



**BALIKLI (ARDEBİL, İRAN) NEHRİ *AGABUS*
(COLEOPTERA; DYTISCIDAE) CİNSİNDEN KİTOSAN
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Özlem BARIŞ
2019
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BALIKLI (ARDEBİL, İRAN) NEHRİ *AGABUS* (COLEOPTERA;
DYTISCIDAE) CİNSİNDEN KİTOSAN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Zooloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BALIKLI (ARDEBİL, İRAN) NEHRİ *AGABUS* (COLEOPTERA; DYTISCIDAE)
CİNSİNDEN KİTOSAN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH tarafından hazırlanan bu çalışma 01/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı - Zooloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat KAYA

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Salih DOĞAN

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Ümit İNCEKARA

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Özlem BARIŞ

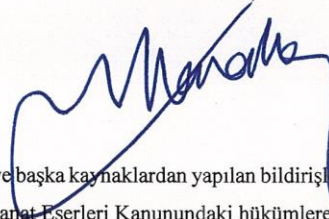
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 07/02/2019 tarih ve 06/20 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN

Enstitü Müdürü



Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

BALIKLI (ARDEBİL, İRAN) NEHRİ *AGABUS* (COLEOPTERA; DYTISCIDAE) CİNSİNDEN KİTOSAN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Kitin özellikle birçok omurgasız canlının dış iskeletinde, mantarların hücre duvarında ve diatomların yapısında yer alan dünyadaki ikinci en bol bulunan biyopolimerdir. Kitosan ise kitinin yüksek baz çözeltisinde ve yüksek sıcaklıkta deasetillenmesi sonucu oluşan, zayıf asitlerde çözünen ve tıp, eczacılık, gıda, ziraat ve daha bir çok alanda kullanıma sahip bir biyopolimerdir. Ticari olarak kitin ve kitosan üretimi genellikle karides, yengeç, istakoz ve mantarlardan elde edilmektedir. Mevcut çalışmada ise sucul ekosistemlerde yaygın ve bol olarak bulunan *Agabus* cinsinin kitin ve kitosan için alternatif bir kaynak olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu bağlamda, *Agabus* cinsinden ilk olarak kitin izole edilmiş ve daha sonra bu kitinin deasetillenmesi sonucu kitosan sentezlenmiştir. *Agabus* cinsinin, kuru ağırlığının %36 oranında kitin içerdiği tespit edilmiştir. Kullanılan metoda göre canlıdan %25 oranında kitosan üretilmiştir. Üretilen kitosan XRD, EDX, SEM, FT-IR, TGA ve UV-vis DRS teknikleri ile analiz edilmiştir. Daha sonra, elde edilen kitosanın *Escherichia coli* (Gram negatif) ve *Staphylococcus aureus* (Gram pozitif) üzerine antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, *Agabus* cinsi sucul böceklerin uygun ortamda kültüre edilerek kitosan için alternatif bir kaynak olabileceği gözlenmiştir.

2019, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sucul böcekler, Kitin, Kitosan, Karakterizasyon.

ABSTRACT

Ph. Doctoral Thesis

FAUNISTIC INVESTIGATIONS ON THE AQUATIC BEETLES FAMILY IN THE BALIKHLOO RIVER (ARDABIL, IRAN AND PRODUCTION, CHARACTERIZATION CHITOSAN OF THESE RESOURCES

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of Zoology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem BARIŞ

The chitin is the second most abundant biopolymer in the world, especially found in the outer skeleton of many invertebrates, in the cell wall of fungi and as well as in the structure of diatoms. Chitosan is a biopolymer producing after deacetylation of the chitin in high base solution and at high temperature and dissolved in weak acids. It has usage in medicine, pharmacy, food, agriculture and many other fields. Commercially, chitin and chitosan production is usually obtained from shrimp, crab, lobster and fungi. In the present study, the usability of *Agabus* genus as an alternative source for chitin and chitosan in aquatic ecosystems was investigated. In this context, firstly, chitin was isolated from *Agabus* and then chitosan was synthesized by deacetylation of this chitin. The dry weight of the genus *Agabus* was found to contain 36% of chitin. According to the used method, 25% of chitosan was produced. The produced chitosan was analyzed by XRD, EDX, SEM, FT-IR, TGA and UV-vis DRS techniques. Subsequently, the antibacterial activities of the obtained chitosan on *Escherichia coli* (Gram negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram positive) were investigated. As a result, it has been observed that aquatic insects, *Agabus* can be an alternative source for chitosan after culturing them in appropriate conditions.

2019, 70 pages

Keywords: Aquatic beetles, Chitin, Chitosan, Characterization.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmaya beni yönlendiren ve her türlü desteği sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Özlem BARIŞ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmanın yürütülmesi sırasında maddi manevi desteğini gördüğüm Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yahya TEPE, Sayın Prof. Dr. Ümit İNCEKARA ve Biyoloji Bölümü, Zooloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Analizlerin yapılması aşamalarındaki yardımları nedeniyle Sayın Doç. Dr. Önder METİN'e ve sonuçların değerlendirilmesinde ki katkıları nedeniyle Sayın Prof. Dr. Murat KAYA'a teşekkürü bir borç bilirim.

Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Esabi Başaran KURBANOĞLU'na ve değerli tez izleme komitesi üyeleri ve savunma sınav jürilerime teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destek ve teşviklerini benden esirgemeyen, annem, babam, kardeşlerim ve eşime teşekkür ederim.

Ramin MOHAMMADI ALOUCHEH

Şubat, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Çalışma Alanı	5
2.2. Ardabil'de Sucul Ekosistemler ve Önemi.....	6
2.3. Böceklerin Önemi.....	7
2.4. Kitin ve Kitosan.....	10
2.5. Kitin ve Kitosan Biyopolimerlerinin Yapısı	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Çalışma sahası	13
3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	14
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler	14
3.2. Yöntem	15
3.2.2. Böceklerin temizlenmesi ve teşhisi	16
3.2.4. <i>Agabus</i> cinsinden kitin eldesi	18
3.2.5. Kitinden kitosan eldesi	18
3.2.6. Elde edilen kitosanın karakterizasyonu	18
3.2.7. Elde edilen kitosanın antibakteriyel aktiviteleri	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. Sistematik Değerlendirmeler	25
4.1.1. Haliplidae familyası hakkında genel bilgiler.....	27
4.1.2. Noteridae familyası hakkında genel bilgiler	30
4.1.3. Hydrophilidae familyası hakkında genel bilgiler	32

4.1.4. Hydraenidae familyası hakkında genel bilgiler.....	34
4.1.5. Dytiscidae familyası hakkında genel bilgiler	36
4.1.6. Araştırma alanında toplanan dytiscidae cinslerinin değerlendirilmesi.....	39
4.1.7. Alt Familya: AGABINAE	39
4.1.8. Alt Familya: DYTISCINAE.....	41
4.1.9. Alt Familya: LACCOPHILINAE.....	42
4.2. Kitosan Eldesi.....	43
4.2.1. <i>Agabus</i> cinsinden kitin eldesi	43
4.2.2. Kimyasal yolla kitinden kitosan üretimi	44
4.2.3. XRD analizi	45
4.2.4. EDX analizi	45
4.2.5. SEM analizi	46
4.2.6. FT-IR analizi	47
4.2.7. TG analizi	48
4.2.8. UV-vis DR spektrum analizi	49
4.2.9. <i>Agabus</i> cinsinden elde edilen kitosanın antibakteriyel özellikleri	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Dk	Dakika
EDX	Enerji yayımlı X-Işını
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
g	gram
h	saat
HCl	Hidroklorik asit
KBr	Potasyum bromür
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TGA	Termal gravimetrik analiz
DRS	UV-Vis yaygın yansıma spektroskopisi
w/w	Kütlece Oran
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
XRD	X-ışını kırınım yöntemi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Araştırma alanının haritası.....	6
Şekil 2.2. <i>Titanus giganteus</i> böceğinin görüntüsü.....	9
Şekil 2.3. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	12
Şekil 3.1. Araştırma alanı ve örnek alınan lokaliteler.....	13
Şekil 3.2. Balıklı nehriden numunelerin toplanması.....	16
Şekil 3.3. Balıklı nehrinen toplanan numunelerin temizlenmesi ve teşhisi.....	17
Şekil 3.4. <i>Agabus</i> cinsinin kabukları için kullanılan öğütücü.....	17
Şekil 3.5. XRD analizi için kullanılan cihaz.....	19
Şekil 3.6. SEM analizi için kullanılan cihaz.....	20
Şekil 3.7. FT-IR analizi için kullanılan cihaz.....	21
Şekil 3.8. TG analizi için kullanılan cihaz.....	22
Şekil 3.9. UV-vis spektrum analizi için kullanılan cihaz.....	22
Şekil 3.10. Antibakteriyel aktiviteleri değerlendirmek için kullanılan alet ve cihazlar..	24
Şekil 4.1. Arazi çalışmalarından örnek görüntü.	26
Şekil 4.2. Haliplidae familyasının genel görünüşü.	29
Şekil 4.3. Haliplidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.....	29
Şekil 4.4. Noteridae familyasının genel görünüşü.	31
Şekil 4.5. Noteridae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.....	31
Şekil 4.6. Hydrophilidae familyasının genel görünüşü.....	33
Şekil 4.7. Hydrophilidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.	34
Şekil 4.8. Hydraenidae familyasının genel görünüşü, üstten.....	35
Şekil 4.9. Hydraenidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.	36
Şekil 4.10. Dytiscidae familyası genel görünüşü.....	38
Şekil 4.11. Dytiscidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.	38
Şekil 4.12. <i>Agabus</i> cinsinin dorsal görünümü.	40
Şekil 4.13. <i>Cybister</i> cinsinin dorsal görünümü.....	42
Şekil 4.14. <i>Laccophilus</i> cinsinin dorsal görünümü.....	43
Şekil 4.15. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için XRD analizi.....	45
Şekil 4.16. Elde edilen kitosan numunesi için EDX analizi.	46

Şekil 4.17. Elde edilen kitosanın SEM görüntüleri.	47
Şekil 4.18. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için FT-IR spektrumu.	48
Şekil 4.19. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için TG analizi.	49
Şekil 4.20. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için UV-vis spektrum analizi.	50
Şekil 4.21. Elde edilen kitosanın, <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri.	51
Şekil 5.1. <i>L. decemlineata</i> türünden elde edilen kitosanların XRD analizi (a: yetişkin ve b: larvalar için XRD analizi.	55
Şekil 5.2. (a) Elde edilen kitosan, (b) ticari Kitosan ve (c) <i>Cicada sloughs</i> türünden elde edilen kitinin EDX spektrumları.	57
Şekil 5.3. Kitosan ve oligo-kitosan için Gram (-) bakterilere karşı etki şekli.	63
Şekil 5.4. Kitosan ve oligo-kitosan için Gram (+) bakterilere karşı etki şekli.	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kitosan çeşitlerinin fizikokimyasal özellikleri	11
Çizelge 4.1. Araştırma alanı olarak seçilen Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçeler koordinatları ve toplanan familyalar.	25
Çizelge 4.2. Ardabil ilinde toplanan Coleoptera örneklerinin familya yüzdeleri	27
Çizelge 4.3. Balıklı nehrinde Dytiscidae familyasına ait toplam örneklerinin cins yüzdeleri.....	39
Çizelge 4.4. Araştırma alanı olarak seçilen Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçelerin koordinatları ve Dytiscidae familyasına ait toplam örneklerinin cinsleri.	39
Çizelge 5.1. Elde edilen ve ticari kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri.	53

1. GİRİŞ

Sulak ekosistemler, canlı türlerinin zenginliği ve bir çok çeşitli özellikleri nedeniyle, ekolojik bakımından çok büyük bir öneme sahiptir. Bu ekosistemler, üretkendirler ve tropik ormanlardan sonra en zengin biyolojik çeşitlilik alanlarıdır. Bu nedenle, sulak ekosistemler zengin hayvan ve bitki türleriyle büyük bir organizma çeşitliliği bulunmaktadır. Ayrıca, bu ekosistemler önemli tatlı su rezervleridir ve içme suyu açısından büyük öneme sahiptir.

İran; farklı coğrafik yapıları ve iklim kuşaklarını birarada bulundurmasının doğal bir sonucu olarak, çok çeşitli yaşam ortamlarına sahiptir. Yaşam ortamlarının farklılığı, bitki ve hayvan çeşitliliğinin artmasına neden olmaktadır. Bu sebeple İran, Asya'nın Güneybatısında, hem bitki hem de hayvan tür sayısı bakımından neredeyse Kuzey Afrika, Güney Asya, Orta Asya ve Avrupa'ya yakın bir sayı ile temsil edilmektedir. Buna karşın, yapılan bilimsel çalışmaların azlığı, bu sayının gelecekte çok daha fazla olacağını göstermektedir. İşte bu yüzden İran'ın bitki ve hayvan türlerini araştırmak bilim insanlarının dikkatlerini çekmiştir.

Canlı grupları arasında bilinen tür sayısı bakımından en fazla biyoçeşitliliğine sahip olan grup böceklerdir (Hexapoda). Böcekler içerisinde ise kınkanatlılar (Coleoptera) takımını, yaklaşık 420.000 tanımlanmış türü ile böceklerin ve metazoanın en büyük grubunu oluşturur (Beutel and Haas 2000). Kınkanatlılar tam başkalaşım (Holometabol) gösteren böceklerdir. Hayat dönemleri; yumurta, larva, pupa ve ergin şeklindedir. Ergin kınkanatlıların, kitinleşmiş, sert ön kanatlarına "Elitra" adı verilir. Uçma işlevini yitirmiş ön kanatlar, arka kanatları ve abdomeni koruyan kalkan görevindedir. Coleoptera takımının büyük çoğunluğu karasal olmakla beraber, en azından on bin kınkanatlı türü, hayat dönemlerinden bir veya daha fazlasını suda gerçekleştirmektedir (Franciscolo 1979; Balke *et al.* 2004).

Sucul koleoptera terimi Coleoptera takımına dahil ve hayat aşamalarından herhangi birini, uzun bir süre suda geçiren kınkanatlılar için kullanılır. Coleoptera takımı günümüz sistematüğinde, Archostemata, Myxophaga, Adephaga ve Polyphaga olmak üzere dört alttakıma ayrılır. Sucul kınkanatlılar, Adephaga ve Polyphaga alttakımlarına dahil olup ve Polyphaga sucul coleoptera alttakımındadır. Ayrıca, Adephaga alttakımı içerisinde, Hydradephaga familyaları yer alır (Ribera *et al.* 2002).

Polyphaga alttakımı içerisinde yer alan familyaların birçoğı karasal türleri ihtiva etmektedir. Bu alttakım içinde Hydrophilidae ve Helophoridae familyaları sucul türler içerir. Bu güne kadar, dünya üzerinde Hydrophilidae familyasının 2500'den fazla tür tanımlanmıştır ve bu sayıya her yıl yeni türler ilave edilmektedir. Ayrıca, Hydrophilidae familyasının çok çeşitli vücut formları vardır ve onların ekolojik özellikleri de önemlidir. Hidrofilidler familyasında dört altfamilya yer alır ve birçok zoocoğrafik bölgelerde bulunabilir. Bunlar; Horelophinae, Horelophopsinae, Hydrophilinae ve Sphaeridiinae alt familyalarıdır (Hansen 1987, 1999; Hebauer 2002). Vücut genelde parlak siyah, kahverengi veya sarımsı renktedirler (Chiesa 1959; Hansen 1991, 1999; Angus 1992; Balke *et al.* 2004).

Helophoridae familyası tek cinsli bir familyadır ve bu cinsler geniş yayılışa sahiptir. Bu familyanın toplam 194 türü bilinmektedir. Bu türlerden 147'si Paleartik, 41'i Neartik, 10'u ise Holartik bölgede yer almaktadır (Smetana 1985, 1988; Angus 1992; Hansen 1999, 2004). Helophoridae familyası yarı sucul ve sucul türleri içerir ve vücut uzunlukları 2 ile 8 mm dır. Bu familya çok küçük su birikintilerinde ve gölcüklerde bulunabilir. Helophoridae familyasına ait olan türler iyi yüzücü değildirler ve su altındaki bitkilere tutarak hareket etmektedirler (Chiesa1959; Angus1992; Hansen 1999; Hendrich and Balke 2004).

Adephaga alttakımındaki türlerin çoğı karasaldırlar ama bu grupun bazı türleri sucul ortama da uyum göstermektedir. Adephaga alttakımındaki 6 sucul familyası var. Bunlar: Noteridae, Haliplidae, Gyrinidae, Hygrobiidae, Amphizoidae ve Dytiscidae'dir (Nilsson and Hájek 2013).

Böcek familyaları genel olarak boyut farklılıkları göstermekle birlikte önemli miktarda kitin içeren ekzoiskeletlere sahiptirler (Ibitoye *et al.* 2018; Shin *et al.* 2019). Kitin farklı canlı gruplarında bulunabilen önemli bir biyopolimerdir. Dünyadaki canlı çeşitliliğine bakıldığında bu canlıların büyük çoğunluğunda (Artropoda ve diğer bir çok omurgasız canlı şubesi, Mantarlar alemi ve diatomlar) kitin bulunmaktadır bu nedenle kitin selüloza göre daha fazla çeşitliliğe sahiptir fakat yer yüzündeki bolluğu açısından bakıldığında selülozdan sonra dünyada en yaygın bulunan ikinci biyopolimerdir. Dünya genelinde ticari kullanım amacıyla kitin ve kitosan en çok kerevit, karides, istakoz ve yengeç gibi krustaselerin besin olarak tüketildikten sonraki atık kabukların üretilmektedir (Çalıklı vd. 2008; Antonio *et al.* 2012). Son yıllarda yapılan hesaplamalara göre, kitin ve kitosanın yıllık üretimine bakıldığında yüz elli bin ton seviyelerinde olduğu rapor edilmiştir. Bu rakam kaynaklara göre ise; yüzonsekiz bin ton yengeç, karides, istakoz ve kerevit gibi deniz kabuklularından, otuziki bin ton mantarlardan oluşmaktadır. Böceklerde kitin oranı %6-40 arasında değişirken bu oran deniz kabuklularında ise %8-39 arasında değişmektedir (Guang 2002; Kaya *et al.* 2014a; Rachmawaty *et al.* 2018).

Kitosanın en önemli avantajı biyobozunur, çevre dostu, nontoksik, antioksidan, antimikrobiyal ve yenilebilir olmasıdır. Bu eşsiz özelliklerinden dolayı da günümüzde oldukça ilgi çekmekte ve buna bağlı olarak da bilimsel çalışmalar yapılmaktadır (Sajomsang and Gonil 2010; Kucukgulmez *et al.* 2011; Hajji *et al.* 2014; Kaya *et al.* 2014a; 2014b; Ma *et al.* 2015; Soon *et al.* 2018).

Kitosanın kullanım alanı gün geçtikte artmaktadır ve kullanım alanları sırasıyla; i) biyomedikal alanda dezenfektan olarak kullanılır çünkü yüksek antimikrobiyal özelliğe sahiptir, ii) gıda ambalajlama da, iii) yara iyileştirmede, iv) yağ tutma özelliğinden dolayı sağlıklı zayıflama ve kan kolesterolünü düşürmede, v) iyi bir adsorbent olarak su arıtımında, vi) nano liflerinden dolayı kağıt yapımında ve kompozit olarak, vii) jel hale getirilerek kozmetik olarak verilebilir (Elibol 2008; Geçer 2010).

Kitosan ve türevlerinin, yukarıda da bahsedildiği gibi, artan kullanım alanlarına paralel olarak yeni kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle son yıllarda böcekler, bol

bulunmaları, hızlı üremeleri, kolay kültüre edilebilmeleri, dünyadaki tür çeşitliliği, kitin içeriklerinin yüksek olması ve bu kitinin kolay izole edilebilmesinden dolayı deniz kabukluları ve mantarlara önemli bir alternatif oluşturma potansiyeline sahiptir (Kaya *et al.* 2014a; Ma *et al.* 2015; Soon *et al.* 2018; Ibitoye *et al.* 2018; Shin *et al.* 2019). Bununla birlikte büyük biyokütle oluşturabildikleri bilinmektedir. Örneğin çekirge istilalarındaki tonlarca biyokütle veya bireysel olarak büyük boyuta sahip bir böcek olarak titan böceği (*Titanus giganteus*) verilebilir (Williams 2001).

Planlanan bu çalışmada, Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçeleri ve civarında bulunan göl, gölcük, akarsu ve akarsuların kenarlarındaki su birikintilerinin sığ kesimleri gibi değişik lokalitelerden ergin sucul Coleoptera örnekleri toplanmıştır. Ayrıca, Coleoptera örneklerinden Dytiscidae familyası üzerinde sistematik çalışmalar yapılmıştır. Bu familya ait *Agabus* cinsinden önce kitin izole edilemesi ve daha sonra kitosanın sentezlenmesi ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Elde edilen kitosanın, X-ışını kırınım yöntemi (XRD), Enerji yayımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR), Termal gravimetrik analizler (TGA), UV-Vis yaygın yansıma spektroskopisi (DRS) ile fiziko-kimyasal analizleri yapılmıştır ve ticari kitosan ile karşılaştırılmıştır. Son olarak, *Agabus* cinsinden elde edilen kitosanın antibakteriyal özellikleri araştırılmıştır.

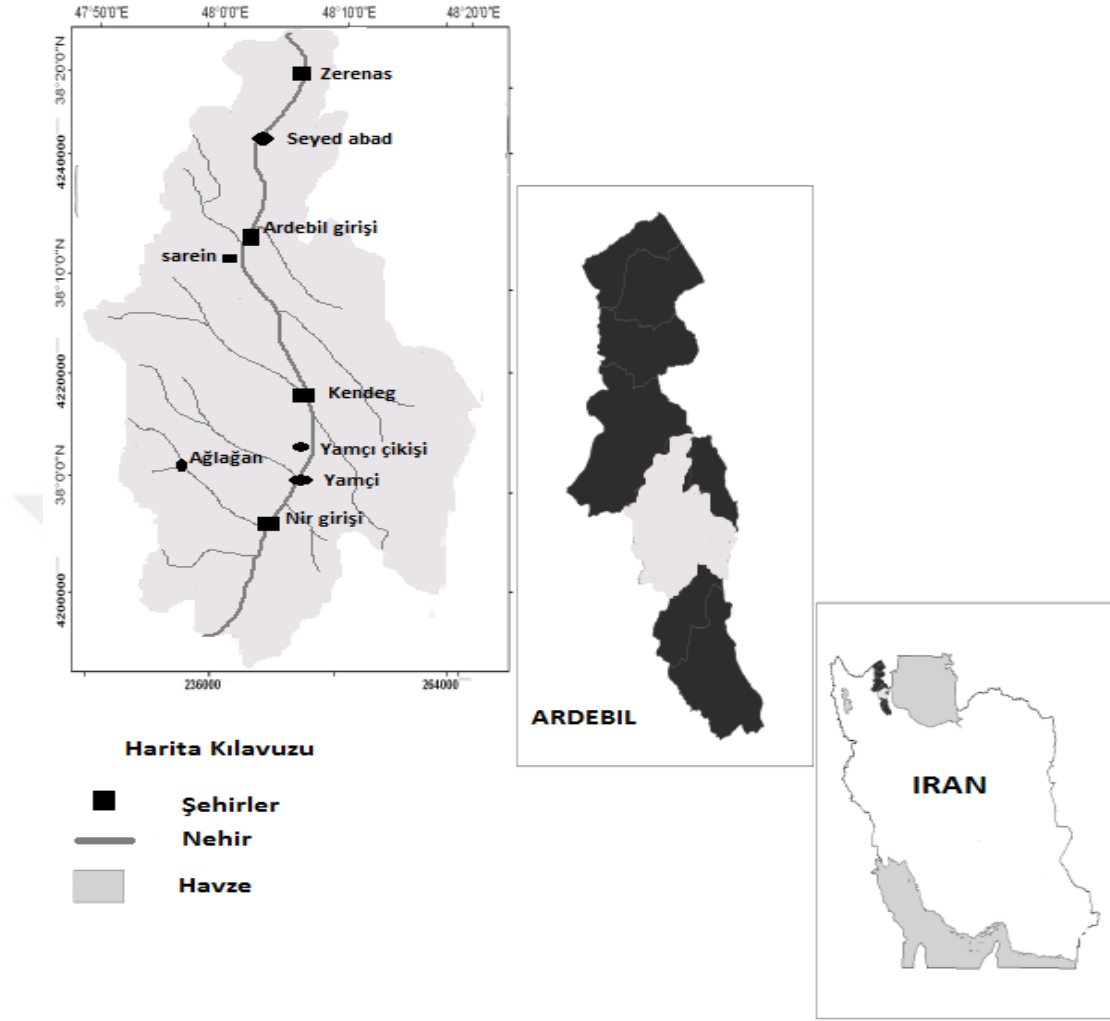
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Çalışma Alanı

Çalışma alanı İran'ın kuzeybatı kesiminde bulunmaktadır, Ardebil Eyaleti (38°15'N, 48°17'E), doğuda Elburz Dağları ve Hazar Denizi ile çevrilidir (Şekil 2.1). Kuzeyde Aras nehri, milli park olan Arasbaran alanı, batıda Gare-Dağ, güneyde ise Talesh dağları ile çevrilidir. Ardebil ili Moghan stepelerinin 20 metrelik rakımı ve 4811 metre yükseltide olan Savalan dağı ile çok farklı yükseltilere sahip olan bir il konumundadır. Ayrıca Ardebil ilinde yılda ortalama 50 gün donma görülmektedir. Yılın maksimum ve minimum sıcaklıkları en soğuk ve en sıcak aylarda yaklaşık -40 ve +40 °C olabilmektedir. Yılda ortalama 250-600 mm arasında yağış miktarı değişmekte ve ilkbahar ve kış mevsimleri yağış mevsimi olarak kabul edilmektedir.

Bu eyalet 5 önemli nehre sahiptir. Bunlar; Aras nehri, Hıyav nehri, Balıklı nehri, Karasu nehri ve Hrodabad nehridir. Çalışmamızın konusu olan Balıklı Nehri, Ardebil eyaletinin Ardebil, Nir ve Sarein yerleşkelerinden geçmektedir. Genel olarak Hazar Denizinin havzasında bulunan, Aras nehrinin Karasu ırmağı alt havzasından sayılan Balıklı nehrinin, su toplama alanı 1059.3 km² dir. Balıklı nehri kuzeyden Khoşke Rod nehrinin havzasına, güneyde Gori nehrine, batıdan Sarabda Acı nehrine ve doğudan Gharehsu nehrine bağlıdır. Bu havzanın en uzun su yolu 4.69 km dir.

Çalışmanın yapıldığı Balıklı Nehri, Sarab havzasına bulunan Savalan yüksekliklerinden Ağlağan çayı ile başlayıp, Nir şehrinden geçerek Yamçı barajına dökülür. Daha sonra Balıklı nehir adıyla kendi yoluna devam ederek sonunda Karasu'ya dökülmektedir. Nehrin eğimi 9.0, debisi 459 m²/s'dir. Yıllık ortalama yağışı 320 mm³ olduğu ve ortalama sıcaklık 8.9°C olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.1. Araştırma alanının haritası.

2.2. Ardabil'de Sucul Ekosistemler ve Önemi

Ardabil topografik ve coğrafik özellikleri nedeniyle geçmişte iklimsel ve jeolojik değişikliklerden etkilenen canlılara barınak olmuştur. Bu nedenle Ardabil sucul ve karasal ekosistemler bakımından yaşayan türleri içeren zengin bir eyalettir. Bu tür zenginliğini ortaya koymak için ilk başlarda karasal ekosistemlerdeki canlılar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bununla beraber bu eyaletin bünyesinde öneme sahip olan sulak alanlar barındırmaktadır. Sucul ekosistemler suyun; bulanıklığı, sıcaklığı, kireçliliği ve tuzluluğu gibi özelliklere göre farklılık göstermektedirler. Bu nedenle sucul ekosistemlerde yaşayan canlılar çok büyük çeşitlilik göstermektedir. Canlıların tür

çeşitliliği dikkate alındığında bilinen bu hayvan türlerinin %80'i eklembacaklılar (Arthropoda) şubesine aittir ve sucul ekosistemler içerisinde de önemli oranda temsil edilirler. Eklembacaklılar içerisinde ise en fazla tür ihtiva eden sınıf böcekler (Hexapoda; Insecta) olarak dikkat çekmektedir. (Salman 2009; Zhang 2011).

Böcekler sınıfı içerisinde, kınkanatlılar (Coleoptera) takımı çeşitlilik ve temsil olarak en kalabalık gruptur. Hem karasal hemde sucul ekosistemlerde geniş yayılış göstermektedir. Kınkanatlıların üyelerinin vücutları sert ve kalın bir dış iskelete sahiptir. Bu böceklere ait olan türlerin bir çoğu bitkiler ve depolanmış ürünlerde ana zararlı olarak önem kazanırlar. Bu grup canlılar bitkilerin lifleri ve taneleri beslenerek zarar yapabilmektedirler. Odun delici (wood boring) ve leş yiyen (scavengers) türler organik besinlerin döngüsünde doğaya önemli katkılarda bulunmaktadır. Biyolojik savaşta ise avcı (predator) türleri önemli kontrol etmenidirler (Trautwein *et al.* 2012; Awasthi 2016).

2.3. Böceklerin Önemi

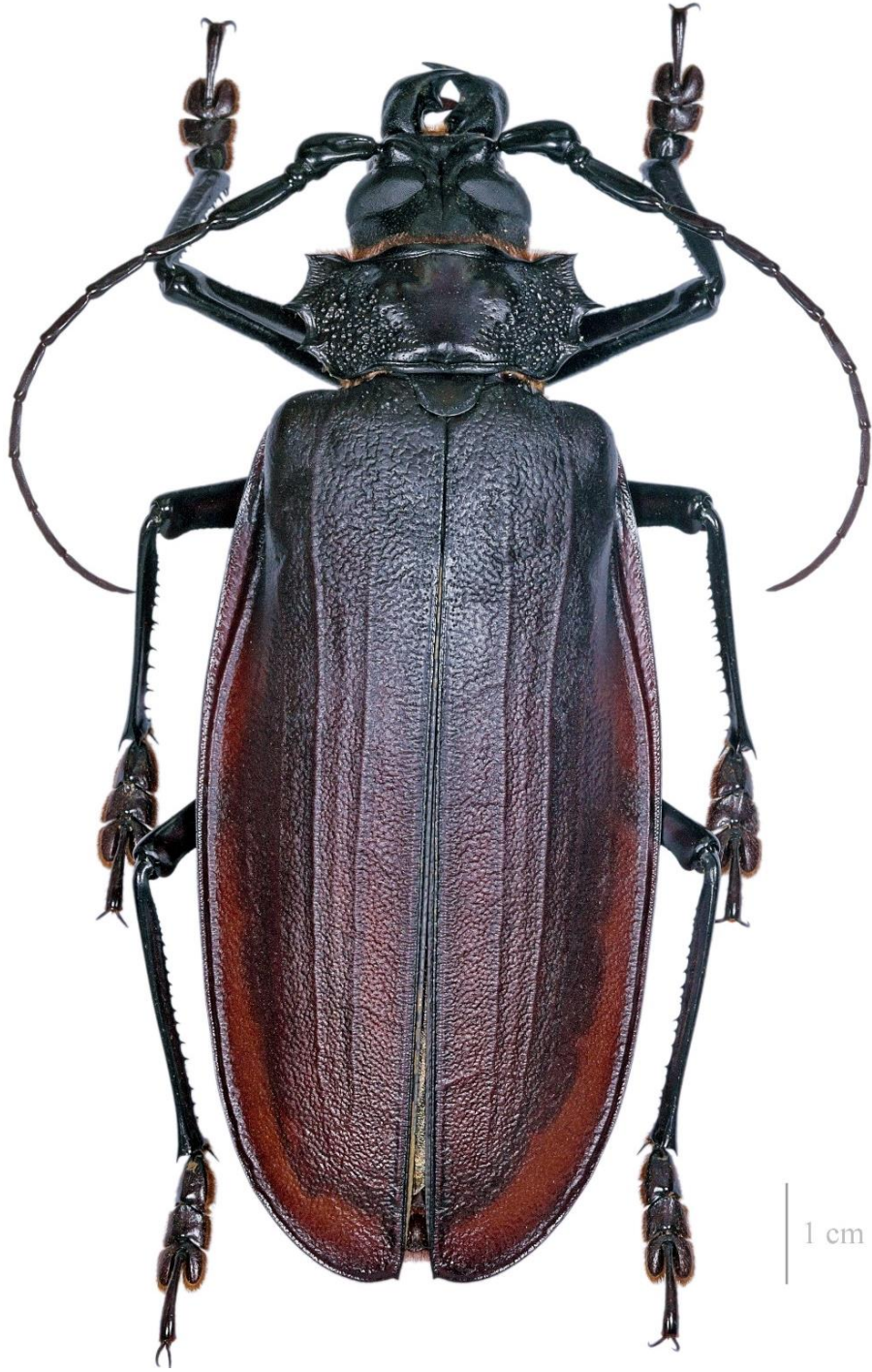
Böcekler, eklembacaklılar (Arthropoda) şubesinin sınıfı ve tür ve takson bakımından en kalabalık hayvan grubudur. Dünyanın hemen hemen her yerinde bulunurlar ve bazen çok yoğun popülasyonlarda görülebilirler. Bir milyondan fazla olan tür sayılarıyla dünyadaki en fazla türe sahip canlılardır. (Chapman 2006; Wilson 2015). Her yıl birkaç bin tür buna eklenmektedir. Toplam tür sayısının iki milyon olduğu kabul edilmektedir. Tür, cins, familya gibi taksonomik kategoriler bakımından 6-10 milyon sayıya ulaşırlar ve Dünyadaki hayvanların %90 kadarını oluştururlar. Türce en zengin böcek familyası cepkenli böcekgiller (Staphylinidae) familyasıdır. 2010 yılındaki verilerine göre 56.768 türle canlılar (bitki ve hayvanlar) arasında en çok tür barındıran familyadır. İkinci en büyük böcek grubu hortumlu böcekgiller (Curculionidae) familyasıdır (Erwin 1982; Erwin 1997; Vojtech *et al* 2002; Chapman 2006; Wilson 2015).

Böcekler, kaynak bakımından verimli hayvansal protein üretimine göre büyük potansiyele sahiptirler. Gelinlikle diğer karasal hayvanlarla karşılaştırıldığında, böceklerin önemli avantajları şunlardır: (1) üstün yem dönüşüm verimliliği; (2) aynı

seviyede protein üretmek için düşük su kullanımı, düşük toprak kullanımı ve düşük sera gazı emisyonu; (3) şu anda enerji üretimi için kullanılan biyokütle de dahil olmak üzere yan ürünlerin böcek diyeti olarak kullanılması imkanı; (4) böcek biyokütlesinin yem / besin olarak tam kullanımı; (5) ürünün yüksek besin değeri ve düşük gıda kaynaklı zoonotik patojen riski (Van Huis *et al.* 2013).

Avrupa'da böcek üretimi, beslenme ve gıda sektöründeki büyük şirketlerin yanı sıra çok sayıda küçük ve orta ölçekli işletmenin dikkatini çeken bir iş alanı haline gelmektedir. Böcek sektörü bir ticaret seviyesine geçmektedir. Ancak, bir gıda sektörü bakış açısına göre, hiçbiri üretim konusunda henüz endüstriyel bir düzeye ulaşmamıştır (örneğin, yılda 1000+ ton böcek biyokütlesi) (Heckmann *et al.* 2018).

Böcekler tür bakımından en kalabalık hayvan grupların oluşturmalarına göre büyük bir biyokütleyle sahiptirler. Böcek familyaları genel olarak boyut farklılıkları göstermekle birlikte önemli miktarda kitin içeren kabuğa sahiptirler (Ibitoye *et al.* 2018; Shin *et al.* 2019). Ayrıca, bu canlılar arasında çok büyük olan örnekler biyokütle için iyi kaynaklardan sayılırlar. Titan böceği (*Titanus giganteus*) en büyük böceklerden biridir (Şekil 2.2). Bu böceğin uzunluğu 16.7 cm kaydedilmiştir (Williams 2001). Ayrıca başka iki herkül böcek türleri, *Xixuthrus heros* ve *Dynastes hercules*, gibi böceklerde örnek verilebilir, bu böcekler uzunluğu sırası ile 15 ve 17.5 cm kaydedilmiştir (Zahl 1959; Ratcliffe *et al.* 2015).



Şekil 2.2. *Titanus giganteus* böceğinin görüntüsü (Anonymous 2019).

2.4. Kitin ve Kitosan

Kitin, selüloza benzeyen bir biyopolimer olmasına rağmen yapısında bulunan azot nedeniyle selülozdan ayrılır. Selüloza göre en önemli avantajı yüksek antimikrobiyal özelliğe sahip olmasıdır. Bu nedenle de kitin ve türevleri endüstride (özellikle gıda, medikal ve kozmetik alanında) geniş kullanım şansı bulmaktadır (Kurita 2001). Kitin canlılarda tek başına bulunan bir materyal değildir ve bu nedenle de protein, mineral, mumsu yapılar ve pigmentler ile birlikte destek dokuyu oluşturur. Kitin izolasyonunda ise ilk olarak yapıda bulunan minerallerin uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilir ve bu basamakta çeşitli asitler kullanılarak minerallerin destek dokudan uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Bu işleme de minerallerin uzaklaştırılması “demineralizasyon” denir. Daha sonra proteinlerin uzaklaştırılması için çeşitli bazlar kullanılarak alkali ortamda proteinlerin bozulması işlemi gerçekleştirilir ve bu işleme de “deproteinizasyon” denir. Son olarak alkol, kloroform, sodyum hipoklorit veya hidrojen peroksit gibi kimyasallar kullanılarak kitinin ağartılması işlemi gerçekleştirilir bu işleme ise “depigmentasyon” denir (Rinaudo 2006). Daha sonra elde edilen kitinin, yüksek sıcaklıkta (120-150°C’da) %50 NaOH ile işlem görmesi sonucu deasetillenmiş kitin yani kitosan elde edilir (Demir ve Seventekin 2009).

1811 yılında Henri Bracannot ilk kez mantarların hücre duvarında kitinin varlığını keşfetmiştir. Daha sonra 1894 yılında Hoppe-Seyler kitini potasyum hidroksitle 180°C’de muamele etmiş ve kitosanı bulmuştur. Daha sonra kitosanın tanıtılması amacıyla yaptığı çalışmalarla Clark ve Smith 1934 yılında kitosan nano liflerini üretmiş ve günümüze kadar yapılan çok sayıda çalışma ile popüler hale gelmiştir (Guang 2002; Berger *et al.* 2011; Fai *et al.* 2011; Stamford *et al.* 2013; Soon *et al.* 2018).

Kitosanın deasetilasyon derecesi ve moleküler ağırlığı, en önemli özelliklerindedir. Molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi kitinin izolasyon metoduna, kitosanın deasetillenmesi sırasındaki çözeltinin sıvı miktarı, sıcaklığı, süresi gibi etmenlere bağlı olarak önemli değişiklikler gösterir. Hatta kitinin izole edildiği kaynak bile kitosanın özellikleri açısından oldukça önemlidir (Rinaudo 2006). Kitosan pozitif yüklü bir polimer

olduğu için, negatif yüklü materyallere örneğin proteinler, anyonik polisakkaritler ve nükleik asitler gibi moleküller ile etkileşime girip çökelti oluşturabilir (Singla and Chawla 2001). Kitosan N-deasetilasyon derecesi, üretim metodu ve sonrasında uygulanacak işlemlere göre değiştirilerek istenildiği gibi modifiye edilebilmektedir (Sezer 2007) (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.1. Kitosan çeşitlerinin fizikokimyasal özellikleri (Sezer 2007).

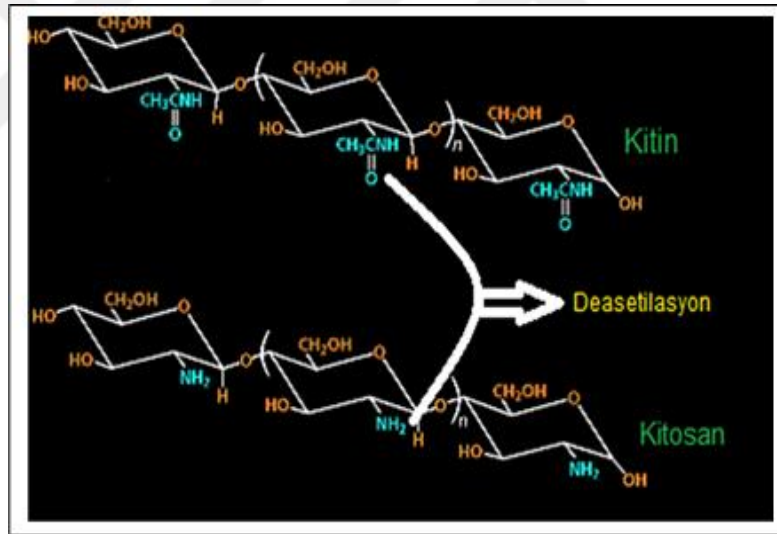
Kitosan Türleri	Deasetilasyon Derecesi (DD)%	Viskozite (cps)
HM _w	81.60	2040
MM _w	81.40	286
LM _w	80.60	115

Kitosan çözeltisinin viskozitesi de yukarıda bahsedildiği gibi, kitosan konsantrasyonuna, üretim esnasında uygulanan sıcaklığa ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak önemli değişiklik gösterir. Viskozite, kitosan konsantrasyonu ve deasetilasyon derecesi ile doğru orantılı olmasına rağmen sıcaklık ile ters orantılı olarak artar. Kitosan, yüksek moleküler ağırlığı ve doğrusal dallanmamış yapısı nedeni ile asidik ortamlarda jel formuna dönüşmesinden dolayı ideal bir viskozite arttırıcı olarak kullanılabilir (Chen and Tsaih 1998).

Genel olarak bilindiği üzere, pozitif yüklü kitosanın, negatif yüklü mukozal yüzeyler ile arasındaki elektrostatik etkileşim nedeni ile muko-adhesif özelliklere sahip olduğu görölmüşür (Lehr *et al.* 1992; Needleman and Smales 1995; Rilosi and Bockton 1995; He *et al.* 1998; Shimoda *et al.* 2001; Kockisch *et al.* 2003).

2.5. Kitin ve Kitosan Biyopolimerlerinin Yapısı

Kitin ve kitosan biyopolimerlerinin kimyasal yapısı ve bağlanması Şekil 2.4'de gösterildiği gibi belirlenmektedir. Kitin polimeri, poli-[b-(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-b-D-glukopiranoz] yapıdan oluşmuş ve 2-amino-2-deoksi-b-glukopiranoz monomerlerde çok düşük oranda içermektedir. Kitosanın kimyasal yapısı, poli- [b- (1,4) -2 -amino -2 -deoksi-b -D- glukopiranoz] şeklindedir. Kitin ve kitosan polisakaridleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise en önemlisi amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır (Mohammedi-Aloucheh 2015).



Şekil 2.3. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları (Geçer 2010).

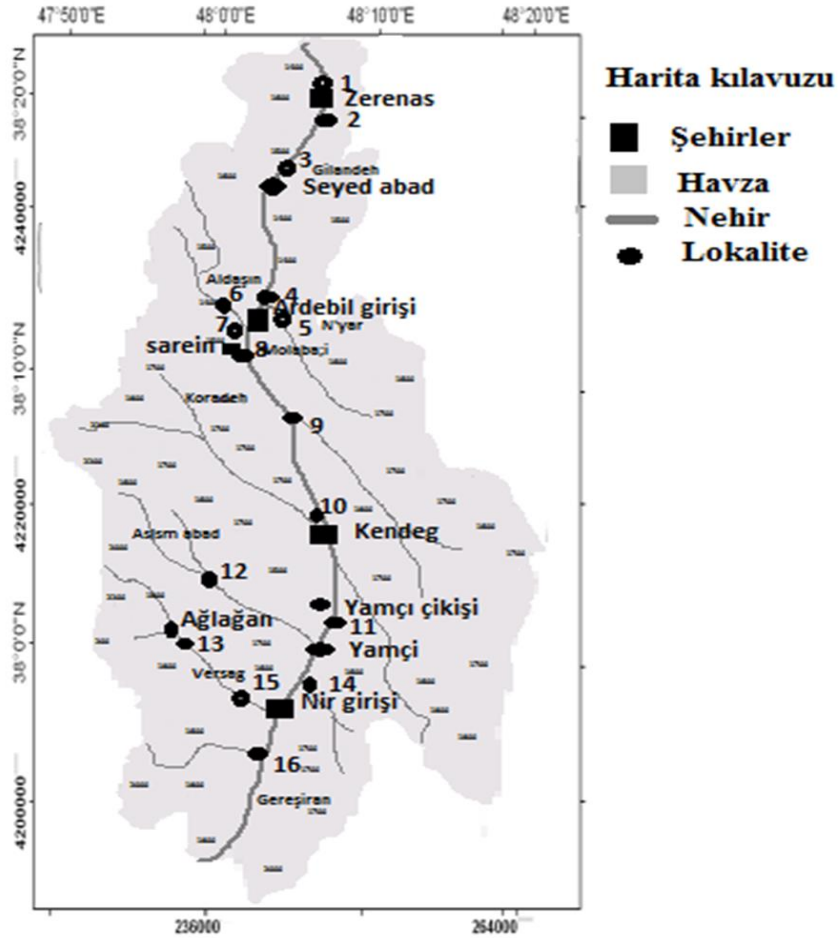
Kitin alfa, beta ve gama olmak üzere üç farklı formda doğada bulunur ve bunların içerisinde en yaygın olanı alfa formudur çünkü tüm Artropoda şubesi ve mantarlarda bu form bulunur. Beta kitin ise kalamarın iç iskelet yapısında yer alır. Beta kitin formu ise böcek kokonlarında gözlenmiştir (Kaya *et al.* 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma sahası

Bu çalışmada, Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçeleri ve civarında bulunan göl, gölcük, akarsu ve akarsuların kenarlarındaki su birikintilerinin sığ kesimleri gibi değişik 16 lokaliteden toplanan ergin sucul kınkanatlı örnekleri 2016 Nisan-Ekim ayları arasında arazi çalışması yapılarak elde edilmiştir. Örneklerin toplandığı yerler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırma alanı ve örnek alınan lokaliteler.

3.1.2. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
 Çalkalayıcı inkübatörü (Fanavaran Sahand Azar, İran)
 Spektrofotometre (Eppendorf ECOM-P 4153, GERMANY)
 Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
 Otomatik Öğütücü (Noble, CHINA)
 Mikrodalga Fırın (Panasonik 2.45 GHz, 1000 W, JAPONYA)
 Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
 Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
 pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
 Hassas Terazi (Mettler Toledo AL204, CHINA)
 Otomatik Pipetler (Transferpette, GERMANY)
 Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
 Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
 Santrifüj (Beckman Culture - Allegra 64R, U.S.A.)
 X-ışını kırınım yöntemi (XRD) (Philips Xpert X-ray, GERMANY)
 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Zeiss EVO LS 10, GERMANY)
 Enerji yayımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)
 Spektrofotometre (IR) (Perkin-Elmer RX I, U.K.)
 Vis yaygın yansıma spektroskopisi (DRS) (Scinco 4100, GERMANY)
 Termal gravimetrik analizler (TGA) (Linseis STA PT 1000, GERMANY)

3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Kitosan (low molecular weight) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya).
 Hidroklorik asit (HCl) aseton, ethanol, ve etil asetat Merck (Dramstadt, Almanya).
 Sodyum hidroksit (NaOH) Riedel-de Haen (Seelze, Almanya).
 Asetik asit (glacial, %99) Carlo Erba (Ronado, İtalya).
Escherichia coli (PTCC 1047) ve *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189) (IROST, İran)
 Nutrient Broth ve Nutrient Agar (Pronadisa, İspanya)

%70'lik ethanol çözeltisi; bir Beher içinde 70 mL ticari ethanol ile 30 mL saf su karıştırıldı.

1 M HCl çözeltisi; 166.3 mL 12 M stok HCl çözeltisinden alınıp 1 litre tamamlanmış ve 1 M'lık çözelti hazırlanmıştır.

1M NaOH çözeltisi; 20 g NaOH katısı 500 mL'lik balonjojeye hassas olarak tartılır ve hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanarak 1 M NaOH çözeltisi elde edilir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Böceklerin toplanması

Numunelerin toplanmasında biyotoplar ve mevsimler dikkate alınmıştır. Araştırma bölgemiz çok çeşitli biyotopları içine almıştır. Araştırma bölgesinin bu özellikleri göz önünde tutularak bir yıl planlı bir şekilde, değişik biyotoplara her mevsimde düzenli olarak gitmek suretiyle, örneklerin toplanmıştır. Örnekler, Ardebil merkez ve ilçe sınırları içerisindeki kaynak, birikinti su gözelerinden, dere ve nemli habitatlardan gözenek çapı 2 mm olan elek, kepçe ve ağ kullanılarak toplanmıştır. Örnekler yakalandıktan sonra arazi şartlarında %70'lik etil alkol ile öldürülmüş ve laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Balıklı nehriden numunelerin toplanması

3.2.2. Böceklerin temizlenmesi ve teşhisi

Laboratuarda, küçük bir fırça ile örnekler üzerindeki çamurlar temizlenmiştir. Coleoptera örneklerine ait familyaların dış morfolojilerinin özellikleri incelenerek teşhis işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3).

Familya ve cins tayinlerinde, Balfour-Brown (1950), Bertrand (1954), Chiesa (1959), Holland (1972), Gentili and Chiesa (1975), Olmi (1976), Pirisinu (1981), Hansen (1987), Holmen (1987), Friday (1988), Vondel (1997), Angus (1992), Hebauer (1994), Nilsson and Holmen (1995), Dettner (1997), Gentili (2000), Hebauer and Klausnitzer (2000), Vondel *et al.* (2006)'in eserlerinden yararlanılmıştır. Örneklerimiz Mohaghegh Ardabili Üniversitesinde (UMA), Biyoloji Bölümünde Zooloji Müzesi'nde muhafaza edilmektedir.



Şekil 3.3. Balıklı nehrinen toplanan numunelerin temizlenmesi ve teşhisi.

3.2.3. Toplanan böceklerin kitin eldesi için hazırlanması

Laboratuar çalışmasına *Agabus* cinsinin elitra kısmından kitinin eldesi ile devam edilmiştir. Bu işlemde önce kabuklu kısımların ve atıkların ayıklanması yapılmıştır. Sonra ayıklanmış kabuklu kısımları saf su ile yıkanmış ve 90°C de etüvde 2 saat kurutulmuştur. Daha sonra, uygulanacak kimyasal işlemlerin etkinliğini arttırmak için mikserde küçük parçalar haline getirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Agabus* cinsinin kabukları için kullanılan öğütücü

3.2.4. *Agabus* cinsinden kitin eldesi

Kurutulan kabuklardan üç kademedede (deproteinizasyon, demineralizasyon, dekolorasyon) kitin elde edilmiştir.

- i) Deproteinizasyon (proteinlerin uzaklaştırılması) için, %5'lik NaOH ile 90°C'de 2 saat reaksiyona bırakılmış ve 90°C'de 2 saat kurutulmuştur.
- ii) Demineralizasyon (minerallerin uzaklaştırılması) için, 1 N HCl ile 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- iii) Dekolorizasyon (pigmentlerin uzaklaştırılması) için, aseton içine elde edilen kitin parçaları atılmış ve 24 saat beklemeye bırakılmıştır ve 90°C'de 2 saat kurutulmuştur (Kucukgulmez *et al.* 2011; Hajji *et al.* 2014; Ma *et al.* 2015).

3.2.5. Kitinden kitosan eldesi

Elde edilen kitin materyali kullanılarak kitosan saflaştırılması literatürdeki yöntemlere göre modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elde edilen kitin bir erlen içerisine yerleştirilmiş ve üzerine hazırlanan %50 (w/v) sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek 100°C'de, 6 saat etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda çözelti filtre kâğıdı ile süzülerek, alkali çözeltinin uzaklaştırılması için saf su ile pH 7 oluncaya kadar yıkanmıştır. Ayrılan kitosan parçaları aseton ile de yıkanarak, 60°C'de, 1 saat etüvde kurumaya bırakılmış ve miktar tayini yapmak üzere ağırlığı tartılmıştır (Sajomsang and Gonil 2010; Kaya *et al.* 2014a).

3.2.6. Elde edilen kitosanın karakterizasyonu

Agabus cinsine ait böceklerin dış iskeletinden elde edilen kitosanın XRD, EDX, SEM, FT-IR, TGA ve UV-vis spektrum analizleri yapılmış ve ticari kitosanın değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca kitosanın polimerlerinin ekstraksiyonu, renk, ekstraksiyon verimleri, kül içeriği ve deasetilasyon derecelerinin hesaplanması yapılmıştır (Lim 2002;

Fouda 2005; Peker *et al.* 2006). Son olarak, elde edilen kitosanın antibakteriyel özellikleri farklı konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir.

a) XRD analizi

Çalışmada elde edilen kitosan ve ticari kitosanın XRD analizi, Philips X'pert X-ışını difraktometre cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. XRD analizi için kullanılan cihaz (Philips Xpert X-ray diffractometer).

b) SEM analizi

Çalışmada elde edilen kitosanın yzey karakterizasyonu ve farklılıkları incelemek için SEM tekniğine uygun olarak vakum altında palladyum-altınla kaplanması suretiyle değişik büyütmelerde Zeiss EVO LS 10 cihazını kullanarak görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. SEM analizi için kullanılan cihaz (Zeiss EVO LS 10 instrument microscope).

c) EDX analizi

Çalışmada elde edilen kitosan kimyasal bileşimini ve saflığını değerlendirmek için EDX analizi aynı SEM cihazı kullanılarak yürütülmüştür.

d) FT-IR analizi

FT-IR analizi Mohaghegh Ardabili Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Analitik Kimya Laboratuvarlarında bulunan spektrofotometre (Spectrum RXI, UK) ile yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. FT-IR analizi için kullanılan cihaz (Spectrum RXI, UK).

e) TG analizi

Çalışmada elde edilen kitosan ve ticari kitosan numunesinin TG analizi 10°C / dk'da ve oda sıcaklığından 700°C'ye kadar hava atmosferi altında bir ısıtma ile Linseis STA PT 1000 cihazı kullanılarak kaydedilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. TG analizi için kullanılan cihaz (Linseis STA PT 100).

f) UV-vis spektrum analizi

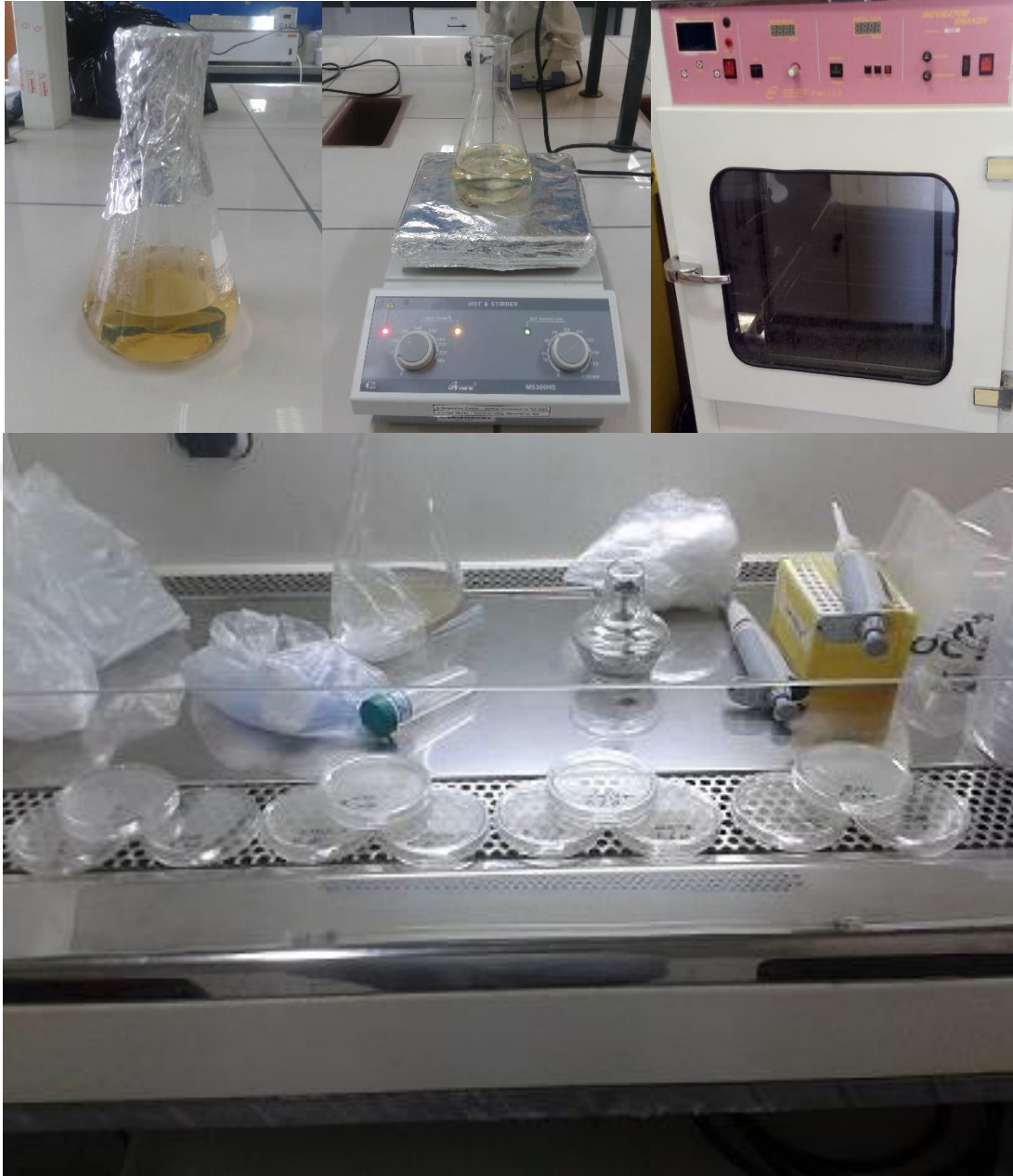
UV-vis DR spektrumları, çalışmada elde edilen kitosan ile hazırlanan numunelerin elektronik absorpsiyon özellikleri hakkında yararlı bilgiler vermektedir. Numuneler için UV-vis spektrumlarını 250-800 nm aralığında Scinco 4100 cihazı kullanılarak kaydedilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. UV-vis spektrum analizi için kullanılan cihaz (Scinco 4100).

3.2.7. Elde edilen kitosanın antibakteriyel aktiviteleri

Agabus cinsinin dış iskeletinden elde edilen kitosan, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri açısından, koloni oluşturan birimler (CFU) sayım yöntemi kullanılarak kontrol ve 0.1-1.8 mg / mL konsantrasyon aralığında değerlendirildi (Gao *et al.* 2007; Fernandes *et al.* 2013). Bu yöntemde, farklı kitosan konsantrasyonları %1 asetik asit içinde çözülerek hazırlandı. Daha sonra, bakteri konsantrasyonu uygulama için besiyerinde 10^8 CFU / mL'e ayarlandı. Belirtilen aralıktaki farklı konsantrasyonlar, besiyeri sıvısı ortamında, 3 mL'lik bir nihai hacimde hazırlandı. Kültür ortamı çalkalayıcı inkübatöründe 120 rpm ve 37°C'de 12 saat boyunca inkübe edildi. Sonra, optik yoğunluk, 600 nm'de ölçüldü. Daha sonra, nutrient agar üzerine 100 µL kültür ortamı yayma plak yöntemi ile ekildi ve petriyerler 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Üç paralel olarak yapılan uygulamada her petride gelişen koloni sayısı kaydedildi. Uygulama yapılan kültürde gelişen koloni sayıları canlılık yüzdesi olarak ifade edildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Antibakteriyel aktiviteleri değerlendirmek için kullanılan alet ve cihazlar

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sistematik Değerlendirmeler

Ardebil Eyaletinde her ilçede küçük, büyük birçok nehir bulunmaktadır. Alanın en önemli nehirleri: Aras nehri, Hıyav nehri, Balıklı nehri, Karasu nehri ve Hrod Abad nehridir.

Araştırma konumuz, bölgedeki Balıklı nehrinde yapılmıştır. Araştırma alanı olarak seçilen Balıklı nehri ve çevresinin faunistik kompozisyonunun ortaya konulması için toplam 71 gün, 16 lokalitede arazi çalışması yapılmıştır. Ardebil eyaletinin ilçeler koordinatlar, yakalandığı familyaları çizelge 4.1’de sunulmuştur. Bu alanlardan toplama yapılırken gözenek çapı 2 mm olan kepçe, elek, süzgeç ve diğer sucul toplama teknikleri kullanılmıştır. Yakalanan örnekler, içinde %70’lik etil alkol bulunan şişelerde laboratuvara getirilmiştir.

Çizelge 4.1. Araştırma alanı olarak seçilen Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçeler koordinatlar ve toplanan familyalar.

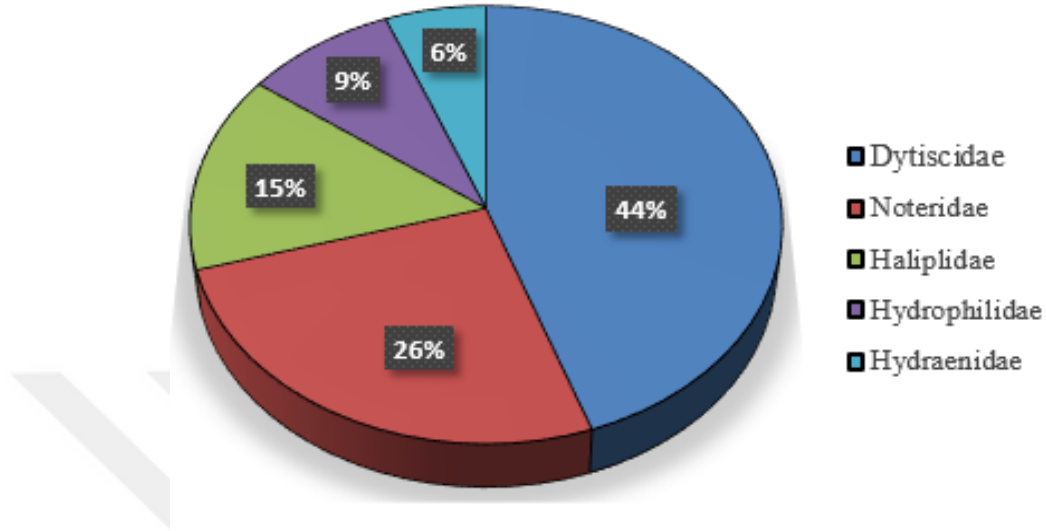
İlçeler	Koordinat	Yakalandığı Familyalar
Ardebil	38°15’N, 48°17’E	Hydraenidae, Hydrophilidae, Dytiscidae, Noteridae, Haliplidae
Sarein	38°34’N, 48°06’E	Hydraenidae, Hydrophilidae, Dytiscidae, Noteridae
Nir	38°2’ N, 47°59’E	Hydrophilidae, Dytiscidae, Noteridae, Haliplidae



Şekil 4.1. Arazi çalışmalarından örnek görüntü.

Bu çalışmada, Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçeleri ve civarında bulunan göl, gölcük, akarsu ve akarsuların kenarlarındaki su birikintilerinin sığ kesimleri gibi değişik habitatlardan toplanan ergin sucul kınkanatlı örnekleri değerlendirilmiştir. Toplam 71 gün, 16 lokalitede arazi çalışması yapılmıştır ve çalışmalar sonucunda, 5 familyaya ait (Hydraenidae, Hydrophilidae, Dytiscidae, Noteridae, Haliplidae) saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Ardabil ilinde toplanan Coleoptera örneklerinin familya yüzdeleri



4.1.1. Haliplidae familyası hakkında genel bilgiler

Haliplidae familyasının tanımlanmış 200'den fazla türü bilinmektedir ve familya üyeleri dünyadaki bütün zoocoğrafik bölgelere yayılmıştır. Palearktik bölgede 50'den fazla tür ve Nearktik bölgede ise 70'den fazla tür bulunmaktadır. *Haliphus* genusu hemen hemen dünyanın bütün bölgelerine dağılmış olmakla birlikte, Palearktik bölgede dominanttır. Haliplidae familyasının Palearktik bölgedeki bir başka genusu olan *Peltodytes* genusu üyeleri ise çoğunlukla ılıman iklime sahip bölgelerde ve çoğu türü de Kuzey Amerika'da dağılım gösterirken, *Brychius* genusu üyelerinin Holarktik bölgede dağılımları sınırlanmıştır (Zaitsev 1972; Franciscolo 1979; Holmen 1987; Vondel 1997).

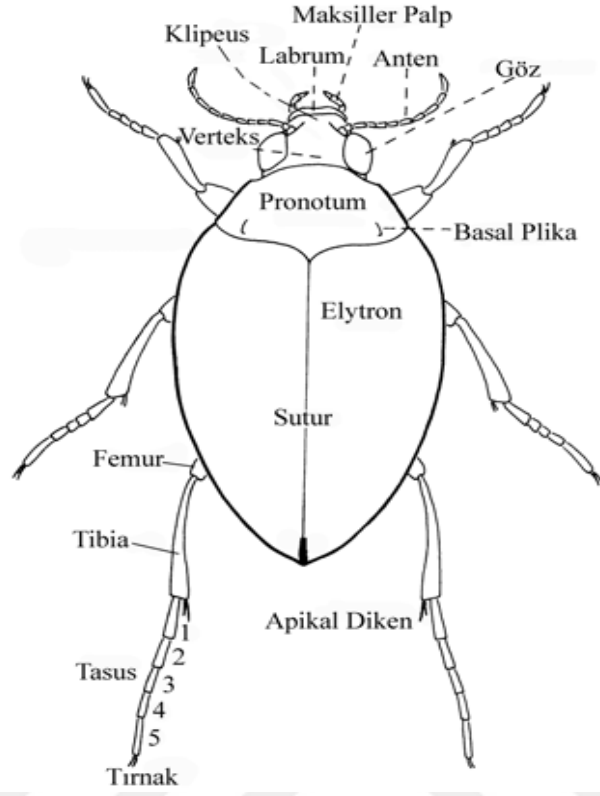
Vücutları yüzmek ve yürümek için adapte olmuş su canlılarıdır. Vücut uzunlukları 1.5-5.0 mm kadar olabilir. Erkeklerin ön ve arka tarsuslarının bir, iki veya üç taban segmenti genişlemiş ve alt kısmında püskül şeklinde tüyler ihtiva eder (Holmen 1987; Vondel 1997).

Baş öne doğru uzamış bir yapıya sahip olup, oldukça küçüktür. Gözler büyük ve oldukça dışarı çıkıktır. Labrum transvers ve dar olup, genellikle içeri doğru eğri ve ayrıca anterior

kenarında saçak şeklinde tüyler bulunur. Vücudun dorsali genellikle beneklidir. Klipus labrumdan daha dardır, transvers ve genellikle anteriorü içeriye doğru eğridir (Holmen 1987; Vondel 1997).

Antenler kısmen uzun, 11 segmentli ve filiformdur. İlk iki taban segmenti diğer segmentlerden biraz daha geniştir. Distal segmentler çoğunlukla proximal segmentlerden daha uzundur. Pronotum çoğu kez iki basal plikalıdır. Pronotumun yüzeyi az veya çok nokta nokta beneklidir. Pronotumun anterior kenarı genellikle eğridir, orta kısmı hafifçe dışarıya doğru uzamıştır ve anteriorü köşelidir (Zaitsev 1972; Holmen 1987; Vondel 1997).

Elytra bütün abdomeni tamamen örter. Her bir elytron 10 veya daha fazla, oldukça geniş nokta sırası içerir. Nokta sıraları arasındaki boşluklarda belirgin ek noktalar vardır ve genellikle düzensiz ana nokta sıralarının arasında düzensiz daha ince nokta sıraları da bulunur. Elytranın yan kısımları aşağıya doğru eğimli bir şekilde devam ederek ventralde elytral epipleurayı oluşturur. Herbir epipleuronda arka koksall plakların altındaki hava deposu ile elytranın altını bağlayan karakteristik bir çentik bulunur. Ayaklar ince ve uzundur. Ön ve orta koksall küresel ve hareketlidir. Femur orta kısımda genişlemiş, tibia ve tarsus ise ince, silindirik yapıdadır. (Holmen 1987; Vondel 1997) (Şekil 4.2). Yakalanan Haliplidae familyasının genel dorsal görünümü ve ventral görünümü şekil 4.3'de kaydedilmiştir.



Şekil 4.2. Haliplidae familyasının genel görünüşü, üstten (Holmen 1987'den).



Şekil 4.3. Haliplidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.

4.1.2. Noteridae familyası hakkında genel bilgiler

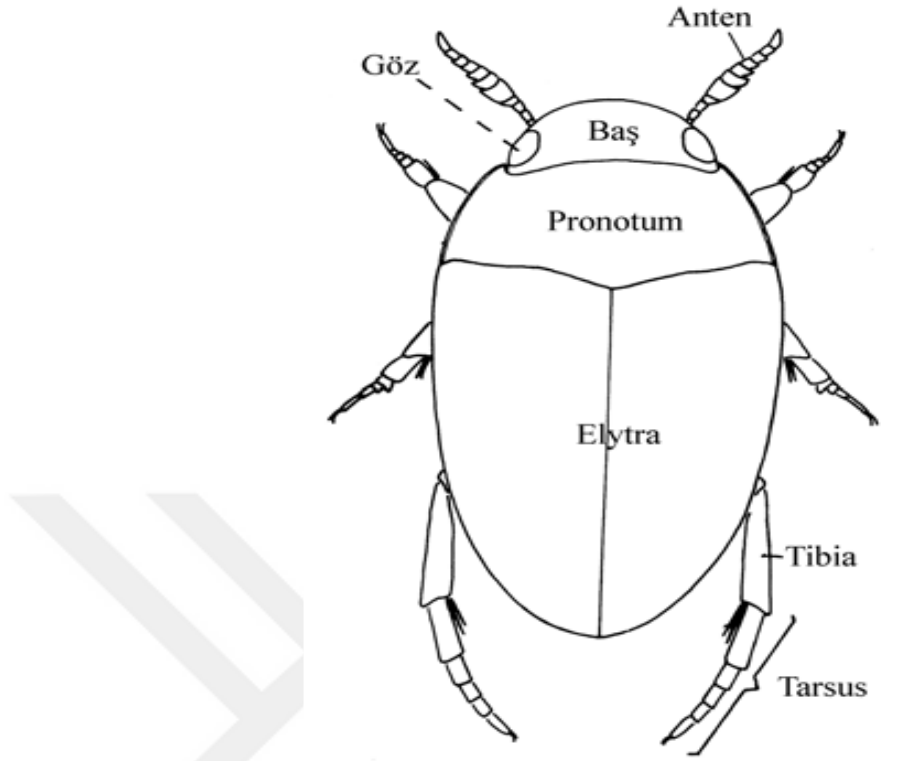
Noteridae familyası Avrupa, Asya, Kuzey ve Güney Amerika, Afrika ve Avustralya'da geniş bir dağılıma sahip Noterinae, tropikal ve subtropikal bölgede, orta ve güney Amerika ve Avustralya'da bulunan Notomicrinae ve sadece Japonya'da dağılım gösteren Phreatodytinae olmak üzere 3 altfamilyaya ayrılmıştır. Dünyada tanımlanmış 250 türle temsil edilirler (Nilsson 2003).

Noteridae familyası türleri, temelde durgun su alanlarında bulunurlar, yoğun bitki gruplarının aralarını ve bir kısmı da çürümekte olan ölü bitkilerin bulunduğu alanları tercih ederler. Boyları 1-8 mm arasındadır ve vücudun dorsali oldukça konveks, ventral taraf ise düzdür (Holmen 1987; Dettner 1997) (Şekil 4.4).

Baş küçük ve ileriye doğru uzamıştır. Gözler dorsal ve ventral kısımlara ayrılmamıştır. Labrum transvers ve oldukça kısadır. Antenler 11 segmentli ve filiformdur, bazen segmentler genişlemiştir. Labial palplerin son segmenti önceki segmentlerden çok daha uzundur, mandibuller uç kısımda çatallanmıştır. Pronotumun anteriorü dardır, yan kenarları belirgindir, posterior kenarı ortada uzamış ve skutellumun üzerini kaplamıştır (Holmen 1987; Dettner 1997).

Prosternal yapı iyi gelişmiştir, posterior kısmı mesosternumun üzerine doğru genişlemiştir ve metasternuma kadar uzanır. Proepisterna iyi gelişmiştir. Mesepimeron elytranın epipleurası ile mesepisternumu birbirinden ayırır. Metasternum çok geniş değildir, yan kısmı elytranın epipleurasına kadar ulaşmaz, transvers bir sutur ile ikiye ayrılmamıştır. Metepisternum orta koksallara kadar ulaşmaz. Metepimera alttan belirgin değildir (Dettner 1997).

Hareketli koksallara sahip ön ve orta ayaklar oldukça kısadırlar, yürümek ve kazmak için adapte olmuşlardır. Arka ayaklar uzundur ve yüzmeye modifiye olmuştur. Arka koksalları geniş, hareketli değildir, yan kenarları epipleuraya kadar ulaşır. Bütün tarsuslar belirgin olarak 5 segmentlidir (Holmen 1987; Dettner 1997). Yakalanan Noteridae familyasının genel dorsal görünümü ve ventral görünümü Şekil 4.5'de kaydedilmiştir.



Şekil 4.4. Noteridae familyasının genel görünüşü, üstten (Holmen 1987'den).



Şekil 4.5. Noteridae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.

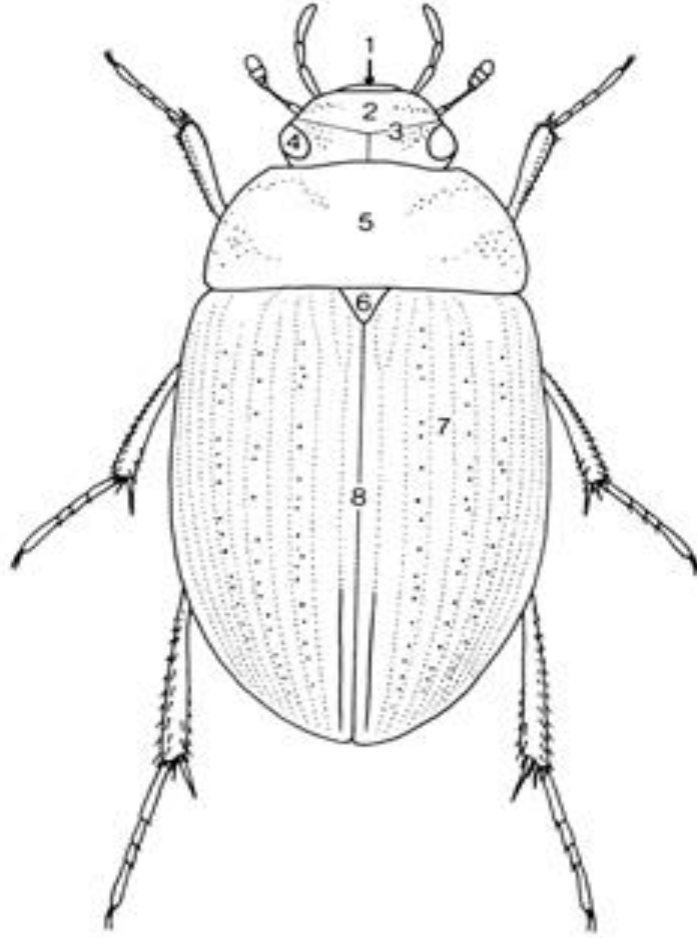
4.1.3. Hydrophilidae familyası hakkında genel bilgiler

Boyları 1-48 mm arasındadır. Vücut şekli değişkendir, uzamış az veya çok geniş oval ya da konvektirler. Renkleri çoğunlukla koyudur. Vücudun dorsali tüysüz, ventral yüzey ise kısa ve yoğun tüylüdür (Hansen 1987; 1996). Gözler iyi gelişmiştir, çoğunlukla konvektir, gözlerin posteriörü pronotumun anterior kenarına ulaşır. Baş gözlerin arka kısmında genellikle daralmıştır. Ocellus yoktur (Hansen 1987).

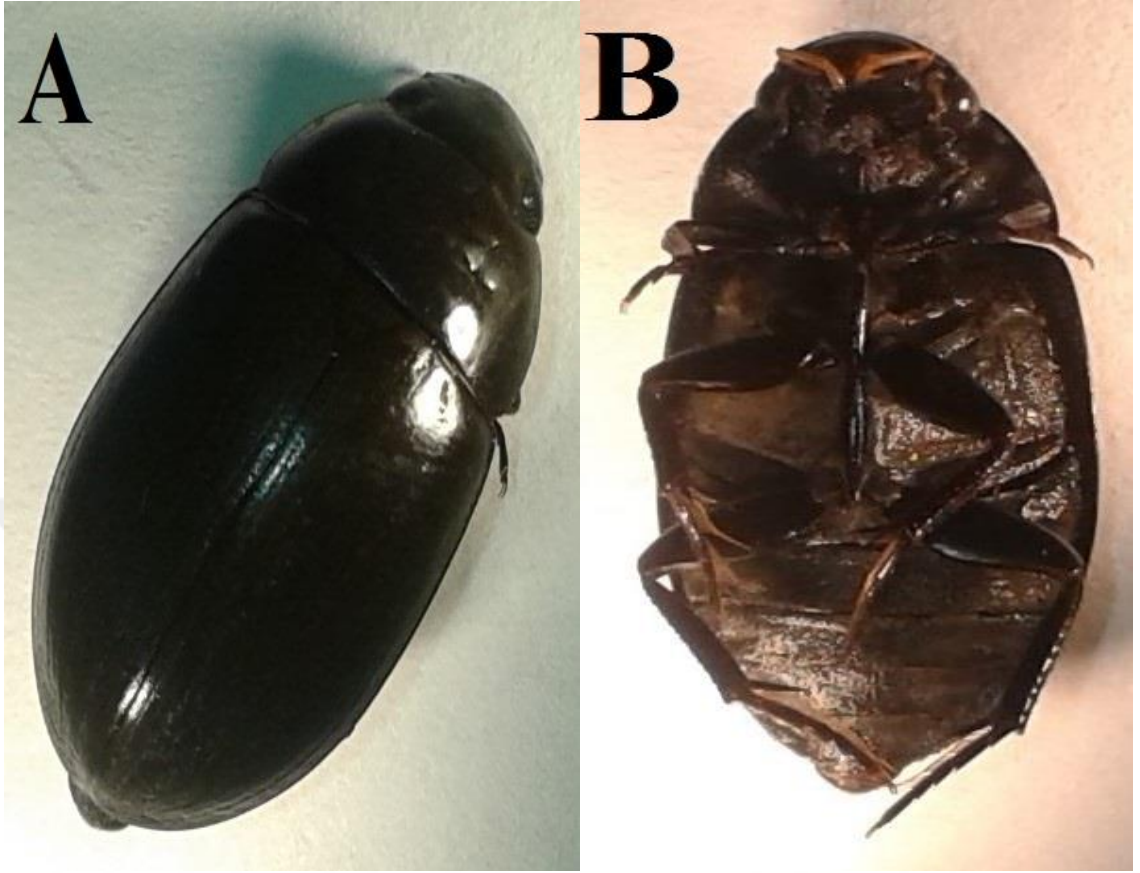
Mentum geniş, dikdörtgen biçimli ya da ön kısmı daralmış trapezoid şekillidir. Labial palpler 3 segmentlidir ve oldukça küçüktür. Maksilla iyi gelişmiştir, 4 segmentli maksil palpler belirgin olarak antenlerden çok daha uzundurlar. Antenler kısadır ve anten segmentlerinin sayısı 7-11 arasında değişiklik gösterir (Hansen 1987; 1996; Hebauer and Klausnitzer 2000).

Pronotum şekil olarak değişkendir, çoğu kez uzunluğundan daha geniştir, anteriorü daha dardır. Skutellum genellikle gizlenmemiştir, ancak, çoğunlukla küçüktür. Elitra tüysüzdür, çoğunlukla belirgin longitudinal yarıklar vardır veya seri şeklinde deliklidir. Sutural çizik vardır veya yoktur (Hansen 1987; 1996; Hebauer and Klausnitzer 2000). Abdomen görülebilir 5 sternitlidir. Prosternum genellikle kısadır, düz veya değişen şekillerde ortası karinalıdır (Hansen 1987; 1996; Hebauer and Klausnitzer 2000).

Ayaklar yüzmekten çok tırmanmak için gelişmiştir; ince ve uzun olabildikleri kadar kısa ve kalın da olabilirler. Femurun taban kısmı değişik boyutta yoğun noktalı ve tüylüdür, uç kısmı seyrek noktalı ve hemen hemen tüysüzdür. Tibia longitudinal olarak sıralanmış ince veya çok ince dikenler taşır. Meso ve metatibialar bazen saçak şeklinde ince uzun yüzücü tüylere sahiptir. Tarsuslar genellikle 5 segmentlidir (Hansen 1987; 1996) (Şekil 4.6). Yakalanan Hydrophilidae familyasının genel dorsal görünümü ve ventral görünümü Şekil 4.7 kaydedilmiştir.



Şekil 4.6. Hydrophilidae familyasının genel görünüşü, üstten (1. Labrum, 2. Klipus, 3. Suture, 4. Göz, 5. Pronotum, 6. Skutellum, 7. Elytra, 8. Elytral suture) (Hansen 1996'dan).



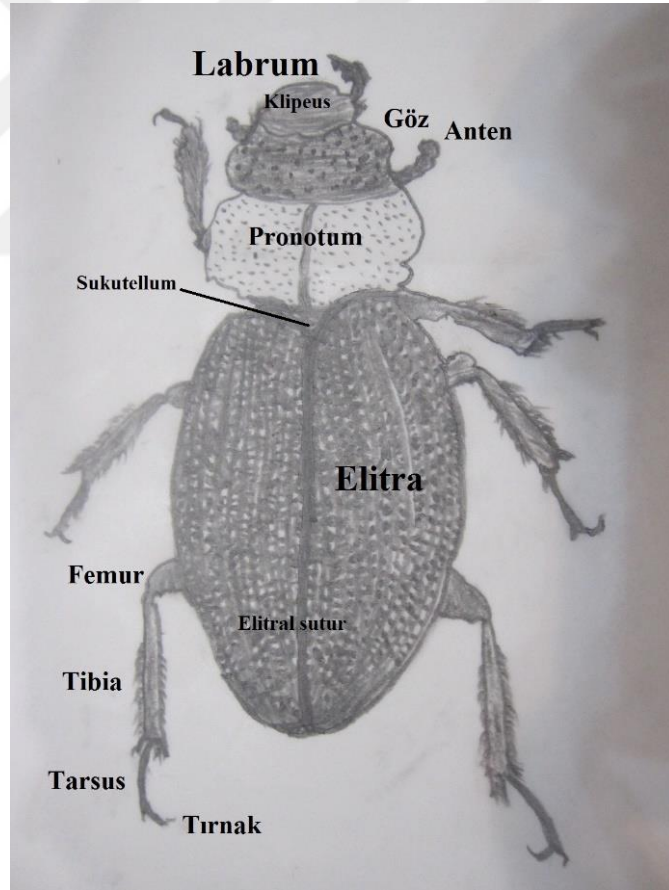
Şekil 4.7. Hydrophilidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.

4.1.4. Hydraenidae familyası hakkında genel bilgiler

Baş bazen gözlerin iç kenarlarında iyi gelişmiş iki ocel içerir. Scutellum belirgindir. Prosternum iyi gelişmiş, prokoxsa tarafından gizlenmemiştir. Abdomende 6-7 görünür segment bulunur. Anten 9-11 segmentlidir ve 5 distal segment genişlemiştir. Tarsus 5 segmentlidir ve basal segment çok küçüktür bu nedenle her zaman görünmez. İkinci ve 3. segmentler oldukça küçüktür ve birbirleriyle birleşmiş gibi görünürler. Hydraenidae familyası üyelerinde maksillar palpler genellikle uzundur ve bazen antenlerin uzunluğunu geçebilir. Tarsal segmentasyon 5-5-5 ya da 4-4-4 şeklinde ve apikal tarsal segment daima en uzun olandır (Hansen 1987) (Şekil 4.8).

Hydraenidae familyasına ait böcekler sucul veya yarı suculdur. Erginlerin tamamına yakın bir kısmı suculdur ve genellikle akarsu, göl, gölet, kaynak suları, birikinti, bataklık,

şelale, su kenarlarındaki nemli kumlar ve nemli topraklarda yaşarlar. Bazı türler su kenarında kum ya da çamur içerisinde tüneller kazarlar, bazı türler taşlara tutunurlar, bazıları nehirlerde içi su dolmuş olan tahta parçalarında ve bazıları da acı sularda yaşarlar. Larvaları yarı suculdur ve karnivor canlılardır. Göllerin, su birikintilerinin, nehirlerin ya da akarsuların su ile birleştikleri kıyı kesimlerinde ve özellikle de alglerin buldukları bölgelerde yaşarlar. Vücut büyüklükleri 1,2-2,5 mm arasında farklılık gösterir. Hydraenidae, kozmopolit bir familyadır. Bu familyanın 20'den fazla cinsi ve 1163 tanımlanmış türü bilinmektedir (White 1983; Castro *et al.* 2001; Castro and Delgado 2001). Yakalanan Hydrophilidae familyasının genel dorsal görünümü ve ventral görünümü Şekil 4.9'da kaydedilmiştir.



Şekil 4.8. Hydraenidae familyasının genel görünüşü, üstten.



Şekil 4.9. Hydraenidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.

4.1.5. Dytiscidae familyası hakkında genel bilgiler

Dytiscidae, Adephaga'nın ikinci en fazla tür ihtiva eden familyasıdır. Genel olarak yırtıcı dalgıç koleopterleri olarak bilinirler. Dünyada 150 cins ve yaklaşık olarak 4000 türle temsil edilir. Boyları 1,5 mm ile 40 mm arasında değişir. Yassılaştırmış ve akıntıya uyum gösteren elverişli vücutları nedeniyle iyi yüzücüdürler (Spangler 1981).

Renkleri değişken olup, çoğunlukla koyu renkli ancak bazı türlerde çizgiler bantlar ve değişik şekil ve boyutlarda benekler bulunur. Antenler tüsüz, filiform ve 11 segmentlidir, antenin segmentleri normal olarak uzun ve silindriktir. Palpler ince, maksil palpleri 4 segmentli, labial palpler 3 segmentlidir, I. segmenti diğer segmentlerden daha kısadır. Gözleri oval ya da yuvarlak az ya da çok dışarı doğru çıkık konumdadır. Gözler bazı türlerinde antenlerin kaidesi yakınlarında içeri girintili bazılarında ise bu girinti bulunmaz (Guignot 1947; Zaitsev 1972; Franciscolo 1979; Nilsson and Holmen 1995).

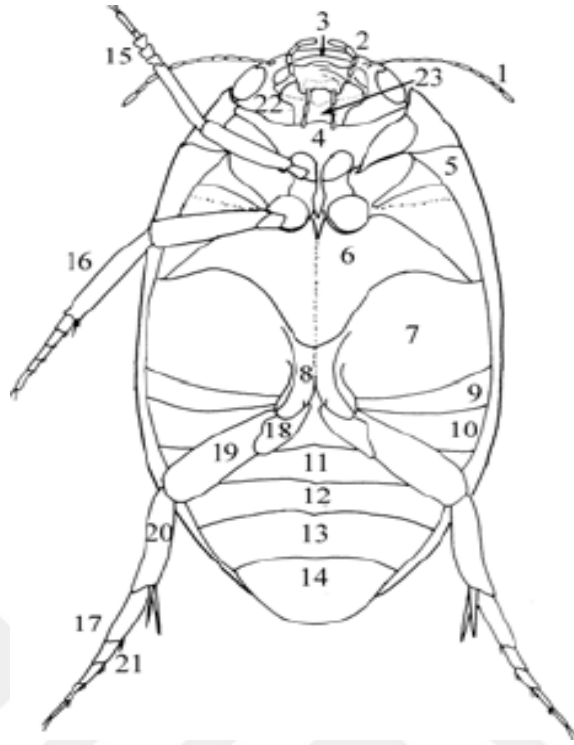
Pronotum geniştir, genellikle arka kenarı en geniştir. Ön kenarın köşeleri çoğu türde ileri doğru uzamıştır. Skutellum, pronotumun arka orta kısmının altında gizlenmiş ya da açıkta görünür vaziyettedir. Elitra düz, tüsüzdür veya çok ince tüyler ihtiva eder. Arka kanatlar iyi gelişmiştir (Zaitsev 1972; Franciscolo 1979; Nilsson and Holmen 1995).

Orta ve arka tibia ve tarsuslarının ventral kısmı saçak şeklinde setalı veya değildir, çoğunlukla dişilerinde yoktur. Erkeğin ön ve orta tarsuslarının I-III. eklemleri genişlemiştir ve ventral kısımları yapışıcı özellikte seta ya da plaklarla kaplıdır. Tırnaklar çoğunlukla uzamıştır, dişçiklidir veya farklılaşmış yapıdadır (Nilsson and Holmen 1995).

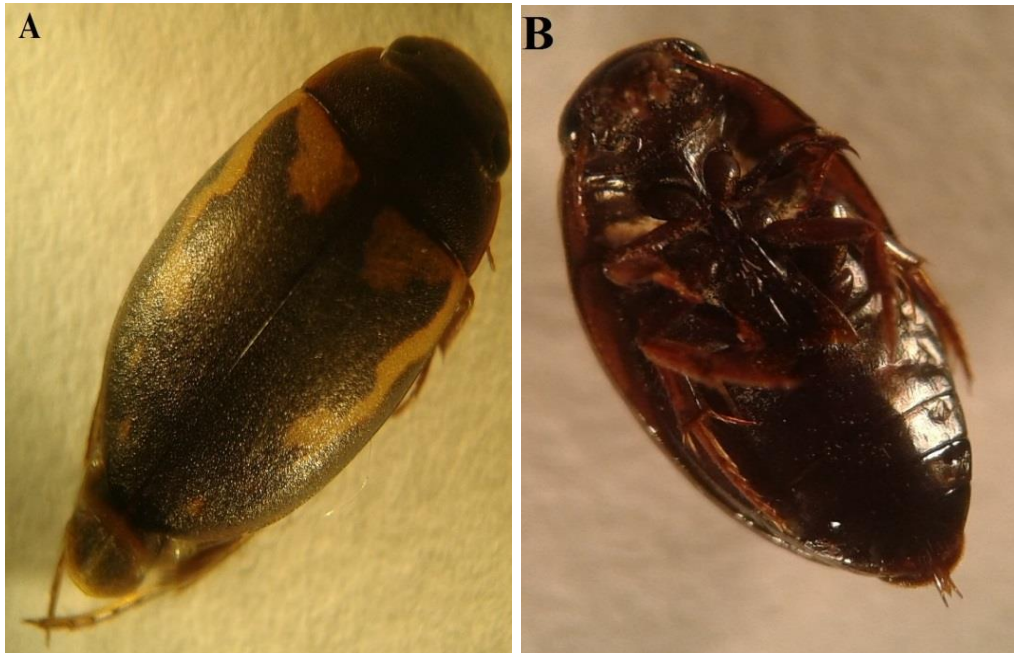
Abdomen görünür 6 segmentlidir. Birinci sternum metakoksal uzantı tarafından ortada bölünmüştür. Erkeklerin genital yapısında, ortada aedeagus ve yanlarda paramerler yerleşmiştir. Paramerler normalde simetrik olup, uç kısımlarında kıllar bulunur. Dişi bireylerin ovipozitörleri değişik şekil ve yapıdadır (Nilsson and Holmen 1995).

Genel olarak ditissidler, elitra altındaki hava miktarını arttırıp azaltarak, dalma-yüzeye çıkma mekanizmasına katkıda bulunurlar. Bu depodan hava çıkararak yoğunluğu arttırabilirler. Havayı dışarı atmak için tergumu kaldırır, elitrayı açar ve karın bölgesinin uç kısmını aşağı indirir. Böylece suyun boşluğa geçmesine izin verilir (Hicks and Larson 1991).

Ditissidler rahatsız edilmedikleri zaman suyun altında yavaşça yüzerek hareket ederler. Ağırlık merkezi vücudun alt-ön kısmına yakın olduğu için öncelikle arka kısımlarını toprağa oturturlar. Fakat tehlike anında ya da rahatsız edildiklerinde, hızlıca yüzerler ve yarım takla atarak, karın bölgesinin son kısmını dışarı çıkarıp hemen suya dalarlar. Çiftleşme ilkbahar'ın ilk dönemlerinde, nadiren de kışın sonunda olur (Usinger 1968; Zaitsev 1972). (Şekil 4.10). Yakalanan Dytiscidae familyasının genel dorsal görünümü ve ventral görünümü Şekil 4.11 'de kaydedilmiştir.



Şekil 4.10. Dytiscidae familyasının: 1. Anten, 2. Maksil palpleri, 3. Labrum, 4. Prosternum, 5. Epipleura, 6. Metasternum, 7. Metakoksal plak, 8. Metakoksal uzantı, 9-14. Abdominal segmentler, 15. Ön ayak, 16. Orta ayak, 17. Arka ayak, 18. Trokanter, 19. Femur, 20. Tibia, 21. Tarsus, 22. Gena, 23. Gula) (Nilsson and Holmen 1995'den).

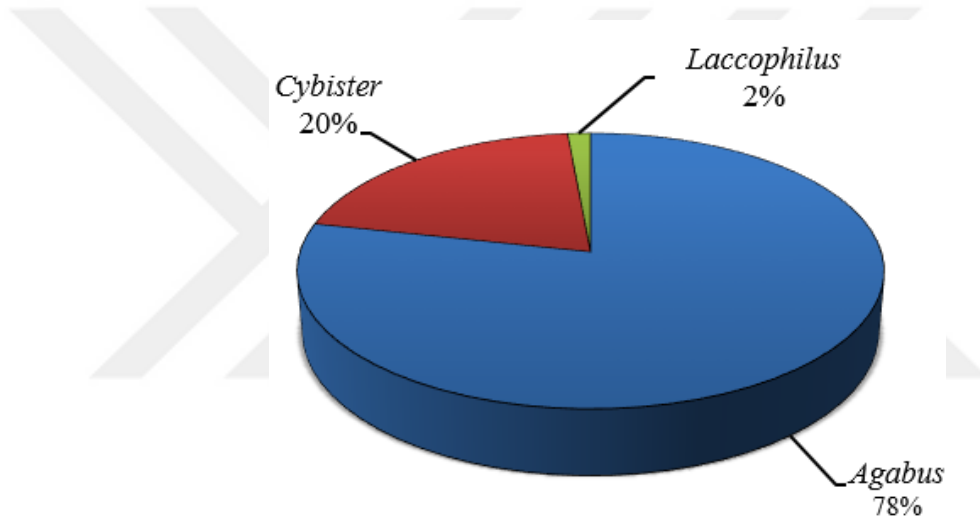


Şekil 4.11. Dytiscidae familyası A) dorsal görünüm B) ventral görünüm.

4.1.6. Araştırma alanında toplanan dytiscidae cinslerinin değerlendirilmesi

Dytiscidae familyasına ait toplam 3 cins (*Agabus*, *Cybister*, *Laccophilus*) tespit edilmiştir. Araştırma alanında tespit edilen Dytiscidae cinslerinin yüzdeleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Ayrıca, Ardebil eyaletinin ilçeleri, koordinatları, yakalandığı Dytiscidae familyasına ait cinsler Çizelge 4.4'de kaydedilmiştir.

Çizelge 4.3. Balıklı nehrinde Dytiscidae familyasına ait toplam örneklerinin cins yüzdeleri.



Çizelge 4.4. Araştırma alanı olarak seçilen Balıklı nehrinin bulunduğu Ardebil eyaletinin ilçelerin koordinatları ve Dytiscidae familyasına ait toplam örneklerinin cinsleri.

İlçeler	Koordinat	Yakalandığı Familyalar
Ardebil	38°15'N, 48°17'E	<i>Agabus</i> , <i>Cybister</i> , <i>Laccophilus</i>
Sarein	38°34'N, 48°06'E	<i>Agabus</i> , <i>Cybister</i> , <i>Laccophilus</i>
Nir	38°2' N, 47°59'E	<i>Agabus</i> , <i>Cybister</i> , <i>Laccophilus</i>

4.1.7. Alt Familya: AGABINAE Thomson 1867

Bu alt familyada bazı cinslerde arka tarsustaki yer alan tırnaklar bir biri ile eşit uzunlukta görülür, bazı cinslerde ise epipleuron, ortaya yakın yerde aniden daralma ait en önemli özellik metafemurun alt yüzeyinde, arka köşe yakınlarındaki setalar ile düzgün sıralanmış şekilde görülür.

Tribus: AGABINI Thomson 1867

Cins: *Agabus* Leach 1817

Bu cinse ait dünyada yaklaşık 200 tür temsil edilmiştir. Bu cins holarktık bölgedeki Dytiscidae familyasının baskın gruplarından biridir. Dytiscidae familyasında görülen hayat dönemlerinin büyük çoğunluğu bu grupta görülür. Bu cinse ait türler, genellikle vejetasyonu zengin küçük havuz birikintilerinde, küçük akarsularda ve pınarlar bulunabilirler. Türler pupa haricinde, tüm yaşantılarını su içinde geçirirler. Bu cinse ait türlerin büyüklükleri 6.5 ile 12 mm arasında olabilir. Farklı renklerde ve desenlerde görülürler. Vücutları uzun, genişçe oval şeklindedir. Bazı türlerde metasternal kanadın genişliği farklıdır. Ayrıca, arka koksada iç hat boşluğu orta genişlikte görülür. Arka tarsusun tırnakları çok türlerde aynı uzunluktadır. Bazı türlerde arka tarsomerler dış kenarda hafif veya lobsuz görülür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Agabus* cinsinin dorsal görünümü.

4.1.8. Alt Familya: DYTISCINAE Leach 1815

Bu alt familyanın dünyada geniş bir dağılımı vardır. Dytiscine alt familyasında dünyada 5 tribusa ayrılır ve bunlardan yaklaşık 400 tür temsil edilmiştir. Bu alt familya ait türlerin çoğu durgun su birikintilerinde yaşamaktadırlar. Vücut büyüklükleri 8 ile 48 mm arasındadır değişebilir. Cinslerin vücutları uzun ve yan hatlarıyla genişçe ovaldir. Bazı türlerde üst yüzey farklı desenlerle ve renklerde görülür. Vücudun üst yüzey kılız görülür ama bazı dişilerde bazı kısımlarda küçük kıllar görülür. Bu alt familya ait türlerin antenleri ince ve uzundur. Tarsuslar farklı olabilir ve her biri beş tarsomerden oluşur. Arka tibianın üst yüzeyinde, ortadan ikiye ayrılmış bir sıra seta vardır. Türlerin çoğunda, hem dişi ve ham erkeklerde arka tibia ve arka tarsusun üst ve alt yüzeyinde saçak gibi setalar vardır. Ayrıca, türlerin çoğunda arka tarsus ya bir tırnaklı ya da eşit olmayan tırnaklar içerir.

Tribus: CYBISTRINI Sharp 1882

Cins: *Cybister* Curtis 1827

Dytiscine ait *Cybister* cinsi dünyada yaklaşık 100 tür temsil edilmiştir ve geniş bir cinistir. Bu cisin Güney ve Kuzey Afrikada sadece birkaç türü temsil edilmiştir. Bu cinse ait türlerin çoğunun büyüklükleri 13.5 ile 43.5 mm olabilir. Prosternum düşük ve orta kısımda dışbükey olup kanallar taşımaz. Türlerde metasternal kanat geniş görülür. Genellikle, arka koksanın on kenarı, en azından orta koksal boşluktan ayrılmıştır. Ayrıca, arka koksanın hatları belirgindir. Bu cinse ait türlerde erkeklerin arka tarsusunda bir tırnak görülür. Dişilerde tek tırnaklı ya da arka tırnağı kuvvetlice kısalmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Cybister* cinsinin dorsal görünümü.

4.1.9. Alt Familya: LACCOPHILINAE Gistel 1856

Alt Familya ait Laccophilinae, dünyada yaygın olup 350 türü 11 cins içermektedir. Türlerinin çoğu, durgun sularda ve akarsularda görülür. Bu alt familya ait türlerin vücut uzunluğu 2.3 ile 7.5 mm arasındadır. Bunlarda vücut ovaldır ve üzerindeki hatlar düzdür. Türlerde renk değişikliği çok görülür ve dorsal yüzeyin desenleri çoğunlukla farklılık gösterir. Vücudun üst yüzeyde hiç bir kıl görülmez. Dorsal görünümünde pronotumun yanlarında kenar kısım yoktur. Ayrıca, sukutellum, pronotumun arka kenarı tarafından örtülmüştür ve prosternum uzantısı aynı hat üzerindedir. Metepisternum, orta koksal boşluğa uzanmaz. Türlerde tarsuslar beş segmenden oluşmuştur ve arka tarsomerlerin arka uç kenarları lobludur. Türlerinin çoğunda sadece bir tırnak bulunur veya birden çok tırnaklı olan türlerde, tırnakları eşit değildir.

Tribus: LACCOPHILINI Gistel 1856

Cins: *Laccophilus* Leach 1815

Dünyada yaygın olan *Laccophilus* cinsi 250'den fazla türe sahiptir. Türlerinin çoğu durgun suların ve akarsu birikintilerinin sakinleridirler. Bu cinse ait olan türlerin vücutları küçük olup ve uzunlukları 3.3 ile 7.5 mm'dir. Baş aşağı doğru dönmüş, az veya çok hipognathus tiptedir. Türlerinin çoğunda pronotumun arka kenarı, orta kısımda bir köşe oluşturur. Elitral ağlanma basit ya da ikilidir. Elitron, arka yarısında, sublateral olarak setal saçaklıdır. Prosternal uzantı uzun ve tepesi sivridir. Metasternum, ön-orta kısımda çentikli, metasternal kanat yan kısımda dar ve kavislidir. Arka koksal uzantılar ön kısımda paralel kenarlı, arka kısımda, arka trokanterin tabanı üzerindeki loblar gibi ayrıktır. Arka koksa, kısa paralel çizgilerden oluşan bir bant taşır veya bu bant yoktur. Altıncı karın segmenti uç kısımda yuvarlak, tepesi kesik ya da çentiklidir. Arka tibia iki tane geniş uçlu supur taşır. Bu supurların tepe kısmı ayrıktır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Laccophilus* cinsinin dorsal görünümü.

4.2. Kitosan Eldesi

4.2.1. *Agabus* cinsinden kitin eldesi

Bu araştırmada kullanılan böcek örneği olarak arazi çalışmaları sonunda en yoğun toplanan *Agabus* cinsi seçilmiş ve çalışmaya bu örnekler üzerinden devam edilmiştir.

Agabus cinsine ait örneklerin temizlenip kurutulan dış iskeletinden ağırlığı 3.12 gr kaydedilmiştir.

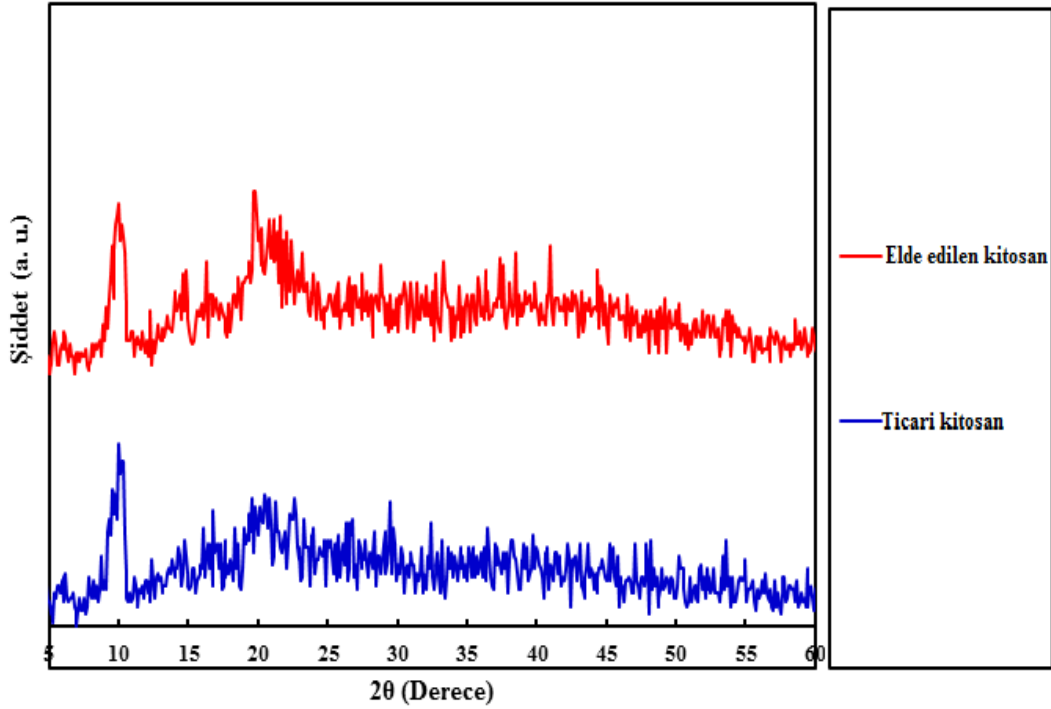
Kitin eldesi için, birinci adımda kurutulan *Agabus* cinsinin temizlenip kurutulan dış iskeleti deproteinizasyonu için, bir beher içine alınmış ve %5 (w/v) sodyum hidroksit çözeltisi ile 90 °C'de 2 saat boyunca (1 gr kabuğa 20 ml çözelti) muamele edilmiştir. Daha sonra kalan malzeme filtre edilmiştir ve nötral pH değerine ulaşılan kadar distile su ile yıkanmıştır. İkinci adımda demineralizasyon için, 1 N hidroklorik asit çözeltisi oda sıcaklığında, 30 dakika boyunca, 1 gr kabuğa 10 mL çözelti olacak şekilde kullanılmıştır. Kalan malzeme filtre edilmiştir ve nötr pH değerine ulaşılan kadar destile su ile yıkanmıştır. Bu adımlar arasında, sarımsı renkli kitin elde edilmiş ve beyazlaştırma işlemi gerekmektedir. Üçüncü adımda dekolorasyon işlemi için ise, aseton içine elde edilen kitin parçaları atılmış ve 24 saat beklemeye bırakılmıştır. Beyazlatılmış olan kitin parçaları filtrasyon ile ayrılarak, nötr pH değerine ulaşılan kadar saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra 90 °C'de 2 saat kurumaya etüv içerisine bırakılmıştır ve miktar tayini yapmak üzere ağırlığı tartılmıştır. Bu araştırmada *Agabus* cinsinen elde edilen kitin ağırlığı 1.204 gr, kaydedilmiştir.

4.2.2. Kimyasal yolla kitinden kitosan üretimi

Kitosan üretimi, kitindeki asetil gruplarının yüksek alkali çözeltiler ile uzaklaştırma yoluyla gerçekleştirilmektedir. Buna göre, önceki basamaklarda elde edilen kitin tartıldıktan sonra bir erlen içerisinde yerleştirilmiş ve üzerine hazırlanan %50 (w/v) sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek 100 °C'de, 6 saat etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda çözelti filtre kağıdı ile süzülerek, alkali çözeltinin uzaklaştırılması için saf su ile pH 7 oluncaya kadar yıkanmıştır. Ayrılan kitosan parçaları aseton ile de yıkanarak, 60 °C'de, 1 saat etüvde kurumaya bırakılmış, miktar tayini yapmak üzere ağırlığı tartılmış ve kitosan ağırlığı 0.75 gr, kaydedilmiştir.

4.2.3. XRD analizi

Bu çalışmada elde edilen kitosan ve ticari kitosan XRD analizi kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.15'de gösterilmiştir. Şekil 4.15'a göre, kitosanın ait olduğu iki farklı kristal formu ($2\theta \approx 10^\circ$ ve $2\theta \approx 20^\circ$) gözlenmektedir ve monoklinik sisteme aittir. Ayrıca bu analize göre $2\theta \approx 13^\circ$ bir amorf formu hem elde edilen kitosan ve hem ticari kitosanda görülmektedir. Moleküller arası hidrojen bağları ve daha yüksek deasetilasyon derecesi nedeniyle, *Agabus* cinsinen elde edilen kitosan, 10° ve 20° 'deki kırınım pikleri, ticari kitosandan daha geniş ve daha güçlü olarak değerlendirilmektedir.

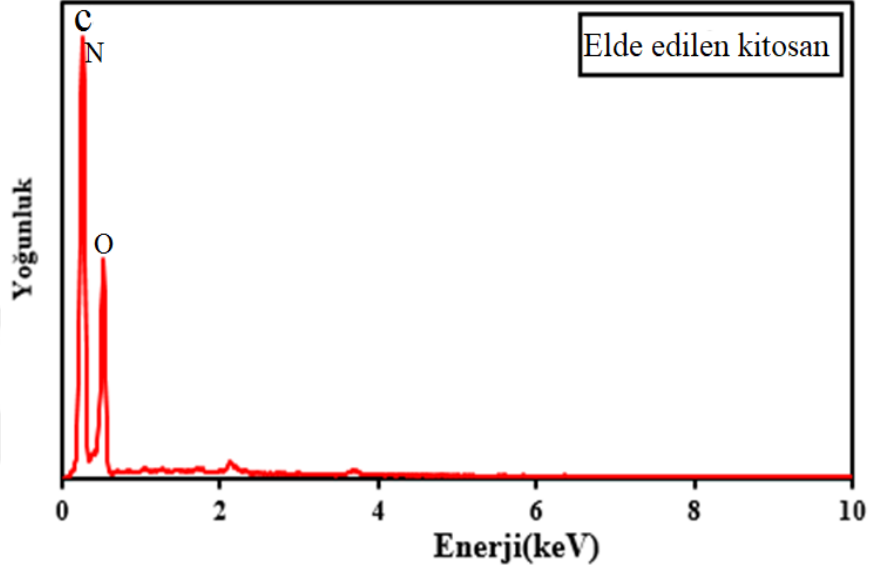


Şekil 4.15. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için XRD analizi.

4.2.4. EDX analizi

Bu çalışmada elde edilen kitosanın kimyasal bileşimini ve saflığını değerlendirmek için EDX analizi kullanılmış ve sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Bu grafiğe göre, diğer saf olmayan maddelerin karakteristik zirveleri yoktur, buna karşılık gelen saf

materyallerin oluşumuna işaret etmektedir. Kitosan içindeki O, N ve C'nin ağırlık yüzdeleri sırasıyla % 24, %30.1 ve %45.9 olarak belirlenmiştir.

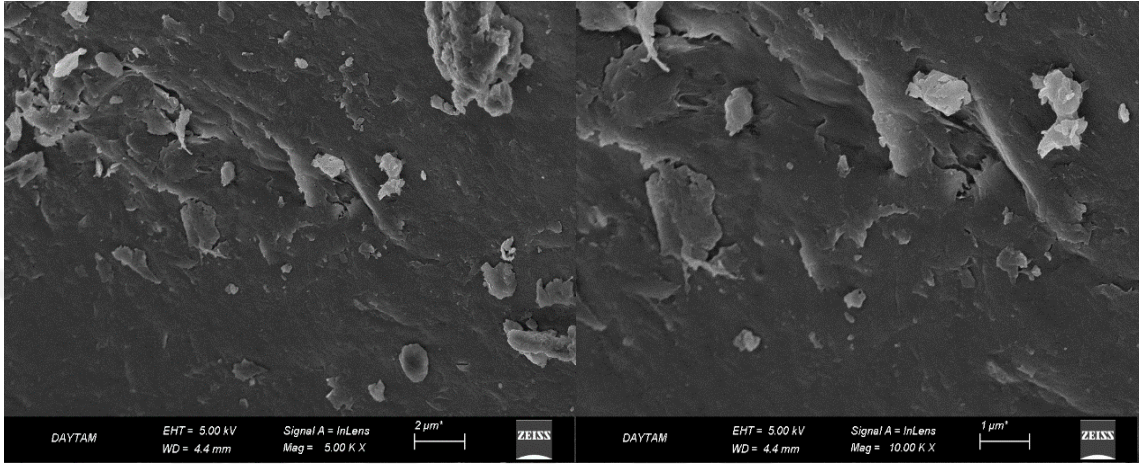


Şekil 4.16. Elde edilen kitosan numunesi için EDX analizi.

4.2.5. SEM analizi

Bu çalışmada elde edilen kitosan yüzey karakterizasyonu ve farklılıkları incelemek için SEM tekniğine uygun olarak vakum altında palladyum-altınla kaplanması suretiyle değişik büyütme oranlarında görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.17'de kitosanın morfolojisi gösterilmektedir. SEM incelemelerine göre; bazı bölgelerin yassı ve bazı bölgelerin ise homojen olmayan bir yüzey sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, elde edilen kitosan membranı kompakttır ve hasar görülmemektedir. Bazı kısımlarda küçük partiküller gözlemlenmektedir. Bunun nedeni filtrasyon ve yıkanma işlemleri olarak değerlendirilmiştir. Literatüre bakıldığında kitin ve kitosan için farklı yüzey morfolojileri tanımlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda kitin ve kitosan için kaydedilen yüzey morfolojileri; a) nano lif ve gözenekli yapıya sahip olan, b) sadece nano liflerden oluşan, c) sadece gözenekli olan, d) nano lif ve gözeneklerin bulunmadığı düz bir yüzeydir (Kaya et al. 2014b). Mevcut çalışmada da nano lif ve gözeneklerin bulunmadığı bir yüzey morfolojisine sahip kitosan gözlemlenmiştir. Bilindiği üzere kitin nano lifler halinde canlı

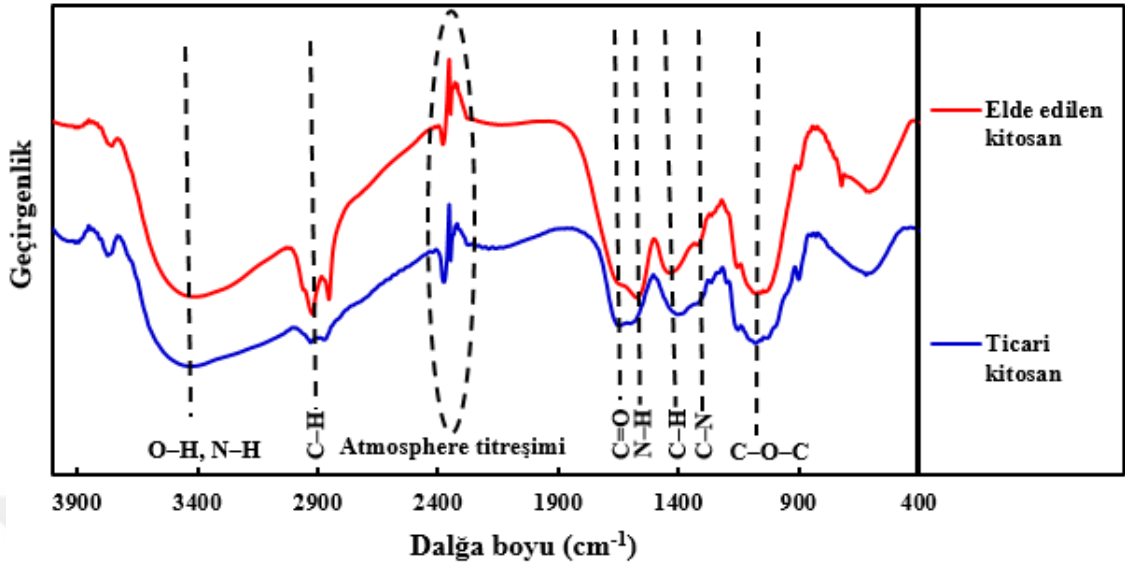
tarafından sentezlenmektedir. Mevcut çalışmada fiberlerin görülmemesi muhtemelen yüksek baz konsantrasyonunda kitinin deasetillenmesi sonucu bu liflerin şeklinin bozularak düz bir yüzey formuna dönüşmesi olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.17. Elde edilen kitosanın SEM görüntüleri.

4.2.6. FT-IR analizi

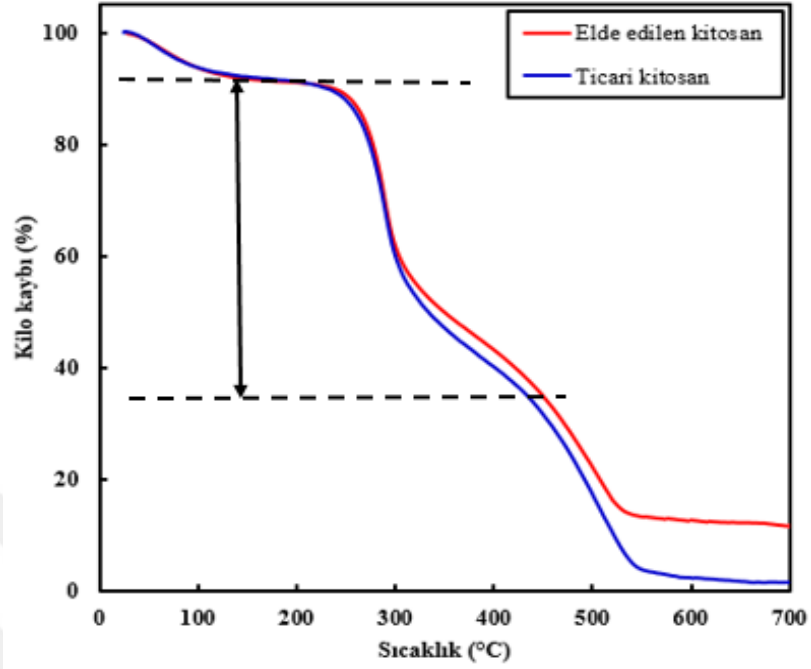
FT-IR spektrumları ayrıca, 400 ila 4000 cm^{-1} bölgelerinde KBr pelet tekniği kullanılarak katı fazdaki fonksiyonel grupları belirlemek için kaydedilmiştir (Şekil 4.18). Şekil 4.18'da *Agabus* cinsinen elde edilen kitosan ve ticari kitosan numunelerinin spektrumları gösterilmiştir. Amino grubunun gerilme titreşimi N-H, hidroksil grupları O-H tarafından sağlanan germe titreşimlerine bağlı 3408 cm^{-1} de görülür. Daha sonra 2926 cm^{-1} 'de karbon-hidrojen bağı C-H simetrik gerilme titreşimi görülür, deformasyon titreşimi (N-H, tip II amid bandı) 1574 cm^{-1} 'de görülen karbonil grubunun titreşim gerilimi (C=O, tip I amid bandı) 1646 cm^{-1} 'de bulunur. Metilen grupları makaslarının C-H deformasyon titreşimi 1436 cm^{-1} 'de, bağı gerilme titreşimi (C-N, III. tip amid bandı) 1320 cm^{-1} 'de görülürken. Son olarak, 1082 ve 1032 cm^{-1} 'deki bantlar, C-O-C glikosidik bağlantı bağlarına karşılık gelen, kitosan daki β - (1,4) bağlarını gösterilmiştir. Mevcut çalışmada üretilen kitosan ile ticari kitosanın benzer bantları vermesi üretilen kitosanın saflığını göstermektedir.



Şekil 4.18. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için FT-IR spektrumu.

4.2.7. TG analizi

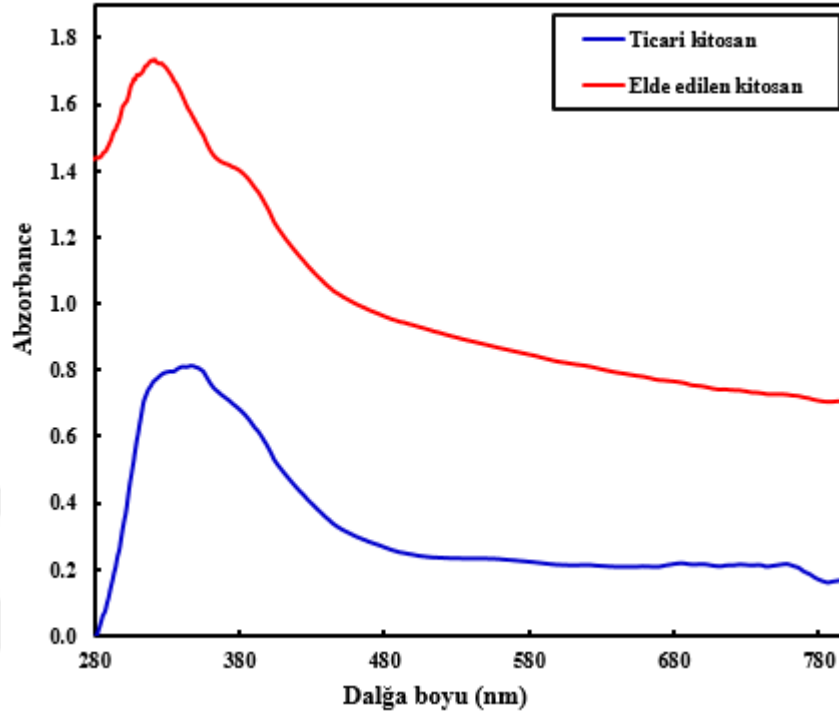
Agabus cinsinen elde edilen kitosan ve ticari kitosan numunesinin TG analizi $10^{\circ}\text{C} / \text{dk}$ 'da ve oda sıcaklığından 700°C 'ye kadar hava atmosferi altında bir ısıtma ile Linseis STA PT 1000 cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve şekil 4.19 elde edilen pikler gösterilmiştir. Bu grafiğe göre, numunelerin ağırlıksızlığı iki aşamaya bölünür. Birinci aşamada, 20 ila 300°C arasında, ısıtma işlemi sırasında kitosandaki su moleküllerinin desorpsiyonuna atfedilen yaklaşık %11.87'lik ağırlık kaybı gösterilmektedir. İkinci aşamada ise, 300 ila 420°C arasında kitosana zincirinin bölünmesi gerçekleşir bu aşamada %87.7'lik ağırlık kaybı gösterilmektedir. *Agabus* cinsinen elde edilen kitosanın ağırlık kaybı oranı ticari kitosandan daha düşüktür. Bu sonuçlar, elde edilen kitosanın daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.19. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için TG analizi.

4.2.8. UV-vis DR spektrum analizi

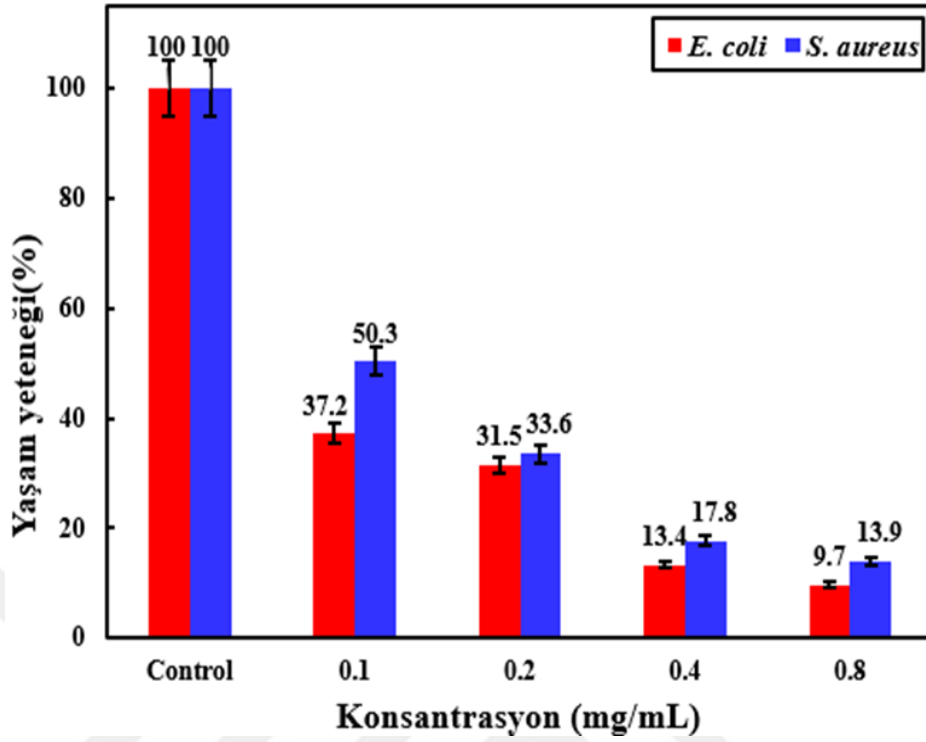
UV-vis DR spektrumları, ışık ışınlaması altında hazırlanan numunelerin elektronik absorpsiyon özellikleri hakkında yararlı bilgiler vermektedir. Şekil 4.20, elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için UV-vis spektrumlarını 280-800 nm aralığında göstermektedir. Ticari kitosan örneği 360 nm'de yoğun absorbans göstermiştir. Aksine, elde edilen kitosan 379 nm'de absorbans göstermektedir. Görülebilir ki, her iki numunede görünür bölgede absorbans yoktur. Bu sonuç elde edilen kitosan ve ticari kitosan numunelerinin çok farklı olmadığını göstermektedir. DRS analizinin sonuçları çok yakın ve FT-IR kırınım sonuçları ile iyi bir korelasyon göstermiştir.



Şekil 4.20. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için UV-vis spektrum analizi.

4.2.9. *Agabus* cinsinden elde edilen kitosanın antibakteriyel özellikleri

Bu çalışma ile elde edilen kitosanın farklı konsantrasyonlarda antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Şekil 4.21'de çalışma sonunda *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin canlılık eğrilerini göstermektedir. Patojenik bakterilerin elde edilen kitosanın farklı konsantrasyonlarına karşı yapılan uygulama sonunda, $P < 0.05$ 'te tek yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiş ve sonuçların belirtilen aralıkta anlamlı olduğu belirlenmiştir. Her iki bakteriye karşı konsantrasyona bağlı bir aktivite belirlenmiştir. Elde edilen kitosanın antibakteriyel aktivitesi bakımından, *E. coli* (9.7 ± 0.83) bakterisinde, *S. aureus* (13.9 ± 0.58) bakterisine karşı daha yüksek sonuç verdiği belirlenmiştir. Sonuçların daha açık değerlendirilebilmesi için ayrıca uygulama görüntüleri Şekil 4.22 'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Elde edilen kitosanın, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri.

Patojenik bakteri	Kontrol	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.8 mg/mL
<i>E. coli</i>					
<i>S. aureus</i>					

Şekil 4.22. *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı uygulamanın petri görüntüleri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma için, 2016 Nisan-Ekim ayları arasında düzenlenen araştırma gezilerinde Balıklı nehri ve akarsu yatağının çekilmesi sonucu ortaya çıkan küçük su birikintilerinden oluşan toplam 16 istasyondan sucul Coleoptera örnekleri toplanmış ve bu canlıların familya üzerinde faunistik araştırması yapılmıştır. Yapılan örneklemelelerde sucul Coleoptera ordosunun iki alttakımına dahil olması tespit edilmiştir.

Adephaga alttakımına dahil 3 familya: Haliplidae, Noteridae ve Dytiscidae tespit edilmiştir.

Polyphaga alttakımına dahil 2 familya: Hydraenidae ve Hydrophilidae tespit edilmiştir.

Bu istasyonlardan en fazla toplanan böcekler Dytiscidae familyası ve Hydraenidae familyası en çok toplanan örneklerdir. Coleoptera takımına ait Dytiscidae familyası çok farklı habitatlarda en fazla yayılış gösteren familyadır. Dytiscidae familyasına ait faunistik araştırmasında toplam 3 cins (*Agabus*, *Cybister*, *Laccophilus*) tespit edilmiştir. Bu çalışma öncesindeki literatür kayıtlarına göre Balıklı nehri sucul böcekler faunası üzerinde hiç bir çalışma bulunmamaktadır.

Ayrıca, bu çalışma ile Dytiscidae familyasına ait *Agabus* cinsinden elde edilen kitin kullanılarak kitosan üretilmiştir. *Agabus* cinsinden elde edilen kitosanın, XRD, EDX, SEM, FT-IR, TG, UV-vis DR spektroskopi analizleri yapılmış ve ticari kitosan ile karşılaştırılmıştır.

İşlem öncesinde *Agabus* cinsinin dış iskelet kısmı saf su ile iyice yıkanmış ve kurutulmuştur. Daha sonra, mikserde küçük parçalar haline getirilmiştir ve 3.12 gr kuru ağırlığı, kitin ekstrakte için kullanılmıştır. Genel olarak, deproteinizasyon, demineralizasyon, ağartma işlemler ile sonunda elde edilen kitin 1.204 gr olarak kaydedilmiştir. Kitosan üretimi, kitindeki asetil gruplarının yüksek alkali çözeltiler ile

uzaklaştırma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Tüm işlem basamaklarının sonunda üretilen kitosanın ağırlığı 0.75 gr, kaydedilmiştir. Sunuçlara göre kitin ve kitosan verimi sırasıyla %36 ve %25 olarak belirlenmiştir. Elde edilen ve ticari kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri çizelge 5.1 'de gösterilmiştir. Bu çizelgeye göre her iki kitosan görünümü toz şeklindedir ve kokusuzdur. Ticari kitosanın rengi beyazdır ama sunuçlara göre elde edilen kitosanın rengi biraz farklı ve deve tüyü renge sahiptir. Bu renk farkı demineralizasyon ve ağartma işlemlerindeki farklılık nedeniyle görülmektedir.

Çizelge 5.1. Elde edilen ve ticari kitosanın fiziksel ve kimyasal özellikleri.

Numune	Görünüm	Renk	DD (%)	Protein kalıntıları (%)	Kül içeriği (%)
Elde edilen kitosan	Toz	Devetüyü rengi	77%	18%	0.31
Ticari kitosan	Toz	Beyaz	85%	32%	0.59

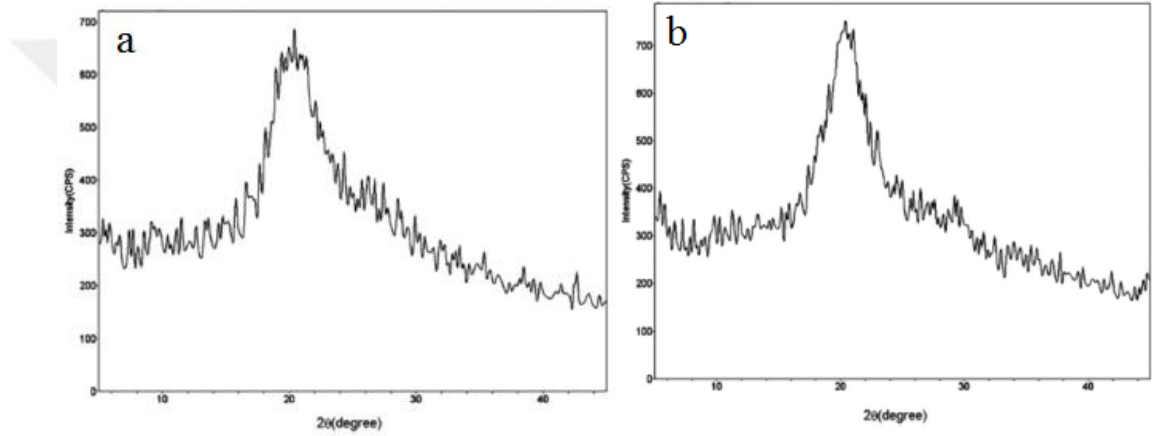
Genel olarak, kitin içerikleri, canlının yaşı ve cinsi gibi parametreye göre değişiklik göstermektedir. Ancak kitin içeriğinin genellikle %13-42 oranında bulunması beklenmektedir. Bu doğrultuda, Ma ve ekibi (2015) yaptıkları çalışmada, 100 gr *Catharsius molossus* böceğın kabuklarından 35 gr kitin elde etmişlerdir. Deasetilasyon ve saflaştırma yoluyla 33.3 gr elde edilen kitinden 24 gr kitosan elde etmişlerdir. Bu çalışmada *C. molossus* L.'den kitin ve kitosan verimi sırasıyla %24 ve %17 kaydedilmiştir (Ma *et al.* 2015). Shin ve arkadaşları (2019) kitin ve kitosanı *Tenebrio molitor*, *Zophobas morio* ve *Allomyrina dichotoma* türlerinden elde etmişler. Bu araştırmacıların sunuçlarına göre kitin ve kitosan verimi ergin böcekler daha yüksektir. Bu verimleri sucul böcekler ile karşılaştırdıklarında *Agabus* cinsinin ekzooskeleton kısmında bulunan kitin miktarın daha yüksek olmasının göstermiştir. Yapılan bu araştırmada *Allomyrina dichotoma* türünden elde edilen kitin miktarı ergin numunesinde %12.70 kaydedilmiş ve bu böcek diğer iki böcekten daha iyi verim göstermiştir (Shin *et al.* 2019). Bu çalışma ile elde edilen kitin ve kitosan verimi her iki literatürde yer alan sonuçlara göre kitin veriminde yaklaşık %10

kitosan veriminde ise %7-11 daha yüksek görülmektedir. Bu fark çalışmada kullanılan böceklerin türleri ile ilgili olarak değerlendirilmiştir. *Agabus* cinsinin, *C. molossus* ve *A. dichotoma* türlerine göre daha yüksek oranda kitin ihtiva ettiği ve verimin yükseldiği düşünülmektedir. Ma ve ekibi yapılan verim hesaplarını karides ve yengeçlerden elde edilen kitin ve kitosan ile karşılaştırmışlar ve *C. molossus* L.'den kitin ve kitosan verimin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Diğer literatürlerde karides ve kerevit üzerinde yapılan çalışmalarda farklı verimler ve değişik deasetilasyon dereceleri kaydedilmiştir. Koçer (2015) tarafından yapılan bir tez çalışmasında, 5 g karides kuru kabuğunan, iki adimli deproteinizasyon sonucunda 3.69 g kabuk elde edilmiş ve %26 kabuğun protein içeriği belirlenmiştir. Demineralizasyon işlemi yapıldıktan sonrada %52 olarak kabuğun mineral içeriği bulunmuştur. Bu tezde 5 g karides kabuğunan %22 oranında (1.09 g) kitin elde edilmiştir. Yapılan bu tezde 5.75 g kerevit kabuğundan ise uzaklaştırılan %35 ve %44 protein ve mineral içerikleri bulunmuş ve kitin içeriği %22 olarak kaydedilmiştir. Karides ve kerevit üzerinde yapılan tez çalışmasında kitosan verimi sırasıyla %18.0 ve %12.2 olarak belirlenmiştir (Koçer 2015). Başka bir çalışmada Hajji ve arkadaşları (2014) karides kabuklarından elde edilen kitin miktarı %20 olarak bulmuşlardır. Bu araştırmacılar önce demineralizasyon ve sonra deproteinizasyonun yapmışlardır (Hajji *et al.* 2014). Literatürde belirtilen değerlere göre karides ve yengeç örneklerine göre oldukça yüksek verim kaydedilmiştir.

XRD analizi kullanılarak elde edilen kitosan ve ticari kitosanı incelenmiş ve kitosanın ait olduğu iki farklı kristal formu ($2\theta \approx 10^\circ$ ve $2\theta \approx 20^\circ$) görülmüştür. Bu farklı kristal formları monoklinik sisteme aittir. Suda yaşayan böceklerden elde edilen kitosan, 10° ve 20° 'deki kırınım pikleri, ticari kitosandan daha geniş ve daha güçlüdür. Bu pikler moleküller arası hidrojen bağları ve daha yüksek deasetilasyon derecesi nedeniyle gözlemlenmektedir.

Literatürlerdeki XRD sonuçları bu tez çalışmasında elde edilen kitin ve kitosanın XRD analizleri ile uyumludur. Örneğin, Kaya ve arkadaşları (2014a) patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata*) üzerinde bir çalışma rapor etmiştir. Şekil 5.1'de görülen gibi, *L. decemlineata* türün 'den elde edilen kitosanların XRD analizinden yetişkinler için 9.38

ve 20.4° , larvalar için 9.7° ve 20.2° ve ticari kitosan için 10.1° ve 20.18° elde edilen pikleri gözlenmiştir. Bu çalışmada kitosanların XRD analizlerinden elde edilen bu iki pikler, karides, kerevit ve yengeç gibi organizmalardan alınan XRD analizlerine benzer olduğunu göstermiştir (Kaya *et al.* 2014a). Bu tez çalışmasında elde edilen kitosan XRD analizlerine göre 10° ve 20° 'deki kırınım pikler görülmektedir. Bu pikler Kaya ve arkadaşlarının patates böceği üzerinde yaptıkları XDR analizleri ile büyük benzerlik göstermektedir.



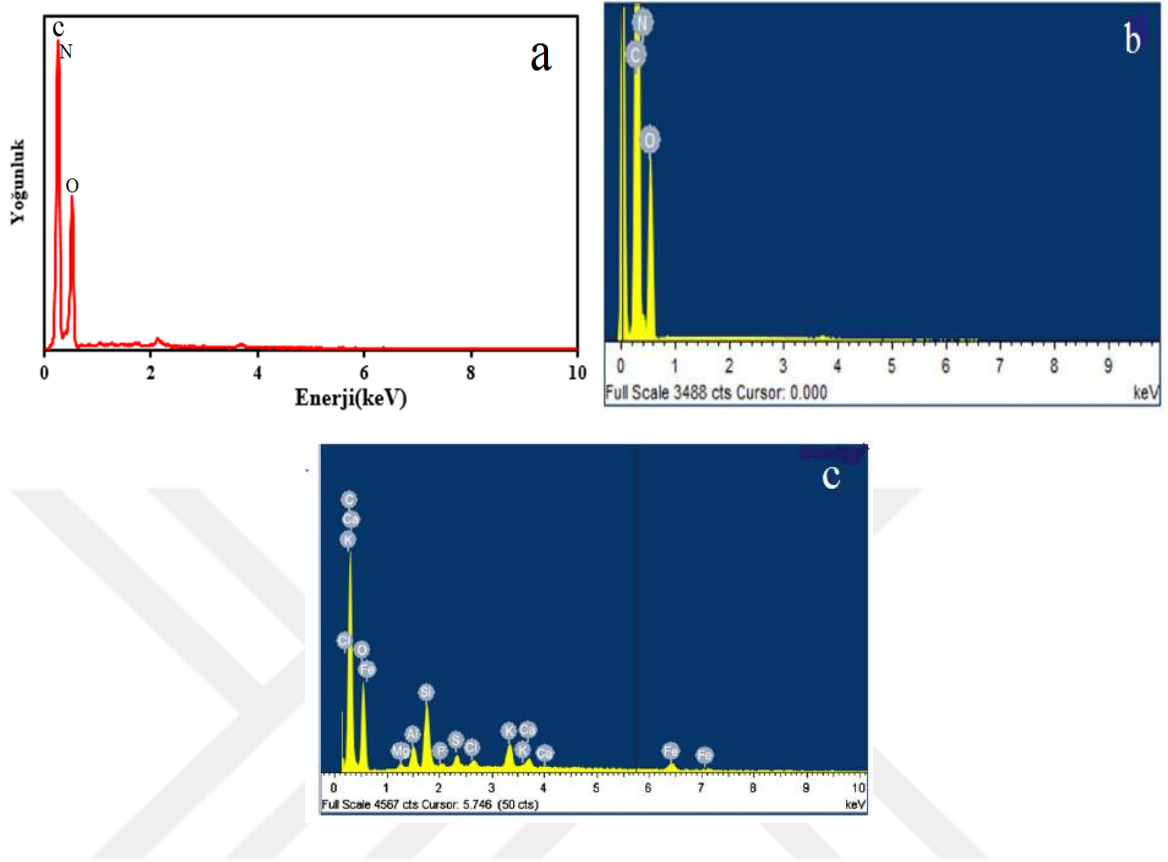
Şekil 5.1. *L. decemlineata* türünden elde edilen kitosanların XRD analizi (a: yetişkin ve b: larvalar için XRD analizi (Kaya *et al.* 2014a).

Karasal böceklerin üç türünden (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio* ve *Allomyrina dichotoma*) elde edilen kitosan ile yapılan XRD analizine göre *T. molitor* böceğinde kitosan maddesi iki kırınım pikleri (10.62° ve 20.02° 'de) ortaya koymaktadır. Ayrıca *A. dichotoma* böceğinde kitosan 10.74° ve 19.92° 'de pikleri göstermiştir (Shin *et al.* 2019). Bu tez çalışmasında yapılan XRD sonuçları ile (10° ve 20° 'deki pikler) literatürde belirtilen bu iki böceğin larvalarından elde edilen kitosan ve ticari karides kitosanı oldukça uyumlu pikler oluşturduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, Erdogan ve Kaya (2016) çekirge türünden (*Doclostaurus maroccanus*) elde edilen kitosan biyopolimerinden bir XRD analizi yapmışlar ve bu analizde iki keskin pik, 10.96° ve 20.3° 'de ergin bireylerinde göstermişler. Bu sonuç *Agabus* cinsi üyelerinden

elde edilen kitosanan XRD analizi ile ($2\theta \approx 10^\circ$ ve $2\theta \approx 20^\circ$) uyumluluk göstermektedir (Erdogan and Kaya 2016).

EDX analizinde bu çalışma ile elde edilen kitosan karbon, azot ve oksijen elementlerine sahiptir. Bu elementlerin ağırlık yüzdeleri sırasıyla %24, %30.1 ve %45.9 olarak belirlenmiştir. Sajomsang ve Gonil (2010) *Cicada sloughs* türünün üzerinde yaptıkları bir araştırmada elde edilen kitin örneğinde hiçbir protein bulunmadığını göstermişler. Bu araştırmacılar böceklerin içindeki en yaygın elementleri, EDX analizi ile belirlenmişler. *C. sloughs* analizinde Ca, Mg, K, Al, P, S, Si ve Fe elementlerinin bulunduğu göstermişler (Şekil 5.2b) (Sajomsang and Gonil 2010). Şekil 5.2 (a)'da görüldüğü gibi diğer saf olmayan maddelerin karakteristik zirveleri yoktur, bu nedenle kitosanın saf materyallerden oluştuğunu rapor etmişler. Shekhawat ve ekibi (2017) şekil 5.2 (c) elde ettikleri kitosan için yaptıkları EDX spektrum analizlerinde karbon, oksijen ve nitrojen piklerin olduğunu göstermişler (Shekhawat *et al.* 2017). *Agabus* cinsi üyelerinden elde edilen kitosanın EDX analizi Şekil 5.2 (a), elementler bakımından, Şekil 5.2 (b) ile uyumlu olduklarını göstermektedir ve her iki şekilde karbon, oksijen ve nitrojen piklerin belirlenmiştir.



Şekil 5.2. (a) Elde edilen kitosan, (b) ticari Kitosan ve (c) *Cicada sloughs* türünden elde edilen kitinin EDX spektrumları.

Bu tez çalışması ile elde edilen kitosanın yüzey karakterizasyonu ve farklılıkları incelemek için SEM tekniğine alınmıştır. SEM incelemelerine göre; bazı bölgelerin yassı ve bazı bölgelerin ise homojen olmayan bir yüzey sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bununla birlikte, elde edilen kitosan membranı kompakttır ve hasar görülmemektedir. Bazı kısımlarda küçük partiküller gözlemlenmektedir bunun nedeni filtrasyon ve dört basamaklı yıkanma işlemlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Paulino ve ekibi (2006) kitin ve kitosanı *Silkworm chrysalis* türünden elde etmiş ve SEM analizleri bu numunelerde kitin yapısı birkaç ince gevşek birleşik yapraklar olarak görüldüğünü rapor etmişlerdir. Ayrıca, ipekböceği kitininden hazırlanan kitosan oldukça gözenekli bir yapı gözlemişlerdir (Paulino *et al.* 2006). Kucukgulmez ve arkadaşları (2011) karides türü olan *Metapenaeus stebbingi* üzerinde bir çalışma yapmışlar ve bu canlıdan kitosan elde etmişlerdir. Bu araştırmacılar elde edilen kitosanın, tabaka tabaka olduğu ve bazı alanlarda gözenekli olduğu SEM analizlerinde göstermişlerdir. Ayrıca, kitosanın bazı kısımlarında

fibril yapı göstermediğini de bildirmişler (Kucukgulmez *et al.* 2011). Her iki literatür çalışmasında da kitosan ile yaptıkları SEM analizleri bu tez çalışmasında elde edilen kitosan ile çok farklılık göstermemektedir ve bu sonuçlar böceklerde kitin ve kitosan yapısının benzerlik gösterdiği yönünde değerlendirilmiştir. Kaya ve arkadaşlarının (2014b) iki çekirge türlerinden (*Calliptamus barbarus* ve *Oedaleus decorus*) üretilen kitinlerin ve kitosaların yüzey morfolojileri incelemişler. Sunuclar her iki türden elde edilen kitinin düzgün bir yüzey morfolojisine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, her iki türden elde edilen kitosanlar gözenekli bir yüzeyi (100 ~ 200 nm) ve nanofibril bir yapı (10 ~ 60 nm) göstermişler (Kaya *et al.* 2014b). Kullanılan kitin ekstraksiyon ve kitosan üretim protokollerinin de bu sonuç için etkili olduğu düşünülmektedir.

FT-IR analizi, elde edilen ve ticari kitosan numuneleri spektrumunda amino grubunun gerilme titreşimi N–H, hidroksil grupları O–H tarafından sağlanan germe titreşimlerine bağlı 3408 cm⁻¹'de göstermektedir. Daha sonra 2926 cm⁻¹'de karbon-hidrojen bağı C–H simetrik gerilme titreşimi görülür, deformasyon titreşimi (N–H, tip II amid bandı) 1574 cm⁻¹ "de görülen karbonil grubunun titreşim gerilimi (C=O, tip I amid bandı) 1646 cm⁻¹"de bulunur. Metilen grupları makaslarının C–H deformasyon titreşimi 1436 cm⁻¹"de, bağı gerilme titreşimi (C–N, III. tip amid bandı) 1320 cm⁻¹ 'de görülürken. Son olarak, 1082 ve 1032 cm⁻¹'deki bantlar, C–O–C glikosidik bağlantı bağlarına karşılık gelen, Kitosan daki β- (1,4) bağlarını göstermektedir.

Bu sunuclar Kucukgulmez ve arkadaşlarının (2011) *Metapenaeus stebbingi* üzerinde yaptıkları analizleri ile uyumludur. Bu araştırmacılar FT-IR spektruma göre, 1555 cm⁻¹ civarında gözlemlenen pik, –CONH– 'in ikincil amid II bantlarının N-H bükülmesini bildirmişler. Bununla birlikte, 1380 - 1460 cm⁻¹'de bölgesinde gözlenen diğer bantlar, metil gruplarının simetrik ve asimetric eğilme titreşimlerine atfedilmektedir. 3300 cm⁻¹'de civarında geniş bant genellikle moleküller arası "H" bantlarına atfedilmiştir ve dışarıdaki düzlem eğimi -OH titreşimleri 670 cm⁻¹'de gözlenmiştir. Bu araştırmacılara göre üretilen kitosanın yüksek deasetilasyon derecesine bağlı olarak güçlü amid II bantları gözlemlenememiştir (Kucukgulmez, *et al.* 2011). Bu tez çalışması ile elde edilen kitosanda deformasyon titreşimi N–H ve tip II amid bandı 1574 cm⁻¹ "de görülmüştür. Bu

fonksiyonel gruplar görülmesi kitosan'ın yapılmasını onaylamaktadırlar. Bu sonuçlar literatürlerde diğer çalışmalara göre kitosanın verimini daha iyi olduğunu ve deasetilasyon derecesinin bazı kaynaklara göre düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar muhtemelen deasetilasyon işlemlerinden kaynaklanmaktadır. Öğütme işlemlerindeki yetersizlik, asitler ve bazları uygun miktarda kullanmamak, optimum sıcaklığa uymamak, bu sorunlara neden olabildiği bilinmektedir.

Ayrıca, kitosana ait FT-IR bulgularının Ma ve ekibinin (2015) sonuçları ile uyumlu olduğu belirlendi. Bu böcek kitosan FT-IR spektrumundaki 1605, 1420 cm^{-1} çevresindeki pikler, kitosanın amide gruplarına aittir. Amid II bandı (1605 cm^{-1}) ve amid III bandı (1420 cm^{-1}) için pikler yoğunluğu deasetilasyon derecesinin artmasıyla azalmıştır. 2900 cm^{-1} 'deki pik noktası, titreşimi veren C-H (CH_2 , CH_3)'e tahsis edilmiştir. Her bir kitosan numunesi için, yüksek deasetilasyon derecesi nedeniyle amid I bantları (1650 cm^{-1}) gözlemlenememiştir (Ma *et al.* 2015).

Soon ve arkadaşları (2018) yaptıkları *Zophobas morio* böceğinin larva üzerinde çalışmalarında kitosanın FT-IR spektumunda hem *Z. morio* hem de ticari kitosanın yapıları birbirine çok benzerlik göstermeğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ticari kitosan örneğinde, NHCO grubunun (1260 cm^{-1}), H bandının, CH_3 simetrik deformasyonunun (1377 cm^{-1}), N-H bandının (Amide I) (1620 cm^{-1}) ve simetrik N-H gerilmesinin karmaşık titreşimleri olan çok pikler görünmemiştir (3105 cm^{-1}). *Z. morio* kitosanında, 3105 cm^{-1} (simetrik) ve 3350 cm^{-1} (asimetrik) olarak iki bant N-H gerilimi vererek primer amit birimini göstermesini bildirmişlerdir. Ayrıca, ticari kitosan 3300 cm^{-1} civarında bir N-H bandına sahip olarak ikincil amit grubun göstermesini bildirmişlerdir (Soon *et al.* 2018).

Bu çalışma ile elde edilen kitosan ve ticari kitosan numunesinin TG analizi 10°C / dk'da ve oda sıcaklığından 700°C'ye kadar hava atmosferi altında bir ısıtma ile kaydedilmiş sonuçlar, numunelerin ağırlıksızlığın iki aşamaya bölündüğünü göstermiştir. Birinci aşamada, 20 ila 300°C arasında, ısıtma işlemi sırasında kitosan daki su moleküllerinin desorpsiyonuna atfedilen yaklaşık %11.87' lik ağırlık kaybı ve ikincisi aşamada ise, 300

ile 420°C arasında kitosan ana zincirinin bölünmesi nedeniyle olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. Bu aşamada %87.7'lik ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar *Agabus* cinsinin kitosanın ağırlık kaybı oranı ticari kitosandan daha düşük olarak belirlenmiştir. TG analizi yapılan FT-IR analizleri ile uyumludur ve elde edilen kitosanın daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, önceden yapılan çalışmalarda iki nedenden dolayı kitosan daki kütle kayıpları gözlemlenmiştir. İlk aşamada gözlenen kayıp, kitosan daki suyun buharlaşmasından kaynaklanmıştır ve ikinci aşamadaki kayıp kitosan moleküllerinin bozulması nedeniyle olmuştur.

Paulino ve ekibi (2006) ipekböceğinden elde edilen kitosanın TG analizinde bu biyopolimerin zayıf bir termal stabiliteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacıların TG analizlerinde 300 ° C civarında görünen pik, deasetil hale getirilmiş olan molekül kısmının bozulması nedeniyle olabileceğini belirtmişlerdir (Paulino *et al.* 2006). Corazzari ve arkadaşları (2015) kitosan in termal bozunma ve su adsorpsiyon kapasitesi incelemişler. Bu araştırmacılar kitosanın TG analizinde iki aşamalı termal ayrışma sürecini göstermişler: birincisi 100°C'de ki genellikle fizyolojik su moleküllerinin kaybı ile ilişkidir ve ikinci aşama, yaklaşık olarak 300°C'de, kitosanın karakter kuvveti ayrışmasına karşılık olmadığını kaydetmişlerdir (Corazzari *et al.* 2015). Bu çalışma ile elde edilen kitosanın TG analizinde birinci (100 ve 300°C'de) ve ikinci (130 ve 350°C'de) ağırlık kaybı çok farklılık görülmemektedir.

Kaya ve arkadaşları (2014a) patates böceğinin erişkin ve larvalarının üzerinde bir çalışmada, elde edilen kitosanın termal gravimetrik analizinin sonuçlarında kütle kaybının iki adımdan oluştuğunu bildirmiştir. İlk aşamada kitosan için toplam kütlenin %3–5'ine kadar su kaybı nedeniyle bildirmiş ve ikinci aşamada, kütlenin %99'u yetişkinlerden ve larvalardan üretilen kitosanolardan kaybolduğunu rapor etmişlerdir (Kaya *et al.* 2014a).

Yukarıdaki belirtilen literatürlerin tamamında TG analizlerinin sonuçlarında iki adımlı bir ağırlık kaybı kaydedilmiş, bu ağırlık kaybı genellikle ilk adımda 66.5°C ve 130°C arasında ve ikinci adım 300 ile 430°C'de kaydedilmiştir. Bu sonuçlar *Agabus* cinsinden elde edilen kitosanın TG analizleri ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.

UV-vis DR spektrumları, ışık ışınlaması altında hazırlanan numunelerin elektronik absorpsiyon özellikleri hakkında yararlı bilgiler vermektedir. Elde edilen kitosan ve ticari kitosan numuneleri için UV-vis spektrumlarını 250-800 nm aralığında göstermiştir. Ticari kitosan örneği 360 nm'de yoğun absorbans göstermiştir. Bununla birlikte, elde edilen kitosan 379 nm'de absorbans göstermektedir. Elde edilen ve ticari kitosan görünür bölgede emilimi yoktur. Bu sonuç elde edilen kitosan ve ticari kitosan numunelerinin çok farklı olmadığını göstermektedir. DRS analizinin sonuçları, FT-IR, TGA, EDX ve XRD sonuçları ile iyi korelasyon göstermiştir. Literatürlerde kitosan için DR spektrum analizi bu tezde yapıldığı analizler ile uyumludur. Örneğin Taheri ve ekibi (2017) kitosan DR spektrum analizlerinde, 250-350 nm aralığında kitosanın adsorpsiyon göstermediğini kaydetmişler ve bunun nedeninin kitosanda kalan protein safsızlıkları ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir (Taheri *et al.* 2017).

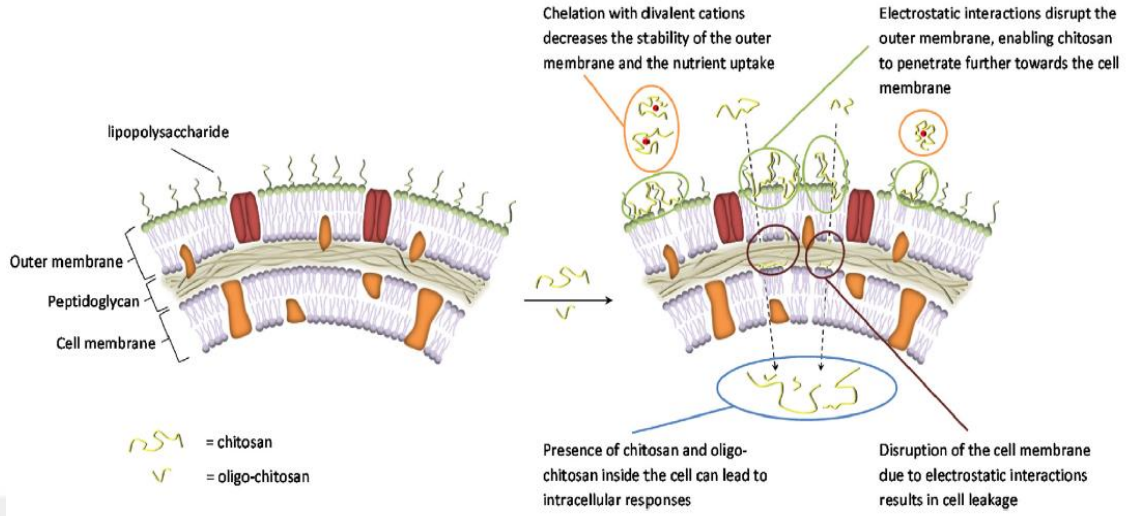
Ayrıca, Wang ve ekibi (2005) kitosanın ultraviyole ışığı ve hidrojen peroksit ile sinerjik bozunumu üzerine çalışma yapmışlar. Bu araştırmacılar orijinal ve bozulmuş kitosanın UV-vis spektrumlarında, orijinal kitosan için, 200 nm civarında güçlü bir absorbans bandı görüldüğünü bildirmişler ve bu absorpsiyonu kitosan amido grupları için $n \rightarrow \sigma^*$ geçişinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda, kitosan ultraviyole ışık ve hidrojen peroksit ile bozunmadan sonra, 260 nm'de bir absorbans bandı görülmüştür. Bu, amido grupları için $n \rightarrow \sigma^*$ geçişine karşılık gelebilir. Ayrıca bir spektral absorpsiyon bandı, karbonil veya karboksil grupları için $n \rightarrow \pi^*$ geçişine atanan 300 nm'de görülebilmektedir (Wang *et al.* 2005).

Kitosan biyopolimerinin oldukça iyi bir polikatyonik yapısı olduğu bilinmektedir ve bu nedenle bu maddenin farklı alanlarda antibakteriyel ve antifungal özellikleri değerlendirilmektedir. Günümüzde kitosan ile başka etken maddeler ve ya metaller kullanılarak yapılan kompleks yapılar birden fazla patojenik mikroorganizma üzerinde araştırılmaktadır (Malini *et al.* 2015; Khan *et al.* 2016; Arjunan *et al.* 2017).

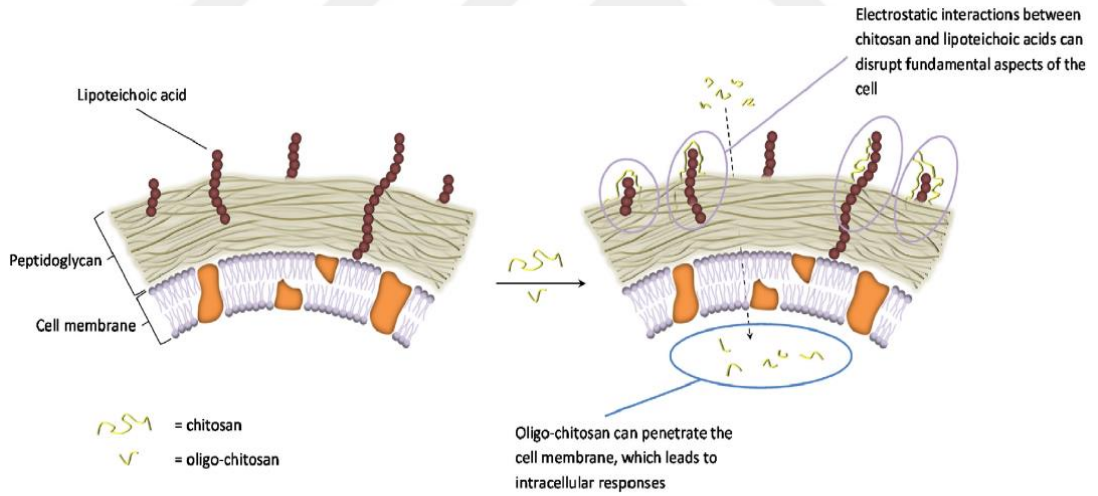
Kitosanın mikrobik inhibisyonu için birçok farklı mekanizma ileri sürülmüştür. En iyi bilinen, pozitif yüklü kitosanın mikrobiyal hücre yüzeyindeki membran proteinleri

üzerinde negatif yüklü fonksiyonel gruplarla etkileşimidir ve bu da hücre yüzeyinde değişiklik ve hücre geçirgenliğine neden olur (Ahmed *et al.* 2014). Birçok deney, kitosanın membran hasar mekanizmalarının önemini göstermiştir. Pozitif yüklü kitosan, N-asetilmuramik asit, sialik asit ve neuraminik asit gibi anyonik hücre yüzeyi bileşenleri ile birleşmektedir (Mansilla *et al.* 2013; Younes and Rinaudo 2015).

Bu nedenle *Agabus* cinsinden elde edilen kitosanın antibakteriyel aktiviteleri *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde değerlendirilmiştir. Antibakteriyel aktivitesi doz veya konsantrasyona bağlı olarak 0.1 mg/mL konsantrasyonlarda en az ve 0.8 mg/mL konsantrasyonda patojenik bakterilerin üzerinde en fazla etki göstermiştir. Elde edilen kitosan antibakteriyel aktivitesi bakımından, *E. coli* (9.7 ± 0.83) bakterisinde, *S. aureus* (13.9 ± 0.58) bakterisine karşı daha yüksek olduğu sonuç varılmıştır. Bu sonuçlar yukarıda belirtilen hususlar yüzünden *E. coli* Gram (-) negatif ve *S. aureus* Gram (+) pozitif bakterilerin hücre yapılarına bağlı olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar literatürlerde *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerin üzerinde yapılan diğer çalışmalara göre uyumlu olduğunu göstermektedir. Verlee ve ekibi (2017) kitosan ve bu maddenin türevlerin antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Kitosanın ve oligo-kitosanın Gram (-) ve Gram (+) bakterilere karşı etkilerin aşağıdaki sunulan şekildeki gibi belirtmişlerdir. (Şekil 5.3 ve şekil 5.4). Bu araştırmacıların değerlendirmelerine göre Gram (-) bakteriler kitosan ve bu maddenin türevlerine karşı Gram (+) bakterilere göre daha hassas olduğunu rapor etmişlerdir (Verlee *et al.* 2017).



Şekil 5.3. Kitosan ve oligo-kitosan için Gram (-) bakterilere karşı etki şekli (Verlee *et al.* 2017).



Şekil 5.4. Kitosan ve oligo-kitosan için Gram (+) bakterilere karşı etki şekli (Verlee *et al.* 2017).

Kitosanın, Gram (-) bakterin hücre zarından geçebildiğini Mansilla ve ekibi (2013) rapor etmişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçlarına göre, kitosan DNA/ RNA sentezine müdahale edip ve hücre içi tepkileri gösterdiği şeklinde açıklamışlardır (Mansilla *et al.* 2013). Ayrıca, Gram (+) bakteriler için, kitosan, peptidoglikan katmanında bulunan teikoik asitler ile kovalent olmayan bir şekilde bağlanır. Hücre yüzeyindeki bu teikoik asitler hücre bölünmesi ve Gram pozitif bakteriyel fizyolojinin diğer temel yönleri için

önemlidir. Kitosanın hücre zarı üzerindeki etkisi halen belirsizdir. Bazı araştırma grupları, kitosanın, peptidoglikan yapısındaki beklenen gözeneklerden daha büyük olduğundan, kitosanın hidrodinamik çapından bu yana, hücre zarını etkilemesinin muhtemel olduğuna inanmaktadırlar. Ayrıca, moleküler ağırlığı 5 kDa'dan az olan kitosan numuneleri, hücre içinde DNA sentezini bloke ederler. Bununla birlikte, teikoik asidin kitosan aktivitesine karşı önemi *S. aureus*'un mutantlarının test edilmesiyle gösterilmiştir. Teikoik asitlerin biyosentezinde rol oynayan bir veya daha fazla gen yoktur. Bununla beraber teikoik asitlerin biyosentezin yapan gen bir fazla görülmemiştir. Bu, kitosanın Gram (+) bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini arttırmak için polianyonik teikoik asitlerin gerekli olduğunu gösterir (Raafat *et al.* 2008; Park *et al.* 2011; Brown *et al.* 2013).

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde İran, Ardebil sulak alanlarının böcek çeşitliliği ve bu çeşitliliğin kullanım potansiyeli üzerine çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya konulmuştur. Bu bölgede yoğun bulunan sucul böcek örneklerinden çalışma için *Agabus* cinsi örnekler belirlenmiş ve kitin eldesi için değerlendirilebileceği yönünde değerlendirmeler yapılmıştır. Elde edilen biyokütle sistematik verilerin eldesi ve müze örneklerinin ayrılmasından sonra temizlenerek kitin eldesi işlemlerine geçilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda veriler ile literatür verilerinin değerlendirmesi sonucunda *Agabus* cinsine ait örneklerin oldukça yüksek kitin ve kitosan verimine sahip olduğu bulunmuştur. Bu cinse ait türlerin teşhisinin tam olarak yapılması ve uygun türlerin kültüre alınabilmesi durumunda önemli bir kitin kaynağı olacağı düşünülmektedir. Kitosan sentezi işlemlerinde standardizasyonun iyi olduğu ve kitinden yüksek saflıkta kitosan üretilebildiği çeşitli analiz sistemleri ile belirlenmiş ve literatür sonuçları ile büyük farklılıklar içermediği tespit edilmiştir. Bölge ekonomisi ve ihtiyaçları doğrultusunda kitin ve kitosan üretimi için umut vadeden bir çalışma olduğu düşünülmektedir. Çalışmaların çeşitlenmesi ve geliştirilmesi ise önemli bir gerekliliktir. Elde edilen kitin kitosan için kullanım alanı oluşturma amacıyla antibakteriyel testlere yer verilmiş ve orta derecede aktivite belirlenmiştir. Bu aktivitenin farklı etkenler ile artırılması veya daha geniş mikroorganizmaya karşı yapılması alternatif kullanım alanları oluşturma potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, S., Ahmad, M., Ikram, S., 2014. Chitosan: a natural antimicrobial agent—a review. *Journal of Applicable Chemistry*, 3 (2), 493–503.
- Angus, R.B., 1992. Süßwasserfauna von Mitteleuropa (Insecta: Coleoptera: Hydrophilidae: Helophorinae). Gustav Fischer Verlag, 144 p, Jena, Germany.
- Anonymous, 2019. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Titanus_giganteus.jpg (Erişim tarihi: 05.02.2019).
- Antonio, C., Clarissa, I.M.L., Ednaldo, R., Marta, C., Freitas, S., Galba, M.C.T., 2012. Microbial Enhance of Chitosan Production by *Rhizopus arrhizus* Using Agroindustrial Substrates. *Journal of Molecules*, 17 (6), 4904-4914.
- Arjunan, N., Singaravelu, C.M., Kulanthaivel, J., Kandasamy, J., 2017. A potential photocatalytic, antimicrobial and anticancer activity of chitosan-copper nanocomposite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104 (3), 1774-1782.
- Awasthi, VB., 2016. Introduction to general and applied entomology. Scientific Publishers Press, 484 p, New Delhi, India.
- Balfour-Browne, F., 1950. British Water Beetles. Ray Society, 394 p, London, UK.
- Balke, M., Jach, M.A., Hendrich, L., 2004. Order Coleoptera , Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region, 609 p, Academy of Sciences Malaysia.
- Berger, L.R.R., Cardoso, A., Stamford, T.C.M., Cavalcante, H.M.M., Macedo, R.O., Campos, T.G.M., 2011. Agroindustrial waste as alternative medium in the production of chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus*-A factorial design. *Asian Chitin Journal*, 7 (2), 83–90.
- Bertrand, H., 1954. Les Insectes Aquatiques D'Europe (Genres: Larves, Nymphes, Imagos) Vol: I. (Collemboles, Hemipteres, Odonates, Plecopteres, Ephemeropteres, Megalopteres, Planipennes, Coleopteres, 556p. New York, USA.
- Beutel, R.G., Haas, F., 2000. Phylogenetic Relationships of the Suborders of Coleoptera (Insecta), *Cladistics*. 16 (6), 103–141.
- Brown, S., Santa Maria, J.P., Walker, S., 2013. Wall teichoic acids of Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 67 (4), 313–363.
- Çalimli, A., Aktaş, Z., Yıldız, N., Gökçe, Y., Cengiz, B., 2008. Nano yapıdaki Kitosan, hidroksiapatit ve kompozitlerinin sentezi ve parçacık karakterizasyonu, TÜBİTAK Proje no: 104M412, Ankara.
- Castro, A. and Delgado, J.A., 2001. Iberoporus cermenius, a New Genus and Species of Subterranean Water Beetle (Coleoptera: Dytiscidae) from Spain. *Aquatic Insects*, 23 (1), 33–44.
- Chapman, A.D., 2006. Numbers of living species in Australia and the World. Canberra: Australian Biological Resources Study, 60p. Australia.
- Chen, R.H. and Tsaih, M.L., 1998. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23 (1), 135–141.
- Chiesa, A., 1959. Hydrophilidae Europae. Coleoptera Palpicornia, Tablededi determinazione. Arnaldo Forni- Editore, 200 p. Bologna, Italy.

- Corazzari, I., Nistico, R., Turci, F., Faga, M.G., Franzoso, F., Tabasso, S., 2015. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FT-IR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1–9.
- Dettner, K., 1997. Insecta: Coleoptera:Noteridae, Hygrobiidae, In: Schwoerbal J. and Zwick P. (eds.), *Sübwasserfauna von Mitteleuropa*, Band:20/3,4. Gustav Fisher Verlag, 147 p, Stuttgart, Germany.
- Elibol, M., 2008. Kabuklu Katı deniz ürünleri artıklarından kitin, Kitosan ve türevlerinin üretimi, TÜBİTAK Proje No: 106M241, İzmir.
- Erdogan, S. and Kaya, M., 2016. High similarity in physicochemical properties of chitin and chitosan from nymphs and adults of a grasshopper. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89 (1), 118–126.
- Erwin, T.L., 1982. Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *Coleoptera Bulletin*, 36 (4), 74–75.
- Erwin, T.L., 1997. Biodiversity at its utmost: Tropical Forest Beetles. ss. 27–40. In: Reaka-Kudla, M. L., D. E. Wilson & E. O. Wilson (eds.). *Biodiversity II*. Joseph Henry Press, Washington, USA.
- Fai, A.E.C., Stamford, T.C.M., Stamford, A.T.M., Santa, C.P.A., Silva, M.C.F., Campos, T.G.M., Stamford T.L.M., 2011. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Journal of Molecules*, 16 (2), 7143–7154.
- Fernandes, S.C., Sadocco, P., Alonso-Varona, A., Palomares, T., Eceiza, A., Silvestre, A.I.J., Mondragon, I., Freire, C.S.R., 2013. Bioinspired antimicrobial and biocompatible bacterial cellulose membranes obtained by surface functionalization with aminoalkyl groups. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5 (2), 3290–3297.
- Fouda, M.M., 2005, Use of Natural Polysaccharides in Medical Textile Applications, PhD Thesis, Duisburg-Essen University, Germany.
- Franciscolo, M. E., 1979. Fauna d' Italia: Coleoptera; Haliplidae, Hygrobiidae, Gyrinidae, Dytiscidae, Vol. XIV Edizioni Calderini, 804p, Bologna, Italy.
- Friday, L.E., 1988, A key to the adults of British water beetles, *Fld. Stud.* Dorset Press, Dorchester, 7(1), 1–151.
- Gao, B., He, S., Guo, J., Wang, R., 2007. Preparation and antibacterial character of a water-insoluble antibacterial material of grafting polyvinylpyridinium on silica gel. *Materials Letters*, 61(4), 877–83.
- Geçer, A., 2010. Suda çözünen nanokitosan sentezi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Gentili, E. and Chiesa, A., 1975. Revisione dei Laccobius paleartici (Coleoptera: Hydrophilidae). *Estratto Dalle Memorie Della Società Entomologica Italiana*, 54 (4), 1–187.
- Gentili, E., 2000. Distribuzione del genere Laccobius (Coleoptera, Hydrophilidae) in Anatolia e problemi relative. *Biogeographia*, 21, 174–215.
- Guang, W.Y., 2002. The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk, PhD. Thesis, 273 p, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong.
- Guignot, F., 1947. Faune de France, Coleopteres Hydrocantheres, 286 p, Paris, France.
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., Jellouli, K., 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three

- different marine sources, *International Journal of Biological Macromolecules*, 65 (5), 298–306.
- Hansen, M., 1987. The Hydrophiloidea (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark Fauna Entomologica Scandinavica. *International Journal Brazilian*, 55 (3), 1–254.
- Hansen, M., 1991. The hydrophiloid beetles. Phylogeny, classification and a revision of the genera. (Coleoptera, Hydrophiloidea). *Biologiske Skrifter*, 40 (2), 1–12.
- Hansen, M., 1996. Coleoptera Hydrophiloidea and Hydraenidae, water scavenger beetles, *Aquatic Insects of North Europe- Taxonomic Handbook*, 173-194.
- Hansen, M., 1999. Fifteen new genera of Hydrophilidae (Coleoptera), with remarks on the generic classification of the family, *Entomologia Scandinavica*, 30, 121–172.
- Hansen, M., 2004. Helophoridae, Hydrochidae, Hydrophilidae. pp. 36–68- In: Löbl, I. and Smetana, A. (editors): *Catalogue of Palaearctic Coleoptera*, Apollo Books, 2: 942.
- He, P., Davis, S.S., Illum L., 1998. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 166, 75– 88.
- Hebauer, F. and Klausnitzer, B., 2000. Insecta: Coleoptera: Hydrophiloidea (exkl. Helophorus). *Süßwasserfauna von Mitteleuropa* 20/7,8,9,10-1. Gustav Fischer verlag, 134p.
- Hebauer, F., 1994, The Hydrophilidae of Israel and Sinai (Coleoptera, Hydrophilidae). *Zoology In The Middle East*, 10, 73–137.
- Hebauer, F., 2002. New Hydrophilidae of the Old World (Coleoptera, Hydrophilidae). *Acta Coleopterologica*, 18 (3), 3–24.
- Heckmann, L.H., Andersen, J.L., Eilenberg, J., Fynbo, J., Miklos, R., Jensen, A.N., Nørgaard, J.V., Roos, N., 2018. A case report on in valuable: insect value chain in a circular bioeconomy. *Journal of Insects as Food and Feed*, 11 (6), 1–6.
- Holland, D.G., 1972. A key to the larvae, pupae and adults of the British Species of Elminthidae, *Freshwater Biological Association*, 58 p, Scientific Publication.
- Holmen, M., 1987. The Aquatic Adephaga (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark. I. Gyrinidae, Haliplidae, Hygrobiidae and Noteridae. E.J. Brill/Scandinavian Science Press Ltd, 168 p, Leiden, Copenhagen.
- Ibitoye, E.B., Lokman, I.H., Hezme, M.N.M., Goh, Y.M., Zuki, A.B.Z., Jimoh, A.A., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket. *Biomedical Materials*, 13 (2), 1–12.
- Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y.S., Tozak, K.O., Mol, A., Mentis, A. and Sezen, G., 2015. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20 (1), 168–179.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Mentis, A., Özusağlam, M.A., Çakmak, Y.S., 2014a. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Materials Science and Engineering: C*, 45, 72–81.
- Kaya, M., Baran, T., Mentis, A., Asaroglu, M., Sezen, G., Tozak, K.O., 2014b. Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates. *Food Biophysics*, 9 (2), 145–157.
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Labidi, J., 2017. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, 176, 177–186.

- Koçer, İ., 2015. Farklı Yöntemlerle Kitosan Eldesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Kockisch, S., Reese, G.D., Yung, S.A., Tsibouklis, J., Smart, J.D., 2003. Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity an in vitro evelation of mucoadhesive potential. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 1614–1623.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H., Kadak, A.E, 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126 (3), 1144–1148.
- Kurita, K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26 (6), 1921–1971.
- Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, H.E. Junginjer, H.E., 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 78 (2), 43–48.
- Lim, S.H., 2002. Synthesis of a Fiber-Reactive Chitosan Derivative And its Application to CottonFabric as an Antimicrobial Finish and a Dyeing-Improving Agent. Ph. Doctoral Thesis, Graduate Faculty, North Carolina State University, USA.
- Ma, J., Xin, C., Tan, C., 2015. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80 (4), 547–556.
- Malini, M., Thirumavalavan, M., Yang, W.Y., Lee, J.F., Annadurai, G., 2015. A versatile chitosan/ZnO nanocomposite with enhanced antimicrobial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80 (4), 121–129.
- Mansilla, A.Y., Albertengo, L., Rodriguez, M.S., Debbaudt, A., Zuniga, A., Casalongue, C.A., 2013. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (2), 6957–6966.
- Mohammadi-Aloucheh, R., 2015. Bazı Fungal Kaynaklardan Kitosan ve Nanokitosan Üretimi ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Needleman, I.G., Smales, F.C., 1995. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Journal of Biometaterials*, 16, 617- 624.
- Nilsson, A. N, 1996. Aquatic Insects of North Europe, A Taxonomic Handbook. p 172.
- Nilsson, A. N, 2003. Noteridae, Dytiscidae, Catalogue of Palaearctic Coleoptera Vol.1, Lobl, & Smetana, A. (ed.), Apollo Boks, Stenstrup, 33-78.
- Nilsson, A.N, and Holmen, M., 1995, The Aquatic Adephaga (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark, II Dytiscidae, Fauna Ent. Scand. E.J. Brill, Leiden, 32, 188 p.
- Nilsson, A.N. and Hájek, J., 2013. A world catalogue of the family Dytiscidae, or the diving beetles (Coleoptera, Adephaga). Umeå. Version 1.I.2015.
- Olmi, M., 1976, Dryopidae, Elminthidae (Coleoptera). Fauna d'Italia. XII., 280 p. Bologna, Italy.
- Park, S.C., Nah, J.W. and Park, Y., 2011. pH-dependent mode of antibacterialactions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) againstvarious pathogens. *Macromolecular Research*, 19, 853–860.
- Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C., Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64 (1), 98-103.

- Peker, İ., Oktar, F., Eroğlu, M., Morkoç, E., 2006. Kerevit kabuklarından kitin üretilmesi ve kesilmiş sütün suyundan laktoz izolasyonu işleminde kullanılması, TÜBİTAK Proje No: 104M017, Ankara.
- Pirisinu, Q., 1981, Palpicorni (Coleoptera: Hydraenidae, Helophoridae, Spercheidae, Hydrochidae, Hydrophilidae, Sphaeridiidae), 96 p, Italy.
- Raafat, D., von Bargaen, K., Haas, A., Sahl, H. G. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3764–3773.
- Rachmawaty, S., Idris, I.S., Pagarra, H., Hartati and Salleh, M.M., 2018, Screening factors influencing chitinase production by *Trichoderma virens* using two level factorial design. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2030, No. 1, p. 020176). AIP Publishing, USA.
- Ratcliffe BC, Cave RD. 2015. The dynastine scarab beetles of the West Indies (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). *Bulletin of the University of Nebraska State Museum*, 28, 1-346.
- Ribera, I., Beutel, R. G., Balke, M. and Vogler, A. P., 2002. Discovery of Aspidytidae, a new family of aquatic Coleoptera, *Proceedings of the Royal Society B*, 269, 2351-2356.
- Rillosi, M. and Buckton G., 1995. Modelling mucoadhesion by use of surface energy terms obtained from the Lewis acid-Lewis base approach. II. Studies on anionic, cationic and unionisable polymers. *Journal of Pharmacological Research*, 12, 669-675.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.
- Sajomsang, W. and Gonil, P., 2010. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs, *Material Science and Engineering C*, 30, 357–363.
- Salman, S., 2009. Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi. Palme Yayınları, 501 s, Ankara.
- Sezer, E., 2007. Investigation of Parameters Effecting Drug Release From Chitosan Microspheres, MMS. Thesis, Ankara University, Ankara.
- Shekhawat, A., Kahu, S., Saravanan, D., Jugade, R., 2017. Tin (IV) cross-linked chitosan for the removal of As (III). *Carbohydrate Polymers*, 172, 205-212.
- Shimoda, J., Onishi, H. and Machida Y., 2001. Bioadhesive characteristics of chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine. *Drug Development Indian Journal of Pharmacology*, 27, 567-576.
- Shin, C.S., Kim, D.Y. and Shin, W.S., 2019. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 72-77.
- Soon, C.Y., Tee, Y.B., Tan, C.H., Rosnita, A.T., Khalina, A., 2018. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 135-142.
- Spangler, P.J., 1981. Aquatic Biota of Tropical South America, Part 1: Arthropoda. San Diego State University, 323 p, San Diego, California, USA.
- Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., Cavalcante, H.M.M., Macedo, R.O. and Campos-Takaki GM., 2013. Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent. In *Practical Applications in Biomedical Engineering*, 1st ed.;

- Andrade, AO. Pereira, AA. Naves, ELM. Soares, AB. Eds. 9, 229–244, InTech: Rijeka, Croatia
- Taheri, M., Ghiaci, M., & Shchukarev, A., 2018. Cross-linked chitosan with a dicationic ionic liquid as a recyclable biopolymer-supported catalyst for cycloaddition of carbon dioxide with epoxides into cyclic carbonates. *New Journal of Chemistry*, 42 (1), 587-597.
- Trautwein, M.D., Wiegmann, B.M., Beutel, R., Kjer, K.M. ve Yeates, D.K., 2012. *Advances in Insect Phylogeny at the Dawn of the Postgenomic Era. Annual Review of Entomology*, 57, 449-468.
- Usinger, R.L., 1968. *Aquatic Insects of California*. University of California Press, 508 p, California, USA.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. and Vantomme, P., 2013. *Edible insects: future prospects for food and feed security*. FAO Forestry Paper no. 171. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 187 p, Rome, Italy.
- Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V., 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268-283.
- Vojtech, N., Yves, B., Scott, E.M., George, D.W., Birgitta, B., Lukas, C., Pavel, D., 2002. Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature*, 416 (6883), 841–844.
- Vondel, B.J. van, 1997. *Insecta: Coleoptera: Haliplidae*, In: Schwoerbal J. & Zwick P. (eds.), *Sübwasserfauna von Mitteleuropa, Band:20/2*. Gustav Fisher Verlag, 95 p, Stuttgart, Germany.
- Vondel, B.J. van, Holmen, M. and Petrov, P. N., 2006. Review of the Palaearctic and Oriental Review of the Palaearctic and Oriental species of the subgenus *Haliplus* s.str. (Coleoptera: Haliplidae: *Haliplus*) with descriptions of three new species. *Tijdschrift voor Entomologie*, 149, 227-273.
- Wang, S.M., Huang, Q.Z., Wang, Q.S., 2005. Study on the synergetic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Carbohydrate Research*, 340 (6), 1143-1147.
- White, R.E. 1983. *A Field Guide to the Beetles of North America*, The Peterson Field Guide Series. Systematic Entomology Lab. U.S. Department of Agriculture. Houghton Mifflin Company, Boston, USA.
- Williams, D.M., 2001. Chapter 30: Largest. In Walker, T.J. *University of Florida Book of Insect Records*, USA.
- Wilson, E.O., 2015. Threats to Global Diversity. www.unesco.org kaynağından 28 Ekim 2015 tarihinde kaynağından arşivlendi, (Erişim tarihi: 28.10.2015).
- Younes, I., Rinaudo, M., 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* 13, 1133–1174.
- Zahl, P.A., 1959. Giant insects of the Amazon. *National Geographic Magazine*, 115 (5), 632-669.
- Zaitsev, F.A, 1972. *Fauna of the USSR: Amphizoidae, Hygrobiidae, Haliplidae, Dytiscidae, Gyrinidae, Coleoptera, Vol. IV*, Israel Prog. Sci. Translations, Jerusalem, 1-401.
- Zhang, Z.Q., 2011. *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. Magnolia Press, 3148, 1-237.

ÖZGEÇMİŞ

1984'de İran'da Ardebil şehrinde doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Ardebil ilinde bitirdi. 2002-2003 yılında Ardebil Azad Üniversitesi'nin Deneysel Bilimler Öğretmenliği Bölümünü kazandı. Lisans eğitimini iyi derece ile 2007 yılında bitirdi. 2008-2009 yılında yüksek lisansa devam etti. 2011 yılında yüksek lisansını bölüm ikincisi olarak tamamladı. 2012 yılında Peyamnur Üniversitesinde Öğretim Elemanı olarak çalıştı. 2012'de Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Bilim Dalı'nda Doktora programına yerleşti.