

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

İNSANLIK YARARINA TEKNOLOJİ YARIŞMASI PROJE DETAY RAPORU

PROJE KATEGORİSİ: Sağlık ve İlk Yardım

PROJE ADI: GIDA ZEHİRLENMELERİNE KARŞI BİTKİSEL
İYİLEŞTİRİCİLERİN BELİRLENMESİ

TAKIM ADI: ANTİFUNGALLER

TAKIM ID: T3-21649-151

TAKIM SEVİYESİ: Lise

DANIŞMAN ADI: Burcu GÜLER

İçindekiler

1. Proje Özeti(Proje Tanımı).....	2
2. Problem/Sorun	2
3. Çözüm.....	2
4. Yöntem	3
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	5
6. Uygulanabilirlik	6
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	6
8. Proje Fikrinin Hedef Kütlesi (Kullanıcılar).....	6
9. Riskler.....	7
10. Proje Ekibi.....	7
11. Kaynaklar.....	7

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Gıda zehirlenmeleri, günümüzde ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu zehirlenme sebeplerinin başında küflü gıdalar sebebiyle oluşan küf zehirlenmeleri gelmektedir. Bu projede, küf zehirlenmelerine karşı tedavi edici özellik gösteren bitkisel takviye ekstraktların üretimi ve kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. “Eğer küf zehirlenmelerine karşı *Althaea officinalis*(Hatmi) yaprağı ekstresi ve *Cydonia oblonga* Mill.(Ayva) kabuğu ekstreleri tüketilirse, organizmanın iyileşme süreci olumlu etkilenir.” hipoteziyle gerçekleştirilen kontrollü deneyler, model organizma *Galleria mellonella* üzerinde uygulanmıştır. Karaman(2016), *Galleria mellonella*’ların model organizma olabileceğini belirtmiştir. Bu sebeple, çalışmamızda bu canlının kullanılmasına karar verilmiştir.



Resim-1: Deneyde kullanılan *Galleria mellonella* ‘lardan örnek(tarafımızca fotoğraflanmıştır.)

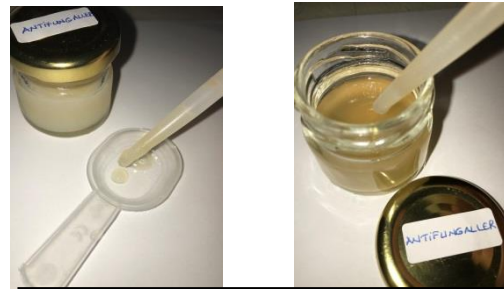
2. Problem/Sorun:

Günümüz şartlarında tarımsal ürünlerde toprak, hava, su kirliliği gibi doğada oldukça yaygın sebeplerle bozulma gerçekleşip bu ürünler insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu ürünlerin raf ömürleri de dikkate alındığında, evimizde saklarken kısa sürede küflenmeleri de gerçekleşebilmektedir. Bu küfler temas ettikleri diğer besinlere ve insanların ellerine bulaşarak ya da az olduğunu düşünmeleri sonucu doğrudan tüketerek bünyelerine alabilmektedirler ve bunun sonucunda küf sebebiyle zehirlenmeler gerçekleşebilmektedir. İnsanların sağlığı göz önünde bulundurulduğunda bu zehirlenmelere dikkat çekilmelidir.

3. Çözüm

Bu projede, mandalina, elma gibi sıkça tüketilen gıdaların üzerinde oluşan küflerin zehirlenmeye yol açabileceği düşüncesiyle, bu gıdalarda oluşan küfler model organizma

Galleria mellonella'ya aşılansın ve bitkisel ekstraktların da bu organizmaya verilmesi ile yaşam süreleri, renkleri, hareketleri gibi yaşamsal faaliyet belirtileri gözlemlenmiştir. Bu şekilde gerçekleşen deneyde kontrol grubu olarak küf aşılansınmayan *Galleria mellonella*'lar da kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.



Resim-2(a,b): (a)Ayva kabuğu jel ekstraktı prototipi, (b)hatmi yaprağı jel ekstraktı prototipi

Althaea officinalis(Hatmi) yaprağı ekstresi ve *Cydonia oblonga* Mill.(Ayva) kabuğu ekstrelerinin küf zehirlenmelerine karşı tedavi

edici etkisinin olduğu model organizma üzerinde gözlemlenmiştir. Küfe karşı bağımsıklık kazanma deneyleri başarılı olup, organizma tarafından bu amaçla günlük olarak düzenli tüketilebileceği görülmüştür. Aynı zamanda, küf sebebiyle zehirlenme sonucunda da bu bitki ekstrelerinin organizma bağımsıklığını artırdığı ve sağlıklı bir şekilde yaşam devamlılığını sağladığı gözlemlenmiştir. İnsanlar üzerinde de aynı etkinin olabileceği düşünülerek jel formda takviye gıda ekstraktların prototipleri Resim-2'de gösterilmiştir.

4. Yöntem


Proje hedefine ulaşmak için planlanan kontrollü deney basamakları Tablo-1'de verilmiştir.

Tablo-1: Kontrollü deney basamaklarının amacı ve ayrıntılı açıklamaları

YÖNTEM BASAMAĞI	AMACI	AÇIKLAMASI
4.1.Bitkilerin temini	Bitki ekstrelerini doğal yoldan elde etmek.	Hatmi çiçeği yaprağı bahçeden, ayva ise pazardan temin edilmiştir.
4.2.Bitki ekstraktlarının hazırlanması	Model organizmada küfe karşı direnç gösteren etkiyi gözlemlenmek amacıyla bitkisel içerikli üretiminin sağlanması.	Hatmi çiçeği yaprağı ve ayva kabuğu kurutulup toz haline getirilmiştir. Elde edilen bitki tozlarından 50'şer g alınıp soxhlet ekstraksiyon düzeneğinde(Resim-3) 500ml saf suda çözdürülmüştür. Son olarak çözücüsü rotary evaporatör kullanılarak buharlaştırılmıştır.
4.3. <i>Galleria mellonella</i> larvalarının temini ve çoğalmasının sağlanması	Etik kurallar gereği insan ve omurgalı hayvanlar üzerinde deneme yapılamaması sebebiyle omurgasız hayvanın model organizma olarak kullanılmasına karar verilmiştir. 15-37°C'de yaşayabilme yeteneği ve büyük boyutları sayesinde kullanımının kolay olması amaçlanarak <i>Galleria mellonella</i> larvalarının kullanılmasına karar verilmiştir. (Karaman, M., 2016)	Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 30 adet tür tayini yapılmış <i>Galleria mellonella</i> larvaları temin edilmiştir. Büyük bal peteklerine konularak çoğalmaları sağlanmıştır.(Resim-4)

Resim-3: Soxhlet ekstraksiyon düzeneğinde ekstraktın hazırlanması

Resim-4: *Galleria mellonella* larvalarının büyük bal peteklerinde çoğaltılması

<p>4.4.Küf üretimi</p>	<p>Buzdolabında meyvelerin küflenmesi sonucu diğer meyvelere de bulaşarak çoğalması gerçekleşebilir ve insanlar bulaşan meyvelere dikkat etmeden tüketebilmektedirler. Özellikle elmanın kabuğu ile tüketimi olabildiği için bu projede küfün ağız ile temas ihtimali yüksek olan elma küfünün üretilmesine karar verilmiştir.</p>	<p>Elmalar kabuğu soyulmadan çürütülerek küflenmeye bırakılmıştır. Küflenen elmalar birbiri ile temas halinde oldukları diğer elmalara da yayılmışlardır. Alınan küfler stereo ve monoküler mikroskopta gözlemlenmiş olup, morfolojik olarak incelendiğinde ve literatürden araştırılan bilgilere göre, oluşan küfün <i>Penicillium expansum</i> olduğu görülmüştür.(Tannous ve ark., 2017)</p>
<p>4.5.Küf solüsyonunun hazırlanması</p>	<p>Model organizmalara eşit miktarda küf aşılatabilmek amacıyla.</p>	<p>Steril öze ile elma üzerinden alınan küfler saf su ile birlikte Mcfarland cihazında 2 mcfarland olacak şekilde solüsyon haline getirilmiştir.</p>
<p>4.6.1.a.Hazırlanan küf solüsyonlarının <i>Galleria mellonella</i> larvalarına aşılması</p>	<p>Bu basamaklarda, küf aşılması ve aşılardan sonra iyileştirici etkinin araştırılması(6.1.a ve 6.1.b) ve önceden bitki ekstresi tüketimi sonucu küfle karşılaşma durumunda küfe karşı direncin gözlemlenmesi(6.2.a ve 6.2.b) amaçlanmıştır. (NOT: Deneğin 6.1, 6.2 ve 6.3 basamakları 3 kez gerçekleştirilmiştir. Toplam 90 adet model organizma kullanılmıştır. Besiyeri olarak Bronskill'in(Nurullohoğlu, Z. Ü., & Susurluk, İ. A. 2004) geliştirdiği ortam olan petek, bal, kepek, gliserin ve su kullanılmıştır.)</p>	 <p>Resim-5: Enjeksiyon alanı(Karaman,M. , 2016)</p> <p>Resim-5'te Karaman(2016)'a göre belirtilen enjeksiyon alanı dikkate alınarak, 15 adet model organizmamızda aynı bölgeye 20'şer µl küf solüsyonları aşılacaktır.</p>
<p>4.6.1.b. Küf solüsyonlarının aşılması <i>Galleria mellonella</i> larvalarına bitki ekstrelerinin aşılması</p>	<p>Küf alımı sonucu model organizmanın iyileşme sürecini gözlemlenmek amaçlanmıştır.</p>	<p>Küf aşılardan 15 adet model organizma, 5'er adet olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır.Bu gruplardan birine 20'şer µl hatmi çiçeğinin yaprak ekstresi aşılacaktır. İkinci gruba ise 20'şer µl ayva kabuğu ekstresi aşılacaktır. 3.grup olan kontrol grubuna ise bitki ekstresi verilmemiştir.</p>
<p>4.6.2.a. <i>Galleria mellonella</i> larvalarına bitki ekstrelerinin aşılması</p>	<p>Küf almadan önce bitki ekstreleri tüketilirse, ileride küfe maruz kalma sonucunda organizmanın direnç kabiliyetinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.</p>	<p>15 adet model organizma, 5'er adet olarak 3 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba 20'şer µl hatmi çiçeği yaprak ekstresi enjekte edilmiştir. İkinci gruba ise 20'şer µl ayva kabuğu ekstresi enjekte edilmiştir. 3.grup olan kontrol grubuna ise bitki ekstresi uygulanmamıştır.</p>

4.6.2.b. Bitki ekstralarının aşılandığı <i>Galleria mellonella</i> larvalarına küf solüsyonlarının aşılması		Bitki ekstralarının aşılandığı model organizmalara 3.günün sonunda 2mcfarland olarak ölçülen küf solüsyonlarından 20'şer µl aşılanmıştır.
4.7.Bitkilerde müsilaaj analizi	Kaya,İ, İncekara,N. ve Nemli, Y.(2004)'ye göre hatmi çiçeğinin sağlıktaki olumlu etkisinin, içerdiği müsilaajdan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu basamakta, küfe karşı direncin kazanılmasında, bitkilerdeki müsilaaj varlığının etkisini tespit etmek amaçlanmıştır.	Bitki ekstraları 1'er g tartılıp ağız şilifli 25ml'lik mezurda 1ml %96'lık etanol ile ıslatılmış ve hacmi saf su ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler belirli aralıklarla çalkalanmış ve üç saat sonunda çöken örneğin hacmi okunmuştur. (Kaya, 1998; aktaran: Kaya,İ, İncekara,N. ve Nemli, Y.(2004)).

Galleria mellonella'ların yaşam süreleri, renkleri, hareketleri gibi yaşamsal faaliyetlerinin gözlemlenmesi deneyleri olan yöntem 4.6.1 ve 4.6.2'nin sonucunda, model organizmalarda oluşan değişiklikler gözlemlenmiştir.

1)Önceden küfle zehirlenmiş organizmalara bitki ekstralarının iyileştirici etkisinin gözlemlenmesi(Yöntem 4.6.1.a, 4.6.1.b): Bitki ekstresi enjekte edilmeyen model organizmalar 4.günde yaşamsal faaliyetleri durmuş ve ölmüştür, aynı zamanda renkleri tamamen koyu gri(Resim-8) olmuştur. Hareketleri ise oldukça yavaş olduğu için yaşadığı sürede hücre metabolizmasının verimsiz olduğunu düşündürmüştür. Hatmi çiçeği ekstresi, organizmaların yaşamsal döngülerini devam ettirmiş ve ölmemiştir. Ayva kabuğu ekstresi ise ölmemiş ancak larva olarak kalmış olup ergin evreye geçememiştir. Her iki bitkiye ayrı ayrı maruz kalan organizmalarda renk değişimi olmamış(Resim-7) ve hareketlerinin seri olduğu görülmüştür.



Resim-6: *Galleria mellonella* deney öncesi



Resim-7(a,b): Küf uygulanmış *Galleria mellonella*'ların hatmi çiçeği(a) ve ayva kabuğu(b) ekstraları uygulanmış hali



Resim-8(a,b): Küf uygulanmış *Galleria mellonella*'ların bitki ekstraları uygulanmamış hali(a=24. saat, b=48.saat)

2)Bitki ekstraları enjekte edilen organizmalara sonradan küf enjekte edilmesi sonucu oluşacak direncin gözlemlenmesi(Yöntem 4.6.2.a, 4.6.2.b): Hatmi çiçeği yaprağı ve ayva kabuğu ile ayrı ayrı enjekte edilen organizmaların yaşamsal faaliyeti devam etmiş ve direnci artmıştır. Ancak hiçbir bitkiyle karşılaşmayan organizmalar, önceki aşamada olduğu gibi 4. günde yaşamsal faaliyetleri sona ermiştir.

Her iki deneyin sonucunda da bitkilerin küf zehirlenmelerine karşı onarıcı olduğu, önceden tüketildiğinde de küfe karşı bağışıklığı güçlendirici olduğu görülmüştür.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Gıda zehirlenmelerine karşı günümüzde kusturma, mide yıkanması gibi yöntemlerin yanında, aktif kömür, katartik ilaçlar, cildin temizlenmesi ve tüm barsak irrigasyonu gibi tedavi yöntemleri uygulanmaktadır(Kekeç Z., 2008). Ancak bu yöntemlerin maliyetinin

yüksek olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda, kullanılan etken madde olarak düşünüldüğünde, bu çalışmada kullanılan bitkisel ürün ülkemizde yetişen bitkilerden kaynaklı olması sebebiyle hem düşük maliyetli hem de yerli bir ürün olacaktır. Bu bitkilerin küf zehirlenmelerine karşı tedavide kullanımına literatürde rastlanmaması sebebiyle özgün olmakla beraber, dışa bağımlı üretimler yerine yerli üretimle küf zehirlenmesine karşı tedavilere yeni bakış açılarının kazandırılması, projenin yenilikçi yönüdür.

6. Uygulanabilirlik

Üretilen bitkisel ekstraktlar sadece hatmi çiçeği yaprağı veya ayva kabuğu içermekte olup, herhangi bir kimyasal içermemektedir. Bu sebeple, hayata geçirme aşamasında bu ekstraktların doğrudan kullanılabilirliği ön görülmüştür. Model organizma üzerinde herhangi bir olumsuz yan etkisinin görülmemesi, alerjenik reaksiyonlara yol açmadığını göstermektedir. Raf ömrüne bakıldığında, 8 ayın sonunda hala bozulmadığı görülmektedir ve gözlemlenmeye devam edilmektedir. Bu sebeple, düşük maliyetli ve küf zehirlenmelerine karşı organizmayı koruyucu etki gösteren, jel formda üretilen ekstraktlar üretilebilir ve tüketilebilir. Ancak hatmi çiçeği veya ayvaya karşı alerjisi olan kişilerin bu ekstraktları tüketimi, bu kişilerce risk faktörü oluşturmaktadır.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Bu proje için gerekli olan masrafların tümü karşılanmış olup toplam maliyeti 235 Türk Lirası olarak hesaplanmıştır. Tablo-2’de, yöntem basamakları ve ilgili bütçesi belirtilmektedir. Her basamak, literatür taramaları ve gözlemlenen veriler ile yorumlanarak bir sonraki basamağa geçilmiştir.

Tablo-2: Yöntem basamaklarının uygulandığı yer ve harcanan bütçe tablosu

TARİH	YÖNTEM BASAMAKLARI	MALZEME	DENEY ORTAMI	MALİYET
10.09.2019-25.10.2019	<i>Galleria mellonella</i> 'nın temini ve çoğalmasının sağlanması	1lt hacimde cam kavanoz	Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	0 ₺
20.09.2019-28.09.2019	Bitkisel ekstraktlarının hazırlanması	Soxhlet borusu, soğutucu cam boru, mantolu ısıtıcı, bitkiler, etüv(kurutmak için), küçük değirmen, 540 mikron çaplı elek, rotary evaporatör, şilifli erlen	BİLSEM Lab. ve Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	100 ₺
28.09.2019-15.10.2019	Küf üretimi ve küf solüsyonlarının hazırlanması	Elma, buzdolabı, mcfarland cihazı, steril öze,5ml hacimde deney tüpü	BİLSEM Lab.	10 ₺
15.10.2019-10.01.2020	Hazırlanan küf solüsyonlarının ve bitki ekstraktlarının <i>Galleria mellonella</i> larvalarına aşılması(Yöntem 6.1 ve 6.2) x 3 tekrar	Plastik petri kabı, enjektör ve iğnesi, büyüteç, mikropipet, bal peteği, bal, kepek, gliserin	BİLSEM Lab.	100 ₺
11.01.2020	Bitkilerde müsilaj analizi	%96'lık etanol, hassas terazi, şilifli mezür, mantar tıpa, saf su	BİLSEM Lab.	25 ₺
28.09.2019-devam etmektedir.	Bitkisel ekstraktların raf ömrünün tespiti	Küçük cam kavanoz, buzdolabı	BİLSEM Lab.	0 ₺

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Kimyasal içerikli ilaçlara karşı alerjisi olan, doğal besin tüketimine önem veren ve zehirlenmelere karşı bağışıklığı düşük olan herkes tarafından kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

9. Riskler

Bitki ekstrelerinin insan üzerinde denenmemesi risk teşkil etmektedir. Bununla beraber, gerekli etik kurul izinleri alınarak ve bilim insanları işbirliği ile kobay fareler üzerinde denemesi gerçekleştirilerek bu risk ortadan kaldırılabılır. Raf ömrünün en az 8 ay olduğu kesinleşmiştir. Böylelikle uzun zaman tüketilebilme avantajı sağlamaktadır, ancak buzdolabında bekletilmesi, gerçekleşebilecek riskleri en aza indirecektir. Bir diğer risk faktörü ise alerjenik etki gösterebilme durumudur. Bunun için kullanması önerilen kişilere, kullanmalarından önce alerjisi olup olmadığı sorulabilir.

10. Proje Ekibi

Takım Lideri: Berfu Şumnulu

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Berfu ŞUMNULU	Takım Lideri, Ekip üyesi	Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Bilim ve Sanat Merkezi	Sorunu belirleme, deneyleri planlama ve uygulama, yorumlama, raporlama
Eylül KIRTIL	Ekip üyesi	Şehit Prof. Dr. İlhan Varank Bilim ve Sanat Merkezi	Sorunu belirleme, deneyleri planlama ve uygulama, yorumlama, raporlama

11. Kaynaklar

- ALTUNTAŞ, H, DERE, B, NURULLAHOĞLU, Z. (2019). Azadirachtin'in modeli böcek *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) 'nın gelişimi üzerine etkileri. Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi - C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji, 8 (1), 85-91. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/estubtdc/issue/43264/525539> adresinden erişildi.
- Güner, E. (2009). "NEEM'in 5. evre *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:Pyralidae) larvaları üzerindeki etkileri." , Yayınlanmış yüksek lisans tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Biyoloji Ana Bilim Dalı, Konya. Erişim adresi: <http://acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4885/255125.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/33579/mod_resource/content/0/AYVA-DERS%20NOTU.pdf. Erişim tarihi: 08.11.2019
- Karaman, M. 2016. In Vivo Enfeksiyon Modellerinin Yükselen Yıldızı: *Galleria mellonella* Larvası. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* , 46(1):1-7. Erişim adresi: https://www.journalagent.com/tmcd/pdfs/TMCD_46_1_1_7.pdf
- Kaya,İ, İncekara,N. ve Nemli, Y.(2004). Ege Bölgesi'nde Sebze Olarak Tüketilen Yabani Kuşkonmaz, Sirken, Yabani Hindiba, Rezene, Gelincik, Çoban Değneği ve Ebegümeccinin Bazı Kimyasal Analizleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,*

- Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 2004, 14(1): 1-6. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyutbd/issue/21995/236147>
- Kekeç, Z. 2008. Zehirlenme olgularına acil yaklaşım. *Türk Aile Hekimleri Dergisi*. 12(2): 81-88. Erişim adresi: <http://www.turkailehekderg.org/wp-content/uploads/2014/06/c12-s02-04.pdf>
- Nurullohoğlu, Z. Ü., ve Susurluk, İ. A. İki Farklı Besin Ortamında Yetiştirilen *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) Türk ve Alman Irkının Yumurta Verimi. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi. Cilt 1, sayı 18, s. 39-44, 2004.
- Öztürk, S., Ercişli, S. (2007). Antibacterial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Althaeaofficinalis*. and *Althaeacannabina*. *Pharmaceutical Biology*, 45:3, 235-240. Erişim adresi: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/13880200701213179?needAccess=true>
- Sadighara, P. ve ark.(2012). The antioxidant and Flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2(3): 113–117. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4075668/>
- Sak, O. , Uçkan, F. CYPERMETHRİNİ *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) 'nın PUPLAŞMA VE ÖLÜM ORANLARINA ETKİSİ. *Uludağ Arı Dergisi*. Cilt 9, sayı 3, s. 88-98. 2009.
- Tannous, J. ve ark. 2017. *Penicillium expansum*'da Sekonder Metabolizma: Patulin Araştırmalarında Son Gelişmeler. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58(12). Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/315717389_Secondary_Metabolism_in_PenicilliPe_expansum_Emphasis_on_Recent_Advances_in_Patulin_Research
- Pacifico, S. ve ark.(2012) Antioxidant properties and cytotoxic effects on human cancer cell lines of aqueous fermented and lipophilic quince (*Cydonia oblonga* Mill.) preparations. *Food and Chemical Toxicology*. 50(11); 4130-4135. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151200539X>