ile sırasıyla 4000 ve 5000 ppm IBA dozlarından, en az değeri ise %62.50 ile kontrol uygulamasında elde etmiştir. Köklendirme ortamlarında ise köklenme oranı ortalamaları; en yüksek değer perlit ortamından %82.78, en düşük değer ise %72.78 ile torf ortamından elde etmiştir.

Bizim elde ettiğimiz sonuçlara göre köklendirme ortamları bakımından perlit ortamının etkileri araştırmacılar ile benzer çıkmıştır. En düşük köklenme oranı torf ortamından elde edilmiş olup (Şekil 1), İzgi (2020) ile bu bakımdan benzer sonuçlar çıktığı görülmektedir. Çalışmamızda mikrobiyal gübrenin köklenme oranına etkisi incelendiğinde, diğer çalışmalarda biberiye bitkisinin köklenme oranını arttırmak için kullanılan IBA dozlarına göre daha yüksek köklenme oranları elde edildiği görülmektedir. IBA köklenme teşvik edici olarak yaygın olarak kullanılan bir hormon olup, mikrobiyal gübrenin bu hormona göre daha etkili olabileceği diğer araştırmacıların çalışmaları ile birlikte bizim elde ettiğimiz veriler ışığında söylenebilir.

Kök Uzunluğu

Varyans analiz tablosu incelendiğinde Ortam, Doz ($P<0.01$) ve OxD intreaksiyonu ($P<0.05$) önemli bulunmuştur (Çizelge 1). En yüksek kök uzunluğu torf-perlit (17.18-25.30 cm), en düşük kök uzunluğu ise torf ortamında (13.22-14.93 cm) elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Köklendirme ortamları ve gübre dozlarının kök uzunluğu (cm) üzerine etkisi

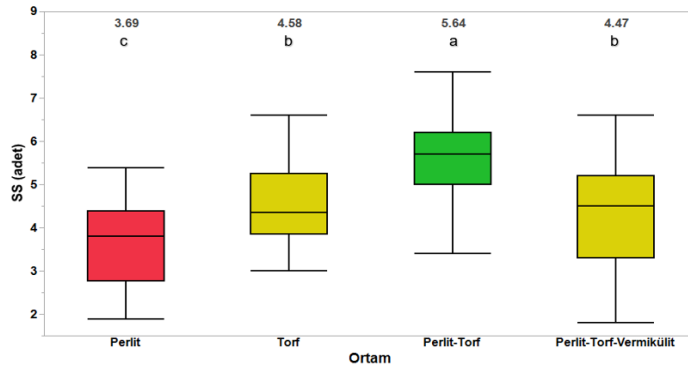
Paradić ve ark. (2013) biberiye bitkisi çeliklerine uyguladıkları IBA dozunun kontrol gruplarına göre etkisini inceledikleri çalışmalarında, IBA dozu muamele edilen biberiye çeliklerinde kök uzunlukları 10.23 cm'e ulaşırken, kontrol grubunun 8.60 cm olduğunu bildirmişlerdir. Sarı ve Kaçar (2019), en yüksek kök uzunluğunu 5.08 cm ile vermikülitte elde ederlerken, bunu 4.73 cm ile kokopit ve 4.50 cm ile perlit ortamları takip etmiştir. En düşük değer ise 3.63 cm ile tarla toprağından elde edildiğini belirlemişlerdir. IBA dozlarından elde edilen kök uzunluklarını ise 3.99–4.71 cm arasında olduğunu saptamışlardır. İzgi (2020), en yüksek kök uzunluğu değerini 4000 ppm IBA dozu uygulamasından (22.58 cm), en düşük kök uzunluğu değerini ise 1000 ppm IBA uygulamasından (20.24 cm) elde etmiştir. Farklı köklendirme ortamlarından elde edilen kök uzunluğu ortalaması ise en yüksek perlit (25.10 cm), en düşük (17.87 cm) torf köklendirme ortamından saptamıştır.

Bizim elde ettiğimiz değerler Paradić ve ark. (2013) ile Sarı ve Kaçar (2019)'dan yüksek İzgi (2020) ile benzer çıktığı söylenebilir. Paradić ve ark. (2013) ve Sarı ve Kaçar (2019)'ın köklenme için kullandıkları ortamın hacmi ve köklenme için beklenen süre değerlerinin düşük çıkmasının sebebi olabilir.

Sürgün sayısı

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin farklı ortam ve farklı mikrobiyal gübre dozlarında sürgün sayısına etkisine ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Varyans analiz tablosunu incelendiğinde köklendirme ortamının etkisi önemli ($P<0.01$), doz ve ortam*doz intreaksiyonunun sürgün sayısına etkisi önemsiz olduğu görülmektedir. En yüksek sürgün sayısı 5.64 adet ile perlit-torf ortamından, en düşük değer ise perlit ortamından 3.69 adet olarak elde edilmiştir (Şekil 3).

Karakaş ve Bahri (2021) çalışmalarında lavanta çeşitlerine ait çeliklerin farklı köklendirme ortamlarının fidelere etkisini incelediği çalışmalarında sürgün sayısını 6.93-7.93 adet olarak saptamışlar ve etkisini önemsiz bulmuşlardır. Çiçek ve Özel (2021) Lavandula angustifolia Mill. bitkisinin çeliklerine IBA dozlarının etkisini inceledikleri çalışmada sürgün sayısını 2.61-3.47 adet aralığında olduğunu saptamışlar ve dozların sürgün sayılarına etkisini aynı şekilde önemsiz bulmuşlardır.

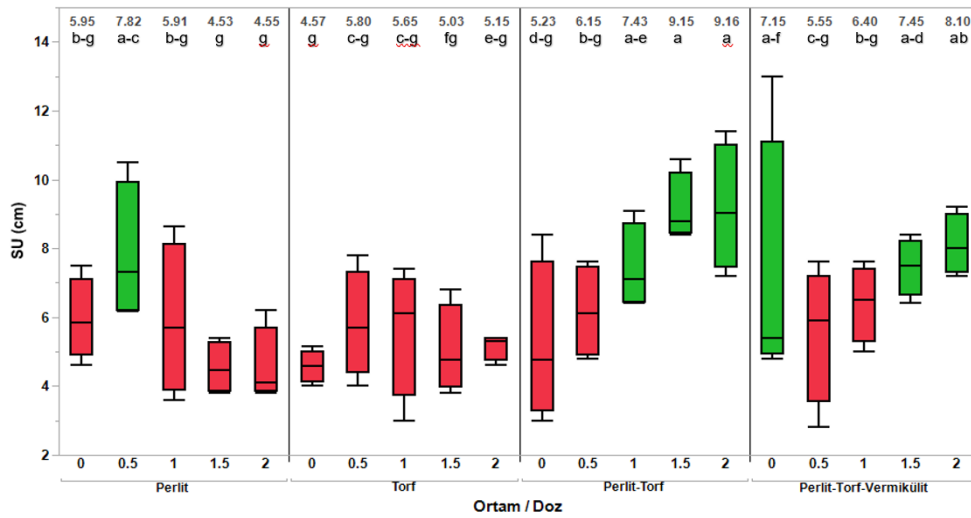


Şekil 3. Farklı köklendirme ortamlarının sürgün sayısı (adet) üzerine etkisi

Bizim çalışmamızda dozların sürgün sayılarına etkisi önemsiz bulunmuş olup köklendirme ortamlarının etkisi önemli bulunmuştur. Bu bakımdan elde edilen sonuçlar doz bakımından Çiçek ve Özel (2021) ile benzer, köklendirme ortamı bakımından Karakaş ve Bahri (2021) ile örtüşmemektedir. Kullanılan ortamlar ve bitki materyalinin farklı olması bu sonucun sebebi olabilir.

Sürgün Uzunluğu

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin farklı ortam ve mikrobiyal gübre dozlarında sürgün uzunluğuna ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 1 ve ortalamalar Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Köklendirme ortamları ve gübre dozlarının sürgün uzunluğu (cm) üzerine etkisi

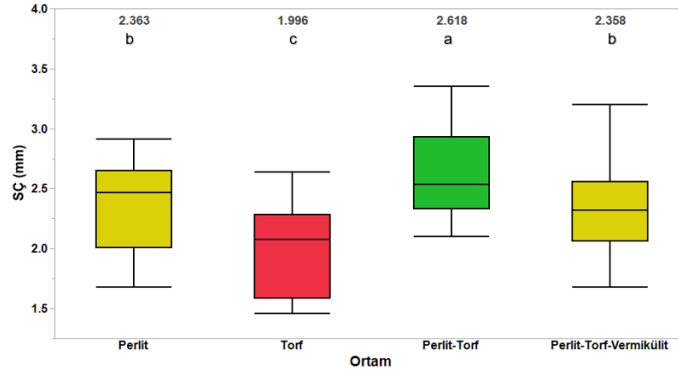
Varyans analiz tablosunun verildiği Çizelge 1 incelendiğinde Ortam*Doz intreaksiyonun sürgün uzunluğu üzerine etkisinin önemli ($P < 0.01$) olduğu görülmektedir. En yüksek ortalamalar 5.23-9.16 cm aralığı ile perlit-torf köklendirme ortamından elde edilmiştir. En düşük ortalamalar ise 4.57-5.80 cm aralığı ile torf ortamında saptanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde mikrobiyal gübre dozlarının etkileri ortamlara göre farklı etkileri olduğu belirlenmiştir. Kırpık ve Özgüven (2018), biberiye sürgün uzunluklarının 1.5-3.5 cm aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Karakaş ve Bahri (2021) lavanta çeşitlerinde yaptıkları çalışmada sürgün uzunluklarının 4.19-5.90 cm aralığında olduğunu saptamışlar ve kullandıkları ortamların etkisinin önemli olduğunu ortaya koymuşlardır. Çiçek ve Özel (2021) *Lavandula angustifolia* Mill. bitkisinde farklı IBA dozlarının sürgün uzunluğuna istatistiksel olarak etkisi olmadığını bildirmişler ve sürgün uzunluğunu 3.38-4.53 cm aralığında saptamışlardır.

Bizim değerlerimiz, Kırpık ve Özgüven (2018)'in bildirdikleri değerden yüksek bulunmuştur. Çiçek ve Özel (2021) sonuçları ile bizim sonuçlar mikrobiyal gübre dozlarının sürgün uzunluklarında

etkili olmaması açısından benzer çıkmıştır. Karakaş ve Bahri (2021)'nin kullandıkları ortamların sürgün uzunluklarına etkisi önemli bulunması mevcut çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir.

Sürgün Çapı (mm)

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)'nin sürgün çaplarına (mm) ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 1, ortalama değerleri ise Şekil 5'de verilmiştir.



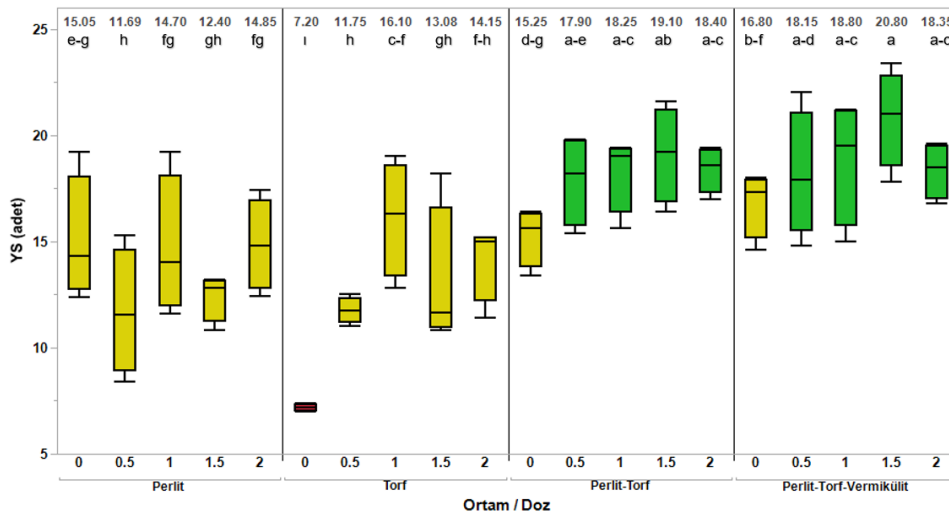
Şekil 5. Farklı köklendirme ortamlarının sürgün çapı (mm) üzerine etkisi

Köklendirme ortamlarının sürgün çaplarına (mm) etkisinin önemli ($P<0.01$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1.). Sürgün çapı ortalamaları 2.358-2.618 mm aralığında bulunmuş olup en yüksek değer perlit-torf köklendirme ortamından elde edilmiştir. En düşük değer ise 1.996 mm ile torf köklendirme ortamından elde edilmiştir. Kırpık ve Özgüven (2018), biberiye sürgün çapını 1.5-3.5 mm aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Yılmaz ve Gökdoğan (2016) biberiye sap çaplarının inceledikleri çalışmalarında 4.368-4.661 mm aralığında saptamışlardır.

Elde ettiğimiz değerler Kırpık ve Özgüven (2018) bildirdikleri değerler ile benzer Yılmaz ve Gökdoğan (2016) değerlerinden düşük çıkmıştır. Bu durum çeliklerin farklı dönemlerinde alınan ölçümlerden dolayı kaynaklanmış olabilir.

Yaprak Sayısı

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)'nin yaprak sayısına ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 1, ortalama değerleri ise Şekil 6'da verilmiştir. Köklendirme ortamı mikrobiyal gübre intreaksiyonunun önemli ($P<0.01$) olduğu belirlenmiştir.



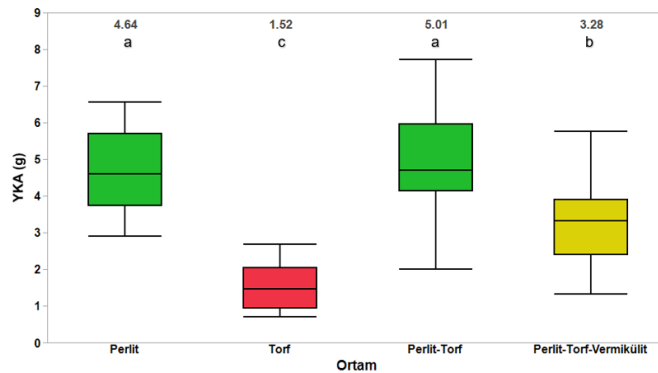
Şekil 6. Köklendirme ortamları ve gübre dozlarının yaprak sayısı (adet) üzerine etkisi

Elde ettiğimiz değerlere göre yaprak sayısı en yüksek perlit-torf-vermikülit ortamından 16.80-20.80 adet aralığında elde edilmiştir. İkinci en yüksek yaprak sayıları perlit-torf ortamından saptanmıştır (Şekil 1). Aslan (2014), fesleğen popülasyonlarında yaptığı çalışmada, fidede yaprak sayısını 6-16 adet, arasında değiştiğini tespit etmiştir.

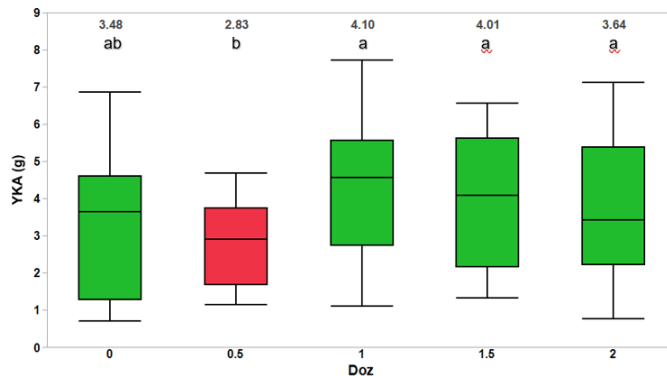
Biberiye bitkisine ait literatür taramasında yaprak sayısına ilişkin kayıt bulamadığımızdan aynı Lamiaceae familyasından fesleğen türüne ait Aslan (2014) çalışması incelenmiştir. Bizim sonuçlarımıza yaprak sayısı Aslan (2014) çalışmasında saptadığı yaprak sayısından fazla olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre farklı köklendirme ortamlarının yaprak verimini olumlu etkilediği söylenebilir.

Yaş Kök Ağırlığı (g)

Biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*)'nin yaş kök ağırlığına (g) ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 1 ve ortalama değerler Şekil 7 ve Şekil 8'de verilmiştir. Ortam*Doz arasındaki interaksiyonunun önemsiz olduğu bulunurken ortam ve dozun yaş kök ağırlığına (g) etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Çalışmamızda farklı köklendirme ortamlarının yaş kök ağırlığına (YKA) etkisi incelendiğinde (Şekil 7.), en yüksek değerlerin aynı grupta yer alan perlit-torf ve perlit ortamlarından elde edildiği ve sırasıyla 5.01 g ve 4.64 g olduğu saptanmıştır. En düşük değer ise 1.52 g ile torf ortamında saptanmıştır. Mikrobiyal gübre dozlarında ise değerler 2.83-4.10 g aralığında değişmekte olup en yüksek değerler aynı grupta yer alan 2, 1.5, 1 ve 0 dozlarında belirlenmiştir. En düşük değer ise torf ortamından elde edilmiştir. Sarı ve Kaçar (2019), köklendirme ortamları ve IBA dozlarının yaş kök ağırlığına etkisini önemli olduğunu saptamışlardır. Elde ettikleri yaş kök ağırlıkları ortamlar bakımından 1.27-3.49 g, dozlar bakımından 2.40-3.29 g arasında değişim gösterdiğini saptamışlardır. En yüksek yaş kök ağırlığı aynı istatistiki grupta yer alan kokopit (3.49 g), perlit (3.45 g), vermikülit (3.12 g) ve torf (3.11 g) dan, en düşük yaş kök ağırlığı ise tarla toprağından (1.27 g) elde etmişlerdir.



Şekil 7. Farklı köklendirme ortamlarının yaş kök ağırlığı (g) üzerine etkisi



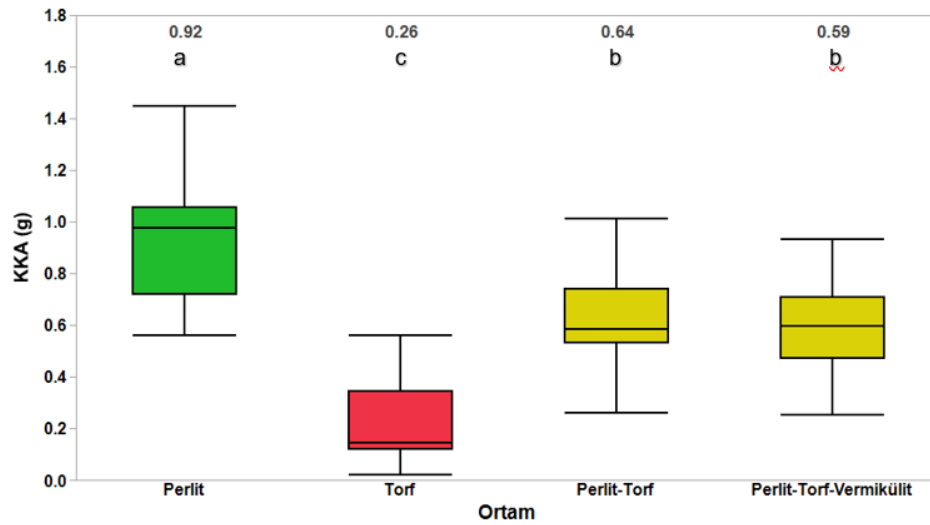
Şekil 8. Farklı köklendirme ortamlarının yaş kök ağırlığı (g) üzerine etkisi

IBA dozları ele alındığında en yüksek değerler 3.29 g, 3.21 g, 2.95 g ve 2.59 g ile sırasıyla 4500 ppm, 3500 ppm, 2500 ppm ve 1500 ppm dozlarında belirlemiştir. En düşük yaş kök ağırlığı ise 2.40 g ile 0 dozundan elde edilmiştir. Ortam*IBA dozu interaksyonu istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Bizim elde ettiğimiz değerler Sarı ve Kaçar (2019) değerlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kullanılan uygulamaların farklılığı bunun sebebi olabilir aynı zamanda mikrobiyal gübrelerin kök gelişimi bakımından etkisi IBA'ya göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

Kuru Kök Ağırlığı

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.)'nin kuru kök ağırlığına (g) ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 1 ve ortalama değerler ise Şekil 9'da verilmiştir. Dozlar ve Ortam*Doz intreaksyonu önemsiz bulunurken köklendirme ortamının kuru kök ağırlığına (g) etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.01$) (Çizelge 1).



Şekil 9. Farklı köklendirme ortamlarının kuru kök ağırlığı (g) üzerine etkisi

Sonuçlarımız incelendiğinde ortamlara göre kuru kök ağırlığı 0.26-0.92 g arasında değişiklik göstermekte olup en yüksek değer 0.92 g ile perlit köklendirme ortamından elde edilmiştir. En düşük değer ise 0.26 g ile torf ortamından elde edilmiştir (Şekil 9).

Sarı ve Kaçar (2019), yaptıkları çalışmada biberiye fidelerinde kuru kök ağırlığı bakımından ortamların etkisini önemli, doz ve ortam*doz interaksyonunu önemsiz olduğunu saptamışlardır. Köklendirme ortamlarında kuru kök ağırlığı değerlerinin 0.49–1.04 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. En düşük değeri tarla toprağında belirlediklerini, diğer tüm ortamlarda elde edilen kuru kök ağırlığı değerlerinin ise aynı istatistiki grupta yer alarak en yüksek değerleri verdiklerini bildirmişlerdir.

Bizim değerlerimiz sonucunda ortamın etkisi önemli bulunup Sarı ve Kaçar (2019) ile benzerlik göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışma Aydın ekolojik koşullarında biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisi için uygun köklendirme ortamlarının ve mikrobiyal gübre dozlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. İncelenen tüm özellikler bakımından genel olarak torf köklendirme ortamından en düşük değerler elde edilmiştir. Perlit, perlit-torf ve perlit-torf-vermikülit ortamlarının köklenme ve fide özellikleri bakımından yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Mikrobiyal gübre dozlarının kullanılan

ortamlara bağlı olarak dozların artmasıyla farklı etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir. Ortam*Doz arasındaki interaksiyonun köklenme oranı (%), kök uzunluğu (cm), sürgün uzunluğu (cm) ve yaprak sayısı (adet) zelliklerinde önemli çıkması bu durumun bir sonucu olduğunu göstermektedir.

Genel olarak firma tarafından önerilen mikrobiyal gübre dozunun üstünde yapılan uygulamalar ile birlikte köklenme ve fide özellikleri olumlu etkilenirken, ölçülen bazı parametrelerde uygulama dozlarının 1 ve 1.5 katı uygulamalarından sonraki seviyelerinde azalmalar meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışmada uyguladığımız mikrobiyal gübre dozlarının, tartışmada bahsettiğimiz biberiye bitkisi üzerinde yapılan diğer çalışmalarda kullanılan İndol-3-Bütirik Asit (IBA)'ya göre köklenme oranı (%), kök uzunluğu (cm) ve yaş kök ağırlığı (g) zellikleri bakımından mikrobiyal gübrenin daha iyi performans sergilediği görülmektedir. Bu durum farklı deneme koşullarından kaynaklanmış olabilir ancak yine de göz ardı edilmeyecek bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz. Bu sebeple bu durumu teyit etmek için IBA ve mikrobiyal gübre uygulamalarının birlikte denendiği yeni çalışmaların yapılması önerilir. Bunun dışında elde ettiğimiz değerlere göre ortamlar bakımında perlit-torf ortamı ve mikrobiyal gübre tavsiye edilen dozun 1-2 kat arasında dozların kullanılması iyi bir köklenme ve fide kalitesi oluşumu için tavsiye edilebilir.

ıkar atışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar atışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- lvarez-Herrera, J. G., Rodrığuez, S. L., Chacn, E. (2007). Effect of different sizes of stem cuttings and substrates on the propagation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomıa Colombiana*, 25(2), 224-230.
- Aslan, D. F. (2014). *Farklı Reyhan (Ocimum basilicum L.) genotiplerinde ontogenetik ve morfolojik varyabilitenin belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi), Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>.
- Chaturvedi, H. C., Jain, M., Kidwai, N. R. (2007). Cloning of medicinal plants through tissue culture—a review. iek, E. ve zel, A. (2021). Lavanta (*Lavandula angustifolia* Mill.)'da çelikle çoğaltmada uygun elik tipi ve IBA dozunun belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(2), 254-264.
- De Padua, L. S., Bunyapraphatsara, N., Lemmens, R. H. M. J. (1999). *Plant resources of South-East Asia 12:(1) medicinal and poisonous plants 1* (No. BOOK). Backhuys Publishers.
- Etter, S. C. (2005). *Rosmarinus officinalis* as an antioxidant. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 11(1-2), 121-159.
- Hakim, A., Jaganath, S., Honnabyraiah, M. K., Kumar, S. M., Kumar, S. A., ve Dayamani, K. J. (2018). Influence of biofertilizer and auxin on growth and rooting of pomegranate (*Punica granatum* L.) cuttings. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 1187-1193.
- İzgi, M. N. (2020). Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Köklendirme zellikleri zerine Optimum IBA Dozlarının Saptanması. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(2), 592-598.
- Karakaş, İ., ve Bahri, İ. (2021). Effects of Three Different Rooting Media on Some Rooting Parameters of Cuttings Belonging to *Lavandula angustifolia* and *Lavandula intermedia* Species. *Acta Nat. Sci*, 2(1), 68-75.
- Kırpık, M. ve zgven, M. (2018). Farklı Kökenli (*Rosmarinus officinalis* L.) Biberiye Bitkilerinin Verim ve Uçucu Yağları zerinde Araştırmalar. *Adyutayam Dergisi*, 6 (2), 46-54.
- Kara, N., Baydar, H., Erbaş, S. (2011). Farklı elik alma dönemleri ve IBA dozlarının bazı tıbbi bitkilerin köklenmesi üzerine etkileri. *Derim*, 28(2), 71-81.
- Loach, K. (1988a). Hormone application and adventitious root formation in cutting – a critical review. *Acta Hort.* 227, 126–133.

- Loach, K. (1988b). *Controlling environmental conditions to improve adventitious rooting*. In: Davis T.D., Haissig B.E. & Sankhla N. (eds), *Adventitious Root Formation in Cuttings*. Dioscorides Press, Portland, OR, pp. 248–279.
- Sarı, Y. ve Kaçar, O. (2003). Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) çeliklerinde köklenme üzerine farklı köklendirme ortamları ve IBA dozlarının etkileri. *Bahçe*, 48(1), 27-37.
- Simon, J. E., Chadwick, A. F., Craker, L. E. (1984). *Herbs, an indexed bibliography, 1971-1980*. Elsevier.
- Şener, S., ve Duran, C. N. (2020). Effects of different microbial fertilizers on rooting of boysenberry cuttings. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(3), 309-313.
- Yılmaz, D. ve Gökdoğan, M., E. (2016). Biberiye (*Rosmarinus Officinalis*) Bitkisinin Fiziko-Mekanik Özelliklerine Nem İçeriğinin Etkisi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(1), 92-98.

Atf İçin: E. Çelik, A., Aksoy, M., Dok, M., Aydın, K. ve Yücel, C. (2023). Farklı Tatlı Sorgum Genotiplerinin Şanlıurfa Ekolojik Koşullarındaki Lignoselülozik Biyoetanol Verimleri. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 3064-3074.

To Cite: E. Çelik, A., Aksoy, M., Dok, M., Aydın, K. & Yücel, C. (2023). Lignocellulosic Bioethanol Efficiency Of Different Sweet Sorghum Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3064-3074.

Şanlıurfa Ekolojik Koşullarında Farklı Tatlı Sorgum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotiplerinin Lignoselülozik Biyoetanol Verimleri

Ayşegül EFENDİOĞLU ÇELİK^{1*}, Mine AKSOY², Mahmut DOK¹, Kadir AYDIN³, Celal YÜCEL⁴

Öne Çıkanlar:

- Çalışmada 21 farklı tatlı sorgum genotipi kullanıldı
- Herbir genotipin lignoselülozik biyoetanol verimi belirlendi
- En yüksek lignoselülozik biyoetanol verimi UNL-Hybrid-3 genotipinden elde edildi

Anahtar Kelimeler:

- Yenilenebilir enerji
- Selüloz
- Tatlı sorgum
- Posa

ÖZET:

Yenilenebilir enerji kaynağı olarak birim alanda yüksek biyokütle verimine sahip olan, birinci derecede gıda amaçlı olarak tüketilmeyen veya çok amaçlı olarak kullanılabilen ürünlerin kullanımı gıda güvenliği açısından büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla, tuzlu-alkali topraklarda yetişebilen, kuraklığa ve kısa süreli su baskınlara toleranslı, geniş adaptasyon yeteneğine sahip olan tatlı sorgum bitkisi lignoselülozik biyoetanol hammaddesi olarak son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bu çalışmanın amacı, tohumu yurtiçi ve yurtdışı kaynaklardan temin edilen, Şanlıurfa ili ekolojisinde ikinci ürün koşullarında yetiştirilen 21 farklı tatlı sorgum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) genotipinin lignoselülozik biyoetanol verimini teorik olarak belirlemektir. Çalışmada lignoselülozik biyoetanol hammaddesi olarak bitki özsuğu alınan tatlı sorgum posaları kullanılmıştır. Posaların selüloz ve hemiselüloz içeriği belirlenmiş ve biyoetanol dönüşüm oranlarından faydalanılarak dekara elde edilebilecek lignoselülozik biyoetanol miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen verilere göre en yüksek verim UNL-Hybrid-3 (805.5 L/da), Theis (766.5 L/da), Smith (698.1 L/da) genotiplerinden elde edilmiştir. Benzinin oktanını artırmak, sera gazı emisyonu ve benzin ithalatını azaltmak gibi sorunları çözmek için, Şanlıurfa ekolojik koşullarında bu üç genotipin lignoselülozik biyoetanol üretimi amaçlı olarak yetiştirilmesi ve yaygınlaştırılması önerilmektedir.

Lignocellulosic Bioethanol Efficiency of Different Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions

Highlights:

- 21 different sweet sorghum genotypes were used in the study
- Lignocellulosic bioethanol yield of each genotype was determined
- The highest lignocellulosic bioethanol yield was obtained from the UNL-Hybrid-3 genotype

Keywords:

- Renewable energy
- Cellulose
- Sweet sorghum
- Pulp

ABSTRACT:

The use of products with high biomass yield per unit area as a renewable energy source, which are not consumed primarily for food purposes or can be used for multi-purposes, is of great importance in terms of food safety. For this purpose, sweet sorghum plant, which can grow in salty-alkaline soils, tolerant to drought and short-term floods, and has wide adaptability, has gained importance as a lignocellulosic bioethanol raw material in recent years. The aim of this study is to theoretically determine the lignocellulosic bioethanol yield of 21 different sweet sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) genotypes grown under second crop conditions in the ecology of Şanlıurfa province, obtained from domestic and foreign sources. In the study, sweet sorghum pulp from plant sap was used as lignocellulosic bioethanol raw material. The cellulose and hemicellulose contents of the pulp were determined and the amount of lignocellulosic bioethanol that could be obtained per decare was calculated by using the bioethanol conversion rates. According to the data obtained, the highest yield was obtained from UNL-Hybrid-3 (805.5 L/da), Theis (766.5 L/da), Smith (698.1 L/da) genotypes. In order to solve problems such as increasing the octane of gasoline, reducing greenhouse gas emissions and gasoline imports, it is recommended that these three genotypes be cultivated and disseminated for lignocellulosic bioethanol production in Şanlıurfa ecological conditions.

¹ Ayşegül EFENDİOĞLU ÇELİK (Orcid ID: 0000-0002-5769-5005), Mahmut DOK (Orcid ID: 0000-0002-1558-7452), Black Sea Agricultural Research Institute Directorate., Samsun, Türkiye

² Mine AKSOY (Orcid ID: 0000-0002-3173-6577), Osmangazi District Directorate of Agriculture and Forestry, Bursa, Türkiye

³ Kadir AYDIN, (Orcid ID: 0000-0002-1583-9605), Çukurova University, Faculty of Engineering, Department of Mechanical Engineering, Adana, Türkiye

⁴ Celal YÜCEL (Orcid ID: 0000-0001-6792-5890), Şırnak University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, Şırnak, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ayşegül EFENDİOĞLU ÇELİK, e-mail: aysegul.celik@tarimorman.gov.tr

Bu çalışma 1140948 numaralı TUBITAK 1003 projesinin bir bölümünden üretilmiştir / It is a part of the project numbered 1140948 supported by TUBITAK.

INTRODUCTION

Today, increasing energy consumption in parallel with economic growth and the use of fossil fuels cause an increase in greenhouse gas emissions and climate change. For this purpose, researchers in our country as well as in all countries of the world have focused on renewable and sustainable energy sources for the production of alternative biofuels based on biomass. Biofuels, such as bioethanol, biomethanol, biodiesel biomethane, etc., can be obtained from biomass. Studies have shown that biofuel products create fewer greenhouse gas emissions than fossil fuels and are effective in controlling global warming (Lal, 2008). Bioethanol, which is a good alternative especially for the transportation sector, is planned to completely replace fossil fuels in the future (Kaplan et al., 2009).

Unlike fossil fuels, bioethanol is an alternative biofuel that can be produced by fermentation of sugar from plants containing starch (first generation raw material) or lignocellulose (second generation raw material) and can be used alone or mixed with gasoline (Balat & Balat, 2009). Sugary, starchy and cellulose containing plants and residues such as sugar beet, sugar cane, corn, wheat, sweet sorghum, potatoes, woody and agricultural wastes are used in bioethanol production (Buresova & Hrivna, 2011).

In terms of food safety, it is of great importance that the plants to be used for energy purposes are plants that are not used as food raw materials, are easily and abundantly available, and have high biomass yield. Sweet sorghum, which has high biomass yield, drought tolerance and wide adaptability, has started to take place in the country's agriculture due to its lower cultivation cost and advantages in bioethanol production. In addition, sweet sorghum is seen as a valuable energy plant due to the non-structural carbohydrates (sucrose, glucose and fructose) and structural carbohydrates (cellulose and hemicellulose) contained in its pulp (Aksoy et al., 2023).

Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) is a grassy plant with high photosynthetic activity due to being a C4 plant belonging to the Poaceae family (Shinde et al., 2013). In this respect, sweet sorghum is a promising or important plant for low-cost bioethanol production that can be used for many purposes (Wang & Liu, 2009). Obtaining must from the stalks of sweet sorghum for bioethanol production, making energy production and plastic production from the rest of the stalk, using the grain for human food, animal feed, ethanol production, making its pulp and green leaves an excellent feed, organic fertilizer, cellulosic raw material in industry, food, Its importance is increasing day by day as it has many uses such as sugar and pulp (Miller & Creelman, 1980; Almodares et al., 1999; Negro et al., 1999; Chiaramonti et al., 2004; Gnansounous et al., 2005; Reddy et al., 2005; Zhao et al., 2009; Nahar, 2011; Almodares et al., 2013). Sweet sorghum is also called "smart crop" in international literature because it has many uses (Kumar et al., 2010).

Sweet sorghum, which has wide adaptability, has the potential for rapid growth, high sugar accumulation and high biomass production (Reddy & Sanjana, 2003). The use of both the juice and pulp of sweet sorghum in bioethanol production increases the bioethanol productivity per unit area (Dolciotti et al., 1998).

Sweet sorghum stalks contain 43.6%-58.2% soluble sucrose, glucose and fructose (Amaducci et al., 2004) and 22.6-47.8% insoluble cellulose and hemicellulose (Dolciotti et al. 1998). When the sorghum plant is considered as a whole, it contains 12.4% cellulose, 10.2% hemicellulose, 4.8% lignin, 55% sucrose, 3.2% glucose and 0.3% ash (Billa et al., 1997).

The lignocellulosic residue remaining after the fermentable sap is separated from sweet sorghum contains significant amounts of polymeric carbohydrates (cellulose and hemicellulose). These polysaccharides can be hydrolyzed to sugars and then to second generation bioethanol by fermentation. In a study conducted in 2014, it was reported that sorghum pulp contains 27-48% cellulose, 19-24%

hemicellulose and 9-32% lignin, and lignocellulosic bioethanol can be obtained with a yield of 69.49% when optimum conditions are met (Yu et al. 2014). Guimaraes et al. (2014) determined the yield values of cellulose, hemicellulose, lignin and theoretical ethanol as 21.4%-49.1%, 18.4%-34.8%, 1.8-11.5% and 221-412 L/ton, respectively, in their modeling study with 957 sweet sorghum plants consisting of 100 hybrids.

Korpos et al. (2008) reported that 8-10 tons of fresh grass were taken from sweet sorghum in Hungarian conditions, and after pressing and extracting the sap, 4-5 tons/da of lignocellulosic raw material was obtained. In the same study, it was reported that a total of 829 L of bioethanol would be obtained, 373 L from the plant sap and 456 L from the pulp.

This study aims to determine the chemical composition of the pulp obtained from 21 different sweet sorghum genotypes grown as a secondary crop in Şanlıurfa province conditions and the genotypes from which lignocellulosic bioethanol will be obtained with the highest yield. Thus, it is to contribute to the economy by bringing high-efficiency alternative energy sources to the country's agriculture and to prevent harmful gas emissions by using clean energy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

In the study, 21 different sweet sorghum genotypes, whose seeds were obtained from different domestic and foreign sources, were used (Table 1).

Table 1. Sweet sorghum genotype names used in the study

No	Genotype Name	No	Genotype Name	No	Genotype Name
1	Corina ^a	8	Ramada ^a	15	UNL-hybrid -3 ^a
2	Cowley ^a	9	Rio ^a	16	Williams ^a
3	Grass1 ^a	10	Roma ^a	17	Wray ^a
4	M81-E ^a	11	Smith ^a	18	No91(653411,Taiwan) ^b
5	N98 ^a	12	Theis ^a	19	No5 (144134, USDA South Africa) ^b
6	Nebraska sugarcane ^a	13	Topper 76 ^a	20	No41 (156890, USDA Zaira) ^b
7	P1579753 ^a	14	Tracy ^a	21	Gülşeker (Türkiye) ^c

^a: Nebraska University-Prof. Dr. Ismail Dweikat-USA

^b: Bati Akdeniz Agricultural Research Institute, Antalya-Türkiye

^c: Uludağ University, Bursa-Türkiye

Method

Field experiments of the study were carried out at the GAP Agricultural Research Institute, Talat Demirören Research Station in Şanlıurfa province, and laboratory studies were carried out at the Energy Agriculture Research Center Laboratory within the Black Sea Agricultural Research Institute.

The research station where the study was conducted is at 36° 42' north latitude, 38° 58' east longitude, and its altitude is 410 m above sea level (Anonymous, 2020). The physical and chemical analysis of soil samples taken from 0-15 and 15-30 cm depth of the experiment field were carried out in the Laboratory of Plant Nutrition and Soil Department of Çukurova University Faculty of Agriculture (Table 2). The soils in this area are with alluvial parent material, flat and almost flat slopes, and deep profiles. Typical red profiles have a clayey texture and the entire profile is very calcareous. The soils are with A, B, C horizons, pH between 7.3 and 7.8, low organic matter content and high cation exchange capacity. Cation exchange capacity increases towards the lower layers depending on the clay content (Dinç et al. 1988).

Lignocellulosic Bioethanol Efficiency of Different Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions

Table 2: Some physical and chemical properties of the soil experiment area

Years	Depth (cm)	pH	EC 1:2.5	N (%)	OC (%)	P (mg/kg)	CaCO ₃ (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Texture Class
2016	0-15	7.68	0.34	0.08	0.40	0.45	46.6	29	27	44	C
	15- 30	7.65	0.30	0.06	0.34	0.39	44.5	28	27	45	C
2017	0-15	7.70	0.37	0.07	0.50	0.50	47.0	30	26	44	C
	15- 30	7.74	0.36	0.05	0.40	0.41	45.5	29	26	45	C

Although Şanlıurfa falls into the continental climate region, the influence of the Mediterranean climate is observed. Summers are dry and hot, and winters are mild. During the summer season, Basra is mostly under the influence of the dry and hot tropical air mass settled in the low pressure center. Daytime temperature rises above 40 °C. Too low relative humidity increases evaporation (Atalay and Mortan, 2006).

After harvesting 21 sweet sorghum genotypes grown in Şanlıurfa province conditions in 2016 and 2017, sorghum stems from which leaves and inflorescences were taken were squeezed and the sap was taken.

500 g wet sample was taken from each genotype pulp to represent the whole and dried and ground in a drying cabinet at 65-70 °C until it reaches a constant weight. Neutral detergent fiber (NDF=cellulose+hemicellulose+lignin), acid detergent fiber (ADF=cellulose+lignin) and acid detergent lignin (ADL=lignin) contents of the prepared samples were determined using ANKOM 200 Fiber Analyzer device (Kutlu, 2008). Then, using the conversion rates in the literature, the amount of lignocellulosic bioethanol to be obtained from 1 ton of raw material from the percentages of ADF, NDF and ADL was calculated theoretically. In Table 3 and Table 4, the conversion rates used to calculate the amount of lignocellulosic bioethanol to be obtained from 1 ton of raw material (based on the cellulose and hemicellulose content of the raw material) are given step by step (Badger, 2002).

In addition, the theoretical lignocellulosic bioethanol yields per decare were calculated in liters by taking into account the dry matter yields per decare of sweet sorghum genotypes.

Table 3. Bioethanol efficiency of glucose

Dry Raw Material	1 ton (1000 kg)
Cellulose Content	x 0.45
Cellulose Conversion and Recovery Efficiency	x 0.76
Stoichiometric Bioethanol Yield	x 0.51
Fermentation Efficiency of Glucose	x 0.75
Bioethanol Efficiency of Glucose	131 kg = 151 L bioethanol

Table 4. Bioethanol efficiency of xylose

Dry Raw Material	1ton (1000 kg)
Hemicellulose Content	x 0.29
Hemicellulose Conversion and Recovery Efficiency	x 0.90
Stoichiometric Bioethanol Yield	x 0.51
Fermentation Efficiency of Xylose	x 0.50
Bioethanol Efficiency of Xylose	66 kg bioethanol = 76 L bioethanol

All the data obtained were subjected to a combined analysis of variance according to the randomized blocks experimental design using the JUMP software package and the averages were compared according to the multiple comparisons Tukey test (Yurtsever, 1984).

RESULTS AND DISCUSSION

Cellulose and Hemicellulose Contents of Sweet Sorghum Pulp

Cellulose and hemicellulose, which are the main polysaccharides of biomass, affect the efficiency of enzymatic hydrolysis and the amount of ethanol obtained accordingly. For this reason, in the study,

Lignocellulosic Bioethanol Efficiency of Different Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions

cellulose and hemicellulose contents of different sweet sorghum genotypes pulp grown in Şanlıurfa province conditions in 2016 and 2017 were determined on the basis of dry matter. The obtained values and variance analysis results are given in Table 5 and Table 6 comparatively.

Table 5. Cellulose contents of the pulp of sweet sorghum genotypes grown in Şanlıurfa province conditions.

Genotype Name	Cellulose (%)		
	2016	2017	Average
Corina	36.88 efg	34.61 de	35.74 efg
Cowley	36.61 efg	33.08 fg	34.84 ghı
Grass1	40.27 a	35.36 cd	37.81 bc
M81-E	36.06 gh	34.01 ef	35.04 fgh
N98	33.38 j	39.26 a	36.32 de
Nebraska sugarcane	33.24 j	33.02 fg	33.13 j
P1579753	39.06 abc	35.36 cd	37.21 cd
Ramada	34.01 ij	36.34 c	35.18 fgh
Rio	34.04 ij	35.91 c	34.97 gh
Roma	37.89 cde	30.78 ı	34.34 hı
Smith	37.30 d-g	32.75 gh	35.03 gh
Theis	37.60 def	33.89 efg	35.74 efg
Topper 76	31.75 k	30.72 ı	31.23 k
Tracy	37.26 d-g	33.20 fg	35.23 fgh
UNL-hybrid-3	40.14 a	35.43 cd	37.79 bc
Williams	36.23 fgh	31.78 hı	34.01 ij
Wray	35.08 hı	36.22 c	35.65 efg
No91	36.54 efg	35.35 cd	35.94 ef
No5	39.68 ab	31.13 ı	35.40 efg
No41	39.02 abc	37.87 b	38.45 ab
Gülşeker	38.46 bcd	39.81 a	39.14 a
Average	36.69	34.57	
CV (%)			1.41
F genotype			**
F year			**
F genotype×year interaction			**

** There is a statistically significant difference between genotypes at the $P \leq 0.01$ level

According to the results of the analysis of variance, a statistically significant difference was found at the $P \leq 0.01$ level between the genotype, year and genotype×year interaction in terms of cellulose content (Table 5). According to the results of the combined two-year analysis, the cellulose content of sweet sorghum pulp varies between 30.72-40.27%. The highest cellulose content was obtained in the Grassi genotype (40.27%) in the first year of the study, and the lowest cellulose content was obtained in the Topper 76 genotype (30.72%) in the second year of the study. Although the average cellulose content varied between 31.23% and 39.14%, the lowest was observed in the Topper 76 genotype and the highest in the Gülşeker genotype. Considering the year averages, the cellulose content in the first year of the study (36.69%) was found to be higher than in the second year (34.57%).

According to the results of the analysis of variance in the hemicellulose content, a statistically significant difference was found at the $P \leq 0.01$ level between the genotype, year and genotype×year interaction (Table 6). According to the results of the two-year combined analysis, the hemicellulose content of sweet sorghum pulp was determined to vary between 18.34-24.90%. The highest hemicellulose content was obtained in the No41 genotype (24.90%) in the second year of the study, and

Lignocellulosic Bioethanol Efficiency of Different Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions

the lowest hemicellulose content was obtained in the Ramada genotype (18.34%) in the second year of the study. Although the average hemicellulose content varied between 19.70-23.51%, the lowest content was observed in the Ramada genotype, and the highest content was observed in the No41 genotype.

Table 6. Hemicellulose contents of the pulp of sweet sorghum genotypes grown in Şanlıurfa province conditions.

Genotype Name	Hemicellulose (%)		
	2016	2017	Average
Corina	22.11 bc	19.89 fgh	21.00 d-h
Cowley	22.22 bc	18.99 gh	20.61 e-h
Grass 1	24.34 a	21.44 c-f	22.89 ab
M81-E	20.92 b-e	22.70 bcd	21.81 b-e
N98	21.21 b-e	21.67 c-f	21.44 c-g
Nebraska sugarcane	20.03 de	21.58 c-f	20.80 d-h
P1579753	24.19 a	21.43 c-f	22.81 abc
Ramada	21.06 b-e	18.34 h	19.70 h
Rio	22.56 ab	20.77 d-g	21.67 b-f
Roma	22.31 bc	19.98 fgh	21.15d-g
Smith	20.63 cde	20.03 e-h	20.33 fgh
Theis	21.40 bcd	24.51 ab	22.96 ab
Topper 76	21.41 bcd	18.91 gh	20.16 gh
Tracy	21.26 b-e	19.71 fgh	20.48e-h
UNL-hybrid-3	21.38 bcd	20.23 e-h	20.80 d-h
Williams	21.47 bcd	19.60 fgh	20.53 e-h
Wray	20.80 b-e	23.32 abc	22.06 bcd
No91	20.95 b-e	23.43 abc	22.19 a-d
No5	22.59 ab	21.63 c-f	22.11 a-d
No41	22.12 bc	24.90 a	23.51 a
Gülşeker	19.50 e	22.19 cde	20.85 d-h
Average	21.64	21.20	
CV (%)			3.58
F genotype			**
F year			**
F genotype×year interaction			**

** There is a statistically significant difference between genotypes at the $P \leq 0.01$ level

Han et al. (2013) conducted a study to determine the cellulose and hemicellulose contents of the stalk and pulp of the sweet sorghum plant for ethanol production potential. In the study, the cellulose content for Dale, M81-E, Topper and Theis varieties was 30.5%, 32.1%, 33.1% and 34.4%, respectively, and the hemicellulose content; respectively, 23.9%, 26.4%, 27.0% and 27.8%. In this study, cellulose and hemicellulose contents of M81-E, Topper and Theis cultivars grown in Şanlıurfa province conditions were similar.

Marx et al. (2014), in their study on bioethanol production from sweet sorghum pulp using microwave irradiation, determined the cellulose and hemicellulose contents of sweet sorghum pulp as 36.60% and 22.96%, respectively. Umagiliyage et al. (2015) found the cellulose and hemicellulose contents of sweet sorghum pulp to be $36.9 \pm 1.6\%$ and $17.8 \pm 0.6\%$, respectively, in their study on improving the enzymatic hydrolysis of sweet sorghum pulp. Barcelona et al. (2016), in their study on ethanol production from sweet sorghum, determined the cellulose and hemicellulose contents of sweet sorghum pulp as $40.4 \pm 2.6\%$ and $20.0 \pm 2.5\%$, respectively.

In the study conducted with six hybrid sorghum biomass in two different regions of Minas Gerais State for the production of lignocellulosic bioethanol; It has been determined that the average cellulose content of the hybrids varies between 35.81% and 39.07%, and the average hemicellulose content varies between 25.34-28.91% (Almeida et al., 2019).

When the average cellulose and hemicellulose contents of the studied sorghum genotypes were examined, it was observed that similar results were obtained with the studies.

Theoretical Lignocellulosic Bioethanol Yield of Sweet Sorghum Pulp

The theoretical lignocellulosic bioethanol yield values and multiple comparisons of the pulp obtained from different sweet sorghum genotypes grown in Şanlıurfa province conditions in 2016 and 2017 are given in Table 7.

According to the results of the analysis of variance in the theoretical lignocellulosic bioethanol yield, a statistically significant difference was found at the $P \leq 0.01$ level between the genotype, year and genotype \times year interaction (Table 7). According to the combined two-year analysis, it was determined that the theoretical lignocellulosic bioethanol yield ranged between 168.2-219.2 L/ton raw material. The highest theoretical lignocellulosic bioethanol yield was obtained in Grassi genotype in the first year of the study, and the lowest yield was obtained from Topper genotype in the second year of the study.

Table 7. Theoretical lignocellulosic bioethanol yields of pulp of sweet sorghum genotypes grown in Şanlıurfa province conditions.

Genotype Name	Theoretical Lignocellulosic Bioethanol Yield (L/ton raw material)		
	2016	2017	Average
Corina	200.2 efg	185.4 f	192.8 f-1
Cowley	199.5 efg	177.1 hi	188.3 jkl
Grassi	219.2 a	192.6 cd	205.9 b
M81-E	193.7 hij	191.3 cde	192.5 ghi
N98	184.7 lm	207.7 a	196.2 c-f
Nebraska sugarcane	180.7 mn	184.4 fg	182.6 m
P1579753	214.3 ab	192.6 cd	203.5 b
Ramada	186.6 kl	187.3 ef	186.9 kl
Rio	191.0 ijk	192.7 cd	191.9 hij
Roma	204.5 de	171.5 jk	188.0 kl
Smith	197.4 fgh	178.9 hi	188.2 kl
Theis	200.8 ef	196.1 bc	198.5 cd
Topper 76	179.3 n	168.2 k	173.7 n
Tracy	199.1 fg	179.7gh	189.4 ijk
UNL-hybrid-3	210.1 bc	189.4 def	199.7 c
Williams	195.9 f-1	174.1 ij	185.0 lm
Wray	189.7 jkl	201.3 b	195.5 d-g
No91	195.6 ghi	198.4 b	197.0 cde
No5	211.9 bc	177.6 hi	194.8 e-h
No41	208.1 cd	212.0 a	210.0 a
Gülşeker	198.4 fgh	211.2 a	204.8 b
Average	198.1	189.0	
CV (%)			1.03
F genotype			**
F year			**
F genotype \times year interaction			**

** There is a statistically significant difference between genotypes at the $P \leq 0.01$ level

The average variety ranged between 173.7-210.0 L/ton raw material and the lowest value was in Topper 76 genotype, followed by Nebraska sugarcane and Williams genotypes, respectively.

Lignocellulosic Bioethanol Efficiency of Different Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) Mohlenbr.) Genotypes in Şanlıurfa Ecological Conditions

Considering the year averages, while the theoretical average lignocellulosic bioethanol yield was 198.1 L/ton raw material in 2016, it was found to be 189.0 L/ton raw material in 2017.

In the study, the theoretical lignocellulosic bioethanol yield per decare (L/da) was calculated by considering the dry matter yields per decare of sweet sorghum genotypes and given in Table 8 with multiple comparisons.

According to the results of the analysis of variance, a statistically significant difference at the level of $P \leq 0.01$ was found between genotype, year, genotype \times year interaction in terms of theoretical lignocellulosic bioethanol yield per decare. According to the two-year pooled analyzes, the theoretical lignocellulosic bioethanol yield ranged from 414.9 to 834.3 L/da. The highest theoretical lignocellulosic bioethanol yield was obtained in the UNL-hybrid-3 genotype in the first year of the study, and the lowest in the N98 genotype in the first year of the study. The genotype average ranged between 474.7-805.5 L/da, and the lowest yield was observed in Williams genotype, while the highest yield was observed in UNL-hybrid-3 genotype. Considering the year averages, it was determined that the average theoretical lignocellulosic bioethanol yield in the first year of the study was 622.9 L/da, and the yield in the second year was 575.5 L/da.

Table 8. Theoretical lignocellulosic bioethanol yields of the pulp of sweet sorghum genotypes grown in Şanlıurfa province conditions (based on dry matter).

Genotype Name	Theoretical Lignocellulosic Bioethanol Yield (L/da)		
	2016	2017	Average
Corina	592.7 b-g	537.4 c-g	565.1 d-h
Cowley	580.9 b-g	542.3 c-f	561.6 d-h
Grassi	673.0 a-e	558.5 c-f	615.7 cde
M81-E	686.9 a-d	583.9 b-e	635.4 cde
N98	414.9 g	597.1 bcd	506.0 fgh
Nebraska sugarcane	443.7 fg	553.5 c-f	498.6 gh
P1579753	769.2 ab	529.6 d-g	649.4 cde
Ramada	584.7 b-g	632.0 bc	608.3 c-f
Rio	552.9 c-g	592.6 bcd	572.7 d-h
Roma	633.3 b-f	519.0 d-g	576.2 d-h
Smith	725.1 abc	671.0 b	698.1 abc
Theis	755.7 ab	777.2 a	766.5 ab
Topper 76	664.7 a-e	538.2 c-f	601.5 c-g
Tracy	554.0 c-g	530.0 d-g	542.0 e-h
UNL-hybrid-3	834.3 a	776.7 a	805.5 a
Williams	479.3 efg	470.2 fg	474.7 h
Wray	478.0 efg	493.6 efg	485.8 h
No91	755.3 ab	580.3 b-e	667.8 bcd
No5	659.4 a-e	439.6 g	549.5 e-h
No41	717.5 a-d	556.5 c-f	637.0 cde
Gülşeker	525.0 d-g	607.4 bcd	566.2 d-h
Average	622.9	575.5	
CV (%)			9.92
F genotype			**
F year			**
F genotype \times year interaction			**

**There is a statistically significant difference between genotypes at the $P \leq 0.01$ level

In a study conducted with six sweet sorghum cultivars planted in the Pacific coastal plains of Guatemala, the average bioethanol yield was found to be 220 g bioethanol/kg on dry matter basis and 2465 L bioethanol per hectare (Cifuentes et al., 2014). In another study, it was tried to determine the amount of bioethanol obtained from the biomass of three sorghum cultivars (Rona 1, Santos, Sucrosorgo 506) grown as the main crop and second crop in central and eastern Europe with a temperate climate.

As a result of the study, it was determined that the amount of bioethanol that could be obtained from the main product was higher than the second product, and the highest average bioethanol yield was obtained from Sucrosorgo 506 variety (22.84 m³/ha) in the second year of the study (Batog et al., 2020).

Frankowski et al. (2022) reported that the amount of lignocellulosic bioethanol obtained in their study with five different types of sweet sorghum pulp in Polish conditions varied between 2.89-9.48 m³/ha. In another study conducted in Ukraine, it was reported that 11.4 m³ of bioethanol will be obtained per hectare from sweet sorghum pulp (Rakhmetova et al., 2020).

In this study, the highest theoretical lignocellulosic bioethanol yield was obtained from the UNL-hybrid-3 genotype as 805.5 L/da.

CONCLUSION

The addition of bioethanol to gasoline as an octane-increasing additive or its use as an alternative contributes to meeting the energy need, but it is important because it reduces environmental pollution and contributes to the country's economy. Research and adaptation studies should be focused on agricultural products that are low in cultivation cost for bioethanol production, have high unit area yield and are not used directly as human and animal food.

In this study, which was carried out to determine the genotypes of sweet sorghum plant suitable for the conditions of Şanlıurfa province, with high yield and biofuel potential; It has been determined that the adaptation ability of the plant to the region is high. It has been determined that sweet sorghum is a plant that can be used both as an energy plant and in animal nutrition since a high amount of biomass is obtained from the sweet sorghum plant.

As a result of the 2-year study conducted in Şanlıurfa province conditions, it was observed that the theoretical lignocellulosic bioethanol yield of different sweet sorghum genotypes pulp varied between 474.7-805.5 L/da. It was calculated that Smith, Theis, UNL Hybrid-3 genotypes among the studied genotypes had the highest lignocellulosic bioethanol yield and 698.1 L, 766.5 L and 805.5 L lignocellulosic bioethanol could be obtained per decare, respectively. It has been concluded that the varieties in question are suitable for the region and that they can be grown in large areas. In addition, within the scope of the study, the potential for energy use of sweet sorghum plant, which has a wide variety of uses, was also evaluated. Considering all the analyzes made, it was seen that the bioethanol obtained from the sweet sorghum plant can be considered as a source of bioethanol that can be obtained directly from the stems or from the pulp remaining after the must is taken. As a result, it has been determined that the sweet sorghum plant has the potential as an environmentally friendly, sustainable, renewable source of both liquid and solid biofuels and can be a raw material source in the production of alternative fuels to fossil fuels.

ACKNOWLEDGEMENTS

It is a part of the project numbered 114O948 supported by TUBITAK. We thank TUBITAK for their support.

Conflict of Interest

The article authors declare that there is no conflict of interest between them.

Author's Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

REFERENCES

- Aksoy, M., Çelik, A., Dok, M., Yücel, C., & Aydın, K. (2023). Determination of Cellulosic Bioethanol Yield of Sweet Sorghum Genotypes Grown Under Cukurova Conditions. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1), 61-70. <https://doi.org/10.33462/jotaf.1065433>
- Almodares, A., & Sepahi, A. (1996). Comparison among sweet sorghum cultivars, lines and hybrids for sugar production. *Annals of Plant Physiology*, 10, 50-55.
- Almodares, A., Hotjatabady, R. H., & Mirniam, E. (2013). Effects of drought stress on biomass and carbohydrate contents of two sweet sorghum cultivars. *Journal of Environmental Biology*, 34(3), 585.
- Almolares, A., Abdy, M., Somani, R. B., & Jilani, S. K. (1999). Comparative study of sorghum sudangrass hybrids and lines for forage. *Annals of Plant Physiology*, 13(1), 6-10.
- Anonymous, (2003). 2002 Su Yılı Hidrometeorolojik Rasat Verileri. Şanlıurfa- Harran Ovası. Köy Hizmetleri Şanlıurfa Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları.
- Atalay, İ., & Mortan, K. (2006). Türkiye Bölgesel Coğrafyası, İnkılâp Kitabevi. 3. Baskı, s.585-620 Ankara-Türkiye.
- Badger, P. C. (2002). Ethanol from cellulose: a general review. *Trends in new crops and new uses*, 14, 17-21. <https://www.hort.purdue.edu/newcrop/ncnu02/pdf/badger.pdf>
- Balat, M., & Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied energy*, 86(11), 2273-2282. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>
- Barcelos, C. A., Maeda, R. N., Santa Anna, L. M. M., & Pereira Jr, N. (2016). Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 94, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.012>
- Batog, J., Frankowski, J., Wawro, A., & Łacka, A. (2020). Bioethanol production from biomass of selected sorghum varieties cultivated as main and second crop. *Energies*, 13(23), 6291. <https://doi.org/10.3390/en13236291>
- Billa, E., Koullas, D. P., Monties, B., & Koukios, E. G. (1997). Structure and composition of sweet sorghum stalk components. *Industrial Crops and Products*, 6(3-4), 297-302. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00031-9)
- Burešová, I., & Hřivná, L. (2011). Effect of wheat gluten proteins on bioethanol yield from grain. *Applied Energy*, 88(4), 1205-1210. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.10.036>
- Chiaromonti, D., Grassi, G., Nardi, A., & Grimm, H. P. (2004). ECHI-T: large bio-ethanol project from sweet sorghum in China and Italy. *Energia Trasporti Agricoltura, Florence, Italy*.
- Cifuentes, R., Bressani, R., & Rolz, C. (2014). The potential of sweet sorghum as a source of ethanol and protein. *Energy for Sustainable Development*, 21, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2014.04.002>
- de Almeida, L. G. F., da Costa Parrella, R. A., Simeone, M. L. F., de Oliveira Ribeiro, P. C., dos Santos, A. S., da Costa, A. S. V., ... & Schaffert, R. E. (2019). Composition and growth of sorghum biomass genotypes for ethanol production. *Biomass and bioenergy*, 122, 343-348. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.030>
- Dinç, U., Şenol, S., Satın, M., Kapur, S., Güzel, N., Derici, R., ... & Kara, E. E. (1988). Güneydoğu Anadolu Toprakları (GAT), I. *Harran Ovası, TÜBİTAK, TOAG*, 534.
- Dolciotti, I., Mambelli, S., Grandi, S., & Venturi, G. (1998). Comparison of two sorghum genotypes for sugar and fiber production. *Industrial Crops and Products*, 7(2-3), 265-272. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00057-5)
- Frankowski, J., Wawro, A., Batog, J., Szambelan, K., & Łacka, A. (2022). Bioethanol Production Efficiency from Sorghum Waste Biomass. *Energies*, 15(9), 3132. <https://doi.org/10.3390/en15093132>
- Ganesh Kumar, C., Fatima, A., Srinivasa Rao, P., Reddy, B. V., Rathore, A., Nageswar Rao, R., ... & Kamal, A. (2010). Characterization of improved sweet sorghum genotypes for biochemical parameters, sugar yield and its attributes at different phenological stages. *Sugar Tech*, 12, 322-328. <https://doi.org/10.1007/s12355-010-0045-1>

- Gnansounou, E., Dauriat, A., & Wyman, C. E. (2005). Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource technology*, 96(9), 985-1002.
- Guimarães, C. C., Simeone, M. L. F., Parrella, R. A., & Sena, M. M. (2014). Use of NIRS to predict composition and bioethanol yield from cell wall structural components of sweet sorghum biomass. *Microchemical Journal*, 117, 194-201.
- Gyalai-Korpos, M., Feczak, J., & Reczey, K. (2008). Sweet sorghum juice and bagasse as a possible feedstock for bioethanol production. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*.
<https://doi.org/10.1021/ef900317s>
- Kaplan, M., Aydın, S., & Fidan, M. S. (2009). Geleceğin alternatif enerji kaynağı biyoetanolin önemi ve sorgum bitkisi. *KSU Journal of Engineering Sciences*, 12(1), 24-33.
- Kutlu, H. R. (2008). Yem değerlendirme ve analiz yöntemleri (Ders notu). *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Adana*, 20.
- Lal, R. (2008). Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production. *Waste management*, 28(4), 747-758. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.09.023>
- Marx, S., Ndaba, B., Chiyanzu, I., & Schabert, C. (2014). Fuel ethanol production from sweet sorghum bagasse using microwave irradiation. *Biomass and Bioenergy*, 65, 145-150.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.019>
- Murray, S. C., Rooney, W. L., Hamblin, M. T., Mitchell, S. E., & Kresovich, S. (2009). Sweet sorghum genetic diversity and association mapping for brix and height. *The plant genome*, 2(1).
<https://doi.org/10.3835/plantgenome2008.10.0011>
- Nahar, K. (2011). Sweet sorghum: an alternative feedstock for bioethanol. *Iranian (Iranica) Journal of Energy & Environment*, 2(1).
- Negro, M. J., Solano, M. L., Ciria, P., & Carrasco, J. (1999). Composting of sweet sorghum bagasse with other wastes. *Bioresource technology*, 67(1), 89-92. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00100-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00100-5)
- Rakhmetova, S. O., Vergun, O. M., Blume, R. Y., Bondarchuk, O. P., Shymanska, O. V., Tsygankov, S. P., ... & Rakhmetov, D. B. (2020). Ethanol production potential of sweet sorghum in North and Central Ukraine. *The Open Agriculture Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.2174/1874331502014010321>
- Reddy, B. V. S., & Reddy, P. S. (2003). Sweet sorghum: characteristics and potential. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 44, 26-28.
- Reddy, B. V., Ramesh, S., Reddy, P. S., Ramaiah, B., Salimath, M., & Kachapur, R. (2005). Sweet sorghum-a potential alternate raw material for bio-ethanol and bio-energy. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 46, 79-86.
- Shinde, M. S., Repe, S. S., Gaikwad, A. R., Dalvi, U. S., & Gadakh, S. R. (2013). Physio-biochemical assessment of sweet sorghum genotypes during post rainy season. *J. Acad. Indus. Res*, 1(8).
- Umagiliyage, A. L., Choudhary, R., Liang, Y., Haddock, J., & Watson, D. G. (2015). Laboratory scale optimization of alkali pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Industrial Crops and Products*, 74, 977-986. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.044>
- Wang, F., & Liu, C. Z. (2009). Development of an economic refining strategy of sweet sorghum in the Inner Mongolia region of China. *Energy & Fuels*, 23(8), 4137-4142.
- Yurtsever, N. (1984). *Deneysel istatistik metotlar*. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü.
- Zhao, Y. L., Dolat, A., Steinberger, Y., Wang, X., Osman, A., & Xie, G. H. (2009). Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel. *Field Crops Research*, 111(1-2), 55-64.

Atf İçin: Şahin, O., Bayram, Ö. B. ve Soysal, M. İ. (2023). Anadolu Mandalarında Vücut Kondisyonu Değerlendirme Standardının Oluşturulması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 3075-3088.

To Cite: Şahin, O., Bayram, Ö. B. & Soysal, M. İ. (2023). Establishment of Body Condition Scoring Standard in Anatolian Water Buffaloes. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 3075-3088.

Anadolu Mandalarında Vücut Kondisyonu Değerlendirme Standardının Oluşturulması

Onur ŞAHİN^{1*}, Önder Bayram ÇOBAN¹, Mehmet İhsan Soysal²

Öne Çıkanlar:

- Vücut Kondisyonu
- Manda
- Standart

Anahtar Kelimeler:

- Anadolu mandası
- Vücut kondisyonu
- Standart
- Zayıf
- Obez

ÖZET:

Bu çalışma, sığırlarda yaygın şekilde kullanılan değerlendirme yöntemini Anadolu mandasına uyarlanmak suretiyle mandalar için kullanılabilir bir değerlendirme sisteminin oluşturulması ve vücut kondisyonu açısından mevcut durumun belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışmanın materyalini 128 işletme ve bu işletmelerde yetiştirilen 614 baş manda ineği oluşturmuştur. Verilerin hazırlanması amacıyla Microsoft Excel programı, istatistiki değerlendirilme için SPSS 20.0 sürümünden faydalanılmıştır. Vücut kondisyonu değerlendirmesi sonucunda manda ineklerinin omurga (O), kaburga (K), kısa kemikler (KK), leğen kemiği (LK), but bölgesi (BB), oturak yumrusu (OY), kuyruk sokumu (KS), uyluk (U) kondisyonları ve genel vücut kondisyonu sırasıyla, 6.12 puan, 5.73 puan, 5.10 puan, 5.65 puan, 5.69 puan, 5.25 puan, 4.92 puan, 5.10 puan ve 5.51 puan olarak tespit edilmiştir. Genel vücut kondisyonu (GVK) ile O, K, KK, LK, BB, OY, KS ve U özellikleri arasında pozitif yönlü, yüksek ve önemli ($p<0.01$) bir ilişki tespit edilmiştir. Bu sonuç, farklı vücut kısımlarına ait vücut kondisyonundan hareketle genel vücut kondisyonunun tahmin edilmesindeki isabeti doğrulamaktadır. Anadolu mandalarında vücut kondisyonuna ait yeterli veri toplanması sonrasında verim, sürü ömrü, besleme özellikleri ile olan fenotipik ve genotipik ilişkileri ortaya çıkaracak daha detaylı araştırmaların yapılması tavsiye edilmektedir.

Establishment of Body Condition Scoring Standard in Anatolian Water Buffaloes

Highlights:

- Body condition
- Water Buffalo
- Standard

Keywords:

- Anatolian water buffalo
- Body condition
- Standard
- Weak
- Obese

ABSTRACT:

This study was carried out in order to establish a usable evaluation system for buffaloes and to determine the current situation in terms of body condition by adapting the widely used evaluation method in cattle to Anatolian water buffalo. The study material consisted of 128 farms and 614 buffalo cows reared in these farms. Microsoft Excel program was used to prepare the data, and SPSS 20.0 version was used for statistical evaluation. As a result of body condition evaluation, buffalo cows' spine (O), rib (F), short bones (KK), pelvis (LK), rump (BB), pine bone (OY), tail bone (KS), thigh (U) Conditions and general body condition were determined as 6.12 points, 5.73 points, 5.10 points, 5.65 points, 5.69 points, 5.25 points, 4.92 points, 5.10 points and 5.51 points, respectively. A positive, high and significant ($p<0.01$) relationship was determined between general body condition (GVK) and O, F, KK, LK, BB, OY, KS and U characteristics. This result confirms the accuracy in estimating the overall body condition from the body condition of different body parts. It is recommended to carry out more detailed studies that will reveal the phenotypic and genotypic relationships with yield, herd life, and feeding characteristics after sufficient data on body condition of Anatolian buffaloes are collected.

¹ Onur ŞAHİN ([Orcid ID: 0000-0002-3801-3881](https://orcid.org/0000-0002-3801-3881)), Önder Bayram ÇOBAN ([Orcid ID: 0000-0002-5179-8687](https://orcid.org/0000-0002-5179-8687)), Muş Alparslan Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Hayvansal Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Muş, Türkiye

² Mehmet İhsan SOYSAL ([Orcid ID: 0000-0002-9992-8102](https://orcid.org/0000-0002-9992-8102)), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Onur ŞAHİN, e-mail: o.sahin@alparslan.edu.tr

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Mandalar üzerinde yürütülen sınıflandırma çalışması için Muş İl Tarım ve Orman Müdürlüğünden proje bazlı izin alınmış olup, hayvan refahını kısıtlayan ve deneme öngören herhangi bir uygulama olmaması nedeniyle Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul izni alınmamıştır.

GİRİŞ

Vücut kondisyonu, mandanın semirme derecesini tahmin etmek için kullanılan hızlı ve ucuz bir yöntemdir (Drame ve ark. 1999; Buckley ve ark. 2003). Vücut kondisyonu değerlendirme, sürülerin besleme programının durumunu değerlendirmek, özellikle süt veren ineklerin ketozis, zayıf inek sendromu, yağlı inek sendromu gibi problemlerini zamanında tanımlamaya yardımcı olmaktan da ötesinde ineğin gelecekteki sağlık, üretim ve üreme performanslarını tahmin etmede ve ineğin yağ rezervlerini yönetmede önemli bir ölçüttür (Buckley ve ark. 2003; Bittante ve ark. 2004).

Bir inekte vücut kondisyonu laktasyonun her evresinde farklılık gösterir. Özellikle yağ rezervleri erken laktasyon döneminde stres altındaki ve iştahsız ineğin enerji ihtiyacını takviye etmede kullanılmaktadır. Manda ineğinin malaklama döneminde vücut kondisyonunun zayıf olması süt veriminde düşmenin yanı sıra döl tutma problemlerini beraberinde getirmektedir. Diğer taraftan bu döneme aşırı yağlı olarak giren ineklerde zor doğum ve metabolik sorunlar daha fazla yaşanmaktadır (Şahin, 2011).

Vücut yağ rezervlerinin tahmin edilebilmesi için hayvanın durumunun görsel ve dokunmak suretiyle değerlendirilmesi gerekmektedir. Son 30 yıl içerisinde çiftlik hayvanlarının vücut kondisyonlarının değerlendirilmesi amacıyla vücut üzerinde anatomik olarak belirli noktaların sayısal olarak derecelendirilmektedir. Bu sistemlerde, koyunda 0-5 skalası, sığırdaki 0,25 hassasiyetli 1-5 skalası kullanılmaktadır (Edmonson ve ark. 1989).

Vücut yağ rezervinin doğru tahmin edilebilmesi için vücudun farklı kısımlarındaki rezervlerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ineğin omurga, kaburgalar, kısa kemikler, leğen kemiği, but bölgesi, oturak yumrusu, kuyruk sokumu ve kalça bölgesi 1-9 puan (Kanada sistemi 1-5 puan) arasında değişen bir skala üzerinden değerlendirilir. Her bir vücut kısmı için elde edilen değerlendirme sonuçları toplanarak sekize bölünmek suretiyle ineğin vücudunun geneli için bir vücut kondisyonu puanı hesaplanmaktadır (Anonim, 2021).

Daha önceki yıllarda manda da vücut kondisyonu değerlendirme konusunda yapılan çalışmalar Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Mandalarda vücut kondisyonu değerlendirme konusunda yapılan çalışmalar

Araştırmacı	İrk	VKP (1-9)	VKP (1-5)
Alapati ve ark., 2010	Murrah		3.29
Lubis and Fletcher, 2012	Swamp mandası		2.90
Tariq ve ark., 2012	Nili-Ravi		3.80
Mirza ve ark., 2013	Nili-Ravi.	4.92	
Arote ve Siddiqui, 2020	Murrah (Erken Laktasyon 0-90 gün)		2.93
Arote ve Siddiqui, 2020	Murrah (Orta Laktasyon 91-180 gün)		2.95
Arote ve Siddiqui, 2020	Murrah (Geç Laktasyon >180 gün)		3.48
Thelma ve ark. 2021	Murrah		3.97



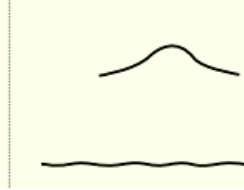
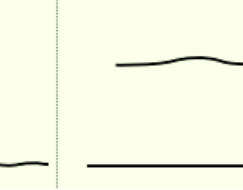



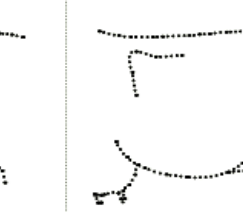
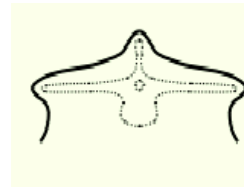
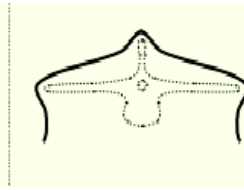
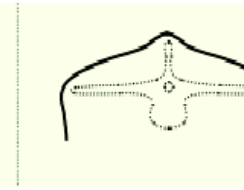
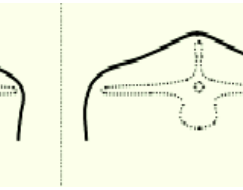
Bu çalışmada, sığırlarda güncel ve yaygın kullanılan vücut kondisyonu değerlendirme yönteminin Anadolu mandasına uyarlanmak suretiyle mandalar için kullanılabilir bir değerlendirme sisteminin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Anadolu mandalarında vücut kondisyonu ile ilgili yeterli veri altyapısının oluşturulması, vücut kondisyonunun süt miktarı, sütün kimyasal kompozisyonu, döl verimi ve karkas verimi üzerine etkilerini ve ilişkilerini ortaya koyacak çalışmalara temel olması beklenmektedir. Bunun yanı sıra vücut kondisyonu puanlama sistemi, manda yetiştiricilerine besleme programlarının değerlendirilmesi ve planlamasına imkan sağlayacaktır. Ayrıca makine öğrenmesi teknolojilerine dayalı görüntü işleme ve değerlendirme sisteminin oluşturulmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmanın materyalini, Bitlis ilinde manda yetiştiriciliği yapan 122 aile işletmesi ve bu işletmelerde yetiştirilen 614 baş manda ineği oluşturmuştur.

Vücut yağ rezervinin doğru tahmin edilebilmesi için vücudun farklı kısımlarındaki rezervlerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla ineğin omurga, kaburgalar, kısa kemikler, leğen kemiği, but bölgesi, oturak yumrusu, kuyruk sokumu ve kalça bölgesi 1-9 puan (Kanada sistemi 1-5 puan) arasında değişen bir skala üzerinden değerlendirilir. Her bir vücut kısmı için elde edilen değerlendirme sonuçları toplanarak sekize bölünmek suretiyle ineğin vücudunun geneli için bir vücut kondisyonu puanı hesaplanmaktadır (Anonim, 2021).













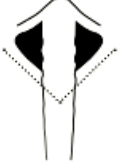
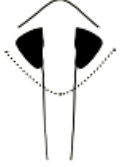
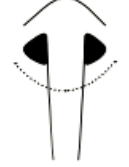

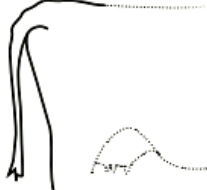

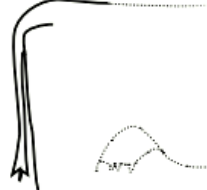

Vücut Bölümü	3 Puan	4 Puan	5 Puan	6 Puan
Omurga (O)				
Kaburga (K)				
Kısa Kemikler (KK)				

Omurganın kısa kaburgalar hizasında (bel) üzerinde oluşturduğu çıkıntıya bakılır. Hayvanın arkasından, omurga çıkıntılı mı yoksa yuvarlak ve düz mü? Hayvanın yan tarafından, tek tek omurların oluşturduğu çentikler görünüyor mu yoksa sırt sırtı düz mü?

Kaburgalar kolayca görünebilir mi? Kaç tane kaburga görünüyor? Kaburgaların aralarındaki boşlukların durumu nasıl, kaburga kenarları keskin mi? Kuyruğa en yakın olan son kaburga ilk görülendir ve daha kondisyon düştükçe başa doğru daha fazla kaburga görünür.

Kısa kaburgalar kolayca görülebilir mi? Dokunulduğunda hissedilebilir mi? Kaburgaların uçları keskin, pürüzsüz veya yuvarlak mı? Kondisyon düştükçe, kısa kemiklerin uçları daha belirgin ve daha keskin hale gelir. Kısa kaburga skorları Rumenin dolu olmasından etkilenebilir.

Şekil 1. Vücut bölümlerine ait vücut kondisyonu değişimi (Anonim, 2021)

Kategori	3 Puan	4 Puan	5 Puan	6 Puan
Leğen kemiği (LK)				
	Gözle ve elle muayene edilerek leğen kemiği çıkıntısının ve köşelerinin keskinliği ve dolgunluğu değerlendirilir. Leğen kemikleri köşeli ve keskin mi yoksa düz ve yuvarlak mı? Tepesindeki tacın görünümü ve gamze olup olmadığı			
But Bölgesi (BB)				
	en kemiği, kalça eklemi ve oturak yumrusu arasındaki alandır. Bu alandaki iskeletin belirginliği, alanda rlık veya dolgunluk durumu gözle değerlendirilir.			
Oturak Yumrusu (OY)				
	Oturak yumru kemiklerinin şekli, gamze olup olmadığı, Oturak yumrusu kemikleri köşeli mi? Yuvarlak mı? Kondisyon arttıkça yağ dokusunun etkisiyle köşeler yuvarlak hale gelir.			
Kuyruk Sokumu (KS)				
	Gözle ve elle kontrol edilerek çukurun derinliği iç duvarlarda doku oluşumu veya kuruluk durumu değerlendirilir. İç yüzey "U" veya "V" şekli mi oluşturuyor? Doku oluşumu arttıkça bölge dolar ve yuvarlak bir hal alır. Doku azaldıkça keskin ve köşeli bir durum ortaya çıkar.			
Uyluk (U)				
	Gözle ve elle kontrol edilerek arka bacakların aşağı doğru arka çizgisinin durumu ve yan bölgelerinin dolgun olup olmadığı, çukurluk durumu değerlendirilir. VKP düştükçe arka çizgi iç bükey görünüm alırken, VKP arttıkça, kalça ve diz üstü kısım dolar. Ortalamada düz bir görünüm alırken, yağlı kondisyonda arka çizgi dış bükey hal alır.			

Şekil 1. (Devamı)

Anonim (2021) tarafından geliştirilen vücut kondisyonu değerlendirme sistemi çalışma kapsamındaki manda inekleri üzerinde uygulanmış ve 1-9'a skalası üzerinden puanlanmıştır. Değerlendirme iskelet yapısı ve iskelet üzerindeki mevcut doku miktarı elle ve gözle incelenerek yapılmıştır.

Değerlendirme sistemine dayalı olarak her bir manda ineği üzerinde omurga (O), kaburgalar (K), kısa kemikler (KK), leğen kemiği (LK), but bölgesi (BB), oturak yumrusu (OY), kuyruk sokumu (KS) ve oyluk (OY) olmak üzere 8 özellik üzerinde 1-9 skalası üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Bu işlemi müteakip her manda ineği için 8 vücut kısmı için verilen puanlar toplanarak 8'e bölünerek genel vücut kondisyonu puanı hesaplanmıştır. Değerlendirme sonuçları 1-9 puan ve 1-5 puan olmak üzere iki skala üzerinden sunulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sistemin Anadolu mandası inekleri üzerine uyarlanması ile ilgili bilgiler Şekil 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'da verilmiştir



Şekil 2. Omurga özelliği için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

1-9 puan skalası üzerinden zayıf vücut kondisyonu olarak değerlendirilen 1 ve 2 puan için bel omurlarına ait diken çıkıntıları arkadan bakıldığında oldukça belirgin ve dik durumdadır. Yandan bakıldığında diken çıkıntıları oldukça belirgin ve diken çıkıntıları arasında derin boşluk göze çarpmaktadır. Zayıf kondisyon kapsamındaki 3 puan için arkadan bakıldığında bel omurları askı şeklinde görünmektedir. Yan taraftan bakıldığında diken çıkıntıları gözle görülmektedir. Diken çıkıntıları arasındaki boşlukların derinliği azalmış olmakla birlikte yağmur oluğu gibi bir görünüm arz etmektedir.

Ortalama vücut kondisyonu olan 4 puan için arkadan yüksek bel omurga çizgisi gözle görülebilmektedir. Yan taraftan bakıldığında bel omurlarına ait diken çıkıntıları, ara boşluklarda hafif doku oluşumu nedeniyle düzensiz bir görünüm arz etmektedir. Yan taraftan bel omurları elle yoklandığında diken çıkıntıları ve ara boşluklar bariz bir şekilde hissedilebilmektedir.

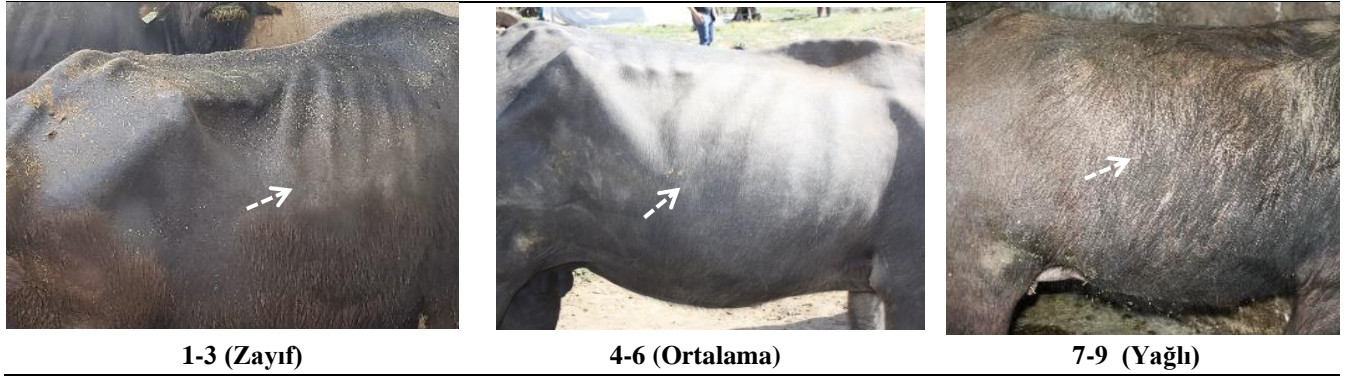
Ortalama vücut kondisyonu kapsamındaki 5 puan için arkadan bakıldığında bel omurları ara boşlukları doku oluşumu ile kapandığı için göze pürüzsüz bir görünüm arz etmektedir. Yan bakıldığında ara tiken çıkıntıları pürüzsüz bir görünüm arz eder. Elle yoklandığında omurga çıkıntıları ve ara boşluklar hafif bir şekilde hissedilebilmektedir.

Ortalama vücut kondisyonu üst sınırı olan 6 puan için arkadan bakıldığında bel omurları üzerinde ve çevresindeki doku oluşumu nedeniyle yumru gibi görünür. Yandan bakıldığında bel omurları düz bir görünüme sahip olmakla birlikte kısa kemikler ile arasının doku birikimi göze çarpar. Omurların üzerine elle sıkı bir şekilde bastırıldığında omurlar ve ara boşluklar çok hafif hissedilebilmektedir.

Yağlı vücut kondisyonu kapsamında yer alan 7 puan için arkadan ve yandan bakıldığında bel omurları doku birikimi nedeniyle düz bir görünüm arz eder. Elle bastırılarak yoklanması halinde omurlar ve aradaki boşluklar hissedilmez. Bel omurları ile kısa kemikler arası doku birikimi nedeniyle düzleşmiş ancak elle yoklandığında doku birikimine rağmen bel omurları ile kısa kemikler bölgesel olarak birbirlerinden ayrılabilir (Şekil 2).

Yağlı vücut kondisyonu olarak değerlendirilen 8 kondisyon puanında bel omurları üzerinde ve kısa kemikler ile arasındaki bölgede yoğun bir doku birikimi göze çarpar. Bel omurları arkadan ve yandan bakıldığında ve elle yoklandığında düz bir durum arz eder. Hatlar tamamen gözden kaybolmuştur. Bel omurları ile kısa kemikler ile arası yağlanmaya bağlı olarak tamamen kapanmış ve düzleşmiştir.

Aşırı yağlı (obez) kondisyon olarak değerlendirilen 9 kondisyon puanında arkadan ve yan taraftan bakıldığında aşırı yağlanmaya bağlı olarak bel omurlarının bulunduğu alan dolgun ve dış bükey bir durum arz etmektedir (Şekil 2).



Şekil 3. Kaburgalar için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Zayıf vücut kondisyonu olarak değerlendirilen 1 ve 2 kondisyon puanlarında tüm kaburgalar bariz şekilde çıkıntılı, kenarları keskin ve kaburgalar arasında derin boşluk göze çarpmaktadır. Yandan bakıldığında tüm kaburgalar gözle rahatlıkla görülebilmektedir.

Üç vücut kondisyonu puanında 4 ila 5 kaburga gözle izlenebilmekle birlikte aralarındaki boşluklar göze çarpmakla birlikte kaburgalar arasında boşlukların derinliği azalmıştır.

Dört vücut kondisyonu puanında 2 ila 3 kaburga gözle izlenebilmektedir. Kaburga kenarları keskinlik azalmış, yuvarlak bir hal almıştır. Elle dokunulduğunda kaburga hatları ve ara boşluklar rahatlıkla hissedilebilmektedir.

Beş vücut kondisyonu puanında doku oluşumu nedeniyle kaburga yüzeyinin düzleşmesine bağlı olarak gözle izlenememektedir. Ancak elle dokunulduğunda kaburgalar hatları ve boşluklar halen hafif hissedilebilmektedir.

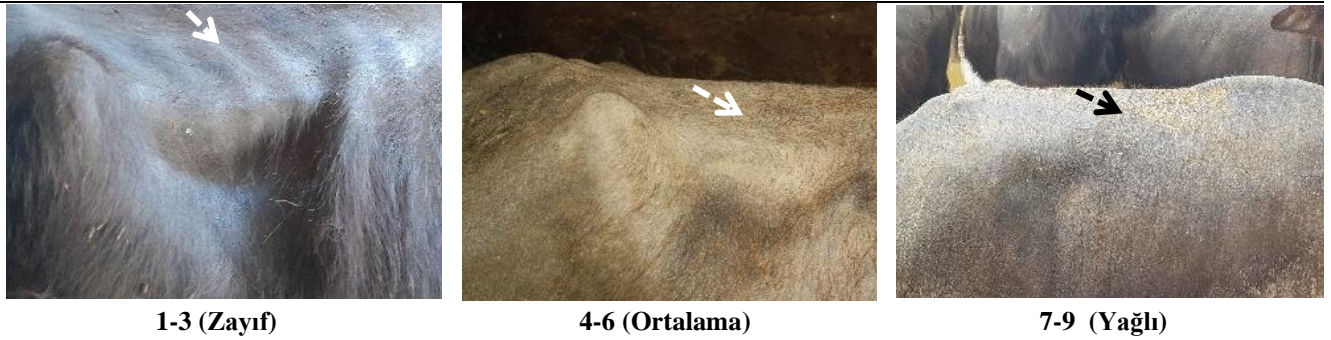
Altı kondisyonu puanında doku birikiminin artmasına bağlı olarak kaburga yüzeyi pürüzsüz bir görünüm arz etmektedir. Ancak elle bastırılarak yoklandığında kaburga hatları ve ara boşluklar hafif hissedilmektedir.

Yedi vücut kondisyonu puanında kaburga yüzeyinde yoğun doku birikimi olması nedeniyle kaburgalar gözle görülememekte ve elle bastırılarak yoklandığında bile kaburgalar hissedilememektedir.

Sekiz vücut kondisyonu puanında kaburga bölgesinin yağlanmanın artmasına bağlı olarak dış bükey bir görünüm aldığı görülmektedir. Dokuz vücut kondisyonu puanında ise kaburgaların üzerindeki deri yüzeyinde yağ dokusu toplanmasına bağlı kıvrımlar göze çarpmaktadır (Şekil 3).

Kısa kemikler özelliği kapsamında 1 ve 2 puanlarında kısa kemiklerin uçları deri altında bariz şekilde çıkıntılı, kenarları keskin ve aralarında derin boşluklar göze çarpmaktadır. Bel omurları ile kısa kemikler arasında 90 dereceye yakın bir açış söz konusudur (Şekil 4).

Üç kondisyon puanında kısa kemiklerin kenarları ve uçları gözle görülmekle birlikte aralarındaki boşlukların derinliği azalmıştır. Elle dokunulduğunda kısa kemiklerin hatları ve ara boşluklar tamamen hissedilebilmektedir. Kısa kemikler ile bel omurları arasındaki hafif bir kavış göze çarpmaktadır (Şekil 4).



Şekil 4. Kısa kemikler için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Dört kondisyon puanında kısa kemikler bireysel olarak tek tek gözle görülebilmektedir. Kısa kemiklerin uç kısımlarının hafif doku oluşumuna bağlı olarak yuvarlak bir hal aldığı, aradaki boşlukların da hafif doku birikimine bağlı olarak derinliğin iyice azaldığı görülmektedir. Kısa kemikler ile bel omurları arasındaki kavış azalmıştır.

Beş kondisyon puanında kısa kemikler bireysel olarak ve uç kısımları doku birikimi nedeniyle aralarındaki boşluklar kapanmış, kenarlar ve uç kısım yuvarlak bir şekilde kavuşmuştur. Gözle bakıldığında kısa kemikler ve ara boşluklar görünmez ancak elle dokunulduğunda kısa kemikler, aradaki boşluklar ve kısa kemiklerin uç kısımları hissedilebilmektedir. Kısa kemikler ile omurga arası doku artışına bağlı olarak düz bir görünüme sahiptir.

Altı kondisyon puanında kısa kemiklerin yüzeyinde ve uç bölgelerinde yağ dokusunun artmasına bağlı olarak kısa kemikler tamamen gözden kaybolmuştur. Ancak elle bastırılarak muayene edildiğinde kısa kemiklerin hatları ve ara boşluklar hafif şekilde hissedilebilmektedir. Kısa kemikler ile bel omurları arası yağlanmaya bağlı olarak dolgunluk göze çarpmaktadır (Şekil 4).

Yedi kondisyon puanında yağlanmadaki artışa bağlı olarak kısa kemikler görülmemekle birlikte el ile bastırılarak yoklandığında dahi kemikler hissedilmemektedir. Kısa kemikler ve bel omurları hat olarak birbirlerinden gözle ayırt edilememektedir.

Sekiz kondisyon puanında kısa kemiklerin bulunduğu alan belli olmamaktadır. Elle yoklandığında yoğun bir yağ kitlesi izlenimi alınmaktadır. Kısa kemikler ile bel omurlarının bulunduğu alan yağlanmadan dolayı tamamen düz bir görünüm arz etmektedir.

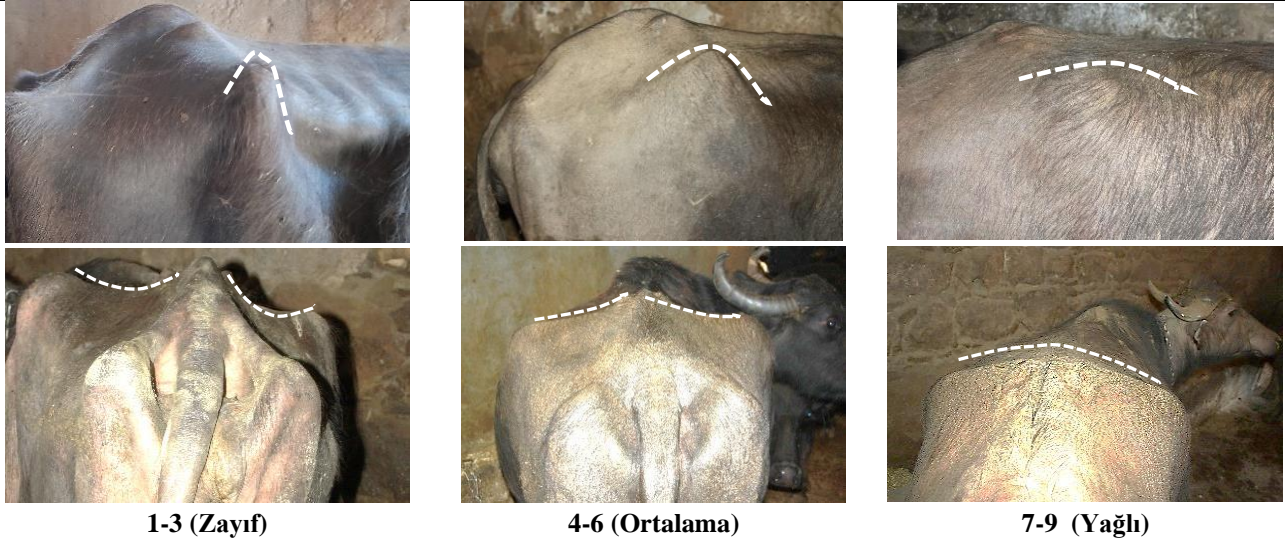
Dokuz kondisyon puanı için kısa kemikler ve bel omurlarının üzeri yoğun yağlanmaya bağlı olarak dış bükey bir görünüm arz etmektedir. Üstten bakıldığında dış bükey ve yandan bakıldığında yuvarlak bir yapı göze çarpmaktadır (Şekil 4).

Leğen kemiği çıkıntısı özelliği için 1 ve 2 kondisyon puanlarında leğen kemiğinin kenar hatları açılı ve keskin durumdadır. Leğen kemiğinin üstünde derin bir çöküntünün yanı sıra ön ve arka kısımda derin gamze çöküntüleri göze çarpmaktadır (Şekil 5).

Üç kondisyon puanında leğen kemiğinin üstündeki çöküntünün yanı sıra ön ve arkadaki gamze çöküntüleri hafif doku birikimine bağlı olarak azalmakla birlikte halen gözle fark edilebilmektedir. Leğen kemiğinin kenarları hafif dokulu olmakla birlikte açı ve keskinlik devam etmektedir.

Dört kondisyon puanında leğen kemiğinin kenarları keskin olmayıp, pürüzsüzdür. Ön ve arkadaki gamzeler kaybolmuş ancak leğen kemiğinin üstünde hafif çöküntü göze çarpmaktadır.

Beş kondisyon puanında leğen kemiğinin hatları yuvarlaklaşmıştır. Leğen kemiğinin üstündeki çöküntünün yanı sıra ön ve arkadaki gamzelerin kaybolduğu görülmektedir. Yandan bakılınca kavisli bir durum göze çarpar. Elle yoklandığında leğen kemiğinin hatları rahatlıkla hissedilmektedir (Şekil 5).

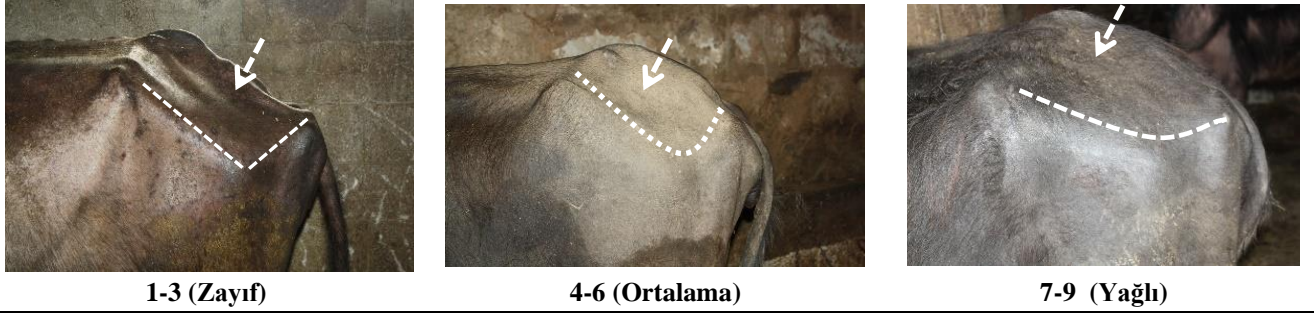


Şekil 5. Leğen Kemiği için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Altı kondisyon puanı için yağ dokusu oluşumuna bağlı olarak leğen kemiğinin hatları yuvarlak bir hal almıştır. Leğen kemiğinin üstü düz bir hal almıştır. Elle bastırılarak yoklandığında leğen kemiğinin hatları hafif hissedilebilmektedir.

Yedi kondisyon puanı için yağ dokusunun artmasına bağlı olarak leğen kemiği deri altında sadece şişlikten ibarettir. Elle bastırıldığında dahi leğen kemiğinin hatları hissedilmemektedir (Şekil 5).

Sekiz kondisyon puanında leğen kemiği tamamen gözden kaybolmuştur. Elle yoklandığında yağ dokusu izlenimi alınmaktadır. Leğen kemiğinin üst kısmı ile bel omurları arası tamamen yağlanarak düz bir hal almıştır. Dokuz kondisyon puanında ise yoğun yağlanmaya bağlı olarak leğen kemiğinin olduğu bölgede deri üzerinde kıvrımların yanı sıra arkadan bakıldığında sağ ve sol leğen kemiği arasındaki bölgenin dış bükey bir kavis sergilediği görülmektedir (Şekil 5). Bir ve iki vücut kondisyon puanlarında but bölgesinde leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusu çıkıntısı arasında keskin bir V şekli ve but yüzeyinde belirgin çukurluk göze çarpmaktadır. Elle yoklandığında açının hatları ve yüzeydeki çöküntü bariz olarak hissedilmektedir (Şekil 6).



Şekil 6. But bölgesi için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Üç vücut kondisyon puanında but bölgesinde çukurluk azalmakla birlikte leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusu çıkıntısı arasındaki V şekli halen gözle görülebilmektedir.

Dört kondisyon puanında leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusunun etrafı ve uç kısımları dolgunlaşmış yumuşak V şekli göze çarpar. But bölgesindeki çukurluk iyice azalmıştır.

Beş kondisyon puanı için leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusu çıkıntısında doku oluşumu nedeniyle aralarında U şekli göze çarpmaktadır. Bu bölge tamamen düz bir hal almıştır.

Altı kondisyon puanında leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusu çıkıntısında yağlanma başlangıcı nedeniyle bu üç nokta arasında eğik bir yay görünümü hakimdir. Elle yoklandığında but bölgesinin yüzeyinde hafif yağlanma hissi alınmaktadır.

Yedi kondisyon puanında yağlanmadaki artışa bağlı olarak leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusu çıkıntısı arasında düz bir yay görünümü dikkat çekmektedir. Elle yoklandığında but bölgesinde yağ dokusu birikiminden dolayı hafif bir dolgunluk hissi alınmaktadır.

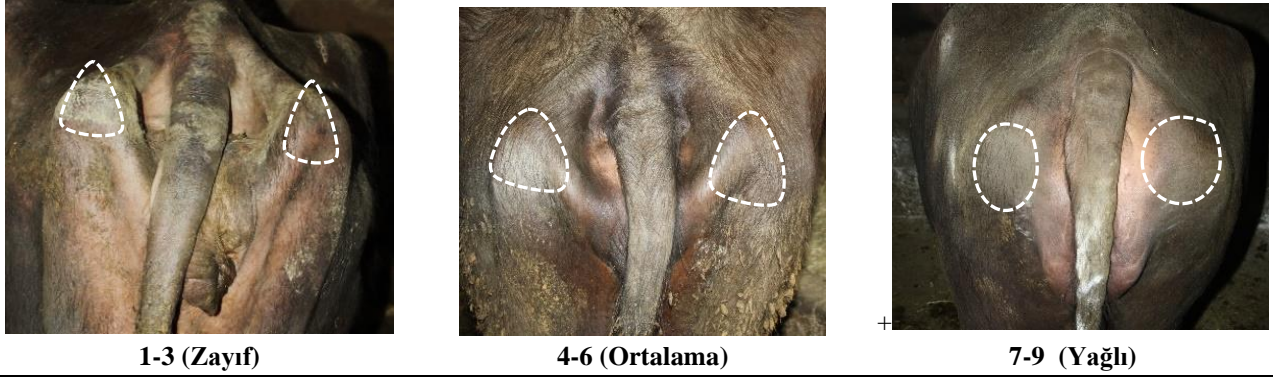
Sekiz kondisyon puanında yağ dokusundaki fazlalık nedeniyle leğen kemiği çıkıntısı, kalça eklemi çıkıntısı ve oturak yumrusu çıkıntısının hatları belirsiz olup, bu üç nokta arasında düz bir çizgi mevcuttur. But bölgesinin yüzeyi ise yağ dokusundan dolayı dış bükey bir görünüme sahip olup, sağrı kemiği ile arasındaki seviye farkı iyice azalmıştır.

Dokuz kondisyon puanında aşırı yağ dokusundan dolayı hatlar tamamen gözden kaybolmuş olup, but bölgesindeki aşırı yağ dokusunun varlığından dolayı but bölgesi sağrı ile aynı hizada ve bir bütün gibi görünmektedir (Şekil 6).

Bir ve iki kondisyon puanlarında oturak yumruları çevresinde doku olmaması nedeniyle kenarları keskin ve hatları belirgindir. Keskin hatları nedeniyle oturak yumruları ters V şekline sahiptirler.

Üç kondisyon puanında oturak yumrusu çok az doku oluşumu nedeniyle kenarları belirgin musluk görünümü arz etmektedir.

Dört kondisyon puanında oturak yumruları çevresinde hafif doku birikimi nedeniyle kenarları yuvarlak bir musluk görünümü arz etmektedir. Elle yoklanması halinde kenar hatları rahatlıkla hissedilmekle birlikte hafif bir doku hissi alınmaktadır (Şekil 7). Beş kondisyon puanında oturak yumrusu çevresinde belirgin bir doku birikimi nedeniyle oturak yumrularının kenarları yuvarlak bir hal almıştır. Elle yoklandığında oturak yumrusunun hatları ile birlikte ele doku birikimi de hissedilebilmektedir.



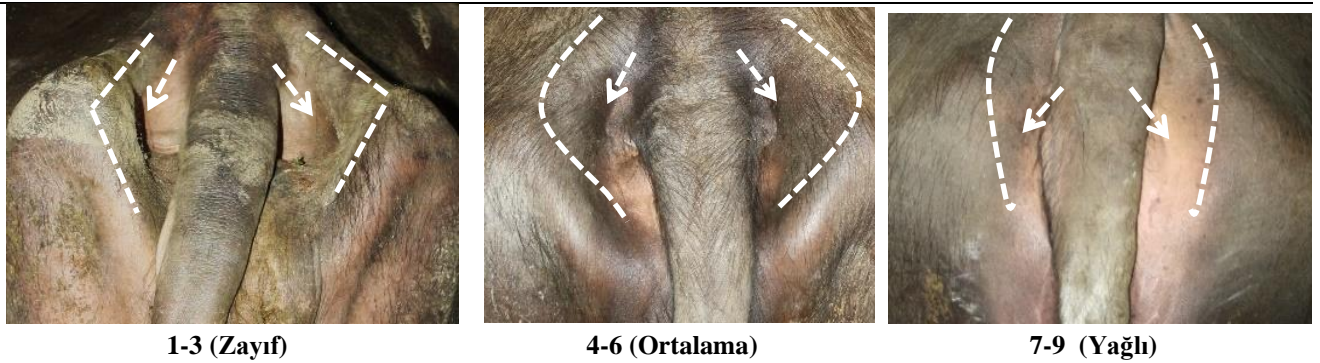
Şekil 7. Oturak yumrusu için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Altı kondisyon puanında yağlanma başlangıcı nedeniyle oturak yumrusunun kenarları belirsiz hale gelmiş olup, tamamen yuvarlak bir hal almıştır. Elle bastırılarak yoklandığında oturak yumrusu hatları ile birlikte yüzeyindeki doku birikimi de hissedilebilmektedir.

Yedi kondisyon puanında yoğun yağlanma nedeniyle oturak yumrusunun hatları gözden kaybolmuş olup, yalnızca bir şişlik göze çarpmaktadır. Elle bastırılarak yoklandığında bile oturak yumrusunun hatları hissedilememektedir.

Sekiz kondisyon puanında aşırı yağlanma nedeniyle oturak yumrusunun bulunduğu yer dış bükey bir görünüm arz etmektedir. Elle yoklandığında yoğun bir yağ tabakası hissedilebilmektedir.

Dokuz kondisyon puanında Obezite sebebiyle oturak yumrularının bulunduğu bölgede yağ dokusu birikimleri ya da kıvrımları göze çarpmaktadır (Şekil 7).



Şekil 8. Kuyruk sokumu için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Bir ve iki kondisyon puanlarında doku olmaması nedeniyle kuyruk sokumu kenarları keskin ve belirgindir. Arkadan bakıldığında kuyruk sokumunun sağ ve sol kenarları ile alt kısmında keskin bir V şekli dikkat çekmektedir. Ayrıca kuyruk sokumu zemininde ve kuyruk başlangıcının sağ ve sol yanlarında bariz ve derin bir çukurluk göze çarpmaktadır (Şekil 8).

Üç kondisyon puanında hafif bir doku varlığı olmakla birlikte arkadan bakınca kuyruk sokumunun kenarları ve alt kısmında “V” şekli görülmektedir. Kuyruk sokumunda ve kuyruk başlangıcının yan taraflarında derinliği azalmakla birlikte çukurluk devam etmektedir.

Dört kondisyon puanında kuyruk sokumunda hafif doku oluşumu nedeniyle kuyruk sokumu kemiklerinin sağ ve sol kenarları ile alt kısmı U şeklini almıştır. Ancak kuyruk sokumunun hatları gözle görülmeye devam etmektedir. Kuyruk sokumunun içi kısmında çukurluk yerini düz bir zemine bırakmıştır. Ancak kuyruk başlangıcının sağ ve sol yanında çukurluk göze çarpmaktadır.

Beş kondisyon puanında doku oluşumunun artmasına bağlı olarak kuyruk sokumu zemini ve kuyruk başlangıcının sağ ve sol yanları tamamen düzleşmiş, kuyruk sokumunda zemin ile sağ ve sol

kenarları yuvarlak bir hal almıştır. Elle yoklandığında kuyruk sokumunun hatları kolaylıkla hissedilebilmektedir.

Altı kondisyon puanında yağlanma başlangıcı nedeniyle kuyruk başlangıcının sağ ve sol yanlarında hafif yağ birikimi göze çarpmaktadır. Elle yoklandığında kuyruk sokumunun kenarları yay şeklini almış ve iskelet yapısı tamamen gözden kaybolmuştur. Kuyruk sokumunun zemininde ve iç duvarlarda yağ birikimleri hissedilebilmektedir. Kenarlar veya iskelet hatları ancak elle bastırılarak yoklandığında hissedilebilmektedir.

Yedi kondisyon puanında kuyruk sokumunun alt kısmı hafif yay şeklinde olup hatları yağ birikiminden dolayı şişkin bir durum sergilemektedir. Elle bastırılarak yoklandığı halde kuyruk sokumunun iskelet yapısı hissedilememektedir. Kuyruk başlangıcının sağ ve solu tamamen yağ dokusu ile dolmuş ve şişkin bir durum arz etmektedir.

Sekiz kondisyon puanında yağ dokusundaki artışa bağlı olarak kuyruk sokumu ve kuyruk başlangıcı hatları birbirinden ayırt edilememektedir. Dolgun ve yuvarlak bir görünüm kazanmıştır.

Dokuz kondisyon puanında aşırı yağ dokusu birikimi nedeniyle kuyruk sokumu ve kuyruk başlangıcı gözden kaybolmuştur. Kuyruk sokumu ve kuyruk başlangıcının bulunduğu alanda yağ birikimi ve kıvrımları göze çarpmaktadır (Şekil 8).



1-3 (Zayıf)



4-6 (Ortalama)



7-9 (Yağlı)

Şekil 9. Uyluk için vücut kondisyonu değerlendirme sisteminin uyarlanması

Bir ve iki kondisyon puanlarında yandan bakıldığında uyluk kısmı yağ doku olmadığı için iç bükey bir görünüm arz etmektedir. Uyluğun yan tarafından çukurluklar dikkat çekmektedir.

Üç kondisyon puanında Yan taraftan bakıldığında uyluk kısmı girintili çıkıntılıdır. Yağ dokusu çok az ve görünür değildir. Uyluğun yan taraflarında derinliği azalmakla birlikte halen çukurluklar mevcuttur (Şekil 9).

Dört kondisyon puanında yandan bakıldığında hafif yağ dokusu başlangıcı nedeniyle girinti ve çıkıntı azalmış olup hafif bir iç bükey kavis durumu söz konusudur. Yan taraflarda doku oluşumuna bağlı olarak çukurluklar azalmıştır. Ancak hem kavis hem de çukurluklar halen gözle görülebilmektedir.

Beş kondisyon puanında yağ dokusunda birikimine bağlı olarak yandan bakıldığında uyluk ve yan taraflar düz ve pürüzsüz bir görünüm arz etmektedir.

Altı kondisyon puanında var olan yağ dokusundaki artışa bağlı olarak uyluk bölgesi ve yan taraflar dolgun ve hafif dış bükey bir durum arz etmektedir. Elle yoklandığında uyluk kısmı hafif bir yağlanma hissi vermektedir.

Yedi kondisyon puanında yağ dokusunda yoğun artışa bağlı olarak yandan bakıldığında uyluk dış bükey bir görünüm arz etmektedir. Yan taraflarda doku artışına bağlı olarak yer yer dış bükeylik göze çarpmaktadır.

Sekiz kondisyon puanında aşırı yağlanma başlangıcı olup uyluk bariz bir dış bükey görünüme kavuşmuştur. Yan taraflarda da yağ birikimine bağlı şişkinlikler dikkat çekmektedir.

Dokuz kondisyon puanında obezite aşaması olup, uyluk aşırı dış bükey bir durum arz eder. Uyluğun arka ve yan taraflarında aşırı yağ dokusu birikimine bağlı doku kıvrımları göze çarpmaktadır (Şekil 9).

Çizelge 2. Anadolu mandalarda vücut kondisyonu özelliklerine ait istatistikî sonuçlar

	VKP (1-9)					VKP (1-5)				
	n	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Min	Maks	Std. Dev.	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	Min	Maks	Std. Dev.	
O	614	6.12 ± 0.04	4.0	8.5	0.94	3.64 ± 0.02	2.5	5.0	0.48	
K	614	5.73 ± 0.04	3.5	8.5	0.97	3.46 ± 0.02	2.5	5.0	0.49	
KK	614	5.10 ± 0.03	3.0	8.0	0.79	3.14 ± 0.02	2.0	4.5	0.42	
LK	614	5.65 ± 0.03	3.0	8.0	0.84	3.42 ± 0.02	2.0	4.5	0.43	
BB	614	5.69 ± 0.03	3.0	8.0	0.79	3.45 ± 0.02	2.0	4.5	0.43	
OY	614	5.25 ± 0.03	3.0	8.0	0.72	3.22 ± 0.02	2.0	4.5	0.38	
KS	614	4.92 ± 0.03	2.5	8.0	0.82	3.05 ± 0.02	2.0	4.5	0.42	
U	614	5.10 ± 0.03	3.0	8.0	0.94	3.14 ± 0.02	2.0	4.5	0.42	
GVK	614	5.51 ± 0.03	3.6	7.8	0.69	3.35 ± 0.01	2.4	4.6	0.35	

O: Omurga, **K:** Kaburgalar, **KK:** Kısa Kemikler, **LK:** Leğen Kemiği, **BB:** But Bölgesi, **OY:** Oturak Yumrusu, **KS:** Kuyruk Sokumu, **U:** Uyluk, **GVK:** Genel Vücut Kondisyonu, **VKP:** Vücut kondisyon puanı

En yüksek ortalama vücut kondisyonu değerleri omurga (O), kaburga (K) ve but bölgesi (BB) özelliklerinde (sırasıyla, 3.64 puan, 3.46 puan ve 3.45 puan) gözlenmesine karşılık, en düşük ortalama değerler kısa kemikler (KK), kuyruk sokumu (KS) ve Uyluk (U) özelliklerinde (sırasıyla, 3.14 puan, 3.05 puan ve 3.14 puan) tespit edilmiştir. Kondisyon puanları tüm özellikler için 2.0 puan ile 5.0 puan arasında değişmiştir. Genel vücut kondisyonu için ortalama, maksimum ve minimum değerler sırasıyla, 3.35 puan, 2.4 puan ve 4.6 puan olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 2).

Bu çalışmada Anadolu mandası için elde edilen ortalama vücut kondisyonu değeri, Tariq ve ark. (2012) tarafından Nili-Ravi ırkı için bildirilen değerden, Telma ve ark. (2021) tarafından Murrah ırkı için bildirdikleri değerden düşük bulunmasına karşılık, Alapati ve ark. (2010) Murrah ırkı için bildirdikleri değerden, Lubis ve Fletcher (2012) bataklık mandası için bildirdikleri değerden, Mirza ve ark. (2013) Nili-Ravi ırkı için bildirdikleri değerden yüksek bulunmuştur.

K özelliği KK ile pozitif yönlü, yüksek ve önemli ($p < 0.01$), BB özelliği LK ile pozitif yönlü, yüksek ve önemli ($p < 0.01$), LK özelliği K ve KK özellikleri ile pozitif yönlü, orta değerli ve önemli ($p < 0.01$), OY özelliği LK ve BB ile pozitif yönlü, orta değerli ve önemli ($p < 0.01$), KS özelliği LK ve BB ile pozitif yönlü, orta değerli ve önemli ($p < 0.01$), OY ile pozitif yönlü, yüksek ve önemli ($p < 0.01$) bir ilişkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Genel vücut kondisyonu O, K, KK, LK, BB, OY, KS ve U özellikleri ile pozitif yönlü, yüksek ve önemli ($p < 0.01$) bir ilişkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Anadolu mandalarda vücut kondisyonu özelliklerine ait istatistiksel sonuçlar

		O	K	KK	LK	BB	OY	KS	U	GVK
O	r	1								
	p-value									
K	N	614								
	r	0.685**	1							
KK	p-value	0.0001								
	N	614	614							
LK	r	0.685**	0.733**	1						
	p-value	0.0001	0.0001							
BB	N	614	614	614						
	r	0.571**	0.576**	0.627**	1					
OY	p-value	0.0001	0.0001	0.0001						
	N	614	614	614	614					
KS	r	0.619**	0.564**	0.595**	0.705**	1				
	p-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001					
U	N	614	614	614	614	614				
	r	0.448**	0.377**	0.400**	0.553**	0.608**	1			
GVK	p-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001			
	N	614	614	614	614	614	614	614		
	r	0.452**	0.422**	0.420**	0.560**	0.613**	0.723**	1		
	p-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		
	N	614	614	614	614	614	614	614		
	r	0.497**	0.424**	0.440**	0.486**	0.611**	0.603**	0.647**	1	
	p-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	
	N	614	614	614	614	614	614	614	614	
	r	0.803**	0.779**	0.796**	0.809**	0.844**	0.733**	0.758**	0.741**	1
	p-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	N	614	614	614	614	614	614	614	614	614

** : Significant at the level of $P < 0.01$; **O**: Omurga, **K**: Kaburgalar, **KK**: Kısa Kemikler, **LK**: Leğen kemiği, **BB**: But Bölgesi, **OY**: Oturak Yumrusu, **KS**: Kuyruk Sokumu, **U**: Uyluk, **GVK**: Genel Vücut Kondisyonu; $r < 0.5$: Zayıf ilişki, $0.5 < r < 0.7$: Ortalama düzeyde ilişki, $0.7 < r$: Güçlü ilişki.

SONUÇ

Bu çalışma sonucunda Anadolu mandası için oluşturulmuş olan vücut kondisyonu değerlendirme sistemi, sığır işletmelerinde olduğu gibi manda işletmelerinde de hayvanların beslenmesi açısından mevcut durumunu ortaya koymanın yanı sıra gelecekte uygulanması gereken besleme planının oluşturulması konusunda işletme sahiplerine önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anadolu mandalarında yeterli veri tabanı alt yapısının oluşturulmasını müteakip verimliliğe katkı sağlaması bakımından gelecekte vücut kondisyonu özelliklerinin, döl verimi, süt verimi, malaklarda büyüme ve gelişme, sütün kimyasal kompozisyonu, karkas verimi ile fenotipik ve genetik ilişkilerini konu olan detaylı araştırmaların yapılması tavsiye edilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu makalenin üretilmiş olduğu proje çalışması Muş Alparslan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından BAP-20-UBF-4901-06 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışmaya destek veren Muş Alparslan Üniversitesi Rektörlüğüne, Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne, Muş ve Bitlis Tarım ve Orman İl Müdürlüklerine, Bitlis İli Damızlık Manda Yetiştiricileri Birliği Yönetim Kurulu'na ve değerli çalışanlarına, proje çalışması için işletmelerini açarak destek veren değerli yetiştiricilerimize sonsuz teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Çalışmanın planlanması, literatür taraması ve kurgulanması OŞ ve MİS tarafından yapılmıştır. Arazi çalışmaları ve verilerin alınması OŞ ve OBC tarafından, verilerin analizi ve yorumlanması OŞ ve MİS tarafından, makalenin yazımı OŞ tarafından gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Alapati, A., Kapa, S. R., Jeepalyam, S. S., Rangappa, S. M. P. & Yemireddy, K. R. (2010). Development of the body condition score system in Murrah buffaloes: validation through ultrasonic assessment of body fat reserves. *J. Vet. Sci*, 11(1), 1-8.
- Anonim. (2021). DairyNZ body condition scoring: The reference guide for New Zealand dairy farmers. URL:[body-condition-score-made-easy_a6-field-guide_2022-final-web.pdf](https://www.dairynz.co.nz/body-condition-score-made-easy_a6-field-guide_2022-final-web.pdf) (dairynz.co.nz) (accessed date: January 15, 2023).
- Arote, S. S., Siddiqui, M. B. A. (2020). Study of body condition score and milk yield during different stages of lactation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(1), 1634-1639.
- Bittante, G., Gallo, L., Carnier, P., Comin, A. & Cassandro, M. (2004). Management and breeding of cows using body condition score. *Informatore Agrario*, 60, 55-58.
- Buckley, F., Sullivan, K. O., Mee, J. F., Evans, R. D., Dillon P. (2003). Relationships among milk yield, body condition, cow weight and reproduction in spring calved Holstein Friesians. *J Dairy Sci* 2003, 86, 2308-2319
- Drame, E. D., Hanzen, C. H., Houtain, J. Y., Laurent, Y. & Fall, A. (1999). Evolution of body condition score after calving in dairy cows. *Ann. Med. Vet.*, 143, 265-270.
- Edmonson, A.J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. & Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68-78.
- Lubis, A. & Fletcher, I. C. (1985). Subjective appraisal of body condition in Swamp buffalo cows. *Buffalo Bulletin*, 4(2), 23-27.
- Mirza, R. H., Javed, K., Abdullah, M. & Pasha, T. N. (2013). Genetic and non genetic factors affecting body condition score in nili-ravi buffaloes and its correlation with milk yield. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 23(6), 1486-1490.
- Şahin O, (2011). Süt sığırlarında tip sınıflandırması ve vücut kondisyonu değerlendirme. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği, ISBN: 978-605-87-199-03, 108 s, Ankara.
- Tariq, M., Khan, A. B., Younas, M. & Schlecht, E. (2012). Body measurements and body condition scoring as parameters for estimation of live weight in Nili Ravi buffalo. Tropentage, (Abstract). Göttingen- Kassel/ Witzenhausen, Germany. Erişim adresi: https://www.tropentag.de/2012/abstracts/links/Schlecht_6gUkXKy7.pdf
- Thelma, A. S., Hironobu, T., Abraham, G., Pinky, M. B. & Bautista, J. A. N. (2021). The relationship of body condition scores to milk production in dairy buffaloes. *Philipp. J. Vet. Med.*, 58(1), 84-95.