

MICROCONTROLLER BASED MAXIMUM POWER POINT TRACKER FOR SOLAR PANELS*

*Solar Paneller için Mikrodenetleyici Tabanlı Maksimum Güç Noktası İzleyici **

Bülent BÜYÜKGÜZEL
Department of Electrical and
Electronics Engineering

Murat AKSOY
Department of Electrical and
Electronics Engineering

ABSTRACT

Solar energy is one of the most important renewable energy sources. Unfortunately, photovoltaic (PV) power systems have two major problems: the conversion efficiency and the amount of electric power generated by solar panels changes continuously with weather conditions.

Maximum power point tracking (MPPT) techniques should be used in photovoltaic systems to maximize the PV panel output power by tracking continuously the maximum power point (MPP) which depends on panel's temperature and on irradiance conditions. Especially for low-cost implementations, the perturb and observe (P&O) maximum power point tracking algorithm is the most commonly used method due to its ease of implementation.

Keywords: Solar energy, Maximum power point tracking, MPP,MPPT, P&O

ÖZET

Güneş enerjisi en önemli yenilenebilir enerji kaynaklarından birisidir. Ne yazık ki fotovoltaik güç sistemleri iki büyük probleme sahiptir: ışınım-elektrik enerjisi dönüştürme verimliliği ve solar paneller tarafından üretilen enerji miktarının hava şartları ile sürekli olarak değişmesi.

PV sistemlerde, PV panel sıcaklığına ve ışınımına bağlı olan maksimum güç noktasının (MGN) sürekli olarak takip edilerek PV panel çıkış gücünün en yüksek seviyeye çıkartılması için Maksimum Güç Noktası İzleme (MGNI) teknikleri kullanılmalıdır. Özellikle düşük maliyeli uygulamalar için Karıştır ve Gözle maksimum güç noktası izleme algoritması kolay uygulanabilir olması nedeniyle en yaygın kullanılan yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: Güneş enerjisi, Maksimum güç noktası izleyici, MGN, MGNI, Karıştır ve Gözle

Introduction

For the last few hundred years humans have been using up fossil fuels that took around 400 million years to form and store underground. It has become clear that, even if those reserves were unlimited, we could not continue to burn them

* MSc. Thesis-(Yüksek Lisans Tezi)

with impunity. The resulting carbon dioxide emissions and increased global warming would almost certainly lead to a major environmental crisis

Solar power, a clean renewable resource with zero emission, has got tremendous potential of energy which can be harnessed using a variety of devices.

Solar power is an alternative technology that will hopefully lead us away from our petroleum dependent energy sources. The major problem with solar panel technology is that the efficiencies for solar power systems are still poor and the costs per kilo-watt-hour (kWh) are not competitive, in most cases, to compete with petroleum energy sources. Solar panels themselves are quite inefficient (approximately 30%) in their ability to convert sunlight to energy.

Moreover, the solar cell I-V characteristic is nonlinear and varies with irradiation and temperature. There is a unique point on the V-I or V-P curve of the PV, called the Maximum Power Point (MPP), at which the entire PV system operates with maximum efficiency and produces its maximum output power. The location of the MPP is not known, but can be located, either through calculation models or by search algorithms. Therefore Maximum Power Point Tracking (MPPT) techniques are needed to maintain the PV array's operating point at its MPP.

To obtain this condition, in the other words, to work PV at MPP operating point of the PV is adjusted by MPPT using DC-DC converter.

Many MPPT techniques have been proposed in the literature. Examples are the Perturb and Observe (P&O) method, the Incremental Conductance (IC) method (Hohm & Ropp, 2002), the Artificial Neural Network method (Sun, Wu, Li, & Zhao, 2002), the Fuzzy Logic method (Kottas, Boutalis, & Karlis, 2006). The P&O and IC techniques, as well as variants thereof, are the most widely used.

The P&O algorithms operate by periodically perturbing (i.e. incrementing or decrementing) the array terminal voltage and comparing the PV output power with that of the previous perturbation cycle. If the PV array operating voltage changes and power increases, the control system moves the PV array operating point in that direction; otherwise the operating point is moved in the opposite direction. In the next perturbation cycle the algorithm continues in the same way.

There are many different P&O methods available in the literature. Most common used P&O methods are the classic, the optimized and the three-point P&O algorithms. In the classic P&O technique, the perturbations of the PV operating point have a fixed magnitude. In the optimized P&O technique, an average of several samples of the array power is used to dynamically adjust the magnitude of the perturbation of the PV operating point. In the three-point weight comparison method, the perturbation direction is decided by comparing the PV output power on three points of the P-V curve.

In this study, the classic P&O technique is implemented as MPPT algorithm with SEPIC topology DC-DC converter.

Material and Method

PV Model

The behavior of photovoltaic (PV) cells can be modeled with an equivalent circuit included current source, diodes and resistors.

A photovoltaic module consist of a number of interconnected solar cells encapsulated into a single unit. In order to predict the power extracted from the solar modules and the module current-voltage (I-V) characteristics, it is important to model the solar cell. Once the I-V characteristics of a single solar cell are determined using the model, one must then expand that model to determine the behavior of a PV array or module.

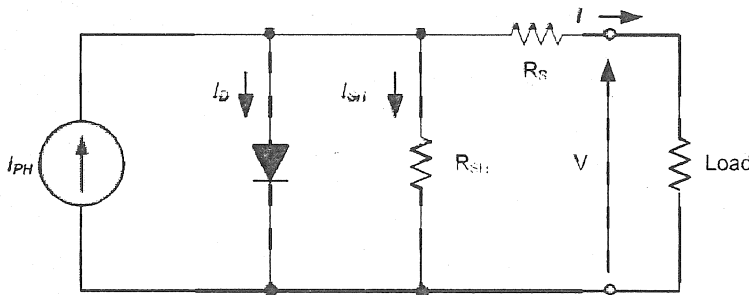


Figure 1. Model of the PV cell

A solar cell model is shown in Figure1. The model takes in to account the variation of the photoelectric current, whne the radiation and the temperature changes, and also the variation of the diode saturation current, when the temperature changes. In this thr current generator I_{PH} reперent the generated photoelectric current. R_s and R_{sh} are the series and shunt resistance of the cell.

The general current-voltage characteristic of a PV panel based on the single exponential model is:

$$I = I_{PH} - I_0 \left[\exp\left(\frac{V + I \cdot R_s}{n_s V_T}\right) - 1 \right] - \frac{V + I \cdot R_s}{R_{SH}}$$

In order to construct a model of the PV module, which exhibits the specifications described in the datasheet, using the above-mentioned single-diode model, there are five parameters to be determined: I_{PH} , I_0 , A , R_s , and R_{SH} . All these parameters is found without any measurement, using only the data from the product datasheet. The method used here proposed by Sera et al (2007) is implemented in MATLAB programs for simulation.

In this study, the Suntech STP005S-12/Db PV module was chosen for modeling. The module has 36 series connected monocrystalline cells and provides 5W peak power at standard test condition.

MPPT

At a given temperature and insolation level, PV cells supply maximum power at one particular operation point called the maximum power point (MPP). Unlike conventional energy sources, it is desirable to operate PV systems at its MPP. However, the MPP locus varies over a wide range, depending on PV array temperature and insolation intensity. Instantaneous shading conditions and ageing of PV cells also affect the MPP locus. In addition, the load electrical characteristics may also vary. Thus, to achieve operation at the MPP, a time varying matching network called the maximum power point tracking network (MPPT) is required that interfaces the varying source and possibly the varying load (Gilbert, 1998).

MPPT System

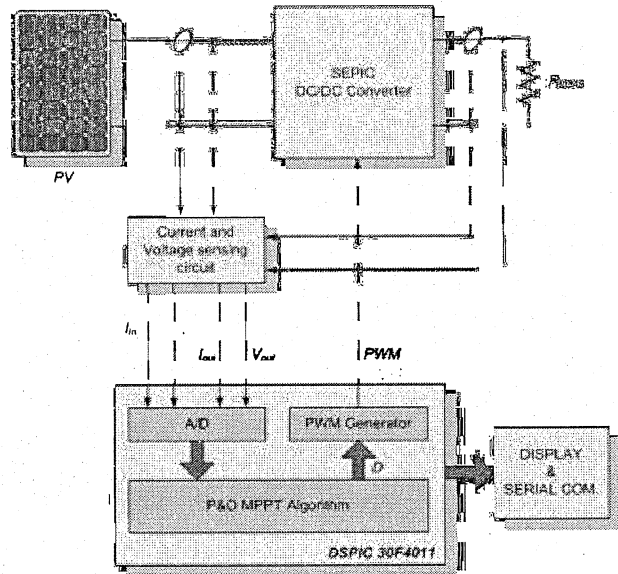


Figure 2. MPPT system

MPPT system architecture is shown in Fig.2. In this study Direct Control Method and SEPIC DC/DC converter are used. The controller for the system is based on a high performance Microchip 16 bit DSPIC 30F4011 digital signal controller.

As shown in Fig.2. direct control method is simpler and uses only one control loop, and it performs the adjustment of duty cycle within the MPP tracking algorithm. The way how to adjust the duty cycle is totally based on the theory of load matching explained before. The impedance seen by PV is the input impedance of converter. The relationship to the load is:

$$R_{in} = \frac{(1-D)^2}{D^2} R_{load}$$

where D is the duty cycle of the SEPIC converter. Increasing D will decrease the input impedance (R_{in}), thus the PV operating voltage moves to the left. Similarly, decreasing D will increase R_{in} , thus the operating voltage moves to the right. The tracking algorithm (P&O) makes the decision how to move the operating voltage. (Hohm & Ropp, 2002).

The MPPT algorithm changes the duty cycle, then the next sampling of PV voltage and current should be taken after the system reaches the periodic steady state to avoid measuring the transient behavior. The direct control method can operate stably for applications such as battery equipped systems and water pumping systems.

MPPT Simulation with MATLAB

MPPT with a resistive load is implemented in MATLAB simulation and verified. The simulated system consists of the Suntech STP005S PV model, the ideal SEPIC converter, the MPPT control, and the resistive load (100Ω).

The following flowchart, shown in Figure 3. explains the simulation of the MPPT system. MPPT algorithm can also be simulated directly without resistive load using MATLAB (Oi, 2005).

These simulations are performed using real irradiance data provided by Castaner, L. and Silvestre, S. (2002). Set of data is the measurements of a cloudy day in April in Barcelona, Spain. The data contain the irradiance measurements taken every two minutes for 12 hours. Irradiance values between two data points are estimated by the cubic interpolation in MATLAB functions. Therefore, data set is reproduced using original data set in order that contain more samples. Reproduced data set contain 43200 samples for 12 hours. So, there is an irradiance data for every second in new data set.

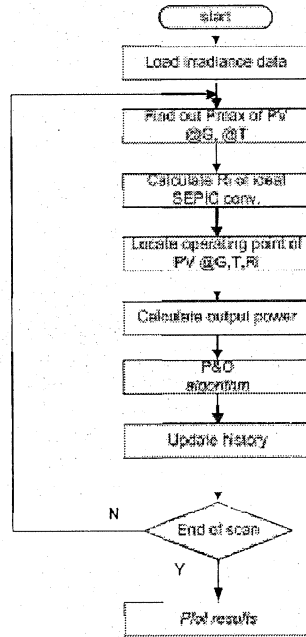


Figure 3. Flow chart of MPPTsimulation

Simulation and Experimental Results

The MPPT system simulation results are compared with the direct-coupled PV system without MPPT. The irradiance data used here are the measurements of a cloudy day in April in Barcelona, Spain, as mentioned before. The total electric energy produced during a 12 hour period is calculated with MATLAB and tabulated in Table 1. Theoretical energy production of the PV under mentioned irradiance is calculated using equation below with MATLAB.

$$E = \left(\sum_0^{43200} P_{\max} \right) / 3600 \text{ Wh}$$

Theoretical maximum total energy produced during 12 hour period Obtained by this way is 20.70 Wh. It is remembered that P_{MPP} of the module is 5 W.

Table 1. Energy assessment of MPPT system

Load resistance (Ω)	Without MPPT		With MPPT	
	Energy (Wh)	Efficiency	Energy (Wh)	Efficiency
45	11.80	0.57	20.66	0.99
100	16.37	0.79	20.66	0.99
145	15.22	0.73	20.66	0.99

MPPT System Results

Input voltage and current values produced by DSPIC ADC at every sampling are sent to PC via serial port. Followed figures are obtained using these data. Irradiance is 0.2 kW/m^2 , temperature is $25 \text{ }^\circ\text{C}$, sampling time of the ADC is 500 ms and duty increment/decrement step is 0.2.

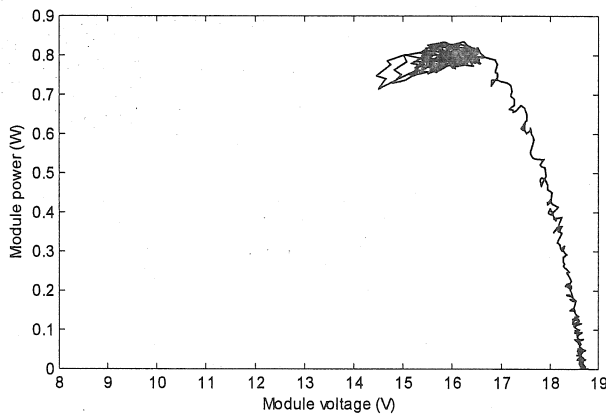


Figure 4. Operating points of the module

Module Power-Voltage curve is given in Figure 4. This figure shows instantaneous module power at every sampling while searching MPP. From simulation results at 0.2 kW/m^2 irradiance level V_{MPP} is 15.31 V and P_{MPP} is 0.84 W. At the MPP, measured values with digital multimeter are given in Table 2.

Table 2. Measured values at MPP

V_{in} (V)	I_{in} (mA)	P_{in} (W)	V_{out} (V)	I_{out} (V)	P_{out} (W)	Duty	Efficiency
15.6	47	0.733	8.2	81	0.664	33.6	0.905

Conclusion

This study presents a simple but efficient photovoltaic system. It models each component and simulates the system using MATLAB. Comparison result shows that the PV model using the equivalent circuit in moderate complexity provides good matching with the real PV module.

Simulations perform tests for the MPPT with Direct Vref Control and MPPT with Duty Control using unreal and real irradiance data. Ideal SEPIC DC-DC converter is used in this simulation. The results show that the PV system without MPPT has poor efficiency because of mismatching between the PV module and load. At the same time simulation results show that the direct connected PV system efficiency depends on load resistance. On the other hand, it shows that the system with MPPT can utilize more than 99% of PV capacity. Assuming a DC-DC converter has efficiency more than 90%, the system can increase the overall efficiency by more than 32% compared to the system without MPPT.

In order to develop a simple low-cost system, this thesis adopts the direct control method which employs the P&O algorithm. This control method offers another benefit of allowing steady-state analysis of the DC-DC converter, as opposed to the more complex state-space averaging method, because it performs sampling of voltage and current at the periodic steady state.

It performs simulations of the whole system and verifies functionality and benefits of MPPT. Simulations also make comparisons with the system without MPPT in terms of total energy produced by PV a day. The results validate that MPPT can significantly increase the efficiency of energy production from PV and the performance of the PV. Implemented low cost MPPT system can be used in the commercial PV lighting and battery charging systems.

References

- Castaner, L., Silvestre, S., 2002. Modelling Photovoltaic Systems using PSPice. John Wiley and Sons.
- Gilbert, M., 1998. Renewable and Efficient Electric Power Systems. Wiley Online Library.
- Hohm, D. P., Ropp, M. E., 2002. Comparative Study of Maximum Power Point Tracking. Progress in Photovoltaics: Research and Applications, 47-62.
- Kottas, T., Boutalis, Y., Karlis, A., 2006. New maximum power point tracker for PV arrays using fuzzy controller in close cooperation with fuzzy cognitive networks. Energy Conversion, IEEE Transactions on, 21 (3), 793-803.
- Oi, A., 2005. Design and Simulation of Photovoltaic Water Pumping System. California Polytechnic State University.
- Sera, D., Teodorescu, R., Rodriguez, P., 2007. PV panel model based on datasheet values., (pp. 2392-2396).
- Sun, X., Wu, W., Li, X., Zhao, Q., 2002. A research on photovoltaic energy controlling system with maximum power point tracking. IEEE, 2, pp. 822-826.

ASIC DESIGN FOR ANN BASED CONTROLLER OF MEMS ACCELEROMETER*

*MEMS İvme Ölçerin Yapay Sinir Ağı Temelli Kontrolüsü için Uygulamaya Yönelik
Tüm Devre Tasarımı*

Zehan KESİLMİŞ
Electrical-Electronics Engineering

Murat AKSOY
Electrical-Electronics Engineering

ABSTRACT

In this work, a neural network based Micro-Electro-Mechanical-System (MEMS) accelerometer is designed. Analog neural network implementation for the MEMS accelerometer is researched and specific hardware design is implemented. Aim of the proposed neural network controller is to improve the performance of capacitive MEMS accelerometer. The study has been performed in both MATLAB and SPICE environment. Simulation results show that, proposed neural network controller improves performance of MEMS accelerometer.

Key Words: Application specific integrated circuits, Artificial Neural Networks, Closed loop systems.

ÖZET

Bu çalışmada, Yapay Sinir Ağı (YSA) temelli bir Mikro-Elektro-Mekanik-Sistem (MEMS) ivmeölçer tasarlanmıştır. MEMS ivmeölçer için analog YSA gerçeklemesi araştırılmış ve özel donanım tasarımı gerçekleştirilmiştir. Önerilen kontrolcünün amacı, kapasitif MEMS ivmeölçerin başarısını arttırmaktır. Bu çalışma MATLAB ve SPICE benzetim ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar göstermektedir ki, YSA kontrolcüsü MEMS ivmeölçerin başarısını arttırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Uygulamaya yönelik tüm devre, Yapay Sinir Ağları, Kapalı çevrim sistemler.

Introduction

MEMS technology is widely used to produce micrometer scale sensors and actuators such as micro mirrors, accelerometers, microphones and pressure sensors. One of the well commercialized MEMS sensor is accelerometer. Various controllers are proposed for MEMS accelerometers to improve the dynamical behavior of the system. From control engineering point of view, MEMS accelerometers can be classified in two groups as open and closed loop. For low frequency applications which do not require a high degree of accuracy, MEMS sensors compensated in open loop fashion. In open-loop accelerometers, the capacitance difference of the sense elements is measured, and the output is generated as measure of acceleration. Main drawback of the open loop devices is limited linear range and nonlinear effect of the damping (Yazdi, 1998).

*Doktora Tezi-PhD. Thesis

To obtain higher dynamic range from accelerometers closed loop control strategies have been developed. In closed loop accelerometers a feedback voltage is applied to feedback elements to generate force to counter balance the accelerating force. This method is known as force-balance technique. By using this method, seismic mass is held in the almost constant position under external acceleration condition and hysteresis effect of mechanical springs and nonlinear damping force almost eliminated.

Several closed loop control strategies are suggested for force-balancing accelerometers, such as analog, Sigma-Delta Modulation ($\Sigma\Delta M$) and sliding mode based techniques (Yazdi, 1998). In conventional analog closed loop accelerometer, a control voltage is applied to both electrodes to limit displacement of the seismic mass as depicted in Figure 1. Such accelerometers contain Proportional Integral Derivative (PID) controller that amplifies the imbalance in sensing elements that is converted into a feedback signal (V_F). This feedback signal used with bias voltage (V_B) to improve linearity of electrostatic force (Kraft et al., 1998)

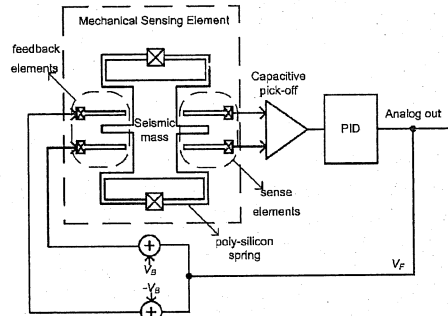


Figure 1. Conventional analog closed loop accelerometer

Use of back stepping and sliding mode controllers proposed by Hassani et al. for MEMS accelerometer (Payam, 2010; Hassani, 2007). However, these controllers are not compatible with ASIC implementation. Hollocher and Memishian proposed an innovative force-balanced technique controller. This technique uses high frequency square wave with variable amplitude to excite feedback elements. Some of closed loop accelerometers of the Analog Devices Inc. utilized with this method (Hollocher and Memishian, 2003).

Use of an ANN was first proposed by Gaura to improve the performance of the MEMS accelerometer (Gaura, 2001). The ANN was trained to approximate the control algorithm. The desired approximation performed by a one hidden layer with 6 neurons. Aim of this controller is mimic the behavior of the $\Sigma\Delta M$ controller with using ANN. Similar control strategy which is proposed by Gaura can be easily realized by using fuzzy logic method.

As outlined above, open loop accelerometers have disadvantages and analog and digital closed loop controllers have been proposed to eliminate these disadvantages. An alternative approach is to employ a Neural Network Controller (NNC) that can compensate the nonlinearities of the accelerometer.

In this work, analog ASIC of ANN based controller for capacitive MEMS accelerometer is designed. The neural network implementation is chosen due to its compatibility with IC technology.

Material and Method

Material

MEMS accelerometers consist of sensing element with control and interface electronics circuits integrated on the same chip. Sensing element of MEMS accelerometer is a mechanical element that can be displacing under external acceleration. This displacement is measured by the pick-off circuit as a measure of acceleration. Sensing elements can be easily modeled as spring-mass-damper system. The differential equation for the displacement as a function of external acceleration is given in Equation (1)

$$ma_{input} = m \frac{d^2 x}{dt^2} + c \frac{dx}{dt} + kx \tag{1}$$

where, a_{input} is external acceleration, m is seismic mass, c is damping factor, k is spring constant and x is displacement of seismic mass under external acceleration. A top view of sensing element of MEMS accelerometer is depicted in Figure 2. The sensing element is a surface micro machined poly-silicon structure and poly-silicon suspension beams suspend this structure over the surface of the substrate (Kraft, 1998).

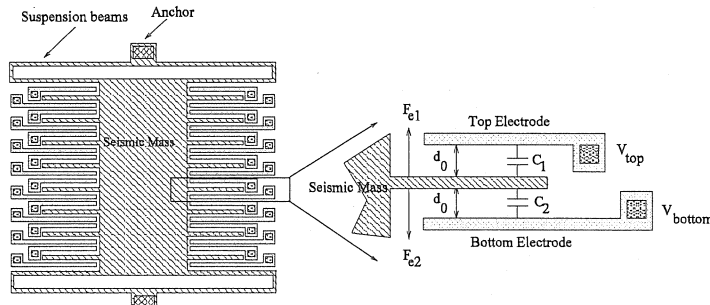


Figure 2. Top View of sensing element

In conventional closed loop accelerometers, differential capacitors (comb fingers) are divided as sense and feedback elements. The sensing capacitors are supplied with the high-frequency signals (V_s) for capacitive sensing purposes and

the feedback capacitors are preloaded with bias (V_B) and feedback (V_F) voltages to generate counter-balance force. Feedback voltage is output of the pick-off circuit and represents displacement of the seismic mass. Three voltages V_s , V_B and V_F are superimposed on the electrodes and generated net electrostatic forces as given Equation (2).

$$F_e = \frac{1}{2} N \epsilon l t \left[\frac{(V_s + V_B + V_F)^2}{(d_0 - x)^2} - \frac{(-V_s - V_B + V_F)^2}{(d_0 + x)^2} \right] \quad (2)$$

where, l is the length of fingers, t is the thickness, ϵ is the dielectric constant, x is displacement of the movable fingers from its rest position and d_0 is the gap finger to outer electrode. N stands for number of parallel capacitor pairs. In order to operation of the closed loop MEMS accelerometer, the seismic mass is subjected to four forces: the force caused by the acceleration, the elastic force of the flexure structure, the counter-balance force and the damping force. Generally this counter-balance force is maintained by electrostatic forces. The mathematical expression for the closed loop MEMS accelerometer is given in Equation (3).

$$F_e - m a_{input} = m \frac{d^2 x}{dt^2} + c \frac{dx}{dt} + kx \quad (3)$$

It should be noted that the simulation of the mechanical device behavior with surrounding electronics is important for mechatronic systems. Therefore, putting the MEMS and electronic circuits together gives more realistic results. SPICE is a general purpose electronic circuit simulation program and suited to solve linear and nonlinear electrical circuits. Also, it has the ability to handle differential and algebraic equations.

The modeling and simulation of MEMS accelerometer and proposed controller is performed in SPICE. Sensing element of the MEMS accelerometer model is designed as behavioral model and NNC is designed in MOS transistor level.

Method

ANNs are well known systems with their function approximation and can be used effectively for the identification and control of dynamical systems. The ANN can be used for controlling the MEMS accelerometers (Gaura, 2001). The ANN training algorithm reads the input and output values in the training data set and makes changes to the weight values to reduce the difference between the predicted output and target output values. A Fuzzy Logic Systems (FLS) can be implemented as a controller. For this purpose a FLS system is designed.

ASIC realization of Fuzzy Logic is a complex task that requires heavy mathematical operations. It has been found that the burden in the FLS can be reduced if it can be implemented in an ANN (Buja, and Todesco, 1994). Input-output patterns of the ANN training data set are collected from the designed FLS.

Training data set contained 1000 samples and off-line back propagation is applied as a training algorithm and training process is stopped when error goal of less than 10^{-4} is reached. The learning rate has been taken as 0.5.

Neural network hardware can be implemented using analog and digital circuits. Digital neural network implementations necessitate the use of Analog to Digital and Digital to Analog converter blocks that use extra chip area and power. Analog circuits can be chosen due to high speed, low power consumption and small chip area. That is the reason why analog implementation has been chosen for proposed NNC design.

The proposed NNC consists of one hidden layer with six hidden neurons and output layer with two neurons. It is fully analog in order to avoid analog to digital conversion. The number of neurons in the hidden layer has been chosen in order to have good approximation ability to control surface. Figure 3 shows the developed neural network architecture.

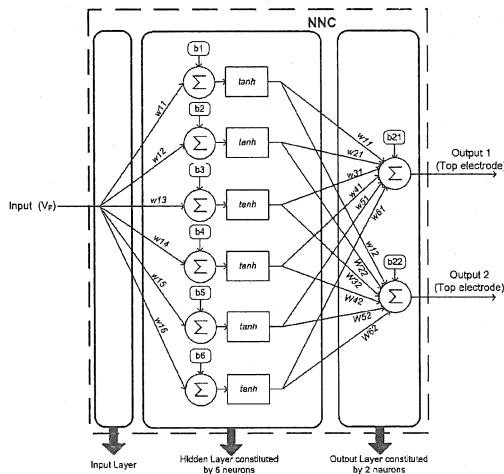


Figure 3. Developed neural network architecture

Number of neurons has been kept as small as possible for simplicity in hardware implementation. Training work is carried out in MATLAB environment and optimum weight and bias values have been found. It is to be noted here, the synaptic weights of the neural network are determined off-line.

Role of the artificial neuron model is amplify the input proportional to the respective weight value and add bias value and to apply nonlinear Activation Function (AF) to the processed signal. Mathematical expression for the artificial neuron is given in Equation (5).

$$y_k = \tanh \left(b_j + \sum_{j=1}^n x_j w_j \right) \quad (5)$$

where \tanh is AF of neuron, w_j is the connection strength or weight of synapse associated with the j th input and x_j is the neuron input and y_k is the output of the neuron and b_j is bias (Haykin, 2006). Proposed NNC designed with AMI 05 process technology in MOS transistor level. Mechanical sensing element of the MEMS accelerometer is modeled in SPICE by using behavioral modeling (Chen et al., 2010). Input of the proposed NNC is directly connected to the capacitive pick off block and output is connected to drive electrodes (feedback elements).

Analog Multiplier

In this work, multiplication function has been achieved by four quadrant multiplier circuit (Saxena and Clark, 2002). This multiplier has been chosen for its simplicity and ability to accepting single ended voltages as input. Multiplier consists of ten MOS transistors. Circuit diagram is depicted in Figure 4. Output (current) of the multiplier is proportional to the inputs (voltage). For increasing linearity voltage level of the input is kept low. Multiplier circuit has been designed to multiply input signals ranging from -1V to 1V.

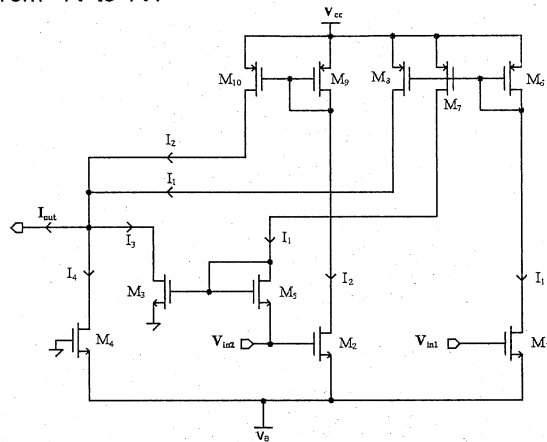


Figure 4. Four quadrant multiplier cell

V_{in1} and V_{in2} are stand for input voltages and I_{out} is output current of multiplier. Performance of multiplier circuit has been evaluated using LTSPICE. Simulation results show that for a 5V power supply and -2.4V bias, the linear range of the multiplier is more over than $\pm 1V$ range. Power dissipation of the multiplier is 4.67mW. These results make it suitable for analog neural network implementation. Equation for the output of the multiplier is given in Equation (6).

$$I_{out} = -2KV_{in1}V_{in2} \quad (6)$$

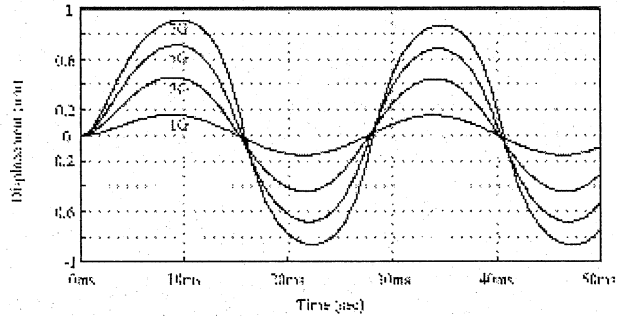


Figure 6. Response of the open-loop system for sine inputs

Simulation of the open loop accelerometer shows that such accelerometer can work linearly in $\pm 3g$ range. As previously mentioned, nonlinear effects of the damping and electrostatic force are increasing with deflection of the seismic mass. Limited performance of the open loop accelerometer shows that designing of a closed loop system is not a trivial task. To obtain higher range from same accelerometer, it is necessary to closing its loop and limiting the displacement of the seismic mass.

Comparative simulations have been made for a conventional and the proposed accelerometer. Normalized transfer characteristic of the two accelerometers over the $\pm 38g$ range depicted in Figure 7. The responses due to the proposed and PID controller are depicted with solid and dotted curves, respectively. It can be seen from figures that dynamic range of the proposed accelerometer is wider than conventional one. Also hysteresis effect is almost eliminated. NNC showed a better performance in the response specification as compared to the PID controller.

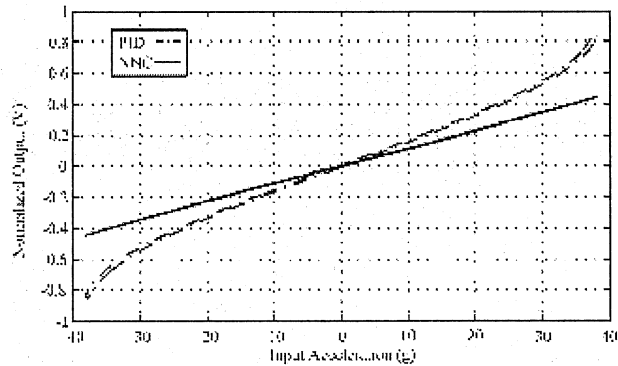


Figure 7. Transfer characteristics

Normalized responses of conventional (dashed line) and proposed accelerometers (solid line) to the step shaped accelerations are depicted in Figure 8. According to given figure, the proposed controller has faster than in settling time response in comparison with the PID controller.

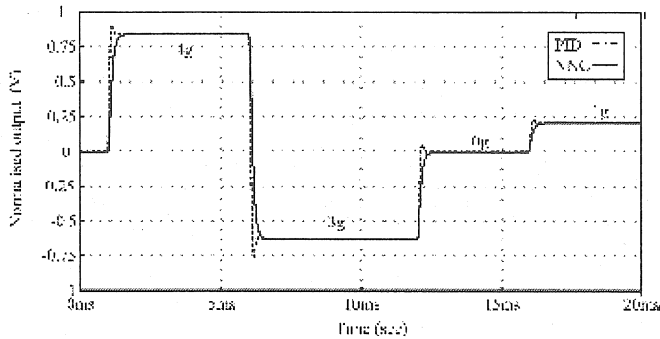


Figure 8. Response to the step shaped acceleration

Responses of the both open and closed loop cases are depicted Figure 6-8. When open loop and closed loop cases of the accelerometer are compared, it can be easily seen that response of the close loop is much faster than open loop. From results of the closed loop cases one can easily notice that output is much closer to the input acceleration. Table 1 compares the performance of closed loop controllers. Settling time of the conventional closed loop and neural network based accelerometers are 0.5ms and 0.25ms respectively. The NNC is producing zero steady state error.

Table 1. Comparison between PID and NNC

Controller	Overshoot	Rise Time	Setting Time
PID	6.8%	0.1ms	0.5ms
NNC	0	0.2ms	0.25ms

When closed loop cases of the accelerometer are compared, proposed controller maintains smooth, non-oscillatory transient response without overshoot. Conventional and proposed controllers were compared respecting several criteria, such as response time, linearity and range. Results showed performance of the proposed NN based controller is better than conventional one.

This work focused on the design of a neural network based active control system to improve the range and response time of MEMS accelerometer. More importantly, it has the obvious effect to reduce the displacement of the seismic mass to reduce nonlinear effects. Simulated data have demonstrated the effectiveness of the proposed approach for improving range of accelerometer.

Also, results show that response of the proposed controller is better than conventional one. According to the author's best knowledge, the analog ASIC implementation for the MEMS accelerometer is reported for the first time. Proposed controller is fully analog and it eliminates to necessity of the digital to analog conversion and once the NN based ASIC has been built weights of the NN can be easily set to control different requirements of application.

References

- YAZDI, N. A. 1998. Micromachined inertial sensors. *Proceedings of the IEEE* , 86 (8), 1640-1659.
- KRAFT, M., & Lewis, C., 1998. System level simulation of a digital accelerometer. *Proceedings of the 1st International Conference on Modeling and Simulation of Microsystems, Semiconductors, Sensors and Actuators*.
- HASSANI, F. P., 2010. Design of a smart MEMS accelerometer using nonlinear control principles. *Smart Structures and Systems* , 6 (1), 1-16.
- PAYAM, A. H. 2007. Design of a hybrid closed loop control system for a MEMS accelerometer using backstepping principle. *International Conference on Microelectronics*, 213-216). Cairo.
- HOLLOCHER, D., & MEMISHIAN, J. (2003). Patent No. 6530275. United States .
- GAURA, E. R. (2001). Neural-network compensation methods for capacitive micromachined accelerometers for use in telecare medicine. *IEEE Trans. on Information Technology in Biomedicine* , 5 (3), 248-252.
- BUJA, G., & TODESCO, F. (1994). Neural network implementation of a fuzzy logic controller. *IEEE Transactions on industrial electronics* , 41 (6), 663-665.
- HAYKIN, S. (2006). *Neural networks: a comprehensive foundation*. NJ: Prentice Hall.
- CHEN, H., CHEN, M., ZHAO, M.W., and XU, L., 2010. Equivalent Electrical Modeling and Simulation of MEMS Comb Accelerometer, *International Conference on Measuring Technology and Mechatronic Automation* 116-119.
- SAXENA, N., and CLARK, J.J., 2002. A four-quadrant CMOS analog multiplier for analog neural networks, *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 29(6), 746-749.
- AL-RUWAIHI, K.M., 2002. CMOS analogue neuron circuit with programmable activation functions utilizing MOS transistors with optimized process device parameters, *IEE Proceedings Circuits, Devices and Systems*, 144(6), 318-322.

BACILLUS SUBTILIS'ten TERMOSTABİL LİPAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU*

Production and Characterization of A Thermostable Lipase From Bacillus sp.

Deniz TANRISEVER
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada yağ fabrikasından alınan toprak örneklerinden 27 bakteri suşu izole edilmiş, bunlar *Bacillus* sp. olarak tanılanmıştır. Söz konusu suşların 8 (%29,62) tanesi lipolitik aktivite göstermiştir. Tributyrin agarda en yüksek lipaz aktivitesi gösteren TKL-25 nolu izolat lipaz üreticisi olarak seçilmiştir. En iyi enzim üretimi pH=10.0 ve 40°C'de gerçekleşmiştir. Enzim pH=4.0-9.0, 20-110°C aralığında aktivite göstermiş, optimum aktivite pH 5.0'de, 80°C'de saptanmıştır. Enzim 50-120°C arasındaki sıcaklıklarda 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitesini 50°C'de %176, 60°C'de %209, 70°C'de %176, 80°C'de %192, 90°C'de %161, 100°C'de %171, 110°C'de %135, 120°C'de %124 korumuştur.

Bacillus subtilis TKL-25 nolu suş mezofil, üretilen enzim asido-termofilik-termostabil karakter göstermektedir. Lipaz üreticisi suşun mezofil, üretilen enzimin termofil olması, fermentasyon prosesi süresince enerji gereksinimi bakımından, endüstriyel boyuttaki üretimlerde önemli bir avantaj sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Asido-termofil-termostabil Lipaz, *Bacillus* sp. TKL-25, Tributyrin Agar

ABSTRACT

In this study, 27 bacterial strains isolated from the oil factory soil samples and identified as *Bacillus* sp. Eight of these strains (%29,62) showed lipolytic activity. Strain TKL-25 which showed the best lipase activity of these strains selected as the producer of lipase. Strain TKL-25 showed the best lipase activity on a tributyrin plate (the largest hydrolysis zone) was selected as a producer of lipase. The best enzyme production took place at pH 10.0, 40°C. The enzyme was active at pH 4.0-9.0, 20-110°C, optimum activity was determined at pH 5.0, 80°C. After a treatment of 30 min. at 50-120°C, activity of the enzyme was conserved %176 at 50°C, %209 at 60°C, %176 at 70°C, %192 at 80°C, %161 at 90°C, %171 at 100°C, %135 at 110°C, %124 at 120°C.

Bacillus subtilis TKL-25 strain is a mesophilic bacteria, the enzyme from this has an acido-thermophilic-thermostable feature. This will provide a great advantage in the industrial productions along the fermentation process for the energy requirement.

Key Words: Acido-thermophilic-thermostable Lipase, *Bacillus* sp. TKL-25, Tributyrin Plate

*Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

Giriş

Enzimler, proteinlerdir ve çok sayıda reaksiyonu katalizlerler. Canlı sistemlerde enzimler, hücrelerin büyüme, onarım ve devamlılığının yanı sıra makromoleküllerin enerjiye ve yeni materyallere transformasyonunda fonksiyon gösterirler. Dolayısıyla bütün canlılar, özellikle de hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar enzim kaynağıdır. Ancak, endüstriyel enzimlerin ticari uygulamaları için mikroorganizmalar çeşitli enzimlerin en önemli kaynaklarıdır (Ibrahim, 2007). Enzimler büyük bir endüstriyel potansiyele sahip olup bitki, hayvan ve mikroplar gibi çeşitli kaynaklarda fazlaca bulunurlar. Mikroorganizmalar biyokimyasal çeşitlilikleri, kütle kültürünün kolaylığı ve aynı zamanda genetik olarak modifiye edilebilmelerindeki rahatlıktan dolayı bitki ve hayvanları enzim kaynakları olarak geri planda bırakmaktadır (Banerjee ve ark, 1999).

Endüstriyel açıdan önemli bütün enzimler içerisinde, çeşitli uygulamalarından dolayı en çok proteazlar ve lipazlar kullanılmaktadır. Proteazlar hidrolitik enzimlerdir ve en fazla uygulama alanları çamaşır deterjanlarıdır (Banerjee ve ark, 1999). Bunun yanı sıra gıda endüstrisinde peynir yapımı ve fırınlama, ilaç endüstrisinde ülser ve yaraların tedavisi için kullanılan antibiyotikli bileşimlerde de kullanım bulurlar (Mala Rao ve ark, 1998). Proteazlar deri işleme endüstrisinde tüylerin giderilmesinde etkin biçimde kullanılırlar (Nilegoankar ve ark, 2006). Lipazlar da önemli derecede endüstriyel potansiyele sahiptir ve deterjan katkıları (Gerritse ve ark, 1998) ve peynir olgunlaştırma, pişirmede vs. lezzetin artırılması için gıda katkı maddeleri olarak (Kauzlauskas ve Bornscheuer, 1998) umut verici kullanımlar bulurlar. Lipazlar, ilaçlar için kiral yapı blokörü sentezinde (Patel ve ark, 2005) ve kişisel bakım ürünlerinin bileşeni olarak (Maugard ve ark, 2002) kullanılırlar.

Lipazlar (triasilgliserol asilhidrolazları; EC 3.1.1.3) yağ-su interfazı üzerinden trigliseridlerin gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen bir çeşit hidroliz sınıfıdır. Ayrıca, lipazlar esterlerin sentezinin yanı sıra diğer esterlerin hidrolizini ve transesterleşmesini katalizlerler ve enantioselektif özellikler gösterirler. Lipazların çok spesifik kimyasal transformasyon gerçekleştirme yeteneği onlara gıda, deterjan, kozmetik, organik sentez ve ilaç endüstrisinde gittikçe artan bir popülerite kazandırmıştır (Park ve ark, 2005; Gupta ve ark, 2007; Grbavcic ve ark, 2007; Franken ve ark, 2009).

Birçok mikroorganizma, bakteri, maya ve mantarlar ekstraselüler lipazların potansiyel üreticileri olarak bilinirler (Abada, 2008). Mikrobiyal lipazlar genellikle ekstraselülerdir ve üretimleri sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijen gibi fizikokimyasal faktörlerin yanı sıra besiyeri içeriği ile de büyük ölçüde etkilenmektedir. Lipazlar uyarılabilir enzimler olduklarından, lipaz aktivitesinin ekspresyonu için ana faktörün her zaman karbon kaynağı olduğu belirtilmiştir. Bu enzimler genellikle yağ gibi bir lipid veya triasilgliserol, yağ asitleri, hidrolizlenebilen esterler, Tween'ler, safra tuzu ve gliserol gibi başka uyarıcıların varlığında üretilirler (Sharma ve ark, 2001; Gupta ve ark, 2004). Birçok *Bacillus* sp. lipolitik enzimlerin temel kaynağı olarak bildirilmiştir (Kim ve ark, 1994; Schmidt ve ark, 1994; Luisa ve ark, 1997).

Materyal ve Metod

Bacillus sp. Suşlarının İzolasyonu

Toprak örneklerinden LB buyyona 10 g inokülasyon yapılarak 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sporlu bakterilerin üremesine olanak sağlamak amacıyla bakteri yoğunluğu artırılmış toprak örneği, 15 dk. 80°C'de bekletilerek ön işleme tutulmuştur. Örnek, jeloza besiyerine yayma metoduyla ekilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben tek koloni şeklinde üreyen suşlar N1 besiyerine çizgi şeklinde ekilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. N1 agarda üreyen ve koloni morfolojileri *Bacillus*'a benzeyen suşlar gram boyama metodu ile boyanmış, Gram (+), endospor oluşturan suşlar eğik katı jeloza ekilerek stok kültürleri hazırlanmış ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir (Fang ve ark, 2006).

Katı ve Sıvı Besiyerinde Lipaz Aktivitesi Gösteren Suşların Saptanması

Katı besiyerinde lipaz aktivitesini saptamak amacıyla içerisinde %1 Tributyrin bulunan Tributyrin Agar besiyerine bakterilerin stok kültürlerinden çizgi şeklinde ekim yapılarak 37°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. 12 saat aralıklarla ekim çizgisi etrafında oluşan hidroliz zonu kontrol edilmiş ve en yüksek aktivite TKL-25 nolu suшта görülmüştür. Katı besiyerinde lipaz aktivitesi göstermiş 8 suş (TKL-2, TKL-3, TKL-9, TKL-10, TKL-14, TKL-19, TKL-20, TKL-25), Tributyrinli sıvı besiyerinde 3 gün 37°C'de üretilmiştir. Kültür 8000 devirde 20 dk., +4°C'de santrifüj edildikten sonra enzim soğuk etanol (Et-OH) ile 1 gece çöktürülmüştür. Standart yöntemle enzim aktivite tayini yapılmış ve 410 nm'de spektrofotometrede aktivite saptanmıştır (Chiou ve Wu, 2004). İçlerinde en yüksek aktiviteyi TKL-25 nolu izolat göstermiştir. Bu çalışmada lipaz üreticisi olarak TKL-25 nolu izolat kullanılmıştır.

Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığının Saptanması

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla substrat olarak p-NPP ve 5 farklı tampon sistemi (Glisin-HCl Tamponu: 3.0-3.6, Sodyum Asetat Tamponu: 4.0-5.6, Fosfat Tamponu: 6.0-7.6, Tris-HCl Tamponu: 7.4-9.0, Glisin-NaOH Tamponu: 9.6-10.6) kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008). Aktivite tayini için 0.2 mL enzim solüsyonu 1 mL substrat çözeltisi ve her pH değerindeki tampon ile karıştırılarak 37°C'de 5 dk. süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon 2 mL 0.5 N Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek durdurulmuştur.

Sonuçlar spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur. Denemeler her pH için 3'lü tekrarlar şeklinde gerçekleştirilmiştir. En yüksek absorpsiyon elde edildiği değer optimum pH olarak saptanmıştır (Leow ve ark, 2007).

Enzimin Optimum Sıcaklık Aralığının Saptanması

Standart metotla 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120°C sıcaklıklarda aktivite tayini yapılmış ve lipaz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık

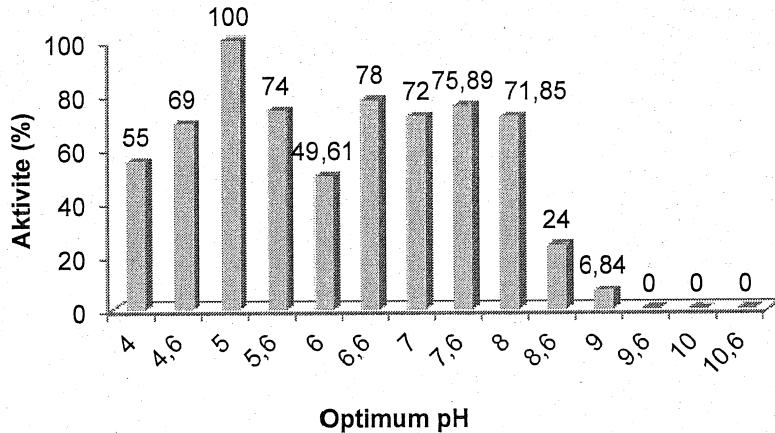
saptanmıştır (Berekaa ve ark, 2009). Aktivite tayinleri için 20-60°C aralığındaki denemelerde su banyosu, 70-120°C'deki denemelerde yağ banyosu kullanılmıştır.

Enzimin Sıcaklık Stabilesinin Saptanması

Enzim 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120°C'lerde 30 dk bekletildikten sonra standart aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin orijinal aktivitesini saptamak amacıyla ön inkübasyona tabii tutulmamış enzimin optimum sıcaklık ve pH'da aktivitesi ölçülmüştür ve bu değer 100 kabul edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kalan aktivite % olarak saptanmıştır (Berekaa ve ark, 2009).

Bulgular ve Tartışma

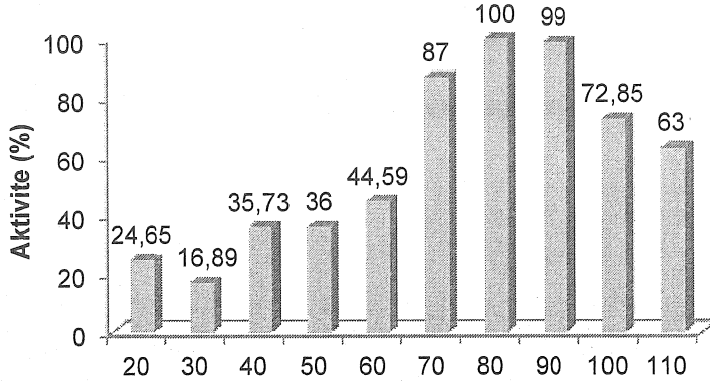
Bacillus subtilis TKL-25 nolu suştan üretilen lipaz enzimi pH 4.0-9.0 aralığında aktivite göstermiştir, fakat en yüksek aktivite pH 5.0'de saptanmıştır.



Şekil 1. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı

Leow ve ark (2007), *Geobacillus* sp.'nin termoalkalifilik T1 lipazının optimum pH'sını 9.0 olarak bulmuşlardır. Literatürlerde belirtilen lipazlar genellikle nötr ve alkali pH'larda optimum aktivite gösterirken, bu çalışmada üretilen TKL-25'in lipazı asidik özellik göstermektedir.

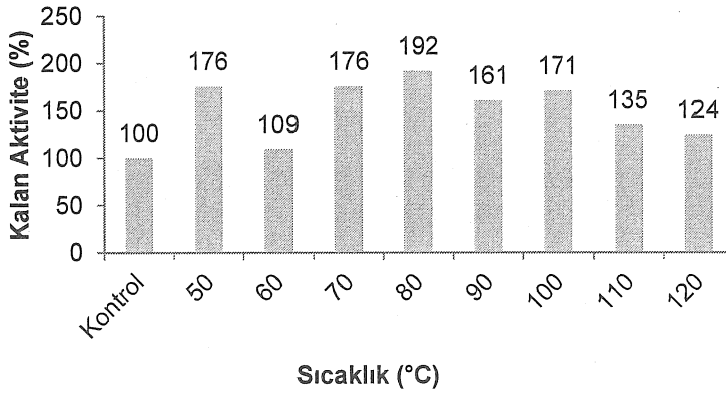
Enzim denenen bütün sıcaklıklarda aktivite göstermiş ancak en yüksek aktivite 80°C'de saptanmıştır.



Optimum Sıcaklık

Şekil 2. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı

Lee ve ark (1999), *Bacillus thermoleovarans* ID-1 lipazının en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı 70-75°C olarak bildirmişlerdir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın elde edilen literatür bilgileriyle uyum içerisinde olduğu görülmektedir. *Bacillus subtilis* TKL-25 no'lu suştan elde edilen lipaz enzimi 50-120°C arasındaki sıcaklıklarda 30 dk ön inkübasyona bırakıldıktan sonra bütün sıcaklıklarda aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Aktivite 50°C'de %176, 60°C'de %209, 70°C'de %176, 80°C'de %192, 90°C'de %161, 100°C'de %171, 110°C'de %135, 120°C'de %124 korunmuştur.



Sıcaklık (°C)

Şekil 3. Enzim kararlılığına sıcaklığın etkisi

Berekaa ve ark (2009), *Geobacillus stearothermophilus* lipazının 70°C'de 15 dk inkübasyon sonunda orijinal aktivitesinin %84.84'ünü koruduğunu saptamışlardır.

Sonuç ve Öneriler

Üretilen lipazın aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 80°C, pH=5.0, bulunmakla beraber geniş bir pH (4.0-10.6) ve sıcaklık (20-110°C) aralığında aktivite saptanmıştır.

Ancak optimum aktivite koşullarına göre enzim asido-termofil lipaz olarak tanımlanmıştır.

Sıcaklık stabilite sonuçlarına bakıldığında enzimin sıcaklık artışıyla aktivite artışı göstermesi önemli bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu özelliğine göre yüksek düzeyde termostabil ifadesi kullanmak uygun olacaktır.

Tohum yağlarının fiziksel olarak artırılması için kullanılan bazı enzimatik proseslerde, pH=5.0 ve 65°C dolayında optimum koşullara sahip, 75°C civarındaki yağdan lizofosfatidin seperasyonu uygulaması için bu sıcaklıkta stabil kalabilen enzimler tercih edilmektedir (Klaus, 1998). Dolayısıyla bu reaksiyonlar termotolerant lipazların kullanımı ile geliştirilmiştir. Bu araştırmadan elde edilen enzim özellikle bu amaç için oldukça uygundur.

KAYNAKLAR

- ABADA, E. A. E., 2008. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11:1100–1106.
- BANERJEE, U. C., RAJESH KUMAR SANI., WAMIK AZMI., RAMAN SONI, 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. Proc Biochem., 35:213-219.
- BEREKAA, M. M., ZAGHLOUL, T. I., ABDEL-FATTAH, Y. R., SAEED, H. M., SIFOUR, M., 2009. Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. World J Microbiol Biotechnol, 25:287-294.
- CHIOU, S. H., WU, W. T., 2004. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. Biomaterials, 25:197-204.
- FANG, Y., LU, Z., LV, F., BIE, X., LIU, S., DING, Z., XU, W., 2006. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. Current Microbiology, 53:510-515.
- FRANKEN, L. P. G., MARCON, N. S., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D., FREIRE, D.M.G., DARIVA, C. et al., 2009. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. Food and Bioprocess Technology.
- GERRITSE, G., HOMMES, R. W., QUAX, W. J., 1998. Development of lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. J. Appl Environ Microbiol, 64:2644-2651.

- GRBAVCIC, S. Z., DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, S. I., BEZBRADICA, D. I., SILER-MARINKOVIC, S. S., and KNEZEVIC, Z. D., 2007. Effect offermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. Journal of the Serbian Chemical Society, 72(8-9):757-765.
- GUPTA, N., SHAI, V., and GUPTA, R., 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. Process Biochemistry, 42(2):518-526.
- GUPTA, R., GUPTA, N., and RATHI, P., 2004. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 64:763-781.
- KAZLAUSKAS, R.J., BORNSCHEUER, U. T., 1998. Biotransformations with lipases. Biotechnology. New York. VCH, 8: 37-192.
- KIM, H., SUNG, M., KIM, M., OH, T., 1994. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. Biosci. Biotech. Biochem., 58:961-962.
- KLAUS, D., 1998. An enzyme process for the physical refining of seed oils. Chem. Eng. Technol., 21:278-281.
- LEE, C. K., DARAH, I., IBRAHIM, C. O., 2007. Enzymatic deinking of laser printed office waste papers: some governing parameters on deinking efficiency. Biores. Technol, 98:1684-1689.
- LEOW, T. C., RAHMAN, R. N. Z. R. A., BASRI, M., SALLEH, A. B., 2007. A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1. Extremophiles, 11:527-535.
- LUISA, M. R., SCHMIDT, C., WAHL, S., SPRAUER, A., SCHMID, R., 1997. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. Large scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. J. Biotechnol., 56:89-102.
- MAUGARD, T., REJASSE, B., LEGOY, M. D., 2002. Synthesis of water soluble derivatives by enzymatic method. Biotechnol Prog., 18:424-428.
- NILEGAONKAR, S. S., ZAMBARE, V. P., KANEKAR, P. P., DHAKEPHALKAR, P. K., SARNAIK, S. S., 2006. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. Biores Technol, 98:1238-1245.
- PARK, H., LEE, K., CHI, Y., and JEONG, S., 2005. Effects of methanol on the catalytic properties of porcine pancreatic lipase. Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(2):296-301.
- PATEL, R., MITAL DODIA, SATYA P. SINGH, 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. Proc Biochem, 40:3569-3575.
- RAO, M. B., APARNA, M., TANKSALE, MOHINI, S., GHATGE, VASANTHI, S., DESHPANDE, 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev., 68:597-635.
- SCHMIDT, C., SZTAJER, H., STOCKLEIN, W., MENGE, U., SCHIMID, R., 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. Biochem. Biophys. Acta, 1214:43-53.

- SHARMA, R., CHISTI, Y., and BANERJEE, U. C., 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19:627–662.
- TEMİZKAN, G., ve ARDA, N., 2008. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı. İstanbul.

**VIC-DİOKSİM TÜREVİ METAL KOMPLEKS SENTEZLERİ VE KARBON
NANOTÜP ÜZERİNDE METALİK DEPOZİSYON İŞLEMİNDE
KULLANILABİLİRLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI***

*Synthesis of Vic-Dioksim Derivative Metal Complexes and Investigation of Their
Metal Deposition on Carbon Nanotubes*

Sevilay YILMAZ
Kimya Anabilim Dalı

Bilgehan GÜZEL
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, öncül olarak kullanılan anti-(4-trifloro metilaniline)glioksim, anti-(4-perflorooktilanilin)glioksim ligandları ile mevcut olan 1,2-sikloheksandiondioksim ve dimetilglioksim ligandlarının $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ ile tepkimeleri sonucu $Cu(II)$ kompleksleri sentezlenmiştir. Sentezlenen ligandların ve metal komplekslerin yapıları ^1H-NMR , $^{13}C-NMR$ ve FT-IR spektrumları alınarak aydınlatılmıştır. Elde edilen kompleksler ile karbon nanotüp üzerine metalik nanopartikül depozisyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksim, vic-Dioksim, Karbon Nanotüp, Metal Kompleks

ABSTRACT

In this study, the oxime complexes are used as a precursor in the synthesis of carbon nanotube-supported metal nanoparticles were investigated. In the similar studies, the oxime complexes have not been used this field. For this purpose, vic-dioxime type fluorinated ligands; anti-[(4-trifluoromethyl)aniline] glyoxime (1), anti-[(4-perfluorooktil)aniline] glyoxime (2) and $Cu(II)$ complexes of the fluorinated ligands(1),(2), 1,2-cyclohexanedione dioxime and dimethylglyoxime ligands $Cu(II)$ complexes have been synthesized. Synthesized metal complexes have been used deposition of the metal nano-particles on the nanotubes. The synthesized fluorinated ligands and the metal complexes have been characterized by using ^1H-NMR , $^{13}C-NMR$ and FT-IR.

Key Words: oxime, vic-dioxime, nanotube, metal complexes

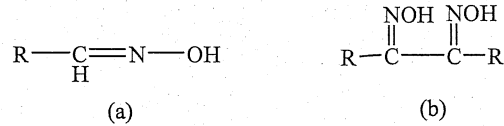
Giriş

Karbon nanotüp yüzeyine metal nanopartikül depozisyon işlemlerinde kullanılan öncüller incelendiğinde genellikle asetilasetonat, trifloroasetilasetonat ve hekzafloroasetilasetonat gibi bilinen ve kataloglarda yer alan komplekslerin kullanıldığı görülmektedir. Bu komplekslerde kullanılan diğer ligantlar heksametiltriethilen, tetrametilenglikol dimetil eter, tetrametil heptadionat, siklooktadien gibi ligantlar olup araştırmacılar yöntemin geliştirilebilmesi için yeni öncüllerin sentezlenmesine ve daha fazla deneysel veriye ihtiyaç duyulduğunu bildirmektedir. Yaptığımız çalışmada oksim türevi kompleksler sentezlenmiş ve bu

* Yüksek Lisans Tezi-Msc Thesis

komplekslerin karbon nanotüp destekli metal nanopartikül depozisyon işleminde öncül olarak kullanımı araştırılmıştır. Ayrıca, literatürler araştırıldığında oksim komplekslerinin bu amaçla kullanımına rastlanmamıştır.

Oksimler farklı şekillerde sentezlenmektedir fakat, en çok uygulanan sentez yöntemine göre; aldehit ve ketonların, hidroksil amin (NH₂OH) ile reaksiyonları sonucunda oluşan ve -C=N-OH grubu taşıyan bileşiklere **oksim** denir. İmin ise schiff bazı olarak bilinen ve yapısında -C=N (azometin) grubu bulunan bileşiklere denir ve oksim ismi, oksi-iminin kısaltmasıdır. Oksimler, aldehitlerden elde edilirse aldoksim, ketonlardan elde edilirse ketoksim olarak isimlendirilirler. Ayrıca Oksimler yaygın olarak O ve/veya N atomlarıyla farklı yollarla merkez atoma bağlanabilen çok yönlü ligandlar olarak tanımlanmaktadır. Koordinasyon kimyasında en çok monooksimler ve vic-dioksimler kullanılmaktadır, aynı zamanda organik moleküller oksim grubu sayısına göre; mono, di, tri ve tetra oksimler de içermektedir.



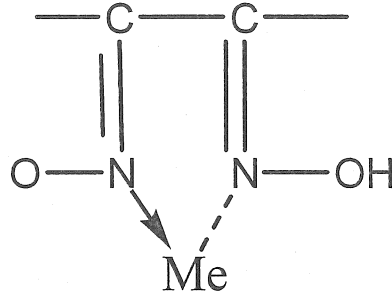
Şekil 1. (a) Basit oksim (b) Dioksimlerin genel gösterimi

Oksimler ; genellikle, renksiz ve eriklerinde bozulan maddelerdir. Sudaki çözünürlükleri azdır ve sadece molekül ağırlığı küçük olanlar dikkate değer derecede uçucudur.(Singh ve Singh, 2003)

Yapısında bulunan azometin (C=N) grubundan dolayı zayıf bazik, hidroksil grubundan dolayı da zayıf asidik özellik gösterirler, hem asidik hem de bazik özellik göstermeleri nedeniyle amfoter madde sınıfına girerler ve çok kuvvetli asit ve bazlarla tuz oluştururlar (Singh ve ark., 1979). Aynı zamanda, zayıf asidik özelliklerinden dolayı NaOH 'de, yapılarındaki C=N gruplarından dolayı bazik karakterli olmaları sebebi ile de konsatre mineral asitlerde (der. HCl) çözünürler, fakat su ile seyreltiklerinde çökerler. Böylece, hidroklorür tuzları elde edilir. Ayrıca CO₂ ile çökerler.

Organik ligandlardan biri olan oksimlerin yapısında yer alan donör atomların hibrit orbitalleri aşağıdaki şekilde görülmektedir. Bir adet ortaklanmamış elektron çiftine sahip olan oksim azotu sp², iki adet ortaklanmamış elektron çifti bulunduran oksijen atomu da sp³ hibritindedir. Bu nedenle oksimler, çoğu geçiş metali ile azot veya oksijen atomu üzerinden farklı şekillerde koordinasyon bağı yaparak kararlı koordinasyon bileşikleri verirler (Chakravorty, 1974).

vic- Dioksimlerin, metallerle iç kompleks tuzları oluşumu sırasında, oksim gruplarından biri asidik diğeri bazik karakter gösterir(Pfeirrer ve Richardz 1928).



Şekil 1.10. vic- Dioksimlerin İç Kompleks Tuzları

Oksimler, tarımda, eczacılıkta, yakıt sanayinde ve birçok alanlarda kullanılmaktadır. Oksim bileşikleri, şelat oluşturabilme, oksijen tutma, biyolojik olarak kendiliğinden parçalanabilme gibi özelliklerinin yanında fotokimyasal ve biyolojik reaksiyonlarda gösterdikleri olağanüstü etkileri sayesinde geniş olarak tanınmakta ve değişen değişen teknolojiye bağlı olarak yeni kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; anti-oksidant ve polimer başlatıcı reaktifleri olarak, yakıtlarda oktan miktarının artırılmasında, boyarmaddelerde ara ürün olarak, değerli metallerin geri kazanılmasında, deri ve dokuma sanayinde yumuşaklığı, su geçirmeme özelliğini sağlamada, böcek ilaçlarında, bazı antibiyotik ilaçlarda (Örneğin, Sefalos Porinler), hormonlarda, fotoğrafçılıkta katkı maddeleri olarak, tatlandırıcılarda, parfümlerde vs.kullanılmalarıdır. Oksimler organik, analitik, anorganik, endüstri ve biyokimyanın birçok alanında değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Bazı oksim ve onların çeşitli alkil, oksi alkil ve amino türevleri fizyolojik ve biyolojik aktif özelliklere sahip oldukları, ayrıca motor yağlarının, boyaların, epoksit reçinelerinin vs. bazı özelliklerinin iyileştirilmesi için katkı maddesi olarak kullanıldıkları bilinmektedir. (Fesenden, 1993).

Bütün bu kullanım alanlarının yanı sıra yapılan bu çalışmada Cu(II) ile oluşturulan çeşitli oksim kompleksleri, nanotüpler üzerine metalik nano parçacıkların deposyonu işlemlerinde kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan bileşikler incelendiğinde çoğunlukla β -diketonat (asetilasetonat) türevi metal komplekslerden yararlandığı, oksim türevi metal komplekslerin ise kullanılmadığı gözlenmiştir.

Karbon Nanotüp Destekli Metal Nanopartiküllerin Kimyasal İndirgemeye Yükleme Metoduyla Üretimi

Geliştirilen yükleme yöntemleri arasında kimyasal indirgemeye yükleme metoduyla nanotüp destekli nanopartikül üretiminde nanopartiküllerin yüklenmesi işlemi organik çözücü ve süperkritik çözücü olmak üzere iki farklı çözücü ortamında yapılabilmektedir. (L.A. Dobrzanski, 2010).

Organik Çözücü Ortamında Yükleme: Karbon nanotüp destekli nanopartikül üretimi çözücü ortamında iki farklı şekilde yapılabilmektedir.

Bunlardan birincisi, nanopartiküllerin önce sentezlenmesi ve sonrasında fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüplerin üzerine kovalent veya non-kovalent etkileşim ile yüklemesidir. İkincisi ise, karbon nanotüplerin yüzeyine nanopartiküllerin kimyasal indirgeme metodu ile doğrudan yüklenmesidir. Böyle bir durumda karbon nanotüp-nanopartikül oluşumu, nanopartiküllerin indirgeme reaksiyonuyla veya karbon nanotüplerin şablon olarak kullanılmasıyla elektrodpozisyon işlemiyle elde edilebilir. Kimyasal indirgeme ile yükleme metodu, karbon nanotüpün aktive edilmesi, karbon nanotüpler ile organik çözücü ortamında karıştırılan metal tuzunun karbon nanotüp yüzeyine adsorplanması ve sonra bu metal tuzun indirgeyici bir ajan varlığında (NaBH_4 , sitrik asit, trifenil fosfin veya etilen glikol) indirgenmesi olmak üzere üç basamakta gerçekleştirilmektedir.

Materyal ve Metot

Materyal

Sentezlerde, saflaştırma çalışmalarında ve karbon nanotüp destekli-metal nanopartikül üretiminde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup; Sigma-Aldrich, Strem firmalarından temin edilmiştir. Sentezlerde kullanılan çözücüler, uygun kurutucular varlığında kurutularak ve içerisinde çözülmüş halde bulunabilecek gazlardan arındırılarak kullanılmıştır. Çözücülerin saflaştırma işlemleri, kullanımları ve sentezlerin tamamı inert gaz atmosferi (argon veya azot) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Metot

Çalışma kapsamında ilk olarak çıkış maddesi ve ligandlar daha sonra metal kompleksleri sentezlenmiştir. Son olarak da metalik öncüller substrat üzerine adsorplanmış ve metalik forma indirgenmiştir.

Dört tane *vic*- dioksım türü ligand kullanılmıştır. Bu ligandlardan *anti*-[(4-triflorometil)anilin] glioksım ve *anti*-[(4-perflorooktil)anilin] glioksım ligandları sentezlenmiş (Özcan ve ark., 2002), 1,2-sikloheksandiondioksım ve dimetilglioksım ligandları ise Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. *anti*-[(4-triflorometil)anilin] glioksım ve *anti*-[(4-perflorooktil)anilin] glioksım ligandlarının sentezinde çıkış maddesi olarak *anti*-kloroglioksım kullanılmıştır ve bu madde literatürde (Ponzio ve Baldracco, 1930) belirtildiği gibi sentezlenmiştir.

Çıkış Maddesinin Sentezlenmesi

***Amphi*-kloroglioksım Sentezi**

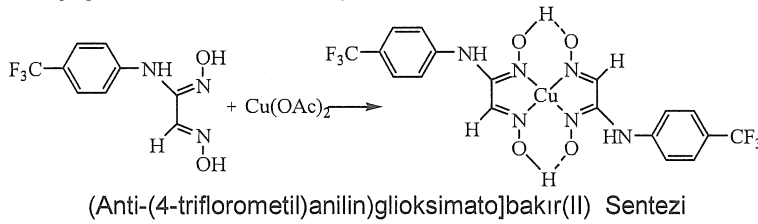
64,45 g (0.9 mol) Hidroksilamin hidroklorür 80 mL suda çözüldü ve üzerine 47,70 g (0.45 mol) sodyum karbonat yavaş yavaş eklendi. Nötralizasyon işlemi bittikten sonra çözeltiye 49,65 g (0.3 mol) kloral hidrat ilave edildi ve bir gece oda sıcaklığında kendi haline bırakıldı. Çözeltinin yüzeyinde ve tabanında tabakalar halinde çökelti oluştu. Bir gece bekleyen çözelti için buz-tuz banyosu hazırlandı ve ortamın sıcaklığı $-5\text{ }^\circ\text{C}$ ile $-10\text{ }^\circ\text{C}$ arasına çekildi. Sıcaklık $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 'yi geçmeyecek şekilde soğutulan ve mekanik karıştırıcı ile karıştırılan çözeltiye, 100 mL saf suda çözülmüş 54 g NaOH damla damla eklendi. NaOH ilavesinden sonra soğuk haldeki

karışıma sıcaklığı -5°C ile -10°C arasında tutmaya devam ederek 32 mL % 98 'lik H_2SO_4 damla damla ilave edildi. Asit ekleme işlemi bittikten sonra çözelti, sıcaklık -5°C ile -10°C arasında tutularak 1 saat boyunca karıştırıldı. Oluşan açık sarı katı buchner hunisi ile vakum altında süzüldü ve vakum desikatöründe kurutuldu. Kurutulan katı ve süzüntü ayrı ayrı dieterler ile ekstrakte edildi ve eter fazları birleştirildi. Susuz magnezyum sülfat ile kurutulan eter fazı döner buharlaştırıcı ile uçuruldu. Eter fazı uçurulduktan sonra elde edilen beyaz katı belirli hacimdeki ve 50°C sıcaklıktaki suda kristallendirildi ve beyaz renkli iğne gibi ince uzun *amphi*-klorogliksim kristalleri elde edildi. Verim(%): 68, E.N: 150°C 'de bozunma. Elde edilem ürün der. HCl ile muamele edilerek *anti*-klorogliksim elde edildi.



Kompleksin Sentezlenmesi

[(Anti-(4-triflorometil)anilin)gliksimato]bakır(II) kompleksi anti-(4-triflorometil) aniline ve $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ kullanılarak sentezlenmiştir. Bu kompleksin eldesinde aşağıdaki metod kullanılmıştır.



0.19 g (0.001 mol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mL suda çözüldü. 0.5 g (0.002 mol) [anti-(4-triflorometil)anilin]gliksim ligandı 20 mL EtOH 'de çözümlenerek $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ligandın üzerine ilave edildi. Metal tuzunu eklerken PH 3.0-3.5 'den 4.0-4.5 'a yükseldi ve ekleme işlemi bittikten sonra PH 'ı 7.0'a ayarlamak için ortama %1 'lik NaOH 'in sulu çözeltisi eklendi. Çözelti $50-55^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 15 dakika karıştırıldı. Elde edilen kompleks süzüldü ve su ile yıkanıp 100°C 'de kurutuldu. Ürün 0.20 g olup % 80 verimle elde edilmiştir. E.N: 260°C , (Ma:555,89 g/mol), IR (KBr, $\nu = \text{cm}^{-1}$): 3425(O....H-O), 1571(C=N), 1515(Ar(C=C)), 1325(C-N), 1123-1066(C-F), 881(N-O).

Metalik öncülün destek materyali olarak kullanılan çok duvarlı karbon nanotüpler üzerine adsorplanması kimyasal indirgemeyeyle yükleme metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve nanotüp yüzeyine adsorplama işlemi yapılmadan önce karbon nanotüpler aktive edilmiştir.

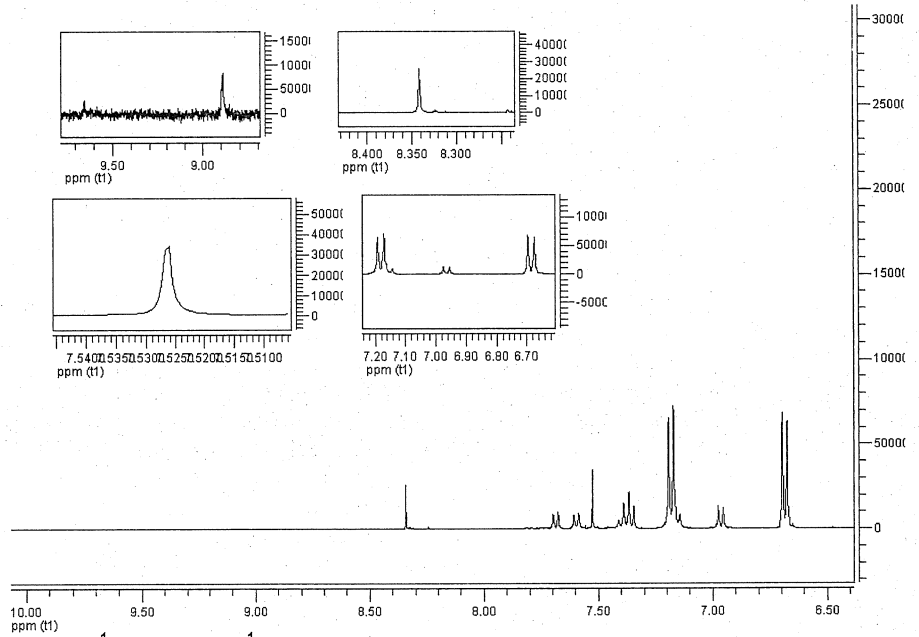
Çok duvarlı karbon nanotüpler derişik $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$ (1:1) karışımı içerisinde 24 saat karıştırıldı ve sonrasında süzülerek 500°C 'de 1 saat bekletildi.

Ardından, soğutulan çok duvarlı karbon nanotüpler yine derişik $H_2SO_4-HNO_3$ (1:1) karışımı içerisinde 6 saat karıştırıldı. Bu işlemlerin ardından süzölen karbon nanotüpler destile su ile pH=7 oluncaya kadar yıkandı ve 60 °C 'de kurutuldu (Zhang, 2010).

Sentezlenen her bakır kompleksi için ayrı ayrı řu işlemler uygulanmıştır; 30 mg çok duvarlı karbon nanotüp'ün etanoldeki çözöltüsü üzerine kompleksin 10 mL 0.1 M etanoldeki çözöltüsü ilave edildi ve 1 saat boyunca 80 °C 'de geri soğutucu altında karıştırıldı. Bu karışım üzerine indirgeme amacıyla kullanılacak olan KBH_4 (0.1 M) ilave edildi. Elde edilen süspansiyon santrifüj edilerek etanol ve su ile yıkandı ve 70 °C'de kurutuldu. XRD: $Cu(I)L_2$; 23°, 43° ve 78° de zayıf pikler gözölenmiştir. $Cu(II)L_2$; 25°, 36°, 43°, 46°, 78° de yayvan pikler gözölenmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

L Bileşğinin 1H -NMR spektrumu incelendiğinde 9-10 ppm'de yayvan ve singlet olarak gözölenen -OH pikleri; 8.35 ppm'de -NH'a ait singlet pik; 7.50 ppm'de oksim karbonuna bağılı Hidrojen (H-C=N) ve 6.7-7.2 ppm'de benzen halkalarına ait dubletler *vic*-dioksimin düşünöldüğü şekilde sentezlendiğini göstermektedir. Bu değerler literatürle uyum içerisinde (Yıldırım, B.; Özcan, E).



Şekil 1. L bileşğinin 1H NMR spektrumu

¹L Bileşiği'nin IR spektrumu incelendiğinde 3318 cm⁻¹ deki -OH, 1658-1610 cm⁻¹ de C=N ve 1113-1128 cm⁻¹ de C-F gerilimlerine ait pikler görülmektedir. En önemlisi, 3404 cm⁻¹ de gözlenen -NH gerilimine ait pikin bu bileşikte ortaya çıkması, antiklorogliksim bileşiğinde 748 cm⁻¹ de görülen C-Cl gerilimine ait pikin görülmemesi ve 1322 cm⁻¹ de C-N gerilimine ait pikin belirgin bir şekilde ortaya çıkması, 1658-1610 cm⁻¹'de -C=C gerilmelerine ait pikler, florlu anilin bileşiğinin antiklorogliksim bileşiğine bağlandığını açık bir şekilde göstermektedir.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada çıkış maddesi olan anti-klorogliksim, ligantlar; anti-[(4-triflorometil)anilin]gliksim (¹L), anti-[(4-perflorooktil)anilin]gliksim (²L), sentezlenmiş ve bu ligandların Cu(OAc)₂ ile tepkimesi sonucu [(anti-(4-triflorometil)anilin)gliksimato]bakır(II) (¹K), [(Anti-(4-perflorooktil)anilin) gliksimato] bakır(II)(²K) kompleksleri sentezlenmiştir. Bu kompleksleri yanısıra hazır olarak temin edilen ligantlardan (1,2-sikloheksandion dioksimato) bakır(II)(³K) ve (dimetilgliksimato) bakır(II)(⁴K) kompleksleri elde edilmiştir. Sentezlenen ligant ve komplekslerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve FT-IR gibi yöntemlerle karakterize edilmiştir. Elde edilen komplekslerin karbon nanotüp destekli metal-nanopartiküllerin sentezlenmesinde öncül olarak kullanımları araştırılmıştır. Metal-nanopartiküllerin sentezlenmesi kimyasal indirgeme ile depozisyon (yükleme) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve metal komplekslerin indirgenmesi organik çözücü ortamında yapılmıştır. Oluşturulan metal-nanopartiküller XRD ile karakterize edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlara göre ³K ve ⁴K komplekslerinde karbon nanotüp üzerine herhangi bir metal birikimi gözlenmemiş ¹K ve ²K komplekslerinde ise düşük oranda gözlenmiştir.

Kaynaklar

- AVRAM, M and MATEESCU, GhD., 1972. Infrared Spectroscopy, New York, Willey-Interscience.
- GÜL, A. and BEKAROĞLU, Ö. 1983. Syntheses of N N'-Bis(4'-benzo[15-crown-5]diaminogliksim and Its Complexes with Copper(II) Nickel(II), Cobalt(II), Palladium(II), Platium(II) and Uranyl(VI). J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2537-2541.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSAIER, G.C. and MORRIL, T.C. 1981. Spectrometric Identification of Champhorquinone Dioxime Ligands. Inorg. Chem., 19, 363.
- ERTAŞ, M., AHSEN, V., GÜL, A. and BEKAROĞLU, Ö. 1987. Synthesis of bis(ferrocenylamino)glyoxime and ist Nickel(II) Complexes. J. of Organometallic Chem., 333, 383-385.
- ERKEY, C. (2009). J.of Supercritical Fluids, 47, 517-522.
- ERKEY, C. SAQUING, C.D., KANG, D., AİNDOW, M. (2005). Microporous and Mesoporous Materials, 80, 11-23.

- XIANG, R. YE, YUEHE LIN, CHIEN M. WA. (2003). Decorating catalytic palladium nanoparticles on carbon nanotubes in supercritical carbon dioxide, Chem. Commun., 642-643.
- REVERCHON, E., ADAMIA, R.(2006). Nanomaterials and supercritical fluids, J. of Supercritical Fluids, 37, 1-22.

BAZI ÇİLEK ÇEŞİT VE GENOTİPLERİNİN MOLEKÜLER MARKÖR TEKNİKLERİ İLE KARAKTERİZASYONU*

*Characteization of some Strawberry Cultivars and Genotypes by Molecular
Markers*

Serap GÜNAYDIN
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Salih KAFKAS
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma Türk ve yabancı orijinli 34 çilek çeşit ve genotipi arasındaki genetik ilişkileri ortaya çıkarmak amacıyla CAPS ve SSR DNA moleküler markör teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada 17 adet CAPS primer enzim kombinasyonu ve 12 adet SSR primer çifti kullanılmıştır. CAPS primer-enzim kombinasyonları 52'si polimorfik olan toplam 60 adet bant üretmiştir. Kullanılan SSR primer çiftlerinden ise 145'i polimorfik olan toplam 150 adet allel elde edilmiştir. Sonuç olarak, çilek çeşit ve genotiplerinin karakterizasyonunda, SSR yöntemi CAPS tekniğine göre polimorfizm oranı (PO) ve polimorfizm bilgi içeriği (PBI) bakımından daha üstün bulunurken, CAPS tekniği ise ayırma gücü bakımından SSR yönteminden daha üstün bulunmuştur.

Anahatar Kelimeler: Çilek, Genetik benzerlik, SSR, CAPS, *Fragaria x ananassa*.

ABSTRACT

This study was performed to reveal the value of genetic relationship among 34 Turkish and foreign strawberry cultivars and genotypes using CAPS and SSR DNA molecular markers. Seventeen primer-enzyme combinations in CAPS and 12 SSR primer pairs in SSR analysis were used. In CAPS analysis, 60 bands were produced and 52 of them were polymorphic. In SSR analysis, 150 alleles were generated and 145 of them were polymorphic. As a result, SSR was better than CAPS from the point of view of polymorphism rates and polymorphism information contents, whereas CAPS was better than SSR from the point of view of resolving power values, in the characterization of strawberry cultivars and genotypes.

Key Words: Strawberry, CAPS, SSR, Genetic similarity, *Fragaria x ananassa*.

Giriş

Dünyada ve ülkemizde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan çilekler, botanik olarak sınıflandırıldıklarında Rosales takımı, Rosaceae (Gülgiller) familyasından, *Fragaria* cinsi içerisinde yer alır (Hancock ve Luby, 1993).

Anavatanı Kuzey ve Güney Amerika'dır. Kuzey yarımkürenin ılıman iklim bölgeleriyle birlikte, Güney yarımkürede de geniş ölçüde tarımı yapılmaktadır. (Nacar, 2005). Ülkemizde çilek yetiştiriciliği 1970'li yıllarda başlamış, özellikle son

* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

yıllarda hızlı bir artış göstermiştir. Nitekim, 1970 yılında 2100 ha alanda 9700 ton ürün alınırken, 2005 yılında 14.000 ha alandan 200.000 ton ürün alınmıştır.

(Kafkas, 2004; Faostat, 2005).

Rosaceae familyasından çilek çeşitleri arasında *Fragaria x ananassa* ($2n=8x=56$) ekonomik öneme sahiptir **(Basil ve ark., 2006)**. *Fragaria* cinsine bağlı olan yaklaşık 20 yabancı türün kromozom sayısı $x=7$ 'dir ve 4 poliploidi seviyesi vardır. Bunlar diploid, tetraploid, hekzaploid ve oktoploid türlerdir **(Hancock, 1999)**.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada; Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Bahçesinden, Yaltır Tarım A.Ş. deneme parsellerinden ve Çiltar LTD. ŞTİ. tarım alanlarından olmak üzere toplam 34 çilek çeşidi materyal olarak kullanılmıştır.

Metot

DNA İzolasyonu, DNA Miktarının Belirlenmesi ve DNA Konsantrasyonun PCR Reaksiyonu için Ayarlanması

34 adet çilek çeşidine ait yaprak örnekleri erken ilkbahar döneminde toplanmıştır. DNA izolasyonunda Qiagen DNeasy Mini kiti kullanılmıştır.

Çalışmada her bir örneğin DNA miktarı, konsantrasyonu belli lamda DNA ile jel-elektroforez yöntemiyle UV altında karşılaştırılarak belirlenmiş ve 5 ng/µl ayarlanması yine aynı şekilde konsantrasyonu belli lamda DNA ile karşılaştırmak suretiyle tahmini olarak yapılmıştır.

CAPS Analizleri

25 µl amplifikasyon reaksiyonu 75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgCl_2$, %0.01 Tween 20, 100 µM dATP, 100 µM dTTP, 100 µM dGTP, 100 µM dCTP, her bir primerden 0.2 µM, 1.0 ünite Taq DNA polimeraz ve 10 ng DNA içermiştir.

CAPS analizlerinde **Kunihisa ve ark.'nın (2003; 2005)** geliştirdikleri 20 adet primer çifti ve enzim kombinasyonu (toplam 22 adet) kullanılmıştır.

Sıcaklık ve döngü koşulları olarak, **Kunihisa ve ark.'nın (2003; 2005)** geliştirdikleri metod kullanılmıştır. Bu ürünlerin görüntüsü alındıktan sonra çalışan primerler belirlenmiş ve daha sonra elde edilen PCR ürünüde uygun enzimlerle kesimleri yapılmıştır.

SSR Analizleri

12 µl amplifikasyon reaksiyonu; 75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgCl_2$, %0.01 Tween 20, 200 µM dATP, 200 µM dTTP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 50 nM 5' ucunda M13 universal primerinin baz dizisi eklenmiş ileri primer, 200 nM geri primer, 200 nM 5' ucu 6-FAM (mavi), VIC (yeşil), NED (sarı) ve PET (kırmızı) ile işaretlenmiş M13 universal primer, 0.6 ünite Taq DNA polimeraz ve 10 ng DNA içermiştir.

SSR analizlerinde elektroforez işlemleri kapiler elektroforez yöntemi ile ABI 3130xl otomatik genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada **Bassil ve ark. (2006)**'nın geliştirdikleri 16 adet primer çiftinin ileri primerlerinin 5 ucuna M13 üniversal (5-TGAAAACGACGGCCAGT-3) primeri (**Schuelke, 2000**) eklenerek SSR analizinde kullanılmıştır. Altı genotipte yapılan tarama işleminden sonra 12 SSR primer çifti çalışmada kullanılmıştır.

SSR-PCR Reaksiyonlarının Kapiler Elektroforezi

Öncelikle 16 SSR primer çiftinden seçilen 12 adet primer çifti FAM (mavi), VIC (yeşil), NED (sarı), PET (kırmızı) flüoresan boya ları da kullanılarak 12 µl'de PCR işlemi yapılmıştır. Daha sonra bunun 0,5 µl'si ABI cihazında kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerine ait bant büyüklüklerinin belirlenmesinde ise LIZ (turuncu) ile etiketli 500 bazlık size standart kullanılmıştır.

Primerlerin Polimorfizm Oranlarının ve Bilgi İçeriklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan CAPS ve SSR primerlerinin polimorfizm oranları (PO), primerlerden elde edilen polimorfik bant sayılarının (PBS), toplam bant sayısına (TBS) bölünüp 100 ile çarpılması ile bulunmuştur.

Polimorfizm bilgi içeriklerinin (PBI) belirlenmesinde ise çalışmada öncelikle polimorfik bantlarda toplam var (1) ve yok (0) olan bant sayıları belirlenip, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (**Smith ve ark.1997**).

$$PBI = 1 - \sum Pi^2 \text{ (Formüle bulunan Pi, i bantının frekansını göstermektedir.)}$$

Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi

Çalışmada primerlerin ayırma güçleri **Prevost ve Wilkinson (1999)** tarafından geliştirilen aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Formüldeki p, I bantının toplam çilek çeşit ve genotipindeki oranıdır.

$\text{Ayırma gücü} = \sum Ib$	$Ib = 1 - (2 \times 0.5 - p)$
--------------------------------	---------------------------------

Çilek Çeşit ve Genotiplerinin Arasındaki Genetik İlişkilerin Belirlenmesi ve Soyağacı Analizleri

CAPS ve SSR amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen veriler NTSYSpc 2.11V (**Rohlf, 2004**) adlı bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Her bir markör tekniğinden elde edilen veriler ayrı ayrı değerlendirildiği gibi birlikte de değerlendirilmiştir. Genetik benzerlik indeksi 'Simple Matching'(SM) katsayısına göre hesaplanmıştır. Soyağacının elde edilmesinde UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) yöntemi kullanılmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Çilek Çeşit ve Genotiplerinin CAPS Tekniği ile Karakterizasyonunda Polimorfizm ve Ayırma Gücü

CAPS tekniğinde ilk olarak çilek çeşit ve genotiplerinde en polimorfik CAPS primerlerini saptamak amacıyla, 6 adet örnekte toplam 22 adet CAPS primer çifti ve kesim enzimi kombinasyonu denenmiş olup, bunların içerisinde 17 adedinin bant verdiği saptanmıştır.

Kunihisa ve ark. (2003) *Mlu* I kesim enzimi ile kesilmiş APX primerini kullanarak 3'ü polimorfik olan 8 bant (%37.5) elde etmişlerdir. Bu çalışmada ise APX primerinden elde edilen toplam 6 adet bantın 6 adedinin (%100) polimorfik olduğu görülmüştür. Bu çalışmada **Kunihisa ve ark.'nın (2003)** sonuçları ile farklı değerler elde edilmiştir. Bunun nedeni çalışmada kullanılan çeşitlerin farklı orijinli olmasından kaynaklanmaktadır.

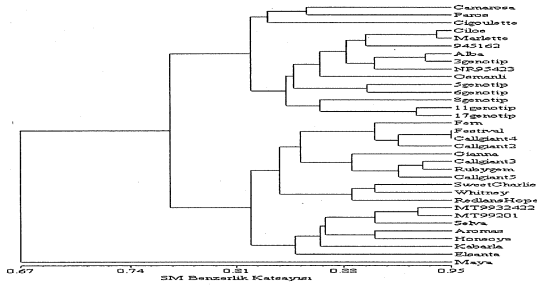
Kunihisa ve ark. (2005) *Hae* III kesim enzimi ile kesilmiş PYDA primerini kullanarak 3'ü de polimorfik olan 3 bant (%100) elde etmişlerdir. **Kunihisa ve ark.'nın (2005)** sonuçları ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Tarama sonucunda CAPS analizinde kullanılan 17 adet primer çifti ve kesim enzimi kombinasyonu, 34 çilek çeşidi ve genotipinde 52'si polimorfik olan toplam 60 bant vermiş olup, bunların 8 adedinin ise monomorfik olduğu tespit edilmiştir.

Çilek Genotiplerinin CAPS Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan çilek çeşitleri ve genotipleri arasındaki Simple Matching (SM) benzerlik katsayıları sonuçlarına göre çilek çeşitleri ve genotipleri arasında genetik benzerlik indeksinin 0.56-0.95 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan CAPS analizi sonucunda çalışmada kullanılan tüm genotip ve çeşitlerin birbirinden ayrıldığı görülmüştür (**Şekil 1.**) **Degani ve ark. (2001)** 19 çilek çeşidi arasındaki genetik ilişkiyi tanımlamak amacıyla AFLP ve RAPD yöntemlerini kullandıklarını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada Camarosa ve Honeoye çeşitleri arasındaki benzerlik katsayısını 228 adet AFLP markörü kullanarak 0.60 bulduklarını ifade etmişlerdir. **Jadwiga ve ark. (2003)** RAPD analizleri ile genetik çeşitlilik amaçlı yaptıkları çalışmada Honeoye (Vibrant x Holiday) ve Elsanta (Gorella x Holiday) çeşitlerini soyağacında aynı grup içerisinde yer aldığını belirtmişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında benzer sonuç elde edilmiştir.



Şekil 1. 34 Çilek çeşit ve genotipinin CAPS tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı

Çilek Çeşit ve Genotiplerinin SSR Tekniği ile Karakterizasyonunda Polimorfizm ve Ayırma Gücü

Çilek çeşit ve genotiplerinde en polimorfik SSR primerlerini saptamak amacıyla, öncelikle 6 çilek çeşidi ve genotipinde 16 SSR primeri ile tarama yapılmış ve bu primerlerden 12 tanesinin skorlanabilir allel verdiği tespit edilmiştir. Elektroforez işlemi, kapiller elektroforez kullanılarak yapılmış, amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde GeneMapper 4.0 bilgisayar paket programında skorlanmıştır. Çalışma sonucunda primer kombinasyonlarından elde edilen toplam allel sayısı (TAS), polimorfik allel sayısı (PAS), polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) ve ayırma güçleri (AG) hesaplanmıştır.

Sargent ve ark. (2003) yabani diploid çilek türleri (*Fragaria viridis*) kullanarak geliştirdikleri 22 adet mikrosatellit primeri 6 adet *F.viridis* genotipinde kullanışlı ve her lokustan ortalama 4.95 allel elde ettiklerini ifade etmişlerdir. **Hadonou ve ark. (2004)** 15 adet *Fragaria vesca* genotipinde 31 adet mikrosatellit primerini denemişler ve yaptıkları çalışmada lokus başına ortalama 4.9 polimorfik allel elde etmişlerdir.

Bu çalışmada primerlerin polimorfizm oranı %95.12 olarak bulunmuştur. **Monfort ve ark. (2006)** yabani çileklerde (*Fragaria vesca*) SSR markörü geliştirmek ve diğer türlere aktarılabilirliğini araştırmak amaçlı yaptıkları çalışmada diploid *Fragaria* türlerinde ortalama %81 polimorfizm oranı (en yüksek %97 ile *Fragaria nubicola* da ve en düşük %63 ile *Fragaria iinumae*'den) elde ettiklerini belirtmişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalarla bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bu çalışmadaki polimorfizm oranları daha yüksek bulunmuştur.

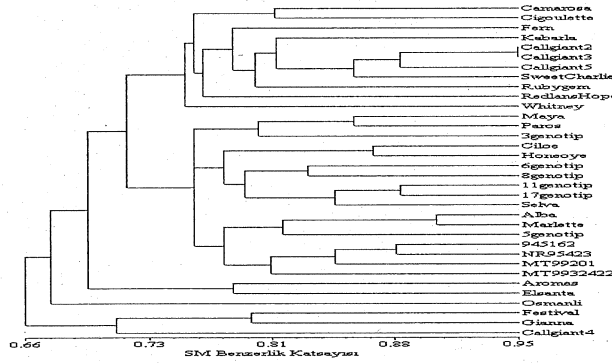
Çalışmada ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.74 olarak bulunmuştur. **Gil-Ariza ve ark. (2006)** çilekte mikrosatellit markör geliştirme üzerine yaptıkları çalışmada 50 adet çilek çeşidini 27 SSR primer çifti kullanarak test etmişlerdir. Ortalama polimorfizm bilgi içeriğinin 0.76 olduğunu belirtmişlerdir.

Çilek Genotiplerinin SSR Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi

Analiz sonuçlarına göre, çilek çeşitleri ve genotipleri arasında genetik benzerlik indeksinin 0.55-0.94 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan SSR analizi sonucunda çalışmada kullanılan tüm genotip ve çeşitlerin birbirinden ayrıldığı görülmüştür. Elde edilen soyağacında 5 farklı ana grup oluşmuştur (**Şekil 2**).

Kuras ve ark. (2004) RAPD analizleri sonuçlarına göre elde ettikleri soyağacında ABD orijinli Selva (Brighton x (Tufts x Pajaro)) ve Honeoye (Vibrant x Holiday) çeşitleri arasında yakın ilişki olduğunu ve Hollanda orijinli olan Elsanta (Gorella x Holiday) çeşidinin ise bu gruptan olmadığını sonuçlarında ifade etmişlerdir. **Redmann ve ark. (2006)** yaptıkları çalışmada Camrosa ve Sweet Charlie çeşitlerini soyağacında aynı grupta olduklarını ifade etmişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalar ile bu çalışmada benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.



Şekil 2. 34 adet çilek çeşit ve genotipine SSR tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı

CAPS ve SSR Analizlerinin Birlikte Değerlendirilmesi ve Karşılaştırılması

CAPS ve SSR Yöntemlerinin Polimorfizm ve Ayırma Gücü bakımından Karşılaştırılması

CAPS ve SSR yöntemlerinin polimorfizm ve ayırma gücü bakımından karşılaştırılması **Çizelge 1**'de verilmiştir. CAPS ve SSR yöntemleri toplam bant sayısı ve polimorfik bant sayısı bakımından karşılaştırıldığında, CAPS tekniğinden toplam 63 bant elde edilmiş, bunlardan ise 53 adedi polimorfik olarak tespit edilmiştir. SSR yönteminde ise toplam 150 bant elde edilmiş, bunlardan ise 145 adedi polimorfik bant olarak tespit edilmiştir.

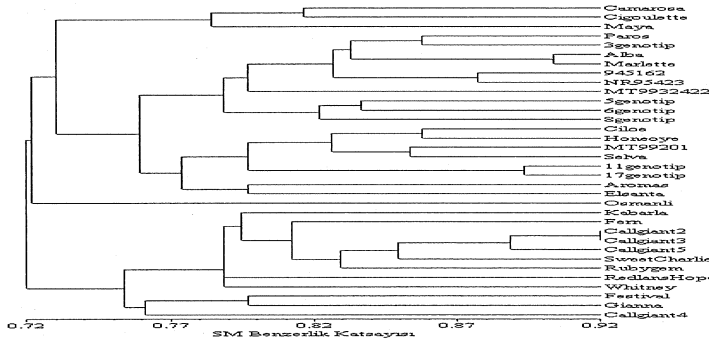
Çizelge 1. CAPS ve SSR primerlerinin amplifikasyonu sonucunda elde edilen toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS), polimorfizm oranı(PO), primer başına düşen toplam bant sayısı (PBDTBS), primer başına düşen polimorfik bant sayısı (PBDPBS), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve primerlerin ayırma gücü (AG) değerleri

	Primer Çifti	TBS	PBS	PO (%)	PBDTBS	PBDPBS	PBI	AG
CAPS	17	60	52	85.03	3.53	3.06	0.31	16.81
SSR	12	150	145	95.12	12.5	12.08	0.79	8.15

Çilek Çeşitleri Arasındaki Genetik İlişkilerin CAPS ve SSR Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi ile Belirlenmesi

Analiz sonuçlarına göre çilek çeşitleri ve genotipleri arasında genetik benzerlik indeksinin 0.59-0.91 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

CAPS ve SSR verilerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu elde edilen soyağacına (Şekil 3.) göre iki ana grup oluşmuştur. Birinci ana grubu Türkiye, İtalya ve Fransa orijinli genotipler oluştururken, ikinci ana grubu ise ABD ve Avustralya orijinli genotipler oluşturmuştur.



Şekil 3. 34 adet çilek çeşit ve genotipinin CAPS ve SSR tekniklerinin birlikte uygulanması sonucu elde edilen soyağacı

Sonuç Ve Öneriler

Elde edilen bulgular aşağıda kısaca özetlenmiştir:

1. CAPS analizleri sonucunda elde edilen verilere göre; *APX2-Dra I* primeri toplam ve polimorfik bant açısından en fazla bantı sağlayan primer olduğu saptanmıştır. *AUB-Hha I*, *CT11-Hinf I* ve *OLP-Dde I* primerleri ise en az polimorfik bant üreten ve en düşük polimorfizm oranına sahip primerler olduğu belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı *B-CT1-Hinf I*, *PGPB-*

Rsa I PYDB-*Hae III*, APX-*Mlu I*, APX3-*Dra I*, B-APX-*Mlu I*, F3H-*Nco I*, CHI-*Pvu II*, PGPA-(*Acc I-Rsa I*) ve PYDA-(*Cfr13-Hae III*) primerlerinden elde edilmiştir. En düşük polimorfik bilgi içeriği değerininin F3H- *Nco I* primerinden ve en yüksek polimorfik bilgi içeriği değerinin ise PGPB-*Rsa I* primerlerinden elde edildiği görülmüştür. En yüksek ayırma gücü değeri PGPA-(*Acc I-Rsa I*) elde edilirken en düşük ayırma gücü değeri ise APX2-*Dra I* primerinden elde edilmiştir.

2. CAPS verileri kullanılarak elde edilen soyağacı ve benzerlik indeksi matrisine göre; yabancı orijinli olan Festival ve Call Giant-4 çeşitlerinin yakın akraba oldukları ve Türk çilek çeşit ve genotiplerinin ise Cİloe ve Marlette çeşitleri ile yakın ilişkili gösterdiği belirlenmiştir. İtalya orijinli Maya çeşidi ise soyağacında oluşan grupların hepsinden ayrılarak grup dışı oluşum göstermiştir. Genel olarak 34 çilek çeşidi ve genotipine bakıldığında ise Türk orijinli çeşitlerin yabancı orijinli çeşitler arasında grup oluşturarak dağılım gösterdiği ve ülkemizde genetik çeşitliliğin olduğu CAPS analizi sonucunda elde edilen verilere göre saptanmıştır.
3. SSR analizleri sonucunda elde edilen verilere göre; Toplam allel sayısı ve polimorfik allel sayısı açısından UFFa 13-C07 lokusu en düşük allel sayısını üretmiş olup, UFFa 08-H09 lokusu ise en fazla alleli vermiştir. Polimorfizm oranı bakımından ise UFFa 13-C07 lokusundan en düşük polimorfizm oranı elde edilirken, UFFa 01-H05, UFFa 02-H04, UFFa 03-B05, UFFa 04-G04, UFFa 08-H09, UFFa 10-H04, UFFa 11-A11 ve UFFa 14-H09 lokuslarından en yüksek polimorfizm oranı elde edilmiştir. En düşük polimorfizm bilgi içeriği değeri UFFa 13-C07 lokusundan, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği değeri ise UFFa 10-H04 lokusundan elde edilmiştir. Primerlerin ayırma gücü değerleri incelendiğinde ise; en düşük ayırma gücü UFFa 11-A11 lokusundan elde edilirken, en yüksek ayırma gücü değeri ise UFFa 13-C07 lokusundan elde edilmiştir.
4. SSR verileri kullanılarak elde edilen soyağacı ve benzerlik indeksine göre; ABD orijinli 3 çeşit (Kabarla, Gianna ve Call Giant-4) grup dışı oluşum göstererek diğer çeşit ve genotiplerden ayrılmışlardır. Osmanlı çeşidi ise bu oluşan diğer 3 gruptan ayrıldığı görülmüştür. Genel olarak elde edilen soyağacına göre 34 çilek çeşidi ve genotipine bakıldığında ise Türk orijinli çeşitlerin yabancı orijinli çeşitler arasında grup oluşturarak dağılım gösterdiği ve ülkemizde genetik çeşitliliğin var olduğu SSR analizi sonucunda elde edilen verilere göre saptanmıştır.
5. Çalışmada kullanılan teknikler karşılaştırıldığında, incelenen özellikler bakımından SSR tekniğinin CAPS tekniğine göre polimorfizm oranı (PO) ve polimorfizm bilgi içeriği (PBI) bakımından daha üstün olduğu bulunmuştur. Ancak ayırma gücü (AG) bakımından ise CAPS tekniğinin SSR tekniğine göre daha üstün olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma ile Türkiye de ilk defa yaygın yetiştiriciliği yapılan ve yurtdışından gelen çeşit ve genotiplerin moleküler karakterizasyonu CAPS ve SSR

yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmanın devamı olarak ileriki dönemlerde diğer DNA markör tekniklerinin de (AFLP, ISSR ve SRAP vb) çileğe uygulanmasına devam edilmelidir. Ayrıca bu çalışmalara ek olarak genetik yakınlık çalışmalarında primer sayısının ve kullanılan çeşit sayısının artırılması önerilmektedir. Çilekte ekonomik öneme sahip bazı bitki özellikleri ile ilişkili DNA markörlerinin geliştirilmesi ıslah süresini kısaltma bakımından oldukça önemlidir.

Çilek çeşit ve genotiplerinin yayılım alanlarının belirlenmesinde, gen kaynaklarının karşılaştırılmasında, çilek çeşit ve genotiplerinin karakterizasyonunda ve çilek ıslah programlarında en iyi ebeveynlerin seçilmelerine yardımcı olmak amacı ile bu çalışmadan çıkan sonuçlar kullanılmalıdır.

Kaynaklar

- ARNAU, G., LALLEMAND, J., and BOURGOIN, M., 2002. Fast and Reliable Strawberry Cultivar Identification Using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Amplification. *Euphytica* 129:69-79.
- BASSIL, N.V., GUNN, M., FOLTA, K., and LEWERS, K., 2006. Microsatellite Markers for *Fragaria* From 'Strawberry Festival' Expressed Sequence Tags. *Molecular Ecology Notes*, 6: 473-476.
- DEGANI, C., ROWLAND, L.J., SAUNDERS, J.A., HOKANSON, S.C., OGDEN, E.L., GOLAN-GOLDHIRSH, A., and GALETTA G.J., 2001. A Comparison of Genetic Relationship Measures in Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Based on AFLPs, RAPDs, and Pedigree Data. *Euphytica* 117: 1-12, 2001.
- FAOSTAT, 2005. FAO web page. (<http://www.fao.org>).
- GIL-ARIZA, D.J. AMAYA, I., BOTELLA, M.A., MUNOZ BLANCO, J., CABELLERO, L., LOPEZ-ARANDA, J.M. VALPUESTA, V., and SANCHEZ SEVILLA, F., 2006. EST-Derived Polymorphic Microsatellites From Cultivated Strawberry (*Fragaria x ananassa*) are Useful for Diversity Studies and Varietal Identification Among *Fragaria* Species. *Molecular Ecology Notes*, 6:1195-1197.
- HANCOCK, J.F., and LUBY, J.J., 1993. Genetic Resources at Our Door Step the Wild Strawberries. *Bioscience* 43: 141-147.
- HANCOCK, J.F., 1999. The Strawberry Species in Strawberries. CABI Publishing, Cambridge, Massachusetts, USA. 18 p.
- JADWIGA, I., ZEBRWSKA. I., and MIROSLOAW, T., 2003. The Use of Markers for Strawberry Identification and Genetic Diversity Studies WFL Publisher Science and Tecnology, Vol 1(1): 115-117.
- KAFKAS, N.E., 2004. Bazı Çilek Genotiplerinde Aroma Bileşiklerinin Tayini ve Aroma Bileşikleri ile Bazı Meyve Kalite Kriterleri Arasındaki İlişkiler. Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana, 2s.

- KUNIHISA, M., FUKINO, F., and MATSUMOTO, S., 2003. Development of Cleavage Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) Markers for Identification of Strawberry Cultivars. *Euphytica* 134: 209-215.
- KUNIHISA, M., FUKINO, F., and MATSUMOTO, S., 2005. CAPS Markers Improved by Cluster-Specific Amplification for Identification of Octoploid Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Cultivars, and Their Disomic Inheritance. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 1410-1418.
- KURAS, A., KORBIN, M., and ZURAWICZ, E., 2004. Comparison of Suitability of RAPD and ISSR Techniques for Determination of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Relationship. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79:189-194.
- MONFORT, A., VILANOVA, S., DAVIS, M.T., and ARUS, P., 2006. A New Set of Polymorphic Simple Sequence Repeat (SSR) Markers from a Wild Strawberry (*Fragaria Vesca*) are Transferable to Other Diploid *Fragaria* Species and to *Fragaria x ananassa*. *Molecular Ecology Notes* 6: 197-200.
- NACAR, Ç., 2005. Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü. Web Page. (www.alata.gov.tr/yayinlar/brosurler/brosurler/cilek_yet.html).
- PREVOST, A., and WILKINSON, M. J., 1999. A New System of Comparing PCR Primers Applied to ISSR Fingerprinting of Potato Accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.
- REDMANN, E. B., BIANCHI, V. J., OLIVEIRA, R.P., and FACHINELLO, J.C., 2006. Characterization and Genetic Diversity of Strawberry Cultivars. *Horticultura Brasileira*, 26:84-87.
- ROHLF, F.J., 2004. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1, Exeter Software, Setauket, New York.
- SARGENT, D. J., HODONOU, A.M., and SIMPSON, D.W., 2003. Development and Characterisation of Polymorphic Microsatellite Markers from *Fragaria Viridis*, a Wild Diploid Strawberry. *Molecular Ecology Notes*, 3: 550-552.
- SMITH, J.S.C., CHIN, E.C.L., SHU, H., SMITH, O.S., WALL, S.J., SENIOR, M.L., MITCHEL, S.E., KRESORICH, S., and TIEGLE, J., 1997. An Evaluation of The Utility of SSR Loci as Molecular Marker in Maize (*Zea mays*): Comparisons with Data from RFLP and Pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 163-173.

LACHANCEA THERMOTOLERANS MAYASININ ETİL ALKOL FERMANTASYONU ÜZERİNE ETKİSİ¹

The influence of Lachancea thermotolerans yeast on ethyl alcohol fermentation

Eren Kemal BALIKCI
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Hüseyin ERTEN
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada Emir üzümü sırasında *Lachancea thermotolerans* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayalarının etil alkol fermantasyonu üzerine etkisi saf, karışık ve ardışık kültürlerde incelenmiştir. Saf *Saccharomyces cerevisiae* ve *Lachancea thermotolerans* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nin karışık kültürleriyle gerçekleştirilen fermantasyonlarda yoğunluk daha hızlı azalmıştır.

Lachancea thermotolerans fermantasyon ortamında fazla sayıda kalmıştır. Ardışık kültürlerde *Saccharomyces cerevisiae* mayası ortama ilave edildikten sonra fermantasyon ortamına hakim olmuştur.

Örneklere etil alkol miktarı %10.76 ile 11.62 (h/h) arasında değişmiştir. En düşük uçur asit miktarı *Saccharomyces cerevisiae* saf kültür fermantasyonunda belirlenmiştir. Yüksek alkol ve esterlerin üretimi *Lachancea thermotolerans* ve 1. gün *Saccharomyces cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık kültür fermantasyonunda daha yüksektir.

Anahtar kelimeler: *Lachancea thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, karışık ve ardışık kültür, şarap, etil alkol fermantasyonu

ABSTRACT

In this study, the effect of pure, mixed and sequential cultures of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts was examined on ethyl alcohol fermentation. Specific gravity of fermentation performed by pure culture of *Saccharomyces cerevisiae* and mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* + *Lachancea thermotolerans* decreased faster, .. the others.

Lachancea thermotolerans survived in fermentation with high numbers and *Saccharomyces cerevisiae* dominated the fermentation after addition in sequential cultures.

The concentration of ethyl alcohol in samples varied between 10.76% and 11.62% by volume. The lowest level of volatile acidity was determined in pure culture fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. The production of higher alcohols and esters was higher in the sequential culture of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* inoculated first day of fermentation.

* Yüksek Lisans Tezi-Msc. Thesis

Keywords : *Lachancea thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, mixed and sequential cultures, ethanol fermentation, wine

Giriş

Türkiye, Dünya bağcı ülkeleri arasında bağ alanı bakımından 540,000 ha ile dördüncü ve yaş üzüm üretimi bakımından 3.92 milyon ton ile beşinci sırada yer almaktadır (Canbaş, 2010). Üretilen yaş üzümün önemli bir kısmı sofralık olarak ve kurutulularak değerlendirilirken geri kalan kısmı da pekmez, pestil, sirke vb. ürünlere işlenmektedir. Şaraba işlenen üzüm miktarı ise ancak % 2-3 kadardır (Cabaroğlu, 1995).

Şarapla ilgili ilk bilgilerin M.Ö. 3500 yıllarına kadar gittiği ve ilk kez Mezopotamya'da Sümerler'in şarap ürettiği belgelenmiştir. Daha sonra buradan Eski Mısır'a, oradan da Anadolu üzerinden Avrupa'ya geçtiği bildirilmektedir (Akman, 1977; Canbaş, 2005).

Şarap, bir kısmı veya tamamı ezilmiş taze üzümün veya üzüm şirasının etil alkol fermantasyonuna terk edilmesi sonucu elde edilen alkollü bir içkidir. Dünya bağcı ülkeleri arasında bağ alanı bakımından dördüncü ve yaş üzüm üretimi bakımından beşinci sırada yer alan ülkemizde yılda yaklaşık 3.92 milyon ton yaş üzüm üretilmektedir (Canbaş, 2010). Üretilen üzümün yaklaşık % 2-3'ü şaraba işlenmekte ve geriye kalan üzümler kurutulmakta, pekmez yapılmakta ve sofralık olarak değerlendirilmektedir.

Elde edilen şarabın kalitesi hammaddeye, başta fermantasyon olmak üzere işleme tekniğine ve fermantasyondan sonra şarabın dinlendirme ve olgunlaştırma koşullarına bağlıdır. Şarap fermantasyonu sırasında kaliteyi etkileyen önemli unsurlardan biri de mayadır.

Şarap yapımında alkol fermantasyonu ya spontan olarak ya da saf maya kullanılarak gerçekleştirilir. Spontan koşullarda, fermantasyon genellikle sivri mayalar (*Kloeckera* (*Kl.*) spp. / *Hanseniaspora* (*H'spora*) spp.) ve *Candida* (*C.*) spp. tarafından başlatılır ve alkol miktarı artıkça bu mayaların sayısı azalır. Fermantasyon etil alkole daha dayanıklı ve şeker çabuk parçalayan *Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae* tarafından tamamlanır (Fleet, 1993).

Lachancea (*L.*) *thermotolerans* (Eski adı *Kluyveromyces* (*K.*) *thermotolerans*) bazı şarap üretim bölgelerinde bulunan bir mayadır. *L. thermotolerans*, glukoz ve fruktozdan yüksek miktarda L-laktik asit ve bunun yanında düşük miktarlarda uçar asit oluşturur. Bu nedenle düşük asitli şaraplarda, asitliği artırmak için *L. thermotolerans* kullanılabilir (Kapsopoulou ve ark., 2005; Kapsopoulou ve ark., 2007).

Asitliğin şarapların tadı ve dayanıklılığı üzerine önemli etkisi vardır. Üzüm çeşitlerinde iklim koşullarına bağlı olarak özellikle sıcak bölgelerde asit miktarı düşük olabilir (Ribéreau-Gayon ve ark., 2000). Türk Gıda Kodeksine (2009) göre toplam asit miktarı, tartarik asit cinsinden, şaraplarda en az 3,5 g/l (46,6 me/l) olmalıdır. Bu nedenle, özellikle düşük asitli şaraplık üzümlerden elde edilecek şaraplarda *L. thermotolerans*'ın kullanılması ile şarabın asitlik miktarı artırılabilir.

Emir üzümü, ülkemizin en yoğun bağ bölgelerinden biri olan Nevşehir-Ürgüp çevresinde yaygın olarak yetiştirilen ve şaraplık olarak iyi özelliklere sahip bir çeşittir. Çoğunlukla Ürgüp bağlarında bulunur ve bu bağların %10-20'sini oluşturur (Canbaş ve ark., 1993). Taneleri yeşil kehrüba renginde, sivrimsi, kabuğu orta kalınlıkta ve içi etlidir ve ülkemizin kaliteli şarap veren çeşitleri arasında yer alır (Canbaş ve Cabaroğlu, 1992).

Bu çalışmada, pastörize Emir üzümü sırasında *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae*'nin saf, karışık ve ardışık kültürlerinin alkol fermantasyonu üzerine etkisi ele alınmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Mayalar

Denemelerde Ç.Ü.Z.F. Gıda Mühendisliği Bölümünde TÜBİTAK TOGTAĞ-1858 nolu projede Emir üzümünün fermantasyonu sırasında izole edilen *S. cerevisiae* (Nurgel ve ark. 2005) ve CBS – KNAW Fungal Biodiversity Centre'den temin edilen *L. thermotolerans* mayaları kullanılmıştır.

Hammadde

Denemelerde kullanılacak beyaz Emir üzümü Nevşehir-Ürgüp yöresinden sağlanmıştır.

Metot

Denemelerin Düzenlenmesi

Denemeler Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Pilot Şarap İşletmesi ve Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. İşletmeye taşınan üzüm, üzüm ezme değirmeninden geçirilip ve preste sıkılmıştır. Elde edilen şıra tortu alma işlemi uygulanmak üzere 15°C'lik bir mahzene alınmış ve 24 saat süre ile tortu alma işlemine tabi tutulmuştur.

Mayalar önce steril şırada çoğaltılmıştır. Bu amaçla 250 ml'lik erlenlere 100 ml şıra konulmuş ve ağzı pamukla kapatılmıştır. Erlenler 105°C'de 5 dakika steril edilmiş ve soğutulmuştur. Mayalar önce malt ekstrakt agar üzerinde çoğaltılarak tek koloni halinde elde edilmiş ve her bir maya için 2 koloni steril şıraya aşılansmış ve ayrı ayrı orbital karıştırıcıda, 160 d/d'da ve 25°C'de 2 gün süre ile inkübasyona terk edilmiştir. Bu süre sonunda mayalar, 4°C'de 5000 d/d'da 10 dakika santrifüj yardımıyla maya hücreleri ayrılmış ve metilen mavisi kullanılarak mikroskop altında sayım yapılmıştır.

Fermantasyonlar ağzı pamukla kapatılmış 1 litrelik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Erlenlere 800 ml üzüm şırası konulmuş ve 105°C'de 5 dakika steril edilmiştir. Daha sonra şarap üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bunlar;

- *S. cerevisiae*'nin saf kültür fermantasyonu
- *L. thermotolerans*'in saf kültür fermantasyonu
- *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae*'nin karışık kültür fermantasyonu
- *L. thermotolerans* + 1. gün *S. cerevisiae* ilavesi

- *L. thermotolerans* + 2. gün *S. cerevisiae* ilavesi
- *L. thermotolerans* + 3. gün *S. cerevisiae* ilavesi.

Saf kültür fermantasyonları için aşılama miktarı 5×10^6 hücre/ml'dir. Karışık ve ardışık kültür fermantasyonları için aşılama miktarı her maya türü için 5×10^6 hücre/ml'dir.

Fermantasyon gidişi yoğunluk ölçümü yapılarak izlenmiş ve yoğunluk değeri sabitlenince fermantasyona son verilmiştir. Daha sonra, şaraplar aktarılarak tortusundan ayrılmış ve 250 ml hacimli steril şişelere alınarak sıcaklığı 14°C olan bir ortamda dinlendirilmeye bırakılmıştır. Tüm denemeler 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Yoğunluk Tayini

Yoğunluk tayini, Mettler Toledo marka otomatik yoğunluk ölçer ile yapılmıştır.

Etil Alkol, Organik Asit ve Şeker Tayinleri

Şarap örnekleri önce 0.45 µm'lik filtreden, daha sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve Shimadzu CC-20AD model RID 10A refraktif indeks detektörlü HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Taşıyıcı faz olarak 5 mM'lik sülfirik asit çözeltisi kullanılmış ve akış hızı 0,6 ml/dak olarak ayarlanmıştır.

Örneklerdeki etil alkol konsantrasyonlarının belirlenmesinde dış standart yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda kalibrasyon çözeltileri hesaplanıp HPLC'de analiz edilmiş ve elde edilen verilere doğrusal regresyon analizi uygulanarak eğriyi tanımlayan eşitlik hesaplanmıştır. Bu eşitlik kullanılarak şaraplarda etil alkol miktarı hesaplanmıştır (Erten, 1998).

Organik asit (laktik, asetik, sitrik ve tartarik asitler) ve şekerlerin (glikoz, frukoz ve sükroz) tayini HPLC ile Erten (1998)' e göre yapılmıştır. Şarap örnekleri önce 0,45 µm'lik filtreden daha sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve Shimadzu LC-20AD model SPD-20A UV ve RID 10A refraktif indeks dedektörlü HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Taşıyıcı faz olarak 5 mM'lik sülfirik asit çözeltisi kullanılmıştır.

Örneklerdeki organik asit ve şeker konsantrasyonlarının belirlenmesinde dış standart yöntemi kullanılmıştır.

Kuru Madde Tayini

Kuru madde tayini A.O.A.C. (1990)'a göre yapılmıştır.

Toplam Asit Tayini

Toplam asit, vakum altında karbondioksiti alınan şaraba, belirteç olarak fenolftalein damlatılarak, N/10'luk NaOH ile titre etmek suretiyle belirlenmiştir. Sonuçlar tartarik asit cinsinden verilmiştir (Ough ve Amerine, 1988; Anon, 1990).

pH Tayini

pH doğrudan pH metre kullanılarak ölçülmüştür (Ough ve Amerine, 1988; Anon, 1990).

Uçar Asit Tayini

Uçar asit tayini, buharlı damıtma yöntemine göre yapılmış ve sonuçlar asetik asit cinsinden g/l olarak verilmiştir (Ough ve Amerine, Anon.,1990).

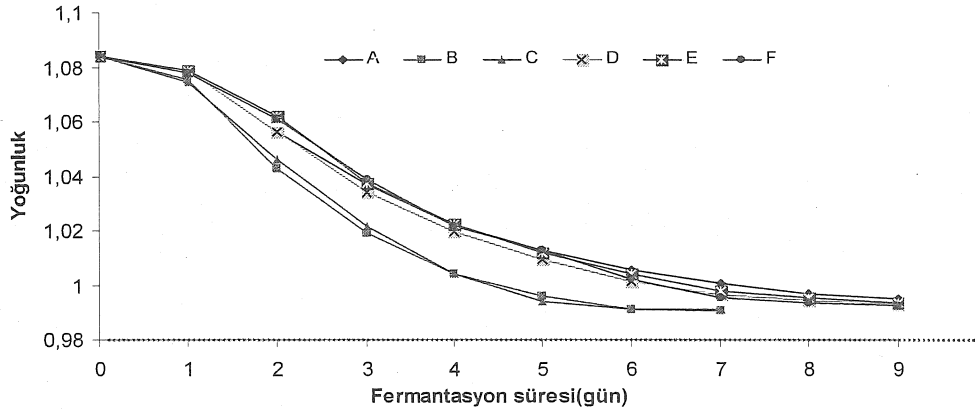
İstatistiksel Analizler

Şarapların bileşimi tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuş ve önemli bulunan farklılıklara Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Şarapların duyu analizi sonuçları tercih testinde Friedman testine göre değerlendirilmiştir (Amerine ve Roessler, 1976). Analizlerde Windows SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Alkol Fermantasyonunun Gidişi

S. cerevisiae ve *L. thermotolerans* mayalarının saf ve karışık kültür fermantasyonları ve *L. thermotolerans*'in sabit ve *S. cerevisiae*'nin farklı günlerde ilavesi ile gerçekleştirilen ardışık deneyler sırasında alkol fermantasyonunun gidişi yoğunluk ölçümleri yapılarak izlenmiştir. Yoğunluktaki değişime göre alkol fermantasyonunun gidişi Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Alkol Fermantasyonunun Gidişi

A: *L. thermotolerans*'in saf kültür fermantasyonu, B: *S. cerevisiae*'nin saf kültür fermantasyonu, C: *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae*'nin karışık kültür fermantasyonu, D: *L. thermotolerans* ve 1. gün *S. cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık fermantasyon, E: *L. thermotolerans* ve 2. gün *S. cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık fermantasyon, F: *L. thermotolerans* ve 3. gün *S. cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık fermantasyon.

Şekil 1'den de görüldüğü gibi başlangıçta yoğunluk değeri 1.084 olarak belirlenmiş ve alkol fermantasyonunun başlamasıyla azalmaya başlamıştır. *S. cerevisiae*'nin saf kültür ve *S. cerevisiae* + *L. thermotolerans* mayalarının karışık kültürünün kullanıldığı denemelerde yoğunluk değeri diğer denemelere göre daha hızlı azalmaya başlamış ve yedi gün süren fermantasyonlar sonunda sırasıyla 0.9908 ve 0.9910 olarak belirlenmiştir. Öte yandan, gerçekleştirilen diğer denemelerde alkol fermantasyonu dokuz gün sürmüş ve fermantasyon sonunda yoğunluk değerleri 0.9925 ile 0.9950 arasında bulunmuştur.

L. thermotolerans mayasının kullanımı sırasında alkol fermantasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Toro ve Vazquez (2002), *C. cantarellii* ve *S. cerevisiae*'nin saf ve karışık kültürleri ile 3. ve 9. güne kadar *C. cantarellii* ve daha sonra *S. cerevisiae* ilavesinin şarap fermantasyonu üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, *C. cantarellii*'nin saf kültürü ve 9. gün ortama *S. cerevisiae* ilave edilmesi ile fermantasyonun diğerlerine göre daha uzun sürdüğünü (21 gün) bildirmişlerdir. *S. cerevisiae*'nin saf kültürü 3. gün *C. cantarellii* ve daha sonra *S. cerevisiae* ilavesi ve karışık kültürlerle gerçekleştirilen fermantasyonların 336 saat sürdüğünü bildirmişlerdir.

Fermantasyon Sırasında Toplam Asitlik ve pH Değerindeki Değişim

Yürütülen fermantasyonlar sonunda titrasyon asitliği 5.00 g/L ile 6.29 g/L arasında belirlenmiştir. En yüksek değer *L. thermotolerans*'in saf kültür fermantasyonunun ve en düşük değer de *S. cerevisiae*'nin saf kültür fermantasyonunun gerçekleştirildiği denemelerde bulunmuştur.

Şarapların Bileşimi

Denemelerden elde edilen şarapların bileşimi Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Şarapların genel bileşimi

	A	B	C	D	E	F	Önem Der.
Yoğunluk	0,994 ^c	0,990 ^a	0,990 ^a	0,992 ^{bc}	0,993 ^{bc}	0,991 ^{ab}	.
Etil Alkol %(h/h)	10,91	11,50	11,62	11,34	10,76	11,44	ö.d.
Kuru madde (g/L)	21,35 ^d	13,90 ^a	15,50 ^{ab}	18,15 ^{bc}	18,80 ^{cd}	17,35 ^{bc}	.
Kül (g/L)	1,63	1,45	1,32	1,40	1,64	1,49	ö.d.
pH	3,37 ^b	3,28 ^a	3,28 ^a	3,36 ^b	3,36 ^b	3,36 ^b	..
Titrasyon asitliği (g/L)*	6,29 ^c	5,00 ^a	5,40 ^b	5,98 ^c	6,28 ^c	6,22 ^c	..
Uçar asit (g/L)**	0,67 ^b	0,53 ^a	0,58 ^a	0,70 ^b	0,73 ^b	0,69 ^b	.
Organik asitler							
Asetik asit (mg/L)	511,3	439,1	473,6	576,4	587,9	572,6	ö.d.
Laktik asit (mg/L)	780,2	688,1	772,4	721,3	732,0	656,6	ö.d.
Malik asit (mg/L)	1722	1632	1572	1661	1666	1449	ö.d.
Tartarik asit (mg/L)	1367,2	956,3	1466,4	703,5	1266,3	838,5	ö.d.
Sitrik asit (mg/L)	76,04 ^d	27,36 ^a	27,43 ^a	41,47 ^b	57,70 ^c	63,62 ^{cd}	..
Şekerler							
Glikoz (g/L)	2,294 ^b	0,756 ^a	1,159 ^a	0,812 ^a	1,446 ^{ab}	0,856 ^a	.
Fruktoz (g/L)	3,915	1,295	1,292	2,972	3,420	2,028	ö.d.
Sükroz (g/L)	1,572 ^b	0,518 ^a	0,794 ^a	0,556 ^a	0,990 ^{ab}	0,586 ^a	.

A: *L. thermotolerans*'ın saf kültür fermantasyonu, B: *S. cerevisiae*'nin saf kültür fermantasyonu, C: *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae*'nin karışık kültür fermantasyonu, D: *L. thermotolerans* ve 1. gün *S. cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık fermantasyon, E: *L. thermotolerans* ve 2. gün *S. cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık fermantasyon, F: *L. thermotolerans* ve 3. gün *S. cerevisiae* ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık fermantasyon, *:Tartarik asit cinsinden, **: Asetik asit cinsinden, .: p<0.05 önem düzeyinde önemlidir, ..: p<0.01 önem düzeyinde önemlidir, ö.d.: önemli değil.

Çizelge 1'den de görüldüğü gibi, şarapların genel bileşimleri incelendiğinde yoğunluk değerlerinin 0.990 ile 0.994 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Erten ve Tangüler (2010) *Williopsis saturnus*'un saf ve karışık kültürlerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, yoğunluk değerlerini 0.9929 ile 0.9953 arasında olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmada elde edilen veriler Erten ve Tangüler (2010) tarafından bildirilen değerlerle benzerlik göstermektedir.

Alkol, şarapların tat ve kokusu üzerine etki eden önemli maddelerden biridir (Akman ve Yazıcıoğlu, 1960).

Elde edilen şaraplarda alkol miktarları %10.76 (h/h) ile %11.62 (h/h) arasında bulunmuştur. Alkol miktarı en düşük değere %10.76 (h/h) ile *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 2. gün ilavesiyle elde edilen şarapta,

en yüksek değere ise %11.62 (h/h) ile *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayalarının aynı anda iave edildiği karışık kültür denemelerinde ulaşılmıştır.

Kapsopoulu ve ark. (2005, 2007) *K. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayalarının saf, karışık ve ardışık kültür denemelerini yürütmüşler ve etil alkol miktarını *K. thermotolerans* ve *S. cerevisiae*'nin saf kültür fermantasyonlarında sırasıyla %7.58 (h/h) ve %9.60 (h/h) ve karışık ve ardışık kültür fermantasyonlarında ise %9.11 (h/h) ile 9.38 (h/h) arasında bulmuşlardır.

Bu çalışmadan elde edilen değerler Kapsopoulu ve ark. (2005, 2007) tarafından bulunan değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

Elde edilen şaraplarda kuru madde miktarları 13.90 (g/L) ile 21.35 (g/L) arasında, kül miktarları ise 1.32 (g/L) ile 1.64 (g/L) arasında belirlenmiştir.

Şarapların pH değerleri 3.28 ile 3.37 arasında bulunmuştur. Titrasyon asitlik değerleri ise, tartarik asit cinsinden, 5.00 (g/L) ile 6.29 (g/L) arasında belirlenmiştir. Titrasyon asitliği tartarik asit cinsinden 5.00 (g/L) ile *S. cerevisiae*'nin saf kültürünün kullanıldığı denemede en düşük değere, 6.29 (g/L) ile *L. thermotolerans*'in saf kültürünün kullanıldığı denemede ise en yüksek değere ulaşmıştır.

Kapsopoulou ve ark. (2005, 2007) *K. thermotolerans*'in saf kültür fermantasyonunda daha yüksek toplam asitlik (16.90 g/L) bulmuşlardır.

Uçar asit, maya seçiminde önemli bir özelliktir (Henschke, 1995). Asetik asit, uçar asitin en önemli bileşenidir ve algılanma eşiği 0.7-1.1 g/L arasında olduğu bildirilmiştir (Henschke ve Jiranek, 1993).

Şarapların genel bileşimi incelendiğinde uçar asit miktarlarının 0.53 (g/L) ile 0.73 (g/L) arasında değiştiği belirlenmiştir. En düşük uçar asit miktarı *S. cerevisiae* mayasının saf kültür denemesinde belirlenmiştir. En yüksek değer ise *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 2. gün ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık kültür fermantasyonunda bulunmuştur.

Kapsopoulou ve ark. (2005, 2007) *K. thermotolerans* ilave edilen denemelerde daha az uçar asit elde edildiğini bildirmişlerdir.

Şarapların genel bileşimleri organik asitler yönünden incelendiğinde asetik asit miktarlarının 439.1 (mg/L) ile 587.9 (mg/L) arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek asetik asit miktarı *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 2. gün ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık kültür denemesinde ve en düşük değer ise *S. cerevisiae*'nin saf kültür denemesinde belirlenmiştir.

Denemeden elde edilen asetik asit miktarları Erten ve Tangüler (2010)'in elde ettiği değerlerle benzerlik göstermiş, ancak Clemente-Jimenez ve ark. (2005)'in belirttiği değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

Laktik asit miktarları ise 656.6 (mg/L) ile 780.2 (mg/L) arasında bulunmuştur. Laktik asit miktarı en yüksek değerine *L. thermotolerans* mayasının saf kültürünün kullanıldığı denemede ulaşılmışken, en düşük değere ise 656.6 (mg/L) ile *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 3. gün ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık kültür denemesinde belirlenmiştir.

Şaraplardaki malik asit miktarları 1449 (mg/L) ile 1722 (mg/L) arasında bulunmuştur. En düşük değer 5×10^6 hücre/ml *L. thermotolerans* ve 5×10^6 hücre/ml

S. cerevisiae mayasının 3. gün ilavesiyle gerçekleştirilen denemede belirlenmişken, en yüksek değer ise 5×10^6 hücre/ml *L. thermotolerans* mayasının tek başına kullanıldığı denemede belirlenmiştir.

Şaraplarda tartarik asit miktarları 703.5 (mg/L) ile 1466.4 (mg/L) arasında bulunmuştur. Tartarik asit miktarının en düşük değeri *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 1. gün ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık kültür denemesinde belirlenmişken, en yüksek değeri *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının aynı anda kullanıldığı karışık kültür denemesinde bulunmuştur.

Sitrik asit miktarları incelendiğinde ise bu değerlerin 27.36 (mg/L) ile 76.04 (mg/L) arasında değiştiği görülmüştür. En düşük değer *S. cerevisiae* mayasının saf kültürünün kullanıldığı denemede belirlenmişken, en yüksek değer ise *L. thermotolerans* mayasının saf kültürünün kullanıldığı denemede saptanmıştır.

Şarapların glikoz miktarı 0.756 g/L ile 2.294 g/L arasında belirlenmiştir. En düşük değer *S. cerevisiae* mayasının tek başına kullanıldığı denemede belirlenirken, en yüksek değer ise *L. thermotolerans* mayasının tek başına kullanıldığı saf kültür denemesinde saptanmıştır.

Fruktoz miktarları 2.028 ile 3.915 g/L arasında bulunmuştur. En düşük değer *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 3. gün ilavesiyle gerçekleştirilen ardışık kültür denemesinde belirlenirken, en yüksek değer ise *L. thermotolerans* mayasının saf kültür fermantasyonunda elde edilmiştir.

Sükroz miktarları incelendiğinde değerlerin 0.518 ile 1.572 g/L arasında değiştiği görülmüştür. En düşük değer 5×10^6 hücre/ml *S. cerevisiae* mayasının tek başına kullanıldığı denemede belirlenirken, en yüksek değer ise 5×10^6 hücre/ml *L. thermotolerans* mayasının tek başına kullanıldığı denemede belirlenmiştir.

Sonuç

Bu çalışmada, pastörize Emir üzümü sırasında *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae*'nin saf, karışık ve ardışık kültürlerinin alkol fermantasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Şarapların genel bileşimleri incelendiğinde yoğunluk değerlerinin 0.990 ile 0.994 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Elde edilen şaraplarda alkol miktarları %10.76(h/h) ile %11.62 (h/h) arasında bulunmuştur. Alkol miktarı en düşük değerine %10.76 (h/h) ile *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 2 gün ilavesiyle elde edilen şarapta, en yüksek değerine ise %11.62 (h/h) ile *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayalarının aynı anda kullanıldığı karışık kültür fermantasyonundan elde edilen şarapta ulaşmıştır.

Şarapların toplam asitlik değerleri, tartarik asit cinsinden, 5 g/L ile 6.29 g/L arasında değişmiştir. En düşük toplam asitlik *S. cerevisiae* mayasının saf kültür fermantasyonlarında elde edilmiştir. *L. thermotolerans* ile gerçekleştirilen karışık ve ardışık kültür fermantasyonlarında daha yüksek toplam asitlik belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının 1. gün ilavesiyle üretilen ardışık kültür ve *L. thermotolerans* ve *S. cerevisiae* mayasının aynı anda kullanıldığı karışık kültür denemelerinden elde edilen şaraplar

en çok beğenilen örnekler olmuştur. Öte yandan, konu üzerinde daha ayrıntılı çalışmalar yapılmalıdır.

Kaynaklar

- AKMAN, A. V. ve YAZICIOĞLU T., 1960. Fermantasyon Teknolojisi, Cilt 2, Şarap Kimyası ve Teknolojisi, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 160, Ankara.
- AKMAN, A., 1977. Modern Şarap Teknolojisine Kısa Bir Bakış. *Gıda*, 2(3):87-93.
- AMERINE, M.A., ROESSLER, E.B., 1976. Wines: Their Sensory Evaluation. Freeman W. H. and Company, San Francisco, pp:72-77.
- ANONYMOUS, 2009. Şarap Tebliği . Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, Resmi Gazete No. 27131 Tarih 4.2.2009
- A.O.A.C., 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Ed: K. Hekrich, Vol: 1 and Vol:2, 15th edn, Arlington, Virginia 22201 USA.
- BELY, M., STOECKLE, P., MASNEUF-POMARERE, I., DUBOURDIEU, D., 2008. Impact of Mixed *Torulaspota delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* Culture on High-Sugar Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122:312-320.
- CABAROĞLU, T., 1995. Nevşehir-Ürgüp Yöresinde Yetiştirilen Beyaz Emir Üzümünün ve Bu Üzümünden Elde Edilen Şarapların Aroma Maddeleri Üzerinde Araştırmalar. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 152s.
- CANBAS, A., ÜNAL, Ü., DERYAOĞLU, A., ERTEN, H., CABAROĞLU, T., 1993. Nevşehir-Ürgüp Yöresi Emir Üzümlerinin Şaraba İşlenmesi Üzerine Denemeler. Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 8(4):37-52.
- CANBAS, A., CABAROĞLU, T., 1992. Nevşehir-Ürgüp Yöresi Şaraplık Beyaz Emir Üzümü Üzerinde Teknolojik Bir Araştırma. *Gıda*, 17(2):109-116.
- CANBAŞ A. 2005. Şarap Teknolojisi, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ders Notları, 164 s. (Yayımlanmamış).
- CANBAŞ, A., Fermente Alkollü İçkiler, İç.: Gıda Biyoteknolojisi, Ed. N. Aran, Nobel Yayın dağıtım, Ankara (2010), ss: 279-308.
- CIANI, M., PICCIOTTI, G., 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnol. Letters* 17(11):1247-1250.
- CIANI, M., 1997, Role, Enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Rec Res Develop Microbiol.* 1:317-331.
- CIANI, M., BECO, L., COMINITI, F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108:239-245.
- CLEMENTE-JIMENEZ, J.M., MINGORANCE-CAZORLA, L., MARTINEZ-RODRÍGUEZ, S., LAS HERAS-VÁZQUEZ, F.J., RODRÍGUEZ-VICO, F., 2005. Influence of Sequential Yeast Mixtures on Wine Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 98:301-308.
- ERTEN, H., 1998. Metabolism of Fructose as an Electron Acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*, *Proc Biochem.* 33(7):735-739.

- ERTEN, H., TANGÜLER, H., 2010. Influence of *Williopsis saturnus* yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. Letters in App. Microbiol. 1-6.
- FLEET, G.H., 1993. The Microorganisms of Winemaking-Isolation, Enumeration and Identification. In: Wine Microbiology and Biotechnology, Ed. G.M. Fleet, Harwood, Chur, pp. 27-54.
- FLEET, G.H., HEARD, G.M., 1993. Yeasts Growth During Fermentation. In: Wine Microbiology and Biotechnology, Ed. G. M. Fleet, Harwood Academic Press. Chur, Switzerland. 507 p.
- FLEET, G. H., 2003. Yeast interaction and wine flavour. Int. J. Food Microbiol. 86:11-22.
- HEARD, G., FLEET, G. H., 1985. Growth of Natural Yeasts Flora During Fermentation of Inoculated Wines. App. Envir. Microbiol. 50:727-728.
- HENSCHKE, P.A., JIRANEK, V., 1993. Yeast Metabolism in Nitrogen Compounds. In Wine Microbiology&Biotechnology, ed. G.M. Fleet, Harwood Academic Press, Switzerland., pp:77-164.
- HENSCHKE, P.A., 1995. Evaluating Wine Yeasts for Improved Wine Quality, Proceedings. 7th Australian Wine Industry Technical Conference, pp:157-165.
- JOLLY, N. P., AUGUSTYN, O. P. H., PRETORIUS, I. S., 2003a. The Use of *Candida pulcherrima* in Combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Chenin blanc Wine. S. Afr. J. Enol. Vitic. 24:70-79.
- JOLLY, N. P., AUGUSTYN, O. P. H., PRETORIUS, I. S., 2003b. The Use of *Candida pulcherrima* in Combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Chenin blanc Wine. S. Afr. J. Enol. Vitic. 24:63-69.
- KABAHARNUP, Y., 2004. Immobilize *Saccharomyces Cerevisiae* mayasıyla şarap üretimi. Ç.Ü. Fen Bil. Enst., Yüksek Lisans Tezi, Adana, 47s.
- KAPSOPOULOU K., KAPAKLIS, A., SPYROPOULOS, H., 2005. Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *K. thermotolerans* isolated in Greece. World J. Microbiol. Biotechnol. 21:1599-1602.
- KAPSOPOULOU K., MOURTZINI, A., ANTHOULAS, M., NERANTZIS, E., 2007. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. World J. Microbiol Biotechnol. 23:735-739.
- MENDOZA, M. L., de NADRA M.C., BRU, E., FARIAS, E. M., 2009. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non- *Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:229-237.
- MORA, J., MULET, A., 1991. Effects of Some Treatments of Grape Juice on the Population and Growth of Population and Growth of Yeast Species During Fermentation. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 42(2):133-136.
- OUGH, C.S., AMERINE, M.A., 1988. Methods for Analysis of Musts and Wines, John Wiley and Sons, New York.

- PRETORIUS, I.S., T.J. van der WESTHUIZEN & O.P.H. AUGUSTYN. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. S. African J. Enol. Vitic. 20:61-74.
- RIBÉREAU-GAYON P, GLORIES Y, MAUJEAN A, DUBORDIE D. Handbook of Enology, Volume II, The chemistry of wine stabilization and treatments. John Wiley & Sons Ltd., Baffins Cane, Chichester, England, 404 p. 2000.
- SODEN, A., FRANCIS, I.L., OAKEY, H., HENSCHKE, P.A., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Aust. J. Grape and Wine Res. 6:21-30.
- TORO, M.E., VAZQUEZ, F., 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. World J. Microbiol Biotech. 18:347-354.

**FARKLI SERTLİK DEĞERLERİNDEKİ SULARDA METAL ETKİSİNDE KALAN
TATLISU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'un DOKULARINDA Na⁺-K⁺ATPaz
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ***

*Determination of Na⁺-K⁺ATPase Activity in Tissues of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* Exposed to Metals in Waters with Different Hardnesses*

Dilek SAĞLAM
Biyoloji Anabilim Dalı

Mustafa CANLI
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Tatlı su balığı *Oreochromis niloticus* farklı sertlik değerlerine sahip sularda, farklı sürelerde 1.0 µg/mL derişimindeki Cu²⁺ ve Cd²⁺'nin etkisine ayrı ayrı bırakılmıştır. 0, 1, 7 ve 14 gün deney süreleri sonunda solungaç, bağırsak ve böbrek dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktiviteleri ve metal birikimleri ölçülmüştür. Deney süresince Cu²⁺ etkisinde 7. günden itibaren balık ölümleri gözlenmiştir. Sert ve yumuşak sularda yaşayan balıklarda Na⁺,K⁺-ATPaz enzim aktivitesi en çok solungaç dokusunda etkilenirken, bunu sırasıyla böbrek ve bağırsak izlemiştir. Ayrıca enzim aktivitesi üzerinde Cd²⁺, Cu²⁺'ya göre daha etkili olmuştur. Deney süreleri sonunda dokularda metal birikimlerinin gözleendiği, özellikle de yumuşak sudaki balıkların bağırsak ve böbrek dokularında Cd²⁺ ve Cu²⁺ düzeyinde sert suya göre önemli bir artış olduğu kaydedilmiştir. Deneyler suyun kimyasal özelliklerinin metal toksisitesinde önemli olduğunu ve çevre araştırmalarında dikkate alınmasını gerektiğini vurgulamıştır.

Anahtar Kelimeler: Metal, *Oreochromis niloticus*, ATPaz, Su sertliği

ABSTRACT

Freshwater fish *Oreochromis niloticus* were individually exposed to 1.0 µg/mL concentrations of Cu²⁺ and Cd²⁺ at different exposure durations in waters with different hardnesses. At the end of the exposure periods (0, 1, 7 and 14 days) Na⁺/K⁺-ATPase activities and total metal levels in the gill, kidney and intestine were measured. Fish mortality was observed after Cu²⁺ exposure beginning from 7th day during the experiments. Na⁺/K⁺-ATPase activity was affected mostly in the gill exposed to soft and hard water and this was followed by kidney and intestine. In addition, Cd²⁺ was appeared to be more effective on Na⁺/K⁺-ATPase activity than Cu²⁺. At the end of the experimental protocol, total Cu²⁺ and Cd²⁺ levels accumulated significantly especially in the kidney and intestine following soft water exposures. Experiments showed that water chemistry is an important parameter in metal toxicity and thus should be taken into account in environmental monitoring studies.

Keywords: Metal, *Oreochromis niloticus*, ATPase, Hardness

* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

Giriş

Antropojenik aktivitenin yoğun olduğu kentsel alanlardan ve çeşitli endüstri kuruluşlarından ortama yayılan toksik maddeler, çevre kirliliğine neden olmaktadır. Meydana gelen bu kirliliğin önemli kaynaklarından birini de ağır metaller oluşturmaktadır (ATSDR, 2006). Ağır metallerden çinko, bakır, civa, kadmiyum, gümüş ve benzeri metaller kirleticilerin büyük bir bölümünden sorumlu olan önemli bir gruptur. Su ortamında kirleticilerin bulunması, birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri meydana getirdiğinden balıklar için çok önemli bir sorun oluşturmaktadır (Ariyoshi ve ark., 1990). Balığın biyolojik sistemlerinde Hg^{+2} ve Cd^{+2} gibi metallerin rolü bilinmezken, Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} gibi ağır metallerin balık metabolizması için gerekli olduğu bilinmektedir. Dokulardaki metal birikiminde, metallerin sudaki derişimleri ve etki süreleri ile tuzluluk, sıcaklık, pH ve sertlik gibi çevresel faktörler rol oynamaktadır (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003; Baykan ve ark., 2007; Atlı ve Canlı, 2008).

Birçok ağır metal sert suda daha az toksik hale gelir. Su sertliği sucul organizmalar üzerine ağır metallerin toksik etkilerini değiştirebilir (Kim ve ark, 2001). Genellikle tatlı sularda su sertliği arttıkça ağır metal toksisitesi organizmaların Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iyonları almak için yarışmasından dolayı azalır (Javid ve ark, 2007; Kim ve ark, 2001; Pyle ve ark, 2002). Doğal ortamda Ca^{+2} ve Mg^{+2} ağır metallerden daha fazla oranda bulunur. Ca^{+2} konsantrasyonu azaldıkça metal iyonların solungaç membranlarından pasif geçişi artar. Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının hücre membranlarından alımı dengenin sağlanmasına neden olur ve bu durum metal iyonlarına karşı geçirgenliği azaltır (Kim ve ark, 2001; Penttinen ve ark, 1998). Su sertliği bilindiği gibi balıklar üzerine ağır metallerin toksik etkilerini azaltmaktadır. Metal toksisitesi genellikle solungaç epitelyumlarındaki Ca^{+2} kanallarının yarışmalı olarak bloke olması yoluyla balıklarda aktif Ca^{+2} transferinin bozulması ile ilgilidir.

Bu çalışmada tatlı su balığı *O. niloticus*'un farklı dokularında ATPaz enzimlerinin metal stresine verdikleri tepkiler farklı sertlik değerlerine sahip sularda test edilecektir. Böylece su sertliği ve metal toksisitesinin birlikte etkileri incelenerek, farklı doğal sularda balıkların karşılaşabileceği fizyolojik durumlar hakkında bilgi edinilmeye çalışılacaktır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bu çalışmada kullanılan *O. niloticus*'lar Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuara getirildi. Balıklar 4 ay süre ile 40 x 40 x 100 cm boyutlarındaki 120 L çeşme suyu içeren akvaryumlar içerisinde 20 ± 1 °C sıcaklığında ve 12 saat aydınlanma periyodu uygulanan laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlandı. Deney sırasında akvaryumlardaki sert ve yumuşak su ortamının kalitesini belirlemek amacıyla çoklu ölçüm cihazıyla (Thermo Orionstar 5) ölçümler yapıldı. Sert su olarak çeşme suyu, yumuşak su olarak ise Pınar Çamlıca marka hazır su kullanıldı. Sert suyun bulunduğu akvaryumlardaki oksijen (5.3 ± 0.83 mg/L), pH (8.3 ± 0.08), toplam sertlik ($304.2 \pm$

21.2 µg CaCO₃/mL) ve iletkenlik (5.8±17.78 mS) değerleri ölçüldü. Yumuşak suyun bulunduğu akvaryumlardaki oksijen miktarı 5.5±0.55 mg/, pH 8.58±0.13, toplam sertlik 61.4± 3,5 µg CaCO₃/mL, iletkenlik ise 1.77±15.57 olarak ölçüldü.

Yöntem

Her bir deney grubu için 6 adet balık 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda kadmiyum (CdCl₂.H₂O) ve bakır (CuCl₂.2H₂O) 1.0 µg/mL derişimlerinin etkisine 1, 7 ve 14 gün olarak üç farklı zaman diliminde metal etkisinde bırakıldı. Deney sırasında akvaryum suları 2 günde bir taze hazırlanan stok çözeltilerden yapılan seyreltmelerle değiştirildi ve metallerin balık yemine yapışmasını önlemek amacıyla su değişiminden 1 saat kadar önce yem verildi. Deney koşulları Atli ve Canli, (2008) da belirtildiği gibi uygulanmıştır. Doku homojenatlarının hazırlanması, ATPaz enzimleri ölçümleri, metal ve protein analizleri ve istatistik analizler Atli ve Canli, (2008) da belirtildiği gibi yapılmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Kontrol Balıklarda ATPaz Aktivitesi

O. niloticus, sert su ve yumuşak suda Cu⁺² ve Cd⁺²'nin 1 µg/mL derişimlerinin etkisine 0, 1, 7 ve 14 gün süre ile bırakıldı ve bu süreler sonunda solungaç, bağırsak ve böbrek dokusunda Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen veriler, sert sulardaki kontrol balıklarında solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin 0, 1, 7 ve 14. günlerde sırasıyla 9,72±0,27, 8,45±1,13, 6,51±0,65 ve 4,28±0,65 µmol Pi/mg prot./sa. olduğunu göstermiştir. Bağırsak kontrol Na⁺,K⁺-ATPaz aktiviteleri aynı günler için sırasıyla 6,54±0,50, 7,55±0,92, 3,58±0,31 ve 5,18±0,65 µmol Pi/mg prot./sa. ve böbrek dokularındaki kontrol Na⁺,K⁺-ATPaz aktiviteleri ise aynı günler için sırasıyla 2,17±0,64, 3,82± 0,80, 4,50±0,85 ve 1,96 ±1,40 µmol Pi/mg prot./sa olarak ölçülmüştür.

Yumuşak sulardaki kontrol balıklarında solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin 0, 1, 7 ve 14. günlerde sırasıyla 6,01±1,13, 6,51±0,65 ve 3,88±0,65 µmol Pi/mg prot./sa. olduğu gözlenmiştir. Bağırsak kontrol Na⁺/K⁺-ATPaz aktiviteleri aynı günler için sırasıyla 7,45±0,92, 5,55±0,31 ve 3,88±0,65 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüş ve böbrek dokularındaki kontrol Na⁺/K⁺-ATPaz aktiviteleri ise aynı günler için sırasıyla 12,9±0,80, 2,94±0,85 ve 6,23±1,40 µmol Pi/mg prot./sa. olarak ölçülmüştür.

Metal Etkisinde Kalan Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

Sert su ortamında bulunan balıkların 1, 7 ve 14 gün süre ile 1 µg/mL Cu⁺² etkisi sonucunda enzim Na⁺-K⁺ATPaz aktivitelerinde kontrole göre önemli farklılıklar gözlenmiş (P<0.05) ve bu değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Buna göre solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi kontrole göre 7. gün sonunda anlamlı olarak en yüksek düzeyine % 130'luk artışla ulaşmıştır (8,16±0,12 µmol Pi/mg prot./sa.). Buna karşın, bağırsak Na,K-ATPaz aktivitesi ise kontrole göre 1. gün sonunda % 18 oranında bir azalış göstermiştir (6,66±0,08 µmol Pi/mg prot./sa.). Böbrek Na,K-

ATPaz aktivitesi ise 1. gün % 149 ($9,50 \pm 0,42$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$) ve 14. gün sonunda % 606 olarak önemli bir artış göstermiştir.

Yumuşak suda yaşayan Cu etkisindeki balıklar ise 7. gün sonunda ölmeye başlamışlardır. Bu nedenle yumuşak su ve Cu etkisindeki gruplarda 14. gün sonunda enzim aktivitesi ölçülememiştir. Solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi, kontrole göre 7. Günde anlamlı bir azalış gözlenmiş, sert suya göre ise 1. ($10,23 \pm 1,41$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$) ve 7. günlerde ($5,35 \pm 0,94$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$) istatikselsel olarak önemli bir azalış gözlenmiştir. Bağırsak Na,K-ATPaz aktivitesi ise 7. gün sonunda % 61 düzeyinde azalış kaydetmiştir ($3,58 \pm 0,18$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Bunun yanında böbrek Na,K-ATPaz aktivitesi ise tüm süreler için istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

Sert suda yaşayan balıkların $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktivitesi 1 $\mu\text{g/mL Cd'nin}$ 1, 7 ve 14 günlük etkisi sonunda önemli düzeyde farklılık göstermiştir ($P < 0,05$). Solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi tüm süreler için anlamlı artışlar göstermiş olup, 7. gün sonunda % 165 ile en yüksek düzeye ulaşmıştır ($9,41 \pm 0,68$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Bağırsak enzim aktivitesi kontrole göre anlamlı olmayan artışların yanında 1. gün sonunda % 44 ile önemli bir azalış göstermiştir ($4,60 \pm 0,61$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Böbrek Na,K-ATPaz aktivitesinde ise 1. ve 14. gün sonunda anlamlı artışlar olmakla birlikte en yüksek 14. Günde % 768'lik ($17,0 \pm 0,03$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$) önemli bir artış, 7 günlük etki sonunda ise % 65'lik ($1,59 \pm 0,13$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$) bir azalış gözlenmiştir.

Yumuşak suda yaşayan balıklarda Cd etkisi sonrasında Na,K-ATPaz aktivitesinde önemli değişiklikler görülmüştür. Solungaç Na,K-ATPaz aktivitesi kontrole göre 1. ve 14. gün sonunda anlamlı artışlar gözlenirken en fazla artışın % 85 oranında 14. günde olduğu ölçülmüştür ($7,18 \pm 0,14$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Ayrıca 7. Gün sonunda da hem kontrole hem de sert suya göre % 23'lük bir azalış gözlenmiştir ($5,02 \pm 0,41$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Bağırsak Na,K-ATPaz aktivitesi en yüksek hem kontrole hem de sert suya göre 7 günlük Cd etkisi sonrasında % 51'lük bir düşüş göstermiştir ($2,85 \pm 0,59$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Buna karşın, böbrek enzim aktivitesinde ise 7. gün sonunda kontrole göre % 82'lik bir artış kaydedilmiştir ($6,50 \pm 0,27$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Sert suya göre ise 1. ve 7. günler önemli düzeyde artış gösterirken, 14. Günde % 27 oranında bir azalış belirlenmiştir ($7,93 \pm 2,06$ $\mu\text{mol Pi/mg prot/sa.}$). Şekil 1 de hem bakır hemde kadmiyum deneyi sonuçları özetlenmiştir.

Doku	Gün	Cd-Sert Su	Cu-Sert Su	Cd-Yumuşak Su	Cu- Yumuşak Su
Solungaç	1	80 ↑*	21 ↑	78 ↓ *	48 ↓ #
	7	165 ↑*	130 ↑*	23 ↑* #	98 ↓* #
	14	143 ↑*	22 ↑	85 ↑*	CBY
Bağırsak	1	44 ↓*	18 ↓*	44 ↓*	19 ↓
	7	12 ↑	2 ↓	51 ↓* #	61 ↓*
	14	9 ↑	19 ↑	54 ↑	CBY
Böbrek	1	95 ↑*	149 ↑*	8 ↑ #	25 ↓
	7	65 ↓*	22 ↓	82 ↑* #	33 ↑
	14	768 ↑*	606 ↑*	20 ↑#	CBY

Şekil 1. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri.. (* ; kontrole göre anlamlı olan değerler, # ; sert sudaki Cd⁺² etkisine maruz kalmış balıklara göre anlamlı olan değerleri göstermektedir. CBY; canlı balık yok).

Dokularda Metal Birikimi

Yumuşak suda Cu⁺² etkisinde kalan balıklardaki solungaç dokusu için ise kontrole göre en önemli artışı 7. günde gösterirken, sert suya göre ise 1. önemli bir düzey gözlenmiştir. Bağırsak dokusu için hem kontrole hem de sert suya göre 1. günde en önemli birikimi göstermiştir. Böbrek dokusu için de kontrole göre en fazla birikim 7. günde olup, sert suya göre ise 1. günde önemli düzey göstermiştir. Cu⁺² etkisinde yumuşak sudaki balıklarda 7. Günden itibaren ölümler gözlenmiş olup 14 gün yaşayamamışlardır.

Sert suda yaşayan 1, 7 ve 14 gün süre ile Cu⁺² ve Cd⁺² etkisinde kalan *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokularında Cd⁺² düzeyleri artış gösterirken, böbrek dokusunda önemli bir değişiklik görülmemiştir. Kontrole göre en yüksek Cd⁺² düzeyi solungaç ve bağırsak dokusunda 14. gün sonunda gözlenmiştir.

Yumuşak suda ise hem kontrole hem de sert suya göre solungaç dokusu için en yüksek Cd⁺² düzeyi yine 14. günde olup önemli bir birikim göstermiştir. Bağırsak dokusu için ise hem kontrole hem de sert suya göre tüm günlerde anlamlı artışlar gösterirken en fazla birikim 14. günde gözlemiştir. Böbrek dokusunda da tüm günler için hem kontrole hem de sert suya göre birikimde önemli artışlar gözlenmiştir.

Metal	Süre	Solungaç	Bağırsak	Böbrek
SK-Cd ⁺²	0	2,54±0,12	6,57±1,3	10,8±0,32
	1	0,64±0,12	1,27±0,16	7,75±0,96*
	7	0,71±0,1	1,79±0,42	2,71±0,62*
	14	0,85±0,06 P>0.05	1,05±0,36 P>0.05	4,44±0* P<0.05
SK-Cu ⁺²	1	1,77±0,37	4,12±0,98	0±0
	7	2,05±0,37	3,94±1,15	0±0
	14	0,64±0,08* P<0.05	1,10±0,31* P<0.05	0±0 P>0.05
S-Cd ⁺²	1	3,69±0,28*	88,5±2,34*	7,10±1,15
	7	16,4±1,55*	201,9±12,64*	61,5±7,58*
	14	46,60±0* P<0.05	209,8±44,5* P<0.05	140,8±32,44* P<0.05
S-Cu ⁺²	1	4,08±0,26*	15,9±0,72*	0±0
	7	15,5±1,53*	59,9±7,14*	9,78±0,0*
	14	28,6±2,05* P<0.05	26,2±11,59* P<0.05	26,9±0,0* P<0.05
YK-Cd ⁺²	1	0,60±0,06	1,15±0,12	8,39±0,76
	7	0,94±0,19	1,34±0,13	4,1±1,27
	14	1,19±0,3 P>0.05	1,74±0,45 P>0.05	6,83±1,95 P>0.05
YK-Cu ⁺²	1	2,22±0,56	3,87±0,44	0±0
	7	1,39±0,47	3,62±0,08	0±0
	14	0,83±0,37 P>0.05	2,75±1,39 P>0.05	7,32±0 P>0.05
Y-Cd ⁺²	1	5,99±0,50*#	72,9±17,50*	10,1±1,58#
	7	12,3±1,36*#	311,5±15,76*#	78,8±2,32*#
	14	15,2±0*# P<0.05	567,3±29,4*# P<0.05	1668,6±664,7*# P<0.05
Y-Cu ⁺²	1	6,37±0,19* #	66,8±29,1*#	7,14±0,0*#
	7	13,4±1,50* P<0.05	58,9±7,48 P<0.05	11,7±3,48* P<0.0

Şekil 2. Sert su ve yumuşak sularda metal etkisinde kalan *O. niloticus* dokularındaki total metal düzeyleri (µg/g k.a.). Veriler Aritmetik ortalama±Standart hata olarak verilmiştir. (Kontrol grup, N=5; Metal etkisinde kalan grup, N=3).

Tartışma

.Bu araştırmada yumuşak su ortamında Cd^{+2} etkisinde herhangi bir balık ölümü gözlenmezken, Cu^{+2} etkisinde 7. gün sonunda balık ölümleri gözlenmiştir. Cu^{+2} 'nin balıklar üzerine olan toksik etkisi iyi bilinmekte olup, yapılan çalışmalar sonucunda osmoregülasyon mekanizmalarının çalışamaz duruma gelmesi balıkların ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (Heath, 1987; Atli ve Canli, 2003; Schjolden ve ark., 2007).

Yapılan birçok çalışma sonucuna göre metaller arasında en toksik özellikte olanının Ag^{+} ve Hg^{+} olduğu bunu Cu^{+2} ve Cd^{+2} 'nin takip ettiği gözlenmiştir (Heath, 1987).

Balıklarda ölümlere neden olan metal toksisitesi sadece metal türünden değil aynı zamanda balık türü, cinsiyet ve yaş gibi biyolojik faktörlerin yanında sıcaklık, su sertliği gibi ortamın fiziksel ve kimyasal koşullardan da etkilenebilmektedir.

Bir alabalık türü olan *Salmo gairdneri* 0.03 mg/L Cu^{+2} ve 0.1 mg/L Cd^{+2} etkisinde kısa sürede ölmüşlerdir (Viale ve Calamari, 1984).

Benzer şekilde bir sazan türü olan *Cyprinus carpio*, 7 μ M Cd^{+2} etkisinde 5. günde, 2.5 μ M Cd^{+2} etkisinde ise 8. günde ölmüştür (Smet ve ark., 2001).

Deney sonucunda elde edilen veriler, Na^{+} , K^{+} -ATPaz aktivitelerinin metal türü, etki süresi, doku tipi ve ortam suyunun sertlik düzeyine bağlı olarak önemli oranda değiştiğini göstermiştir.

Buna göre hem sert su hem de yumuşak su ortamında yaşayan balıklarda Cd^{+2} 'nin Na^{+} , K^{+} -ATPaz aktivitesine etkisinin Cu^{+2} 'ya oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Metallerin enzim aktivitesini en çok etkilediği dokuya dair bir karşılaştırma yapılacak olunursa sıralamanın solungaç>böbrek>bağırsak şeklinde olduğu görülmektedir.

Solungaç Na^{+} , K^{+} -ATPaz aktivitesi sert su ortamında metal etkilerinde artış, yumuşak su da ise hem artış hem de azalış göstermiştir. Bağırsak enzim aktivitesi ise her iki su ortamında azalış, böbrek dokusunda ise genel olarak artış göstermiştir.

Bununla birlikte metal etkilerinin yumuşak su ile sert su arasında enzim aktivitesine etkilerine bakıldığında; Cu^{+2} etkisinde Na^{+} , K^{+} -ATPaz aktivitesi çok değişiklik göstermemekle birlikte solungaç dokusunda azalmış, Cd^{+2} etkisinde ise solungaç ve bağırsak dokusunda azalırken böbrek dokusunda artmıştır.

Veriler, metal ile sert ve yumuşak su etkisinde dokulardaki metal ve iyon düzeylerinin de önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir.

Sert su ortamında en fazla Cd^{+2} olmak üzere her iki metal de birikim gösterirken, yumuşak su ortamında metallerin toksik etkilerinin daha fazla olmasına bağlı olarak daha da artmıştır.

Bu çalışmada solungaç dokusunun Na^{+} , K^{+} -ATPaz aktivitesi için oldukça duyarlı olduğu ve Cd^{+2} toksisitesinin bu dokuda özellikle de bu enzim aktivitesine etkili olduğu görülmektedir.

Bu durum Cd^{2+} toksisitesinin yüksek olduğunu ve Na^+,K^+ -ATPaz aktivitesinin de bu metale duyarlı olduğunu gösteren diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Li ve ark., 1998; De la Torre ve ark., 2000; Atlı ve Canlı, 2007). Na^+/K^+ -ATPaz, hücre içindeki 3 Na^+ iyonunu hücre dışına, 2 K^+ iyonunu hücre içine taşımak için ATP molekülünden açığa çıkan enerjiye gereksinim duymaktadır.

Hem deniz hem tatlı su teleostlarının özellikle solungaç, böbrek ve bağırsak gibi osmoregülatör organların özgü bir enzim olan Na^+/K^+ -ATPaz enzimi temelde hücre içi homeostazisin korunmasından sorumludur ve yapılan çalışmalar günümüzde artan çevresel kirlilik sonucu metallerin toksik etkilerinin değerlendirilmesinde Na,K -ATPaz'ın duyarlı biyolojik bir belirteçler olarak büyük öneme sahip olduğunu vurgulamaktadırlar (Watson ve Beamish, 1981; Canlı ve Stagg, 1996; Atlı ve Canlı, 2007).

Bu çalışmanın sonuçları, çevresel etki değerlendirilmeleri yapılırken, su sertliğinin ve balıkların Na^+-K^+ ATPaz'ların görev aldığı iyon regülasyonundaki değişikliklerin, sucul ortamlarda metal kirliliğinin tespitinde ve organizmalara olan etkilerinin belirlenmesinde, dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır.

Kaynaklar

- ARIYOSHI, T., SHIIBA, S., HASEGAWA, H., and ARIZONO, K., 1990. Profile of Metal-binding Proteins and Heme Oxygenase in Red Carp Treated with Heavy Metals, Pesticides and Surfactants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 643-649.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2003. Natural Occurrence of Metallothionein-like Proteins in the Liver of Fish *Oreochromis niloticus* and Effects of Cadmium, Lead, Copper, Zinc, and Iron Exposures on Their Profiles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 619-627.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2007. Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 145: 282-287.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2008. Characterization of Branchial Na,K -ATPase from Three Freshwater Fish Species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, and *Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Zoology*, 32:299-304
- ATSDR, 2006. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, CERCLA Priority List of Hazardous Substances. Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>. Accessed October, 05, 2006.
- BAYKAN, U., ATLI, G., and CANLI, M., 2007. The Effects of Temperature and Metal Exposures on the Profiles of Metallothionein-like in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 33-38.
- CANLI, M., ATLI, G., 2003. The Relationship between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. *Environmental Pollution*, 121: 129-136.

- CANLI, M., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of In Vivo Exposure to Cadmium, Copper, and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 31: 491-501.
- DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2000. Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus carpio* Exposed to Waterborne Cadmium. *Environmental Pollution*, 109: 277-282.
- HEATH, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC press, Florida, USA, 245s.
- JAVİD A, JAVED M, and ABDULLAH S.,(2007). Nickel bio-accumulation in the bodies of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhina mrigala* during 96-hr LC_{50} exposures. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9:139-142.
- KİM AD, GU MB, ALLEN HE, AND CHA D., (2001). Physicochemical factors affecting the sensitivity of *Ceriodaphnia bulba* to copper. *Environmental Monitoring and Assessment*, 70:105-106.
- LI, J., QUABIUS, E.S., WENSWLAAR BONGA, S.E., FLIK, G., and LOCK, R.A.C., 1998. Effects of Water-borne Copper on Branchial Chloride Cells and Na^+ - K^+ -ATPase Activities in Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquatic Toxicology*, 43: 1-11.
- PENTTİNEN S, KOSTAMO A, and KUKKONEN JVK., (1998). Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to Daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 2498-2503.
- PYLE GG., SWANSON SM., and LEHMKUHT DM., (2002). The influence of water hardness, pH, and suspended solids on nickel toxicity to larva fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Water , Air, and Soil Pollution*, 133:215-226.
- PRATAP, H.B., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1993. Effect of Ambient and Dietary Cadmium on Pavement Cells, Chloride Cells, and Na^+/K^+ -ATPase Activity in the Gills of the freshwater Telesot *Oreochromis mossambicus* at Normal and High Calcium Levels in the Ambient Water. *Aquatic Toxicology*, 26: 133-150.
- SCHJOLDEN, J., SORENSEN, J., NILSSON, G.E., and POLEO, A.B.S., 2007. The Toxicity of Copper to Crucian Carp (*Carassius carassius*) in Soft Water. *Science of the Total Environment*, 384: 239-251.
- SMET, H.D., WACHTER, B.D., LOBINSKI, R., and BLUST, R., 2001. Dynamics of (Cd, Zn)-metallothioneins in Gills, Liver and Kidney of Common Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. *Aquatic Toxicology*, 52 (3-4): 269-281.
- VIALE, G., and CALAMARI, D., 1984. Immune Response in Rainbow Trout *Salmo gairdneri* After Long-term Treatment with Low Levels of Cr, Cd and Cu. *Environmental Pollution*, 35: 247-257.

WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes In Vitro from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 68: 167-173.

COLD AKTİF ALKALİN AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN *BACILLUS* sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ VE ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU*

Isolation Of Cold Active Alkaline Amylase Producing Bacillus sp. Strains, Enzyme Production and Partial Characterization of Enzyme

Nihan ARABACI
Biyoloji Anabilim Dalı

Burhan ARIKAN
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Ankara ve Tuz Gölü'nden izole edilen alkalifilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi izolasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, optimum aktivite sıcaklığı, optimum pH, pH stabilitesi ve sıcaklık stabilitesi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bacillus sp. NCA35 amilaz enzimi optimum aktivitesini 25°C ve pH 8.0'de göstermiştir. Enzim 10-40°C arasında 30 dakikada aktivitesinin yaklaşık %96'sını korumuştur. Amilaz enzimi 25°C'de pH 8.0-12.0 aralığında 24 saat süreyle ortalama %53 stabil kalmıştır.

Bu sonuçlara NCA35 enziminin, soğukta ve asido-alkali aktif, termostabil ve pH-stabil özellik göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı NCA35 amilaz enzimi, deterjan, gıda ve içecek endüstrisi ile biyoremediasyon uygulamalarında kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Alkali, *Bacillus* sp., Soğukta Aktif Amilaz, Soğukta ve pH Stabil

ABSTRACT

In this study, the amylase enzyme from *Bacillus* sp. strains isolated from Ankara and Salt Lake was produced and characterized. For this purpose, optimum activity temperatures and pH values, temperature and pH stabilities analysis of enzyme was investigated.

The enzyme showed its optimum activity at 25°C and pH 8.0. The enzyme activity was retained around 96% of the original activity within 30 minutes between 10-40°C. Enzyme was also stable about %53 between pH 8.0-12.0 at 25°C for 24 hours.

According to these results, NCA35 enzyme shows cold and acido-alkaline active, thermostable and pH-stable properties. Therefore, NCA35 cold active amylase enzyme has the potentials to use in detergents, beverage and food industries and bioremediation applications.

Key Words: Alkaline, *Bacillus* sp., Cold Active Amylase, Cold and pH stabile

* Yüksek Lisans Tezi-MSc Thesis

Giriş

Enzimler, canlı hücrelerde bulunan, kimyasal dönüşümlerin meydana gelmesinde katalizör rolü oynayan kompleks organik moleküllerdir. Enzimlerin izolasyon esnasında kendi özel kimyasal dönüşümlerini gerçekleştirebilmeleri endüstride, gıda işlemede, biyoremediasyonda ve ilaçlarda giderek artan kullanımlarına yol açmıştır. Bu amaçlar için üretimleri genel olarak 'enzim teknolojisi' şeklinde isimlendirilmiştir. Ticari olarak üretilmiş enzimler modern toplumun karşı karşıya olduğu, gıda üretimi, enerji azlığı ve korunumu, çevrenin verimli hale getirilmesi, medikal uygulamalar gibi çok önemli problemlerin çözümüne katkıda bulunmaktadır (Smith, 2004).

Amilazlar, "glikozid hidrolaz" olarak da bilinen, endüstriyel olarak büyük öneme sahip enzimlerdir (Gupta ve ark, 2003). Nişastayı hidroliz eden enzimler temel olarak dört gruba ayrılmaktadır; 1. endoamilazlar, 2. ekzoamilazlar, 3. dallanmaları hidroliz eden enzimler, 4. transferazlar. Endüstriyel anlamda en önemli endoamilazlar, *Bacillus*'lardan izole edilen α -amilazlardır (Wim, 2006; Pandey ve ark, 2000; Kiran ve Chandra, 2008). Bu enzim ekmek, pasta, bira, peynir gibi gıda endüstrilerinde, nişastanın maltoza hidroliz edilmesinde, maltoz şuruplarının elde edilmesinde, otomatik çamaşır ve bulaşık makinelerinde kullanılan deterjanların üretiminde kullanılmaktadır (Igarashi ve ark, 1998). Amilazların endüstriyel öneminden dolayı, deterjan endüstrisi için alkalik amilaz gibi, endüstriyel uygulamalara uygun özellikte amilaz enzimi üreten yeni bakteri suşlarının izolasyonuna olan ilgi artmıştır (McTigue ve ark, 1995). Alkalifilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, özellikle aşırı asidik ve aşırı bazik reaksiyon şartlarına sahip uygulamalar için oldukça kullanışlıdır. Deterjan üretimi bu duruma örnek olarak gösterilebilir (Burg, 2003, Gerday ve ark, 2000; Hmidet, 2009).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin, bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte çoğunlukla mikroorganizmalardan izole edilmelerinin nedeni, mikrobiyal kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmalarıdır (Madigan ve Martinko, 2010).

Mikroorganizmalar optimum üreme sıcaklıklarına göre, psikrofiller (20°C altında), mezofiller (20-55°C) ve termofiller (55-80°C) ve hipertermofiller (80 °C üzerinde) olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Prokaryotlardan oluşan, ekstrem şartlarda yaşayabilen organizmalar ekstremofiller olarak adlandırılmaktadır. Ekstremofil organizmalar bu koşullar altında optimum şekilde üremek üzere evrimleşmişlerdir. Ekstremofil organizmalar, hipertermofiller, psikrofiller, alkalifiller, asidofiller, barofiller ve halofiller olarak sınıflandırılmaktadırlar (Gomes ve Steiner, 2004; Madigan ve Martinko, 2010).

Soğukta aktif olan amilaz, proteaz, lipaz gibi enzimler düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik aktivite gösterebildiklerinden dolayı moleküler biyoloji, medikal araştırmalar, endüstriyel gıdalar, besin teknolojileri, deterjanlar ve kozmetik gibi

uygulama alanlarında tercih edilmektedirler. (Margesin ve Feller, 2010; Jahandideh ve ark, 2007).

Bu çalışmada, soğukta aktif alkalın amilaz enzimi üreten *Bacillus* sp. bakterilerinin izolasyonu, enzimin üretimi, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Ankara ve Tuz Gölü'nden alınan çeşitli toprak örnekleri, soğukta aktif alkalofilik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu için pH'sı 9.0 olan N1 sıvı besiyerlerine inoküle edilip, 15°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 80°C'de 10 dakikalık sıcaklık uygulaması gerçekleştirilmiştir (Lennette ve ark, 1985). Bu uygulama sonrasında örnekler çalkalamalı inkübatörde 15°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında tek koloni elde etmek amacıyla pH'sı 9.0 olan N1 agar besiyerine yayma ekim yapıp, 15°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve *Bacillus* görünümüne sahip örnekler N1 agar besiyerine ekilip, 72 saat 15°C'de inkübe edilmişlerdir. Örnekler arasından en geniş aktivite zon çapı oluşturan NCA35 suşu enzim üretimi için kullanılmıştır.

Sıvı Kültürde Amilaz Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Katı besiyerinde farklı pH ve sıcaklıklarda en iyi üremeyi ve en iyi enzim aktivitesini gösteren NCA35 suşu, pH'sı 10.0 olan M9 nişasta sıvı besiyerinde 24 saat süreyle 15°C ve 240 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Örnek +4°C ve 7500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek organizmalar kültürden uzaklaştırılıp, süpernatant kısmı alınmıştır. Süpernatanta örnek hacminin %70'i oranında soğuk etanol eklenerek enzim karışımı -20°C'lik derin dondurucuda bir gece bekletilmiştir. Örnek +4°C ve 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş, çöken enzim toplanarak uygun hacimde 0.1M'lık fosfat tamponunda (pH 7.0) sıvılaştırılmıştır (Srivastava, 1987; Arıkan, 2008).

Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerinin saptanması için, Na-Fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) ve Boraks-NaOH (pH 11.0-13.0) tamponları kullanılmıştır. 0.5 mL enzim 0.5 mL substrat karıştırılarak 15°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda DNS yöntemi kullanılarak 550 nm UV visible spektrofotometrede standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlanarak relatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Gessesse ve Gashe, 1997; Burhan ve ark, 2003).

Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değerinin Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C'lik sıcaklık değerlerinde inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon işleminden sonra standart enzim

aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık derecesi enzimin optimum aktivite gösterdiği değer olup, 100 olarak kabul edilmiştir. Diğer sıcaklık derecelerinden elde edilen absorbans değerleri optimum absorbans değeriyle oranlanarak relatif enzim aktivitesi bulunmuştur (Srivastava, 1987; Burhan ve ark, 2003).

Enzimin Termal Stabilitesinin Saptanması

Termal stabilitenin belirlenmesi için enzim 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C'lerde 30 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon tamamlandıktan sonra, 0.5 mL enzim ve 0.5 mL optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde hazırlanmış substrat tamponu (pH 8.0) karıştırılarak optimum aktivite sıcaklığında (25°C) 60 dakika inkübasyona bırakılmış ve standart aktivite analizi yapılmıştır. Başlangıç aktivitesinin saptanması için ön işlemde geçmemiş enzim kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Başlangıç aktivitesi 100 kabul edilerek ön işlemde geçmiş enzime ait değerler buna göre oranlanıp kalan aktivite değeri hesaplanmıştır (Srivastava, 1987; Gessesse ve Gashe, 1997; Mehrotta ve ark, 1999; Burhan ve ark, 2003).

Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması

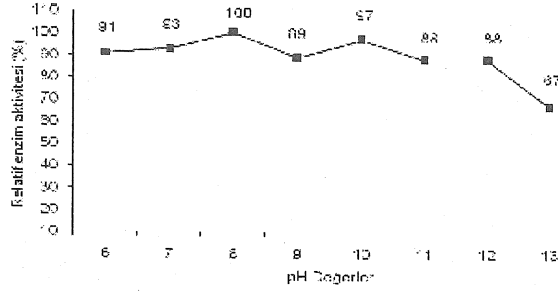
Enzimden 2 mL alınarak 11.000 dev/dak'da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra tüpteki pellet üzerine pH 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 değerlerindeki tampon çözeltilerden 2'şer mL eklenerek, enzim resüspanse edilmiştir. Karışım 25°C'de 24 saat ön inkübasyona bırakılmış ve standart aktivite analizi yapılmıştır. Başlangıç aktivitesinin saptanması için ön işlemde geçmemiş enzim kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Başlangıç değeri 100 kabul edilmiş ve farklı pH değerlerinden elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak kalan relatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Coral ve ark, 2002; Burhan ve ark, 2003).

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Ankara ve Tuz Gölü'nden izole edilen 50 suştan 5 örnek amilaz pozitif (%10) bulunmuştur. Bu suşlar arasında aktivite zonları dikkate alındığında, amilaz sentezleme yeteneği en iyi olan NCA35 suşu enzim üretimi ve karakterizasyonu için kullanılmıştır.

Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değeri

Bacillus sp. NCA35 suşuna ait amilaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için, çeşitli pH tamponları kullanılarak 15°C'de 60 dakika süreyle inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 1'de verilmiştir.

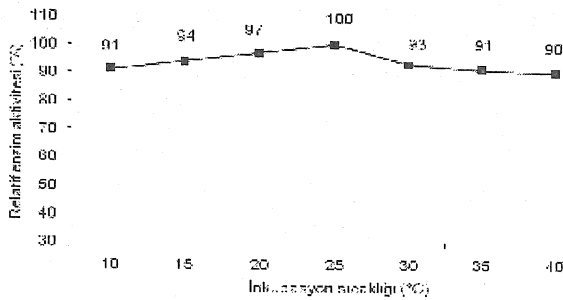


Şekil 1. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı

Bacillus sp. NCA35 suşuna ait amilaz enziminin optimum pH'sı 8.0 bulunmuştur. Bu sonuç, enzimin alkali özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. pH 6.0, 7.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 ve 13.0'deki aktivite değerleri, sırasıyla, %91, %93, %89, %97, %88, %88 ve %67 ölçülmüştür. Enzimin pH 6.0-13.0 aralığındaki ortalama aktivitesi %89'dur. Zhang ve Zeng (2007), *Nocardiopsis* sp. 7326'dan izole ettikleri alfa amilaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH'nın 8.0 olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin pH 7.0-9.0 aralığındaki değerlerde de %60'tan fazla aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Amoozegar ve ark (2003), *Halobacillus* sp. MA-2 suşundan elde ettikleri amilaz enziminin maksimum aktivitesini pH 7.5-8.5 aralığında gösterdiğini bulmuşlardır. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi bu özellikleri ile alkali özellikte olmakla birlikte, asido-alkali (yaklaşık %88.2) özellik göstermektedir.

Enzimin Aktivite Gösterdiği Optimum Sıcaklık Değeri

NCA35 enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 10-40°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 2'de gösterilmiştir.

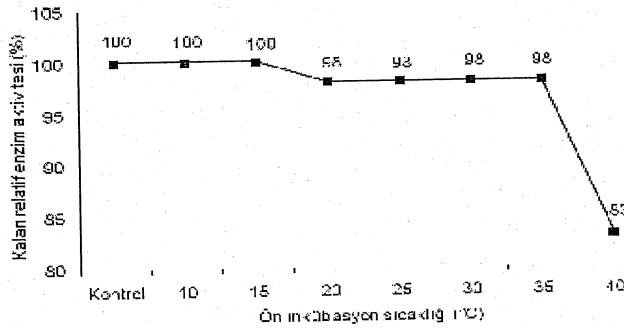


Şekil 2. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve aralığı

Enziminin, optimum aktive sıcaklık 25°C'dir. Enzim 10, 15, 20, 30, 35, 40°C'lerde, sırasıyla, %91, %94, %97, %93, %91 ve %90 relatif aktivite göstermiştir. Enzimin 10-40°C aralığındaki ortalama aktivitesi %94'tür. Bu sonuçlar, enzimin soğuk koşullarda daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir Groudieva ve ark (2004), Spitzbergen'in farklı bölgelerinden izole ettikleri suşlardan saflaştırdıkları amilaz enziminin maksimal aktivitesini 30°C'de gösterdiğini tespit etmişlerdir. Fan ve ark (2009), *Micrococcus antarcticus* suşunun soğukta aktivite gösteren amilaz enziminin optimum aktivitesini 30°C'de gösterdiğini, enzimin 10-15°C gibi düşük sıcaklıklarda da yüksek aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre enzim cold-adapted olarak adlandırılmıştır. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi düşük sıcaklıklarda literatürlerde belirtilen verilerden daha yüksek aktiviteye sahiptir.

Enzimin Termal Stabilitesi

Enzimin termal stabilite değerlerini belirlemek amacıyla enzim 60 dakika 10-40°C aralığında ön inkübasyona tabi tutulup, kalan aktivite değerleri bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar şekil 3'te gösterilmiştir.



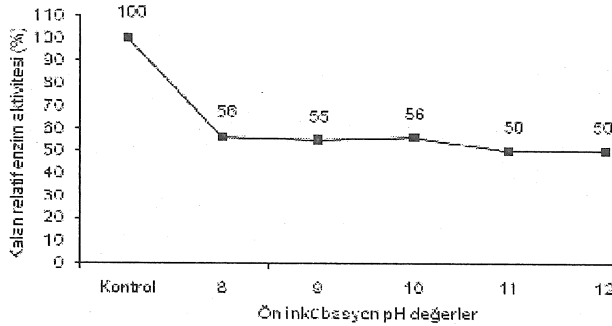
Şekil 3. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin termal stabilite sonuçları

Enzimin 25°C'de orijinal aktivitesinin %98'ini korumuştur. Bütün değerler dikkate alındığında 10, 15, 20, 30, 35 ve 40°C'lerde, sırasıyla, %100, %100, %98, %98, %98 ve %83 kalan enzim aktivitesi ölçülmüştür. Orijinal aktivitesini ortalama (10-35°C) %99 korunmaktadır. Aktivitenin 40°C'de aniden %83'e düşmesi cold aktif özellik için karakteristiktir (Zhang ve Zeng, 2007). Bernhardsdotter ve ark (2005), *Bacillus* sp. L1711 amilaz enzimini 21, 37 ve 55°C'lerde 1'er saat inkübe etmişlerdir. Enzim orijinal aktivitesini, sırasıyla, %90.7, %84.3 ve %1.6 korumuştur. Zhang ve Zeng (2007), *Nocardiopsis* sp. 7326'dan izole ettikleri amilaz enziminin 20-45°C aralığında orijinal aktivitesini %70 koruduğunu bildirmişlerdir. Enzim 15-25°C'de 60 dakikalık inkübasyondan sonra aktivitesinin büyük bir kısmını korurken, 35°C'de 40 dakika inkübe edildiğinde aktivitesinin yarısını kaybetmektedir. *Bacillus*

sp. NCA35 amilaz enzimi literatür bilgilerinden çok daha yüksek düzeyde soğuğa adapte özellik göstermektedir.

Enzimin pH Stabilitesi

Enzim, pH 8.0–12.0 aralığındaki farklı pH tampon sistemlerinde, 25°C'de 24 saat ön inkübasyona bırakılmış ve kalan relatif aktivite değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi pH stabilite sonuçları

Enzim pH 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0'de 24 saatlik ön inkübasyondan sonra aktivitesini, sırasıyla, %56, %55, %56, %50 ve %50 korumuştur. Bütün pH'larda ortalama %53 stabil kaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin 25°C'de 24 saat süreyle %50'nin üzerinde stabil kaldığını göstermektedir. Zhang ve Zeng'in (2007), *Nocardiopsis* sp. 7326 suşundan izole ettikleri amilaz enzimi, 4°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra pH 5.0-10.0 aralığında stabil kalmıştır. Enzim optimum pH 8.0'de aktivite gösterirken, pH 7.0-9.0 aralığında enzimin aktivitesinin %60'ından fazlası korunmuştur. Lu ve ark (2010), *Pseudoalteromonas arctica* GS230'dan izole ettikleri soğuğa adapte amilaz enziminin pH 7.0-8.5 aralığında yaklaşık %60 stabil olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, enzimin bu özellikleri nedeniyle gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda, izolasyonu gerçekleştirilen *Bacillus* sp. NCA35 bakterisinden izole edilen amilaz enziminin optimum aktivitesi 25°C olmakla birlikte, enzim 10-25°C aralığında sahip olduğu ortalama %99 aktiviteyle soğukta aktif enzim özelliğinde olduğunu göstermiştir. Enzimin optimum aktivitesi pH 8.0 olsa da, enzim pH 6.0-8.0 aralığında yaklaşık %92 aktiviteye sahiptir. Bu sonuçlara göre, enzim oldukça geniş bir pH aralığında yüksek düzeyde aktiviteye sahiptir. Enzimin 60 dakika ön inkübasyon işleminden sonra 10°C-35°C'ler arasında orijinal aktivitesini %99 oranında koruması, çok yüksek katalitik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enzimi, 24 saat oda sıcaklığında ve

farklı pH değerlerinde (pH 8.0-12.0) ön inkübasyona bırakıldığında ortalama %53 stabil kalmıştır

Bu özellikleri dikkate alındığında, *Bacillus* sp. NCA35 amilaz enziminin gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir. Bu alandaki uygulama ile düşük sıcaklıklarda yüksek katalitik aktivite göstermesi ve sıcaklığın düşmesine bağlı olarak aktivitenin artması özellikle yıkama sektöründe çok önemli oranlarda enerji tasarrufu sağlayacaktır. Ayrıca, yıkamanın düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi sonucu ısıl yıpranmanın önlenmesine bağlı olarak giysilerin kullanım ömrünün uzaması da söz konusudur.

Kaynaklar

- ARIKAN, B., 2008. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99:3071-3076.
- AMOOZEGAR, M.A., MALEKZADEH, F., MALIK, K.A., 2003. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. Strain MA-2. *J.of Microbiological Methods*, 52:353-359.
- BERNHARDSDOTTER, E.C.M.J., NG, J.D., GARRIOTT, O.K., PUSEY, M.L., 2005. Enzymatic properties of an alkaline chelator-resistant α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate L1711. *Process Biochemistry*, 40:2401-2408.
- BURG, B., 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6:213-218.
- BURHAN, A., NİSA, U., GÖKHAN, C., ÖMER, C., ASHABİL, A., OSMAN, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38:1397-1403.
- CORAL, G., ARIKAN, B., ÜNALDI, M.N., GÜVENMEZ KORKMAZ, H., 2002. Some properties of thermostable xylanase from an *Aspergillus niger* strain. *Ann. Microbiol.*, 52:299-306.
- FAN, H.X., LIU, Y., LIU, Z.P., 2009. Optimization of fermentation conditions for cold-adapted amylase production by *Micrococcus antarcticus* and its enzymatic properties. *Huan Jing Ke Xue/Environmental Science*, 30(8):2473-8.
- GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J.P., CLAVERIE, P., COLLINS, T., D'AMICO, S., DUMONT, J., GARSOUX, G., GEORLETTE, D., HOYOUX, A., LONHIENNE, T., MEUWIS, M.A., FELLER, G., 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Tibtech.*, Vol. 18, 103-107.
- GESSESSE, A., GASHE, B.A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. *Journal of Applied Microbiology*, 83:402-406.
- GOMES, J., STEINER, W., 2004. The biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4):223-235.

- GROUDIEVA, T., KAMBOUROVA, M., YUSEF, H., ROYTER, M., GROTE, R., TRINKS, H., ANTRANIKIAN, G., 2004. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles*, 8:475–488.
- GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38:1599-1616.
- HMIDET, N., ALI, N.E.H., HADDAR, A., KANOUN, S., ALYA, S.K., NASRI, M., 2009. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47:71-79.
- IGARASHI, K., HATADA, Y., HAGIHARA, H., SAEKI, K., TAKAIWA, M., EUMURA, T., ARA, K., OZAKI, K., KAWAI, S., KOBAYASHI, T., ITO, S., 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl. Environ. Microb.*, 64:3382-3389.
- JAHANDIDEH, S., ABDOLMALEKI, P., JAHANDIDEH, M., ASADABADI, E. B., 2007. Sequence and structural parameters enhancing adaptation of proteins to low temperatures. *Journal of Theoretical Biology*, 246:159-166.
- KIRAN, K.K., CHANDRA, T.S., 2008. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 77:1023-1031.
- LENNETE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER, J.W.Jr., SHADOMY, J.H., 1985. *Manual of Clinical Microbiology*, USA, Vol 4, 1149p.
- LU, M., WANG, S., FANG, Y., LI, H., LIU, S., LIU, H., 2010. Cloning, Expression, Purification, and Characterization of Cold-Adapted α -Amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230. *Protein J.*, 29:591–597.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., 2010. Çevresel Etmenlerin Mikrobiyal Üreme Üzerine Etkisi, (C. ÇÖKMÜŞ editör). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, 11. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, s.152-154.
- MARGESIN, R., FELLER, G., 2010. Biotechnological applications of psychrophiles. *Environmental Technology*, vol. 31, 835-844.
- MCTIGUE, M.A., KELLY, C.T., DOYLE, E.M., FOGARTY, W.M., 1995. The alkaline amylase of the alkaliphilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme Microb Technol*, 17:570-3.
- MEHROTRA, S., PANDEY, P.K., GAUR, R., DARMWAL, N.S., 1999. The purification of alkaline protease by a *Bacillus* species isolated. *Bioresource Technology*, 67:201-203.
- PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V.Y., SINGH, D., MOHAN, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:135–152.
- SMITH, J.E., 2004. *Biotechnology*. Cambridge University Press, New York, 271p.

- SRIVASTAVA, R.A.K., 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearotherophilus*. *Enzyme. Microb. Technol.*, 9:749-754.
- WIM, J.Q., 2006. Bacterial Enzymes (M. DWORKIN editor). *The Prokaryotes: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology*, Third Edition, Springer Science and Business Media Inc., New York, p.777-796.
- ZHANG, J.W., ZENG, R.Y., 2007. Purification and Characterization of a Cold-Adapted α -Amylase Produced by *Nocardiopsis* sp. 7326 Isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Marine Biotechnology*. Volume 10, 75-82.

KADMIYUM, ÇİNKO VE KADMIYUM+ÇİNKO ETKİSİNDE KALAN TATLI SU BALIĞI *Oreochromis niloticus*'da ATPaz TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Determination of the Response of ATPases in Freshwater Fish Oreochromis niloticus Exposed to Cadmium, Zinc and Cadmium+Zinc

Ali EROĞLU
Biyoloji Anabilim Dalı

Mustafa CANLI
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada 1 µg/mL derişimindeki Cd²⁺ ve Zn²⁺ in ayrı ayrı ve birlikte etkilerine farklı sürelerde (0, 7, 14, 21 ve 28 gün) maruz kalan tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*'un farklı dokularında ATPaz grubu enzimlerin (Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg²⁺-ATPaz ve Ca²⁺-ATPaz) tepkileri incelenmiştir. Deney süreleri sonunda balıklarda solungaç dokusunda Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg²⁺-ATPaz ve Ca²⁺-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca²⁺-ATPaz aktiviteleri ölçülmüştür. Balıklar deney koşullarında 28 gün yaşarken herhangi bir sağlık sorunu gözlenmemiştir. Metallerin ayrı ayrı ve birlikte etkisinde kalan balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktivitelerinde bazı önemli değişimler görülmüştür. Buna göre Na⁺/K⁺-ATPaz ve Ca²⁺-ATPaz aktiviteleri metal türü, metallerin ayrı ayrı ve birlikteki etkileri, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle azalış yönünde bir değişim gösterirken, Mg²⁺-ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Balıkların doku protein düzeylerinde ise genel olarak bir değişim görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Metal, Etkileşim, *Oreochromis niloticus*, ATPaz

ABSTRACT

In this study the responses of ATPases (Na⁺/K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase) in different tissues of a freshwater fish *Oreochromis niloticus* to 1 µg/ml concentration of Cd²⁺ and Zn²⁺ at different periods (0, 7, 14, 21 and 28 days) were investigated. At the end of experimental periods, the activities Na⁺/K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase in gill tissues and Ca²⁺-ATPase activity in muscle tissues were measured. While living under the experimental conditions, fish did not have any health problem. There were some significant alterations in ATPase activities in gill and muscle tissues of fish exposed to metals as single or combination. According to the results, there were general declining trends in Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities in regard to metal type, single or combined exposures, period of exposures, and tissues, though there was no significant alteration in Mg²⁺-ATPase activity. There was also no considerable change in tissue total protein levels of fish.

Keywords: Metal, Interaction, *Oreochromis niloticus*, ATPase

Giriş

Endüstri, ziraat ve madencilikte yaygın olarak kullanılan ve ekolojik tehlike oluşturan bakır, civa, kurşun, kadmiyum vb. ağır metalleri içeren çeşitli kimyasalların kullanımlarındaki artışın çevreyi kirlettiği bilinmektedir. Atmosferik depozisyon, atıklar, aerosol presipitasyonu ve yağmurların yıkayıcı etkisiyle ve diğer kaynaklar aracılığı ile çevreye yayılan ağır metallerin çoğu için son durak olması nedeniyle sucul ortamlar hassas olarak kontrol edilmesi gereken biyotoplardır. Yapılan birçok çalışma ile ağır metallerin yüksek derişimlerde sucul organizmalar için letal olduğu gösterilmiştir (Eisler ve Hennekey, 1977; Mance, 1987; Canlı, 1995). Sucul bir organizma için letal doz, hem metale hem de organizmaya bağlıdır. Metallerin organizmalara olan toksik etkilerinin kimyasal yapıları ile doğrudan ilişkili olduğu ve biyolojik olarak parçalanma özelliği göstermediklerinden ekosistemde uzun süre kalabildikleri bilinmektedir (Tagliari ve ark., 2004). Metallerin toksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar, metallerin birlikte yaptıkları etkilerden çok tek başına yaptıkları etkileri içermektedir (Lange ve ark., 2002). Metallerin birliktaki etkileri sinerjistik, antogonistik veya toplam etki şeklinde gözlenebilmektedir. Metal etkileşimleri metallerin emilim, dağılım, atılım ve aynı zamanda biyolojik fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Heath, 1987).

Adenozin trifosfat (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda iyon pompası olarak önemli rol oynayan membrana bağlı bir enzim grubudur. Bu enzimler yüksek elektronegatif özellik göstermeleri nedeniyle geçiş metallerine oldukça duyarlıdır (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1981; Thaker ve ark., 1996). Sucul organizmalar dikkate alındığında Na^+/K^+ -ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirlenmelere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir. Cu^{+2} , Ag^+ , Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} ; tatlı su ve deniz balıklarında Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonu ile bağlantılı osmoregülasyonda bozulmalara neden olan metaller arasındadır (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini ve ark., 2004, 2006). Mg^{+2} -ATPaz enzimi, solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü, solungaç geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2} 'nin taşınmasında ve oksidatif fosforilasyonda görev görmektedir (Parvez ve ark., 2006). Ca^{+2} -ATPaz ise sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olmakta ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2} 'nin uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücrel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Saxena ve ark., 2000).

Balıklar, sucul ekosistemlerin durumunu ve toksikolojik olarak gelişen patolojiyi değerlendirmede yaygın olarak kullanılan önemli bir biyoindikatördür. Nil tilapyası *O. niloticus*, elde edilişi, kültürü, laboratuvar çalışması ve toksikolojik araştırmalarda kirlenmelere verdiği tepkilerden dolayı iyi bir biyolojik modeldir (Almeida ve ark., 2002; Garcia-Santos ve ark., 2006). Bu çalışmada $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ derişimindeki Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'nin tek tek ve birliktaki etkileri sonunda *O. niloticus*'un solungaç Na^+/K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz ile kas Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin ve bu dokulardaki protein düzeylerinin farklı süreler (0, 7, 14, 21 ve 28 gün) sonunda verdiği tepkilerin ölçülmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Deneylerde kullanılmak üzere Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınan *O. niloticus*, sıcaklığın 20 ± 1 °C olduğu ve 12 saat aydınlatma periyodunun uygulandığı laboratuvar ortamında 40 x 40 x 100 cm ölçülerindeki 100 L çeşme suyu içeren akvaryumlarda yaklaşık 4 ay süreyle yeni koşullara adapte olmaya bırakıldı.

Yöntem

Balıklar 6 adet olacak şekilde 33x33x40 cm boyutlarındaki akvaryumlarda kadmiyum ve çinkonun tek tek ve birlikte etkilerine maruz bırakılmıştır. Balıkların ortalama boy ($13,9 \pm 0,79$ cm) ve ağırlıklarının ($42,4 \pm 6,96$ g) farklı deney grupları arasında istatistiksel olarak bir ayırım göstermediği gözlemlendi ($P > 0,05$). Deney koşulları Atli ve Canli, (2008) da belirtildiği gibi uygulanmıştır. Doku homojenatlarının hazırlanması, ATPaz enzimleri ölçümleri, metal ve protein analizleri ve istatistik analizler Atli ve Canli, (2008) da belirtildiği gibi yapılmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Kontrol Balıklarda ATPaz Aktivitesi

Kontrol balıklarda enzim aktiviteleri şekil 1. de verilmiştir. Buna göre ATPaz aktivitelerinde bazı önemli değişimler görülmüştür.

Gün	SOLUNGAÇ			
	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	Mg ²⁺ -ATPaz	Ca ²⁺ -ATPaz	KAS Ca ²⁺ -ATPaz
0	8,31±0,83	13,0±0,55	2,29±0,26	1,83±0,53
7	6,01±0,28	13,3±0,83	0,71±0,04	1,80±0,42
14	4,66±0,59	9,17±0,30	2,21±0,44	2,32±0,50
21	9,29±0,43	14,5±0,81	0,99±0,28	2,47±0,78
28	17,0±1,58	4,17±0,18	1,35±0,18	3,25±0,50

Şekil 1. Kontrol *O. niloticus* da ATPaz aktivitelerinin farklı günlerdeki değerleri. Değerler $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$ olarak verilmiştir.

Metal Etkisinde Kalan Balıklarda ATPaz Aktiviteleri

Metallerin tek tek ve birlikte etkilerine 28 gün süre ile bırakılan balıklarda ATPaz aktivitelerinde meydana gelen değişimlerin % değerleri ve bunların istatistiksel sonuçları şekil 2 de verilmiştir.

Solungaç Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin, 1 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre 7 ve 28. günlerde zamana bağlı bir azalış gösterdiği ve en düşük düzeyini % 35 değeri ile 7. gün sonunda gösterdiği gözlemlenmiştir ($3,93 \pm 0,31$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$). Mg²⁺-ATPaz aktivitesi ise Cd²⁺ etkisinde denenen tüm süreler için kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P > 0,05$). Ca²⁺-ATPaz aktivitesi denenen tüm günlerde bir azalış göstermiş ve en düşük düzeyi %

70 ile 21. ($0,29 \pm 0,09 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ve 28. ($0,40 \pm 0,05 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) gün sonunda gözlenmiştir ($P < 0,05$). Kas dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi günlere bağlı olarak artış veya azalış göstermiştir. En fazla azalış % 25 ($2,45 \pm 0,45 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ile 28. günde gözlemlenmiştir ($P > 0,05$).

Metal	Gün	SOLUNGAÇ			KAS
		Na^+/K^+ -ATPaz	Mg^{+2} -ATPaz	Ca^{+2} -ATPaz	Ca^{+2} -ATPaz
Zn^{+2}	7	8 ↑	13 ↑	51 ↑*	21 ↑
	14	17 ↓	11 ↓	72 ↓*	3 ↑
	21	22 ↓	4 ↑	70 ↓*	74 ↑
	28	22 ↓*	30 ↓	39 ↓	82 ↓*
Cd^{+2}	7	35 ↓*	3 ↑	24 ↓	9 ↓
	14	28 ↓	8 ↑	60 ↓*	5 ↑
	21	57 ↑*	11 ↓	70 ↓*	89 ↑
	28	16 ↓*	7 ↓	70 ↓*	25 ↓
$\text{Cd}^{+2} + \text{Zn}^{+2}$	7	52 ↑*	2 ↓	59 ↓	73 ↑
	14	19 ↑	6 ↓	66 ↓*	48 ↓
	21	13 ↑	4 ↑	69 ↓*	2 ↓
	28	18 ↑*	23 ↓	100 ↓*	78 ↓*

Şekil 2. *Oreochromis niloticus* dokularında metal etkilerinde ATPaz aktivitelerinin kontrole göre yüzde (%) değişimleri. * : Anlamlı istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P < 0,05$).

Solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin, $1 \mu\text{g Zn}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre zamana bağlı bir azalış gösterdiği ve en düşük düzeyini % 22 azalış ile 28. gün sonunda gösterdiği gözlenmiştir ($13,2 \pm 0,44 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$). Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise Zn^{+2} etkisinde denenen tüm süreler için kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P > 0,05$).

Solungaç dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi genel olarak bir azalış göstermiş ve en düşük düzeyini 14. gün sonunda % 72 oranında göstermiştir ($0,62 \pm 0,15 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$). Kas dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi kısa süreli etkilerde % 3 ile % 21 oranında artış göstermiş ($P > 0,05$) fakat 28. gün sonunda kontrole göre % 82 azalış göstermiştir ($0,58 \pm 0,18 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$).

Solungaç Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin, $1 \mu\text{g Cd}^{+2} + \text{Zn}^{+2}/\text{mL}$ 'nin farklı sürelerdeki etkisinde kontrole göre zamana bağlı bir artış gösterdiği ve en yüksek düzeyini % 52 değeri ile 7. gün sonunda gösterdiği gözlenmiştir ($9,14 \pm 0,84 \mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P < 0,05$). Mg^{+2} -ATPaz aktivitesi ise $\text{Cd}^{+2} + \text{Zn}^{+2}$ etkisinde denenen

tüm süreler için kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir ($P>0,05$). Solungaç dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi denenen tüm günlerde bir azalış göstermiş ve en düşük düzeyini 28. gün sonunda % 100 oranında göstermiştir (0 ± 0 $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$). Kas dokusunda, Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi genel olarak azalış göstermiş ve 28. gün sonunda % 78 ile en düşük düzeyde ölçülmüştür ($0,7\pm 0,24$ $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$) ($P<0,05$).

Tartışma

Bu çalışmada 28 gün metallerin tek tek ve birlikte etkileri sonucu balıklarda mortalite gözlenmemsi, seçilen dozların subletal düzeyde olduğunu göstermektedir. Analizler sonucu elde edilen verilere göre, en fazla Ca^{+2} -ATPaz'ın ardından da Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinin etkilendiği buna karşın, Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinin ise değişmediği gözlenmiştir. Enzim aktivitelerinin bazı durumlar dışında genel olarak azalış göstermesine karşın özellikle Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesi metallerin tek tek etkilerinde azalış, birlikteki etkisinde ise artış göstermiştir. Dokular arasında Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi bakımından bir karşılaştırma yapıldığında ise solungaç dokusunun kas dokusuna göre daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Dokulardaki toplam protein düzeyi kısa süreli metal etkilerinde değişiklik gösterirken genel olarak kontrole göre herhangi bir ayırım göstermemiştir. ATPaz aktivitelerinin metal türü, etki süresi ve doku tipine göre değişiklik gösterdiği sonucu diğer çalışmalarla da uygunluk göstermektedir (Ay ve ark., 1999; Morgan ve ark., 2004; Silvestre ve ark., 2005; Atlı ve Canlı, 2007). Çeşitli çevresel kirleticilere cevap olarak ATPaz aktivitesinde değişikliklerin olduğu ve enzimin metallerin etkisine duyarlı olduğu gösterilmiştir (Watson ve Benson, 1987; Canlı ve Stagg, 1996; Kamunde ve Wood, 2003). Bu sonuçlar ışığında enzim aktivitesinde gerçekleşen azalışlar, osmoregülasyon sistemindeki bozulmalardan veya hücre zarında oluşan yapısal hasarın sonucunda zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte metallerin tek ve iki değerlikli iyonlarla yarışması veya enzim yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak konformasyonel değişikliklere neden olması da aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Enzim aktivitesindeki artışlar ise bozulan düzenin tekrar onarılabilmesi için telafi mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. De La Torre ve ark. (2007), balıkta Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin de kirleticilerin yoğun etkilerine, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına doğrudan kirleticilerin etkisi veya dolaylı olarak endokrin sistemin hasar görmesine bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır. Garcia-Santos ve ark., (2006) *O. niloticus*'un 96 saatlik akut Cd^{+2} (5, 15 ve 25 $\mu\text{g/mL}$) etkisi sonrasında solungaç Na^{+}/K^{+} -ATPaz aktivitesinde herhangi bir değişim gözlemlenmişlerdir. Plazma Na^{+} düzeyinde de anlamlı bir değişiklik olmamasına karşın plazma Ca^{+2} düzeyinin etki süresi sonunda derişime bağlı bir azalış gösterdiği belirtilmiştir.

Balıklar, homeostasiyi sağlamak için gerekli iyonları solungaçlar aracılığıyla sudan almaktadırlar. Solungaçlarda aktif iyon alımı ve organlardan iyon akışından

sorumlu klorit hücrelerinin metal etkilerinde hasar gördüğü ve bu hücrelerde elektrolit kaybının gözlemlendiği gösterilmiştir (Lauren ve McDonald, 1987; Tkatcheva ve ark., 2004; Garcia-Santos ve ark., 2006). Birincil toksik etkiler arasında sayılan ve Cd^{+2} 'nin Ca^{+2} iyonu ile yüksek ilgili Ca^{+2} bağlayan bölgeler için yarışarak Ca^{+2} alımını bloke ettiği ve böylece klorit hücrelerin bazolateral membranında bulunan Ca^{+2} pompasını inhibe ettiği bilinmektedir (Pelgrom ve ark., 1997). Bununla ilgili olarak yapılan analizler sonucunda tüm dokularda Cd^{+2} etkisinde gözlenen Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonu ve Ca^{+2} iyon akışının bozulması bu durumu desteklemektedir. Metallerin dokulardaki elektrolit düzeylerine olan etkilerindeki farklılıkların balık ve metal türlerine, metal derişimleri ve suyun kimyasına bağlı olabileceği belirtilmiştir (Morgan ve ark., 1997; Rogers ve ark., 2003; Garcia-Santos ve ark., 2006). Zn^{+2} , Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları arasındaki kimyasal benzerlik, Mg^{+2} -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz'ın aktif bölgelerindeki bağlanma yerleri için Zn^{+2} , Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonları arasında yarışa neden olmaktadır. Hogstrand ve ark. (1996), Zn^{+2} 'nin solungaç klorit hücre membranını Ca^{+2} ile benzer yolla geçtiğini belirtirken, 100 pM serbest Zn^{+2} varlığında alabalık solungaç Ca^{+2} -ATPaz enziminin bloke olduğunu belirtmişlerdir.

Metal birikiminde solungaçların birincil hedef ve metal alımının gerçekleştiği organ olması ve nefrotoksik etkilerin gözlemlendiği böbreklerin ise metaller için seçici olmaları nedeniyle önem kazandığı bilinmektedir (Heath, 1987; Canlı ve Atlı, 2003). Chhaya ve ark. (1997), ağır metal ve çeşitli organik bileşikler içeren yüksek pH'lı endüstriyel atıkların çeşitli derişimlerinin 2-6 günlük etkilerinde *Periophthalmus dipses*'in farklı dokularında ATPaz aktiviteleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Buna göre karaciğer, beyin ve kas Na^{+}/K^{+} -ATPaz, Total-ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerinde etkiye bağlı genel bir inhibisyon gözlenmesine karşın, en düşük aktivitenin en uzun etki süresinde gözlemlendiği ve çoğunlukla bazı yüksek derişim etkilerinde enzim aktivitelerinde artış görüldüğünü belirtmişlerdir. Ca^{+2} -ATPaz inhibisyonuna neden olan metaller toksisitesine göre sıralandığında, sıralama $Hg^{+2} > Pb^{+2} > Cu^{+2} > Cd^{+2} > Zn^{+2}$ şeklindedir (Viarengo ve ark., 1993).

Canlı dokularda metal koordinasyon bölgeleri hiçbir zaman tek bir metale özgün olmadığından metabolizma için gerekli metalleri bağlayan metal bölgeleri aynı zamanda benzer iyonik çap ve koordinasyon geometrisi gösteren başka metalleri de bağlayabilmektedir. Bunlar arasında yüksek toksik etkiye sahip ve metabolizma için gerekli olmayan Cd^{+2} ile buna karşın metabolizma için gerekli ve yüksek düzeylerinde toksik özellik gösterebilen Zn^{+2} , kimyasal olarak benzer olduklarından benzer taşınma yollarını kullanmaktadır. Cd^{+2} ve Zn^{+2} arasındaki yarışın çoğunlukla -SH içeren bölgeler için gerçekleştiği söylenebilir. Bazı araştırmacılar çeşitli su organizmalarında Zn^{+2} varlığının Cd^{+2} alımını baskıladığını bildirmişlerdir (Sunda ve Huntsman, 2000; Chen ve ark., 2008). Metal etkileşimleri, balık ve diğer sucul organizmaların dokularında metal birikimini etkileyebilmektedir ve genel olarak metal birikimleri metal etkileşimlerinden çok tek başına olan etkilerinde daha yüksek olmaktadır (Mance, 1987). Brzoska ve Moniuszko-Jakoniuk (2001), Cd^{+2} ve Zn^{+2} etkileşiminin Cd^{+2} toksisitesinde oldukça önemli olduğunu vurgulamışlar ve Cd^{+2} 'nin toksik etkisinin Zn^{+2} eksikliğinde önemli

düzeyde arttığını belirtmişlerdir. Eroğlu ve ark. (2005), *O. niloticus* karaciğerinde Zn^{+2} birikiminin Cd^{+2} - Zn^{+2} etkileşiminde en yüksek düzeyde olmasını, Cd^{+2} toksisitesini önlemek adına gerçekleştiğini kaydetmişlerdir. Pelgrom ve ark. (1995) da metal karışımlarının etkisinde organizmalarda karmaşık etkileşim mekanizmalarının devrede olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada da metal etkileşimlerinin dokulardaki metal birikimlerine olan etkilerine benzer sonuçlar özellikle Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz aktivitelerinde de gözlenmiştir.

Tatlı su kirliliği ile ilgili geleneksel çalışmaların yanında, doku ve vücut sıvılarındaki kimyasal maddeler, toksik metabolitler, enzim aktiviteleri veya diğer biyokimyasal değişiklerin analizleri gibi toksik maddelerin biyolojik sistemleri nasıl etkilediğini gösteren belirteçlerin kullanımı daha da önem kazanmaktadır. Molekül derişimlerinin ölçümü ile saptanan değışiklikler olarak tanımlanan toksisite belirteçleri, kirlenici etkisi ile risk değerlendirme mekanizmalarını birbirine bağlamaktadır (De La Torre ve ark., 2007). Elde edilen sonuçlar enzim aktiviteleri ile diğer ölçülen parametrelerin metallere verdikleri tepkilerinin, derişim ve süresi ile metal tipi ve doku tipine bağlı olarak değıştiğini göstermiştir. Buna göre enzim aktivitesindeki azalışlar, metal birikimi, iyon ve protein düzeyindeki değışiklikler, enzim yapısındaki -SH gruplarına metallerin bağlanması, dokudaki yapısal farklılıklar ile bunlara bağlı gelişen iyon ve osmoregülatör sistem bozukluklarından kaynaklanabilmektedir. Buna benzer şekilde daha önce enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarda görev alan parametrelerle yapılan çalışmalar bu durumu desteklemektedir (Atli ve ark., 2006; Atli ve Canli, 2008). Bu çalışma ile metallerle ATPaz'lar arasında, enzim aktivitesinde değışikliklere yol açan kimyasal mekanizmanın anlaşılmasının önemi vurgulanmaktadır. Aynı zamanda toksik maddelerin saptanmasında ATPaz aktivite değışimini temel alan analizler basit, kullanışlı ve hızlı ölçüm sağladığından ekotoksikoloji çalışmalarında uyarıcı sistem olarak kullanılabilir.

Kaynaklar

- ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., and NOVELLI, E.L.B., 2002. The Use of The Oxidative Stres Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to In Vivo Cadmium Contamination. Environment International, 27: 673-679.
- ATLI, G., ALPTEKİN, Ö., TÜKEL, S., and CANLI, M., 2006. Response of Catalase Activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} in Five Tissues of Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 143: 218-224.
- ATLI, G., and CANLI, M., 2007. Enzymatic Responses to Metal Exposures in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 145: 282-287.

- ATLI, G., and CANLI, M., 2008. Responses of Metallothionein and Reduced Glutathione in a Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* Following Metal Exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25: 33–38.
- AY, Ö., KALAY, M., TAMER, L., and CANLI, M., 1999. Copper and Lead Accumulation in Tissues of a Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na,K-ATPase Activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 160-168.
- BIANCHINI, A., and WOOD, C.M., 2003. Mechanism of Acute Silver Toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (6): 1361–1367.
- BIANCHINI, A., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2004. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. *International Congress Series*, 1275: 189– 194.
- BIANCHINI, A., MARTINS, S.E.G., and BARCAROLLI, I.F., 2006. Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. *International Congress Series*, 1275: 189– 194.
- BRZOSKA, M., M., and MONIUSZKO-JAGONIUK, J., 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology* 39 (2001) 967-980.
- CANLI, M., 1995. Effects of Mercury, Chromium and Nickel on Some Blood Parameters in the Carp *Cyprinus carpio*. *Turkish Journal of Zoology*, 19: 305-311.
- CANLI, M., and STAGG, R.M., 1996. The Effects of In Vivo Exposure to Cadmium, Copper, and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 31: 491–501.
- CANLI, M., and ATLI, G., 2003. The Relationships Between Heavy Metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) Levels and the Size of Six Mediterranean Fish Species. *Environmental Pollution*, 121: 129–136.
- CHEN, D., QIAN, P.-Y., and WANG, W.-XIONG., 2008. Biokinetics of Cadmium and Zinc in Marine Bacterium: Influences of Metal Interaction and Pre-Exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 27, No. 8, pp. 1794-1801.
- CHHAYA, J., THAKER, J., MITTAL, R., NUZHAT, S., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1997. Influence of Textile Dyeing and Printing Industry Effluent on ATPases in Liver, Brain, and Muscle of Mudskipper, *Periophthalmus dipes*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 793-800.
- DE LA TORRE, F.R., SALIBIAN, A., and FERRARI, L., 2007. Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. *Chemosphere*, 68: 1582-1590.

- EISLER, R., and HENNEKEY, R.J., 1977. Acute Toxicities of Cd²⁺, Cr⁺⁶, Hg²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ to Estuarine Macrofauna. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 6: 315-323.
- EROĞLU, K., ATLI, G., and CANLI, M., 2005. Effects of Metal (Cd, Cu, Zn) Interactions on the Profiles of Metallothionein-like Proteins in the Nile Fish *Oreochromis niloticus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75: 390-399.
- GARCIA-SANTOS, S., FONTAINHAS-FERNANDES, A., and WILSON, J.M., 2006. Cadmium Tolerance in the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Following Acute Exposure: Assessment of Some Ionoregulatory Parameters. Environment Toxicology, 21: 33-46.
- HEATH, A.G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC press, Florida, USA, 245s.
- HOGSTRAND, C., and WOOD, C.M., 1996. The Physiology and Toxicology of Zinc in Fish (E.W. TAYLOR editör). The Toxicity of Silver to Marine Fish, University Press, Cambridge, s.61-84.
- KAMUNDE, C., and WOOD, C.M., 2003. The Influence of Ration Size on Copper Homeostasis during Sublethal Dietary Copper Exposure in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology, 62: 235-254.
- LANGE, A., AUSSEIL, O., and SEGNER, H., 2002. Alterations of Tissue Glutathione Levels and Metallothionein Mrna in Rainbow Trout during Single and Combined Exposure to Cadmium and Zinc. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 131: 231-243.
- LAUREN, D.J., and McDONALD, D.G., 1987. Acclimation to Copper by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*: Biochemistry. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 44: 105-111.
- MANCE, G., 1987. Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environment. Elsevier, London, 363s.
- MORGAN, I.J., HENRY, R.P., and WOOD, C. M., 1997. The Mechanism of Acute Silver, Nitrate Toxicity in Freshwater Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) is Inhibition of Gill Na⁺ and Cl⁻ Transport. Aquatic Toxicology, 38: 145-163.
- MORGAN, T.M., GROSELL, M., PLAYLE, R.C., and WOOD, C.M., 2004. The Time Course of Silver Accumulation in Rainbow Trout during Static Exposure to Silver Nitrate: Physiological Regulation or an Artifact of the Exposure Conditions? Aquatic Toxicology, 66: 55-72.
- PARVEZ, S., SAYEED, I., and RAISUDDIN, S., 2006. Decreased Gill ATPase Activities in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to a Diluted Paper Mill Effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, 65: 62-66.
- PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1995. Effects of Combined Waterborne Cd and Cu Exposures on Ionic Compositions and Plasma Cortisol in Tilapia,

- Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2: 227-235.
- PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., and WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. Calcium Fluxes in Juvenile Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Exposed to Sublethal Waterborne Cd, Cu or Mixtures of These Metals. Environmental Toxicology and Chemistry, 16: 770-774.
- RIEDEL, B., and CHRISTENSEN, G., 1979. Effect of Selected Water Toxicants and Other Chemicals upon Adenosine Triphosphatase Activity *In Vitro*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 23: 365-368.
- ROGERS, J.T., RICHARDS, J.G., and WOOD, C.M., 2003. Ionoregulatory Disruption as the Acute Toxic Mechanism for Lead in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 64: 215-234.
- SAXENA, T.B., ZACHARIASSEN, K.E., and JORGENSEN, L., 2000. Effects of Ethoxyquin on the Blood Composition of Turbot, *Scophthalmus maximus* L. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 127: 1-9.
- SILVESTRE, F., TRAUSSCH, G., and DEVOS, P., 2005. Hyper-osmoregulatory Capacity of the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Exposed to Cadmium; Acclimation during Chronic Exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 140: 29-37.
- SUNDA, W. G., and HUNTSMAN, S. A., 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. The American Society of Limnology and Oceanography, 45 (7): 1501-1516.
- TAGLIARI, K.C., VARGAS, V.M.F., ZIMIANI, K., and CECCHINI, R., 2004. Oxidative Stress Damage in the Liver of Fish and Rats Receiving an Intraperitoneal Injection of Hexavalent Chromium as Evaluated by Chemiluminescence. Environmental Toxicology and Pharmacology, 17: 149-157.
- THAKER, J., CHHAYA, J., NUZHAT, S., MITTAL, R., MANSURI, A.P., and KUNDU, R., 1996. Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dips*. Toxicology 112: 237-244.
- TKATCHEVA, V., HYVARINEN, H., KUKKONEN, J., RYZHKOV, L.P., and HOLOPAINEN, J., 2004. Toxic Effects of Mining Effluents on Fish Gills in a Subarctic Lake System in NW Russia. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 278-289.
- WATSON, T.A., and BEAMISH, F.W.H., 1981. The Effects of Zinc on Branchial Adenosine Triphosphatase Enzymes *In Vitro* from Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 68: 167-173.
- WATSON, C.F., and BENSON, W.H., 1987. Comparative Activity of Gill ATPase in Three Freshwater Teleosts Exposed to Cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 14: 252-259.

METAL ÇÖKTÜRÜLMÜŞ KARBON NANOTÜP ELEKTROTTA METANOL OKSİDASYONUNUN ARAŞTIRILMASI*

*Investigation of methanol oxidation on metal-deposited carbon nanotubes electrode**

Murat FARSAK
Kimya Anabilim Dalı

Gülfeza KARDAŞ
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET¹

Bu çalışmada, metanolün elektrooksidasyonu ve bu oksidasyon reaksiyonlarına ait olan bazı kinetik parametreler 1 M KOH içeren ortamda araştırılmıştır. Çalışma elektrotları olarak Grafit (Grafit), karbon nanotüp (CNT) enjekte edilmiş grafit (Grafit/CNT), nikel biriktirilmiş grafit (Grafit/Ni) ve nikel biriktirilmiş karbon nanotüp modifiyeli grafit (Grafit/CNT-Ni) elektrotlar kullanılmıştır. Kinetik parametrelerin belirlenmesinde dönüşümlü voltametri tekniğinden yararlanılmıştır. Deneyler farklı sıcaklık, tarama hızı ve metanol derişiminde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, Grafit/CNT-Ni'in, metanol oksidasyonunda Grafit/CNT ve Grafit/Ni elektrota göre etkin olduğu belirlenmiştir. Grafit/CNT-Ni elektrotta aktivasyon enerjisi 33,81 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Metanol, Elektrooksidasyon, Nikel biriktirme, Karbon Nanotüp, Dönüşümlü Voltametri

ABSTRACT

In this study, the oxidation of methanol and some kinetic parameters related to the reactions of this oxidation were investigated in a medium of 1 M KOH. Graphite (Grafit), carbon nanotubes-enjeckted graphite (Grafit/CNT), nickel-coated graphite (Grafit/Ni) and carbon nanotubes modified graphite with nickel-coated electrodes (Grafit/CNT-Ni) were utilized as the working electrodes. Cyclic Voltammetry Technique was made use of for the identification of the kinetic parameters. The experiments were carried out under various heat, scanning rate and methanol oxidation. As a result of the study, of the electrodes used, Grafit /CNT-Ni was determined to more active than Grafit/CNT and Grafit/Ni electrodes. Activation energy of Grafit /CNT-Ni electrode was calculated as 33,81 kJ/mol in the methanol oxidation.

Key Words: Methanol, Electrooxidation, Nickel Deposition, Carbon Nanotubes, Cyclic Voltammetry

Giriş

Metanol elektrooksidasyonu düşük emisyon ve yüksek etkinlikle doğrudan metanollü yakıt hücrelerindeki(DMFCs) büyük potansiyel gösteren uygulamalarından dolayı son 20 yıldır dikkat çekmektedir (Chetty ve ark, 2009,

* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

Arico ve ark, 2001). Bununla birlikte bu yakıt hücrelerinin ticarileşmesinde metanol oksidasyon reaksiyonunun kinetik kısıtlamalarından dolayı önemli zorluklarla karşılaşmaktadır. Asidik ortamda metanol elektrooksidasyonu için platin zeminli elektrokatalizörler son yıllarda yaygın olarak çalışılıyor (Patra ve ark, 2009) fakat yüksek maliyet ve sınırlı kaynaklar ticari aşamada platin kullanımına izin vermiyor (Bensebaa ve ark, 2005). Buna ek olarak platin zeminli elektrokatalizörler genellikle reaksiyon ara ürünleri tarafından özellikle asidik ortamda CO gibi bir ara ürün tarafından zehirlenip, deaktive oluyorlar (Li ve ark, 2007). Eğer DMFCs çalışmasında asidik bir elektrot yerine alkali bir elektrot kullanılırsa kinetik önemli ölçüde gelişiyor ve platinsiz elektrokatalizörler kullanılabilir (Zhao ve ark, 2010).

Yakıt hücrelerinde kullanımından dolayı, özellikle elektrokatalitik soy metallerde alkollerin elektrooksidasyonu üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Doğrudan metanol yakıt hücresi (DMFC), enerji üretimi için ümit verici sistemlerde²n birisi olarak düşünülmektedir. Metanol bir yakıt hücresi olarak, nispeten yüksek aktiviteye sahiptir, ayrıca sıvı halden enerjiye dönüştürülmesi ve transferinin kolay olması avantaj sağlamaktadır (Rahim ve ark, 2004).

Metanol oksidasyon reaksiyonunun ilerleyişi, alkali ortamda asidik ortamdaki daha hızlı olduğu için tercih edilir. Alkali çözeltinin dezavantajı, alkali ortamda CO₂ ile ilerleyen karbonatlanmadır (Tripkovic ve ark, 2004). Platin, küçük organik bileşiklerin doğrudan oksidasyonunda önemli bir elektrokatalizör olarak kabul edilmektedir (Rahim ve ark, 2004). Ancak, Pt elektrotta, metanol adsorpsiyonunun potansiyel bölgelerinde adsorplanan oksijen içeren türlerin yetersizliğinden dolayı, asidik çözeltilerde metanol oksidasyonu için aktivite düşüktür. Bununla beraber platin, düşük potansiyellerde OH⁻ anyonları ve metanolün dengeli adsorpsiyonu nedeniyle alkali çözeltide tercih edilir (Tripkovic ve ark, 2004).

Elektrokatalitik oksidasyon reaksiyonunu artırmak için, Pt elektrotlarda pek çok değişiklikler denenmiştir. Bu değişiklikler, yeni daldırma teknikleriyle alaşımlama veya düşük potansiyeller altında çeşitli metallerin kullanılmasıdır. Doğrudan metanol yakıt hücrelerinde(DMFC) ticarete engellenen problemlerden birisi, metanolün doğrudan elektrooksidasyonu ile birleşen yüksek aşırı potansiyeldir. Elektrokataliz platin temelinde dayanması, geliştirilmesi ve iyi aktivite sergilemesine rağmen, yüksek fiyatı çoğu zaman engelleyici bir faktör olmuştur. Son zamanlarda platinden daha ucuz maddelerin seçilmesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Daha ucuz maddelerin kullanımı için yapılan çeşitli denemelere örnek olarak; Co, Pd, Fe, Ni ve TiO₂ ve Fe, Co, Ni, Mo, Mn, Cr, Cu ve Hg'nin oksitleri ile kaplanmış Ti veya onların kombinasyonları; Sb-Sn, Co-Mn, Ni-Si, Ni-Cr-Mo, ve Fe-Cr verilmiştir (Rahim ve ark, 2004).

Redoks katalizi tarafından organik maddelerin heterojen katalitik oksidasyonu üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Redoks reaksiyonlarının bu tür için, nikel iyi bir katalizör olarak bulunmuştur. Nikel, organik sentez ve su elektrolizinde hem anodik hem de katodik reaksiyonlar için elektrokatalizör olarak tercih edilmiştir. Sistemde bulunan oksitler, oksidasyon reaksiyonu için iyi bir

elektron transfer aracı olarak davranır. Bu oksitler elektrooksidasyonda nikelin redoks çiftini içerir. Bu, nikel hidroksitin $Ni(OH)_2$, nikel oksihidroksite $NiOOH$ dönüşümüdür (Rahim ve ark, 2004).

Materyal ve Metod

Materyal

Elektrokimyasal Analiz Cihazı (CHI 608, Seri No: R0635) : elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmıştır.

Nikel Kaplama Banyosu: Grafit elektrodun yüzeyinin nikel ile kaplanmasında kullanılmıştır. Banyo bileşimi ; % 30 $NiSO_4 \cdot 7H_2O$, % 1 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, % 1, 25 H_3BO_3 , pH = 5.6 – 6.2 dir.

Elektrotlar:

Çalışma Elektrodu : Nikel kaplanmış grafit elektrot (Grafit/Ni) ve nikel kaplanmış karbon nanotüp modifiyeli grafit elektrot (Grafit/CNT-Ni).

Referans Elektrot : Gümüş- gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl, Cl⁻)

Karşı Elektrot : Platin levha

Grafit elektrot: 0,283 cm² yüzey alanına sahip grafit çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.

Platin elektrot: 2 cm² yüzey alana sahip parlak platin karşı elektrot olarak kullanılmıştır.

Grafit/Ni: 0,283 cm² yüzey alana sahip grafit nikel banyosunda 80 saniye süreyle nikel kaplanarak hazırlanmıştır.

Grafit/CNT-Ni: 0,283 cm² yüzey alana sahip grafit üzerine karbon nanotüp katıldıktan sonra 80 saniye süreyle nikel kaplanarak hazırlanmıştır.

Metod

Elektrotların Hazırlanması

Çalışma elektrotları silindirik grafit çubuklardan 5 cm uzunluğunda kesilmiş taban alanlarından bir tanesi delinerek iletkenliği sağlamak için bakır tel geçirilmiştir. Sadece diğer taban alanı (çalışma yüzeyi) açıkta kalacak şekilde polyester blok ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan grafit elektrotun yüzey alanı 0,283 cm² dir. Çalışma elektrotlarının yüzeyleri bütün ölçümlerden önce mekanik parlaticıda 1200 tanecik boyutlu zımpara kağıtları ile parlatıldıktan sonra sırasıyla saf su ile yıkayıp, etanolden geçirilip saf su ile tekrar yıkandıktan sonra filtre kağıdı ile kurutulmuştur. Elektrot üzerine, hazırlanan karbon nanotüp süspansiyonu enjekte edilmiştir.

Dönüşümlü Voltamogramların Elde Edilmesi

Dönüşümlü voltamogramlar üç elektrot tekniği kullanılarak CHI 608 elektrokimyasal analiz cihazı ile elde edilmiştir. Platin karşı elektrot ve Ag/AgCl, Cl⁻ (3,0 M KCl) referans elektrot olarak kullanılmıştır. Elektrotların karakterizasyonu 1,00 M KOH ve değişik derişimlerinde (0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 M) metanol içeren ortamlarda, değişik tarama hızlarında (25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 mVs⁻¹) ve değişik sıcaklıklarda (298, 303, 308, 313, 318 K) yapılmıştır.

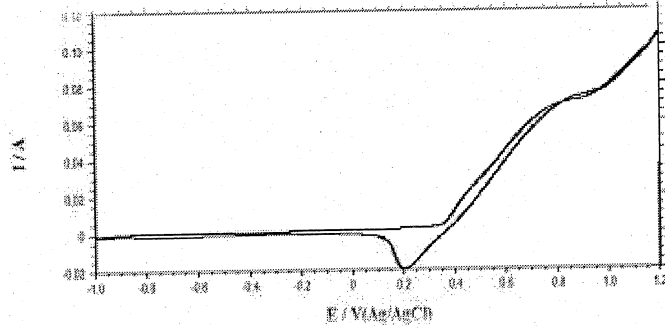
Kronoamperometri eğrilerinin elde edilmesi

Grafit, Grafit/CNT, 80 saniye nikel biriktirilmiş Grafit ve Grafit/CNT elektrotların zamanla kararlılık testleri metanolün yükseltgendiği potansiyel olan 0,6 V sabit potansiyelde kronoamperometri tekniği kullanılarak 1,00 M metanol içeren 1,00 M KOH çözeltisinde 298 K'de yapılmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Grafit/CNT-Ni Elektrotta Metanol İçeren 1,00 M KOH çözeltisinde Elde Edilen Bulgular ve Değerlendirilmesi

Grafit/CNT-Ni elektrot üzerinde metanol içeren 1,00 M KOH çözeltisinde 100 mV s⁻¹ hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil 1'de verilmektedir. Şekil 1 incelendiğinde, ileri yönlü taramada iki ve geri yönlü taramada bir tane olmak üzere, toplam üç tane pik görülmektedir. Anodik tarama boyunca 0,543 V'tan itibaren metanol molekülleri NiOOH katalizörlüğünde okside olmaya başlamıştır. Potansiyelin artmasına paralel olarak oksidasyon akım değerleri hızla artmakta, ~0,923 V'tan itibaren oksijen çıkışı gözlenmektedir.



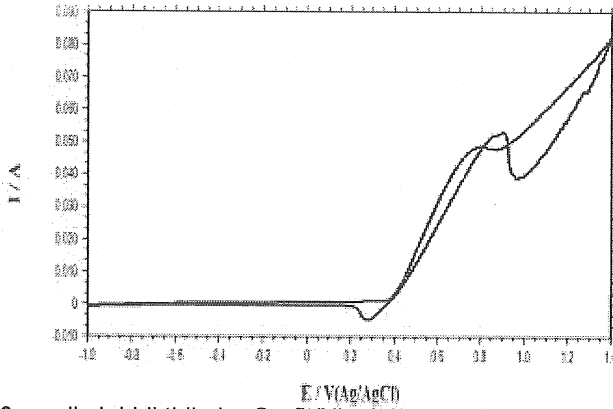
Şekil 1. 80 s nikel biriktirilmiş Grafit/CNT-Ni elektrotun 1,00 M KOH + 0,50 M metanol çözeltisi içindeki dönüşümlü voltamogramı

Grafit/CNT-Ni elektrot üzerinde meydana gelen metanol oksidasyonu ile Grafit/Ni elektrot üzerindeki metanol oksidasyonu karşılaştırıldığında elde edilen akım değerleri ve potansiyeller sırasıyla 68,90, 48,40 mA ve 0,819, 0,800 V'tur. Elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi Grafit yüzeyine çok duvarlı karbon nanotüp enjekte edildikten sonra 80 s Ni biriktirildiğinde metanol oksidasyon akım değerleri artmakta, potansiyelde daha pozitif değerlere kaymaktadır. Moleküler yapısı fulleren yapısına benzediğinden dolayı iki farklı yüzey alanına sahiptir (Niyogi ve ark, 2002). Bu yüzeyler tüpün yan duvarları ve tüpün uç kısımlarıdır. Bu özellik ona diğer karbon malzemelerden daha geniş yüzey alanlı olmasını sağlamakta, nano boyutta olmasından dolayı elektrokimyasal reaksiyonlar sırasında elektron transferi ve reaktantın elektrokimyasal aktif bölgelere ulaşabilmesi kolaylaşmaktadır (Li ve ark, 2003 ve Liang ve ark, 2008). Yüksek yüzey alanından dolayı nano katalizör

(Ni), CNT yüzeyine kolayca adsorbe olur ve homojen olarak yayılır. Yüzeyine biriktirilen katalizörle kolayca uyum sağlayarak kararlı bir yapıya sahiptir (Prabhuram ve ark, 2004 ve Niu ve ark, 2008). Bu gibi üstün özelliklerinden dolayı metanol oksidasyonu esnasında Grafit/Ni oranla oksidasyon akım değerleri daha yüksek çıkmıştır.

Grafit/Ni Elektrotta 1,00 M KOH ve Metanol İçeren Ortamda Elde Edilen Bulgular ve Değerlendirilmesi

Grafit/Ni elektrotta metanol içeren bazik ortamda elde edilen dönüşümlü voltamogramını incelenecek olursa, ileri ve geri yönlü taramada nikel için karakteristik pikler görülmektedir. Metanol molekülleri nikel metali üzerinde pH'nın yüksek olduğu ortamda okside olmakta ve ileri ve geri yönde olmak üzere toplam iki tane oksidasyon piki vermektedir. Bu pikler Şekil 2'de açıkça görülmektedir. 1,00 M KOH ortamına metanol eklendiği zaman Grafit/Ni elektrotta anodik yönde bir oksidasyon piki oluşmaktadır. Bu oksidasyon piki Ni^{+2}/Ni^{+3} dönüşümünün gerçekleştiği potansiyelle karşılık gelmektedir.



Şekil 2. 80 s nikel biriktirilmiş Grafit/Ni elektrotun 1,00 M KOH + 0,50 M metanol çözeltisi içindeki dönüşümlü voltamogramı

İlerleyen potansiyelerde NiOOH miktarına bağlı olarak oksidasyon azalmakta ve yerini oksijen çıkışına bırakmaktadır. Literatürde alkollerin oksidasyonu için farklı hipotezler vardır. Fleischmann ve ark, (1971-1972) göre alkolün oksidasyon mekanizmasında NiOOH'lar elektrokatalizör olarak görev görür. Şekilde görüldüğü gibi oksidasyon sadece ileri yönde değil aynı zamanda katodik çevrimin başında da oluşmaktadır. Bunun nedeni aktif merkezleri kapatan ara ürünlerin yüzeyden desorpsiyonu ile metanol adsorpsiyonu artmakta ve oksidasyon yeniden başlamakta, buna bağlı olarak akım tekrar artmaktadır. ~ 0,8 V' ta nikel yüzeyde NiOOH formunda olup metanolün oksitlenmesine katkıda bulunurken,

NiOOH'ten Ni(OH)₂ formuna dönüşmektedir (Fleischmann ve ark, 1971). Oksidasyon son basamakta format anyonu oluşuncaya kadar devam etmektedir.

Sonuçlar

Nikel biriktirilmiş grafit ve Grafit/CNT elektrotlarda, 0,5 M metanol içeren 1,00 M KOH çözeltisinde elde edilen dönüşümlü voltamogramlara göre metanol oksidasyon pikleri her ikisinde de olduğu görülmüştür. CNT'nin gözenekli yapıda oluşu ve grafit yüzeyini genişlettiği için metanol oksidasyon akımlarını arttırmış. Buna bağlı olarak oksidasyonu katalizlemiştir.

Kaynaklar

- ARICO A.S., SRINIVASAN S., ANTONUCCI V., 2001. DMFCs: from fundamental aspects to technology development. *Fuel Cells*, 1133-161.
- BENSEBAA F., FARAH A.A., WANG D., BOCK C., DU X., KUNG J., et al., 2005. Microwave synthesis of polymer-embedded Pt-Ru catalyst for direct methanol fuel cell. *J. Phys. Chem. B*, 109:15339-15344
- CHETTY R., XIA W., KUNDU S., BRON M., REINECKE T., SCHUHMANN W., et al., 2009. Effect of Reduction Temperature on the Preparation and Characterization of Pt- Ru Nanoparticles on Multiwalled Carbon Nanotubes. *Langmuir*, 25:3853-3860.
- FLEISCHMANN M., KORINEK K., PLETCHER D., 1971. The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution. *J. Electroanal. Chem.* 31:39-49.
- LI W.Z., LIANG C.H., ZHOU W.J., QIU J.S., ZHOU Z.H., SUN G.Q., XIN Q., 2003. Preparation and Characterization of Multiwalled Carbon Nanotube-Supported Platinum for Cathode Catalysts of Direct Methanol Fuel Cells. *J. Phys. Chem. B*, 107:6292
- LIANG Y., LI J., XU Q.C., HU R.Z., LIN J.D., LIAO D.W., 2008. Characterization of composite carbon supported PtRu catalyst and its catalytic performance for methanol oxidation. *Alloys Compd.*, 465:296
- NIU JJ, WANG JN., 2008. Activated carbon nanotubes-supported catalyst in fuel cells *Electrochim Acta*, 53:8058-63
- NIYOGI S., HAMON M.A., HU H., ZHAO B., BHOWMIK P., SEN R., ITKIS M.E., HADDON R.C., 2002. *Acc. Chem. Res.*, 35:1105
- PATRA S, MUNICHANDRAIAH N, *Langmuir*, 25(2009)1732-1738
- PRABHURAM J., ZHAO TS., WONG CW., GUO JW., 2004. *J Power Sources*,134:1-6
- RAHIM, M.A.A., HAMEED, R.M.A., KHALIL, M.W., 2004 a. the role of a bimetallic catalyst in enhancing the electro-catalytic activity towards methanol oxidation. *Journal of Power Sources*, 135: 42-51.
- RAHIM, M.A.A., HAMEED, R.M.A., KHALIL, M.W., 2004 b. Nickel as a catalyst for the electro-oxidation of methanol in alkaline medium. *Journal of Power Sources*, 134: 160-169.

**ADANA VE MERSİN EKOLOJİK KOŞULLARINDA YETİŞEN MERSİN BİTKİSİ
(*Myrtus communis* L.)'NİN YAPRAK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ***

*Determination Of Properties Of Leaves Of Myrtle Plants (*Myrtus communis* L.) That Grown On The Ecological Conditions Of Adana And Mersin.*

Hülya YILDIRIM
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Sevgi PAYDAŞ KARGI
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

ÖZET

Bu araştırmada Adana ve Mersin ekolojik koşullarında yetişen mersin bitkisinin yaprak özellikleri belirlenmiştir. Mersin bitkisi yaprakları L*, croma ve hue değerleri bakımından incelenmiş ve yaprak ayasında uzunluk, yaprak ayasında genişlik özellikleri sırasıyla 28.20-53.61 mm, 7.47-20.86 mm olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : *Myrtus communis*, yaprak, uçucu yağ.

ABSTRACT

In this research properties of leaves of myrtle plants (*Myrtus communis* L.) that grown on the ecological conditions of Adana and Mersin were determined. The myrtle plants were examined in terms of; leaf of the value of L*, leaf of the value of croma, leaf of the value of hue and leaf length, were determined 28.20-53.61 mm, 7.47-20.86 mm, respectively.

Key Words : *Myrtus communis*, leaf, essential oil,

Giriş

Mersin bitkisi yaklaşık 100 cins ve 3000 tür ile temsil edilen myrtaceae familyasında yer almaktadır. Hambeles ve bahar ağacı gibi yaygın isimleri bulunan mersin bitkisi Akdeniz Bölgesi'nin doğal bitki örtüsünde bulunan çok yıllık ve herdem yeşil bir bitkidir. Yaprakları derimsi, düz kenarlı; gövde üzerinde karşılıklı veya çapraz dizilişlidir. Çiçekler beş parçalı olup yaprak koltuklarından tek tek çıkmaktadır. Meyveleri üzüksü meyve tipindedir. (Anonim, 2011a). Mersin bitkisi yaprakları az miktarda kafeik, ellajik ve gallik asit gibi fenolik asitler ile kersetin türevleri, fazla miktarda ise kateşin ve mirsetin türevleri içermektedir (Romani ve ark. 1999). Küçük ağaç veya geniş çalılıklar oluşturmaktadır. Açık sarı renkli uçucu yağları okaliptüs kokusundadır (Anonim, 2011b). 1-5m yüksekliğe kadar boylanabilen mersin bitkisinin 2-5cm uzunluğunda tüysüz, salgı bezleri taşıyan yaprakları, ezildiğinde keskin aromatik bir koku yaymaktadır. (Davis, 1982).

Uçucu yağlarda, terpenik maddeler, aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar, azot ve kükürt taşıyan bileşikler bulunmaktadır. Uçucu yağlar bitkilerin tamamında bulunabileceği gibi petal, yaprak, tohum, ağaç kabuğu, çiçek tomurcuğu, stigma, meyve, kök, rizom gibi bitkinin belirli bir organında da oluşabilir.

* Yüksek lisans-MSc Thesis

Yapraklarda yaprağın dış epidermis hücreleri arasında oluşan salgı ceplerinde veya epidermis hücrelerinin dışarı uzaması sonucu oluşan salgı tüylerinde bol bulunmaktadır. Uçucu yağlar tek bir maddeden oluşmayıp genellikle onlarca hatta yüzlerce farklı bileşenden meydana gelip, koku özelliğini bu bileşenlerden en fazla bulunanı belirlemektedir. (Anonim, 2012)

Bitki çeşitliliği açısından Türkiye dünyanın zengin ülkelerinden biridir. Bu zenginlik, ülkemizin çeşitli iklim tiplerine sahip olması, kısa aralıklar içerisinde önemli ekolojik değişikliklerin bulunması, jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilik, deniz, göl ve akarsu gibi değişik karakterde sulak alanlara sahip olması, deniz seviyesinden 5000m 'ye kadar değişen yükseltilerde çok sayıda dağların bulunmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca ülkemizin Asya, Avrupa ve Afrika kıtaları arasında geçiş konumunda bulunması sonucunda da Türkiye'de zengin bir bitkisel çeşitlilik oluşmuştur (Anonim, 2011c).

Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların sentetik yolla elde edilenlere göre etkisinin çok yönlü olması, çevre ve insan sağlığına zararlı etkilerinin olmaması, ilaç sanayi yanında, gıda ve meşrubat, parfüm ve kozmetik endüstrisi ile aromaterapi gibi pek çok alanlarda kullanılması nedeniyle, dünyada her geçen yıl tüketimi artmakta, buna paralel olarak ülkemiz ekonomisinde gelişen bir sektör olarak varlığını sürdürmektedir (Karık ve Öztürk,2010). Ülkemizde 9000'e yakın bitki türü doğal olarak yetişmesine rağmen bunlardan yeterince yararlanılamamaktadır. Kimyasal içerikleri üzerindeki çalışmalar ise çok yavaş yürümektedir (İlçim ve Dığrak,1998). Bu çalışmanın amacı, Adana ve Mersin ekolojik koşullarında yetişen mersin bitkisi yaprak ayasında uzunluk, genişlik ile renk özelliklerini(L*,croma ve hue) belirlemektir.

Materyal ve Metot

Materyal

Adana'nın Karaisalı, Mersin'in Erdemli ve Tarsus ilçelerinde yetişen 60 mersin bitkisi seleksiyonla belirlenmiş, bu bitkilerden toplanan yapraklarda ölçümler yapılmıştır. Araştırılan bu bitkilerin konumlarının 36-37 enlemleri ile 34-35 boylamları arasında olduğu ve deniz seviyesinden yüksekliğinin ise 2 m ile 463 m arasında değiştiği belirlenmiştir.

Metot

Her bitkiden gelişmesini tamamlamış, her tekerrürde 10 yaprak olmak üzere 3 tekerrürlü ve toplam 30 yaprak alınarak, dijital kumpas yardımıyla yaprağın boyuna en uzun yerinden mm olarak ölçülmüştür. Her bitkiden gelişmesini tamamlamış, her tekerrürde 10 yaprak olmak üzere 3 tekerrürlü ve toplam 30 yaprak alınarak, dijital kumpas yardımıyla yaprağın enine en geniş yerinden mm olarak ölçülmüştür.

Her bitkiden gelişmesini tamamlamış, her tekerrürde 10 yaprak olmak üzere 3 tekerrürlü ve toplam 30 yaprak alınarak, yaprak rengi renk ölçüm cihazı ile L *, Croma ve Hue değerleri olarak ölçülmüştür.

Araştırma Bulguları

Yaprak ayasında uzunluk değerlerinin 28.20 mm ile 53.61 mm arasında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Yaprak boyları 60 bitkiden 22'sinde 28mm ile 35mm, 21'inde 35mm ile 40mm, 17'sinde 40mm ile 53mm arasında değişmiştir. Tarsus'un Yanıkkışla köyünde 33m48 numaralı bitkide 51.38mm ile en yüksek, 33m49 numaralı bitkide ise 28.20 mm ile en düşük olarak belirlenmiştir. Tarsus ilçe merkezinde 33m35 numaralı bitkide 45.82 mm ile en yüksek 33m23 numaralı bitkide ise 25.20 mm ile en düşük olarak saptanmıştır. Erdemli ilçesinde 33m64 numaralı bitkide 44.80 mm ile en yüksek, 33m66 numaralı bitkide ise 32.71 mm ile en düşük olarak belirlenmiştir. Adana'nın Karaisalı ilçesinde 01m05 numaralı bitkide 53.61 mm ile en yüksek, 01m01 numaralı bitkide ise 30.93 mm ile en düşük olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1.) Altmış mersin bitkisinde yaprak boyu bakımından istatistiksel olarak bitkiler arasındaki farkların önemli olduğu bulunmuştur (Çizelge 2.).

Yaprak ayasında genişlik değerlerinin 7.47 mm ile 20.86 mm arasında dağılım gösterdiği belirlenmiştir Yaprak en uzunlukları 60 bitkiden 6'sında 7 mm ile 12 mm, 25'inde 12 mm ile 14 mm, 18'inde 14 mm ile 16 mm, 11'inde 16 mm ile 20 mm arasında değişmiştir. Tarsus Yanıkkışla köyünde 33m48 numaralı bitkide 18.33 mm ile en fazla iken, 33m49 numaralı bitkide 7.47 mm ile en düşük ortalama değeri elde edilmiştir. Tarsus ilçe merkezinde 33m35 numaralı bitkide 20.86 mm ile en yüksek, 33m11 numaralı bitkide 10.23 mm ile en düşük ortalama değeri belirlenmiştir. Erdemli ilçesinde 33m64 numaralı bitkide 17.86 mm ile en yüksek olarak belirlenirken, 33m67 numaralı bitkide 12.77 mm ile en düşük ortalama değerleri tespit edilmiştir. Adana'nın Karaisalı ilçesinde 01m05 numaralı bitkide 19.73 mm ile en yüksek iken, 01m01 numaralı bitkide 12.66 mm ile en düşük ortalama değeri belirlenmiştir. (Çizelge 1.) 60 bitkide yaprak eni bakımından istatistiksel olarak bitkiler arasındaki farkların önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 2.).

Araştırılan 60 bitkide en parlak yapraklar Tarsus merkezinde 33m30 numaralı bitkide ($L^*=19.61$) belirlenirken, en düşük parlaklık değeri Tarsus merkezinde 33m37 numaralı bitkide ($L^*=4.81$) belirlenmiştir. Karaisalı'da yetişen mersin bitkisi yapraklarının parlaklığı 01m01 numaralı bitkide ($L^*=5.73$) en düşük parlaklık değeri elde edilirken, 01m04 numaralı bitkide parlaklık değeri ($L^*=14.32$) en yüksek olarak belirlenmiştir. Tarsus merkezinde en parlak yapraklar 33m30 numaralı bitkiden ($L^*=19.61$) elde edilirken, en düşük parlaklık değeri 33m37 numaralı bitkide ($L^*=4.81$) belirlenmiştir. Erdemli'de en parlak yapraklar 33m67 numaralı bitkiden ($L^*=14.9$), en düşük parlaklık değeri 33m64 numaralı bitkide ($L^*=7.59$) saptanmıştır. Tarsus Yanıkkışla köyünde en parlak yapraklar 33m63 numaralı bitkiden ($L^*=16.68$) elde edilirken, en düşük parlaklık değeri 33m55 numaralı bitkide ($L^*=9.76$) saptanmıştır(Çizelge 3.).

Araştırılan 60 bitkide en yüksek yaprak renk yoğunluğu Tarsus merkezinde 33m30 numaralı bitkide tespit edilirken ($C=71.54$), en düşük yaprak renk yoğunluğu Karaisalı'da 01m01 numaralı bitkide ($C=70.80$) tespit edilmiştir. Karaisalı'da yetişen mersin bitkisi yapraklarından en yüksek renk yoğunluğu 01m04 numaralı bitkiden

elde edilmiştir ($C=71.15$). En düşük yaprak renk yoğunluğu 01m01 numaralı bitkide ($C=70.8$) belirlenmiştir. Tarsus merkezde en yüksek renk yoğunluğu 33m30 numaralı bitkiden elde edilirken ($C=71.54$), en düşük yaprak renk yoğunluğu 33m37 numaralı bitkide ($C=70.85$) tespit edilmiştir. Erdemli'de yetişen mersin bitkisi yapraklarından en yüksek renk yoğunluğu 33m66 numaralı bitkiden elde edilirken ($C=71.19$), en düşük yaprak renk yoğunluğu 33m64 numaralı bitkide ($C=71$) belirlenmiştir. Tarsus Yanıkışla köyünde yetişen mersin bitkisi yapraklarından en yüksek renk yoğunluğu 33m63 numaralı bitkide belirlenirken ($C=71.30$), en düşük yaprak dış renk yoğunluğu 33m55 ve 33m56 numaralı bitkilerde ($C=70.93$) belirlenmiştir (Çizelge 3.).

Araştırılan 60 bitkide en açık renkli yapraklar Tarsus merkezinde 33m30 numaralı bitkide ($h^{\circ}=53.74$) elde edilirken, en koyu renkli yapraklar 33m37 numaralı bitkide ($h^{\circ}=45.74$) saptanmıştır. Karaisalı'da en açık renkli yapraklar 01m04 numaralı bitkide ($h^{\circ}=51.08$) belirlenirken, en koyu renkli yapraklar 01m01 numaralı bitkide ($h^{\circ}=47.07$) saptanmıştır. Tarsus merkezinde en açık renkli yapraklar 33m30 numaralı bitkide ($h^{\circ}=53.74$) elde edilmiştir. En koyu renkli yapraklar 33m37 numaralı bitkide ($h^{\circ}=45.74$) belirlenmiştir. Erdemli'de en açık renkli yapraklar 33m67 numaralı bitkiden ($h^{\circ}=51.5$) elde edilirken, en koyu renkli yapraklar 33m64 numaralı bitkide ($h^{\circ}=50.09$) saptanmıştır. Tarsus Yanıkışla köyünde en açık renkli yapraklar 33m63 numaralı bitkiden ($h^{\circ}=52.37$) elde edilmiştir. En koyu renkli yapraklar 33m55 numaralı bitkide ($h^{\circ}=49.29$) saptanmıştır. (Çizelge 3.)

Çizelge 1. Mersin bitkisi yaprak en, boy ortalama ve standart sapma değerleri.

Bölge	Bitki Numarası	Yaprak Boyu (mm)	Yaprak Eni (mm)
Karaisalı	01m01	30.93±0.09	12.66±0.30
Karaisalı	01m03	41.70±0.18	13.37±0.05
Karaisalı	01m04	39.92±0.12	13.77±0.05
Karaisalı	01m05	53.61±0.19	19.73±0.33
Tarsus (M)	33m06	38.70±0.09	13.09±0.41
Tarsus (M)	33m07	38.56±0.25	18.07±0.14
Tarsus (M)	33m09	36.05±0.31	14.52±0.18
Tarsus (M)	33m10	33.48±0.16	14.17±0.30
Tarsus (M)	33m11	31.64±0.14	10.23±0.08
Tarsus (M)	33m12	34.05±0.28	14.14±0.18
Tarsus (M)	33m13	34.02±0.02	11.80±0.26
Tarsus (M)	33m14	37.77±0.17	14.08±0.13
Tarsus (M)	33m15	33.50±0.40	12.73±0.14
Tarsus (M)	33m16	36.55±0.38	14.85±0.33
Tarsus (M)	33m17	33.32±0.11	13.43±0.31
Tarsus (M)	33m18	39.02±0.12	14.52±0.16
Tarsus (M)	33m19	43.83±0.12	14.94±0.09

Tarsus (M)	33m20	37.31±0.16	14.15±0.13
Tarsus (M)	33m21	40.12±0.25	16.37±0.96
Tarsus (M)	33m22	42.34±0.28	18.08±0.76
Tarsus (M)	33m23	25.20±0.05	16.52±0.64
Tarsus (M)	33m24	36.44±0.10	14.95±0.44
Tarsus (M)	33m25	33.95±0.25	12.90±0.44
Tarsus (M)	33m26	34.78±0.15	13.65±0.17
Tarsus (M)	33m27	38.44±0.28	13.85±0.48
Tarsus (M)	33m28	32.45±0.06	12.13±0.25
Tarsus (M)	33m29	31.83±0.15	13.10±0.31
Tarsus (M)	33m30	37.70±0.26	12.63±0.18
Tarsus (M)	33m32	31.05±0.10	14.62±0.18
Tarsus (M)	33m33	38.21±0.22	13.84±0.33
Tarsus (M)	33m34	38.64±0.11	14.34±0.18
Tarsus (M)	33m35	45.82±0.31	20.86±0.11
Tarsus (M)	33m36	33.08±0.07	12.46±0.16
Tarsus (M)	33m37	36.98±0.40	13.96±0.18
Tarsus (M)	33m39	41.40±0.07	14.69±0.09
Tarsus (M)	33m40	29.96±0.05	12.68±0.08
Tarsus (M)	33m41	35.29±0.21	13.03±0.23
Tarsus (M)	33m42	34.25±0.18	16.67±0.04
Tarsus (M)	33m43	30.69±0.11	12.61±0.24
Tarsus (M)	33m44	39.80±0.48	15.55±0.38
Tarsus (M)	33m45	37.66±0.37	15.08±0.15
Yanikkışla	33m46	36.53±0.43	16.07±0.23
Yanikkışla	33m47	35.56±0.07	13.20±0.39
Yanikkışla	33m48	51.38±0.52	18.33±0.03
Yanikkışla	33m49	28.20±0.09	7.47±0.07
Yanikkışla	33m51	40.53±0.44	14.25±0.24
Yanikkışla	33m52	42.03±0.27	10.05±0.16
Yanikkışla	33m53	40.19±0.17	16.22±0.31
Yanikkışla	33m55	34.07±0.25	12.71±0.07
Yanikkışla	33m56	48.66±0.29	14.21±0.45
Yanikkışla	33m57	33.91±0.19	11.08±0.11
Yanikkışla	33m58	42.27±0.18	14.50±0.14
Yanikkışla	33m60	35.58±0.19	12.68±0.31
Yanikkışla	33m61	43.74±0.27	13.06±0.14
Yanikkışla	33m62	37.80±0.19	12.92±0.12

Yanıkışla	33m63	34.70±0.23	10.01±0.07
Erdemli	33m64	44.80±0.30	17.86±0.29
Erdemli	33m65	40.11±0.19	14.57±0.34
Erdemli	33m66	32.71±0.03	12.94±0.16
Erdemli	33m67	33.99±0.20	12.77±0.16

Çizelge 2. Yaprak en, boy ortalama değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Bölge	Bitki	Yaprak Boy(mm)	Yaprak En(mm)
Karaisalı	01m01	30.93EF	12.66tuwv
Karaisalı	01m03	41.7gh	13.37opqrst
Karaisalı	01m04	39.92i	13.77mnopq
Karaisalı	01m05	53.61a	19.73b
Tarsus (M)	33m06	38.7kl	13.09qrstuv
Tarsus (M)	33m07	38.56klm	18.07c
Tarsus (M)	33m09	36.05st	14.52ghijkl
Tarsus (M)	33m10	33.48yzA	14.17jklm
Tarsus (M)	33m11	31.64DE	10.23z
Tarsus (M)	33m12	34.05wxyz	14.14jklm
Tarsus (M)	33m13	34.02wxyz	11.8x
Tarsus (M)	33m14	37.77no	14.08jklmn
Tarsus (M)	33m15	33.5yzA	12.73stuvw
Tarsus (M)	33m16	36.55qrs	14.85fghi
Tarsus (M)	33m17	33.32zA	13.43nopqrs
Tarsus (M)	33m18	39.02jk	14.52ghijkl
Tarsus (M)	33m19	43.83f	14.94fgh
Tarsus (M)	33m20	37.31opq	14.15ijklm
Tarsus (M)	33m21	40.12i	16.37d
Tarsus (M)	33m22	42.34g	18.08c
Tarsus (M)	33m23	25.2gh	16.52d
Tarsus (M)	33m24	36.44rs	14.95fgh
Tarsus (M)	33m25	33.95xyz	12.9stuv
Tarsus (M)	33m26	34.78uvw	13.65mnopqr
Tarsus (M)	33m27	38.44klmn	13.85lmnop
Tarsus (M)	33m28	32.45BC	12.13wx
Tarsus (M)	33m29	31.83CD	13.1qrstuv
Tarsus (M)	33m30	37.7nop	12.63uvw
Tarsus (M)	33m32	31.05DEF	14.62ghijk
Tarsus (M)	33m33	38.21lmn	13.84lmnop

Tarsus (M)	33m34	38.64kl	14.34hijklm
Tarsus (M)	33m35	45.82d	20.86a
Tarsus (M)	33m36	33.08AB	12.46vwx
Tarsus (M)	33m37	36.98pqr	13.96klmno
Tarsus (M)	33m39	41.4h	14.69ghij
Tarsus (M)	33m40	29.96G	12.68tuvw
Tarsus (M)	33m41	35.29tuv	13.03rstuv
Tarsus (M)	33m42	34.25wxy	16.67d
Tarsus (M)	33m43	30.69FG	12.61uvw
Tarsus (M)	33m44	39.8ij	15.55ef
Tarsus (M)	33m45	37.66nop	15.08fg
Yanıkkişla	33m46	36.53qrs	16.07de
Yanıkkişla	33m47	35.56tu	13.2pqrstu
Yanıkkişla	33m48	51.38b	18.33c
Yanıkkişla	33m49	28.2H	7.47A
Yanıkkişla	33m51	40.53ı	14.25hijklm
Yanıkkişla	33m52	42.03gh	10.05z
Yanıkkişla	33m53	40.19ı	16.22d
Yanıkkişla	33m55	34.07wxyz	12.71tuvw
Yanıkkişla	33m56	48.66c	14.21ijklm
Yanıkkişla	33m57	33.91yz	11.08y
Yanıkkişla	33m58	42.27g	14.5ghijkl
Yanıkkişla	33m60	35.58t	12.68tuvw
Yanıkkişla	33m61	43.74f	13.06rstuv
Yanıkkişla	33m62	37.8mno	12.92stuv
Yanıkkişla	33m63	34.7vwx	10.01z
Erdemli	33m64	44.8e	17.86c
Erdemli	33m65	40.11ı	14.57ghijk
Erdemli	33m66	32.71AB	12.94stuv
Erdemli	33m67	33.99wxyz	12.77stuvw
LSD: 0.05		1.603	2.484

Çizelge 3. Mersin bitkisi yaprak rengi ortalama ve standart sapma değerleri

Bölge	Bitki numarası	Yaprak		
		L*	C	h°
Karaisali	01m01	5.73±1.36	70.8±0.10	47.07±2.19
Karaisali	01m03	9.25±3.52	70.91±0.06	49.25±0.67
Karaisali	01m04	14.32±5.41	71.15±0.21	51.08±1.98
Karaisali	01m05	11.2±1.83	71.07±0.06	50.7±0.46
Tarsus (M)	33m07	8.83±1.64	71.21±0.12	51.75±0.85
Tarsus (M)	33m09	7.02±1.07	70.93±0.16	49.53±1.62
Tarsus (M)	33m14	12.04±2.80	71.28±0.10	52.22±0.60
Tarsus (M)	33m19	10.49±0.66	71.34±0.03	52.58±0.18
Tarsus (M)	33m22	6.10±1.04	70.92±0.11	49.28±1.11
Tarsus (M)	33m23	8.29±0.68	71.18±0.08	51.58±0.59
Tarsus (M)	33m26	9.03±3.41	71.11±0.20	50.87±1.49
Tarsus (M)	33m30	19.61±3.79	71.54±0.05	53.74±0.24
Tarsus (M)	33m32	18.33±2.22	71.32±0.09	52.45±0.57
Tarsus (M)	33m34	13.42±1.76	71.37±0.08	52.63±0.40
Tarsus (M)	33m35	10.14±2.23	71.09±0.17	50.82±1.31
Tarsus (M)	33m36	12.36±1.33	71.32±0.09	52.48±0.55
Tarsus (M)	33m37	4.81±2.02	70.85±0.13	45.74±3.98
Tarsus (M)	33m39	9.61±1.20	71.11±0.13	50.97±1.07
Tarsus (M)	33m40	11.93±4.71	71.18±0.17	51.49±1.12
Tarsus (M)	33m41	6.71±0.88	70.95±0.17	49.33±1.90
Tarsus (M)	33m42	6.05±1.73	70.95±0.13	48.44±3.48
Tarsus (M)	33m43	7.71±2.45	71.01±0.12	50.18±1.08
Tarsus (M)	33m45	7.53±1.95	70.97±0.11	49.77±1.23
Yanıkkişla	33m51	10.47±3.40	71.10±0.12	50.96±0.92
Yanıkkişla	33m55	9.76±4.03	70.93±0.15	49.29±1.56
Yanıkkişla	33m56	11.21±3.52	70.93±0.09	49.45±0.91
Yanıkkişla	33m63	16.68±5.40	71.30±0.13	52.37±0.83
Erdemli	33m64	7.59±1.40	71.00±0.12	50.09±1.09
Erdemli	33m65	8.21±2.12	71.01±0.12	50.13±1.23
Erdemli	33m66	11.19±4.31	71.19±0.22	51.44±1.74
Erdemli	33m67	14.9±7.81	71.18±0.18	51.5±1.20

Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma İstasyonu Mùdùrlùğù yaprak, toprak sulama suyu ve gùbre analiz laboratuvarında yapılan toprak analizleri ile ilgili sonuçlara göre; Yanıkkişla'dan alınan toprak materyalinde toplam kireç miktarı

%37.83, tuzluluk E.C. 0.12 mmhos/cm, organik madde miktarı % 0.65, pH ise 7.78 olarak belirlenmiştir. Alınabilir K, P ve Mg miktarları sırasıyla 117.16 ppm, 62.26 ppm ve 766.42 ppm, Fe, Zn, Mn ve Cu miktarları sırasıyla 6.63 ppm, 1.43 ppm, 1.30 ppm, 3.25 ppm olarak tespit edilmiştir. Alata'dan alınan toprak materyalinde toplam kireç miktarı %23.00, tuzluluk E.C. 1.39 mmhos/cm, organik madde miktarı % 5.91, pH ise 6.80 olarak belirlenmiştir. Alınabilir K,P ve Mg miktarları sırasıyla 734.79 ppm, 260.10 ppm ve 838.90 ppm, Fe, Zn, Mn ve Cu miktarları sırasıyla 12.40 ppm, 82.87 ppm, 12.18 ppm, 6.70 ppm olarak tespit edilmiştir.

Tarsus merkez yeşil mahalleden alınan toprak materyalinde, toplam kireç miktarı %40.50, tuzluluk E.C. 0.16 mmhos/cm, organik madde miktarı % 1.36, pH ise 7.50 olarak belirlenmiştir. Alınabilir K, P ve Mg miktarları sırasıyla 193.22 ppm, 180.94 ppm ve 486.58 ppm, Fe, Zn, Mn ve Cu miktarları sırasıyla 4.55 ppm, 2.97 ppm, 4.55 ppm, 2.68 ppm olarak tespit edilmiştir.

Tarsus merkez Tekke mahallesinden alınan toprak materyalinde, toplam kireç miktarı %45.69, tuzluluk E.C. 0.09 mmhos/cm, organik madde miktarı %1.36, pH ise 7.77 olarak belirlenmiştir. Alınabilir K, P ve Mg miktarları sırasıyla 144.41 ppm, 147.43 ppm ve 356.98 ppm, Fe, Zn, Mn ve Cu miktarları sırasıyla 18.38 ppm, 14.67 ppm, 5.18 ppm, 10.20 ppm olarak tespit edilmiştir.

Tarsus merkez baraj bölgesinden alınan toprak materyalinde, toplam kireç miktarı %27.54, tuzluluk E.C. 0.14 mmhos/cm, organik madde miktarı %2.40, pH ise 7.55 olarak belirlenmiştir. Alınabilir K, P ve Mg miktarları sırasıyla 283.19 ppm, 83.14 ppm ve 343.67 ppm, Fe, Zn, Mn ve Cu miktarları sırasıyla 6.33 ppm, 1.35 ppm, 5.28 ppm, 2.00 ppm olarak tespit edilmiştir.

Mersin'de uzun yıllar (1975-2010) içinde gerçekleşen ortalama değerler incelendiğinde; ortalama sıcaklık değerleri 10.5°C ile ocak ayında en düşük, 28.4°C ile ağustos ayında en yüksek olarak gerçekleşmiştir. Ortalama güneşlenme süresi aralık ayında 4.8 saat ile en düşük, temmuz ayında 10.2 saat ile en yüksek olmuştur. Ortalama en yüksek sıcaklık ocak ayında 14.8°C ile ağustos ayında 31.5°C arasında değişmiştir. Ortalama en düşük sıcaklık ocak ayında 6.9°C ile ağustos ayında 24.9°C arasında değişmiştir. Ortalama yağışlı gün sayısı ağustos ayında 1.6 ile aralık ayında 10.3 arasında değişmiştir. Adana'da uzun yıllar (1975-2010) içinde gerçekleşen ortalama değerler incelendiğinde; sıcaklık değerleri 9.6°C ile ocak ayında en düşük, 28.5°C ile ağustos ayında en yüksek olarak gerçekleşmiştir. Ortalama güneşlenme süresi aralık ayında 4.5 saat ile en düşük, temmuz ayında 10.6 saat ile en yüksek olmuştur (Meteoroloji Genel Müdürlüğü, 2011).

Sonuçlar

Yaprak ayasında uzunluk Adana'nın Karaisalı ilçesinde 01m05 numaralı bitkide 53,61 mm ile en yüksek, yaprak ayasında genişlik Tarsus merkezinde 33m35 numaralı bitkide 20.86 mm ile en yüksek olarak tespit edilmiştir. Araştırılan 60 bitkide en parlak yapraklar Tarsus merkezinde 33m30 numaralı bitkide ($L^*=19.61$) belirlenirken, en yüksek yaprak renk yoğunluğu Tarsus merkezinde 33m30 numaralı bitkide ($C=71.54$) tespit edilmiştir. En açık renkli yapraklar Tarsus

merkezinde 33m30 numaralı bitkide ($h^{\circ}=53.74$) belirlenmiş, en koyu renkli yapraklar Tarsus merkezinde 33m37 numaralı bitkide ($h^{\circ}=45.74$) tespit edilmiştir. Yapılan toprak analizleri sonucunda toplam kireç miktarının en fazla Tarsus merkezde, daha sonra sırasıyla Tarsus Yanıkkışla köyünde ve Erdemli Alata'da olduğu görülmüştür. Organik madde miktarı en fazla Alata'da, daha düşük miktarlarda Tarsus merkezde olduğu ve Tarsus Yanıkkışla'da en az olduğu tespit edilmiştir. Yapılan toprak analizlerine göre mersin bitkisinin topraktaki toplam kireç ve organik madde bakımından çok seçici olmadığı görüşüne varılmıştır. Bununla birlikte elde edilen iklim verileri, murt bitkisinin tipik bir Akdeniz Bölgesi bitkisi olduğunu göstermiştir.

Kaynaklar

- ANONİM, 2011a. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
[http://www.batem.gov.tr/MERSİN\(Myrtus_communis_L.\)](http://www.batem.gov.tr/MERSİN(Myrtus_communis_L.))Erişim tarihi:04.12.2011
- ANONİM.2011b.The Properties and Use of Myrtle Oil in Aromatherapy.
<http://sharonfalseitto.suite101.com/myrtle-essential-oil>
(Erişimtarihi: 17.12.2011)
- ANONİM, 2011c. <http://www.dogabotanik.com>(Erişim tarihi, 31.12.2011)
- ANONİM, 2012. <http://www.kimyaevi.org>(Erişim tarihi, 01.01.2012)
No.v. 9(3) p. 283-288
- DAVIS P.H.,1982. Myrtaceae, in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 4, Edinburgh, the University Press.
- İLÇİM, M., DIĞRAK, E., 1998. Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Tubitak, Tr.J.of Biology 22, 119-125.
- KARIK, Ü., ÖZTÜRK, M., 2010. Uçucu Yağ Sektörünün Ulusal Ekonomimizdeki Yeri, Sorunları ve Çözüm Önerileri. Alatarım, 2010, 9 (2): 30-37.
- MERSİN METEOROLOJİ MÜDÜRLÜĞÜ, 2011.
- METEOROLOJİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ, 2011.

INITIALIZATION AND TRAINING IMPROVEMENTS FOR CONIC SECTION FUNCTION NEURAL NETWORKS*

*Konik Kesit Fonksiyon Yapay Sinir Ağları İçin Başlatma ve Eğitim Geliştirmeleri**

Ceyhun ÇELİK
Bilgisayar Mühendisliği

Mutlu AVCI
Bilgisayar Mühendisliği

ÖZET

Bu çalışmada, Konik Kesit Fonksiyon Yapay Sinir Ağlarının başlatma aşamasında merkez vektörlerinin belirlenmesi için Genetik Algoritma kullanılmıştır ve Konik Kesit Fonksiyon Yapay Sinir Ağlarının eğitim aşaması için geliştirilmiş koni bükme metodu önerilmiştir. Önerilen metotlar UCI machine learning repository veri setlerinden Iris, Lense, Wine, Ecoli ve Haberman ile Two Spiral Problem veri setleri üzerinde test edilmiş ve geleneksel Konik Kesit Fonksiyon Yapay Sinir Ağı ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Konik Kesit Fonksiyon Yapay Sinir Ağları, Genetik Algoritma, Koni Bükme

ABSTRACT

In this study, Genetic Algorithm is used to determine the center vectors of Conic Section Function Neural Networks on initialization phase and improved cone folding method is proposed for training phase of Conic Section Function Neural Networks. The test performances of the Conic Section Function Neural Network with the proposed training versus Conic Section Function Neural Network with classical training are done on Iris, Lenses, Wine, Ecoli and Haberman datasets of UCI machine learning repository and Two Spiral Problem dataset.

Key Words : Conic Section Function Neural Networks, Genetic Algorithm, Cone Folding

Introduction

Machine learning contains fast and effective techniques for complex and difficult problems of developing technology. The techniques may be problem specific or universal approach for many problems.

Artificial Neural Networks (ANNs) are probably the most popular techniques in machine learning. The fundamentals of ANN are based on the modeling of biological neuron operation principle. Since first proposed artificial neuron model, ANNs have been improved considerably to solve many of up to date problems. Especially, non-linear systems without analytical solution are wide application area of ANNs. Some of these are medicine, industry, biology, electronics and social sciences. Since the first neuron and network model, many different neuron models and network topologies are added to ANN. Conic Section Function Neural Network (CSFNN) is proposed by Dorffner (Dorffner, 1994) to

* Yüksek Lisans Tezi- MSc. Thesis

carry out advantageous parts of Multi Layer Perceptron (MLP) (Werbos, 1974), (Rumelhart et al, 1986) and the Radial Basis Function (RBF) (Broomhead and Lowe, 1988), (Moody and Darken, 1989) ANNs. In a simpler manner, CSFNN can be considered as a hybridization of these two ANNs.

Both of the MLP and RBF ANNs are feed-forward networks that consist of input, hidden and output layers. These networks are black box systems. After receiving the inputs from the input layer, they apply propagation process on them according to the propagation rules of each layer. Finally, the output of the network can be obtained from the output layer.

Generally the feed-forward ANN contains an initialization phase before training. Often, the performance of the RBF depends mostly on the initialization of the center values (Yıldırım, 1997). Also the pre-processing on train data before applying MLP highly enhances the network performance (Smyth, 1992), (Weymaere and Martens, 1994). Hence, CSFNN includes both MLP and RBF, the performance of these RBF and MLP affect that of CSFNN.

In this study, a Genetic Algorithm (GA) based center value initialization approach is proposed for CSFNN to improve performance of this ANN. In addition to this initialization approach, gradient descent based hidden layer weight update and improved cone folding method for hidden layer angles are proposed and adopted on CSFNN training phase. The test performances of the CSFNN with the proposed training versus CSFNN with classical training are done on Iris, Lenses, Wine, Ecoli and Haberman datasets of UCI machine learning repository and Two Spiral Problem dataset. All software developments are realized by using C# programming language. Overall performance improvements proved the efficiency of proposed training for CSFNN.

Material and Methods

Material

CSFNN Software is developed with C# programming language to train and test of CSFNN on any given dataset in this work. It is CSFNN specific and developed with a user-friendly view. The software has its own input file format called *.csfn. There are mainly three frames on GUI window. Those are command frame, process tree frame and result frame.

The command frame of developed software allows to adjusting different parameters of CSFNN. There are two phases for CSFNN. First phase is initialization and the second phase is training. With this frame, GA or Learning Vector Quantization (LVQ) (Kohonen, 1984) can be used as initialization method. The former method is proposed one in this study and the latter is proposed by Dorffner. Different parameter options are also applicable for training phase. The frame provides two train method selections for data separations. The data either can be separated in percentage terms; e.g. %66 train data and %34 test data; or k-fold cross-validation can be applied to dataset. At the same time, data can be normalized according to min-max normalization or used with its actual values. In addition there is another sub-window of command frame to manage the train

strategy. With this sub-window, activation function of hidden and output layer, training mode; batch or incremental mode; of CSFNN, starting network type of CSFNN; MLP or RBF; and parameters to be updated and initialized can be given. Each parameter in the network is updated in a process with a different learning rate. In default, the network trains with batch mode and starts as MLP. The activation function of output layer is logarithmic sigmoid function and the activation function of hidden layer is linear function. The weights of output layer are updated with error back-propagation and learning rate is 1.0. The angle parameters ω of hidden layer are updated with cone folding and learning rate is 1.0. The default parameters led to Dorffner's training strategies.

Each CSFNN procedure is a process that includes inputs, errors, structure and outputs of CSFNN on software. Previous studies about any dataset are held on memory temporarily with all required information. When the program is terminated, these processes are erased automatically. However, there is a save option and required process can be saved easily.

Result frame has two sub-windows in itself. One of them visualizes the sum squared error (SSE), the desired outputs and the outputs of CSFNN graphics for both train and test set.

Methods

Conic Section Function Neural Networks: CSFNN is three-layered ANN that has one input, one hidden and one output layer. Working idea of CSFNN based on the providing fine-tuning by switching between MLP and RBF decision areas. However this switching process must be provided with an easy way (Dorffner, 1994). Hence the propagation rule of the hidden layer units is Conic Section Function contains propagation rule of both MLP and RBF. So decision areas of these ANNs can be used in a hybrid way. While decision areas of MLP can be planes (hyper-plane), decision areas of RBF are circles (hyper-sphere). The propagation rule of CSFNN provides diversity among decision areas such as circles, ellipses, parabolas and planes with an angle parameter. So the switching process is done in an easy way.

The propagation rule produces decision areas of CSFNN can be derived from a vector equation produces cone.

$$(x-s)a = \cos \omega \parallel x-s \parallel \quad (1)$$

Where s is the tip of the cone, unit vector a is axis of cone, ω is any value in a range of $[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}]$ and x is any point on the cone. This vector equation is defined on $n+1$ dimension for n -dimensional input space. Equation (1) could be rewritten for n -dimensional input space as follows.

$$\sum_{i=1}^{n+1} (x_i - s_i) a_i = \cos \omega \sqrt{\sum_{i=1}^{n+1} (x_i - s_i)^2} \quad (2)$$

$$x_{n+1} \equiv 0$$

At first, when the axis values of cone are thought as weights in MLP, the left side of (2) becomes Dot Product (propagation rule of MLP). Similarly the right side of (2) is thought as Euclidean Distances (propagation rule of RBF) without $\cos \omega$. If right side of (2) is subtracted from left side of (2), the propagation rule of CSFNN will be obtained as follows.

$$\sum_{i=1}^{n+1} (x_i - s_i) a_i - \cos \omega \sqrt{\sum_{i=1}^{n+1} (x_i - s_i)^2} = 0 \quad (3)$$

$$x_{n+1} \equiv 0$$

There are some differences about using propagation rule of CSFNN in literature. According to Yildirim, axis of the cone can be used as weight in MLP (Yildirim, 1997). On the other hand, according to Dorffner, axis of the cone depends on the angle parameter ω (Dorffner, 1994). Hence, the axis of the cone could be expressed with projection onto the input space of axis as weights when the weights are unit vector as follows.

$$a_i = w_i (-\cos(\omega + \alpha)), 1 \leq i \leq n \quad (4)$$

$$a_{n+1} = -\sin(\omega + \alpha)$$

Where w is weight vector for n-dimensional input space, ω is angle parameter between axis of the cone and plane of degraded cone and α is angle parameter between plane of degraded cone and input space. In this study Dorffner's CSFNN is used for developing.

The data inside the decision area, gives positive signal and the data outside the decision area, gives negative signal for a CSF neuron on hidden layer. If a negative class member is inside the decision area of positive class; i.e. the signal is positive; it will be excluded by folding the cone. On the other hand, if a positive class member, is outside the decision area of positive class; i.e. the signal is negative; it will be included by unfolding the cone. Thus the positive and the negative data are separated as much as possible.

A method called cone folding is proposed by Dorffner to separate negative and positive class members (Dorffner, 1994). In this method, the angle parameter ω is updated with gradient descent as given in (5).

$$\Delta\omega = \frac{\partial y}{\partial \omega} \text{sign}(w_k) \quad (5)$$

Where y is the propagation rule of CSFNN. The folding or unfolding process of the cone is decided by considering MLP part signal of the unit and the sign of desired weight between the hidden unit and the output unit for the input vector.

$$\Delta\omega = \begin{cases} -\eta\delta_\omega & \text{if } \bar{y} > 0 \text{ and } w_k > 0 \\ +\eta\delta_\omega & \text{if } \bar{y} < 0 \text{ and } w_k < 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (6)$$

$$\bar{y} = \sum_{i=1}^n (x_i - s_i)w_i \quad (7)$$

Equation (7) shows the MLP part of (3). δ_ω is computed as follows.

$$\delta_\omega = \sum_{i=1}^n (x_i - s_i)w_i \sin(\omega + \alpha) + s_{n+1} \cos(\omega + \alpha) + \sqrt{\sum_{i=1}^{n+1} (x_i - s_i)^2} \sin\omega \quad (8)$$

The steps of traditional CSFNN algorithm are as follows. Firstly, weights of network and hidden layer center vector are initialized. Then hidden layer weight and center vectors are fixed. Finally cone folding is used for updating the angle parameter and back-propagation is used for updating the output layer weights. Thus the fine-tuning is done by switching between MLP and RBF decision areas.

The second angle parameter α is fixed by Dorffner. In this study, this parameter is also updated with gradient descent based cone folding method. Thus, fine-tuning is done on the height of each cone.

$$\Delta\alpha = \frac{\partial y}{\partial \alpha} \text{sign}(w_k) \quad (9)$$

$$\Delta\alpha = \begin{cases} +\eta\delta_\alpha & \text{if } y > 0 \text{ and } \bar{y} < 0 \text{ and } w_k > 0 \\ -\eta\delta_\alpha & \text{if } y < 0 \text{ and } \bar{y} > 0 \text{ and } w_k < 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (10)$$

$$\delta_\alpha = \sum_{i=1}^n (x_i - s_i)w_i \sin(\omega + \alpha) + s_{n+1} \cos(\omega + \alpha) \quad (11)$$

Updating of the angle α is done according to data between center of the cone and plane of degraded cone. This could be determined according to sign of propagation rule and MLP part of propagation rule together.

There are some restrictions, when the angle parameters are updated. The hidden CSFNN unit behaves like MLP unit when ω is equal to $\frac{\pi}{2}$ and similarly it behaves like RBF unit when $\omega + \alpha$ is equal to $\frac{\pi}{2}$. So possible values of updated angle parameter are between $\frac{\pi}{2}$ and $\frac{\pi}{2} - \alpha$ for ω and between $\frac{\pi}{2}$ and $\frac{\pi}{2} - \omega$ for α .

The weight and center vectors of hidden layer are fixed after initialization on Dorffner's studies (Dorffner and Porenta, 1993), (Dorffner, 1994). But only the weight vectors of output layer are updated with back-propagation algorithm. In this study, the weight vectors of hidden layer are also updated with gradient descent.

$$\Delta_{hidden} w_{ki} = \eta_{hidden} \delta_k (x_i - s_{ki}) (-\cos(\omega_k + \alpha_k)) \quad (12)$$

$$\delta_k = \sum_{j=1}^l \delta_j w_{kj} y_k (1 - y_k) \quad (13)$$

Derivation of hidden layer weights are defined as (12) and (13). After the initialization phase is completed, all of the weights and biases are updated with error back-propagation algorithm. At the same time, angle parameters of hidden layer are updated with gradient descent based cone folding algorithm to minimize SSE.

Genetic Algorithm: GA aimed to find the best solution has a population that includes the possible solutions for optimization problems. Each element of population is called a chromosome that is candidate to solve the problem. These chromosomes are updated with genetic operators on each cycle. In this way, although the GA starts up with specific area on search space, it looks for the other area with genetic operators for the appropriate solution. These genetic operators are selection, cross-over and mutation.

When a GA is used to solve a problem, there are two important issues. Those are fitness function and structure of chromosome. The chromosome coding varies according to problem such as binary coding, permutation coding, real coding and tree coding. At the same time, fitness function is a criterion to determine the selection probability of individuals for the next population. Order of individuals in current population is also provided by it.

GA steps are as follows, firstly a population is created then the solutions are produced for each chromosome on population according to fitness function.

These solutions show the importance of the chromosomes. If the appropriate value for the solution of the problem is not reached, genetic operators will be applied to create a new population. The previous steps are repeated until the appropriate solution is reached. If a population with the desired individual is created, GA will complete the search process and the best chromosome will be presented as the result of problem.

Test Results And Performance Evaluation

In this thesis, the methods are proposed for initialization and training phases of CSFNN. Updating of hidden layer weights and angle parameter α are proposed for training phase. Similarly, recursive GA is proposed for initialization phase. The well-known datasets are used for testing and comparing procedure. These datasets are explained shortly below.

Table 1. Data distribiton of datasets

	Data Count	Input Count	Class Count	Data Distribiton
Iris	150	4	3	50-50-50
Lenses	24	4	3	4-5-15
Wine	178	13	3	59-71-48
Ecoli	336	8	8	143-77-52-35-20-5-2-2
Haberman	306	3	2	81-225
Two Sprial	194	2	2	97-97

Table 2 shows the best result of each method on datasets. Each method is tested with different options and only the best results are presented. Each CSFNN is trained for 1000 iteration count. 66% of dataset is used for training and 34% of dataset is used for testing. The learning rates are 1.0 for angle parameter ω and 1.0 for weights between hidden and output layers. On initialization phase both GA and LVQ is used for hidden weight update and improved cone folding methods. For Iris dataset, all proposed methods are better than traditional CSFNN. For Lenses dataset, both GA-based CSFNN and GA-based CSFNN with improved cone folding have better SSE than traditional CSFNN, however traditional CSFNN has higher accuracy. On the other hand, GA-based CSFNN with hidden weight update reaches to smaller SSE and higher accuracy than traditional CSFNN. According to results of Wine datasets, all proposed methods are better than traditional CSFNN. The test results on Ecoli dataset show that CSFNN with improved cone folding has smaller SSE and higher accuracy than traditional CSFNN. However traditional CSFNN is better than GA-based CSFNN and CSFNN with hidden weight update.

Table 2. Comparison results of proposed methods versus traditional CSFNN

	INPUTS	OUTPUTS			
	Method	SSE of Train Set	SSE of Test Set	Accuracy of Train Set	Accuracy of Test Set
Iris	Traditional CSFNN	2,49334	1,06284	96/99	49/51
Iris	GA-based CSFNN	1,75876	0,97065	97/99	50/51
Iris	Imp. Cone Folding	1,55311	0,87585	98/99	50/51
Iris	Hidden Weight Update	1,52558	0,86028	98/99	50/51
Lenses	Traditional CSFNN	0,66089	1,62738	16/16	6/8
Lenses	GA-based CSFNN	0,17688	1,27916	16/16	5/8
Lenses	Imp. Cone Folding	0,44201	1,41571	15/16	6/8
Lenses	Hidden Weight Update	1,06013	0,87811	16/16	7/8
Wine	Traditional CSFNN	2,35393	2,11094	117/118	57/60
Wine	GA-based CSFNN	1,33949	2,25028	118/118	58/60
Wine	Imp. Cone Folding	1,38738	2,09714	118/118	58/60
Wine	Hidden Weight Update	1,66117	1,03415	117/118	60/60
Ecoli	Traditional CSFNN	14,51635	10,57254	199/220	97/116
Ecoli	GA-based CSFNN	18,45725	13,88524	196/220	95/116
Ecoli	Imp. Cone Folding	14,24579	10,51283	199/220	98/116
Ecoli	Hidden Weight Update	12,38830	13,84064	189/220	92/116
Haberman	Traditional CSFNN	20,55968	14,05706	156/201	76/105
Haberman	GA-based CSFNN	37,66485	23,17590	153/201	75/105
Haberman	Imp. Cone Folding	20,81351	14,07033	156/201	76/105
Haberman	Hidden Weight Update	20,48358	13,89984	157/201	77/105
Twospiral	Traditional CSFNN	19,54979	11,27561	72/128	31/66
Twospiral	GA-based CSFNN	23,96185	19,33291	79/128	30/66
Twospiral	Imp. Cone Folding	19,54624	11,36753	73/128	30/66
Twospiral	Hidden Weight Update	18,72544	13,51841	64/128	33/66

CSFNN with hidden weight update has smaller SSE and higher accuracy than traditional CSFNN according to test results on Haberman dataset. However the results of CSFNN with improved cone folding and GA-based CSFNN are very close to traditional CSFNN. The test results on Two Spiral Problem show that GA-

based CSFNN has higher accuracy, however traditional CSFNN has smaller SSE. On the other hand, the results of CSFNN with hidden weight update and CSFNN with improved cone folding are very close to traditional CSFNN.

Conclusion

In this study, hybrid neural network CSFNN is examined. The working idea behind CSFNN is combining advantages parts of two popular ANN MLP and RBF. The investigation on CSFNN shows that, initialization phase is very important for this network since there is not any update procedure on hidden layer weights and center vectors. Hence GA is adapted to CSFNN to determine the center vectors of hidden layer. By this method, two important problems for CSFNN are tried to be solved. One of them is determination of the center vectors and the second is hidden layer neuron number decision.

Cone folding algorithm is proposed by Dorffner to update tip angle parameters on CSF neurons for training phase. The investigation shows that, this technique provides fine-tuning on separated data. However this technique leads to strait efficiency for CSFNN. Hence improved cone folding algorithm is proposed to increase efficiency of standard cone folding algorithm. In this method second angle parameter between plane of degraded cone and input space is also updated with gradient descent based cone folding. It can be estimated that future studies are about to improve cone folding algorithm.

In traditional CSFNN error back-propagation algorithm is just used for weight updates between hidden and output layers. In this thesis, this training method is also used for updating weights between input and hidden layers. The investigation on CSFNN training phase shows that updating hidden layer weights requires more attention. Since the hidden layer weights updating varies on a large error space according to test results. Hence, training phase of CSFNN is still needs to be improved.

The test performances of the CSFNN with the proposed training versus CSFNN with classical training are done on Iris, Lenses, Wine, Ecoli and Haberman datasets of UCI machine learning repository and Two Spiral Problem dataset. All software developments are realized by using C# programming language. Utilizing the proposed methods, higher accuracy classification and smaller SSE are aimed. Although each proposed method does not give better solutions than traditional CSFNN for all datasets, hybrid approaches of these proposed methods are better than traditional CSFNN. Test results proved the efficiency of proposed methods.

References

- BROOMHEAD, D. S. and LOWE, D., 1988. Multivariable Functional Interpolation and Adaptive Networks. *Complex Systems* 2 , p. 321-355.
- DORFFNER, G. and PORENTA, G., 1993. On Using Feedforward Neural Networks for Clinical Diagnostic Tasks. Austrian Reserch Institute for Artificial Intelligence, Report No. OeFAI-93-24.
- DORFFNER, G., 1994. A Unified Framework for MLPs and RBFNs: Introducing Conic Section Function Networks. *Cybernetics and Systems: An International Journal*, 25(4): p. 511-554.
- KOHONEN, T., 1984. Self-organization and associative memory. *Springer Series in Information Sciences*, 8. Springer-Verlag, Berlin, p. 255.
- MOODY, J. and DARKEN, C., 1989. Fast Learning in networks of locally-tuned processing unit. *Neural Computation* 1, p. 281-294.
- RUMELHART, D.E., HINTON, G.E., WILLIAMS, R.J., 1986. Learning internal representations by error back-propagation. (David E. Rumelhart, James L. McClelland editors). *Parallel distributed processing: explorations in the microstructure of cognition*, vol. 1, MIT Press, Cambridge, p. 318 – 362.
- SMYTH, S. G., 1992. Designing Multilayer Perceptrons from Nearest-Neighbor Systems. *IEEE*, Vol. 3(2): p. 329-333.
- WERBOS, P., 1974. Beyond regression: New tools for prediction and analysis in the behavioral sciences. Harvard University, Ph.D. Dissertation.
- WEYMAERE, N. and MARTENS, J., 1994. On the Initialization and Optimization of Multilayer Perceptrons. *IEEE*, Vol. 5(5): p. 738-751.
- YILDIRIM, T., 1997. Development of conic section function neural Networks in software and analogue hardware. Liverpool University, Ph.D. dissertation.

SU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLEN KIVIRCIK MARUL BİTKİSİNDE MİKROALG (*Chlorella vulgaris*) UYGULAMASININ ETKİLERİ¹

Effects of Microalgae Chlorella vulgaris on Hydroponically Grown Lettuce

Onur ERGÜN
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Öğrencisi

H.Yıldız DAŞGAN
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

ÖZET

Deneme 2010 sonbahar yetiştiriciliği döneminde cam serada gerçekleştirilmiştir. Su kültürü tekniği ile marul yetiştiriciliğinde farklı besin dozlarında mikroalg (*Chlorella vulgaris*) kullanımının etkileri araştırılmıştır. Uygulamalar olarak; (1) Kontrol, %100 Besin: Tam doz besin çözeltisi verilmiştir. (2) %100 Besin+Alg: Tam doz besin çözeltisi ve alg uygulanmıştır, (3) %80 Besin: Tam besin dozuna göre %20 azaltılmış besin çözeltisi, (4) %80 Besin+Alg: Tam besin dozuna göre %20 azaltılmış besin, ve alg, (5) %60 Besin: %40 azaltılmış besin (6) %60 Besin+Alg: %40 azaltılmış besin ve alg, (7) %40 Besin: %60 azaltılmış besin (8) %40 Besin+Alg: %60 azaltılmış besin alg uygulanmıştır. Su Kültürü yetiştiriciliğinde mikroalg *Chlorella vulgaris* kullanımının, marul bitkisinde büyüme ve gelişme, verim ve bitki besin maddeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Denemede bitki boyu, yaprak sayısı, yaprak taze ağırlığı, kök taze ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, kök kuru ağırlığı, kuru ağırlık oluşturma yüzdesi, bitki çevresi, Vitamin C, klorofil ve nitrat içeriği önemli bulunmuştur. Yaprak alanı ve suda çözünebilir kuru madde (SÇKM) miktarı uygulamalardan etkilenmemiştir. Yapılan yaprak analizlerinde *Chlorella vulgaris* eklenen azaltılmış besin dozlarında algin marul bitkilerine N, P, Ca, Mg, Na, Mn, Cu ve Zn beslenmesi bakımından artırıcı katkılar sağladığı belirlenmiştir.

Çalışmanın genel sonuçları: su kültüründe algin kullanılarak kontrol bitkilerine göre besin çözeltisini %20 ve %40 azaltılması başarıyla gerçekleştirilmiştir ve marul üretimi bu şekilde yapılabilmiştir. Ayrıca bu durum temiz bir çevre ve doğa için önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, *Chlorella vulgaris*, *Lactuca sativa*, topraksız kültür, örtüaltı yetiştiriciliği

ABSTRACT

Experiment has been carried out in 2010 autumn-growing period in glasshouse in order to investigate the effects of different nutrient doses with microalgae (*Chlorella vulgaris*) under the hydroponic lettuce-growing conditions. The eight nutrient treatments have been realized: (1) %100 N+A : Full nutrition + algae, (2) %100 N: Full nutrition, (3) %80 N+A: %80 nutrition+algae, (4) %80 N: %80 nutrition, (5) %60 N+A: %60 nutrition +algae, (6) %60 N: %60 nutrition, (7) %40 N+A: %40 nutrition +algae, (8) %40 N: %40 nutrition.

*Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

The effects of microalgae *Chlorella vulgaris* on the plant growth, yield, plant nutrients and some lettuce quality parameters have been investigated. The plant height, leaf number, leaf fresh weight, dry leaf weight, root fresh weight, root dry weight, the percent of dry weight formation, leaf circle, Vitamin C, chlorophyll and nitrate contents of the leaf were significant. However, leaf area and the rate of water soluble dry material were not affected by the treatments. The leaf analysis showed that *Chlorella vulgaris* has been increasingly supported to the lettuce plants for N, P, Ca, Mg, Na, Cu, Mn and Zn nutrition under the decreased nutrients levels.

The general conclusions from the project work; fertilizer savings %20 and %40 can be achieved with lettuce plants controlled by using hydroponic culture in greenhouse. This also is served to clean environment.

Key Words: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, *Lactuca sativa*, soilless culture, Greenhouse production

GİRİŞ

Ticari anlamda durgun su kültürü yetiştirme dönemi kısa olan salata-marul ve yeşilliklerin üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla bitkiler besin çözeltisinde serbest olarak bırakılan hafif bir materyalin (köpük levhalar) üzerinde yetiştirilmekte ve bu yönteme 'yüzen su kültürü' olarak adlandırılmaktadır. Bu yetiştiricilik şeklinde bitki kökleri onların gereksinim duydukları makro ve mikro besin maddelerinin optimum düzeylerde sağlandığı, pH ve EC seviyelerinin optimal düzeylerde ayarlandığı, havalandırılan besin çözeltisi içerisinde bulunmaktadır. Yüzen su kültürü sistemi, genellikle yeşil aksamı küçük ve vejetasyon süresi kısa olan sebzelerin veya bitkilerin yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır.

Salata grubu sebzeler içinde salata ve marullar bütün Dünyada en çok tüketilen yeşil sebzeler arasındadır. On iki ay pazarlarda, marketlerde satılan Salata ve Marul tek yıllık serin iklim sebzesidir. Besin değeri bakımından sağlığa yararlı, iştah açıcı sebze olan Salata ve Marul'lar taze olarak tüketildiklerinden, özellikle vitamin ve mineral maddeler yönünden içerikleri zengindir. (Aybak, 2002)

Bitki gelişimine olumlu katkıda bulunarak verimliliği artıran mikroorganizmalara, "biyo-gübreler" veya "mikrobiyal gübreler" denilmektedir. Son yıllarda adı sıkça duyulmaya başlayan *Chlorella* bilinen en eski (2.5 milyar yıl) canlılardan ve besin kaynaklarından biridir. Aynı zamanda çekirdeği tam oluşmuş en eski tek hücreli organizmadır. *Chlorella*, yeşil bir tatlı su alg'idir. İsmi Latince yaprak/yeşil ve küçük anlamına gelen iki kelimeden üretilmiştir. Koyu yeşil renkte olan *Chlorella*'nın yeşilliği içindeki çok yüksek orandaki (bütün bitkiler içinde en yüksek) klorofil maddesinden gelmektedir. *Chlorella*'daki klorofil bilinen diğer alg türlerinden 5-10 misli fazladır.

Bitki yetiştiriciliğinde; mavi yeşil algler, yüksek bitkilere benzer fotosentez yolu ile oksijen üreten ve karbondioksit fiksasyonu yapan ve azot fikse eden tek organizmadır. Ürettikleri fotoasimilatlar bitkiler için önemli bir organik madde kaynağıdır. Bitkiler azot kaynağı nitrit, nitrat amonyum tuzları ve üre gibi organik bileşikleri kullanabilmekte, havadaki inorganik azotu (N_2) kullanamamaktadır. Havadaki azotu hem kullanabilen hem de organik forma dönüştürebilen

organizmalar mavi yeşil algler ve bakterilerdir (Sukatar, 2002). Mavi yeşil algler ayrıca Chlorophyll, Auxin ve Cytokininleri üretmektedir. Bunlar bitki büyüme ve gelişmesini teşvik ederek, ürün verimliliğini olumlu etkilemektedir. Köklenmeyi artırmaktadırlar. Kök bölgesinde pH ve EC seviyelerini bitki lehine düzenlemektedir. Kök bölgesinde mikroorganizma faaliyetlerinin artmasını teşvik etmektedir. Bitkilerin hastalıklara ve böceklere karşı dayanıklılığını artırmaktadır. Bitki için gerekli besinlerin taşınmasını hızlandırır.

Burada sunulan yüksek lisans tez çalışmasında, bir tatlı su algi olan *Chlorella vulgaris*'in, seralarda kullanılan topraksız yetiştiricilik sistemlerinden biri olan hidroponik su kültürüne eklenmesi ve aynı besin çözeltisi içerisinde *Chlorella vulgaris* ile beraber kıvrıcık marul bitkilerinin köklerinin bulunduğu yaşam ortamında, *Chlorella vulgaris* alginin marul-salata yetiştiriciliğine olabilecek katkılarını ortaya çıkarmaktır.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü deneme alanında 500 m² alana sahip cam bir seranın 1/3'lük kısmında gerçekleştirilmiştir. Denemede kullanılan *Chlorella vulgaris* mikroalg materyali Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden temin edilmiştir.

Bitkisel materyal olarak May Tohumculuk firmasına ait Arapsaçı kıvrıcık marul çeşidi kullanılmıştır. Marul bitkileri serada su kültürü ortamında, azalan besin maddeleri doz uygulamalarında mikroalg *Chlorella vulgaris* olduğu ve olmadığı kontrolleri ile karşılaştırmalı yetiştirilmiştir.

Tez çalışmasında aşağıdaki 8 uygulama ile hidroponik kültürde kıvrıcık marul bitkileri yetiştirilmiştir.

- 1) Besin Çözeltisi %100: Komple besin çözeltisi kullanılmıştır.
- 2) Besin Çözeltisi %100+Alg: Komple besin çözeltisi *Chlorella vulgaris* ile beraber uygulanmıştır.
- 3) Besin Çözeltisi %80: Komple besin çözeltisi tüm elementler bakımından %20 azaltılarak bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
- 4) Besin Çözeltisi %80+Alg: Komple besin çözeltisi tüm elementler bakımından %20 azaltılmış ve *Chlorella vulgaris* ile beraber bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
- 5) Besin Çözeltisi %60: Komple besin çözeltisi tüm elementler tüm bakımından %40 azaltılarak bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
- 6) Besin Çözeltisi %60 +Alg: Komple besin çözeltisi tüm elementler bakımından %40 azaltılmış ve *Chlorella vulgaris* ile beraber bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
- 7) Besin Çözeltisi %40: Komple besin çözeltisi tüm elementler bakımından %60 azaltılarak bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.
- 8) Besin Çözeltisi %40+Alg: Komple besin çözeltisi tüm elementler bakımından %60 azaltılmış ve *Chlorella vulgaris* ile beraber bitkilerin yetiştirilmesinde kullanılmıştır.

Metod

Çalışmada azaltılan besin dozlarında besin maddelerinin tamamı aynı aynı oranlarda azaltılmıştır. Bitki materyali olarak kullanılan kıvırcık marul tohumları torf:perlit (2:1) karışımı içeren viyollere, 26 Eylül 2010 tarihinde ekilmiştir. Fideler 22 Ekim 2010 tarihinde su kültürüne farklı uygulamalara transfer edilmiştir. Transferle beraber besin çözeltisi ve alg uygulamaya başlanmıştır. Bitkiler 50 litre hacimdeki sert plastikten yapılmış 105 x 55 cm ebadındaki dış kısımları siyah renkli ve üst kısım ışık geçiren şeffaf PVC malzemeden oluşturulmuş kaplarda, bitki kökleri havalandırılan besin çözeltisi içerisinde olacak şekilde "Yüzen su kültürü" (Floating Culture) yöntemi ile yetiştirilmiştir. Her kap bir tekrür olarak gerçekleştirilmiştir. Denemede yer alan farklı uygulamalar için, 4 tekrür ve her tekrürde 15 bitki olacak şekilde (60 bitki/uygulama) tesadüf blokları deneme desenine göre bitkiler su kültürü sisteminde yetiştirilmiştir.

Bitkilerin Beslenmesi: Denemede gübreleme işlemi için 100 kere konsantre stok çözeltiler hazırlanmıştır. Stoklarda çökme olmaması için iki ayrı stok çözelti tankı kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Marul bitkisi için su kültürü besin çözeltisi element konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Denemede kullanılan stok çözeltiler

STOK A	STOK B
Kalsiyum Nitrat	Potasyum sülfat
Potasyum Nitrat	Mono potasyum fosfat
Amonyum Nitrat	Magnezyum sülfat
Fe-EDDHA (sequestrene)	Mikro elementler
	Çinko sülfat yerli
	Borik asit yerli
	Mangan sülfat yerli
	Bakır sülfat yerli
	Amonyum molibdat

Çizelge 2. Denemede kullanılan besin elementi konsantrasyonları

Element	Mg L ⁻¹
N	200
P	50
K	300
Ca	200
Mg	65
Fe	19,6
Zn	0.552
B	0.97
Cu	0.12
Mo	0.128
Mn	0.96

Alg uygulamaları: *Chlorella vulgaris* içeren 2, 4, 6 ve 8 nolu uygulamalara, 2×10^{-7} alg ml⁻¹ konsantrasyonundaki stok alg solüsyonu deneme uygulamalarına göre besin dozları düzenlenmiş besin çözeltisi içerisine, 40 kez seyreltilmiş şekilde deneme kaplarında bulundurulmuştur. Alg uygulaması olmayan 1, 3, 5 ve 7 nolu uygulamalarda sadece besin dozu azaltılması yapılmış bu kaplara *Chlorella vulgaris* eklenmemiş yukarıdaki algi uygulamaların kontrolleri oluşturulmuştur. Hasat: Denemede hasat aşamasına gelen, çeşide özgü büyüklüğe ulaşan kıvırcık marul bitkileri dikimden 30 gün sonra, 22.11.2010'da hasat edilmiş adet ve ağırlıkları kaydedilmiştir. Yaprak Sayısı (adet / bitki): Kıvırcık marul bitkilerinin

yaprak sayısı teker teker sayılarak belirlenmiştir. Bitki/Yaprak Taze Ağırlığı (g/bitki): Bütün yaprak ağırlığı 0.1 hassasiyetteki bir terazide tartılarak kaydedilmiştir. Klorofil Miktarı (mg klorofil/g taze ağırlık): Marul bitkileri 4 eşit parçaya ayrılacak ve ¼'lük kısım %80'lik aseton ile homogenizasyon yapılarak elde edilen bitki ekstratından 652 nm dalga boyunda spektrofotometrede klorofil analizi yapılmış ve taze ağırlık başına hesaplanma yapılarak toplam klorofil miktarı hesaplanmıştır (Dasgan, 2003). Nitrat Miktarı (ppm): Marul bitkilerinin eşit olarak ayrılmış ¼'lük kısmı kullanılarak nitrat analizi salisilik asitin nitritleşmesi yoluyla kolorimetrik olarak Cataldo ve ark. (1975)'e göre yapılmıştır. Vitamin C okumaları spektrofotometre cihazında yapılmıştır. Yaprakta Besin Elementi Analizleri: Azot (N), fosfor (P), potasyum (K), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), sodyum (Na), demir (Fe), mangan (Mn), bakır (Cu) ve çinko (Zn) için analizler yapılmıştır. Verilerin Değerlendirilmesi: Deneme tamamlanınca elde edilen veriler JUMP paket programına tabi tutularak istatistiksel analizleri yapılmış, ortalamalar LSD testine göre karşılaştırılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE SONUÇLAR

Bitki Boyu (cm): Denemede, aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* eklenen yetiştirme ortamlarında, alg eklenmeyen kontrollerine göre marul bitkilerinin daha uzun boylu olduğu belirlenmiştir. Buna göre; %100 B+A uygulaması alg eklenmeyen %100 B uygulamasına göre %13.75 oranında, %80 B+A uygulaması alg eklenmeyen %80 B uygulamasına %15.49 oranında, %60 B+A uygulaması alg eklenmeyen %60 B uygulamasına %13.54 ve %40 B+A uygulaması alg eklenmeyen %40 B uygulamasına göre % 19.58 oranında daha uzun bitki boyuna sahip olmuşlardır.

Yaprak Taze Ağırlığı (Verim): Denemede farklı uygulamaların kıvırcık marulda verim üzerine etkisi değerlendirildiğinde, %100 uygulaması hariç diğer tüm uygulamalarda aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* eklenenler, eklenmeyenlerden daha yüksek verim oluşturmuştur. %80 besin dozunda *Chlorella vulgaris* eklenen uygulamaya eklenmeyen kontrolüne göre % 9.2 daha yüksek verim oluşturmuştur. %60 besin dozuna bakıldığında *Chlorella vulgaris* eklendiğinde eklenmeyen kontrolüne göre % 12.2 daha yüksek verim oluşturmuştur. Son uygulamalar olan %40 besin dozunda ise *Chlorella vulgaris* eklendiğinde eklenmeyen kontrolüne göre % 16.1 daha yüksek verim oluşturmuştur. Bu durum açıkça göstermektedir ki aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* ortama eklenince kıvırcık marulda verimlilik %9 ile 16 arasında artmıştır. İğinc bulgu besin dozu %100'den %40'a doğru azaltıldıkça *Chlorella vulgaris*'in algsiz uygulamaya göre daha artan oranlarda bitki ağırlığını başka bir deyişle verimliliği artırdığı görülmüştür. Oysa %100 B uygulamasına göre *Chlorella vulgaris* içermeyen uygulamalarda verim azalması %80, %60 ve %40 uygulamalarında sırasıyla %8.1, % 12.6 ve % 15.1 oranlarında olmuştur. Bu durumda serada hidroponik kültürde kıvırcık marul yetiştiriciliğinde besin çözeltisine eklenen gübreler %40 ve %60'a varan oranlarda azaltılabilir.

Rathore ve ark., (2009) soya bitkisinde deniz yosununun farklı oranlarda (%2.5-%5-%7.5-%10.0- %12.5 ve %15) uyguladıkları çalışmada dozlardan %12.5

ile %15 alg uygulamaları en yüksek verim değerlerini oluşturmuş ve algsiz kontrol grubuna kıyasla %57 ve %46 oranında daha fazla verim alındığı bildirilmiştir.

Marul Bitkilerinde Yaprakta Klorofil Miktarı: Denemede en yüksek klorofil miktarı içeren en yeşil yapraklar mg/g birimi ile %100 B+A uygulamasından 0.94 ile en düşük değer ise %40 B uygulamasında 0.40 olarak elde edilmiştir. Su kültüründe yetiştirilen kıvırcık marul bitkilerinin yapraklarında klorofil miktarının artmasında yetiştirme ortamına eklenen *Chlorella vulgaris* mikroalginin artırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Buna göre, %100 besin dozunda alg eklenen uygulama eklenmeyene göre %38 artış göstermiştir. Diğer uygulamalarda %80, %60 ve %40 besin dozlarında alg eklenen dozlarda eklenmeyenlere göre klorofil artışları sırasıyla %27, %42 ve %73 oranlarında gerçekleşmiştir.

Marul Yapraklarında Vitamin C Miktarı: Su kültürü tekniği ile marul yetiştirilen ortama *Chlorella vulgaris* eklendiğinde vitamin C miktarının kısmen arttığı görülmüştür. Denemede en yüksek vitamin C miktarı mg/100 g birimi ile %100 B+A uygulamasından 6.35 olarak alınmıştır. %40 B uygulamasında 4.5 olarak gözlenmiştir. *Chlorella vulgaris* kıvırcık marullarda vitamin C miktarı artmasına üzerine hafif etkide bulunmuştur. Aybak (2002)'a göre 100 g yenilebilir salata ve marulun çeşit ve yetiştirilme sezonu, koşullarına bağlı olarak içerdiği vitamin C miktarı 6-18 mg arasında olabileceği bildirilmektedir.

Marul Yapraklarında Nitrat Miktarı: Kıvırcık marul yapraklarındaki nitrat miktarları 2481 ve 3592 olarak gözlenmiştir. Denemede %80 besin dozuna *Chlorella vulgaris* eklendiğinde nitrat miktarı azalırken, %60 ve %40 gibi besin dozlarının giderek azaltıldığı iki uygulamada alg eklendiği durumda nitratın arttığı görülmektedir. Ancak her halükarda denemede ki nitrat miktarları insan sağlığı için risk oluşturacak düzeyde değildir.

Türkiye'de 2002 yılında yayınlanan Türk Gıda Yönetmeliği'ne göre, marul ve taze ispanakta en fazla bulunabilecek nitrat miktarı 3500 mg/kg (taze ağırlık başına), lahanada ise 875 mg/kg (taze ağırlık başına) olarak bildirilmektedir (Anonim, 2002). Rusya federasyonunun uyguladığı standartlarda ise marul, ispanak ve maydanozlarda maksimum nitrat miktarının 2000 ppm, Avrupa birliğinde ise maksimum nitrat konsantrasyonu ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte marulda 907-4674 olarak bildirilmektedir (Anonim, 2006).

Marul Bitkilerinde Besin Maddeleri Analizleri

Yaprakta Azot (N) Konsantrasyonu: Uygulamaların marul yapraklarında azot konsantrasyonu üzerine etkileri istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Azot konsantrasyonları %3.66 ile %4.59 arasında değişmiştir. Kıvırcık marul yapraklarındaki azot içeriğine bakıldığında %100 uygulamaları hariç diğerlerinde, aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* eklenen uygulamalar kendi kontrollerine göre daha yüksek azot içermiştir. **Yaprakta Fosfor (P) Konsantrasyonu:** Denemede farklı uygulamalar ile yetiştirilen marul yapraklarının P içerikleri istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Fosfor değerleri %0.31 ile %0.54 arasında değişmiştir. Tam besin dozu olan %100 uygulamaları hariç, diğer azaltılmış besin uygulamalarında aynı besin dozunda ortama *Chlorella vulgaris* eklendiğinde kendi kontrolünden daha

yüksek P içerdiği görülmüştür. Yaprakta Potasyum (K) Konsantrasyonu: Denemede yetiştirilen marulların yaprak K içerikleri %5.64 ile %7.06 arasında değişmektedir. Yukarıda incelenen N ve P elementlerinde olduğu gibi K bakımından *Chlorella vulgaris*'in marul bitkilerinin beslenmesine artı bir katkı sağladığı net bir şekilde görülememiştir.

Yaprakta Kalsiyum (Ca) Konsantrasyonu: Çalışmadaki marul bitkilerinin yapraklarındaki Ca konsantrasyonlarına bakıldığında aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* eklenen uygulama kendi kontrolünden daha fazla Ca içermiştir. Demir ve ark. (2003), 6 farklı organik gübre kombinasyonu ve geleneksel NPK gübre kullanılarak lital ve iceberg tipi marul yetiştirdikleri çalışmalarında, deniz yosunu uygulanan organik üretim parsellerindeki marul yapraklarında kalsiyum içeriğini ortalama % 1.33 olarak bildirmişlerdir. Yaprakta Sodyum (Na) Konsantrasyonu: Çalışmada kıvırcık marul bitkileri yapraklarındaki sodyum (Na) konsantrasyonları bakımından uygulamalar arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur. Çalışmada kıvırcık marul bitkileri yapraklarındaki sodyum (Na) konsantrasyonları bakımından uygulamalar arasında istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur. Denemede en yüksek değer %60 B+A uygulamasında %1.48 olurken, en düşük değer ise %40 B uygulamasında % 0.81 olarak gözlenmiştir. Bergman (1992)'e göre genel olarak bitkilerde Na konsantrasyonun %0.004 ile % 2.0 arasında olduğu bildirilmektedir. Su kültürü marul yetiştiriciliğinde *Chlorella vulgaris* kullanımı bitkilerde herhangi bir Na eksikliği veya fazlalığına neden olmadığı ve tuzluluk etkisi oluşturmadığı tespit edilmiştir. Yaprakta Magnezyum (Mg) Konsantrasyonu: Denemede marul bitkilerinin yapraklarındaki Mg konsantrasyonlarına bakıldığında, aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* içeren uygulamalarda Mg içeriğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Yaprakta Mikro Element Konsantrasyonları: Denemede farklı uygulamaların kıvırcık marul yapraklarındaki bakır konsantrasyonları 12.97 ppm ile 17.26 ppm arasında değişmiştir. Çalışmadaki marul bitkilerinin yapraklarındaki Mn içerikleri 132.76 ppm ile 222.78 ppm arasında değişmiştir. Çalışmadaki marul bitkilerinin yapraklarındaki Mn konsantrasyonlarına bakıldığında, aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* içeren uygulamalarda Mn içeriğinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Demir ve ark. (2003), deniz yosunu uygulanan ve organik üretilen marul yapraklarında Mn içeriğini ortalama 61.91 ppm olarak tespit etmişlerdir.

Farklı uygulamalarda marul yapraklarının Fe içerikleri 64.39 ppm ile 128.06 ppm arasında değişmiş olmamakla beraber istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Buna rağmen denemede marul bitkilerinin yapraklarındaki Fe konsantrasyonları, aynı besin dozunda *Chlorella vulgaris* içeren uygulamalarda kendi kontrollerine göre daha fazla Fe içeriği görülmektedir. Demir ve ark. (2003), deniz yosunu uygulanan ve organik üretilen marul yapraklarında Fe içeriğini ortalama 172.72 ppm olarak belirlemiştir.

Çizelge 3. Kıvırcık marul bitki büyüme ve kalite parametreleri

Uygulamalar	Bitki boyu(cm)	Verim (g/bitki)	Klorofil mg/g	Vitamin C mg/100g	Nitrat/mg nitrat/kg kuru ağırlık
%100 B*+A**	24.49 a	238.69 ab	0,94 a	6.35 a	2579 de
%100 B	21.53 bc	242.35 a	0,68 bc	6.25 a	2825 de
%80 B+A	22.81 ab	243.31 a	0,56 b-d	6.18 a	3105 bcd
%80 B	19.75 cd	222.77 bc	0,44 d	6.13 a	3395 ab
%60 B+A	20.97 bc	237.56 ab	0,68 bc	5.93 a	3592 a
%60 B	18.47 d	211.81 c	0,48 cd	5.75 a	2896 cd
%40 B+A	21.86 b	239.01 ab	0,69 b	5.00 b	3274 abc
%40 B	18.28 d	205.82 c	0,40d	4.50 b	2481 e
LSD _{0.05}	1.942	17.283	0.2002	0.7297	13.035

Çizelge 4. Denemede marul bitkilerinden alınan yaprak örneklerinde belirlenen makro elementlerin konsantrasyonları

Uygulamalar	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Na (%)	Mg (%)
%100 B+A	4.44 abc	0.53 a	5.64 c	0.84 bcd	1.37 ab	0.30 a
%100 B	4.55 ab	0.54 a	6.32 b	0.78 cde	1.06 abc	0.25 b
%80 B+A	4.59 a	0.50 ab	6.47 ab	0.90 bc	1.14 a-c	0.24 b
%80 B	4.04 d	0.42 b-d	6.52 ab	0.75 de	0,94 bc	0.18 c
%60 B+A	4.44 a-c	0.46 a-c	7.06 a	1.04 a	1.48 a	0.15 de
%60 B	4.40 b-d	0.39 c-e	6.49 ab	0.93 ab	0.87 c	0.12 ef
%40 B+A	4.24 cd	0.35 de	6.45 b	0.77 de	0.85 c	0.16 cd
%40 B	3.66 e	0.31 e	6.50 b	0.64 e	0.81 c	0.09 f
LSD _{0.05}	0.2850	0.0884	0.6011	0.1196	0.4937	0.03095

Çizelge 5. Denemede marul bitkilerinden alınan yaprak örneklerinde belirlenen mikro elementlerin konsantrasyonları

Uygulamalar	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Fe (ppm)	Zn (ppm)
%100 B+A	14.83 b	143.85 b	86.31	47.52 ab
%100 B	14.65 b	132.76 b	64.39	31.63 b
%80 B+A	12.97 b	162.12 b	103.14	40.54 ab
%80 B	12.53 b	142.34 b	93.48	47.54 ab
%60 B+A	13.07 b	197.12 b	123.81	41.11 ab
%60 B	13.62 b	142.36 b	104.13	54.88 ab
%40 B+A	17.26 a	222.78 a	68.74	42.92 a
%40 B	15.75 b	204.48 b	128.06	42.91 ab
LSD _{0.05}	9.3388	95.3178	77.7133	25.6355

En yüksek çinko konsantrasyonu %60 B uygulamasında 54.88 ppm ve en düşük çinko konsantrasyonu ise % 100 B 31.63 ppm olarak belirlenmiştir. Denemede *Chlorella vulgaris* içeren sadece %100 B+A uygulamasında kendi kontrolü %100 B uygulamasına göre %50.23 daha fazla konsantrasyonda çinko içerdiği tespit edilmiştir. Diğer alg içeren uygulamalarda kontrollerine göre bir artış görülmemiştir.

Sonuç

Denemede farklı mikroalg uygulamaların bitki boyu, yaprak miktarı, yaprak taze ağırlığı, verim, kök taze ağırlığı, kök kuru ağırlığı, yaprak kuru ağırlığı, kuru madde oluşturma oranına, bitki çevresi ve yaprakta klorofil miktarı üzerine etkisi olumlu ve artırıcı yönde bulunmuştur. Denemede ölçülen vitamin C üzerine alg etkisi az bulunmuş; yaprak alanı, ŞÇKM değeri üzerine uygulamaların etkisi önemsiz bulunmuştur. Denemede farklı uygulamaların mikro element bazında Cu, Mn ve Zn elementlerinde etkisi önemli bulunmuştur. Denemede farklı uygulamaların marul bitkisi yapraklarında mikro element içerikleri bakımından *Chlorella vulgaris* içerenlerin kendi kontrollerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Denemede kullanılan *Chlorella vulgaris* mikrolaginin azalan besin dozlarında dahi marul bitkisinde büyüme ve gelişmeyi, ürün verimini, bitkinin beslenmesini artırmasının sebebinin 3 şekilde açıklamaya çalışabiliriz;

- 1) Mikroalgler su kültürü ortamına salgıladıkları ligantlar (şelatlar) sayesinde ortamdaki besin çözeltilisindeki besin maddelerinden bitkinin dahi iyi faydalanmasına hizmet etmesi; besin maddelerinin köklere taşınmasında kolaylık, böylece alımda kolaylık ayrıca şelatlar besin maddelerinin bitki içerisinde taşınmasına da olumlu katkılarda bulunmaktadır,
- 2) Mikroalgler ürettikleri organik maddeler veya ölen alglerden sağlanan organik maddeler, çözünerek ve inorganik maddelere ayrışarak yine bitkilerin beslenmesine artı katkıda bulunurlar,
- 3) Son olarak mikrolaglerin ürettikleri bir takım enzimler ve hormonlar bitkilerin büyüme ve gelişmesinde ürün veriminde katkı sağlayabilir.

Denemede şu sonucunda; su kültüründe alg kullanarak gübrelemeden %20, %40 ve hatta %60 azaltma yoluna gidilebilir, bu durum üretimi olumsuz etkilemeyecektir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda;

- 1) Kıvırcık marul dışında, su kültürü tekniği ile en fazla yetiştirilen yetiştiriciliğinde *Chlorella vulgaris* ile olan etkileşimleri çalışılmalıdır,
- 2) Sera içerisinde su kültürü yetiştirme tekniği kullanılarak, dışarıya daha az veya hiç atık verilmeden kapalı bir sistem oluşturulması, algin ve bitkilerin ortak yaşaması üzerine daha uzun soluklu çalışmalar planlanabilir.

KAYNAKLAR

- ANONİM, 2002. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Resmi Gazete , sayı ,24885 Tebliğ no 2002/63, 23.09.2002
- ANONİM, 2006. ANONİM, 2006. Rusya Federasyonu Sağlık Bakanlığı Rusya Federasyonu Baş Sıhhi doktoru kararı (Meyve-Sebze Ürünleri). T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı. Antalya Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği Üyeleri. Sirküleri No:2006/91
- AYBAK, Ç.H.,2002. Salata ve Marul Yetiştiriciliği (Hasad Yayıncılık)

- BERGMANN, W., 1992. Evaluation of plant or leaf analysis results. In: Bergmann. W. (ed.). Nutritional disorders of plants. Gustav Fischer
- CATALDO D., HAROON, T., SCHADER, L.E. ve YOUNGS, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Communication of Soil sciences and Plant Analysis. 6: 7 1- 80.
- DAŞGAN, H.Y., ÖZTÜRK L., ABAK K. ve ÇAKMAK İ. , 2003. Activities of Iron-Containing Enzymes in Leaves of Two Tomato Genotypes Differing in Their Resistance to Fe chlorosis. Journal of Plant Nutrition, Vol. 26, Nos.10 & 11: 1997-2007
- DEMİR, H., GÖLÜKÇÜ M., TOPUZ, A., ÖZDEMİR, F., POLAT, E. ve ŞAHİN, H., 2003. Yedikule ve İnceberg Tipi Marul Çeşitlerinin Mineral Madde İçeriği Ekolojik Üretimde Farklı Organik Gübre Üzerine Uygulamalarının Etkisi
- RATHORE, S.S., CHAUDHARY, D.R., BORİCHA, G.N., GHOSH, A., BHATT, B.P., ZODAPE, S.T., PATOLIA, J.S., 2009. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (Glycine max) under rainfed. South African Journal of Botany 75 (2009) 351-355.
- SUKATAR, A., 2002. Alg Kültür Yöntemleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 184

BURUK OLMAYAN BAZI TRABZON HURMASI ÇEŞİTLERİNDE TOZLAYICININ MEYVE DÖKÜM ZAMANI VE MEYVE BÜYÜME HIZINA ETKİSİ¹

Effect of Pollinizer on Fruit Drop Periods and Periodical Changes on Fruit Diameter in Some Non-Astringent Persimmon Cultivars

Şenay KARABIYIK
Bahçe Bitkileri Anabilimdalı

Sinan ETİ
Bahçe Bitkileri Anabilimdalı

ÖZET

Bu araştırmada buruk olmayan bazı Trabzon hurması çeşitlerinde tozlayıcı kullanımının meyve döküm zamanı ve meyve büyüme hızına etkisi araştırılmıştır. Araştırma 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait Trabzon hurması parselindeki 17 yaşlı ağaçlarda yürütülmüştür. Çalışmada buruk olmayan Fuyu, Giant Fuyu, O'Gosho çeşitleri ve 31 TH 03 no'lu yerli tip ana çeşit; Bruniquel, Ghora Gali, Mandarino ve Mercatelli ise tozlayıcı çeşitler olarak kullanılmıştır. Ana çeşitlerde izolasyon, serbest tozlanma ve yapay tozlama uygulamaları yapılmış, aylık sayım ve çap ölçümleriyle meyve döküm zamanları ile meyve büyüme hızı belirlenmiştir.

Yapılan uygulamalar sonucunda meyve dökümlerinin ilk iki ayda fazla olduğu, sonra azaldığı belirlenmiştir. Genel olarak yapay tozlama uygulamalarında meyve dökümünün daha az olduğu, izolasyon uygulamasında ise sadece Fuyu'da çok düşük oranda meyve tutumunun gerçekleştiği saptanmıştır. Meyve büyümesinin de ilk üç ay hızlı olup daha sonra azalarak devam ettiği, ayrıca uygulamalar arasında meyve büyüme hızı açısından bir fark olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Trabzon hurması, Buruk olmayan, Meyve dökümü, Tozlanma

ABSTRACT

In this study, we have been studied the effect of using pollinizer on fruit drop periods and periodical changes on fruit diameter. Research was carried out in 2010 vegetation period with 17 years old persimmon trees in the Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Cukurova's persimmon research field. In the search, non-astringent Fuyu, Giant Fuyu, O'Gosho and 31 TH 03 local variety were used as main cultivars; Bruniquel, Ghora Gali, Mandarino and Mercatelli as pollinizers. Non-pollination, open-pollination and hand-pollination treatments were studied on main cultivars and the fruit drop periods and periodical changes on fruit diameter were determined with monthly counts and fruit diameter measures.

The results showed that, fruit drops were intense in first two months and then decreased. Besides this, it was determined that controlled-pollination

*Yüksek Lisans Tezi - MSc Thesis

decreased fruit drops compared with open and non-pollination treatments. In terms of seasonal changes in fruit growth, while it was fast in first three months, there were not any significant difference between treatments.

Key Words: Persimmon, Non-astringent, Fruit drop, Pollination

Giriş

Trabzon hurması Ebenales takımının Ebenaceae familyasına ait Diospyros cinsinin üyesidir. Diospyros cinsi yaklaşık 400 tür içermektedir. Ancak bunun yalnızca 4 türü ticari olarak meyve üretiminde kullanılmaktadır.

Trabzon hurması yetiştiriciliğinde meyve dökümü, periyodisite, meyve çatlaması ve buruk tat karşılaşılan en önemli problemlerdir. Bu sorunlar içerisinde meyve dökümü düzensiz meyve üretimini etkileyen ana faktörlerdendir.

Trabzon hurmasının çiçek yapısı ile bitkinin taşıdığı çiçek tipindeki farklılıklar tozlanma ve döllenme olaylarında bazı sorunların meydana gelmesine neden olmaktadır (Kitagawa ve Glucina, 1984). Trabzon hurmalarında erdişi, dişi ve erkek çiçekler olmak üzere 3 tip çiçek vardır (Onur, 1990). Meyve, ekonomik olarak dişi çiçeklerden elde edilmekte ve ticari çeşitlerin çoğu dişi çiçekleri taşıyan çeşitlerden oluşmaktadır (Eti, 2008). Erkek çiçek veren çeşitlerin çoğu tozlayıcı olarak önemli olmakla birlikte, buruk olmayan tozlayıcı çeşitler melezleme programlarında etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar (Yamada ve Yamane, 1994).

Trabzon hurmasının bazı çeşitlerinde görülen şiddetli meyve dökümü ve meyve tutumunun düşük olması konusu üzerinde değişik araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Bargandzhiya (1978), yeterli sayıda çiçek veren Tanenashi, Fuyu ve Khachiya çeşitlerinde çiçek ve meyve dökümünün şiddetli olduğu, meyve dökümünün yetersiz tozlanma ve yaz ortasındaki kuraklık gibi nedenlerle arttığını belirtmiştir. George ve ark. (1995), yaptıkları çalışmada tozlanmış çiçeklerin meyve tutumunun tozlanmamış olanlara göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, tozlanmış olan meyvelerde gelişimin tüm safhalarında daha hızlı büyüme olduğu ve bu meyvelerin taze ağırlıklarının tozlanmamış olanlara göre % 25 daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Yamamura ve Naito (1975) yaptıkları çalışmalarda meyve gelişiminin erken safhalarında küçük meyvelerin, dökümlere karşı büyük meyvelerden daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Kitagawa ve Glucina (1984), Japonya'da Trabzon hurması meyvelerinin 3 büyüme aşamasına sahip olduklarını, birinci aşamada büyümenin hızlı, ikincide yavaş, üçüncüde ise yine hızlı olduğunu belirtmişlerdir.

Bu araştırmada, buruk olmayan bazı Trabzon hurması çeşitlerinde farklı tozlama uygulamalarının meyve büyüme hızı ve meyve dökümleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırma, 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait 1989 yılında 6x6 m aralıklarla dikilmiş olan Trabzon hurması koleksiyon parselinde yürütülmüştür.

Denemede Fuyu, Giant Fuyu, O'Gosho, Ghora Gali, Bruniquel, Mandarino ve Mercatelli çeşitleri ile Hatay ilinden selekte edilmiş olan 31 TH 03 tipine ait Trabzon hurması ağaçları kullanılmıştır. Fuyu, Giant Fuyu, O'Gosho ve 31 TH 03 ana olarak; Bruniquel, Ghora Gali, Mandarino ve Mercatelli ise tozlayıcı olarak kullanılmıştır.

Uygulama yapılan çeşitlerde çiçeklerin açılmasından hemen önce her tipten seçilen 3'er ağaçta her uygulama için toplam 150 çiçek olacak şekilde serbest tozlanma, yapay tozlama ve izolasyon uygulamaları yapılmıştır. İzolasyon ve yapay tozlama uygulamalarında olası bir karışıklığı önlemek amacıyla çok küçük tomurcuklar ile açmış çiçekler koparılmış, ayrıca tüm uygulamalarda dalın besleme durumu ve taşıyabileceği meyve yükü göz önüne alınarak çiçek seyreltmesi yapılarak, her dal için ayrı ayrı olmak koşuluyla uygulamaya alınan çiçek sayıları kaydedilmiştir. İzolasyon uygulamaları kapsamında seçilen dallar üzerindeki henüz açmamış olan çiçekler bez torbalarla kapatılarak böcek veya rüzgar yardımıyla çiçek tozu taşınması engellenmiştir. Torbalar dişicik boruları tamamen kuruyuncaya kadar dallar üzerinde bırakılmıştır. Serbest tozlanma uygulamalarında ise sadece dal üzerindeki çiçekler seyreltilmiş ve doğal koşullara bırakılmıştır. Yapay tozlama uygulamalarında kullanılacak olan Bruniquel ve Ghora Gali tozlayıcı çeşitlerine ait henüz açmamış ancak açmak üzere olan çiçekler bir gün önceden toplanmış ve anterler filamentlerinden ayrılarak parlak kağıtlar üzerinde oda sıcaklığında bir gece boyunca bekletilmiştir. Bu şekilde anterler patlayarak içlerindeki çiçek tozlarının salınması sağlanmıştır. Denemeye alınan Trabzon hurması tiplerinde, çiçeklerde bulunan erkek organlar fonksiyonel olmadığı için emaskülasyon işine gerek duyulmamıştır. Elde edilen çiçek tozları ana çeşitlerdeki henüz açmamış ancak açmak üzere olan çiçeklerin taç yaprakları alındıktan sonra dişicik tepesi üzerine bir samur fırça yardımıyla aktarılmıştır.

Yapılan uygulamalarda uygulama başlangıcından hasada kadar aylık zaman aralıklarıyla kalan meyveler sayılmış ve elde edilen veriler sütun grafik haline getirilmiştir. Sayımlar sırasında her çeşide ait her uygulamadan 30'ar meyvede aylık çap ölçümleri yapılarak veriler meyve büyüme hızının belirlenmesi için çizgi grafik halinde sunulmuştur.

Denemeler 3 yinelemeli olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiş ve elde edilen değerler JMP ve Excell paket programında grafik haline getirilmiştir.

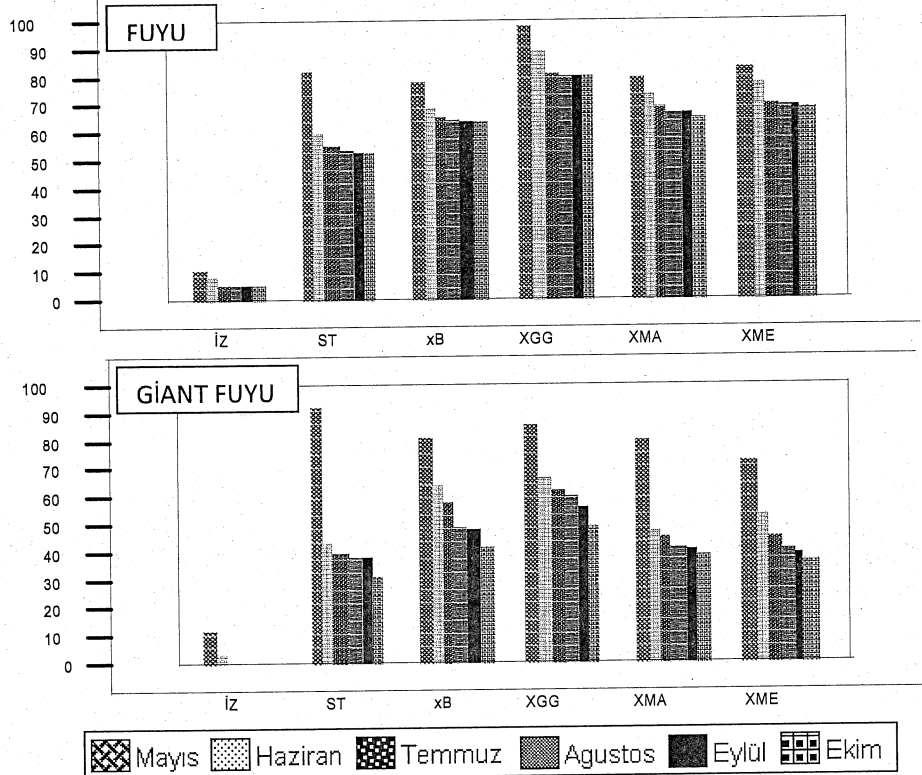
Bulgular ve Tartışma

Uygulamalardan Derime Kadar Değişik Tarihlerde Saptanan Meyve Tutma Düzeyleri

Uygulamaya alınan buruk olmayan Trabzon hurması çeşitlerinde yapılan izolasyon, serbest tozlanma ve değişik tozlayıcılarla yapay tozlama işlemi sonucunda, uygulama tarihinden meyvelerin derimine kadar geçen süre içerisinde aylık aralıklarla küçük meyve sayımları yapılmış ve bu değerler grafik haline getirilmiştir. Bu şekilde dökümlerin hangi dönemlerde yoğunlaştığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Fuyu çeşidinde dökümler yapay tozlama uygulamalarında en az düzeyde iken, en fazla dökümün izolasyon uygulamasında olduğu gözlenmiştir (Şekil 1). Dökümler genelde mayıs ve haziran aylarında diğer aylara göre fazla olmuştur. Temmuz ayı sayımında da döküm fazla görülmüş ancak, bu aydaki döküm ilk iki aya göre daha düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Ağustos, eylül ve ekimde ise dökümler olmuş, fakat dikkate alınacak oranlarda olmamıştır.

Giant Fuyu Trabzon hurması çeşidine ait meyve döküm grafiği Şekil 1'de verilmiştir. Giant Fuyu çeşidinde mayıs ve haziran aylarında şiddetli meyve dökümleri gözlenmiştir. Temmuz ve ağustos aylarında ise dökümlerin daha düşük düzeyde olduğu belirlenirken, derim öncesinde yine belirgin düzeyde dökümlerin gerçekleştiği saptanmıştır. Bunun yanında, Giant Fuyu çeşidinde, ilk iki sayımda görülen izolasyon uygulamasına ait meyveler 3. sayımda tamamen dökülmüş ve derim sırasında izolasyon uygulamasından meyve elde edilememiştir.

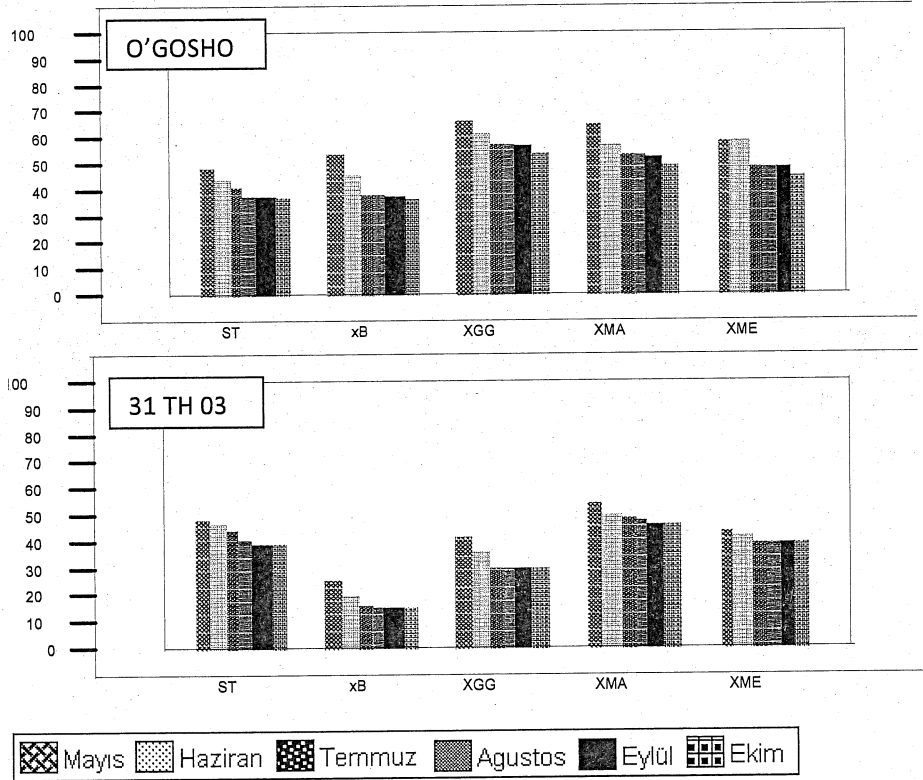


Şekil 1. Denemeye alınan bazı Trabzon hurmalarında yapılan farklı uygulamalarda aylık zaman aralıklarıyla saptanan meyve tutma düzeyleri(%) (İZ: izolasyon; ST: Serbest Tozlanma; xBR: Bruniquel çeşidi ile yapay tozlama;

xGG: Ghora Gali çeşidi ile yapay tozlama; xMA: Mandarino ile yapay tozlama; xME: Mercatelli ile yapay tozlama)

O'Gosho çeşidine ait aylık meyve dökümleri Şekil 2'de verilmiştir. İzolasyon uygulamasından hiç meyve elde edilemezken, en yüksek ve en düşük meyve dökümlerinin yapay tozlanmanın farklı uygulamalarında olduğu saptanmıştır. O'Gosho çeşidinde dökümler genelde Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında gerçekleşmiştir. Ağustos ve Eylül aylarında yapılan uygulamalarda çok önemli bir döküm olmazken, derim öncesinde az da olsa dökümler görülmüştür.

31 TH 03 no'lu tipte ise diğer çeşitlere göre farklı bir grafik sergilenmiştir (Şekil 2). Hatay bölgesine ait olan bu seleksiyon tipinde döküm ilk sayımda oldukça şiddetli olmuş ve bundan sonraki dönemlerde dökümler bazı uygulamalarda azalarak devam etmiştir. Ancak, Bruniquel, Ghora Gali ve Mercatelli tozlayıcı çeşitleri ile yapılan yapay tozlama uygulamalarında Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında döküm gözlenmemiştir. Bunun yanında meyve tutumunun genel olarak diğer çeşitlere göre düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 2. Denemeye alınan bazı Trabzon hurmalarında yapılan farklı uygulamalarda aylık zaman aralıklarıyla saptanan meyve tutma düzeyleri(%) (İZ: İzolasyon; ST: Serbest Tozlanma; xB: Bruniquel çeşidi ile yapay tozlama; xGG: Ghora Gali ile yapay tozlama; xMA: Mandarino ile yapay tozlama; xME: Mercatelli ile yapay tozlama)

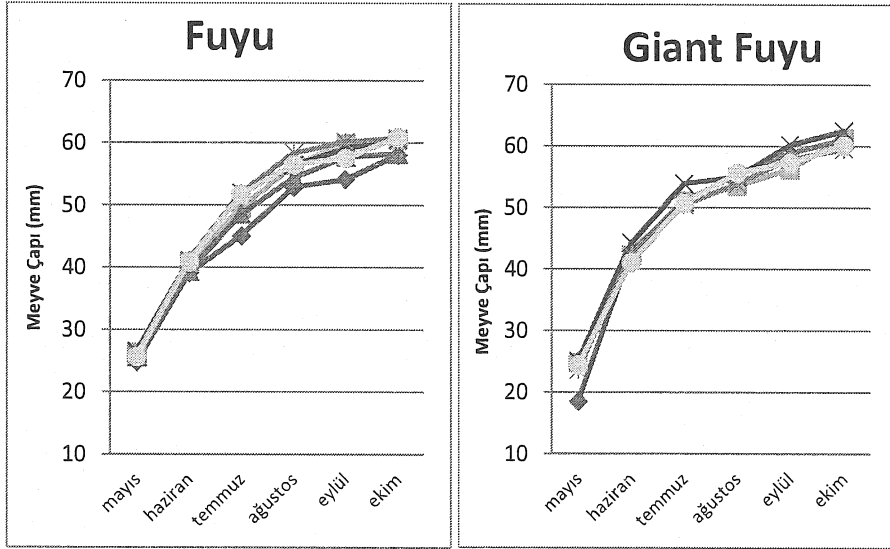
Genel olarak değerlendirildiğinde, en az meyve dökümü yapay tozlama uygulamalarında gerçekleşmiştir. İzolasyon uygulamalarında Fuyu çeşidi dışındaki çeşitlerde meyve elde edilememiş, denemeye alınan çiçeklerin uygulama gününden itibaren dökülmeye başladığı ve ilk sayımlara kadar tüm meyvelerin döküldüğü görülmüştür. Giant Fuyu çeşidinde ilk iki sayıma kadar ağaç üzerinde kalan izolasyon meyvelerinin de 3. sayıma kadar tamamen döküldüğü gözlenmiştir. Serbest tozlanma ve yapay tozlama uygulamalarında ise mayıs ve haziran aylarında çok fazla meyve dökümü olduğu saptanırken, temmuz ayında döküm oranının çeşitlere göre değişmekle birlikte azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, ağustos, eylül ve ekim aylarında meyve dökümleri gerçekleşmiş, ancak dökümler bu aylarda önemli seviyede olmamıştır (Şekil 1 ve 2).

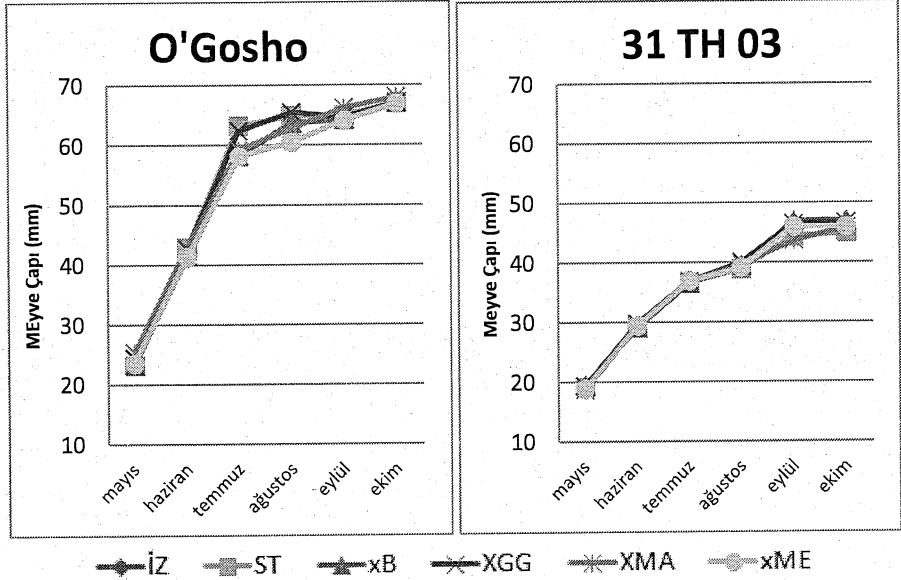
Sayılan (1995) Adana koşullarında yaptığı bir çalışmada, meyve dökümlerini belirlemek amacıyla incelemeler yapmış ve bunun sonucunda çeşitlerin çoğunda dökümlerinin ilk 3 ayda yoğun olduğunu, daha sonra döküm şiddetinin azaldığını veya hiç döküm olmadığını belirtmiştir. Messaoudi ve ark. (2009) ise yapay tozlanma ve serbest tozlanma uygulamaları yaptıkları Fuyu Trabzon hurması meyvelerinde dökümlerin Temmuz'un ilk haftalarında azaldığını belirlemiş, aynı zamanda tozlanma uygulamasının derim öncesi meyve dökümlerini de azalttığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da meyve döküm zamanları ve meyve dökümünü engelleyen uygulamalara ait bulguların, daha önce yapılmış çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyum içerisinde olduğu saptanmıştır.

Meyve Büyüme Hızı

Meyve büyüme hızını belirlemek amacıyla denemeye alınan çeşitlerde yapılan uygulamalarda aylık zaman aralıklarıyla 30'ar meyvede meyve çapı ölçümleri yapılmış ve elde edilen değerler çizgi grafik haline getirilmiştir (Şekil 3).

Çeşitler arasında büyüme zamanları açısından çok büyük bir fark olmamakla birlikte, mayıs, haziran ve temmuz aylarında meyve büyümesinin hızlı olduğu ve bundan sonraki aylarda azalan bir artışla devam ettiği belirlenmiştir. İstisna olarak 31 TH 03 no'lu tipte meyve büyümesi ağustos eylül ayları arasında da hızlı olmuş ve derim zamanına kadar diğer çeşitler gibi daha küçük bir ivmeyle büyüme süreci devam etmiştir.





Şekil 2. Denemeye alınan Trabzon hurmalarında yapılan farklı uygulamalardan elde edilen meyvelere ait zamana bağlı çap ölçüm değerleri (mm) (İZ: İzolasyon; ST: Serbest Tozlanma; xBR: Bruniquel çeşidi ile yapay tozlama; xGG: Ghora Gali ile yapay tozlama; xMA: Mandarino ile yapay tozlama; xME: Mercatelli ile yapay tozlama)

George ve ark. (1995), tozlanmış meyvelerin tozlanmamışlara oranla meyve büyümesinin tüm safhalarında daha hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada 9 farklı Trabzon hurması çeşidi kullanılmış, bu çeşitlerde izolasyon ve serbest tozlanma uygulamaları yanında, Ghora Gali çeşidi ile yapay tozlama yapılarak 21 günlük aralıklarla meyve çapları ölçülmüştür. Bütün çeşitlerde meyve büyüme hızında zamana bağlı olarak sürekli bir artış gözlenmiştir. Bu artışın ilk 3 ayda yüksek olduğu, sonraki aylarda ise giderek azaldığı tespit edilmiştir (Sayılıkan, 1995).

Kim ve ark (1997)'nin Fuyu çeşidinde yaptıkları tozlama çalışmalarında ise büyüme dönemlerini belirlemek amacıyla 10 günlük aralıklarla meyvelerde çap ölçümü yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, ilk dönemde hızlı bir büyüme eğrisi görülürken; eylül aylarına gelindiğinde, meyve büyümesinin yavaşladığı bildirilmiş ve büyüme hızının tozlayıcılara bağlı olmadığı saptanmıştır.

Bu çalışmada, meyve büyüme hızları arasında tozlayıcılara bağlı önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiş olup, bu sonuç yapılan diğer çalışmalarda elde edilen verilerle desteklenmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Bu araştırmada buruk olmayan bazı Trabzon hurması çeşitlerinde meyve dökümünün azaltılması amacıyla yapay tozlanma, serbest tozlanma ve izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Uygulamalarda yapılan aylık sayımlar sonucu meyve dökümlerinin hangi aylarda yoğunlaştığı belirlenmiş ayrıca büyümenin de hangi dönemde hızlandığı saptanmıştır.

Aylık sayımlar sonucu, Fuyu ve O'Gosho çeşitleri ile 31 TH 03 no'lu tipte dökümlerin temmuz ayına kadar şiddetli olduğu, bundan sonra ise derim zamanına kadar önemli dökümlerin olmadığı saptanmıştır. Bunun yanında, O'Gosho ve Fuyu çeşitlerinde partenokarpik meyve tutumunun yüksek olmasından dolayı belirli ölçüde derim öncesi dökümler de gerçekleşmiştir. Ancak, Giant Fuyu çeşidinde dalların üzerindeki meyveleri taşıyamayarak eğilmesi ile gerçekleşen meyve kayıplarından dolayı, diğer çeşitlerden farklı olarak derim zamanına kadar her ay meyve dökümlerinin gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu çeşitte ayrıca, yapay tozlanma uygulamalarında dökümlerin izolasyon ve serbest tozlanma uygulamalarına göre daha az olduğu belirlenmiştir. Meyve büyüme hızının yapılan uygulamalara bağlı olarak değişmediği gözlenmiştir. Meyve gelişiminin ilk 3 ayda hızlı olduğu belirlenirken, bundan sonra giderek azaldığı ve son aylarda tekrar hızlandığı saptanmıştır.

Sonuç olarak; Fuyu, Giant Fuyu ve O'Gosho çeşitleri için Ghora Gali, 31 TH 03 no'lu tip için ise Mandarino tozlayıcı çeşidinin kullanılması durumunda meyve tutumunun önemli ölçüde olumlu etkilenebileceği ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

- BARGANDZHIYA, A. G., 1978. Biological characteristics of flowering and fruiting of Oriental persimmon. Horticultural Abstracts. 48(9): 8630.
- ETİ, S., 2008. Bahçe Bitkilerinde Döllenme Biyolojisi Dersi Lisansüstü Ders Notları. 42 s.
- GEORGE, A. P., NISSEN, R. J., COLLINS, R. J. and RASMUSSEN, T. S., 1995. Effects of fruit thinning, pollination and paclobutrazol on fruit set and size of persimmon (*Diospyros kaki* L.) in Subtropical Australia. J. Hort. Sci., 70: 477-484.
- KIM, J., CHAE, Y. and KANG, S., 1997. Selection of economic pollinizers for Fuyu sweet persimmon. 1st internal Persimmon Sym. Acta Hort 436: 395-401.
- KITAGAWA, H. P. and GLUCINA, P. G., 1984. Persimmon Culture in New Zealand. DSIR Information Series, 159. Science Information Publishing Centre. 74 p.
- MESSAOUDI, Z., GMILI, R.E., KHATİB, F. and HELMY, Y., 2009. Effect of pollination, fruit thinning and gibberellic acid application on "Fuyu" kaki fruit development. IVth IS on Persimmon. Acta Hort. 833: 233-238.
- ONUR, S., 1990. Trabzon Hurması. Derim Dergisi Trabzon Hurması Özel Sayısı. 7(1): 4-47.
- SAYILIKAN, G., 1995. Bazı yerli ve yabancı Trabzon hurması çeşitlerinin döllenme biyolojisi üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. 143 s. (Yayınlanmamış).

- YAMADA, M. AND YAMANE, H., 1994. Efficiency of use of control genotypes for reducing yearly fluctations of quantitative fruit characters in Japanese persimmon breeding. Bull Fruit Trees Res. Stn. 26: 29-37.
- YAMAMURA, H. and NAITO, R., 1975. Mechanism of the thinning action of NAA in kaki fruits: 1. Relation between NAA-Induced fruit abscission and endogenous growth substances in fruit tissues. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 43: 406-414.

TUZLULUK VE KURAKLIK STRESLERİNE TOLERANS BAKIMINDAN BAMYA GENOTİPLERİNİN TARANMASI*

*Screening of the Okra Genotypes for Their Tolerans to Salinity and
Drought Stresses*

Sinem KÜÇÜKKÖMÜRCÜ
Bahçe Bitkileri

H. Yıldız DAŞGAN
Bahçe Bitkileri

ÖZET

Bu çalışmada, 37 adet bamy genotipinin tuz ve kuraklık streslerine karşı tolerans seviyelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Tuz ve kuraklığa yüksek tolerans gösteren bamy genotipleri üreticilere önerilebileceği gibi ilerde ıslah çalışmalarında gen kaynağı olarak da kullanılabilir. Bitkiler, "substrat kültürü" tekniği ile vermikulit ortamında yetiştirilmiştir. Bamy genotiplerinin tuz stresine tepkilerini ortaya çıkarmak için 200mM NaCl kullanılırken, kuraklık stresi kademeli su kesilerek oluşturulmuştur. Çalışmada, bamy bitkileri tuz ve kurak streslerinin yanı sıra stres olmayan kontrol koşullarında da yetiştirilmiştir. Denemede 24 günlük erken gelişme aşamasındaki bamy bitkileri ile çalışılmış, verime kadar gidilmemiştir. Farklı bamy genotiplerinin tuz ve kuraklığa tolerant olanlarını belirlemek amacıyla bir seri morfolojik ve fizyolojik ölçümler ve analizler yapılmıştır. Bunlar; 0-5 skalasına göre genotiplerde semptomatik zararlanmanın puanlandırılması, yeşil aksam taze ve kuru ağırlıkları, kök taze ve kuru ağırlıkları, yaprak sayısı, bitki boyu, yaprak alanı, membran zararlanma indeksi, SPAD-klorofil metre okumaları, yaprak oransal su içeriği, yaprak su potansiyeli, yaprak osmotik potansiyel, stoma geçirgenliği, yaprak sıcaklığı, yeşil aksam ve kökte Na, K, Ca ve Cl analizleridir. İncelenen tüm parametreler bakımından tuz ve kuraklık stresindeki bitkilerde kontrol bitkilerine göre oluşan % değişimler hesaplanmıştır. Ayrıca parametrelerin birbirleriyle olan ilişkileri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Abelmoschus esculentus*, NaCl stresi, kuraklık stresi, tolerans,

ABSTRACT

In this study, salinity and drought responses of the 37 okra genotypes have been investigated. The goal of the work was tolerance levels of the okra genotypes have been determined. The okra genotypes with high tolerance level can be suggest to the growers and also can be used as genetic material in breeding programs in the future. The plants have been grown in vermiculite by "substrate culture" technique. The bean genotypes have been grown with 200mM NaCl for salinity stress and irrigation was stopped gradually for drought stress. Control plants without stress have also been grown. Young plant stage (24 days old plant) was used for screening studies and plants were not been grown until fruit stage. In order to identified tolerance and susceptible okra genotypes some

* Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

morphological and physiological measurements and analysis have been realized; 0-5 scale evaluation for the symptomatic appearance of the plants, shoot fresh and dry weights, root fresh and dry weights, leaf number per plant, leaf area, SPAD chlorophyll meter reading, membrane injury index, leaf relative water content, leaf water potential, leaf osmotic potential, stomata conductance, leaf temperature, Na, K, Ca and Cl concentrations of the shoot and root samples. All these parameters' differences in salinity and drought stresses via control have been calculated. Also the relationships among the parameters have been investigated. At the end of the study, large variations have been determined in okra genotypes for their salinity and drought responses. Thirty-seven okra genotypes have been classified; tolerant, mild tolerant and susceptible. In general okra plants sometimes have been shown similar responses in saline and drought conditions, however, salinity stress more severe than drought stress.

Key Words: *Abelmoschus esculentus*, NaCl stress, drought stress, tolerance,

Giriş

Doğadaki çok çeşitli biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olur. Biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin etkisi altında bitkilerde ortaya çıkan değişimler stres olarak ifade edilmektedir. Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açmak suretiyle bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken üründe nitelik ve niceliğin yitmesine, bitkinin ve bitki organlarının yaşantısını yitirmesine neden olabilmektedir.(Kacar ve ark.,2006). "Küresel ısınma" atmosferde artan sera gazlarının potansiyel etkilerinden sadece birini ifade eden bir terimdir (Kadioğlu, 2001). Kuraklık, toprakta bitkiye yararışlı su miktarının azalması, atmosferik koşulların etkisiyle transpirasyon ve evaporasyon sonucu su yitmesinin sürmesi durumunda ortaya çıkar (Kacar ve ark., 2006).Kurak koşullarda önce toprağın, ardından bitkinin su potansiyeli azalır ve daha ileri safhalarda turgor basıncında düşme, stomalarda kapanma, yaprak büyümesinde azalma ve fotosentez oranında düşüş meydana gelir (Öztürk, 1998).

Tuzluluk; özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yıkanarak yeraltı suyuna karışan çözünebilir tuzların, yüksek taban suyuyla birlikte kapilarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır. Toprak tuzluluğu çoğunlukla yağış miktarı az, yüksek sıcaklık derecelerine sahip olan kurak ve yarı kurak bölgelerde ortaya çıkmakta ve böyle alanlarda ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır (Munns ve Termaat, 1986). Bamyanın dünyadaki üretim alanı 1020807 ha, ülkemizdeki üretim alanı ise 7300 ha dır.Üretim miktarı ise 6779215 ton iken ülkemizde 38432 ton dur.(FAO,2009). Çalışma kurak ve yarı kurak alanlarda üretimi artırabilecek yeni çeşitlerin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca bu çalışmada, bamy koleksiyonu içerisinde seçilen 37 farklı genotip ile tuz ve kuraklık streslerine karşı tarama çalışmaları yapılarak bamy genotiplerinin dayanıklılık seviyelerinin ortaya çıkarılması, ayrıca bu gen kaynaklarının tanımlanarak koruma altına alınması ve ileride yapılacak olan ıslah çalışmalarına materyal hazırlanması hedeflenmiştir. Türkiye'de geleneksel bir sebze olarak karşımıza çıkan bamyada (*Abelmoschus*

esculentus), tuz ve kuraklık stresi alanında yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır bu nedenle bu çalışmanın yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Denemenin bitki yetiştiriciliği kısmı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait 360 m² alana sahip plastik örülü bir serada 2010 Mayıs-Haziran aylarında, ölçüm ve analizler ise Bitki Fizyolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür. Bölümümüzün bamyaya gen bankasında bulunan 37 farklı genotip bitki materyali olarak kullanılmıştır.

Metot

Denemenin tamamında genç bitki aşamasında (25 günlük bitki) çalışılmış, bitkiler saksılarda substrat kültüründe yetiştirilmiş, meyveye kadar gidilmemiştir. Çalışma 3 uygulama şeklinde kurulmuştur. Bunlardan birisi kuraklık uygulaması, diğeri tuzluluk uygulaması ve bunlara paralel olarak kontrol uygulaması oluşturulmuştur. Denemeler su stresi uygulaması, tuz uygulaması ve kontrol uygulamasını içerecek biçimde, her uygulamada 4 saksı ve her saksıda 3 bitki olacak şekilde oluşturulmuştur. Her genotipten stres ve kontrol koşullarında ayrı ayrı en az 12'şer bitki olmuştur. Tesadüf blokları deneme deseni kullanılmıştır.

Kuraklık stresine ve tuz stresine maruz bırakılacak bitkiler 3 gerçek yapraklı aşamaya ulaşınca kadar kontrol bitkileri ile aynı sulama koşullarında yetiştirilmiştir. Bu aşamadan sonra strese başlanmıştır. 50 mM NaCl ile ilk tuz uygulaması ve 400 ml besin çözeltisi ile ilk kuraklık uygulaması başlanmış, kademeli olarak tuz konsantrasyonu artırılmış ve kademeli olarak kuraklık konsantrasyonu azaltılmış olup, 4 günün sonunda kuraklık uygulamasında 0 ml besin çözeltisi ve tuz uygulamasında 200 mM NaCl değerine ulaşılmıştır. Tuz uygulamasında bitkiler strese girinceye kadar her gün aynı dozda NaCl ile muamele edilmiştir. Kuraklık uygulamalarında ise dördüncü günden sonra sulama kesilmiştir.

Bitkiler serada 25 Mayıs – 17 Haziran 2010 tarihleri arasında yetiştirilmiştir. Tohumlar vermikulit içeren ortama, 2 litre kapasitedeki saksılara ekilmiştir. Her saksıda 3 bitki olacak şekilde ekim düzenlemesi yapılmıştır. On beş günlük, 3 yapraklı aşamaya ulaşınca kadar stressiz koşullarda büyütülen bitkiler bu aşamadan itibaren tuz ve kuraklık stersine maruz bırakılmıştır.

Besin Çözeltisi Kompozisyonu

Bitkilerin sulanmasında komple besin elementlerini içeren bir besin çözeltisi kullanılmıştır. Besin çözeltisindeki elementlerin konsantrasyonları şu şekilde belirlenmiştir; N: 172,20 mg/l, P: 52,70 mg/l, K: 328,44 mg/l, Mg: 26,30 mg/l, Ca: 120,30 mg/l, S: 22,47 mg/l, Fe: 1.68 mg/l, Mn: 0.85 mg/l, B: 0.44 mg/l, Zn: 0.30 mg/l, Cu: 0.85 mg/l.

Yapılan Ölçüm ve Analizler

Bitkilerde su ve tuz stresinden kaynaklanan zararlanmanın gözle görülen belirtilerini ifade edebilmek amacıyla, 0-5 skala değerlendirmesi yapılmıştır. Aşağıda belirtilen skalaların oluşturulması ön denemeler yapılarak belirlenmiştir. Bitkilerin zararlanma derecesine göre 0- 5 arasında puan verilmiştir.

0: Hiç etkilenme yok (kontrol bitkileri)

1: Su stresinden hafif etkilenme % 5'den fazla değil,

2: Alt yapraklarda solgunluk başlangıcı olabilir ve su stresinden etkilenme % 6-20 arası olabilir,

3: Yapraklarda kıvrılma, kapanma, solgunluk ve sararmalar % 21-50 arası streten etkilenme olabilir,

4: Yaprakların % 51-80 düzeylerinde şiddetli solgunluk, sararma, yapraklarda nekroz ve kurumalar,

5: Bitkide % 80 üzerinde geriye dönüşümsüz solma, yapraklarda kurumalar veya ölüm olabilir.

Deneme sonunda hasat edilen bitkilerde bitki boyu (cm), yaprak sayısı (adet), yaprak alanı (adet/bitki), bitki yeşil aksam ve köklerinin yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki), SPAD-klorofil metre okumaları, yaprak oransal su içeriği, yaprak membran zararlanması, yaprak su potansiyeli, yaprak sıcaklığı, stoma geçirgenliği, yaprak ozmotik potansiyeli belirlenmiştir. Ayrıca yeşil aksam ve köklerde Cl, Na, K, Ca element analizleri de yapılmıştır. Bitki yeşil aksam ve kök kuru ağırlıklarının belirlenebilmesi için bitki ve kök örnekleri, 65 °C sıcaklıktaki etüvde, 48 saat süre ile kurutulmuştur.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Tez çalışmasının bu kısmında 37 bamyı genotipinin tuz ve kuraklık stresleri karşısında gösterdiği tepkilere ait araştırma bulguları sunulmaktadır. Her bir incelenen parametre için bulguların hemen arkasından tartışması da yapılarak beraber sunulmuştur. Tuz ve kuraklık stresleri uygulanan bitkiler ile stres görmemiş kontrol bitkilerinde yeşil aksamda semptomolojik olarak ortaya çıkan zararlanmanın derecesini ortaya koyabilmek amacıyla bir skala oluşturulmuştur (0-5 skalası). Genel ortalamalara bakıldığında ise tuz stresi sonucunda tüm genotiplerin ortalaması 2.49 değerini verdiği, kuraklık stresinde ise tüm genotiplerin ortalaması 2.52 olduğu belirlenmiştir. Kuşvuran ve ark. (2008a), 34 bamyı genotipi ile yaptıkları bir kuraklık çalışmasında, görsel skala (0-5) değerleri bakımından genotiplerin farklı puanlamalar aldığını ve farklı tepkiler verdiğini bildirmişlerdir.

Tuz ve kuraklık stresinin bitki boyu bakımından ortaya çıkardığı tepkiler karşılaştırıldığında, tuz stresinin bitki boyunda meydana getirdiği azalmanın kuraklık stresine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Tuz stresi bamyı genotiplerinde genel olarak ortalama % 39.04 oranında bir azalmaya neden olurken, kuraklık stresinde bu oran % 21.71 düzeyinde gerçekleşmiştir. Tuz stresi altında tüm genotiplerin yaprak sayılarında değişen oranlarda azalmanın gerçekleştiği kontrollerine göre kayıplar esas alındığında genel ortalama olarak %25.63 oranında bir değişimin meydana geldiği saptanmıştır. Kuraklık stresi tuz

stresine oranla etkisini daha az gösterirken, tüm genotiplerde kontrollerine göre meydana gelen ortalama değişim % 17.14 olarak kaydedilmiştir. Kuşvuran ve ark. (2008), kurak stresi altında yetiştirdikleri farklı bamyada genotiplerinin yaprak sayıları bakımından, elli günlük kurak uygulaması sonucunda tüm genotiplerin yaprak sayılarında % 7.7 ile % 86 oranında azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Tuz ve kuraklık stresi çalışmada yer alan bamyada genotiplerinin tamamında yaş ağırlık değerlerinin azalmasına neden olmuştur. Genel olarak tuz stresi altında yetiştirilen bamyada genotiplerinin kontrol bitkilerine göre % 73.20 oranında değişim gösterdiği tespit edilirken, kuraklık stresinde görülen bu etkinin % 63.56 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Kuşvuran 2010, kavunda yeşil aksam yaş ağırlık değerlerinde tuz ve kurak stresinde genel ortalama olarak % değişimler değerlendirildiğinde tuz stresinde meydana gelen % değişimler, % 52.22 olurken kuraklık stresi koşullarında bu oran % 48.04 olarak saptanmıştır. Tuz ve kuraklık stresinin her ikisi de genel olarak bitkilerin kuru ağırlıklarında azalmalara neden olmuştur, aynı şekilde Kuşvuran (2010) kavunda tuz ve kuraklık stresi üzerine yaptığı çalışmada yeşil aksam kuru ağırlıkları bakımından incelenen kavun genotiplerinin tuz stresinden daha fazla etkilendiği tespit etmiştir. 200 mM NaCl uygulaması karşısında genotiplerin ortalama % değişim oranı % 54.50 olurken, kuraklık stresi koşullarında bu oran % 49.03 olarak tespit edilmiştir. Tuz ve kuraklık stresi bamyada genotiplerinin kök yaş ağırlığında azalmaya neden olmuş. Genel olarak her iki stres koşulunda da birbirine yakın oranda kayıplar meydana gelmiştir. Tuz stresi koşullarında oluşan % değişim oranı % 40.32 olurken. Kuraklık stresinde ortaya çıkan değişim % 32.97 oranında belirlenmiştir. Asraf ve ark. (2003), 100 mM NaCl konsantrasyonunda yetiştirdikleri bamyada genotiplerinde tuz stresinin büyümede azalmaya neden olduğunu, kök yaş ve kuru ağırlıklarında ise kayıpların ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Kök kuru ağırlıkları incelenen bamyada genotiplerinde tuz stresinin bitkileri daha fazla etkilediği belirlenmiştir. Tuz stresi koşullarında meydana gelen % değişimler genel ortalama olarak % 20.49 azalma düzeyinde saptanırken, kuraklık stresinde bu azalma oranı % 14.53 olmuştur. Klorofil miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışın yaprağın birim alanının azalması ve yaprak kalınlığının artmasına bağlı olduğu saptanmıştır. Kuraklık stresi ve tuz stresi bitkilerin yaprak alanında kontrol bitkilerine göre azalmayı meydana getirmiştir. Sankar ve ark. (2008), beş farklı bamyada çeşidinde yaptıkları çalışmada, kuraklık stresinin yaprak alanı ve net asimilasyon oranında kontrol bitkilerine göre azalmalara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Kuşvuran (2010), kurak koşullarda yetiştirilen kavun bitkilerinden alınan yapraklar da oransal su içerikleri açısından değerlendirmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında kurak koşullarda genotiplerin birbirine yakın değerler oluşturduğu görüşüne varılmış. Tuz ve kuraklık çalışmaları sonucu elde edilen değerler bakımından yaprak oransal su içeriğinin genel olarak kuraklık stresinden daha fazla etkilendiği görülmüştür. Tuz stresi koşullarında yaprak oransal su içeriğinde kontrole göre ortalama % 28.29 oranında azalma, kuraklık stresinde ise % 10.18 oranında azalma şeklinde görülmüştür. Tuz ve kurak koşullarda yetiştirilen 37 bamyada genotipinin yaprak hücrelerinde meydana gelen zararlanma bakımından ortaya çıkan değişimler, her iki stres koşulunda farklı

sonuçlar ortaya çıkarmıştır, bitkiler tuz stresinden daha fazla etkilenmiş olup ortalama % 16.16 oranında hücre membranlarında zararlanma meydana getirirken, kurak koşullarda yetiştirilen bitkilerde bu oran ortalama % 2.34 olduğu belirlenmiştir. Hücrelerde stres sonrası meydana gelen zararlanma her iki stres koşulunda da benzer değerler göstermekle birlikte tuz stresinde genotiplerin ortalama % değişimi % 34.25 olmasına karşın kuraklık stresinde % 30.60 olarak belirlenmiştir (Kuşvuran,2010). Tuz stresi etkisi ile tüm genotiplerin ortalaması % 6.61 değerini alarak kontrol koşullarına (% 1.06) göre Cl iyonu yönünden önemli bir artış göstermiştir. Genel ortalamalara bakıldığında kontrol bitkileri köklerine göre, tuz stresi etkisiyle tüm genotiplerin kök klor ortalamasının % 466.79 arttığı belirlenmiştir. Kuşvuran ve ark. (2007) kavun genotiplerinde yaptıkları çalışma sonucunda, tüm kavun genotiplerinde NaCl içeren ortamında yetiştirme sonrası Cl⁻ iyonu artışının olduğunu ve bu artış oranları arasında çok büyük farklılıkların ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Bu sonuçlar yaptığımız çalışmanın klor sonuçları ile uyum göstermektedir.

Tuz stresi bamyaya genotiplerinin bünyesinde Na konsantrasyonu artışına neden olmuştur. Kontrol koşullarında yetiştirilen bitkilerin içerdiği Na konsantrasyonu ortalama olarak % 1.196 olmasına karşın 200 mM NaCl uygulaması, bu değer % 3.19 düzeyine çıkmasına neden olmuştur. Tuz ve kurak stresin bitkilerin yeşil aksam Na içerikleri bakımından oluşturdukları değişimler incelendiğinde, tuz stresinin Na içeriğinde önemli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Genotiplerin genel ortalaması yönünden incelendiğinde tuz stresinde % 4.59 oranında gerçekleşen Na konsantrasyonu, kuraklık stresi altında % 0.34 oranında kalmıştır (Kuşvuran,2010). Kontrol koşullarında yetiştirilen bitkilerin köklerinde içerdiği Na konsantrasyonu ortalama olarak % 1.408 olmasına karşın, 200 mM NaCl uygulaması, bu değer % 316.99 düzeyine çıkmasına neden olmuştur. Tuz ve kurak koşullarda yetiştirilen bamyaya genotiplerinde kontrollerine göre % değişim ise K konsantrasyonu bakımından tuz uygulanan bitkilerde genel olarak ortalama % 33.08 oranında azalma meydana gelirken, kuraklık stresi altında yetiştirilen genotiplerde bu ortalama % 3.80 oranında azalma şeklinde gerçekleşmiştir. Tuz ve kurak koşullarda yetiştirilen bamyaya genotiplerinde kökte K konsantrasyonu bakımından kontrole göre % değişim tuz uygulanan bitkilerde genel olarak ortalama % 77.48 oranında artma meydana gelirken, kuraklık stresi altında yetiştirilen genotiplerde bu ortalama % 9.14 oranında artma şeklinde gerçekleşmiştir. Tuz ve kuraklık stresi sonucu köklerdeki K iyonu kontrol bitkilerine göre azalma göstermiştir. Yeşil aksam K konsantrasyonu değerlerinden farklı olarak kök bölgesinde kuraklık stresi sonu K iyonundaki azalmanın tuz stresine oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Tuz stresinde genotiplerin kontrol bitkilerine göre değişimleri dikkate alındığında K iyonu % değişimi % 26.87 olmasına karşılık kuraklık stresinde bu oran % 32.38 düzeyine çıkmıştır (Kuşvuran, 2010).

Tuz stresinde yeşil aksam Ca konsantrasyonu artarken (% 4.02) kuraklık stresinde azalmıştır (% 1.42) olmuştur. Tuz stresi koşullarında köklerde Ca konsantrasyonu ortalama olarak % 0.98 iken, kuraklık stresi altındaki bamyaya köklerinde ise ortalama % 0.57 olarak belirlenmiştir. Kuşvuran (2010),

Çalışmasında tuz ve kuraklık stresleri sonunda genotiplerde yeşil aksam Ca konsantrasyonları ve kontrole göre değişimleri (%) kuraklık stresinde meydana gelen değişimler, tuz stresi ile karşılaştırıldığında Ca konsantrasyonlarının kuraklık stresinden daha fazla etkilendiği düşünülmüştür. Tuz stresinde ortalama % değişim % 26.13 iken, kuraklık stresinde bu oran % 39.78 olmuştur.

Yeşil aksamda K/Na oranı bakımından tuz uygulanan bamyada bitkilerinin, uygulanmayan kontrol bitkilerine göre ortalama %76.27 düzeyinde önemli bir azalmanın gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol bitkileri köklerinde K/Na oranı genotiplerin ortalaması olarak 3.01 oranına sahipken tuz bitkilerinde tüm genotiplerin ortalaması olan K/Na oranı 1.16 olarak hesaplanmıştır. K/Na oranının yüksek olması, bitkinin Na^+ iyonu yerine K^+ iyonunu tercih ettiğini ve bunu ya dışarıdan aldığı veya yaşlı yapraklardan genç yapraklara taşıdığını göstermektedir. 200 mM NaCl uygulanan bamyada genotiplerinin yeşil aksamda Ca/Na oranları kontrol bitkilerine göre ortalama % 14.89 oranında azalma göstermiştir. Kökde Ca/Na oranı bakımından tuz stresindeki bitkiler kontrollerine göre ortalama % 24.84 daha düşük bir değer göstermiştir. Tuz ve kuraklık stresi karşılaştırılacak olunursa tuz stresinde yaprak su potansiyeli bakımından bitkiler % 102.98 oranında kontrol bitkilerine göre azalma göstermiştir. Kuraklık stresi ise kontrole göre % 61.76 oranında azalma göstererek tuz stresinden daha az düzeyde bitkiler strese girmiştir. Tüm genotiplerin ortalaması değerlendirildiğinde ise tuz stresinin genel ortalaması $33^{\circ}C$ değerini alırken kontrol bitkileri $28^{\circ}C$ değerindedir. Kuraklık stresinde tüm genotiplerin ortalaması $29^{\circ}C$ değerini almıştır. Tuz ve kuraklık stresleri genellikle yüksek sıcaklık stresiyle beraber ortaya çıkabilmektedir. Bitkinin düşük yaprak sıcaklığına sahip olması transpirasyonla kendini serinletme çabası olarak strese karşı bir adaptasyon mekanizması olabilir (Dasgan, 2008). Tuz ve kuraklık stresi karşılaştırıldığında tuz stresi altındaki bitkilerin stoma iletkenliği bakımından genel ortalamasında kontrole göre % 54.08 oranında azalma olduğu belirlenirken, kuraklık stresi karşısında genotiplerin genel ortalaması kontrole göre % 34.90 oranında azalma göstermiştir. Tuz ve kuraklık stresi altındaki genotipler, kontrol bitkilerine göre değerlendirildiğinde, tuz stresinde ortalama % 128.64 oranında artış görülmüştür. Kuraklık stresi ise yaprak ozmotik potansiyeli bakımından tuz stresinden daha az düzeyde genel olarak ortalama % 12.12 oranında artış göstermiştir.

Tuz stresi karşısında toplam 12 genotip dayanıklı, 13 genotip orta düzeyde dayanıklı ve 12 genotip duyarlı olarak belirlenmiştir. Kuraklık stresi karşısında ise toplam 12 genotip dayanıklı, 14 genotip orta dayanıklı ve 11 genotip duyarlı olarak belirlenmiştir.

Çizelge 1. Tuzluluk ve kuraklık stresleri altında bitkilerin ortalama değerleri

Parametreler	Kontrol	Tuz	Kurak	Kontrolle göre % değişim	
				Tuz	Kurak
Skala	-	2.49	2.52	-	-
Bitki Boyu	16.10	9.69	12.48	-39.04	-21.71
Yaprak Sayısı	3.05	2.25	2.50	-25.63	-17.14
Y.A.Y.A.	12.92	3.25	4.37	-73.20	-63.56
Y.A.K.A.	0.90	0.36	0.46	-56.18	-44.87
Kök Yaş Ağırlık	5.75	3.0	3.5	-40.32	-32.97
Kök Kuru Ağırlık	0.38	0.28	0.31	-20.49	-14.53
Klorofil	37.71	42.97	43.44	14.60	15.40
Yaprak Alanı	260.08	80.74	92.76	-64.87	-59.90
RWC	90.16	64.68	80.93	-28,29	-10,18
MII	-	16.16	2.34	-	-
Yeşil Aksam Cl	1.06	6.61	-	560.16	-
Kök Cl	0.96	4.61	-	466.79	-
Yeşil Aksam Na	1.196	3.194	-	176.71	-
Kök Na	1.408	5.486	-	316.99	-
Yeşil Aksam K	5.165	3.365	4.841	-33.08	-3.80
Kök K	3.882	5.746	3.827	77.48	9.14
Yeşil Aksam Ca	1.910	4.022	1.420	123.86	-20.76
Kök Ca	0.492	0.988	0.575	152.11	48.32
Yeşil Aks. K/Na	4.51	1.07	-	-74.55	-
Kök K/Na	3.01	1.16	-	-50.23	-
Yeşil Aks. Ca/Na	1.65	1.27	-	-14.89	-
Kök Ca/Na	0.35	0.19	-	-24.84	-
Yaprak Su Pot.	-0.07	-0.13	-0.10	102.98	61.76
Yaprak Sıcaklığı	28.00	33.46	29.05	19.58	3.85
Stoma Geçirg.	518.08	104.51	161.35	-54.08	-34.90
Yap. Ozmo. Pot.	473.87	717.48	539.28	128.64	54.79

Çizelge 2. Tuz ve kuraklık stresleri sonucunda genotiplerin toleranslık düzeyleri

TUZ			KURAK		
Dayanıklı	Orta Dayanıklı	Duyarlı	Dayanıklı	Orta Dayanıklı	Duyarlı
Okr-3	Okr-91	Okr-1	Okr-20	Okr-6	Okr-1
Okr-6	Okr-102	Okr-11	Okr-73	Okr-11	Okr-3
Okr-45	Okr-108	Okr-20	Okr-82	Okr-43	Okr-45
Okr-73	Okr-111	Okr-43	Okr-93	Okr-89	Okr-47
Okr-82	Okr-127	Okr-47	Okr-102	Okr-91	Okr-115
Okr-89	Okr-131	Okr-93	Okr-105	Okr-101	Okr-123
Okr-105	Okr-133	Okr-101	Okr-110	Okr-108	Okr-126
Okr-109	Okr-134	Okr-112	Okr-111	Okr-109	Okr-133
Okr-110	Okr-135	Okr-126	Okr-131	Okr-112	Okr-134
Okr-115	Okr-137	Okr-139	Okr-135	Okr-127	Okr-140
Okr-123	Okr-140	Okr-141	Okr-141	Okr-137	Okr-145
Okr-152	Okr-145	Okr-151	Okr-152	Okr-139	
	Okr-149			Okr-149	
				Okr-151	

Sonuç

Toplam 37 adet bamy genotipi ile gerçekleştirilen kuraklık ve 200 mM NaCl uygulanması ile oluşturulan tuz stresi karşısında genotiplerin farklı dayanıklılık ve duyarlılık seviyeleri gösterdikleri belirlenmiştir.

Her iki stres koşulunda da yeşil aksam ağırlıklarının, kök ağırlığına oranla daha fazla etkilendiği, bitki boyu, yaprak sayısı ve yaprak alanı gibi parametrelerin stres koşulları altında azalma gösterdiği saptanmıştır. Klorofil miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Tuz ve kuraklık stresi yaprak oransal su içeriğinde azalmaya neden olmuş; bu azalma tuz stresi koşullarında biraz daha belirginleşmiştir. Tuz ve kuraklık stresleri karşılaştırıldığında tuz stresinin yaprak membranlarına olan zararı kuraklık stresinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Her iki stresin de membran zararlanma indeksleri bakımından benzer etkiler oluşturdukları görülürken, tuz ve kuraklığa toleransı yüksek olan genotiplerde indeksin daha düşük çıktığı, hassas olan genotiplerde ise indeks derecesinin arttığı belirlenmiştir. Tuz stresi ile birlikte bitki bünyesinde artan Na iyonu, K ve Ca iyonlarının alımını sınırlandırmıştır. Tuza karşı hassas olan genotiplerde yeşil aksam ve kök kısmında K ve Ca iyonlarının miktarları toleran genotiplere oranla daha düşük olmuştur. Kuraklık stresi koşullarında bünyesinde K ve Ca iyonu daha fazla olan genotiplerin kuraklık stresi karşısında tolerans düzeylerinde artış gösterdiği saptanmıştır. Her iki stres koşulunda da meydana gelen bu değişimler karşılaştırıldığında K iyonunun yeşil aksam bakımında tuz stresinde daha fazla etkilirken, Ca iyonunun da tuz stresinden daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir. Yaprak ve köklerde K/Na oranı ve Ca/Na oranları genotiplerin stres koşullarında

tercimini belirleyen en önemli parametreler arasında bulunduğu belirlenmiştir. Tuz ve kuraklık stresi sonucunda yaprak su potansiyeli parametresi her iki streste de artma göstermiştir. Yaprak sıcaklığı tuz stresi ve kuraklık stresi altında yetiştirilen genotiplerde artış göstermiştir. Tuz ve kuraklık stresinin genotiplerdeki etkisi stoma iletkenliği yönünden incelendiğinde tuz stresinin genotiplerin stomalarının açılıp kapanma mekanizmasını kuraklık stresinden daha fazla etkilediği belirlenmiştir. Yaprak ozmotik potansiyeli bakımından tuz ve kuraklık stresi sonucunda genotiplerin arttığı saptanmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda yeni çeşitlerin elde edilebilmesi için bu genotiplerin bir ıslah materyali olarak kullanılması, hem yerel materyalin korunması açısından hem de kurak ve yarı kurak alanlarda üretimi artırabilecek yeni çeşitlerin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Her iki stres faktörü sonucunda elde edilen veriler ve tolerans düzeyleri belirlenen genotipler özellikle bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmalar için öncülük edecektir. Çalışma kurak ve yarı kurak alanlarda üretimi artırabilecek yeni çeşitlerin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

Kaynaklar

- ASHRAF., M., BASHIR., A., 2003. Salt stres induced changes in some organic metabolits and ionic relations in nodules and other plants parts of two crop legumes differing in salt tolerance. *Flora*198; 486-498.
- DAŞGAN H. Y., 2008. "İklim Değişikliğinin Sebze Tarımına Etkileri (Yüksek Sıcaklık Stresi)" VII. Sebze Tarımı Sempozyumu, YALOVA
- FAO, 2009. FAOSTAT, Agriculture Database. <http://apps.fao.org>.
- KACAR,B., KATKAT,A.,V., Öztürk.Ş., 2006. Bitki fizyolojisi kitabı.
- KADIOĞLU, M., 2001: İklim Değişiklikleri Ve Etkileri: Meteorolojik Afetler TMMOB Afet Sempozyumu Bildiriler Kitabı Ankara 47-55.
- KUŞVURAN, Ş., DAŞGAN, H.Y., ABAK, K., 2008a. Farklı Bamyı Genotiplerinin Kuraklık Stresine Tepkileri. VII. Sebze Tarımı Sempozyumu, 26-29 Ağustos, Yalova
- KUŞVURAN, Ş., DAŞGAN, H.Y., ABAK, K., 2008. Kavunda Kuraklık Çalışmalarında Kullanılan PEG 6000 Dozunun Belirlenmesi üzerine Bir Araştırma. VII. Sebze Tarımı Sempozyumu, (26-29 Ağustos 2008), Yalova.
- KUŞVURAN, Ş., 2010. Kavunlarda Kuraklık Ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar Çukurova Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Doktora Tezi 356 sayfa, Adana
- ÖZTÜRK A.1998. "Kuraklık Kışlık Buğdayın Gelişmesi ve Verime Etkisi" Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 25240 Erzurum-TÜRKİYE Tr. J. of Agriculture and Forestry 23 (1999) 531-540 © TÜBİTAK
- SANKAR, B., ABDUL JALEEL, C., MANIVANNAN, P., KISHOREKUMAR, A., SOMASUNDARAM, R., PANNEERSELVAN, R., 2008. Relative Efficacy of Water Use in Five Varieties of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. under Water Limited Conditions. *Biointerfaces*, 62: 125-129.



