

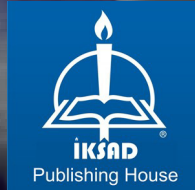
BİYOLOJİDE

GÜNCEL AKADEMİK ÇALIŞMALAR

TEORİK VE UYGULAMA

EDİTÖR
PROF. DR. ŞİFA TÜRKÖĞLU

YAZARLAR
PROF. DR. A. CENAP CEVHERİ
PROF. DR. ÇİĞDEM KÜÇÜK
PROF. DR. ŞİFA TÜRKÖĞLU
DOÇ. DR. ARMAĞAN KAYA
DOÇ. DR. BETÜL YILMAZ ÖZTÜRK
DOÇ. DR. YEŞİM DAĞLIOĞLU
DR. ÖĞR. ÜYESİ GÖKSAL SEZEN
ÖĞR. GÖR. DR. DAMLA AMUTKAN MUTLU
DR. BENAY TUNÇSOY
DR. DUYGU ÖZHAN TURHAN



**BİYOLOJİDE GÜNCEL AKADEMİK
ÇALIŞMALAR
TEORİK VE UYGULAMA**

EDİTÖR

PROF. DR. ŞİFA TÜRKÖĞLU

YAZARLAR

PROF. DR. A. CENAP CEVHERİ

PROF. DR. ÇİĞDEM KÜÇÜK

PROF. DR. ŞİFA TÜRKÖĞLU

DOÇ.DR. ARMAĞAN KAYA

DOÇ. DR. BETÜL YILMAZ ÖZTÜRK

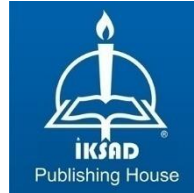
DOÇ. DR. YEŞİM DAĞLIOĞLU

DR. ÖĞR. ÜYESİ GÖKSAL SEZEN

ÖĞR. GÖR. DR. DAMLA AMUTKAN MUTLU

DR. BENAY TUNÇSOY

DR. DUYGU ÖZHAN TURHAN



Copyright © 2021 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced,
distributed or transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or
mechanical methods, without the prior written permission of the publisher,
except in the case of
brief quotations embodied in critical reviews and certain other
noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic
Development and Social
Researches Publications®
(The Licence Number of Publisher: 2014/31220)
TURKEY TR: +90 342 606 06 75
USA: +1 631 685 0 853
E mail: iksadyayinevi@gmail.com
www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.
Iksad Publications – 2021©

ISBN: 978-625-7636-79-7
Cover Design: İbrahim KAYA
May / 2021
Ankara / Turkey
Size = 16x24 cm

İÇİNDEKİLER

EDİTÖRDEN / ÖNSÖZ

Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU1

BÖLÜM 1

LAMBDA-CYHALOTHRIN İNSEKTİSİTİNİN ALLIUM CEPAL. KÖK UCU HÜCRELERİNDE DNAMİKTARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU.....3

BÖLÜM 2

BAKIR ETKİSİNDEKİ GALLERİA MELLONELLA LARVALARINDA ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ TEPKİLERİ

Dr. Benay TUNÇSOY17

BÖLÜM 3

TOPRAK BİYOFİLMLERİ VE ROLLERİ

Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK

Prof. Dr. A. Cenap CEVHERİ.....41

BÖLÜM 4

MIKROALG BAZLI BİYOGÜBRELER

Dr. Öğr. Üyesi Göksal SEZEN

Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK69

BÖLÜM 5

BITKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLER VE AĞIR METALLER

Prof. Dr. A. Cenap CEVHERİ

Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK.....87

BÖLÜM 6

MİKROPLASTİKLER SUCUL EKOSİSTEMLERDE ÜRETİCİ VE TÜKETİCİBASAMAKLARINI NASIL ETKİLER?

Dr. Duygu ÖZHAN TURHAN

Doç. Dr. Armağan KAYA.....107

BÖLÜM 7

NANOMALZEMELERİN/NANOPARTİKÜLLERİN HÜCRE, MOLEKÜLER BİYOLOJİVE BİYOMEDİKAL UYGULAMALARI

Doç. Dr. Yeşim DAĞLIOĞLU

Doç. Dr. Betül YILMAZ ÖZTÜRK.....125

BÖLÜM 8

BÖCEKLERDE SİNDİRİM SİSTEMİNE KISA BİR GİRİŞ

Öğr. Gör. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU.....163

ÖN SÖZ

Bu kitap, biyoloji biliminin çeşitli alanlarında görev alan araştırmacılar tarafından titizlikle hazırlanmıştır. Kitap içerisindeki her bölümde konular teorik veya uygulamalı esasları açıklanarak verilmiştir. Kitabın ilk iki bölümünde güncel akademik araştırmalar ve sonuçlarına yer verilirken, diğer bölümlerde de biyoloji alanında önemli yer tutan konular ile ilgili teorik bilgiler bulunmaktadır.

Değerli yazıları ile bu kitabın ortaya çıkmasına katkıda bulunan yazarlara, kitabın hazırlanmada ve basılmasında görev alan yayın ekibine teşekkür eder, kitabın siz değerli araştırmacı, öğrenci ve ilgililere faydalı olmasını dilerim.

Prof. Dr. ŞİFA TÜRKÖĞLU

BÖLÜM 1

LAMBDA-CYHALOTHRIN İNSEKTİSİTİNİN *ALLIUM CEPA* L. KÖK UCU HÜCRELERİNDE DNA MİKTARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU¹

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sivas,
TÜRKİYE.turkoglu@cumhuriyet.edu.tr.ORCID 0000-0002-2725-9827

GİRİŞ

Dünya nüfusunda hızlı ve kontrolsüz bir artış meydana gelmektedir. Buna karşılık, bu artışı karşılayacak oranda kaliteli ve yeterli ürün sağlanamamakta, bunun sonucunda da gıda ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde ve dünyada bu ihtiyacın karşılanması amacıyla tarım alanlarında birçok teknolojik yenilikler kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak tarım alanlarındaki ürüne zarar veren bitki ve hayvansal organizmalarla savaşmak içinde yoğun pestisit kullanımına gidilmektedir. Bu ürünlerin kullanılmasıyla ürün miktarı ve kalitesinde artış sağlamaktadır. Ancak bu kimyasallar suda, toprakta, meyve ve sebzeler üzerinde uzun süre kalmakta ve böylece çevre kirliliğine neden olarak, besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşabilen çeşitli zararlara sebebiyet vermektedir (Liman ve ark. 2011; Sinha ve Kumar, 2014; Bianchi ve ark. 2015; Datta ve ark., 2018; Verma ve Srivastava, 2018).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan pestisitler, adsorbsiyon sonucu meyve ve sebzelerin yüzeylerine yapışırlar. Bu gıdalar çoğunlukla çiğ tüketildiğinden yeterli arındırma sağlanmaz ve sindirim sistemi aracılığı ile maruziyet meydana gelir. Bazen de soluma veya temas sonucu deri yoluyla emilerek kan dolaşımına katılarak hayati organlara ve sistemlere ulaşabilirler.

İnsektisitler pestisitler içinde zararlılara karşı en yaygın kullanılan grupturlar. Tarım alanlarında kullanılan insektisitlerin %30'nu oluşturan sentetik piretroidler hedeflenen organizmaya karşı çok, buna karşılık kuşlar ve memelilere karşı daha az toksik olmaları nedeniyle

sıklıkla tercih edilmektedirler (Mazmancı ve ark. 2008). Bu kimyasallar, toksik etkilerini memeliler ve böceklerin sodyum kanalları üzerinde göstererek, periferik ve merkezi sinir sistemlerindeki aksonları etkileyen, sinir sistemini bozan zehirlerdir (Bradbury ve Coats, 1989).

Birçok ülkede lambda-cyhalothrin, sivrisinek, triatomin böcekleri ve diğer eklem bacaklılar gibi bulaşıcı hastalık vektörlerinin kontrolünde başarıyla kullanılmıştır (Schenone ve Rojas, 1992; Awumbila ve Bokuma, 1994). Öte yandan bu insektisitinin memeliler üzerinde genotoksik etkileri olduğu da gösterilmiştir (Campana ve ark., 1999; Çelik ve ark. 2003 ve 2005; Fahmy ve Abdalla, 2001; Naravaneni ve Jamil, 2005; Velmurugan ve ark., 2006).

Allium cepa, farklı kimyasalların genotoksik etkilerini belirlemek için kullanılan bir test materyalidir. Birleşmiş Milletler Çevre Programı, Dünya Sağlık Örgütü, Bitki Bioassay Uluslararası Programı ve ABD Çevre Koruma Ajansı gibi çevre kuruluşları, bitkilerin test organizmaları olarak kullanılmasını onaylamaktadırlar.

Allium cinsinin, özellikle de *A. cepa*'nın genotoksik çalışmalarda kullanıldığı birçok makale mevcuttur (Yüzbaşıoğlu ve ark. 2009; Saxene ve ark., 2010; Bianchi ve ark. 2016; Datta ve ark. 2018).

C değeri bir haploit hücrenin içerdiği DNA miktarıdır. 2C değeri replike olmamış durumda diploit hücrenin içerdiği DNA miktarıdır. C değeri türden türe değişir. Fakat bir tür için sabittir. DNA miktarı basit

organizmalardan gelişmiş organizmalara doğru paralel olarak bir artış gösterir.

Nuklear DNA içeriği, hücre siklusunun sentez fazında (S-faz) genellikle 2 katına çıkar. Sentez fazı başlamamış ya da tamamlanmış ploidi seviyesi bilinen nukleusların kullanılması ile C değerleri saptanabilmektedir. Diploit bitkilerin meristem hücrelerindeki (kök ucunda) tek mitotik nukleusların ölçümlerinde DNA miktarı telofazda 2C, profazda ve meteofazda 4C dir (Bennett ve Smith, 1976).

Bir türün DNA içeriği evrimsel gelişmişliği ile pozitif ilişki göstermesine rağmen, yakın akraba türler birbirinden farklı 2C değeri gösterebilirler. Bu durum “C değeri paradoksu” olarak tanımlanmaktadır. Bu farklı miktardaki DNA'nın herhangi bir gen ürününü kodlamayan DNA'lardan ibaret olduğu saptanmıştır (Nagl, 1980).

Pestisitler ile yapılan çalışmalar genellikle bu maddelerin kromozomlar ve mitotik indeks üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Türkiye’de elma, armut, fındık, buğday, mısır, domates, üzüm, zeytin, patates, şeker pancarı vb. birçok kültür bitkisinin büyüme ve gelişim sürecinde halen yoğun bir şekilde insektisit olarak kullanılmasına karşılık yapılan literatür taramalarında lambda-cyhalothrin insektisitinin çekirdek DNA miktarı üzerine olan etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmadığından, bu maddenin *A. cepa* kök ucu hücrelerinde çekirdek DNA miktarı üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL METOD

Lambda-cyhalothrin sentetik bir piretroidtir. Yaygın ismi “Karate” olan bu insektisit kimyasal adı (R+S)- γ -cyano-3-(phenoxyphenyl)methyl-(IS+IR)- Cis-3- (z-2-chloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enyl)-2,2-dimethyl-cyclopropare-carboxylate’dır. CAS Numarası 91465-08-06 olan bu insektisit kokusuz, beyaz veya renksiz kristal formdadır.

Çalışmada araştırma materyali olarak eşit büyüklükteki *A.cepa* başları kullanılmıştır. Örnekler bir kontrol ve üç uygulama grubu olmak üzere toplam dört gruba ayrılmıştır. 72 saat süre ile oda sıcaklığında köklenmeye bırakılmıştır. İnsektisit EC₅₀ değerinin belirlenmesi kök büyümesi inhibisyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla insektisit 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ppm lik dozları kullanılmıştır. EC₅₀ değeri 80 ppm olarak belirlenmiştir. Uygulama dozları ise EC₅₀ dozundan aşağıda olacak şekilde tercih edilmiş ve 25, 50 ve 75 ppm olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu distile su kullanılarak yapılmıştır. Yukarıda belirtilen dozlarda hazırlanan insektisit çözeltisi bulunan behere 5’er tane sağlam görünüşlü, benzer büyüklükteki, dolgun soğan tohumları konularak 24 saat süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tohumlar distile su ile yıkanmış ve içinde saf su bulunan beherlere alınarak 20 °C ‘ye ayarlı etüvde 5 (beş) gün boyunca çimlendirilmişlerdir. Kök uzunlukları 1-1,5 cm olunca kesilmiş ve fiksasyon amacıyla 24 saat karnoy solüsyonunda bekletilmiştir. Bu işlemde sonra tespit edilmiş olan kök uçları 1N HCL’de 60 °C ‘lik etüvde 10 dakika süreyle hidroliz

edilmiştir (Fiskesjö, 1985). Hidrolizden sonra kök uçları 1 dakika süre ile damıtık suda yıkanmış ve bir filtre kağıdı üzerinde kurulanmıştır. Bu işlemde sonra kök uçları 1 saat süre ile oda sıcaklığında Feulgen boya ile boyanmıştır. Feulgen reaksiyonu hidroliz sonunda nükleotiddeki baz kısmının pentozdan ayrılarak, pentozdaki serbest hale geçen aldehit grubunun leubazik füksin ile muameleye girmesi sonucu füksinin kırmızı renginin çıkmasından ibarettir. Asit hidrolizinden sonra Feulgen reaksiyonu, DNA için karakteristiktir.

Boyanan kök uçları üç kez 10 dakikalık sürelerle kükürtlü suda (SO₂ suyu) yıkanmıştır. Daha sonra bu kök uçları damıtık suda alınarak preparat yapma aşamasından geçirilmiştir. Ezme preparat yöntemi ile hazırlanan preparatlardan hücreleri iyi dağılmış olanlar seçilerek entellan ile kapatılarak daimi preparatlar hazırlanmıştır. Kontrol grubu için de yukarıdaki işlemler uygulanmıştır (Nagl, 1976).

Daimi preparatlardan DNA ölçümü amacıyla, ölçüme uygun telofaz hücrelerinin çekirdek absorpsiyonları Reichert-Zetopan mikrospektrofotometrede 550 nm de ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Her grup için ayrı ayrı 100 ölçüm yapılmıştır ve bu ölçümler üç tekrar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubu ile insektisit uygulandığı gruplar arasındaki farkın belirlenmesi için SPSS 22 programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Farklı dozlardaki (25, 50 ve 75 ppm) Lambda-cyhalothrin insektisiti ile muamele edilen *A.cepa* kök ucu hücrelerinde belirlenen çekirdek

DNA miktarı Tablo 1 de verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi uygulanan tüm dozların kontrol ile karşılaştırılması sonucu aralarında istatistiksel olarak fark olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde dozlar kendi aralarında karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak fark bulunduğu gözlenmiştir. 2C çekirdek DNA miktarındaki azalma doz artışına paralel olarak gerçekleşmiştir.

Tablo 1: Lambda-cyhalothrin İnektisitinin 25 ppm, 50 ppm ve 75 ppm lik lik Dozlarının *Allium cepa* Kök Ucu Hücrelerine Uygulanması Sonucu Elde Edilen 2C Çekirdek DNA Miktarları (pikogram olarak)

Doz	2C çekirdek DNA miktarı ORT. \pm S. H.*
Kontrol	90.27 \pm 0.11 a
25 ppm	76.75 \pm 0.53 b
50 ppm	62.70 \pm 0.31 c
75 ppm	40.52 \pm 0.48 d

ORT. \pm S. H.: Ortalama \pm Standart Hata

*: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı harflerle gösterilen değerler 0,05 düzeyinde önemsizdir.

TARTIŞMA

Lambda-cyhalothrin'nin 2C çekirdek DNA miktarı üzerine etkilerini içeren çalışmaları araştırmak amacı ile yapılan literatür taramasında, bu konuya ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak başka pestisitlerin etkilerini gösteren çalışmalar az sayıda da olsa elde edilmiştir. Stomp herbisitini *Allium cepa* kök ucu hücrelerine uygulayan Bilaloğlu (1984), çalışma sonunda bu maddenin kök ucu hücrelerinde DNA miktarını kontrole göre artırdığını saptamıştır. Bu çalışmada stompun iğ iplikleri oluşumunu engelleyerek poliploidi oluşturduğu ve buna bağlı olarak da DNA miktarını artırdığı

belirtilmiştir. Fierment ve Gurther (1970), dalaponu *Agropyron repens*' e uygulamışlar ve çalışma sonunda bu maddenin DNA miktarını azalttığını tespit etmişlerdir. Turbutry herbisitinin *Vicia faba* kök uçlarına uygulandığı başka bir çalışmada, tüm uygulamalarda mitotik indeksin baskılandığı ve DNA ve RNA miktarlarında azalmaların meydana geldiği belirtilmiştir (Badr, 1986). Chand ve Roy (1981), 2,4-dinitrofenolün bitkilerde oksitatif fosforilasyonu azalttığını ve bununda ATP seviyesinde azalmalara neden olduğunu ve sonuçta DNA ve RNA sentezinde inhibisyonların meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir. Badr ve Ibrahim (1987), glean herbisitinin *Allium cepa* ve *Vicia faba*'da DNA ve RNA miktarını azalttığını ve bu durumun mitotik indekste düşüslere neden olduğunu belirtmişlerdir. El-Ghamery ve Ark., (2000), atrazin herbisitini *Allium cepa* ve *Vicia faba* kök meristemlerine uygulamışlardır. Çalışma sonunda DNA ve RNA miktarının doz ve uygulama süresinin artışına paralel olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar DNA sentezindeki inhibisyonun RNA sentezini de baskıladığını ve tüm bunların sonunda mitotik indeksin azaldığını ileri sürmüşlerdir.

22-24 Kasım 2019 tarihleri arasında Gaziantep'te düzenlenen "Zeugma III. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi"nde sözlü olarak sunulan "Lambda-Cyhalotrin İnsektisitinin *A. cepa* Kök Ucu Hücrelerinde Genotoksik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışmamızda bu insektisit mitotik indeksi etkin bir şekilde azalttığı ve kromozomlarda anafaz köprüsü, c-mitoz, kromozom yapışkanlığı ve binükleus oluşumları gibi çeşitli hasarlara neden olduğu

gösterilmiştir (3rd International Zeugma Conference on Scientific Researches, November 22-24, 2019 Gaziantep, Turkey, Full Text Book on Applied Sciences, ISBN 978-605-7811-39-4, sayfa 508-517). Bu kromozom anormallikleri tamir edilemeyen DNA hasarlarının bir göstergesidir. Bunun sonucunda da 2C çekirdek DNA miktarında azalmaların meydana geldiği söylenebilir. Daha net sonuçlar için bu maddenin DNA çift heliksindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla da moleküler ve biyokimyasal çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Awumbila A., Bokuma E. (1994). Survey of pesticides used in the control of ectoparasites on farm animals in Ghana. Trop. Anim. Health Prod., 26, pp. 7-12
- Badr A. (1986). Effects of the s-triazine herbicide terbutryn on mitosis chromosomes and nucleic acids in root tips of *Vicia faba*. Cytologia, Vol. 51, pp 571-578
- Badr A., Ibrahim A. G. (1987). Effects of the herbicide glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems, Cytologia, Vol. 52, pp 293-302
- Bennett M. D. and Smith J. B. (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. Phil. Trans. R. Soc. London, Ser. B 274, pp 227-274
- Bianchi J., Mantovani M. S., Marin-Morales M. A. (2015). Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. J. Environ. Sci. (China), Vol. 36, pp. 102-111
- Bianchi J., Fernandes C. C. T., Marin-Morales M. A. (2016). Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. Chemosphere, 144, pp 475-483
- Bilalaoğlu R. (1984). Stomp ve Hyvar X' in *Allium cepa* L.' de oluşturdukları Mitotik etkileri ve kromozomal değişimler. C. Ü. Fen Ed. Fak. Fen Bil. Der., 2, 53-70
- Bradbury S. P. ve Coats J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 108, pp 133-177
- Campana M. A., Panzeri A. M., Moreno V. J., Dulout F.N. (1999). Genotoxic evaluation of the prethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of fish Cheirodon interruptus. Mutat. Res. 438, pp 155-161

- Chand S. and Roy S. C. (1981). Effects of herbicide 2,4-dinitrophenol on mitosis, DNA, RNA and protein synthesis in *Nigella sativa* L. *Biol Plantarum* Vol. 23, pp 198-202
- Çelik A., Mazmancı B., Camlıca Y., Çomelekoglu U., Askin A. (2003). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutat. Res.* 539, pp 91–97
- Çelik A., Mazmancı B., Çamlıca Y., Çömelekoğlu U., Aşkın A. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 61, pp 128–133
- Datta S., Singh J., Singh J., Singh S., Singh S. (2018). Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, Vol. 28, Issue 4, pp 171-178
- El-Ghamery A. A., El-Nahas A. I., Mansour M. M. (2000). The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, Vol. 65, No. 3, pp 277-287
- Fahmy A. M., Abdalla E. F. (2001). Cytogenetic effects by the natural prethrins and the synthetic lambda-cyhalothrin in mice in vivo. *Cytologia*, Vol. 66, pp 139–149
- Fierment G. and Gunther G. (1970). Nukleinsauruntersuchungen an *Agropyron repens* (L). Beauu. Unter berücksichtigung der systemischen wirkung von dalopan. *Biol. Zbl.*, Vol. 89, pp 723-733
- Fiskesjo G. (1985). The Allium test as a standart in environmental monitoring. *Hereditas*, Vol. 102, pp 99-112
- Liman R., Cigerci I. H., Akyil D., Eren Y., Konuk M. (2011). Determination of genotoxicity of fenaminosulf by *Allium* and comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, pp 61-64
- Mazmancı B., Tamer L, Aşkın A. (2008). Sıçanlarda lambda cyhalothrinin akut toksik etkisinin araştırılması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, vol. 1 No. 1), pp 15-9

- Nagl W. (1980). Chromosome, organisation, funktion und evolution des chromatins. Verlag Paul Parey Berlin-Hamburg.
- Naravaneni R. ve Jamil K. (2005). Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on human lymphocytes. J. Biochem. Mol. Toxicology, Vol. 19, pp 304-310
- Saxena P. N., Gupta S. K., Murthy R. C. (2010). Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: a spectroscopic approach for chromosome damage. Pestic. Biochem. Physiol, 96, pp 93-100
- Schenone H. ve Rojas, A. (1992). Laboratory study on the immediate and persistent insecticide activity of the pyrethroid lambda-cyhalothrin on nymphs of IV instar *Triatoma infestans*. Bol. Chil. Parasitol., Vol. 47, pp 35-37
- Sinha V. S., Kumar N. (2014). Assessment of Mito-inhibitory and Genotoxic effects of two Organophosphate Pesticides in the root tip cells of *Allium cepa* L. Ann. Plant Sci, 3, pp 699-703
- Velmurugan B., Ambrose T. and Selvanayagam, M. (2006). Genotoxic evaluation of lambda-cyhalothrin in *Mystus gulio*. Journal of Environmental Biology, Vol. 27, No: 2, pp 247-250
- Verma S., Srivastava A. (2018). Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L.-A biomarker based study. Chemosphere. Vol. 206, pp 248-254
- Yüzbaşıoğlu D., Unal F., Sancak C. (2009). Genotoxic effects of herbicide illoxan (Diclofop-methyl) on *Allium cepa* L. Turk. J. Biopl., 33, pp 283-290

BÖLÜM 2

BAKIR ETKİSİNDEKİ *Galleria mellonella* LARVALARINDA ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİ TEPKİLERİ

Dr. Benay TUNÇSOY¹

¹ Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Adana, Türkiye, btuncsoy@atu.edu.tr, * ORCID 0000-0003-4361-3475

GİRİŞ

Ağır metaller oldukça yüksek yoğunluğa sahip olan metaller olarak adlandırılmaktadır. Çoğunlukla bu terim, fiziksel özellikler açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ün üzerinde olan metaller için kullanılır. Bu grupta demir (Fe), bakır (Cu), kurşun (Pb), cıva (Hg), nikel (Ni), krom (Cr), kobalt (Co), çinko (Zn) ve kadmiyum (Cd) olmak üzere altmışın üzerinde metal yer almaktadır. Bu elementler doğal olarak dünyamızda kükürt, silikat ve karbonat gibi kararlı bileşikler olarak veya silikatlarda bağlanmış olarak bulunur.

Ağır metaller, biyolojik süreçler üzerindeki etki derecelerine göre yaşamsal (gerekli) ve yaşamsal olmayan (zorunlu olmayan) olarak sınıflandırılır. Enzimatik bir reaksiyonlarda kofaktör olarak rol oynayan ve organizmada belirli bir düzeyde bulunması gereken vitamin ve hormon bileşenleri yaşamsal olarak sınıflandırılır. Fe, Cu, Zn, Ni ve Se gibi metaller organizmada belirli bir derişimden sonra toksik etki gösterirken, Hg, Cd ve Pb gibi yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük derişimlerde bile toksik etkilere neden olabilmektedir. Günümüzde teknolojik gelişmeleri ve beslenme gereksinimlerini karşılamak için madencilik, boya, plastik, cam ve metal kaplama gibi çeşitli endüstriyel alanlarda ağır metallerin kullanılması, bunlara ek olarak tarımsal alanlarda daha fazla kaliteli ürün elde etmek amacıyla artan pestisit ve suni gübre kullanımı doğal ortamlardaki derişimlerini tehlikeli seviyelere çıkarabilmektedir (Hu, 2000).

Bakır, özellikle elektrik endüstrisinde dünyada en çok kullanılan metallere biridir. Madencilik ve metal kaplama endüstrilerinin yanı sıra, istenmeyen bitki örtüsünün gelişmesini önlemek için kullanılan yosunlar, tarımsal verimliliği artırmak için kullanılan gübreler, doğal ekosistemlerdeki bakırın ana kaynaklarıdır. (Nussey, 1998). Hayvansal organizmalarda bakır; kemik oluşumu, omuriliğin miyelinasyonu, hemoglobinin sentezi ve özellikle sitokrom oksidazlarla birlikte metaloenzimlerin redoks reaksiyonlarında çalışan enzimlerin yapısal bileşenini oluşturmaktadır. Bu işlevleri nedeniyle canlıda yüksek düzeyde regüle edilmektedir. Yüksek organize olmuş organizmalar yapısal ve metabolik süreçleri için eser miktarda bakır gibi ağır metallere ihtiyaç duyarlar, ancak belirli bir konsantrasyonun üzerinde alındığında metabolik olarak aktif dokularda birikerek toksik etkilerini gösterirler. Organizmalarda ağır metallerin birikmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna, hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına ve enzimlerin inhibisyonuna neden olmaktadır.

Moleküler oksijen (O_2) aerobların yaşamı için gerekli potansiyel olarak toksiktir (Fridovich, 2013). Birikmiş O_2 'nin toksisitesiyle başa çıkmak için, birkaç farklı enzim geliştirilmiştir. Biyolojik olarak, antioksidan kavramı, oksitlenebilir bir substratınkinden daha düşük bir konsantrasyonda mevcut olan, substratın oksidasyonunu geciktirebilen veya önleyebilen herhangi bir bileşik olarak tanımlanmaktadır. (Pisoschi ve Pop, 2015).

Oksidatif stresin en önemli nedenlerinden biri serbest radikal oluşumdur. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve

bozulması arasındaki bir dengesizliğe dayanan fizyolojik veya patofizyolojik süreç olarak tanımlanmaktadır (Staerck ve ark., 2017). Antioksidan sistemler tüm organizmalarda bulunur. Antioksidan enzimlerin işlevleri, oksidatif hasarı onarmak ve reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak organizmaları oksidatif stresten korumaktır. Antioksidan savunma bozulduğunda, oksidatif stres DNA hasarına ve enzim fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Doyotte ve ark., 1997).

Aerobik organizmalardaki hücrel metabolizma, O_2 ' nin azaltılmasını içeren en etkili enerji metabolizması biçimlerinden biridir. O_2 ' nin eksik indirgenmesi, endojen reaksiyonlarda oldukça toksik olan radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açmaktadır. (Mates, 2000; Livingstone, 2001). ROS oluşumu, O_2 ' nin oksidasyonu ve indirgenmesi ile ilgilidir. Bu indirgemenin bir sonucu olarak, moleküler oksijen $O_2^{\cdot-}$ radikale ve ardından daha reaktif H_2O_2 ve OH^{\cdot} radikale ve son olarak suya (H_2O) indirgenir. $O_2^{\cdot-}$ radikali çok zararlı olmasa da, H_2O_2 kaynağı olduğu için önemlidir. Süperoksit kendiliğinden veya süperoksit dismutaz enzimi (SOD) tarafından parçalanarak H_2O_2 ' ye dönüştürülebilir (Lesser, 2006; Unfried ve ark., 2007). H_2O_2 yüksüzdür, $O_2^{\cdot-}$ 'den daha karardır ve su içeriği nedeniyle biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilir. Katalaz (CAT) enzimi, H_2O_2 ' yi su ve oksijene katalize eden enzimdir.

Glutasyon peroksidaz (GPx), indirgenmiş glutasyon (GSH) kullanarak H_2O_2 ' nin indirgenmesini katalize eden ve GSH' yi fazla oksitlenmiş glutasyonu oksitleyen bir peroksidazdır. Glutasyon peroksidaz,

hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri, genellikle mitokondriyi, bazen sitozolü alkole parçalayan önemli bir hücre içi enzimdir (Peric-Mataruga ve ark., 2019). Genel olarak aktivitesi, mikro besin kofaktörü olarak bilinen selenyuma bağlıdır (Ighodaro ve Akinreprene, 2018). Elektron kaynağı olarak glutasyon kullanan GPx, organik hiperoksit ve hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi, Lepidoptera takımına ait türlerde nispeten düşüktür. (Tunçsoy, 2016).

H₂O₂, katalaz veya glutasyon peroksidaz enzimleri tarafından yok edilmez ve tamamen H₂O ve O₂'ye indirgenmezse en reaktif oksijen türlerinden OH[•] radikaline dönüştürülebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Lesser, 2006; Unfried ve ark., 2007). Endojen H₂O₂ detoksifiye edilmezse, Haber-Weis ve Fenton reaksiyonlarının bir sonucu olarak metaller tarafından katalize edilir. Haber Weis ve Fenton reaksiyonları, demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında H₂O₂'nin azalması sonucu OH[•] radikali şeklinde oluşur (Lesser, 2006; Unfried ve ark., 2007).

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi vücuda giren yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli rolü olan bir enzimdir. Böceklerde bu enzim, hücresel zarların oksidatif yıkıma ve insektisit detoksifikasyonuna karşı korunmasını sağlar (Yu, 2008). Bu enzim, toksik metabolitlerin glutasyon ile konjugasyonunu katalize eder. Aynı zamanda hücre, doku, organ bütünlüğü ve diğer antioksidan moleküllerin korunmasından ve ribonükleotitlerin azaltılmasından

sorumlu olan önemli bir antioksidan moleküldür (Casalino ve ark, 2004).

Hidrolazlardaki en önemli enzim grupları esterazlardır. Esteraz enzimleri, böceklerde feromon ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi birçok önemli mekanizmada rol oynar. Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolini hidrolize eden lipofilik etkiye sahip bir enzimdir. Asetilkolin, sinir uyarılarını sinir ucundan başka bir sinir hücresine taşır. Ayrıca sinir ve kas hücreleri yoluyla biyoelektrik akım oluşumunu sağlayan biyolojik önemi büyük bir esterdir (Alon ve ark., 2008). Çeşitli inhibitörler tarafından indüklenen enzim inaktivasyonu, asetilkolin birikimine, reseptörlerin hiperstimülasyonuna ve böceklerde lokomotor davranışta değişikliklere neden olan bozulmuş nörotransmisyonu açar. Asetilkolinesteraz aktivitesinin spesifik inhibitörleri, Hg^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} gibi ağır metalleri içerir (Frasco ve ark., 2007). İnhibisyon, protein-SH kalıntılarına bağlanarak gerçekleşir (Lionetto ve ark., 2013).

Bilinen böcek türlerinin çoğu otçuludur ve besinlerdeki toksik maddelerle reaksiyonları hızlı ve güçlüdür. Toksik metallerin bu tür böcekler üzerindeki büyüme inhibisyonu, gelişim bozuklukları, mortalitesi, fizyolojilerinin yeniden düzenlenmesi, biyokimyası gibi akut ve kronik etkilerinin olduğu bilinmektedir (Peric-Mataruga ve ark., 2019). Çalışmada materyal olarak kullanılan *Galleria mellonella* L., Pyralidae ailesinin bir üyesidir. *G. mellonella* bir holometabol böcektir ve dört farklı yaşam evresine sahiptir (yumurta, larva, pupa,

yetişkin). Aynı zamanda model organizma olarak da kullanılan bu türün larvaları pupa aşamasında polen, balmumu, bal arısı derileri ve yavruları ile beslenerek, petek içinde tüneller oluşturur ve toplu olarak yumurtlama ağları meydana getirir. Bu süre zarfında kovana zarar verirler. Ayrıca, kolonilerin larvalar tarafından büyük ölçekli istilası genellikle koloni kaybına yol açar. Bu türün en önemli özelliklerinden biri in vitro koşullarda rahatlıkla büyüebilmesi ve geniş larva gruplarının kullanabilmesi açısından çalışmaların istatistiksel gücünü arttırmakta ve araştırmalarla ilgili maliyetleri düşürmektedir (Cook ve McArthur, 2013; Maguire ve ark., 2017; Lange ve ark., 2018).

Ağır metallerin endüstriyel alanlarda kullanımının artmasıyla birlikte çevre ve hedef dışı organizmalar üzerindeki olumsuz etkiler de aynı oranda artmaktadır. Organizmalarda ağır metallerin birikimi sonucu besin zinciri ile organizasyonları daha yüksek organizmalara transfer edilerek derişimleri artar. Böcekler, karasal ekosistemin büyük bir popülasyonunu oluşturan canlı gruplar oldukları için besin zincirinde önemli bir basamağı oluşturmaktadırlar. Bu amaç kapsamında yapılan çalışmada canlı organizmalar üzerinde, özellikle sinir sistemi ve diğer metabolik sistemler üzerinde toksik etkilere neden olan bakırın, model organizma *G. mellonella* larvalarının antioksidan savunma sistemleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

1. MATERYAL- METOT

Stok kültürün devamı için Bronksil (1961) tarafından belirlenen kepek, bal peteği, bal, gliserin ve saf sudan oluşan besin karışımı 5 litrelik cam kavanozlara yerleştirilerek 5 dişi ve 5 erkek ergin *G.*

mellonella bırakılmıştır. Besin karışımı içerisine kepek ilave edilmeden önce kontaminasyonu önlemek amacıyla FN 400 Nüve marka sterilizatörde 150 °C' de sterilize edilmiştir. Dişilerin yumurta bırakması için kavanozların kapaklarına bırakılan kağıtlar gün aşırı değiştirilerek petek içeren farklı kavanozlara aktarılmıştır. Kavanozların ağızları hava sirkülasyonunu engellemeyecek ince bir tül ile kapatılmıştır. Hazırlanan kavanozlar böcek kültürü odasında 30 ± 1 °C sıcaklıkta, % 65 ± 5 bağıl nemde ve günlük 12:12 (K: A) foto periyodunda inkübasyona bırakılmıştır. Populasyon yoğunluğuna bağlı olarak zaman zaman kavanozlara bal peteği eklenmiştir. Bu yöntemle elde edilen 5. evre larvaların seçimi Singh (2010) tarafından belirlenen boy ve ağırlık verilerine göre yapılmıştır.

Yapılan çalışmada Cu' nun doğadaki derişimlerinin *G. mellonella* larvaları üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Besin içerisine 100 g besin içerisine 10 µg /mL CuSO₄ uygulanmıştır. Yumurtadan yeni çıkan larvalar CuSO₄.5H₂O içeren besine aktarılmıştır (N=20). Kontrol böceklerinin Cu içermeyen besin ile beslenmeleri sağlanmıştır. Larvalar son (7.) evreye ulaştığında (yaklaşık 15 gün sonra; 150-200 mg), besin ortamından alınmış, hemolenf, orta bağırsak ve yağ dokusu disekte edilerek içerisinde soğuk homojenizasyon tamponu (20 mM Tris tamponu pH 7.6) bulunan Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Melanizasyonu önlemek için her tüpe birkaç feniltioüre (PTU) kristali eklenmiştir. Elde edilen homojenatlar 500 x g'de 15 dakika (+4 °C) santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar yeniden 12.000 x g'de 45 dakika (4 °C) tekrar santrifüj edilmiştir. Yağ dokuları 50 W, 40-50 s'

de ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonoplus. HD 2070, Berlin, Almanya) santrifüj edilmiştir. Sitosolik fraksiyon hacimleri, toplam protein ölçümü için her numunenin 100 µL alikotunu ayırarak ölçülmüş ve düşük moleküler ağırlıklı proteinleri uzaklaştırmak için Sephadex® G-25 jel kolonları uygulanarak saflaştırma işlemi yapılmıştır (Gonzalez ve ark., 2014). Antioksidan enzimlerin tayini için örnekler, analiz işlemlerine kadar - 80 °C' de saklanmıştır.

1.1 SOD Enzim Aktivitesinin Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD: EC: 1.15.1.1) aktivitesi, ksantinoksidaz/hipoksantin sistemi ile sitokrom c' deki azalmanın ölçülmesiyle belirlenmiştir. 1 birim SOD, sitokrom c azalmasının % 50'sinin inhibisyonu ile biriken enzim miktarı ile tanımlanmaktadır (McCord ve Fridovich, 1969). SOD aktivitesi, toplam proteinin U mg⁻¹ olarak tanımlanmasıyla elde edilmiştir.

1.2. CAT Enzim Aktivitesinin Tayini

Katalaz (CAT: EC: 1.11.1.6) aktivitesi, bir dakika boyunca 240 nm absorbansta H₂O₂' nin parçalanmasıyla salınan azalmış absorbansın ölçümüdür. Sabit sayı ($\epsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak birim zamandaki absorbans değişiklikleri, katalaz aktivitesinin bir ölçüsü olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein birimi cinsinden ifade edilmiştir (Greenwald, 1985).

1.3. GPx Enzim Aktivitesinin Tayini

Toplam glutasyon peroksidaz (GPx: EC: 1.11.1.9), NADPH'nin 340 nm'de oksidasyonunu takiben substrat olarak glutasyon redüktaz,

indirgenmiş glutatyon ve kümen hidroperoksit varlığında ölçülmüştür (Lawrence ve Burk, 1976). GPx aktivitesi, toplam protein konsantrasyonunun $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ i olarak ifade edilmiştir.

1.4. AChE Enzim Aktivitesinin Tayini

Asetilkolinesteraz (AChE: EC: 3.1.1.7), asetiltiyokolinin tiyokolin ile asetata ayrışma reaksiyonunu katalize eden bir enzimdir. Hemolenf, orta bağırsak ve yağ doku, % 10 Triton içeren Tris-HCl tamponunda (100 mM, pH 8.0) buz üzerinde homojenize edilmiş daha sonra 12.000 g' de 30 dakika (4°C) santrifüj edilmiştir. AChE aktivitesi, 41 nm dalga boyunda tiyokolin ile DTNB arasındaki reaksiyon sonucu oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin verdiği sarı rengin yoğunluğu ölçülerek belirlenmiştir (Ellman ve ark., 1961).

1.5. GST Enzim Aktivitesinin Tayini

1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) indirgenmiş glutatyon ile konjugasyonunu katalize eden toplam GST aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Absorbanstaki değişiklik 340 nm' de tespit edilmiş ve enzim aktivitesi, molar ekstinksiyon katsayısı $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak kullanılarak mmol konjuge CDNB/dk/mg protein olarak hesaplanmıştır (Habig ve ark., 1974).

1.6. Total Protein Tayini

Bradford yöntemi, proteinlerdeki arginin, triptofan, tirozin, histidin ve fenilalanin gibi amino asit kalıntılarının, mavi renkli bir kompleks oluşturan Coomassie brilliant blue G-250 boyasına bağlanmasına

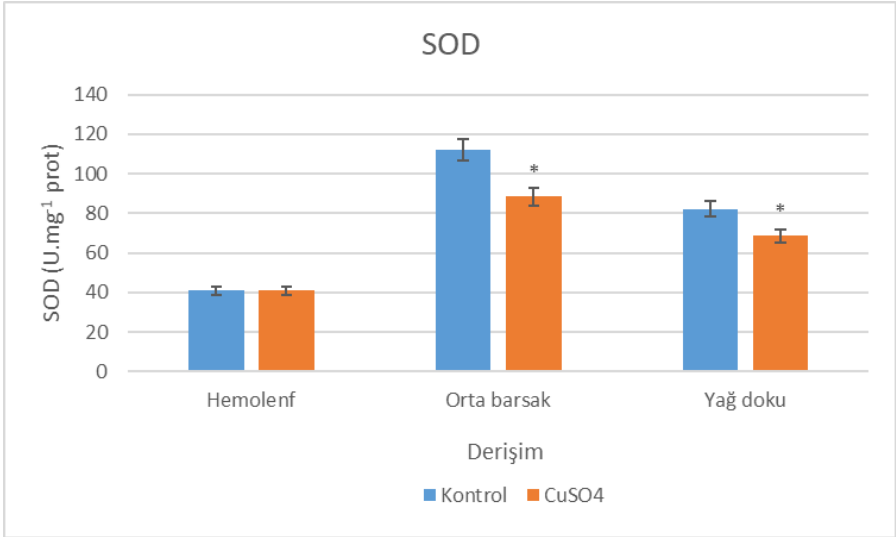
dayanır. Renkli solüsyonun absorbansı 595 nm'de ölçülmüştür (Bradford, 1976).

1.7. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 21.00 programı kullanılarak bir dizi Varyans Analizi ve Bağımsız örnekler t testi ile değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

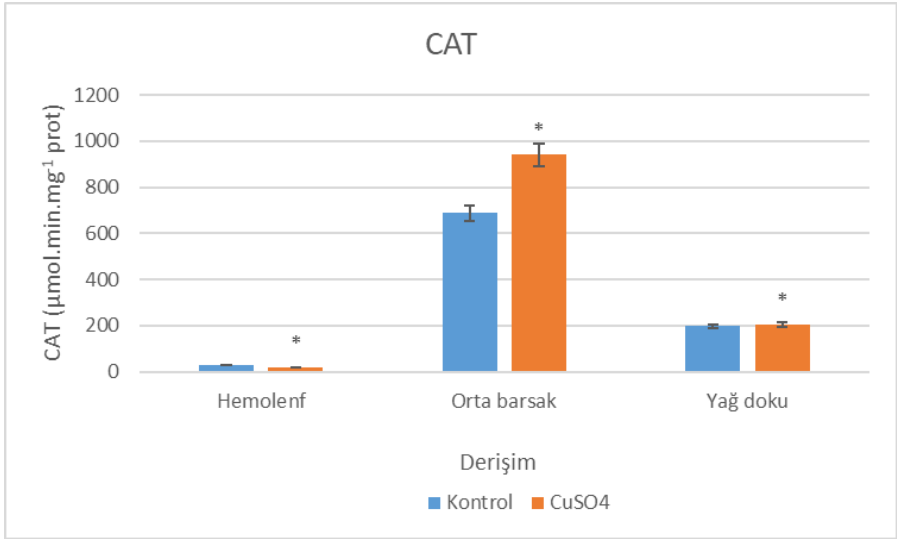
2. BULGULAR

CuSO_4 uygulaması sonucunda larvaların orta barsak ve yağ dokuda SOD aktivitelerinde sırasıyla 1.27 kat ve 1.20 kat oranlarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 1; $P < 0.05$).



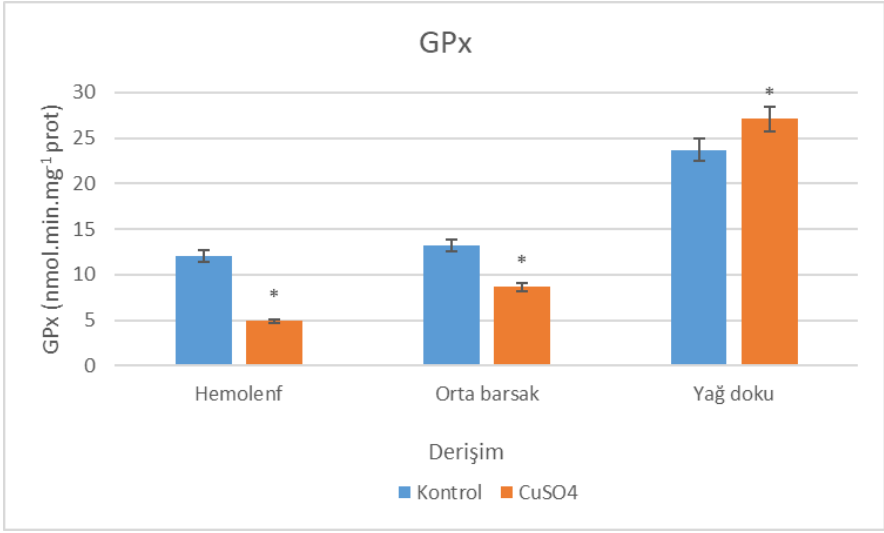
Şekil 1. Bakıra maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki SOD aktivitesi. t testine göre “*” ile gösterilenler arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur ($P < 0,05$).

Bakır maruziyeti sonucunda *G. mellonella* larvalarının hemolenfide CAT aktivitesinde 1.53 kat oranında azalma meydana gelirken, orta barsak ve yağ dokusunda sırasıyla 1.37 kat ve 1.04 kat oranlarında artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 2; $P<0.05$).



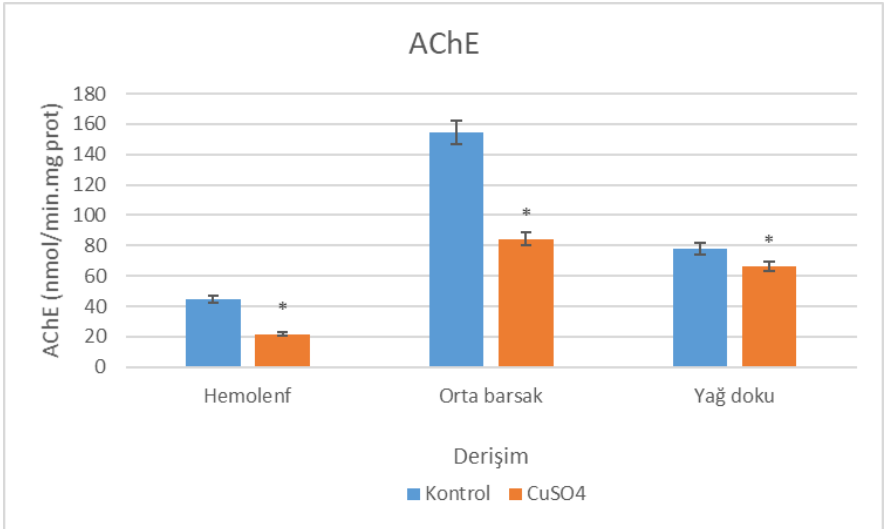
Şekil 2. Bakıra maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki CAT aktivitesi. t testine göre “*” ile gösterilenler arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur ($P<0,05$).

GPx aktivitelerinde ise, *G. mellonella* larvalarının hemolenf ve orta barsakta sırasıyla 2.46 ve 1.52 kat oranlarında azalma tespit edilmiştir. Larvaların yağ dokularında ise GPx aktivitesinde 1.14 kat oranında artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 3; $P<0.05$).



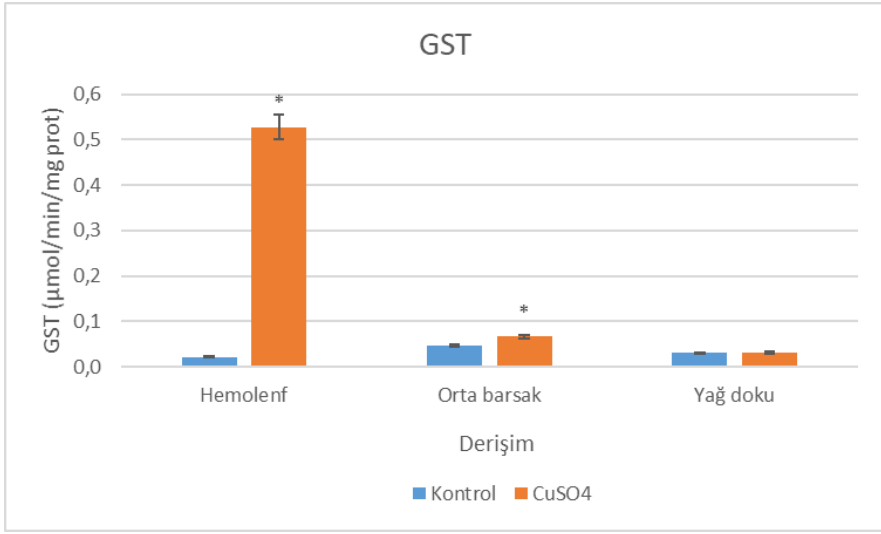
Şekil 3. Bakıra maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki GPx aktivitesi. t testine göre “*” ile gösterilenler arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur. (P<0,05).

AChe aktivitesinde ise, hemolenf, orta barsak ve yağ dokuda sırasıyla % 52, % 46 ve % 15 inhibisyon meydana gelmiştir (Şekil4; P<0,05).



Şekil 4. Bakıra maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki AChE aktivitesi. t testine göre “*” ile gösterilenler arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur. (P <0,05).

GST aktivitesinde, hemolenfte 24 kat oranında artış meydana gelirken, orta barsakta 1.45 kat oranında artış meydana gelmiştir (Şekil 5; $P < 0,05$).



Şekil 5. Bakıra maruz bırakılan *G. mellonella* larvalarının hemolenf, orta barsak ve yağ dokusundaki GST aktivitesi. t testine göre “*” ile gösterilenler arasında istatistiksel bir fark bulunmuştur. ($P < 0,05$).

3. TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, antioksidan enzimlerin böceklerde metal etkisi sonucunda güçlü bir şekilde etkilendiğini göstermiştir. Metaller, genellikle düzenleme mekanizmalarıyla kontrol edilen Lepidopter larvalarında birikime neden olmakta veya zor asimile edilebilmektedir (Gintenreiter ve ark., 1993). Larvalarda metal içeriklerin düzenlenmesi, genellikle bağırsak hücrelerinin (metallerin biriktiği yerlerde) dışkıda atılmak üzere sindirim sisteminin lümenine parçalanması veya malpighian tübülleri yoluyla metallerin atılması

yoluyla gerçekleştirilir (Dallinger, 1992). Bakırın birçok organizmanın orta bağırsağındaki sitozol metalotiyonine bağlanması, Cu/Zn süperoksit dismutaz, sitokrom c oksidaz veya transkripsiyon faktörleri gibi birçok biyolojik aktivitede yer alan temel bir element olması gibi özelliklerine rağmen, hücrelerde belirli bir derişimin üzerinde alındığında toksik etki meydana getirdiğı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Baghban ve ark., 2014).

Marshall (1983), bakırın kükürt içeren bir metalotioneine bağlanabileceğini ve granüllerin ya bakır detoksifikasyonunun son ürünlerini temsil ettiğini ya da bakır depolarının, misetomal simbiyotlar tarafından enzimlerin ve makromoleküllerin sentezini oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra Huang ve ark. (2012), daha yüksek Cu konsantrasyonlarının protein denatürasyonuna neden olabileceğini ve *S. litura*' da ileri düzeyde disfonksiyona yol açabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca, maruziyetin düşük bir düzeyde devam etmesi halinde, bu metalin birikmesi nedeniyle büyüme üzerinde olumsuz bir etki gözlemlendiğini de ortaya koymuşlardır.

Bu çalışmada, CuSO₄ etkisindeki *G. mellonella* son evre larvalarının orta barsak ve yağ dokusunda CAT aktivitesi artarken hemolenfte azalma meydana gelmiştir. Tüm dokularda SOD aktivitesinde ise azalma meydana geldiğı tespit edilmiştir. GPx aktivitesi hemolenf ve orta barsakta azalmış, buna karşın yağ dokuda artış meydana geldiğı belirlenmiştir. GST aktivitesinde, hemolenf ve orta barsata artış meydana gelmiştir. AChE aktivitesinde ise, tüm dokularda inhibisyon meydana geldiğı tespit edilmiştir.

Ağır metaller de diğer tđm kirleticiler gibi ya direkt organizmalarda reaktif oksijen tđrlerini oluşturarak ya da antioksidan hđcre savunmasını yok ederek oksidatif strese neden olmaktadır (Janero, 1990; Kong ve ark., 2013). Cu canlı organizmalarda Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonlarını katalizleyerek reaktif oksijen tđrlerini oluşturmakta ve oksidatif strese neden olmaktadır (Prousek, 2007). Cu⁺² iyonu direkt olarak negatif yđklđ protein-SH gruplarına bağlanarak, enzimleri denatđre ederek ya da indirekt olarak reaktif oksijen tđrlerini oluşturarak oksidatif strese yol açmaktadır (Ahmad ve ark., 2005; Bopp ve ark., 2008). Tđm organizmalarda ağır metallerin neden olduğu oksidatif stresin zararlı etkileri SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler tarafından etkisiz hale getirilmektedir (Ma ve ark., 2010). Diğer organizmalar gibi bđceklerde de oksijen tđrlerinden kaynaklı oksidatif stres SOD, CAT ve GPx enzimleri tarafından superoksit (O₂^{•-}) radikalini hidrojen peroksite (H₂O₂), ardından H₂O₂'yi de H₂O ve O₂'ye çevirerek yok edilmektedir (Valavanidis ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda bđceklerde metal iyonlarının, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimler dahil olmak úzere detoksifiye edici enzimlerin aktivitelerindeki değişimle ilgili olduğu bildirilmiştir (Kafel ve ark., 2012). Orta barsak ve yağ dokudaki CAT aktivitesindeki artışın, metal etkileşiminin neden olduğu artan oksidatif stres ile ilişkili olabileceği, hemolenfteki azalmanın ise, metalin enzim molekđlđ úzerindeki –SH gruplarına doğrudan bağlanmasıyla ilişkili olabileceği dđřđnđlmektedir. Ayrıca, bđceklerde orta barsak, emilimin meydana geldiği yer olup, metabolik aktivitelerde önemli bir rol oynamaktadır. Sindirim sisteminde metal

etkileşimi olduğunda, barsak hücreleri metalleri biriktirir ve bunların hemolenfe girişini engeller (Ballan-Dufrançais, 2002).

Suganya ve ark. (2016), *Spodoptera litura* larvaları ile yaptığı çalışmada farklı konsantrasyonlardaki Cd ve Pb uygulanması sonucunda yağ dokudaki CAT ve SOD aktivitelerinin artan konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Perić-Mataruga ve ark. (2019) ise, dördüncü evre *Lymantria dispar* larvalarında beyindeki ve orta barsaktaki Cd biyoakümüülasyonunu, oksidatif stresi ve kolinesteraz aktivitesi parametrelerindeki farklılıkları araştırmışlar, sonuç olarak oksidatif stresin belirteci olan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT, GR, GST, APOX, GSH ve SH grupları) ve Cd birikiminin her iki doku içinde artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. Kolinesteraz aktivesi ise beyinde orta bağırsağa göre önemli derecede arttığını belirlemişlerdir. Sun ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *S. litura* larvalarında besine eklenen nikelin GST ve karboksilesteraz aktivitelerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, bakırın *G. mellonella* larvalarında oksidatif strese neden olarak antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir. CuSO_4 tarımsal alanlarda insektisit olarak sıklıkla kullanılmaktadır ve toksik etkisi oksidatif stresin indüksiyonundan kaynaklanmaktadır. Araştırılan metalin etkisindeki uygulamada *G. mellonella* larvalarında antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olduğundan, bu parametrelerin kirlilik belirteci olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, I., Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A. (2005). *Anguilla anguilla* L. Oxidative Stress Biomarkers Responses to Copper Exposure with or Without B-Naphthoflavone Pre-Exposure. *Chemosphere* 61:267-275.
- Alon, M., Alon, F., Nauen, R., Morin, S. (2008). Organophosphate resistance in the B biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 940-949.
- Baghban, A., Sendi, J. J., Zibae, A., Khosravi, R. (2014). Effect of heavy metals (Cd, Cu, and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae). *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 367-373.
- Ballan- Dufrançais, C. (2002) Localization of metals in cells of pterygote insects. *Microsc. Res. Tech.*, 56: 403-420.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., (2008). Copper-Induced Oxidative Stress in Rainbow Trout Gill Cells. *Aquatic Toxicology* 86:197-204.
- Bradford, M., (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Bronksil, J.F. (1961). A Cage to Simplify the Rearing of The Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* (Pylalidae). *Journal of Lepidopteran Society*: 102-4.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretto, G., Landriscina, C., (2004). Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology* 200, 29-38
- Cook, S. M., McArthur, J.D. (2013). Developing *Galleria mellonella* as a Model Host for Human Pathogens. *Virulence* 4(5): 350-53.
- Dallinger R, Berger B, Birkel S. (1992). Terrestrial isopods. Useful biological indicators of urban metal pollution. *Oecologia* 89, 32-41
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, R., (1997). Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of

- Experimental or Field Exposure in the Gills and the Digestive Gland of the Freshwater Bivalve *Unio turnidus*. *Aquatic Toxicology*, 39:93-110.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7:88-95.
- Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L. Do metals inhibit acetylcholinesterase(AChE)? (2005). Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*. 10(5):360-75.
- Fridovich, I. (2013). *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition Superoxide Dismutase*. 2nd ed. Elsevier Inc.
- Gintenreiter S., Ortel J. and Nopp H. J. 1993. Effects of different dietary levels of cadmium, lead, copper, and zinc on the vitality of the forest pest insect *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae, Lepid.). *Arch. Environ. Con- tam. Toxicol.* 25, 62-66.
- Gonzalez-Rey, M. 2014. Effects of Active Pharmaceutical Ingredients Mixtures in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 153: 12–26.
- Greenwald, R. A. (1985). *Handbook Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., (1974). Glutathione-S-transferases, The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249:7130-7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Oxidative Stress: Adaptation, Damage, Repair and Death. In *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: Oxford University Press, 246–350.
- Hong, F.S., (2010). Oxidative Stress in the Brain of Mice Caused by Translocated Nanoparticulate TiO₂ Delivered to the Abdominal Cavity. *Biomaterials*, 31:99-105.
- Hu, H., 2000. Exposure to Metals. *Occupational and Environmental Medicine*, 27: 983-996.

- Huang D, Kong J, Seng Y. 2012. Effects of the heavy metal Cu²⁺ on growth, development, and population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* 105(1):288-94.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. 2018. First Line Defence Antioxidants- Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role in the Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54(4): 287–93.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactivity as Diagnostic Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissue Injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9:515-540.
- Kafel, A., A. Zawisza-Raszka, and E. Szulinska. 2012. Effects of multigenerational cadmium exposure of insects (*Spodoptera exigua* larvae) on antioxidant response in haemolymph and developmental parameters. *Environ. Pollut.* 162: 8 -14.
- Kong, X., Jiang, H., Wang, S., Wu, X., Fei, W., Li, L., Nie, G., Li, X. 2013. Effects of Copper Exposure on The Hatching Status and Antioxidant Defense at Different Develop-Mental Stages of Embryos and Larvae of Goldfish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 92:1458-1464.
- Lange, A.et al. 2018. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announcements* 6(2): 1–2.
- Lawrence, R. A., Burk, R.F. 1976. Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71(4): 952–58.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiology Ecology. *Annual Reviews in Physiology.* 68:253-278.
- Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. 2013. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *Biomed Res Int.* 321213.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42:656-666.

- Maguire, R., Kunc, M., Hyrsl, P., Kavanagh, K. 2017. Analysis of the Acute Response of *Galleria mellonella* Larvae to Potassium Nitrate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 195: 44–51.
- Marshall J, Ottaway JM 1983. Determination of copper in urine by carbon- furnace atomic-emission spectrometry. *Talanta* 30: 571.
- Mascio, P.D., 2007. Oxidative Stress in *Perna perna* and Other Bivalves as Indicators of Environmental Stress in the Brazilian Marine Environment: Antioxidants, Lipid Peroxidation and DNA Damage. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 146:588-600.
- Matés, J.M., 2000. Effects of Antioxidant Enzymes in the Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology. *Toxicology*, 153:83-104.
- McCord, J. M., Fridovich, I. 1969. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *The Journal of biological chemistry* 244(22): 6049–55.
- Nussey, G., 1998. Metal Ecotoxicology of the Upper Olifants River at Selected Localities and the Effect of Copper and Zinc on Fish Blood Physiology. PhD-thesis, Rand Afrikaans University, South Africa, s. 158.
- Perić-Mataruga, V, Ilijin L, Mrdaković M, Todorović D, Prokić M, Matić D, Vlahović M. 2019. Parameters of Oxidative Stress, Cholinesterase Activity, Cd Bioaccumulation in the Brain and Midgut of *Lymantria Dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Caterpillars from Unpolluted and Polluted Forests. *Chemosphere* 218: 416–24.
- Pisoschi, A., Pop A. 2015. The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97: 55–74.
- Prousek, J., 2007. Fenton Chemistry in Biology and Medicine. *Pure and Applied Chemistry*, 79:2325-2338.
- Singh, D., 2010. Morphotaxonomy of Immature Stages of Some Economically Important Pyraloidea (Ditrysia: Lepidoptera) of Punjab. Doctor of Philosophy Thesis, Punjabi University.

- Staerck,C. 2017. Microbial Antioxidant Defense Enzymes. *Microbial Pathogenesis* 110: 56–65.
- Suganya, M., Sengodan, K.,Muthugounder, S. S., 2016. Effect of Cadmium and Lead Exposure on Tissue Specific Antioxidant Response in *Spodoptera litura*. *Free Radicals and Antioxidants* 6(1):90–100.
- Sun, H., 2011. The Effect of Dietary Nickel on the Immune Responses of *Spodoptera litura* Fabricius Larvae. *Journal of Insect Physiology* 57(7): 954–61.
- Tuncsoy, S. B., Ozalp, P. 2016. Combined effects of pyriproxyfen and *Bacillus thuringiensis* on antioxidant activity of hemolymph, midgut and fatbody of *Galleria mellonella* larvae. *Fresenius Environmental Bulletin* 25(5): 1661–66.
- Unfried, K., Albrecht, C., Klotz, L., Mikecz, A.V., Grether-Beck, S., Schins, R.P.F., (2007). Cellular Responses to Nanoparticles: Target Structures and Mechanisms. *Nanotoxicology*, 1(1):52-71.
- Yu, S. J. (2008). *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press Taylor Francis Group, 250 pp.

BÖLÜM 3

TOPRAK BİYOFİLMLERİ VE ROLLERİ

Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK¹ , Prof. Dr. A. Cenap CEVHERİ²

¹ Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: ckucuk@harran.edu.tr .ORCID 0000-0001-5688-5440

² Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: ccevheri@harran.edu.tr. ORCID0000-0002-3759-4645

GİRİŞ

Toprak ekosistemi, sayısız mikroorganizmayı barındırmaktadır (Flemming ve Wuertz, 2019). Çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan toprak biyofilmlerinin, mineral yüzeyler, gözenek boşlukları ve bitki kökleri gibi çeşitli substratlarda kolonileştiği belirlenmiştir (Ramey ve ark., 2004). Doğal ortamlarda, bakterilerin yaklaşık % 99'unun biyofilm matrisinde bulunduğu tahmin edilmektedir (Gutiérrez Castorena ve ark., 2016). Bakteriyel yüzey bileşenleri ve hücre dışı bileşikler [özellikle flagella, lipopolisakkaritler (LPS) ve ekzopolisakkaritler (EPS'ler)], sinyal moleküllerin çoğu bakteri türünde otoagregasyon ve biyofilm gelişiminde oldukça önemli olmuştur (Antoun ve Prevost, 2005; Gobat ve ark., 2004). Biyofilmler, hücrelerin bir yüzeye bağlı hücre dışı polimerik bileşiklerin bir matrisine gömülü olduğu bakteri topluluklarıdır (Gupta ve ark., 2015). Biyofilmlerde yaşamak, bakterilerin zararlı koşullardan korunmasına yardımcı olmakla birlikte, hem hayvanlarda hem de bitkilerde bakteriyel patojenlerin hastalık döngüsünde de önemli bir faktör gibi görünmektedir (Gupta ve ark., 2015).

Bağlanmanın ilk aşamalarına dış zar proteinleri, pili veya LPS'ler aracılık eder. Mikrokolonilerin oluşumundan sonra, olgun bir biyofilm oluşumu için yeteri miktarda sinyallerin üretilmesi gerekir (Weller, 2007). EPS'ler, biyofilmlerin yapılarını oluşturur ve 3 boyutlu yapılarını stabilize eder. Biyofilmler, bakterilerin su, besin, enzim ve sinyal alışverişi yapmasına, potansiyel olarak toksik metabolitleri

atmasına ve gelişmiş metabolik işbirliği sergilemesine izin verir (Gobat ve ark., 2004; Whipps, 2001).

Toprak biyofilmlerinin gelişimi toprağın fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Mikroorganizmalar tarafından salgılanan EPS, mineraller arasında bağlantıyı sağlayarak, toprak mikro agregatlarının iç kohezyonunu da güçlendirmiştir (Lin ve ark., 2016). Böylece, toprak biyofilmleri; çevresel stres altında mikroorganizmaların hayatta kalmasını arttırdığı gibi, toprak mikro ortamlarının şekillendirilmesinde de belirleyici bir rol oynamaktadır. Toprak biyofilmlerinin toprağın aşırı kuruması, aşırı otlatma ve ağır metaller gibi çevresel olumsuzluklara karşı koruyucu özellikleri genel olarak kabul edilmekle birlikte, cevaplanması gereken temel sorular vardır. Örneğin, toprak matrisindeki biyofilm gelişim süreçleri, toprak biyofilm oluşumunun çevresel ve biyolojik belirleyicileri, toprak biyofilmine katkı sağlayan mikroorganizmaların metabolik aktivitesi ile topluluk yapısının etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. Bakteriyel biyofilmler, tarımsal ekosistemler içindeki çeşitli nişlerde bulunur ve bitki kökündeki diğer mikroorganizmalarla başarılı bir şekilde rekabet edebilir. Bakteriler ve mantarlar da toprakta birlikte yaşar ve ortak mikro nişleri paylaşır. Bu bir arada yaşama, yalnızca mikroorganizmanın metabolik faaliyetlerine fayda sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bitki ve ekosistem sağlığına da katkıda bulunmaktadır (Deveau ve ark., 2018). Bakteriyel biyofilm ve bunların etkileşimleri ile ilgili çalışmalar, genellikle biyoteknolojik uygulamalarda ve klinik alanlarda dikkat çekerken (Kenny ve Balskus, 2018; Magana ve ark.,

2018), toprak biyofilmlerinin önemi de son yıllarda büyük ölçüde artmıştır (Bystriansky ve ark., 2019).

Mantar-bakteriyel biyofilmler olarak bilinen mantar yüzeylerine yapışan bakteriyel biyofilmlerin, biyofilm oluşumu olmayan tek veya karışık kültürlerle göre bitki büyümesini, besin alımını ve çevre stresine karşı toleransını artırdığı bildirilmiştir (Hassani ve ark., 2018). Bitki kökleriyle ilişkili bu tür doğal olarak var olan biyofilmler, sadece bitkisel üretimi iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda konukçu bitkiyi farklı çevresel stresler altında da korumuştur (Hassani ve ark., 2018). Bitki için, rizosferde bulunan mikrobiyal topluluk ve biyofilm toplulukları olarak etkileşimlerinin bitki metabolik süreçlerini önemli ölçüde etkilemesi olasıdır. Bu bölümde, toprak bakteriyel biyofilmler, sürdürülebilir tarımda ve verimliliğinin artırılmasındaki rolü, bitki kökleri ile ortak yaşamda bulunan doğal mikrobiyal biyofilmler ilgili çalışmalar özetlenmiştir.

1. TOPRAK BİYOFİMLERİNİN ÖZELLİKLERİ

Toprakta bulunan tüm mikroorganizmaları içeren toprak mikrobiyomu, birçok önemli biyojeokimyasal döngüyü yürüten araç olarak bilinir. Mikrobiyom, besin döngüsünü, toprak verimliliğini koruduğu gibi, toprakta karbon depolamada rol oynamakta olup (Liang ve Balsler, 2011), karasal ekosistemlerdeki bitki ve hayvanların sağlığı üzerinde de doğrudan veya dolaylı bir etkiye sahiptir (Ahmad ve ark., 2017; Fierer, 2017). Doğal ortamdaki mikroorganizmalar sıklıkla biyofilm adı verilen yüzeye bağlı yapılar oluşturur (Flemming

ve ark., 2016). Biyofilmler genellikle bitki kökleri ve kil mineralleri gibi toprak ortamının karbon bakımından zengin yüzeylerini kolonize eder ve kümeler oluşturmak için EPS salgılar (Ma ve ark., 2017; Cai ve ark., 2018). Topraktaki mikroorganizmalar, kendilerinin ürettiği hücre dışı polimerik madde (EPS) ile, toprak parçacıklarına, kökler veya mantar hifleri gibi biyotik yüzeylere bağlanır ve organik materyali ayrıştırır (Flemming ve Wuertz , 2019). Toprak ortamları karmaşık ve dinamik olsa da, biyofilmler bakterileri çevreleyen koşulları stabilize edebilir; avlanma, kuruma ve antibiyotiklere maruz kalmaya karşı koruma sağlarken, besinlerin ve oksijenin içeriğini düzenler, gen transferi için uygun bir niş sağlar (Madsen ve ark., 2012). Topraklarda mikroorganizmalar çeşitlilik gösterir, topraklarda çok sayıda mikro habitatın oluşumu olduğu gibi, zıt nişlerde yaşayan mikroorganizmalar için farklı yaşam alanı bulunmaktadır (Rilling ve ark., 2017). Yapılan bir araştırmada, toprakta mikroorganizmaların bireysel mikroagregatlar şeklinde var olduğu kanıtlanmıştır (Nunan, 2017). Bu mikroagregatlar küçük boyutludur, sadece birkaç yüz hücre ve sınırlı sayıda tür içermekte; diğer mikroagregatlardan birkaç mikrometre ile ayrılmaktadır (Raynaud ve Nunan, 2014). Bu nedenle, tek bir agregat, farklı mikrobiyal topluluk içerebilmektedir (Rillig ve ark., 2017).

Bir toprak biyomunun yaşam döngüsü; katı yüzeylere bağlanma (mineraller ve bitki kökleri gibi), bu yüzeylerin kolonizasyonu, gelişme, olgunlaşma ve hücre dağılımı gibi birkaç aşamaya ayrılabilir (Cai ve ark., 2013). Bağlanma, yüzey yükü, çözünmüş iyonlar ve sıvı

mekaniğinin etkileşimine bağlı fizikokimyasal bir süreçtir (Cai ve ark., 2013). Mikroorganizmalar yüzeyi algıladığında, kolonizasyonu teşvik eden fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir (O'Toole ve Wong, 2016). Bir biyofilm gelişimi sırasında, hücrelerin fizyolojisi farklılaşarak biyokimyasal olarak farklı bir fenotip ve farklı bir form oluşturur. Olgunlaşmada biyofilm yapısı ve bileşimi nispeten karardır. Bununla birlikte, biyofilm içindeki hücreler; besinlerin tükenmesi veya oluşan stres koşullarına karşı biyofilmi dağıtabilen ve hücrelerin dağılmasını tetikleyebilen enzimleri salgılayarak hızla tepki verebilir (Oppenheimer-Shaanan ve ark., 2013). Biyofilm dağılımı sırasında hücreler, aktif veya pasif yollarla biyofilm matrisinden ayrılabilir. Bu ayrılmış hücreler, başka bir bölgede kolonileşebilir ve yeni bir biyofilm döngüsü başlatabilir (O'Toole ve Wong, 2016).

Hücre dışı polimerik matris (EPS), biyofilmdeki etkileşim sırasında mikroorganizmaya stabilite sağlayan biyofilm oluşumunun bağlanma aşamasında oluşur (Jamal ve ark., 2018). EPS, organik madde, ekzopolisakkaritler, proteinler, hücre dışı DNA, nükleik asit, enzim, lipidler vb. bileşiklerden oluşur (Jamal ve ark., 2018). Bakteriyel biyofilm matris oluşumunda yer alan her bir yapısal element, biyofilm oluşumunda ve stabilitesinde belirli bir işleve ve role sahiptir (Fong ve Yıldız, 2015). Ekzopolisakkaritler, mikrobiyal biyofilm oluşumu ve organizasyonu için çok önemlidir. Bu nedenle polisakkaritler, agregatif (hücrelerin yüzeye yapışması), koruyucu (hücreleri antibiyotik penetrasyonundan koruduğu difüzyon bariyeri) ve yapı

(biyofilm oluşum dzenlemesi ve yapısı) olarak kategorize edilir (Lin ve ark., 2016) .

Staphylococcus aureus'ta ekzopolisakkaritlerin varlığında bile biyofilm ile ilişkili proteinlerin biyofilm oluşumunu indüklediği tanımlanmıştır (Shukla ve Rao, 2017). Polisakkaritlerin dışında bir diğer önemli faktör; bakteriler tarafından aktif olarak salgılanan hücre dışı DNA'dır. Yüzeyle ilişkili mikrokolonilerde eDNA'nın ana işlevi bakteriyel bağlanma, stabilizasyon, agregasyon ve olgunlaşmayı sağlamaktır ve eDNA'nın *P.aeruginosa*'da erken biyofilm oluşumunda da gerekli olduğu gösterilmiştir (Chang, 2018). Uygun koşullarda herhangi bir yüzeyle biyofilm oluşumu, tek tek bakteri hücrelerinin etkileşimi ile başlar. Biyofilm matrisindeki üçüncü önemli unsur; pili, lektin, flagella, fimbriae ve şeker bağlayıcı proteinlerdir. Bu yüzeyle proteinlerinin, flagella ve pili'nin, bakteri hücrelerinin yüzeyle ilk yapışmasında ve bazı durumlarda da hücrelere bağlanma yüzeyle kolonize etmesine yardımcı olan göçte rol aldığı bilinmektedir (Fong ve Yıldız, 2015). Matriks proteini, biyofilm matrisinin yeniden dzenlenmesini veya proteinlerin enzimatik özelliklere sahip olması nedeniyle matrisin diğer bileşenlerine doğru parçalanmasını ve dağılmasını sağlar. EPS, matrisin daha uzun süre sulu kalmasına yardımcı olan ve bakteri hücrelerini kurumaya karşı koruyan % 97 sudan oluşmaktadır (Flemming ve ark., 2016).

Biyofilm ile ilişkili bakteriler genellikle birçok avantajlara sahiptir (Kragh ve ark., 2016). Bu biyofilmlerin küçük hacimlerinde, ekolojik olarak önemli biyojeokimyasal süreçler oluşmaktadır (Kragh ve ark.,

2016). Örneğin, bir arada bulunan *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5019 ve *Penicillium* spp. toprakta organik azot ve fosfor mineralizasyonunu artırmış ve aynı türün farklı üyelerini içeren topraklara oranla daha yüksek nitrojenaz aktivitesi göstermiştir (Seneviratne ve Jayasinghearachchi, 2005). Biyofilmlerin içindeki taksonomik gruplar arasındaki tür etkileşimleri de toprak kümelenmesi üzerindeki olumlu etkilerini ortaya çıkarmaktadır (Lehmann ve ark., 2017). Biyofilm kuru kütlelerinin % 80'ini oluşturan EPS, mikroorganizmaları biyotik ve abiyotik streslere karşı korumak gibi toprakta çok sayıda yararlı işlev sağlayabilir (Or ve ark., 2007). Örneğin EPS, kendi ağırlığının 15-20 katı su depolayabildiği için (Chenu ve Roberson, 1996), toprakların su tutma kapasitesini önemli ölçüde artırabilmektedir (Adessi ve ark., 2018). EPS ayrıca, toprağın özelliklerine bağlı olduğu toprak agregatlarının oluşumuna ve stabilitesine de katkıda bulunmaktadır (Bezzate ve ark., 2000).

2.TOPRAK BİYOFİMLERİNDE MİKROBİYAL ETKİLEŞİMLER

Biyofilmlerdeki hücrelerin birbirleriyle etkileşime girdikleri ve pek çok aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (Parsek ve Greenberg, 2005). Bu, hücrelerarası ve içi etkileşimleri, metabolik ürünlerin değişimini ve hücreler arası sinyalleşmeyi içerir (Burmolle ve ark., 2014). Biyofilm topluluklarındaki mikroorganizmaların çeşitliliği nedeniyle, biyofilmlerdeki etkileşimler her zaman çeşitli ve dinamiktir, toprak biyofilmlerinin oluşumunda ve işlevinde önemli roller oynar (Adessi ve ark., 2018).

Doğadaki mikroorganizmalar tek başlarına var olmama eğilimindedir ve bir biyofilm oluşturmak için işbirliği yapabilirler (Faust ve Raes, 2012). Biyofilmlerin oluşumu, çevresel streslere karşı korumaya elverişlidir, bu da mikroorganizmaların, olumsuz yaşam koşullarıyla birlikte başa çıkabilen çok türlü biyofilmler oluşturmak için işbirliği yapabileceklerini işaret etmektedir (Burmolle ve ark., 2007; Ren ve ark., 2015). Örneğin, Burmolle ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada; *Pseudomonas putida* SB5'in *Chryseobacterium* sp tarafından biyofilm oluşumunu teşvik edebileceği belirlenmiştir. Başka bir çalışma, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Xanthomonas retroflexus*, *Microbacterium oxydans* ve *Paenibacillus amylolyticus* içeren dört türün biyofilmin de *Xanthomonas retroflexus* baskın rol oynadığı, diğer suşların biyofilmlerinin oluşumunda da etkili olduğu saptanmıştır (Ren ve ark., 2015).

Rizosfer, biyofilm oluşturabilen ve bitki gelişimi, besin döngüsü, bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde etkili ve biyoremediasyon gibi önemli süreçlerde yer alan bitkiye yararlı bakteriler tarafından kolonize edilir (Shaikh ve ark., 2018; Velmourougane ve ark., 2019). Rizosfer biyofilmlerinin işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Belirli toprak uygulamaları ile rizosferdeki biyofilmlerin rollerini açıklığa kavuşturmak için metagenomik yaklaşımların kullanarak daha fazla çalışmanın yapılmasının gerekli olduğu açıklanmıştır (Schmeisser ve ark., 2017).

Bitki mikrobiyomundaki önemli mikrobiyal simbiyont grubu, bitki büyümesi ile birlikte toprak kalitesinin iyileştirilmesinin yanı sıra

hemen hemen tüm ekosistemlerde bitkilerin iyileştirilmesine yardımcı olan arbusküler mikorizal mantarlar (AMF) ve ektomikorizal mantarlardır (EMF) (Guennoc ve ark., 2018). Rizosferde biyofilm oluşturan bakteriler; bu mantarların sporlarında veya mikorizal yapıların yüzeyinde de bulunabilmektedir (Torres-Cortés ve ark., 2015). Mikoriza ile ilişkili bakterilerin, kök gelişiminde rol oynadığı; kök ve AMF arasındaki tanıma sürecine katkı sağlayarak, sporülasyonu, miselyal oluşumunu ve büyümesini uyardığı, antagonistik maddelere karşı korumayı teşvik ettiği, fosfat çözünürlüğü, azot fiksasyonu, antibakteriyel veya antifungal özellikleri teşvik ettikleri bildirilmiştir (Wagner ve ark., 2019). Bu bakteriler, mantar yapılarını değiştirerek veya bakteri-mikoriza etkileşimi ve sinyalleşmede önemli bir rol oynarken, sitrik ve maleik asidi karbon kaynağı olarak sağlayarak AMF'nin gelişimini teşvik etmektedir (Kannan ve ark., 2011). Bununla birlikte, bu tür bakteriler mikorizal simbiyoz tipine bağlı olmadıkları için spesifik değildir. *Bacillus megatarium*, *Bacillus* sp.'nin mikorizal türlerden *Gigaspora margarita*'nın gelişimini teşvik ettiği (Budi ve ark., 2012), *Paenibacillus validus* ve *Rhizobium tropici*'nin *Glomus intraradices*'in hif gelişimini arttırarak simbiyotik etkileşime katkı sağladığı (Hildebrandt ve ark., 2005), *Pseudomonas fluorescens*'in ise *Glomus mosseae*'in bitki kök kolonizasyonunda rol oynadığı (Pivato ve ark., 2009) yapılan çalışmalarda açıklanmıştır.

3. BİTKİLERLE İLİŞKİLİ HABİTATLARDA BİYOFİMLER

Rizosfer, bitki köklerinden ve topraktaki sızıntılarından etkilenir, bakteriler tarafından kolonize edilir. Rizobakterilerin bitki kökleriyle ilişkisi, bitki kök yüzeyleri ile ilişkili mikroorganizmaların (*Psuedomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* ve *Paenibacillus* vb.) hücrelere yapışmasına, mikrokolonilerin oluşumuna ve etkileşimlerine bağlıdır (Jung ve ark., 2018; Velmourougane ve ark., 2017). Bitki köklerinde biyofilm oluşumu, besin ve su varlığı ile bakteri-bakteri etkileşimleri gibi sinyallerle de başlatılabilir, stresli koşullar altında da oluşturulabilir (Zuniga ve ark., 2017). Kök yüzeyinin özellikleri köklerin uzunluğu boyunca değişiklik gösterir. Biyofilm oluşumunun, farklı yerlerde kökler tarafından salınan eksüdatlar ve besinlerden etkilendiği rapor edilmiştir (Timmusk ve ark., 2005). Metallerle kirli topraklardaki yonca kök bölgesinden izole edilen ve biyofilm oluşturan *Proteus* sp., *Pseudomona* sp., *Ensifer meliloti* 'nin metal kontamineli toprakların remediasyonunda kullanılabileceği yapılan bir araştırmada açıklanmıştır (Raklami ve ark., 2019). Ansari ve Ahmad (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise; *Pseudomonas entomophila* tarafından oluşturulan biyofilmin abiyotik strese karşı buğdaya toleranslılık kazandırdığı belirlenmiştir. Ayrıca *Azotobacter chroococcum*-*Anabaena* ortaklığınca üretilen biyofilm oluşumunun bitki gelişimini arttırdığı rapor edilmiştir (Prasanna ve ark., 2011).

Bitkiler genellikle doğal ekosistemde karşılıklı bir etkileşim içinde AMF ile birliktelik oluştururlar. Bu simbiyotik birliktelikte; mikoriza bitkiler tarafından salınan fotosentatın yaklaşık % 20'sini tüketir,

karşılığında konukçu bitkiye su ve besin sağlar (Wipf ve ark., 2019). Bu organizmalar kök bölgesinin yakınında bulduklarından, bitki gelişimini ve büyümesini desteklerken besin maddelerinin emilimini artırmaya yardımcı olduklarından, biyogübreleme olarak kullanılırlar (Wipf ve ark., 2019).

AMF'nin hifleri, mikroorganizmalar için tercih edilen bir mikro habitat olabilir ve birçok bakteri, mantar hif yüzeyini farklı oranlarda kolonize edebilir, biyofilmler oluşturabilir (Frey - Klett ve ark., 2011). Bunun nedeni büyük olasılıkla, hiflerin zengin bir besin bölgesi olmasının yanı sıra, hif filmi boyunca göç ederek veya biyofilmlerdeki hif uçlarını büyüterek uzaktaki besinlere ulaşmada "güvenli yol" görevi görebilmesinden kaynaklanmaktadır (Ghignone ve ark., 2018). AMF'de biyofilm oluşumu sadece bakterilere besinler sağlamakla kalmaz, aynı zamanda bakterilere avcılardan ve streslerden uzakta güvenli bir niş sağlayarak onlara avantajlar da sağlayabilir (Guennoc ve ark., 2018). Dış mikorizal hifler, bitki konağının fizyolojisini ve kök eksüdasyon modelini değiştirerek toprakta bulunan bakterilerle doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girer. AMF'yi kolonize eden bitki ile bazı bakteri türleri arasındaki bu tür "üçlü" ilişkilerde çok yüksek özgüllük vardır, çünkü farklı türler belirli mikoriza varlığına değişken şekilde yanıt verir (Ghignone ve ark., 2012). Farklı bakteri suşları, sporlar ve hifler gibi çeşitli mantar yapılarıyla etkileşime girebilir ki bu ilişkiler, kolonize bitki kökünde biyofilm formunda korunabilir. Bu bakteriler, biyofilm şeklinde sporun yüzeyinde veya sporun sitoplazması içinde endobakteriler olarak bulunur (Taktek ve

ark., 2017). Mantar-bakteri ilişkisi, hem mantar türlerine hem de kolonizasyon bölgesine göre seçici olabilir (Agnolucci ve ark., 2019). Bakteriler, besin kaynağını keşfetmek ve daha önce erişilemeyen besin alanlarına ulaşmak için mantar yüzeyinde koloni oluştururlar (Agnoluccik ve ark., 2019).

AMF sporu ve spor duvarlarıyla ilişkili kültürlenebilir bakterilerin izole edildiği ve çeşitli izolatların tanımlandığı rapor vardır (Magallon-Servuin ve ark., 2019). Sporla ilişkili bakterilerin yanı sıra mikoriza, sitoplazmalarında endobakterilere de ev sahipliği yapar (Torres-Cortes ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2014). Mikoriza ilişkili bakterilerin çoğu, azot ve fosfor gibi besin maddelerinin varlığını artırmış; fitohormonlar, sideroforlar, indol asetik asit üretmiş ve fungal patojenlerine karşı direnç sağlamışlardır (Agnolucci ve ark., 2015). Ayrıca, mikorizosfer bakterilerinin spor çimlenmesini, hif genişlemesini iyileştirdiği, mikorizal aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (Agnolucci ve ark., 2019). Mikoriza (EMF veya AMF) ile ilişkili bakteriler, mikorizal yapılarla biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir (Deveau ve Labbe, 2017; Guennoc ve ark., 2018).

Aşırı derecede kirlenmiş topraklardan (petrol hidrokarbonları), çok çeşitli AMF tanımlanmış, *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Massilia* sp. ve *Methylobacterium* sp. ise AMF ile ilişkili bakteriler olarak tanımlanmıştır. Bu bakteriyel türler AMF propagülleriyle biyofilmler oluşturmuştur (Iffis ve ark., 2014). Bir havuç kökünde *P.fluorescens*'in, arbusküler mikorizal mantar olan *Glomus intraradis*'in miselleri üzerinde biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir

(Bianciotto ve ark., 2001). Hem bakteri hem de AMF, konakçı köklerle doğrudan etkileşime girerek bitki büyümesini uyarmıştır, mikorizal mantarların ve bakterilerin bitki sağlığı üzerindeki sinerjistik etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Revillini ve ark., 2016). Son çalışmalar, mikorizal mantarların ve bakterilerin bitkiler üzerinde olumlu sinerjistik etkileri olduğunu göstermiştir (Magallon-Servin ve ark., 2019). Mısır mikorizosferinde bulunan bakteriyel biyofilmler, fosforu çözmüş ve konakçı büyümesini artırmıştır (Magallon-Servin ve ark., 2019). Mısır mikorizosferindeki *G.margarita*'nın spor yüzeylerinde *Bacillus* sp., *Bacillus thuringiensis* ve *Paenibacillus*'un rizosfer suşlarının oluşturduğu biyofilm, toprak kaynaklı bitki patojenlerini inhibe ettiği gibi, fosfor çözünürlüğü, etilen üretimi, nitrojenaz aktivitede artış sağlamıştır (Cruz ve Ishii, 2012). *Rhizobium miluonense* ve *Burkholderia anthina* suşlarının *Rhizoglossum irregulare* yüzeyine güçlü bir şekilde yapıştığı ve fosfatı çözebildiği gözlemlenmiştir (Taktek ve ark., 2017).

4.TARIM BİYOTEKNOLOJİSİNDE BİYOFİLM FONKSİYONLARI

Toprak rizosferinde oluşan biyofilmler, aynı zamanda mikrobiyal toplulukları da şekillendirirler (Hassani ve ark., 2018). Biyofilm üreten bakterilerden üretilen ürünlerin bitkiyi yalnızca çeşitli çevre ve toprak kaynaklı hastalıklara karşı değil, aynı zamanda tuzluluk, kuraklık, inorganik ve organik kirleticiler gibi abiyotik streslere karşı koruyarak potansiyel olarak verimliliğini artırabildiği açıklanmıştır (Malusave ve ark., 2012). Rizosferdeki biyofilmlerin, stres altında kök

eksüdasyon tepkisini teşvik edebilen mikrobiyal biyokütle ile birlikte su stabilitesini iyileştirmede de katkı sağladığı belirlenmiştir (Kasim ve ark., 2016). Toprakta organik kirleticilerin ve ağır metallerin biyolojik olarak parçalanması biyofilm varlığında sağlanabilmiştir. Çünkü bu tür yapılar matrisin varlığı nedeniyle zorlu ortamlara karşı bozulmadan kalabilmiştir (Kasim ve ark., 2016). Faydalı bakteriyel biyo filmler aşı olarak, bitki gelişimini ve büyümesini teşvik etmek için toprakta veya toprak üstü kısımlara sprey şeklinde doğrudan bitkilere uygulanabilir (Hettiarachchi ve ark., 2014).

Mantar varlığında metabolik işbirliği ise, mantar yüzeyine bakteri yapışması için fungal sızıntıların bakterilerce kullanılması nedeniyle toprakta yeni bakteri nişlerinin oluşmasında önemlidir (Deveau ve ark., 2018). Bakteriler ve mantarlar arasındaki metabolik işbirliği, biyo filmi oluşturan mikroorganizmalara, özellikle bakteri türleri için daha fazla koruma sağlar (Deveau ve ark., 2018). Mikorizal bitkilerde meydana gelen bitki-mikroorganizma etkileşimleri, mikorizalaşmayı artırmaya ve çevresindeki mikrobiyal popülasyon çeşitliliğini doğrudan etkilemeye yardımcı olmuştur (Guennoc ve ark., 2018). Bu nedenle, bu tür etkileşimler sadece bitki büyümesine katkı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda besin döngüsündeki artışla toprak kalitesini de artırmaktadır (Velmourougane ve ark., 2017). Bitki büyümesi ve toprak sağlığı üzerinde daha fazla olumlu etkiye sahip polisakkaritler ve biyoaktif bileşikler üretebileceklerinden, çok sayıda türden biyo filmlere daha fazla odaklanılmalıdır.

SONUÇ

Doğal ortamlarda, bitki kökleri ile ilişkili bulunan çok sayıda mikrobiyal topluluk vardır ve bu üç yönlü bitki-mantar-bakteriyel biyofilm simbiyotik birlikteliği bitkilerin var oluşundan beri süregelmiştir. Çeşitli sinyalleşmeler, doğadaki mikrobiyal topluluklar tarafından bitkileri etkilemek için kullanılmaktadır ve bunların anlaşılmasının, tarımsal üretkenliği artırmak için gelecekteki çalışmalar üzerinde etkili olacağı belirgin hale gelmiştir (Mhlongo ve ark., 2018). Yeni nesil dizileme ve metagenomik yaklaşımlar gibi yeni teknolojilerin kullanılması, araştırmacıların bitkilerle ilişkili mikrobiyal toplulukların fizyolojik potansiyellerini açıklamaya yardımcı olan mekanik bir analizini gerçekleştirmelerine olanak tanır. Bu tür bilgiler, rizosfer bölgesindeki mikrobiyal süreçleri ve etkileşimlerin anlaşılmasına da yardımcı olur (Knief, 2014). Toprak biyo-film-leri, mikroorganizmalar için de avantajlar sunar. Toprakta biyofilm gelişimi, organizasyonu ve mikrobiyal etkileşim mekanizmaları üzerine yapılacak çalışmalar, çevresel, tarımsal veya biyoteknolojik alanlarda toprak mikroorganizmalarının yönetimi için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Uygun floresan etiketler ve görüntüleme teknikleriyle birleştirilmiş cihazlar, bu karmaşık mikro çevrenin mikro ölçekli ekolojisini açıklayabilir (Cai ve ark., 2019). Tarım sektöründe, biyogübre olarak kullanılacak biyo-film-lerinin önemli potansiyel faydaları olabilir. Bu tür yenilikçi çevre dostu ürünler, geleneksel kimyasal bazlı gübrelerin yetersizliklerinin üstesinden gelme potansiyeline sahiptir. Bitki ve biyofilm arasındaki etkileşimin daha

iyi anlaşılması, topraktaki fungal-bakteriyal biyofilmlerin ve biyogübre olarak kullanılacak biyofilmlerin verimliliğın artmasına yardımcı olacaktır. Bitkiler ve doğal olarak ilişkili mikroorganizmalar arasındaki ortak yaşam ve patogenez derinlemesine incelenirken, mikrobiyal biyofilmlerin bitki büyümesi, sağlığı ve hastalıklar üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Adessi, A., de Carvalho, R. C., De Philippis, R., Branquinho, C., da Silva, J. M. (2018). Microbial extracellular polymeric substances improve water retention in dryland biological soil crusts. *Soil Biology & Biochemistry*, 116, 67–69
- Ahmad, I., Khan, M. S., Altaf, M. M., Qais, F. A., Ansari, F. A., Rumbaugh, K. P. (2017). Biofilms: an overview of their significance in plant and soil health. In: Ahmad, I., Husain, F.M. (Eds.), *Biofilms in Plant and Soil Health*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–25
- Agnolucci, M., Turrini, A., Giovannetti, M. (2019). Molecular and functional characterization of beneficial bacteria associated with AMF spores. In *Methods in Rhizosphere Biology Research* ed. Reinhardt, D. and Sharma, A. K. pp. 61–79. Singapore: Springer.
- Ansari, F. A., Ahmad, I. (2018). Biofilm development, plant growth promoting traits and rhizosphere colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: a promising PGPR. *Adv Microbiol.*, 8, 235–251
- Antoun H., Prevost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, Z.A. Siddiqui (Eds), *PGPR: biocontrol and biofertilization*, Springer, Dordrecht, pp 1–38.
- Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O., Heulin, T. (2000). Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 2, 333–342.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P., Perotto, S. (2001). Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Mol Plant Microbe Interact.*, 14, 255–260.
- Budi, S. W., Bakhtiar, Y., May, N. L. (2012). Bacteria associated with arbuscula mycorrhizal spores *Gigaspora margarita* and their potential for stimulating

- root mycorrhizal colonization and neem (*Melia azedarach* Linn) seedling growth. *Microbiol Indones*, 6, 180–188.
- Burmolle, M., Hansen, L. H., Sorensen, S.J. (2007). Establishment and early succession of a multispecies biofilm composed of soil bacteria. *Microbial Ecology*, 54, 352–362.
- Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., Sorensen, S. J. (2014). Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in Microbiology*, 22, 84–91.
- Bystriansky, L., Hujsova, M., Hrselova, H., Rezacova, V., Nemcova, L., Simsoaa, J. (2019). Observations on two microbial life strategies in soil: planktonic and biofilm- forming microorganisms are separable. *Soil Biol. Biochem.*, 136, 107535.
- Cai, P., Sun, X., Gao, C., Mortimer, M., Holden, P.A., Redmile-Gordon, M., Huang, Q. (2019). Soil biofilms: microbial interactions, challenges, and advanced techniques for *ex-situ* characterization. *Soil Ecol. Lett.*, 1, 85-93.
- Cai, P., Huang, Q., Walker, S. L. (2013). Deposition and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on clay minerals in a parallel plate flow system. *Environmental Science & Technology*, 47, 1896–1903.
- Cai, P., Liu, X., Ji, D., Yang, S., Walker, S.L., Wu, Y., Gao, C., Huang, Q. (2018). Impact of soil clay minerals on growth, biofilm formation, and virulence gene expression of *Escherichia coli* O157:H7. *Environmental Pollution*, 243, 953–960.
- Chang, C.Y. (2018). Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.*, 8, 2671.
- Chenu, C., Roberson, E. B. (1996). Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. *Soil Biology & Biochemistry*, 28, 877–884.

- Cruz, A.F., Ishii, T. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Biol Open*, 1, 52–5
- Deveau, A., Labble, J. (2017). Mycorrhiza helper bacteria. In *Molecular Mycorrhizal Symbiosis* ed. Martin, F. Hoboken, N. J: John Wiley & Sons. pp. 437–440.
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervee, V. (2018). Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiol Rev.*, 42, 335–352.
- Faust, K., Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews. Microbiology*. Vol. 10, pp.538–550.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, 15, 579–590.
- Flemming, H.C., Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 17, 247–260.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, 14, 563–575.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 75, 583–609.
- Fong, J.N.C., Yildiz, F.H. (2015). Biofilm matrix proteins. *Microbiol Spectr.*, 3, 1–27.
- Ghignone, S., Salvioli, A., Anca, I., Lumini, E., Ortu, G., Petiti, L., Cruveiller, S., Bianciotto, V. (2012). The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions. *ISME J.*, 6, 136–145.
- Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. (2004). *The living soil. Fundamentals of soil science and soil biology*, Lausanne, Suisse: science publisher Inc., USA.

- Guennoc, C. M., Rose, C., Labbe, J., Deveau, A. (2018). Bacterial biofilm formation on soil fungi: a widespread ability under controls. *FEMS Microbiol Ecol.*, 94, 1-26.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi S.K., Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture, *J Microb Biochem Technol.*, 7, 96–102.
- Gutiérrez Castorena, E.V., Gutiérrez-Castorena, M.d.C., González Vargas, T., Cajuste Bontemps, L., Delgadillo Martínez, J., Suastegui Mendez, E., Ortiz Solorio, C.A. (2016). Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma*, 279, 11–21.
- Hassani, M.A., Duruan, P. and Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome*, 6,1-17.
- Hettiarachchi, R. P., Dharmakeerthi, R.S., Jayakody, A. N., Seneviratne, G., de Silva, E., Gunathilake, T., Thewarapperuma, A. (2014). Effectiveness of fungal bacterial interactions as biofilmed biofertilizers on enhancement of root growth of Hevea seedlings. *J Environ Prof Sri Lanka*, 3, 25–40.
- Hildebrandt, U., Ouziad, F., Marner, F.J., Bothe, H. (2005). The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. *FEMS Microbiol Lett.*, 254, 258–267.
- Iffis, B., St-Arnaud, M., Hijri, M. (2014). Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett.*, 358, 44–54.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc.*, 81, 7– 1
- Jung, B. K., Hong, S. J., Park, G.S., Kim, M. C., Shin, J.H. (2018). Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while

- producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Appl Biol Chem.*, 61, 173–180.
- Kannan, V.R., Suganya, S., Solomon, E.K., Balasubramanian, V., Ramesh, N., Rajesh, P. (2011). Analysis of interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and their Helper bacteria by MILPA model. *Res Plant Biol.*, 1, 48–62.
- Kasim, W.A., Gaafar, R.M., Abou-Ali, R.M., Omar, M.N., Hewait, H.M. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Ann Agric Sci.*, 61, 217–227.
- Kenny, D. J., Balskus, E. P. (2018). Engineering chemical interactions in microbial communities. *Chemical Society Reviews*. Vol.47, pp. 1705– 1729.
- Knief, C. (2014). Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Front Plant Sci*. Vol. 5, p.216.
- Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E.L., Irie, Y., Jensen, P.O., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V., Bjarnsholt, T. (2016). Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *MBio.*, 7, e00237–e16.
- Lehmann, A., Zheng, W., Rillig, M.C. (2017). Soil biota contributions to soil aggregation. *Nature Ecology & Evolution*, 1, 1828–1835.
- Liang, C., Balsler, T.C. (2011). Microbial production of recalcitrant organic matter in global soils: implications for productivity and climate policy. *Nature Reviews. Microbiology*. 9, 75.
- Lin, D., Ma, W., Jin, Z., Wang, Y., Huang, Q., Cai, P. (2016). Interactions of EPS with soil minerals: a combination study by ITC and CLSM. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 138, 10–16.
- Ma, W. T., Peng, D. H., Walker S.L., Cao, B., Gao, C. H., Huang, Q. Y., Cai, P. (2017). *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *Biofilms and Microbiomes*, 3, 4.
- Madsen, J. S., Burmolle, M., Hansen, L. H., Sorensen, S.J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65, 183– 195.

- Magallon-Servun, P., Antoun, H., Taktek, S., Bashan, Y., de-Bashan, L. (2019). The maize mycorrhizosphere as a source for isolation of arbuscular mycorrhizae-compatible phosphate rock-solubilizing bacteria. *Plant Soil*, 1, 1–18.
- Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C. A., Ball, A. R., Magiorkinis, E., Chatzipanagiotou, S., Hamblin, M. R., Hadjifran- giskou, M., Tegos, G. P. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*, 31, e00084–e16.
- Malusave, E., Sas-Paszt, L., Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *Sci World J.*, 4, 1-12.
- Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Madala, N. E., Labuschagne, N., Dubery, I. A. (2018). The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Front Plant Sci.*, 9, 1-17.
- Nunan, N. (2017). The microbial habitat in soil: scale, heterogeneity and functional consequences. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180, 425–429.
- O’Toole, G. A., Wong, G. C. (2016). Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 139–146.
- Oppenheimer-Shaanan, Y., Steinberg, N., Kolodkin-Gal, I. (2013). Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends in Microbiology*, 21, 594–601.
- Or, D., Phutane, S., Dechesne, A. (2007). Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils. *Vadose Zone Journal*, 6, 298–305.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13, 27–33
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P., Berta, G. (2009). Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81–90

- Prasanna, R., Pattnaik, S., Thankappan, S., Nain, L. (2011). Development of cyanobacterium-based biofilms and their in vitro evaluation for agriculturally useful traits. *Folia Microbiologica*, 56, 49-58.
- Raklami, A., Oufdou, K., Tahiri, A.I., Mateos-Naranjo, E., Navarro-Torre, S., Rodriguez-Llorente, I.D., Meddich, A., Redondo-Gomez, S. (2019). Safe cultivation of *Medicago sativa* in metal-polluted soils from semi-arid regions assisted by heat- and metallo-resistant PGPR. *Microorganisms*, 7, 212.
- Ramey, B.E., Koutsoudis, M., von Bodman, S.B., Fuqua, C. (2004). Biofilm formation in plant-microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7, 602-609.
- Raynaud, X., Nunan, N. (2014). Spatial ecology of bacteria at the microscale in soil. *PLoS One*, 9, e87217.
- Ren, D., Madsen, J. S., Sørensen, S. J., Burmolle, M. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME Journal*, 9, 81-89.
- Revillini, D., Gehring, C.A., Johnson, N.C. (2016). The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant soil feedback systems. *Funct Ecol.*, 30, 1086-1098.
- Rilling, M.C., Muller, L.A., Lehmann, A. (2017). Soil aggregates as massively concurrent evolutionary incubators. *ISME Journal*, 11, 1943-1948.
- Schmeisser, C., Krohn-Molt, I., Streit, W.R. (2017). Metagenome analyses of multispecies microbial biofilms: first steps toward understanding diverse microbial systems on surfaces. In *Functional Metagenomics: Tools and Applications* ed. Charles, T., Liles, M. and Sessitsch, A.. Cham: Springer, pp. 201-215.
- Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H.S. (2005). A rhizobial biofilm with nitrogenase activity alters nutrient availability in a soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 1975-1978.
- Shaikh, S.S., Wani, S.J., Sayyed, R.Z. (2018). Impact of interactions between rhizosphere and rhizobacteria: a review. *J Bacteriol Mycol.*, 5, 1058.

- Shukla, S.K., Rao, T.S. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. Indian J Med Res., 146, 1–8.
- Taktek, S., St-Arnaud, M., Piche, Y., Fortin, J.A., Antoun, H. (2017). Igneous phosphate rock solubilization by biofilm-forming mycorrhizobacteria and hyphobacteria associated with *Rhizoglyphus irregularis* DAOM 197198. Mycorrhiza, 27, 13–22.
- Timmusk, S., Grantcharova, N., Wagner, E.G.H. (2005). *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. Appl Environ Microbiol., 71, 7292–7300.
- Torres-Cortes, G., Ghignone, S., Bonfante, P., Schußler, A. (2015). Mosaic genome of endobacteria in arbuscular mycorrhizal fungi: transkingdom gene transfer in an ancient mycoplasma-fungus association. Proc Natl Acad Sci., 112, 7785–7790.
- Velmourougane, K., Prasanna, R., Saxena, A.K. (2017). Agriculturally important microbial biofilms: present status and future prospects. J Basic Microbiol., 57, 548–573.
- Velmourougane, K., Prasanna, R., Chawla, G., Nain, L., Kumar, A., Saxena, A. K. (2019). *Trichoderma-Azotobacter* biofilm inoculation improves soil nutrient availability and plant growth in wheat and cotton. Journal of Basic Microbiol., 59, 632-644.
- Wagner, K., Krause, K., Gallegos-Monterrosa, R., Sammer, D., Kovuacs, A.T., Kothe, E. (2019). The ectomycorrhizospheric habitat of Norway spruce and *Tricholoma vaccinum*: promotion of plant growth and fitness by a rich microorganismic community. Front Microbiol., 10, 1-14.
- Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., Courty, P.E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. New Phytol., 223, 1127–1142
- Weller, D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years, Phytopathology, 97, 250–256.
- Whipps, J.M. (2001). Microbiol Interaction and biocontrol in the rhizosphere, J Exp Bot., 52, 487–511.

- Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., Zhang, R. (2014). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant Soil*, 374, 689–700.
- Zuniga, A., Donoso, R.A., Ruiz, D., Ruz, G.A., Gonzalez, B. (2017). Quorum-sensing systems in the plant growthpromoting bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN exhibit cross-regulation and are involved in biofilm formation. *Mol Plant Microbe Interact.*, 30, 557–565.

BÖLÜM 4

MIKROALG BAZLI BIYOGÜBRELER

Dr. Öğr. Üyesi Gökşal SEZEN¹ , Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK²

¹ Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
e-mail: sezen@harran.edu.tr .ORCID 0000-0001-9054-851X

² Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: ckucuk@harran.edu.tr .ORCID 0000-0001-5688-5440

GİRİŞ

"Mikroalg" terimi, öncelikle hem deniz hem de tatlı su ortamlarında çok yaygın olan sucul mikroskobik algler ve siyanobakteriler için kullanılmaktadır (Priyadarshani ve ark., 2011). Mikroskobik alglerin aksine siyanobakteriler, oksijenik fotosentez yapabilen gram negatif fotosentetik prokaryotlardır (Singh ve ark., 2016). Bazı siyanobakterilerin heterosistler olarak bilinen özel yapıları vardır; bunlar azot fiksasyonundan sorumludur. Mikroalgler, önemli miktarda karbonhidrat, lipit ve yağ asitleri içerir. Bazı mikroalg türleri, zarf veya kılıf olarak bilinen hücrelerini kaplayan hücre dışı polisakkaritlere sahiptir. Azot fiksasyonunda rol oynayan siyanobakterilerin, bitkilerin besin döngüsünde de önemli olan ve büyümeyi destekleyen vitaminler, organik asitler ve antagonistik maddeler ürettiği bilinmektedir (Singh ve ark., 2016). Ayrıca ürettikleri polisakkarit yapıları ile toprağın gözenek boyutu ve su tutma kapasitesi gibi fiziksel özelliklerini de iyileştirdikleri bildirilmiştir (Singh ve ark., 2016).

Mikroalgler esas olarak açık sistemlerde (açık havuzlar, yuvarlanma yolu havuzları ve tanklar) veya kapalı sistemlerde (tüp, düz ve kolon, foto-biyoreaktörler) yetiştirilir (Wang ve ark., 2012; Kumar ve Singh, 2016). Açık sistemlere göre kapalı sistemler, büyüme koşulları ve çevresel faktörler açısından daha iyi kontrol sağlar; bu sistemler belirli türlerin başarılı bir şekilde yetiştirilmesine yardımcı olur. Bununla birlikte, açık yetiştirme sistemleri, atık su kullanılması durumunda

daha iyi alternatif olabilir ve atık suda birçok mikroalgal türünün yetiştirilmesi için daha düşük enerji maliyetlerine sahiptir.

Mikroalgler, yeterli miktarda azot (üre, amonyum veya nitrat), fosfor, karbon (organik veya inorganik) ve diğer eser elementlere sahip oldukları için evsel, belediye, su ürünleri yetiştiriciliği, süt ürünleri veya endüstriyel gibi çeşitli atık sularda yetiştirilebilir. Atık su arıtımı için mikroalg kullanımı, sadece verimli atık su biyoremediasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda biyogübreler (Singh, 2015), biyoyakıt (Kumar ve ark., 2018) için mikroalgal biyokütle üreten düşük maliyetli ve sürdürülebilir bir endüstriyel üretim sistem sunabilir (Kumar ve ark., 2017). Kanalizasyon arıtma tesisleri ve atık su arıtma tesisleri ile atık suda mikroalgal yetiştirme gibi tesisler entegre edilebilir (Kumar, 2017).

Mikroalgal yetiştirme için atık su arıtmanın faydaları vardır; bunlar; su ve besinin geri kazanımı yoluyla atık suyun çevresel ve ekonomik değerini iyileştirir, tarımsal ve endüstriyel amaçlar için kullanılacak büyük hacimlerde su sağlar, biyogübreler, biyoyakıtlar ve endüstriler için diğer katma değerli ürünler için mikroalgal biyokütlenin yetiştirilmesine izin verir; atık su arıtımı sırasında kanalizasyon ve atık su arıtma tesisleri tarafından üretilen CO₂'yi yakalayarak karbon ayak izini azaltır (Kumar ve ark., 2018; Priyadarshani ve ark., 2011).

1. BİYOGÜBRE OLARAK MİKROALG

Mikroalglerin birçok yönü, onları, azot fiksasyonu, bitki büyümesini teşvik etmek için çeşitli maddelerin üretimi ve toprağın fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesi gibi potansiyel bir biyogübre varlığı yapar. Siyanobakterilerin, atmosferik azotu diazotrofi olarak bilinen biyolojik olarak yararlı bir forma (yani amonyak) sabitlediği bilinmektedir. Bazı siyanobakteriyel suşlar, azot fiksasyonu için nitrojenaz enzimi içeren özel kalın duvarlı hücrelere, yani heterosistlere sahiptir. Bu heterosistoz siyanobakteriler, aerobik fotodiazotroflardır ve tarım alanlarını özellikle de çeltikleri doğal olarak inhibe ederler (Singh ve ark., 2016). Siyanobakterilerin çeltik tarlalarına yaklaşık 20-30 kg N / ha azot katkısında bulunabileceği tahmin edilmektedir (Issa ve ark., 2014). *Trichormus variabilis*, *Desmonostoc muscorum*, *Aulosira fertilissima* ve *Tolypothrix tenuis* gibi diazotrofik siyanobakteriler, çeltik için biyo-aşılama olarak kullanılabilir.

Anabaena-Azolla eğrelti otu simbiyotik birlikteliğinin, mevsimde 60 kg N / ha'ya kadar azot katkısı yaptığı ve ayrıca toprağa önemli miktarda organik madde sağladığı açıklanmıştır (Moore, 1969). Siyanobakteriyel biyogübreler, çeltik yetiştiriciliği için azotlu gübrelerin yerine Çin, Vietnam, Hindistan vb. Asya ülkelerinde çok sık kullanılmaktadır (Lumpkin ve Plucknett, 1982). Çeltikler, siyanobakterilerin büyümesi için güneş ışığı, su, sıcaklık, nem ve besin maddelerine ihtiyaçları gibi uygun koşullar sunar (Kumar ve ark., 2018b). Bununla birlikte, yüksek seviyelerde azot varlığı,

siyanobakterilerin büyümesi ve azot fiksasyon yeteneğini inhibe etmektedir. Mikrobiyal biyokütle karbonunun topraktaki değişikliğini ölçmek için bir gösterge olabileceği iyi bilinmektedir. Mikroalglerin veya siyanobakterilerin aşılmasıyla ilgili tüm uygulamalar, aşılammış kontrole göre mikrobiyal biyokütle karbonunda önemli bir artış göstermiştir (Albiach ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada mikroalgal biyokütlenin, toprağın kuru koşullarda canlılığını ve verimliliğini korumasına yardımcı olan humus oluşumuna önemli ölçüde katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir (Nekrasova ve Aleksandrova, 1982). Kaushik (1985), doğal alglerin 6 aylık bir süre boyunca in vitro koşullarda toprak organik karbonunda yaklaşık % 0.03'lük (672 kg/ha) bir artışla katkıda bulunabileceğini gözlemlerken, Subhashini ve Kaushik (1984) sodik topraklardaki siyanobakteriyel halotolerant türler ile aşılamanın, ekim mevsiminde organik karbonu yaklaşık 5.3–7.6 ton karbon / ha artırabileceğini bildirmiştir.

Toprakta fosforun alınabilir formda olmaması büyük bir sorun oluşturmaktadır. Siyanobakterilerin, organik fosforu fosfataz enzim üretimi ile çözündürerek fosforun biyoyararlanımını arttırdığı bilinmektedir. Siyanobakteriler; trikalsiyum fosfat, demir fosfat, alüminyum fosfat ve hidroksiapatit gibi çözünmeyen fosfor formunu topraklarda ve tortularda çözebilirler (Cameron ve Julian, 1988; Singh ve ark., 2016). Toprakta inorganik olarak bulunan fosfor oranla mikroalgal aşılama ile bitkilerin fosfat alımının çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Fuller ve Roger, 1952).

2.TOPRAĞIN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDEKİ ROLLERİ

Mikroalgler ve siyanobakterilerin, topraktaki gelişmeleri sırasında polisakkaritler, peptitler ve lipitler gibi çeşitli bileşikleri serbest bıraktıkları bilinmektedir; bu, mikro agregatlar oluşturmak için toprak parçacıklarının birbirine bağlanmasına yardımcı olur. Ayrıca polisakkaritler, kil partiküllerini yakalayabilen lif benzeri yapılar oluştururlar; böylece mikroagregatların yapısının korunmasını da sağlarlar. Oluşan mikroagregatlar, makroagregatlar olarak bilinen daha büyük toprak agregatlarını oluşturmak için birbirine bağlanır (Singh, 2014).

Toprak kümelemesini zenginleştirme kapasiteleri nedeniyle, siyanobakteriler kurak veya yarı kurak bölgelerdeki bozulmuş arazilerin toprak kalitesini iyileştirmek için kullanılabilir (Singh, 2014). Siyanobakterilerin aşılmasına bağlı olarak, toprağın polisakkarit içeriğinin arttığı, böylece hem toprağın agregat stabilitesi hem de su tutma kapasitesi artmıştır (Kaushik, 1998). Rogers ve Burns (1994); makro agregatların, rüzgar ve su kaynaklı toprak erozyonuna kolayca direnebilen siyanobakterilerin müsülajlı filamentleri ile daha da güçlendirildiğini öne sürmüştür. Siyanobakterilerin aracılık ettiği makro agregatların stabilitesi, kurak ve yarı kurak koşullarda, bitkisel üretimde oldukça faydalıdır. *Desmonostoc muscorum* ile aşılamanın çeltik fide gelişimini olumlu yönde etkilediği gibi, besin içeriği ve agregat stabilitesini de etkilediği rapor edilmiştir (Regers ve Burn, 1994). Siyanobakteriyel büyümenin toprağın havalandırılmasını

iyileştirdiği, bu da topraklardaki sıkışmayı azalttığı ve yer altı biyoçeşitliliğini desteklediği bildirilmiştir (Rogers ve Burns, 1994).

3. MİKROALGLERİN KULLANIMI İLE TUZLU TOPRAĞIN ISLAHI

Siyanobakteriler, tuzlu topraklar gibi aşırı ortamlarda hayatta kalabilir ve bu nedenle bu toprakları iyileştirmek için kullanılabilir. Moisaner ve ark. (2002), *Anabaena oscillarioides*, *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* ve *Microcystis aeruginosa* gibi bazı siyanobakteriyel suşların 7-15 g/l arasında değişen tuz konsantrasyonlarını tolere edebildiğini bildirmiştir. Ayrıca, bu siyanobakteriyel türlerin ekzopolisakkaritler ürettiği ve toprağın daha iyi partikül bağlama ve su tutma kapasitesine yol ağtığı da gözlemlenmiştir (Kumar ve ark., 2019).

4.MİKROALGLERİN BİTKİ BÜYÜME DESTEKLEYİCİLERİ OLARAK KULLANIMI

Siyanobakteriler, bitki büyüme hormonları (gibberellinler, sitokinin, oksin veya absisik asitler), vitaminler (B vitamini veya amino asitler), antibiyotikler ve toksinler üretir. Misra ve Kaushik (1989) çeltik bitkilerinde siyanobakterilerin bitki büyümesini destekleme kapasitesini incelemişler ve siyanobakterilerin çeltik tohumlarının çimlenmesini, ayrıca köklerin ve sürgünlerin büyümesini desteklediğini rapor etmişlerdir.

5.MİKROALG BAZLI BİYOGÜBRE

Mikroalgler, açık sistemlerde veya kapalı sistemlerde (Fotobiyoreaktörler veya PBR'ler olarak da adlandırılır) yetiştirilebilir (Takenaka ve Yamaguchi, 2014; Fernandes ve ark., 2015; Kumar ve Singh, 2016; Singh ve ark., 2016).

5.1.Açık Havuzlar ve Yüksek Oranlı Alg Havuzları (HRAP)

Siyanobakterilerin yetiştirilmesi için açık havuz sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar çoğunlukla doğal göletler, göller veya alg havuzlarıdır (Spolaore ve ark., 2006; Dragone ve ark., 2011). Alg havuzları, derinliği 0.2-0.4 m (bazen 1 m'ye kadar) olan sığ tipi açık havuzlardır. Göletler, lagünler; göller gibi açık havuzlarla karşılaştırıldığında, mikroalgal üretimini verim açısından üç kata kadar iyileştirebilir (Craggs ve ark., 2011). Açık havuz sistemlerinin en büyük avantajları, kullanım kolaylığı ve daha düşük inşa maliyeti ile ayrıca kapalı sistemlere göre daha fazla biyokütle üretimine sahiptirler (Carlsson, 2007; Dragone ve ark., 2011). Bununla birlikte, kirlenmeye ve ayrıca iklim koşullarına, özellikle buharlaşma ve yağış nedeniyle besin ve hücre sayılarındaki değişikliklere karşı çok hassastırlar (Tredici, 2004; Dragone ve ark., 2011).

Açık sistemlere göre, fotobiyoreaktörler; hücre sayısı, pH, sıcaklık ve O₂ ve CO₂ konsantrasyonunun daha iyi düzenlenmesi ve kontrolüne sahiptir (Pulz, 2001). Daha sürdürülebilir ve esnek yetiştirme sistemleridir, ürün türüne, üretim seviyesine ve yerel hava şartlarına göre açık veya kapalı koşullarda çalıştırılabilirler. Yüksek değerli

ürünlerin gerekli olduğu ilaç ve kozmetik endüstrilerinde, kontaminasyon içermedikleri için oldukça avantajlıdır (Dragone ve ark., 2011).

5.2.Hasat

Mikroalgal biyokütlenin hasat edilmesi, öncelikle boyut, yoğunluk ve hasattan sonra gereken ürün gibi mikroalglerin özelliklerini dikkate alır. Brennan ve Owende (2010) hasadı toplu hasat ve yoğunlaştırma olarak iki aşamaya ayırmıştır.

Toplu hasat aşamasında, mikroalgal biyokütle, açık havuzlardan veya kapalı foto-biyoreaktörlerden toplanan yığın süspansiyondan ayrılır. Brennan ve Owende (2010), toplam katı maddenin yaklaşık % 2-7'sinin toplu süspansiyondan ayrılabilceğini belirtmiş ve bunu başarmak için sedimantasyon, yüzdürme veya flokülasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Yerçekimi sedimantasyonu, mikroalgal biyokütlenin toplu olarak toplanması için en yaygın tekniktir, ancak *Spirulina* gibi büyük mikroalglerin toplanmasında daha yararlıdır (Brennan ve Owende, 2010). Ayrıca, çok basit bir teknik olmasına rağmen, ön işlem için çok uzun bir süre ve yüksek sıcaklık koşulları gerektirdiği ileri sürülmüştür (Uduman ve ark., 2010).

Yoğunlaştırmada ise; toplu hasatta elde edilen mikroalgal katı biyokütle, filtrasyon, santrifüjleme ve ultrasonik agregasyon gibi çeşitli tekniklerle daha da konsantre edilir (Brennan ve Owende, 2010). Filtreleme yöntemi, *Coelastrum* ve *Spirulina* (70 µm'den büyük hücre boyutu) gibi büyük mikroalgler için yaygın olarak

kullanılmaktadır. Bu yöntem, membran filtrasyonunun kullanılması nedeniyle nispeten pahalıdır; bu nedenle büyük ölçekli hasat için uygulanamaz (Brennan ve Owende, 2010).

5.3.Biyokütle Değerlemesi

Mikroalgal biyokütlenin toplu olarak toplanmasından ve kalınlaştırılmasından sonra, konsantre katı biyokütle (kuru ağırlık) genellikle % 15-25'dir (Uduman ve ark., 2010). Bu konsantre biyokütle, bir hayvan yemi olarak veya tarımsal amaçlar için bir biyogübre olarak geliştirilebilir. Ürün değerini daha da artırmak için konsantre mikroalgal biyokütle kurutulabilir. Biyokütlenin denatürasyonunu önledikleri için geliştirilmiş iki tür kurutma; püskürtmeyle kurutma ve güneşle kurutma vardır. Hem püskürtmeyle kurutma hem de güneş enerjisiyle kurutma çok verimli olmasına rağmen (Leach ve ark., 1998), püskürtmeyle kurutma sıcak gaz (azot veya hava) kullanımıyla daha fazla enerji gerektirirken, güneş enerjisiyle kurutma geniş bir yüzey alanına ihtiyaç duyar (Prakash ve ark., 1997). Kurutulmuş mikroalgal biyokütle, hayvan yemi (Becker, 2007) veya bir biyogübre (Mulbry ve ark., 2005) olarak kullanılabilir.

5.4.Atık Suda Mikroalg Yetiştiriciliği

Atık su arıtma için yaygın olarak kullanılan atık stabilizasyon havuzlarında *Synechococcus*, *Leptolyngbya*, *Nostoc*, *Merismopedia* ve *Limnothrix* gibi çeşitli siyanobakteriyel cinslerin varlığına ilişkin birçok rapor bulunmaktadır (Vasconcelos ve Pereira, 2001; Oudra ve ark., 2002; Furtado ve ark., 2009). Mikroalglerin oksijen, pH ve güneş

ışığı gibi bazı koşulları iyileştirdiği de gözlemlenmiştir (Asada ve Takahashi, 1987), bunun da belediye kanalizasyonundaki toplam bakteri ve koliform sayısını azaltmaya yardımcı olabileceği açıklanmıştır (Uma ve ark., 2002).

SONUÇ

Ekilebilir arazinin sürekli olarak ekim için kullanılması, topraktaki azot ve fosfor gibi temel besin maddelerinin kaybına yol açmıştır. Bu nedenle, gübreler, maksimum verime ulaşmak için tarımın iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Tarım uygulamalarında yoğun kimyasal gübre ve pestisit kullanımı, toksik olmakla kalmayıp, aynı zamanda fiyatı da yükselen sentetik tarım kimyasallarına karşı aşırı bağımlılığa yol açmıştır (Chakhalyan ve ark. 2008). Siyanobakterileri içeren mikroalglerin, tarım ve çevre sürdürülebilirliği için yararlı olabilecek çeşitli biyoaktif bileşiklerin üretiminde önemli biyokaynak olduğu kanıtlanmıştır (Mishra ve Kaushik, 1989a,b). Son yıllarda, mikroalglerden biyogübrelerin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Mikroalgal biyogübreler, azot fiksasyonu ve bitki büyümesini destekleme yetenekleri nedeniyle, kimyasal gübrelerle karşılaştırıldığında düşük maliyetli ve sürdürülebilir bir alternatif sunabilir (Agwa ve ark., 2017; Dineshkumar ve ark., 2017; Garcia-Gonzales ve Sommerfeld, 2016). Genetik mühendisliği ve biyoteknoloji, yüksek kaliteli ürünler geliştirmek amacıyla kullanılabilir. Atık su, mikroalg yetiştirme ortamı için bir kaynak olarak kullanılabilir ve sonuçta maliyetleri düşürmeye yardımcı olabilir (Navarro Lopez ve ark., 2020). Ayrıca,

mevcut pahalı kimyasal (pıhtılaşma) ve biyolojik yöntemlerin (aktif çamur) yerini alarak atık su arıtma maliyetini düşürebilir. Ayrıca, mikroalgal iyileştirme entegre atık su arıtma, besinleri ve suyu geri kazanarak atık suya değer sağlar. Sonuçta mikroalglerin bitki büyümesini artırmada kimyasal gübrelerin yerini alması için verimli, ekonomik ve güvenli bir biyo-gübre olduğunu ve bitki üzerinde hiçbir zararlı etkisi olmadığını göstermektedir.

KAYNAKÇA

- Agwa, O. K., Ogugbue, C. J., Williams, E. E. (2017). Field evidence of *Chlorella vulgaris* potentials as a biofertilizer for *Hibiscus esculentus*. *Int. J. Agric. Res.*, 12, 181–189.
- Albiach, R., Canet, R., Pomares, F., Ingelmo, F. (2000). Microbiomass content and enzymatic after the application of organic amendments to a horticultural soil. *Bioresour. Technol.*, 75, 43–48.
- Becker, E. W. (2007). Microalgae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.*, 25, 207–210.
- Brennan, L., Owende, P. (2000). Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energ. Rev.*, 14, 557–577.
- Chakhalyan, A., Avetisova, G., Saghiyan, A., Chil-Akopyan, L., Melkonyan, L., Gevorkyan, R., Sargsyan, H., Ghazarian, L. (2008). Zeolites in complex nitrogen biofertilizers. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 174, 521–524.
- Cameron, H. J., Julian, G. R. (1988). Utilisation of hydroxyapatite by cyanobacteria as their sole source of phosphate and calcium. *Plant Soil*, 109, 123–124.
- Carlsson, A. S. (2007). Micro- and Macroalgae: Utility for Industrial Applications: Outputs from the EPOBIO Project. CPL Press, p. 82.
- Craggs, R. J., Heubeck, S., Lundquist, T. J., Benemann, J. R. (2011). Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Sci. Technol.*, 63, 660–665.
- Dineshkumar, R., Kumaravel, R., Gopalsamy, J., Sikder, M. N. A., Sampathkumar, P. (2017). Microalgae as bio-fertilizers for rice growth and seed yield productivity. *Waste Biomass Valorization*, 9, 793–800.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl. Energy*, 88 (10), 3331–3335.
- Garcia-Gonzalez, J., Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmusdimorphus*. *J. Appl. Phycol.*, 28, 1051–1061

- Fernandes, B. D., Mota, A., Teixeira, J. A., Vicente, A. A. (2015). Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: approaches, applications and future trends. *Biotechnol. Adv.*, 33, 1228–1245.
- Fuller, W.H., Roger, R.N. (1952). Utilisation of the phosphorus of algal cells as measured by the Neubauer technique. *Soil Sci.*, 74, 417–429.
- Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuario, D. B., Fiore, M. F. (2009). Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia*, 627, 195–209.
- Issa, A. A., Abd-Alla, M. H., Ohshima, T. (2014). Nitrogen fixing cyanobacteria: future prospect. In: Ohshima, T. (Ed.), *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. InTech Publisher, Rijeka.
- Kaushik, B. D. (1985). Effect of native algal flora on nutritional and physico-chemical properties of sodic soils. *Acta Bot. Indica*, 13, 143–147.
- Kaushik, B.D. (1998). In: Subramanian, G. (Ed.), *Cyanobacterial biotechnology*. Science Publs Inc., Enfield, pp. 211–222.
- Kumar, A., Singh, J. S. (2016). Microalgae and cyanobacteria biofuels: a sustainable alternate to crop-based fuels. In: Singh, J.S., Singh, D.P. (Eds.), *Microbes and Environmental Management*. Studium Press Pvt. Ltd., New Delhi, pp. 1–20
- Kumar, A., Kaushal, S., Saraf, S. A., Singh, J. S. (2017). Cyanobacterial biotechnology: an opportunity for sustainable industrial production. *Clim. Change. Environ. Sustain.*, 5 (1), 97–110.
- Kumar, A., Kaushal, S., Saraf, S. A., Singh, J. S. (2018). Microbial bio-fuels: a solution to carbon emissions and energy crisis. *Front. Biosci. Landmark*, 23, 1789–1802.
- Kumar, D., Kastanek, P., Adhikary, P. (2019). Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Current Science*. 115, 234-241.

- Leach, G., Oliveira, G., Morais, R. (1998). Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β -carotene rich powder. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 82–85.
- Lumpkin, T.A., Plucknett, D.L. (1982). Azolla as a green manure: Use and management in crop production. Westview tropical agriculture series No. 5, Westview Press, Boulder.
- Misra, S., Kaushik, B. D. (1989a). Growth promoting substances of cyanobacterial vitamins and their influence on rice plant. *Proc. Ind. Sci. Acad.*, 55, 295–300.
- Misra, S., Kaushik, B. D. (1989b). Growth promoting substances of cyanobacteria: detection of amino acids, sugars and auxins. *Proc. Ind. Natl. Sci. Acad.*, 6, 499–504.
- Moisander, P. H., McClinton, E. I. I., Paerl, H. W. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb. Ecol.*, 43, 432–442.
- Mulbry, W., Westhead, E. K., Pizarro, C., Sikora, L. (2005). Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresour. Technol.*, 96, 451–458.
- Nekrasova, K. A., Aleksandrova, I. V. (1982). Participation of collembolas and earthworms in transformation of algal organic matter. *Soviet Soil Sci.*, 14 (4), 31–39.
- Navarro-Lopez, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Ación, G., Gouveia, L. (2020). Bioestimulant potential of *Scenedesmus obliquus* grown in brewery wastewater. *Molecules*, 25, 664.
- Oudra, B., Loudiki, M., Vasconcelos, V., Sabour, B., Sbiyyaa, B., Oufdou, K. H., Mezrioui, N. (2002). Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. *Environ. Toxicol.*, 17, 32–39.
- Prakash, J., Bushparaj, B., Carozzi, P., Torzillo, G., Montaini, E., Materassi, R. (1997). Microalgal biomass drying by a simple solar device. *Int. J. Sol. Energy*, 18, 303–311.

- Priyadarshani, I., Sahu, D., Rath, B. (2011). Microalgal bioremediation: current practices and perspectives. *J. Biochem. Technol.*, 3 (3), 299–304.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 287–293.
- Rogers, S.L., Burns, R.G. (1994). Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations and seedling emergence following inoculation of soil with *Desmonostoc muscorum*. *Biol. Fertil. Soils*, 18, 209–215.
- Singh, J.S. (2014). Cyanobacteria: a vital bio-agent in eco-restoration of degraded lands and sustainable agriculture. *Clim. Change. Environ. Sustain.*, 2, 133–137.
- Singh, J.S., 2015. Microbes: the chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 203, 80–82.
- Singh, J.S., Kumar, A., Rai, A.N., Singh, D.P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.*, 7, 529.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101 (2), 87–96.
- Subhashini, D., Kaushik, B.D. (1984). Amelioration of salt affected soils with blue green algae. *Phykos* 23, 273–277. Subramanian, G., Sundaram, S.S., 1986. Induced ammonia release by the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 37, 151–154.
- Takenaka, H., Yamaguchi, Y. (2014). Commercial-scale culturing of cyanobacteria: An industrial experience. In: Sharma, N.K., Rai, A.K., Stal, L.J. (Eds.), *Cyanobacteria: An Economic Perspective*, first ed. John Wiley & Sons Ltd, pp. 293–301.
- Tredici, M. (2004). Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp. 178–214.

- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., 2010. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energ.* 2.
- Vasconcelos, V.M., Pereira, E. (2001). Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Res.* ,35, 1354–1357.
- Wang, B., Lan, C.Q., Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.*, 30 (4), 904–912.

BÖLÜM 5

BITKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLER VE AĞIR METALLER

Prof. Dr. A. Cenap CEVHERİ¹, Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK²

¹ Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: ccevheri@harran.edu.tr ORCID 0000-0002-3759-4645

² Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
E-mail: ckucuk@harran.edu.tr ORCID 0000-0001-5688-5440

GİRİŞ

Bitki büyümesini destekleyen bakteriler, bitkiler için yararlı olan serbest yaşayan toprak, rizosfer ve filosfer bakterileri olarak tanımlanmıştır (Bashan ve ark., 2005; Bashir ve ark., 2020). Bu yararlı bakterilerin faaliyetlerinin çoğu rizosferde ve daha az ölçüde de yaprak yüzeylerinde incelenmiştir (Kamran ve ark., 2020). Bu tip mikroorganizmalar, bitki büyümesini farklı yollarla desteklemiştir; genellikle yetersiz bulunan maddeleri sağlayarak bitkilerin metabolizmasını doğrudan etkilerler, atmosferik azotu sabitleyebilir, fosfor ve demiri çözebilir ve bitki hormonlarının üretimini artırabilir. Ayrıca kuraklık, yüksek tuzluluk, metal toksisitesi ve pestisit gibi streslere karşı bitki toleransını geliştirebilmişlerdir (Kamran ve ark., 2020).

Pek çok toprak ve özellikle rizosfer bakterisi, bitki metabolizmasını doğrudan etkileyerek, majör bir patojenin yokluğunda bitkilerin büyümesini uyarabilir. Bu bakteriler, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcos*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Hydrogenophaga*, *Kluyvera*, *Microcoleus*, *Phyllobactasloccia*, *Pylobacterium*, *Pylobacterium*, *Pylobacterium*, *Pylobacterium* gibi çeşitli cinslere ve baklagil symbiontı olan *Rhizobium* cinsi bakterileridir (Bashan ve Holguin, 1998; Bashan ve de-Bashan, 2005). Ürün aşılama olarak kullanımlarına ek olarak, son yıllarda çevresel uygulamalarda da kullanılmıştır. Örneğin, *Azospirillum* türleri, mikroalglerin çoğalmasını ve metabolizmasını

artırarak mikroalglerle arıtılmış atık suyun biyoremediasyonuna katkı sağlamıştır (Ghani, 2011; Ahmad ve ark., 2014).

Toksik metaller tarafından su ve toprağın kontaminasyonu, ekosistemde önemli toksisiteye neden olmaktadır. Sadece toprak ve su kalitesini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda tarımsal üretimi ve insan sağlığını da olumsuz etkiler. Yoğun fungusid ve herbisidlerin kullanımı ve sulamalar, kanalizasyon, endüstriyel üretim, yoğun tarım, hızlı kentleşme gibi nedenler ağır metaller tarafından oluşturulan kirliliğe neden olmaktadır. As, Cd, Cu, Pb, ve Zn gibi ağır metaller insan sağlığında olumsuz etkilere neden olmaktadır (Bolan ve ark., 2014). Son yıllarda birçok ülkede ağır metallerin neden olduğu zararlar rapor edilmiştir. Örneğin; Bangladeş ve Hindistan'da arsenik kontaminasyonu olan tarlalarda yetiştirilen çeltik ile beslenen insanlarda arsenik zehirlenmeleri görülmüştür (Bhattacharya ve ark., 2012). Yeni Zelanda'da hayvanların beslendiği otlarda Cd depolanması belirlenmiştir (Bolcn ve ark., 2014). Benzer olarak Hindistan'da çiftlik hayvanlarında ağır metallerin toksik düzeyi rapor edilmiş, bu hayvanların besin olarak kullanılması sonucunda da insanlarda zehirlenmeler ortaya çıkmıştır (Rajaganapathy ve ark., 2011).

İnsan sağlığı üzerinde toksik metallerin olumsuz etkilerinin azaltılması, toprak ve atık sulardan toksik metallerin temizlenmesi için remediasyon teknikleri geliştirilmiştir. Kontaminasyonlu çevrelerden ağır metallerin temizlenmesi için fiziksel, kimyasal ve biyolojik prosesler ümit verici olmuştur. Bununla birlikte, her bir remediasyon

alternatifi çevre güvenliği ve maliyet bakımından avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Bradl ve Xenidis, 2005). Örneğin atık sulardan ağır metallerin giderilmesinde geleneksel olarak kimyasal presipitasyon kullanılmaktadır. Kimyasal uygulama çok kirli suların temizlenmesinde etki olmasına rağmen, metal iyon konsantrasyonu düşük olduğunda etkisi oldukça düşüktür (Fu ve Wang, 2011). Termal uygulama, biyolojik uygulama ile karşılaştırıldığında, kısa periyotlar için kullanılsa da oldukça maliyetli bulunmuştur. Biyolojik uygulama ise, toksik bileşikleri parçalayabilen mikroorganizmalar bulunmasına rağmen, mikrobiyal biyoremediasyonun kullanımı sınırlıdır (Megharaj ve ark., 2011). Ağır metal kontaminasyonun çevre ve insan sağlığı üzerindeki risklerini azaltmak için bitki ile ilişkili mikroorganizmaların kullanımı ile ilgili yeni teknolojilerin geliştirilmesi son yıllarda artış göstermiştir (Fatima ve Ahmed, 2018; Rashid ve ark., 2013). Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler, metal kontaminasyonlu topraklarda bitkilerin biyomas üretimini artırabilmektedir. Bu bölümde metal ile kontaminasyonlu topraklarda bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin bitki gelişimi üzerindeki etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

1. AĞIR METAL STRESİ

Ağır metaller, dünya üzerinde çevre ve insan nüfusu için en tehlikeli kirleticiler arasındadır. Bunlar, pestisitlerden ve sülfürdioksit ile karbondioksit gibi diğer inorganik kirleticilerden daha tehlikeli hale gelmiştir (Chen ve ark., 2007). Ağır metaller çevreye olan toksisiteleri açısından katı ve nükleer atıklardan daha tehlikeli olabilir (Lajayer ve

ark., 2017). Ağır metaller ayrıca oksidatif stresi indükleyerek antioksidatif sistemleri inhibe edebilen aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek dolaylı hücre toksisitesi sağlar. Bazı bitkiler güçlü antioksidatif sistemler geliştirmiştir ve bu nedenle ağır metal stresine daha iyi uyum sağlayabilirler (Choudhury ve ark., 2017).

Ağır metalle kirlenmiş bölgeleri temizlemek için farklı fizikokimyasal stratejiler kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında fizikokimyasal ekstraksiyon (toprağın yıkanması), metal yapının kimyasallarla değiştirilerek yerinde sabitlenmesi, metal stabilizasyonu vb. yollar bulunmaktadır (Hollenbach ve ark., 1997).

Fizikokimyasal teknikler, toprağın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini olumsuz etkilemektedir (Ali ve ark., 2013). Bu stratejilerin yüksek maliyeti ve düşük verimliliği nedeniyle, bilim adamları ağır metal kirlenmiş toprakları iyileştirmek için uygun maliyetli, çevre dostu ve tekrarlanabilir alternatifler üzerinde çalışmaktadır (Ali ve ark., 2013). Bazı toprak mikroorganizmaları daha yüksek konsantrasyonlarda ağır metalleri tolere edebilir ve ayrıca fitohormon üretme kabiliyetine sahiptir, bu nedenle fitohormon üreten ağır metale toleranslı bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin uygulaması, tarım sistemlerinde ağır metal toksisitesi sorununu çözmek için umut verici bir yaklaşım olarak düşünülmüştür (Roman-Ponce ve ark., 2017).

2.BİTKİLERDE AĞIR METAL STRES TOLERANSINI İNDÜKLEMELİK İÇİN FİTOHORMON ÜRETEN BAKTERİLERİN UYGULAMALARI

Faydalı toprak mikroorganizmaları ile bitkilerin aşılınması, modern tarım sistemlerinde ürün verimi için en umut verici yaklaşımlardan biri olarak ortaya çıkmaktadır. Araştırmalar, bitki-toprak-mikrop etkileşimleri, bitkileri metalle kirlenmiş ortamlara alıştırmak için kullanılabilmiş ve böylelikle bitkilerde metal toleransını indüklemek için araştırılmıştır (Tiwari ve ark., 2018). Toprak mikroorganizmaları, ağır metallerin varlığında hayatta kalmak için farklı mekanizmalar geliştirdiklerinden, ağır metal stresi altında bitki büyümesini iyileştirmede etkili olabilirler (Weyens ve ark., 2013). Bitkiye yararlı olan mikroorganizmalar, atık malzemeleri basit/toksik olmayan bileşiklere dönüştürerek atıkları tüketebilirler ve ağır metalleri daha az toksik formlara dönüştürebilirler.

Toprak mikroorganizmaları ayrıca fitohormonlar üreterek veya organik asit üretimi yoluyla toprak pH'ını düşürerek asitleştirme, çöktürme ve şelasyon yoluyla ağır metal biyoyararlanımını değiştirebilmiştir (Mishra ve ark., 2017). Roman-Ponce ve ark. (2017), ağır metalle kirlenmiş toprakta gelişen *Spharealcea angustifolia* ve *Prosopis laevigata*'nın rizosferlerinden 60 bakteri suşu izole etmişlerdir. Seçilen *Curtobacterium* sp. NM1R1 ve *Microbacterium* sp. CE3R2'yi test etmişler, seçilen suşların yüksek düzeylerde Cu, Zn, Pb ve As'ı tolere edebildiğini ve IAA ürettiğini belirlemişlerdir. Bu suşlarının, *Brassica nigra*'nın ağır metal stresi

altında çimlenmesini ve kök büyümesini önemli ölçüde iyileştirdiğini gözlemlemişler ve bu nedenle, bunları biyoremediasyonda kullanılabileceğini ve ağır metal stresi altında bitki büyümesini iyileştirmek için potansiyel adaylar olarak önermişlerdir. *Variovorax* sp. (Va), *Pseudomonas fluorescens* (Pf) gibi fitohormon üreten bakteri suşları ile aşılama, ayrı ayrı ve kombinasyon halinde, Zn ve Cd ile kontamine alüvyal toprakta *Brassica napus*'un büyümesini geliştirmiştir (Dabrowska ve ark., 2017). Bakteriyel suşların tek tek aşılama, metal stresi altında *B.napus* bitkilerinin yapraklarındaki ve klorofil içeriklerindeki potasyum konsantrasyonunu önemli ölçüde geliştirmiştir. Test edilen suşların, metalle kirlenmiş topraklarda *B.napus*'un büyümesini iyileştirmek için etkili bir şekilde kullanılabileceğini ve metalle kontamine toprakların iyileştirilmesine yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir (Dabrowska ve ark., 2017). Başka bir çalışmada ise *Bacillus* sp. RJ16 ve *Pseudomonas* sp. RJ10, toksik Cd konsantrasyonları altında gelişen kolza bitkilerinin kök büyümesini desteklemiştir (Weyens ve ark., 2013). Siderofor üreten, ağır metale toleranslı rizobakteriyel tür *Pseudomonas aeruginosa*'nın, kabak ve hardal bitkilerinde Cd toksisitesi altında Cd alımını azaltarak bitki büyümesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Pereira ve ark., 2015).

Siderofor üreten, ağır metale toleranslı bitki gelişmesini teşvik eden rizosfer bakterilerinin bitkilerde ağır metallerin biyoyararlanımı ve besin birikimini hızlandırabilmiş, böylece ağır metallerin bitkiler üzerindeki zararlı etkilerini azaltmaya yardımcı olmuştur (Gamalero ve ark., 2011). IAA üreten, ağır metal toleranslı rizobakterilerden

Microbacterium sp. 3ZP2, *Achromobacter* sp. 1AP2 ve *Rhodococcus erythropolis* EC 34'nin Zn ve Cd ile kontamine topraktaki *Trifolium repens* biyokütlesini artırdığı açıklanmıştır (Hasan ve ark., 2017). Seneviratne ve ark. (2016), Ni, Pb ve Cu'nun bakteri büyümesi, IAA üretim yeteneği ve marul fidelerinin büyümesini teşvik üzerindeki etkisini incelemiştir. Araştırmacılar, IAA üreten *B.japonicum*'un ağır metal stresi altında marul fidelerinin kök ve sürgün büyümesini iyileştirmede etkili olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, fitohormon üreten, metale toleranslı bakteri suşları *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas moraviensis* ile aşılama, tuzlu sodik toprak koşullarında buğday gelişimi üzerindeki ağır metallerin toksik etkilerini azaltmıştır (Fatima ve Ahmed, 2018; Wang ve ark., 2020).

Bitkiye yararlı bakteriler, bitki gelişimi ve büyümesini olumlu olarak etkilediği için, bitki gelişimini teşvik eden bakteriler olarak adlandırılmaktadır (Bashan ve Holguin, 1998). Bu bakteriler bitki patojenlerini bastırarak, bitki gelişme ve büyümesini dolaylı olarak etkileyerek biyokontrol etmenleri olarak işlev görebilirler. Diğer yandan hormon düzeylerini düzenleyerek veya mevcut mineral besinleri arttırarak bitki gelişimi ve büyümesini dolaylı olarak da etkileyebilmektedir (Rashid ve ark., 2013).

Bu yararlı bakteriler, bitki gelişimi için kullanılabilir fosfor gibi minerallerin çözünürlüğünü artırırlar, bitki etilen düzeyini azaltabilen 1-aminosikloprop-1-karboksilat (ACC) deaminaz sentezlerler, bitki patojenlerinin aktivitesini inhibe ederler, bitkilerin demir beslenmesini attıran siderofor olarak tanımlanan demir şelatları sentezleyerek bitki

gelişiminin farklı aşamalarını ilerletebilen oksin, sitokin ve gibberellin gibi fitohormonları sentezleyebilirler (Glick,2010). Farklı çevre koşullarında bitki gelişimini teşvik eden bakteriler farklı mekanizmaları kullanabilirler ve bu mekanizmaların bir veya daha fazlasını kullanarak bitki gelişimi ve büyümesini ilerletebilirler (Glick ve ark., 2015). Bitki gelişiminde bakterilerin yararlı etkileri, bitkilerin tuzluluk ve ağır metal gibi stresli koşullar altında ortaya çıkmaktadır (Brigido ve ark., 2013).

Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler, kök gelişiminde etkili olan fitohormonları salgılayabilirler (Ma ve ark., 2016). En önemli oksin, indol-3-asetik asit (IAA)'dir. IAA, bitkinin fizyolojik proseslerinde önemlidir (Gravel ve ark., 2007). Bitki dokularından sentezlenen IAA, bitki ile ilişkili bakteriler arasında da yaygın olarak üretilmiştir (Shin ve ark., 2012). Örneğin; bitki ve bakterilerin her ikisi tarafından sentezlenen IAA, toprakta *Streptomyces*'in antibiyotik üretimi için sinyal olabilir, böylece *Streptomyces* tarafından üretilen antibiyotikler topraktaki bitki patojenlerinin inhibisyonuna neden olurken, patojenlere karşı bitkiyi korur (Matsukawa ve ark., 2007).

Bununla birlikte, bakteriyal IAA, kök yüzeyini, yan köklerin sayısını, kök saçlarını artırır, topraktan minerallerin bitkiler tarafından alınımı kolaylaştırır (Kong ve ark., 2017). Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler tarafından salgılanan IAA, tuzluluk, ağır metal, asidik pH gibi çevresel strese karşı bitkileri korur (Kong ve ark., 2017). Arsenik-dirençli IAA üreten *Brevundimonas diminuta*'nın arsenik stresinin zararlı etkilerinden çeltik bitkilerini korumuş ve bitkinin

fitostabilizasyonunu artırmıştır (Singh ve ark., 2015). Bakteriyal IAA, bitki gelişimine etkili olduğu gibi, bitkinin hücre bölünmesinde teşvik etmektedir. *Pseudomonas brassicacearum* ve *Sinorhizobium meliloti*'nin IAA, siderofor ve ACC deaminaz aktivite gösteren suşları ile birlikte aşılınması sonrası *Medicago lupulina*'nin gelişiminin arttığı tespit edilmiştir (Kong ve ark., 2017). Araştırmacılar *P.brassicacearum* ve *Sinorhizobium meliloti*'nin aşırı bakır ile kontamine toprakta bitkinin bakır alımı, nodulasyon ve gelişiminde önemli artış olduğunu bildirmişlerdir (Kong ve ark., 2017). IAA üreten bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin metal fitoremediasyonunu iyileştirdiği yönünde birçok çalışma yapılmıştır (Zhang ve ark., 2015; Gamalero ve Glick, 2011; Duca ve ark., 2014).

Gibberellinler kadar sitokinlerde bitki büyümesi ve gelişmesinde önemli rol oynar. *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* ve *Arthrobacter*'in serbest hücre kültürlerinde bakteriyal sitokinler belirlendiği gibi, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* gibi epifitik ve rizosferik bakteriler tarafından üretilmektedir (Tsavkelova ve ark., 2006). Bu bakteriler tarafından salgılanan sitokin veya gibberallin bitkileri abiyotik strese karşı korumuşlardır (Arkhipova ve ark., 2007). Bununla birlikte ağır metal ile kontamine koşullarda bitki gelişimine etkileri üzerine yapılan çalışmalar ise sınırlıdır.

Bakteriler tarafından ACC deaminaz üretimi ile toksik metallerin yüksek düzeylerinde bitkilerin etilen miktarı azalmıştır (Lugtenberg ve Kamilova, 2009). ACC deaminaz üreticisi *S.meliloti* ile aşılınmış

M.lupulina'nin gövde ve köklerinde toplam biyomasın arttığı belirlenmiştir (Kong ve ark., 2015). Ağır metal ile kontaminasyonlu topraklarda fitoremediasyon için siderofor üreten yararlı bakterilerin önemi yapılan çalışmalarda açıklanmıştır (Ma ve ark.,2011; Sinha ve Mukherjee, 2008). Siderofor üreten *Pseudomonas putida* ile aşılı fasulyenin Pb ve Cd varlığında bakteri ile aşısız olanlara göre gelişmenin daha iyi olduğu ve klorofil içeriğinin arttığı bildirilmiştir (Tripathi ve ark., 2005). Siderofor üreten *Streptomyces tendae*'nin ayçiçeği bitkilerinin Fe ve Cd alımı ile gelişimini önemli ölçüde arttırdığı açıklanmıştır (Dimkpa ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışmada ise siderofor üreten *Kluyvera ascorbata*'nın domates ve kanola bitkilerini Ni, Pb ve Zn gibi metal toksisitesinden koruduğu rapor edilmiştir (Burd ve ark., 1998; 2000). Fosforu çözen bakterilerden *Acinetobacter sp.*, *P.aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*'in metal fitoremediasyon çalışmalarında kullanıldığı bildirilmiştir (Ahemad, 2014).

2. BITKIYE YARARLI BAKTERİLERİN BİTKİ METAL ALIMINI DEĞİŞTİRME MEKANİZMALARI

Bazı toprak bakterileri, konakçı bitkilerin yetersiz toprak koşullarına adaptasyonunu kolaylaştırabilir ve bitki büyümesini teşvik ederek, metal fitotoksitesini azaltır, böylece topraktaki metal biyoyararlanımını değiştirir. Bitki içindeki metalin içeriğini azaltarak fitoremediasyonun verimliliğini artırabilir. Bitki ıslahı sürecini teşvik etmek için kullanılan PGPB mekanizmaları, bitkinin metallere toleranslılığını arttırdığı gibi, bitki büyümesini olumlu yönde etkiler,

bitkilerdeki metal birikimini azaltır. Ayrıca, PGPB, metal direnci, detoksifikasyon, birikim, transformasyon gibi çok sayıda bitki büyümesini teşvik edici özellikleriyle bitkilerdeki metal biriktirme kapasitesini ve translokasyonunu değiştirebilir, böylece metal fitotoksitesini azaltabilir ve kontamine topraklarda ağır metallerin fitoyararlanımını değiştirebilir. (Ma ve ark., 2016). Metal fitotoksitesi, fitoremediasyonun başarısını engelleyen kritik bir faktördür (Shin ve ark., 2012). Metal hiperakümülatör *Alnus*'un köklerinden izole edilen kurşuna dirençli bakteri olan *Bacillus* sp. MN3–4, hücre içi birikim yoluyla metallerin fitotoksik etkilerini azaltarak fitoremediasyon potansiyelini artırmıştır (Shin ve ark., 2012).

Bir yandan, aşılınmış suşlar rizosferdeki doğal mikroplarla rekabet etmekte başarısız olabilir, bu nedenle hayatta kalma ve kolonizasyon yetenekleri, fitoremediasyonu etkin bir şekilde desteklemek için yeterli olmayabilir ((Agarry ve ark., 2013; Ma ve ark., 2011). Diğer yandan, yerli olmayan bitki ve mikrobiyal türlerin (özellikle genetiği değiştirilmiş organizmalar) kirlenmiş bir bölgeden yayılabileceği, doğal türlerle yer değiştirebileceği konusunda önemli endişeler vardır (Karene ve ark., 2009). Bu bağlamda, bitki ilaçlama sırasında yabancı bakterilerin yerli mikrobiyal topluluklar üzerindeki ekolojik etkisi hala net değildir.

SONUÇ

Bitki gelişimini teşvik eden bakteriler ile güçlendirilmiş bitki ıslahı, ağır metalle kirlenmiş topraklarda bitki stresinin zorluklarının üstesinden gelmek için başarılı bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar da bilim adamları, çeşitli yararlı toprak bakterilerinin bitki büyümesine nasıl katkıda bulunduğunu ve ardından fitoremediasyonun verimliliğini nasıl iyileştirdiğini ortaya koymuşlardır. Sağlıklı bir toprak ekosistemi oluşturmak için, sadece yer üstü bitki örtüsünü eski haline getirmek değil, aynı zamanda yeraltı toprak mikrobiyal komünitesinin iyi bir biyoaktivite ve stabilitesini sağlamak için de gereklidir. Toprağın; özellikle tarım arazilerinin iyileştirilmesinin ana amacı yalnız topraktan fazla metalleri gidermek değil, aynı zamanda mikrobiyal topluluğu ve toprağın genel ekolojik işlevlerini zenginleştirmektir. İyi bir biyoremediasyon stratejisi, besin mevcudiyetine, metal formlarına ve toprakta bulunan mikrobiyal topluluğa bağlıdır.

KAYNAKÇA

- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869–881.
- Agarry, S. E., Aremu, M. O., Aworanti, O. A. (2013). Kinetic modelling and half-life study on bioremediation of soil co-contaminated with lubricating motor oil and lead using different bioremediation strategies. *Soil and Sediment Contamination Journal*, 22(7), 800–816.
- Ahemad, M. (2014). Phosphate solubilising bacteria assisted phytoremediation of metalliferous soil: A review. *3 Biotech*, 5(2), 111–121.
- Ahmad, I., Akhtar, M. J., Zahir, Z. A., Naveed, M., Mitter, B., Sessitsch, A. (2014). Cadmium tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 11054–11065.
- Arkipova, T.N., Prinsen, E., Veselov, S.U., Martinenko, E.V., Melentiev, A.I., Kudoyarova, G.R. (2007). Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*, 292, 305–315.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E. (2005). Bacteria/plant growth-promotion. In *Encyclopedia of soils in the environment*. Vol. 1, ed D. Hillel, pp. 103-115. Elsevier, Oxford, UK.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1998). Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1225-1228.
- Bashir, M.A., Naveed, M., Ahmad, Z., Gao, B., Mustafa, A., Nunez-Delgado, A. (2020). Combined application of biochar and sulfur regulated growth, physiological, antioxidant responses and Cr removal capacity of maize (*Zea mays* L.) in tannery polluted soils. *J. Environ. Manag.*, 259, 110051.
- Bhattacharya, S., Gupta, K., Debnath, S., Ghosh, U.C., Chattopadhyay, D., Mukhopadhyay, A. (2012). Arsenic bioaccumulation in rice and edible plants and sub-sequent transmission through food chain in Bengal basin: A

- review of the perspectives for environmental health. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, 1–13.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T. (2014). Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils—To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141–166.
- Bradl, H., Xenidis, A. (2005). Remediation techniques. *Interface Sci. Technol.*, 6, 165–261.
- Brigido, C., Nascimento, F.X., Duan, J., Glick, B.R., Oliveira, S. (2013). Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Mesorhizobium* spp. reduces the negative effects of salt stress in chickpea. *FEMS Microbiology Letters*, 349(1), 46–53.
- Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R. (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3663–3668.
- Burd, G. I., Dixon, D.G., Glick, B.R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 237–245.
- Chen, T.M., Gokhale, J., Shofer, S., Kuschner, W.G. (2007). Outdoor air pollution: Nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and carbon monoxide health effects. *Am. J. Med. Sci.*, 333, 249–256
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.*, 90, 856–867
- Dabrowska, G., Hryniewicz, K., Trejgell, A., Baum, C. (2017). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the phytoextraction of Cd and Zn by *Brassica napus* L. *Int. J. Phytoremediation*, 19, 597–604.
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatoš A., Bucchel, G., Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1687–1696.
- Duca, D., Rose, D.R., Glick, B.R. (2014). Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas* sp. strain UW4 that converts indole-3-acetonitrile

- to indole-3-acetic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 4640–4649.
- Hassan, T.U., Bano, A., Naz, I. (2017). Alleviation of heavy metals toxicity by the application of plant growth promoting rhizobacteria and effects on wheat grown in saline sodic field. *Int. J. Phytoremediation*, 19, 522–529.
- Hollenbach, B., Schreiber, L., Hartung, W., Dietz, K.J. (1997). Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: Implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta*, 203, 9–19.
- Fatima, H.E., Ahmed, A. (2018). Microremediation of chromium contaminated soils. *Peer J.*, 6, e6076
- Fu, F., Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418.
- Gamalero, E., Glick, B.R. (2011). Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Plant nutrient management* (pp. 17–46). Berlin/Heidelberg: Springer.
- Ghani, A. (2011). Effect of chromium toxicity on growth, chlorophyll and some mineral nutrients of *Brassica juncea* L. Egypt. Acad. J. Biol. Sci., 2, 9–15.
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28(3), 367–374.
- Glick, B. R. (2015). *Beneficial plant–bacterial interactions*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), 1968–1977.
- Kamran, M., Malik, Z., Parveen, A., Huang, L., Riaz, M., Bashir, S., Mustafa, A., Abbasi, G.H., Xue, B., Ali, U. (2020). Ameliorative effects of biochar on rapeseed (*Brassica napus* L.) growth and heavy metal immobilization in soil irrigated with untreated wastewater. *J. Plant Growth Regul.*, 39, 266–281.

- Karene, G., Huang, X. D., Bernardr, G., & Brucem, G. (2009). Phytoremediation and rhi- zoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*, 176(1), 20–30.
- Kong, Z. Y., Glick, B. R., Duan, J., Ding, S. L., Tian, J., Mcconkey, B. J. (2015). Effects of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase-overproducing *Sinorhizobium meliloti* on plant growth and copper tolerance of *Medicago lupulina*. *Plant and Soil*, 391(1–2), 383–398.
- Kong, Z. Y., Deng, Z. S., Glick, B. R., Wei, G. H., Chou, M. X. (2017). A nodule endophytic plant growth-promoting *Pseudomonas* and its effects on growth, nodulation and metal uptake in *Medicago lupulina* under copper stress. *Annals of Microbiology*, 67(1), 49–58.
- Lajayer, A.B., Ghorbanpour, M., Nikabadi, S. (2017). HMs in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 145, 377–390.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556.
- Ma, Y., Prasad, M.N., Rajkumar, M., Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29(2), 248–258.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 174, 14–25.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Iimura, Y., Hayakawa, M. (2007). Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* sp. *Actinomycetologica*, 21(1), 32–39.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362–1375.
- Mishra, S.K., Khan, M.H., Misra, S., Dixit, V.K., Khare, P., Srivastava, S., Chauhan, P.S. (2017). Characterisation of *Pseudomonas* spp. and

- Ochrobactrum* sp. isolated from volcanic soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110, 253–270.
- Pereira, S.I.A., Barbosa, L., Castro, P.M.L. (2015). Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium-contaminated soil. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 2, 2127–2142
- Rajaganapathy, V., Xavier, F., Sreekumar, D., Mandal, P.K. (2011). Heavy metal contamination in soil, water and fodder and their presence in livestock and products: A review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(3), 234–249.
- Rashid, Mahmood, T., Mehmood, F., Khalid, A., Saba, B., Batool, A. (2013). Phytoaccumulation, competitive adsorption and evaluation of chelators metal interaction in Lettuce plant. *Environmental Engineering and Management Journal*, 13, 2583–2592.
- Roman-Ponce, B., Reza-Vázquez, D.M., Gutierrez-Paredes, S., Maria de Jesus, D.E., Maldonado-Hernandez, J., Bahena-Osorio, Y.; Estrada-de los Santose, P., Wang, T., Vasquez-Murrieta, M.S. (2017). Plant growth-promoting traits in rhizobacteria of heavy metal resistant plants and their effects on *Brassica nigra* seed germination. *Pedosphere*, 27, 511–526.
- Seneviratne, M., Gunaratne, S., Bandara, T., Weerasundara, L., Rajakaruna, N., Seneviratne, G., Vithanage, M. (2016). Plant growth promotion by *Bradyrhizobium japonicum* under heavy metal stress. *S. Afr. J. Bot.*, 105, 19–24.
- Shin, M.N., Shim, J., You, Y., Myung, H., Bang, K.S., Cho, M. (2012). Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *Journal of Hazardous Materials*, 199-200, 314–320.
- Sinha, S., & Mukherjee, S. K. (2008). Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization. *Current Microbiology*, 56(1), 55–60.
- Singh, N., Marwa, N., Mishra, S.K., Mishra, J., Verma, P.C., Rathur, S. (2015). *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant

- growth promotion in *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 25-34.
- Tiwari, S., Lata, C. (2018). Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: An overview. *Front. Plant Sci.*, 9, 452.
- Tripathi, M., Munot, H., Shouche, Y., Meyer, J., Goel, R. (2005). Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead-and cadmium resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology*, 50(5), 233–237.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117–126.
- Wang, X., Wang, G., Guo, T.T., Xing, Y., Mo, F., Wang, H., Fan, J., Zhang, F. (2020). Effects of plastic mulch and nitrogen fertilizer on the soil microbial community, enzymatic activity, and yield performance in a dryland maize cropping system. *Eur. J. Soil Sci.*, 1–13
- Weyens, N., Beckers, B., Schellingen, K., Ceulemans, R., Croes, S., Janssen, J., Haenen, S., Witters, N., Vangronsveld, J. (2013). Plant-associated bacteria and their role in the success or failure of metal phytoextraction projects: First observations of a field-related experiment. *Microb. Biotechnol.*, 6, 288–299.
- Zhang, W.H., He, L.Y., Wang, Q., Sheng, X.F. (2015). Inoculation with endophytic *Bacillus megaterium* 1Y31 increases Mn accumulation and induces the growth and energy metabolism-related differentially-expressed proteome in Mn hyperaccumulator *Hybrid pennisetum*. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 513–521.

BÖLÜM 6

MİKROPLASTİKLER SUCUL EKOSİSTEMLERDE ÜRETİCİ VE TÜKETİCİ BASAMAKLARINI NASIL ETKİLER?

Dr. Duygu ÖZHAN TURHAN¹ , Doç. Dr. Armağan KAYA²

¹ İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, TÜRKİYE
duygu.turhan@inonu.edu.tr ORCID 0000-0002-7111-4289

² Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Rafet Kayış Mühendislik Fakültesi,
Mühendislik Temel Bilimleri Bölümü, Antalya, TÜRKİYE
armagan.kaya@alanya.edu.tr ORCID 0000-0002-6776-3497

GİRİŞ

Yunanca istenilen şekle dönüştürülebilen anlamına gelen “plastikos” sözcüğünden türevlenen plastik, petrol türevlerinden üretilen polimerik yapıya sahip malzemeleri ifade etmek için kullanılır. Plastikler, yüksek sıcaklık altındaki durumlarına göre termoset (ısıtıldığında erimeyen) ve termoplastik (ısıtıldığında eriyen) olmak üzere iki kısımda incelenirler. Termoset plastikler yapılarındaki çapraz bağlar sayesinde yüksek sıcaklıklarda bile katı halde bulunurken, termoplastikler çapraz bağların bulunmaması nedeni ile yüksek sıcaklıkta akışkan bir hal alan plastiklerdir. Termoplastikler kendi içinde; düşük yoğunluklu polietilen (DYPE), yüksek yoğunluklu polietilen (YYPE), polistirene (PS), polypropylene (PP), polyethylene tetrapythalate (PET veya PETE) ve polivinilchlorür (PVC) olarak altı grupta sınıflandırılır (Önder ve ark. 2020; Kılıç ve Yüce, 2014).

Plastikler işlenmeleri ve şekillendirilmeleri kolay malzemelerdir. Bu sayede ilave katkı maddeleri ile plastiklerin özellikleri geliştirilerek daha dayanıklı plastikler üretilir. Genellikle tek kullanımlık olarak kullanılan bu malzemeler elektrik akımına, ısıca ve soğuğa karşı yalıtkan davranırlar. Ayrıca plastikler çeşitli kimyasallara karşı dayanıklı olup, toksik maddeleri üzerlerinde adsorplayarak taşıyabilirler (Yurtsever, 2018). Olumsuz yönlerine rağmen plastikler; hafifliği, dayanıklılığı ve korozyon direnci gibi özelliklerinden dolayı endüstride ve günlük yaşamda yaygın olarak kullanılmaktadır (Meng vd, 2020). Günlük yaşamımızda kullanılan neredeyse tüm ürünler plastik içermektedir (Zhang vd., 2015). Örneğin oyuncaklar,

ambalajlar, pet şişeler, paketlenme için kullanılan plastik kaplar, damacanalara ve tekstil ürünleri farklı polimer türlerinde plastikler içermektedir (Önder ve ark. 2020; Sevençan ve Vaizoğlu, 2007). Bununla birlikte 1950'li yıllardan itibaren gelişen plastik endüstrisi ile birlikte plastik atıklar günümüzde küresel bir çevre problemi haline gelmiştir. İstatistiklere göre bugüne kadar 8.3 milyar ton plastik üretilmiş ve bunun yaklaşık 6.3 milyar tonu atık haline gelmiştir ve bu atığın sadece % 9'u geri dönüştürülmüştür (Zhang ve ark. 2020). Son zamanlarda yapılan çalışmalar plastik kirliliğinin doğadaki canlılar üzerindeki olumsuz etkilerine odaklanmış ve plastiklerin çevre üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya çıkması ile birlikte konu ile ilgili çeşitli önlemler alınmaya başlanmıştır (Aydın ve ark. 2019).

MİKROPLASTİKLER

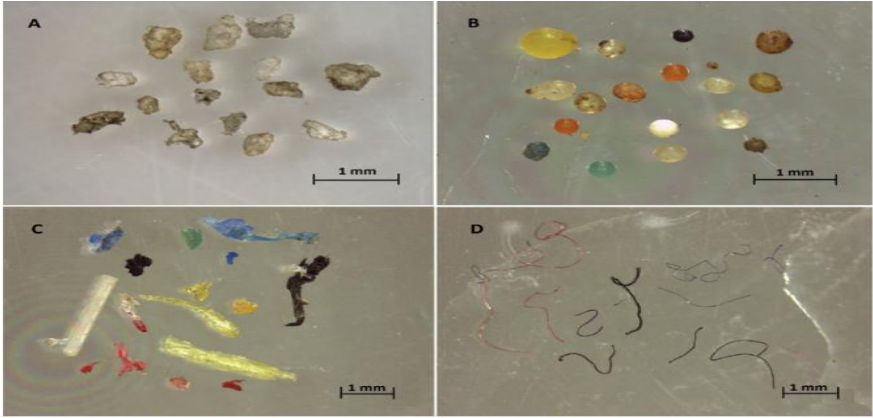
Plastiklerin parçalanması milyonlarca mikroplastik (MP) oluşumuna yol açmaktadır. MP'ler bilinen en genel tanımıyla boyutları 5 mm'den daha küçük plastik materyalleri ya da fragmentleridir (Yang ve ark. 2015). Thomson ve ark. (2004) MP'leri sedimentlerde biriken plastik parçaları olarak tanımlamıştır. Ardından Arthur ve ark. (2009) MP'lerin boyutlarını da hesaba katarak MP'lerin 5 mm'den daha küçük plastik partikülleri olduğunu ifade etmiştir. 2011 yılında ise Cole ve ark. MP'leri orijinlerine göre sınıflandırmıştır. MP'ler konusunda yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bilgiler ışığında MP'ler; boyutları 1µm-5 mm arasında değişen, düzenli ya da düzensiz şekilli, primer ya da sekonder orijinli olarak oluşabilen ve suda çözünmeyen herhangi bir sentetik katı partikül ya da polimerik madde

olarak tanımlanır (Fria ve Nash, 2019). MP'ler genel (şekilsiz, uzun, parçalanmış, kırık kenarlı), pelet şeklinde (silindirik, düz, disk, oval, küresel) ve parça şeklinde (yuvarlak, yarı yuvarlak, köşeli, yarı köşeli) olabilirler (Yurtsever, 2018). Ayrıca tanımda belirtildiği gibi MP'ler farklı kaynaklardan oluşabilirler. Temel olarak MP'ler primer ve sekonder kaynaklardan oluşmaktadır. Primer kaynaklar tekstil ürünleri, ilaçlar, kişisel bakım ürünlerinden, sekonder kaynaklar ise plastik kaplar, ağlar, filmler ve lastikler dâhil olmak üzere daha büyük plastik çöplerin UV radyasyonu, dalga, rüzgâr aşınması, hidroliz, termal bozulma ve mikrobiyal bozunma gibi süreçlerle bozulması sonucu meydana gelmektedir (Xu vd., 2020, Lenaker vd., 2019). Yani MP'ler direkt üretildiği gibi makroplastiklerin rüzgâr, hava, güneş ışığı, sularda ki dalga, akıntı, tuzluluk, canlı faaliyetleri gibi etkenlere bağlı olarak parçalanması ve aşınmasıyla da oluşmakta ve oluşan bu MP'ler nehir, göl ve denizlere geçmektedir (Mendoza ve Balcer, 2019). Bununla birlikte MP'ler son zamanlarda tarımsal alanları, şehirleri ya da endüstriyel alanları da içeren çoğu karasal ekosistemlerde de tespit edilmiştir (Rilling ve ark. 2019). MP'ler konusunda yapılan araştırmalar her ne kadar sucul ekosistemler üzerine yoğunlaşsa da aslında MP'ler sulara büyük oranda karasal kullanımların bir sonucu olarak ulaşmaktadır (Tunca, 2020). Karasal ekosistemlerde MP'ler toprak içinde birikebilir, çeşitli faktörlerin (UV, oksijen bolluğu, yüksek sıcaklık vb.) etkisi ile bozunabilir, yeraltı sularına sızabilir ya da toprakta yaşayan çeşitli canlıların vücuduna geçebilir. Aynı zamanda MP'ler sucul ekosistemlerde de önemli bir kirlilik kaynağı olup sucul organizmalarda birikebilir ve

besin zinciri yolu ile insanlara ulaşıp bir takım sağlık sorunlarına yol açabilir (Esmeray ve Armutcu, 2020).

MİKROPLASTİKLERİN SUCUL EKOSİSTEMLERDEKİ ETKİLERİ

Günlük hayatımızda sıklıkla kullandığımız plastikler sadece karasal ekosistemlerde değil aynı zamanda sucul ekosistemlerde de önemli ölçüde MP kirliliğine sebep olmaktadır. MP'ler sucul çevreye bazı tüketim ürünleri yolu ile doğrudan ya da daha büyük plastik materyallerin UV radyasyonu, fiziksel kuvvetler, hidroliz ya da termal bozunma gibi süreçler vasıtasıyla yıkımı sonucunda dolaylı olarak sucul ekosistemlere karışabilirler. Ayrıca MP'lerin çeşitli canlılar tarafından yutulması ve dokularda birikmesi de mikroplastığın sucul ekosistemlere ulaşmasının bir diğer yoludur (Kalcıkova ve ark. 2017; Tunca, 2020). Şekil 1'de doğrudan ya da dolaylı yolla sucul ekosistemlere karışan bazı MP örnekleri görülmektedir. Son yıllarda MP'lerin deniz habitatlarında (Cole ve ark., 2011) ve çeşitli tatlı su ekosistemlerindeki (Baldwin et al., 2017) varlığı defalarca kez tespit edilmiştir. Özellikle gündelik hayatımızda sıklıkla kullanılan losyon, sabun, diş macunu gibi kişisel bakım ürünleri ve kozmetik ürünler tatlı su sistemlerinde MP'lerin önemli bir kaynağını oluşturmaktadır (Kalcıkova ve ark. 2017).



Şekil 1. Primer (A ve B) ve Sekonder (C ve D) Mikroplastik Örnekleri. A ve B Kişisel bakım ürünlerinden türetilen mikroboncuklar. C ve D daha büyük plastiklerin veya sentetik tekstil fiberlerinin parçalanması sonucu oluşan parçacıklar (Talvitie ve ark. 2017)

Literatürde MP'lerin deniz ve tatlı sularda yaşayan omurgalı ve omurgasız hayvanlar üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Sucul ekosistemlerde MP'ler sadece hayvansal organizmaları değil aynı zamanda sucul bitkileri de etkilemektedir (Kalcıkova ve ark. 2017). Sucul organizmalar, MP'ler tarafından kirletilmiş suları ya da mikroplastığe maruz kalmış diğer organizmaları tüketerek MP ile kontamine olabilmekte ve bu kontaminasyon besin zinciri boyunca insanlara kadar ulaşarak insan sağlığını tehlikeye atabilmektedir. MP'ler deniz suyundan çeşitli kimyasalları, toksinleri ya da metalleri emerek deniz canlılarına aktarma yeteneğindedir. Birçok deniz canlısının insanlar için temel gıda maddeleri olduğunu düşünürsek MP'lerin bu canlılar vasıtası ile insanlara ulaşması kaçınılmazdır (Esmeray ve Armutcu, 2020). Bu nedenle MP'lerin başta insan sağlığı olmak üzere çevre üzerinde gösterdiği tüm olumsuz etkilerin önüne geçebilmek için sadece karasal

ekosistemlerde değil aynı zamanda sucul ekosistemlerde de kontaminasyon yollarının ve etkilerinin araştırılması önemlidir. Bu bölümde MP'lerin sucul ekosistemler üzerine etkilerini ayrıntılı bir şekilde analiz etmek amacıyla kirlilik araştırmalarında yaygın olarak kullanılan üretici ve tüketici basamaklarındaki bazı organizmalarda mikroplastığın etkileri ayrı ayrı değerlendirilecektir.

MİKROPLASTİKLERİN ÜRETİCİ BASAMAKTA BULUNAN BAZI MODEL ORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİLERİ

Mikroplastiklerin *Chlorella* Üzerine Etkileri:

Mikroalgler okyanuslarda, denizlerde ve tatlı sularda dağılım gösteren, genellikle kıyı şeritlerinde, çökeltelerde, plajlarda ve atık sularda bulunan organizmalardır (Song ve ark. 2020). Besin ağlarının birincil üretici basamağında yer alan mikroalgler; oksijen üretme, yüksek trofik seviyeler için besin sağlama ve ekosistemlerin devamlılığını koruma gibi önemli görevlere sahiptir (Wang ve ark. 2020). Bu organizmalar, MP ve nanoplastik (NP)'ler gibi kontaminantlardan aşırı derecede etkilenmektedir. MP'ler, mikroalglerin hücre büyümesini engellemekte ve hücre hasarına neden olmaktadır (Fu ve ark. 2019). Sucul ekosistemde kirleticilere karşı oldukça duyarlı olan *Chlorella* cinsine ait türler, ekotoksosite testlerinde model organizma olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark. 2020).

Fu ve ark. (2019) tarafından yapılan bir araştırmada, düşük konsantrasyonda polivinil klorürün *Chlorella vulgaris*'in hücre

büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği, yüksek konsantrasyonda ise herhangi bir inhibisyona neden olmadığı gözlenmiştir. Bu durumun yüksek konsantrasyonda polivinil klorürün çökmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Hazem ve ark. (2020) polistiren kontaminasyonunun *C. vulgaris*'de hücre canlılığında azalma ve ROS üretiminde artışa neden olduğunu rapor etmiştir.

MP'ler mikroalglerde klorofil içeriğinin ve fotosentetik aktivitenin azalmasına yol açmaktadır. MP'ler fotosistem II reaksiyon merkezini ve elektron taşıma zincirlerini etkileyerek fotosentezi engelleyebilmekte ve oksidatif stresten sorumlu reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olmaktadır (Bhattacharya ve ark. 2010).

Mikroplastiklerin Sumercimekleri Üzerine Etkileri

Lemnoideae alt familyasına ait türleri içeren sumercimekleri, tatlı sularda bulunan, su yüzeyinde yüzerek ya da kısmen batık olarak yaşayan çok yıllık otsu bitkilerdir. Birçok kirlilik çalışması için önemli bir model bitki olarak kullanılan su mercimekleri aynı zamanda yüksek protein içeriği sayesinde balık ya da diğer hayvanlar için de önemli bir besin maddesi olarak bilinmektedir (Coşkun ve ark. 2018). Özellikle son yıllarda MP kirliliğinin önemli bir çevre problemi haline gelmesi üzerine konu ile ilişkili çalışmalar artmış ve sucul ekosistemler üzerinde yapılan çalışmaların bir kısmı su mercimekleri üzerine odaklanmıştır.

Kokalj ve ark. (2019), primer kökenli MP uygulamasının su mercimeğinin kök uzunluğunu azalttığını ifade etmiştir. Mateos-

Cárdenas ve ark. (2019) ise polietilen mikroplastiklerin su mercimeği tarafından güçlü bir şekilde adsorblandığını ancak bitkide fotosentez ve büyüme üzerine etki etmediğini rapor etmiştir. Ayrıca araştırmacılar Lemna tarafından tutulan MP'lerin bir su omurgasız olan *Gammarus duebeni*'e besin zincir yolu ile transfer edilebildiğini belirtmiştir. Bu bulgulara benzer şekilde Kalcıkova ve ark. (2017) polietilen MP'lerin sumercimeğinde yaprak gelişimi ve fotosentetik pigmentleri olumsuz yönde etkilemediğini ancak kök gelişimini belirgin şekilde etkilediğini ifade etmiştir (Kalcıkova ve ark. 2017). Kalčíková ve ark (2020) MP'lerin yapay olarak bozulmasının onların özelliklerini değiştirdiğini belirtmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada bozulmamış MP'lere kıyasla bozulmuş MP'lerin daha fazla gümüş absorbladığını ve gümüş adsorblamanın etkisi ile MP'lerin *Lemna minor* ve *Daphnia magna* üzerinde daha toksik bir potansiyele sahip olduğunu belirtmiştir (Kalcıkova ve ark. 2020).

MİKROPLASTİKLERİN TÜKETİCİ BASAMAKTA BULUNAN BAZI MODEL ORGANİZMALAR ÜZERİNE ETKİSİ

MP kontaminasyonuna maruz kalan sucul organizmalar, bu sentetik maddeleri doğal avlarından ayırt edemeyerek veya istemeyerek yutmakta ve bu durum trofik seviyelerde bozulmalara neden olmaktadır (Anbumani ve ark. 2018). Sucul ortamda MP'lerin yutulması zooplankton, balık, amfibi gibi organizmalarda gözlenmektedir (Rehse ark. 2016). Organizmalar; biyolojik olarak parçalanamadıkları için MP'lere karşı oldukça hassastır. MP'ler

tüketici organizmaların vücut dokularında veya sıvılarında birikerek iltihaplanma sebep olmakta ayrıca bağırsağın tıkanması, beslenmenin ve sindirimin bozulması gibi olumsuz durumlara yol açmaktadır (Jemec ve ark. 2016).

Mikroplastiklerin *Daphnia* Üzerine Etkileri:

Cladocera grubundan olan *Daphnia* türleri ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılan önemli zooplanktonik model organizmalardandır (Castro ark. 2020). MP partiküllerinin *Daphnia* tarafından yutulması partikülün tipine, boyutuna ve şekline bağlıdır.

Literatürde MP'lerin *Daphnia* üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin Jaikummar ve ark. (2019) hem bozulmamış (PMP) hem de yapay olarak bozulmuş (SMP) MP'lerin *D. magna* üzerine toksik etkileri araştırmış ve her iki tip MP'nin de maruz kalan bireylerde üreme verimliliğini azalttığını ifade etmiştir. Ayrıca MP kontaminasyonu *Daphnia* yavrularının vücut uzunluğunun azalmasını teşvik etmiştir. Yin ve ark. (2020), 5.8 µm partikül boyutuna sahip olan polistirenin (PS) düşük PS konsantrasyonlarda (0.5 mg/L), *D. magna*'nın üremesi üzerinde önemli etkiye neden olmazken, 2 mg/L ve üstü konsantrasyonlarda ilk kuluçka süresinin uzamasına, kuluçka sayısının sınırlanmasına ve toplam neonat sayısının azalmasına neden olduğunu belirtmiştir. Araştırmacılar neonat sayısının azalmasını, organizmaların sindirim sisteminde oluşan fiziksel hasarla ve gıda alımının engellenmesiyle ilişkilendirmiştir. MP'lerin etkilerini inceleyen bir diğer araştırmada tekstil ürünlerinden kaynaklanan mikrofiberlere 48 saat boyunca

maruz kalan *D. magna* türüne ait bireylerin, bağırsak bölgesinde 300 ile 1400 µm uzunluğunda sentetik lifler tespit edilmiş ve ölüm oranlarında artış gözlenmiştir. Ölüm oranında ki bu artışın, mikrofiberler tarafından bağırsakta meydana gelen tıkanmadan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Jemec ve ark. 2016). Bosker ve ark. (2019) 21 gün boyunca MP'e maruz kalan bireylerin biyokütlelerinde %21 oranında azalma görüldüğünü ve bu azalmanın bağırsaktaki MP birikimi ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir. Rosenkranz ve ark. (2009) *D. magna*'nın bağırsak epitelindeki 0.01 ve 1 mm boyutundaki MP'leri hızla sindirebildiğini ve lipit damlacıklarında biriktirdiğini rapor etmiştir.

Mikroplastiklerin Zebra Balığı Üzerine Etkileri:

Zebra balığı (*Danio rerio*) , küçük boyutlu olması, üreme ve yetiştirme kolaylığı nedeniyle toksikolojik çalışmalarda omurgalı modeli olarak kullanılan tropikal tatlı su balığıdır (Lei ve ark. 2018).

Polistiren kirliliğine maruz kalmak balık üreme organlarını olumsuz etkileyebilmektedir. 100 µg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarda polistirene maruz kalan hem erkek hem de dişi zebra balıklarının karaciğer ve gonadlarında reaktif oksijen türlerinin seviyesi artmaktadır (Qiang ve Cheng, 2021). Ayrıca polistiren zebalarda vücut ağırlığını azaltmaktadır (Zhao ve ark. 2020). Jin ve ark. (2018), farklı boyut ve konsantrasyonlarda polistirene maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarında bağırsak mikrobiyotasının değiştiğini, polistirenin bağırsak mukus hacmini etkilediğini ve bu durumun balıkların bağırsaklarında mikrobiyota disbiyozuna neden olduğunu

rapor etmiştir. Lu ve ark. (2016) tarafından 5 ve 20 µm boyutunda polistiren partiküllerine maruz bırakılan yetişkin zebra balıklarında; 5 µm boyutundaki partiküllerin solungaçlarda, karaciğerde ve bağırsakta birikirken, 20 µm boyutunda ki partiküllerin ise solungaçlarda ve bağırsakta biriktiği ifade edilmiştir.

Zebra balığı dokularında MP alım yetenekleri oldukça farklıdır. Zebra balıklarında en fazla MP birikiminin gastrointestinal (GIT) sistemde olduğu bunu solungaçların izlediği, buna karşın beyinde ve kasta MP birikiminin olmadığı rapor edilmiştir. Bu durum kas dokusuna giren parçacıkların genellikle önce dolaşım sistemine girmesinden kaynaklanabilir. Beyin dokusunda birikimin olmaması ise, kan-beyin bariyeri (BBB) ile ilişkili olabilir. Çünkü BBB, beynin mikro çevresini korumak için çoğu madde için aşılmaz bir engel oluşturmaktadır ve sadece moleküler ağırlığı 400 Da'dan küçük olan lipofilik kimyasalların bu bariyeri geçebileceği bilinmektedir.

MP'lerin şekli de onların organizmadaki birikimini etkilemektedir. Qiao ve ark. (2019), üç farklı şekilde (boncuk, fragman, lif) MP'nin birikimini incelemiş ve bağırsakta şekle bağlı olarak birikimi sırası ile lif>fragman>boncuk olarak gözlemlemiştir. Araştırmacılar küresel olmayan MP'lerin, küresel MP'lerden daha uzun bağırsak geçiş süresine sahip olabileceğini ifade etmiş ve MP birikmesinin bağırsakta mukozal hasar, geçirgenliğin artması, iltihaplanma ve metabolizma bozulması gibi çok sayıda toksik etkiye neden olduğunu rapor etmiştir.

KAYNAKÇA

- Anbumani, S. and Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25,14373–14396.
- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., (2009). Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects, and fate of microplastic marine debris. NOAA marine debris program. September 9-11, 2008, University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA.
- Aydın, S., Ulvi, M., Aydın, M.E., Ulvi, A. (2019). Mikroplastikler ve çevresel etkileri, 4. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi, Yalova.
- Baldwin, A.K., Corsi, S.R., Mason, A. S. (2017). Plastic Debris in 29 Great Lakes Tributaries: Relations to Watershed Attributes and Hydrology. *Environmental Pollution* 230, 1108-1115.
- Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J.P., Ke, P.C. (2010). Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry*, 114:39, 16556-16561.
- Bosker, T., Olthof, G., Vijver, M.G., Baas, J., Barmantlo, H. (2019). Significant decline of *Daphnia magna* population biomass due to microplastic exposure. *Environmental Pollution*, 250, 669-675.
- Castro, G.B., Bernegossi, C.A., Felipe, C.M., Corbi, J.J. (2020). Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics? *Journal of Environmental Science And Health, Part A*, 55 (8), 935-946.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.
- Coşkun, Ö.F., Aydın, D, Akıska, S., Özel, H.B., Varol, T. (2018). Türkiye’de Yayılış Gösteren Sumercimeğil Üyelerinin Belirlenmesi. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 20 (1): 145-151.

- Esmeray, E., Armutcu, C. (2020). Mikroplastikler, Çevre-İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri ve Analiz Yöntemleri, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8, 839-868.
- Frias, J.P.G.L., Nash, R., (2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin* 138, 145–147.
- Fu, D., Zhang, Q., Fan, Z., Qi, H., Wang, Z., Peng, L. (2019). Aged microplastics polyvinyl chloride interact with copper and cause oxidative stress towards microalgae *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, 216,105319.
- Hazeem, L.J., Yesilay, G., Bououdina, M., Perna, S., Çetin, D., Suludere, Z., Barras, A., Boukherroub, R. (2020). Investigation of the toxic effects of different polystyrene micro-and nanoplastics on microalgae *Chlorella vulgaris* by analysis of cell viability, pigment content, oxidative stress and ultrastructural changes. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111278.
- Jaikumar, G., Brun, N.R., Vijver, M.G., Bosker, T. (2019). Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure. *Environmental Pollution*, 249, 638-646.
- Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., Krzan, A. (2016). Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 219, 201-209.
- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution*, 235, 322-329.
- Kalcíkova, G., Gotvajn, A.Z., Kladnik, A., Jemec, A., (2017). Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*, *Environmental Pollution* 230 (2017) 1108-1115.
- Kalcíkova, G., Skalar, T., Marolt, G., Kokalj, A.J. (2020). An environmental concentration of aged microplastics with adsorbed silver significantly affects aquatic organisms. *Water Research* 175, 115644.
- Kılıç, M., Yüce, A.E., (2014). Katkılı PVC ve PET Atıkların Seçimli Flotasyonu Bölüm 1: Plastikler; Çevresel Etkileri; Geri Dönüşümü, *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 29(2), 79-93.

- Kokalj, A.J., Kuehnel, D., Gotvain, A.Z., Kalcıkova, G. (2019). An exploratory ecotoxicity study of primary microplastics versus aged in natural waters and wastewaters. *Environmental Pollution* 254, 112980.
- Lei, L., Wua, S., Lu, S., Liua, M., Songa, Y., Fu, Z., Shi, H., Susman, K.M., Hea, D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment*, 619:620, 1–8.
- Lenaker, P.L., Baldwin, A.K., Corsi, S.R., Mason, S.A., Reneau, P.C., Scott, J.W. (2019). Vertical distribution of microplastics in the water column and surficial sediment from the Milwaukee River Basin to Lake Michigan. *Environmental Science Technology*, 53, 12227–12237.
- Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., Ren, H., (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental Science Technology* 50, 4054–4060.
- Mateos-Cárdenas, A., Scott, D.T, Seitmaganbetova, G., van Pelt, FNAM, O'Halloran, J., Jansen, M.A.K (2019). *Science of the Total Environment* 689, 413–421.
- Mendoza, L.M.R. and Balcer, M. (2019). Microplastics in freshwater environments: A review of quantification assessment. *Trends in Analytical Chemistry* 113, 402-408.
- Meng, Y., Kelly, F.J., Wright, S.L. (2020). Advances and challenges of microplastic pollution in freshwater ecosystems: A UK perspective. *Environmental Pollution*, 256, 113445.
- Önder, S. , Günal, Ç.A., Sepici Dinçel, A. (2020). Plastikleri Attığımızda Ne Oluyor? Mikroplastikler, *Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi*, Sayı 3(4): 181-186.
- Prata, J.C., Costa, J.P., Lopes, I., Duarte, A.C., Santos, T.R. (2019). Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review. *Science of The Total Environment*, 665, 400-405.

- Qiao, R., Deng, Y., Zhang, M., Wolosker, B., Zhu, Q., Ren, H., Zhang, Y. (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, 236, 124334.
- Qiang, L. and Cheng, J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 263, 128161.
- Rehse, S., Kloas, W., Zarfl, C. (2016). Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 153, 91-99.
- Rilling, M., Lehmann, A., Machado, A.S., Yang, G. (2019). Microplastic effects on plants. *New Phytologist*, 223(3), 1066-1070.
- Rosenkranz, P., Chaudhary, Q., Stone, V., Fernandes, T.F. (2009) A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 28: 2142–2149.
- Sevencan, F., Vaizoğlu, S.A. (2007). PET ve Geri Dönüşümü, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 6 (4): 307-312.7
- Song, C., Liu, Z., Wanga, C., Li, S., Kitamura, Y. (2020). Different interaction performance between microplastics and microalgae: The bio-elimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC-0025. *Science of the Total Environment*, 723, 38146.
- Talvitie, J., Mikola, A., Koistinen, A., Setela, O., (2017). Solutions to microplastic pollution e Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment Technologies. *Water Research* 123, 401-407.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, AWG., McGonigle, D., Russell, A.E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304 (5672), 838.
- Tunca E.Ü. (2020). Küresel Tehdit Mikroplastiklerin Kaynakları, Adsorpsiyonu ve Toksisitesi, *Turkish Journal of Maritime and Marine Sciences*, 6 (2), 120-136.

- Wang, F., Wang, B., Qu, H., Zhao, W., Duan, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Yu, G.(2020). The influence of nanoplastics on the toxic effects, bioaccumulation, biodegradation and enantioselectivity of ibuprofen in freshwater algae *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Pollution*, 263, 114593.
- Xu,S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., Miao, A.J. (2020). Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 703, 134699.
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Jabeen, K., Kolandhasamy, P. (2015). Microplastic Pollution in Table Salts from China, *Environ. Sci. Technol.* 49, 22.
- Yin, C., Yang, X., Zhao, T., Watson, P., Yang, F., Liu, H. (2020). Changes of the acute and chronic toxicity of three antimicrobial agents to *Daphnia magna* in the presence/absence of micro-polystyrene. *Environmental Pollution*, 263,114551.
- Yurtsever, M. (2018). Küresel Plastik Kirliliği, Nano-Mikroplastik Tehlikesi ve Sürdürülebilirlik, Çevre Bilim ve Teknoloji, Yayın Yeri:Güven Plus Grup A.Ş. Yayınları, Editör: Ayşegül Akdoğan Eker, Fatma İter Türkdoğan, Fatma Gülen İskender, Neşe Tüfekçi, Süleyman Övez, Basım sayısı:1, ISBN:978-605-7594-06-8, sayfa:171-197.
- Zhang, W., Zhang S., Zhao, Q., Qu, L., Ma, D., Wang, J. (2020). Spatio-temporal distribution of plastic and microplastic debris in the surface water of the Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin* 158, 111343.
- Zhang, K., Gong, W., Lv, J., Xiong, X., Wu, C. (2015). Accumulation of floating microplastics behind the Three Gorges Dam. *Environmental Pollution*, 204, 117-123.
- Zhao, Y., Bao, Z., Wan, Z., Fu, Z., Jin, Y. (2020). Polystyrene microplastic exposure disturbs hepatic glycolipid metabolism at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels in adult zebrafish. *Science of the Total Environment*, 710, 136279.

BÖLÜM 7

NANOMALZEMELERİN/NANOPARTİKÜLLERİN HÜCRE, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE BİYOMEDİKAL UYGULAMALARI

Doç. Dr. Yeşim DAĞLIOĞLU¹, Doç. Dr. Betül YILMAZ ÖZTÜRK²

¹ Ordu üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu, Türkiye. yozkan52@gmail.com. ORCID 0000-0001-8740-1162

² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM), Eskişehir, Türkiye. byozturk@ogu.edu.tr ORCID 0000-0002-1817-8240

GİRİŞ

Nanobilim, olguların incelenmesi ve malzemelerin 100 nanometre ile atomik seviyeye (yaklaşık 0,2 nm) kadar değişen boyutlarda manipülasyonu olarak tanımlanır. Bu boyut aralığında malzemeler artan nispi yüzey alanı ve kuantum etkileri nedeniyle, aynı malzemenin daha büyük boyutlarından daha farklı mekanik ve kimyasal özelliklere sahip olabilir. Aslında, partiküller boyut olarak küçüldükçe, içindeki atomlarla karşılaştırıldığında yüzeyinde daha çok oranda atom bulunur. Örneğin, 30 nm boyutundaki nanopartikülün (NP'ün) atomlarının %5'i yüzeyde bulunurken 3 nm boyutundaki NP'ün atomlarının %50'si yüzeyde bulunur. Böylece, NP'ler daha büyük partiküllere kıyasla birim kütle başına çok daha büyük bir yüzey alanına sahiptir. Büyüme ve katalitik kimyasal reaksiyonlar yüzeylerde meydana geldiği için, NP formundaki malzemenin kütlesi büyük partiküllerin kütlesinden çok daha reaktiftir. Yüzey alanı etkileri ile, kuantum etkileri nano boyutta maddenin özelliklerine hâkim olarak malzemelerin optik, elektriksel ve manyetik davranışlarını etkileyebilir. Nanomalzemeler, boyutlarından en az birinin nanometrik ölçeği nedeniyle tanımlanmış nano-nesnelere oluşur¹. Nanometre boyut aralığında yüksek kontrollü özelliklere sahip çeşitli nanoyapıların artan mevcudiyeti, biyoteknolojik sistemlerde kullanımlarında yaygınlaşan bir ilgi uyandırmıştır. NP'lerin boyutu, birçok ortak biyomolekülün boyut aralığına benzer olup, hibrid sistemlerde doğal biyomoleküller gibi görünmesini sağlar². Daha önemlisi, nanoyapılar biyoteknolojik uygulamalara yeni ve benzersiz özellikler kazandırmıştır. Ayrıca, geliştirilmiş sulu çözünürlük,

biyoyumluluk veya biyotanıma için yüzey katmanlarının değiştirilmesi gibi biyolojik sistemlerle entegrasyonlarına daha iyi uyacak şekilde nanoyapılarda değişiklik yapılabilir². Nanoyapı yüzeylerine bağlı seçilmiş biyomoleküller ile biyoalgı ve görüntüleme gibi uygulamalar için yeni hibrid nanoyapılar elde edilebilir veya nanoyapılar, malzeme özelliklerini değiştirmek veya yeni işlevler kazandırmak için diğer biyoyumlu malzemelere gömülebilir².

Nanobiyoteknoloji, biyoteknoloji ve nanoteknolojinin kesişmesi ile oluşan bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı, atomik ölçekli makinelerin moleküler düzeyde biyolojik sistemlerin birleştirilmesini taklit ederek veya atomlar tarafından doğal yapı özelliklerini; atomu incelemek veya değiştirmek için küçük aletler oluşturmayı da sağlayan hibrid bir disiplindir. Bu nedenle, nanobiyoteknoloji nano ölçek özellikleri, moleküler ve biyolojik nanoyapı uygulamalar ile ilgili olması nedeniyle, kimyasal, biyolojik ve fiziksel bilimler arasında arayüz konumundadır. Bu teknolojinin inovasyon yaratır ve ilaç dağıtımı, gen tedavisi, moleküler görüntüleme, biomarker ve biyosensörler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda hayati bir rol oynar¹.

1. NANOPARTİKÜLLERİN MOLEKÜLER BİYOLOJİDE UYGULAMALARI

1.1. Nanopartiküllerin sensör uygulaması

NP'ler, çok düşük konsantrasyonlarda analitlerin teşhis edilmesi, patojenlerin tespit edilmesi ve ayrılması, hücrelerin belirlenmesi ve yakalanmasının yanısıra moleküler ve hücresele fonksiyonların saptanması dâhil olmak üzere çeşitli uygulamalar için sensörlerde kullanılmıştır.

1.2. Nanopartiküllerin analit tespiti

DNA, RNA ve proteinler gibi biyolojik analitler için yeni algılama tekniklerinin geliştirilmesi, bu analitlerin düşük konsantrasyonlarda daha hassas ve etkili bir şekilde tespitine yol açmaktadır. Bu yeni tekniklerin birçoğu, NP'lerin, büyük yüzey alanı, kütle oranı, küçük boyutu ve bileşimine bağlı benzersiz özelliklerinden faydalanmıştır. NP'lerin bu özellikleri, algılama eşiğini yükseltmek veya daha hızlı saptama sağlamak için yüzey ligandlarının kullanımını sağlar³. NP'leri hedefleme ligandları ile kolayca işlevsel hale getirme yeteneği analitlerin bağlanması ve sinyallemesinde özgünlüğünü sağlayarak etkili bir saptama sağlar. NP biyosensörlerin geliştirilmesi öncelikle inorganik NP'lerin, özellikle metalik veya manyetik NP'lerin kullanımına odaklanılmıştır. Özellikle altın NP'leri yüzey kimyalarından dolayı sensör olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sinyal transdüksiyon amplifikasyonu için altın NP'lerin eşsiz yüzey kimyasını kullanmanın bir yöntemi Mirkin grubu tarafından geliştirilen biyo-barkod yöntemidir. Bu yöntem, protein ve DNA hedef tespiti için uygulanmıştır⁴⁻⁵. Alzheimer hastalığı için çözünür patojenik biomarker sitokinlerin saptanması⁶ ve prostat kanserinin varlığını gösterebilen kanser biyo-belirteci olan prostat spesifik antijen (PSA)'ı saptamak⁷ için bu yöntem kullanılmıştır. Nano sensörlerde, SPION'ler gibi manyetik NP'lerin manyetik özelliklerinden yararlanarak geliştirilmiştir. Güçlü manyetik özelliklere sahip oldukları ve çoğu biyolojik numunenin ihmal edilebilir manyetik duyarlılık sergiledikleri için manyetik NP'lere önemli ölçüde ilgi vardır. SPION'ler, manyetik partiküllerin sensör yüzeyine bağlanmasına dayanan dev magneto-resistive (GMR)

biyosensörleri dâhil birçok farklı sensör tipi için manyetik etiket olarak kullanılmıştır⁸.

1.3. Nanopartiküllerin patojen tespit ve ayrımı için kullanımı

Kompleks karışımlardan belirli hücrelerin verimli izolasyonu, biyolojik araştırmalar ve birçok biyolojik uygulama için gereklidir. NPler, düşük frekansta (az yoğunlukta) bulunan spesifik hücre tiplerinin ve hücrelerin saptanması için hassas araçlar olarak araştırılmıştır. Örneğin, dolaşımdaki tümör hücrelerinin saptanması ve yakalanması amacıyla uygulanmıştır. Çünkü dolaşımdaki tümör hücreleri, metastatik meme, kolorektal ve prostat kanserli hastalarda genel sağkalım için güçlü bir prognostik biomarker olarak tanımlanmış olmakla beraber kanser metastazının biyolojisinin anlaşılmasına yardımcı olabilecek potansiyeli taşımaktadır⁹⁻¹⁰. Bunun haricinde NP immünomagnetik teknikler, dolaşımdaki tümör hücrelerinin tanımlanması ve yakalanması için daha sık kullanılan yöntemlerden bazılarıdır. Bu teknikte, ligand-reseptör bazlı mekanizma kullanarak dolaşımdaki tümör hücrelerinin hedeflenmesi ve izole edilmesi için manyetik NP'ler kullanılır.

Hücrelerin tanımlanması ve ayrılması için diğer teknikler, doğal olarak oluşan işlemlerden yararlanan biyomimetik nanoteknolojinin kullanımını içerir. Bu amaçla, hücrelerin tanımlanması ve ayrılması için mikroakışkan cihazların geliştirilmesi için biyomimetik yaklaşımlar araştırılmıştır. Bu cihazlar, hücre döngülerinin doğal sürecini kullanırlar. Bu, kanser hücreleri üzerindeki endotelial venüller ve glikoprotein reseptörleri üzerinde eksprese edilen selektif moleküller arasındaki yapışkan

etkileşimlerinden kaynaklanır¹¹. Son zamanlarda, selektin kullanan hücre döngüleme işlemi, geliştirilmiş yüzey duyarlılığı ve özgüllüğü için dolaşımdaki tümör hücrelerinin tespitine uygulandı¹¹⁻¹³ Yedinci nesil (G7) poli (amidoamin) (PAMAM) dendrimerler, çoklu ligandların çoklu reseptörlere (multivalent bağlanma) eşzamanlı olarak bağlanması için hücre yakalama yüzeylerini oluşturmak için de kullanılmıştır¹⁰.

1.4. Nanopartiküllerin görüntüleme ajanı olarak kullanımı

NP'ler moleküler görüntülemeye yeni etiketler ve kontrast maddeler olarak araştırılmıştır. NP'lerin benzersiz özellikleri, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklarla ilişkili hücre cevaplarının yanı sıra moleküler hedeflerin hassas ve spesifik olarak izlenmesini sağlayabilir¹⁴.

1.5. Nanopartiküllerin hedeflenen görüntüleme için kullanımı

NP'lerin hedeflenen görüntüleme için birçok umut verici özelliği vardır. Birincisi, NP'ler yüzey alanlarından dolayı bir seferde çok sayıda görüntüleme ajanı sağlayabilir ve hassasiyeti artırabilir¹⁵. İkincisi, NP'ler permeabilite ve retensiyon etkisiyle (EPR) *in vivo* dokuları pasif olarak hedefleyebilir veya moleküler hedefin ifade edildiği yerlerde birikerek, kontrast maddelerinin lokal konsantrasyonunu artırarak hedeflenebilir. NP modifikasyonu için yüksek kapasite, *in vivo* görüntüleme için amplifikatörler olarak kullanılmalarını sağlar. Son olarak, çok modlu görüntülemeyi gerçekleştirmek için birkaç farklı görüntüleme aracı sunabilirler. Özellikle kuantum noktaları (KN'ler) gibi inorganik NP'ler,

hücreSEL görüntüleme için en umut verici floresan etiketler arasındadır. KN'ler, belirli dalga boylarında ışık yayabilir ve ayrıca, doku otofloresansının azaldığı ve uyarma ışık penetrasyonunun arttığı spektrumun NIR bölgesinde yayılmak üzere ayarlanabilir¹⁶. Çok işlevli KN'ler, hücrelerdeki tek tek proteinleri ile metastaz ve gelişimleri boyunca hücre hareketine katılan reseptörleri izlemek için kullanılmıştır^{12,17-19}. KN'ler, integrin $\alpha 3$ 'ün hedeflenmesi için arginin-glisin-aspartik asit (RGD) peptid-konjuge NIR QDS kullanımı gibi spesifik tümör biyobelirteçlerinin görüntülenmesi için kullanılmıştır²⁰.

1.6. Nanopartiküllerin Dağıtım araçları olarak kullanılması

1.6.1. Biyolojik çalışmalar için siRNA verilmesi

RNA interferansı (RNA girişimi=RNAi), hücre kültüründe ve canlı organizmalarda kullanım için önemli bir biyolojik araçtır. Geleneksel olarak gen fonksiyonlarını incelemek için kullanılır, çünkü sekansa özgü çift zincirli RNA'ların hücrelere girmesinden sonra mRNA'nın hedeflenmiş bozulmasını sağlar. Etkili siRNA uygulaması için bazı biyolojik engellerin üstesinden gelinmesi gerekir. Bu zorluklar, yüksek molekül ağırlığı ve negatif yükler nedeniyle hücreye girme zorluğu, hücre içindeki nükleazlar tarafından bozulma, uygun hücre kompartmanlarına hedefleme, *in vivo* hızlı temizleme ve kararsızlıklardır²¹⁻²². Bu nedenle, RNAi potansiyelini gerçekleştirmek için verimli ve biyo-uyumlu dağıtım sistemlerine ihtiyaç vardır. NP'ler siRNA dağıtımında zorluklara potansiyel bir çözüm sunmaktadır. Katyonik lipid veya polimer NP'ler, nükleik asitlerle yoğunlaştırılmış kompleks oluşturma yeteneklerinden

dolayı anyonik nükleik asitleri hücrelere taşımak için kullanılmış olup enzimatik bozulmadan korur. Katyonik maddeler ayrıca NP'lerin endozom/lizozomlarda sekestrasyondan kaçmasına yardımcı olabilir. Endozom/lizozomların pH ortamında proton haline gelen katyonik polimer polietilenimin (PEI) içindeki nitrojenler gibi gruplar, asidik pH'da protonasyona yanıt olarak Cl^- akışını artırarak endozomal kaçıışı kolaylaştırabilir. Sonuç olarak, ozmotik basınçta ve şişmede bir artış meydana gelir. Bu da organelin patlamasına ve siRNA NP'lerin verilmesine yol açar. Bu olay “proton sünger etkisi” olarak adlandırılır. Bununla birlikte, yakın tarihli bir çalışmada, katyonik lipid NP sisteminde siRNA uygulamasının, içselleştirilmiş siRNA'nın yaklaşık %70'inin, geç endozom lizozomlardan lipid NP'lerinin çıkmasına bağlı olarak hücre dışı ortama geri dönüştürüldüğü için büyük ölçüde azaldığı gösterilmiştir^{11,23}. Böylece, geri dönüşüm yollarından kaçabilen yeni NP araçları tasarlanarak siRNA teslimatı geliştirilebilir. Nükleik asitlerin NP uygulamasının endositik olmayan alımlarının aktif hedefleme yöntemleri de füzojenik peptidler ve hücre-penetrans peptidler kullanılarak araştırılmıştır²⁴. siRNA NP'lerin biyolojik sistemlerle etkileşimlerini daha iyi anlamak için siRNA problemleri, hücre içi trafiğin yanı sıra siRNA NP'lerinin montajı ve demontajını incelemek için kullanılmıştır²⁵⁻²⁷. Son zamanlarda, NP'ler, immün hücrelerde genleri susturmak için siRNA'yı iletmek için kullanılmıştır, çünkü bu hücreler homeostazi ve hastalıkta önemli rollere sahip olabilir²⁸. Örneğin, bir çalışmada NP'ler, bağırsak iltihabında molekülün tam rollerini belirlemek için *in vivo* olarak lökositlerde hücre döngüsü düzenleyici molekülü olan Cyclin D1'i (CyD1) susturmak için kullanmışlardır²⁸. Çalışmada NP'ler, CyD1 siRNA'sı ile

yüklendi ve $\beta 7$ integrin'e karşı antikorlar ile fonksiyonel hale getirildi. Sonuçta, hedeflenmiş NP'lerin lökositlerde CyD1'i susturduğu ve lökosit proliferasyonunu ve T yardımcı hücre 1 sitokin ekspresyonunu baskılayarak farelerde deneysel olarak indüklenen koliti tersine çevirdiği gözlenmiştir²⁸. Diğer bir çalışmada, immün hücrelerde hastalık genlerini susturmak için siRNA'nın *in vivo* olarak iletilmesi için lipit NP'leri kullanılmıştır^{12,29}. Çalışma, insan dışı primatların miyeloid hücre tiplerinde siRNA aracılı susturmayı ve kemirgen miyeloid hücrelerinde çoklu gen hedeflerinin hedeflenmesinin uygulanabilirliğini göstermiştir. Terapötik potansiyel, tümör nekroz faktörü-a'yı (TNF α) hedefleyen siRNA kullanılarak doğrulanmıştır. Başka bir çalışmada, non alkolik steatohepatiti (NASH) tetikleyen immünolojik mekanizmaları araştırmak için NP'ler kullanılmıştır²⁹. Araştırmacılar, Kupffer hücreleri tarafından üretilen TNF α 'nın, geliştirilmiş IP-10 ve MCP-1 kemokinleri üretimi yoluyla NASH'ın gelişimini tetikleyebileceğini gözlemlemişlerdir. Dahası, miyeloid hücrelerde TNF α susturulması kemokin üretimini azaltmış ve NASH'ın gelişmesini engellemiş ve NASH'de yeni bir terapötik hedef olarak TNF α 'nın potansiyelini ortaya koymuştur. NP'ler ayrıca, tek hücre seviyesinde hücrel yolları incelemek üzere bitki hücrelerinde siRNA iletmek için bir araç olarak kullanılmıştır³⁰. Başka bir araştırma grubu, selüloz biyosentez yolunda spesifik genleri hedefleyen siRNA'lara yönelik araçlar olarak amin-konjuge polimerik NP'leri kullanmıştır. Tüm bitkilerde hücre duvarı sentezinde rol oynayan bir faktör olan NtCesA-1'in izole protoplastlarda hücre duvarı rejenerasyonunda da önemli bir rol oynadığını bulmuşlardır¹².

1.6.2. Solvent veya ekspiyan olmadan hidrofobik bileşiklerin iletilmesi

Biyolojik olarak aktif olan birçok bileşik, hidrofobik özelliktedir ve suda zayıf bir şekilde çözünür. Bu tür bileşikleri biyolojik araştırmalarda kullanmak sulu ortamlardaki zayıf çözünürlükleri nedeniyle zor olabilir. Bu yüzden, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücü veya cremophor gibi ekspiyanın kullanılmasını içeren güncel yaklaşımlar vardır. Bununla birlikte, bütün bileşikler bu çözücüler kullanılarak çözülemez ve ayrıca bu çözücülerin kendileri de sıklıkla canlı organizmalardan toksik özellik gösterir. Bu sebeple, hidrofobik ajanları iletme-dağıtma zorluğunun üstesinden gelme stratejilerinden biri NP'leri kullanmaktır. Birçok nanopartikül, özellikle polimerik NP'ler, hidrofobik çekirdeklere sahiptir ve hidrofobik maddelerin iletilmesi için çok uygundur. NP iletim araçlarının kullanımı sadece aktif maddenin çözünürlüğünün üstesinden gelmekle kalmaz aynı zamanda ajanı, taşıyıcısı olan NP'den salınana dek çevreden korur. Örneğin, NP'lerin wortmannin'in çözünürlüğünü ve stabilitesini artırdığı kaydedilmiştir. Ayrıca NP wortmannin gibi hücreler üzerinde de aynı sinyalleme etkilerine sahip olduğu bulunmuştur^{12; 31}. Bununla birlikte, NP wortmannin, *in vivo* fare modelinde etkili bir terapötik ajan olarak işlev görmüştür¹².

1.6.3. Subselüler organellere nanopartiküllerin iletilmesi

Son yıllarda en popüler araştırma konularından birisi, spesifik organellere çeşitli ajanların iletmesidir. Özellikle, bir hedefin subselüler kullanılabilirliği ve erişilebilirliği, terapötik ve görüntüleme

ajanlarının etkili iletilmesinde önemlidir. Kanser tedavisi için eş zamanlı hedefleme, görüntüleme ve tedaviler için subselüler organelere özgü reaktifler oldukça caziptir. Bunun yanısıra, hücre regülasyonu, sinyalleme ve sinyal iletimi gibi canlı hücrelerde meydana gelen karmaşık olayları çözebilmek, bu süreçlere müdahale edebilmek ve bunları modüle edebilecek tedavilerin tasarlanması subselüler düzeyde iletim ve hedeflemeyi daha önemli hale getirmiştir³². Örneğin, flüoresan yarı iletken kuantum noktaları, zamana göre milisaniye/saat ölçeklerinde görüntü molekülleri oluşturabilir ve görüntüleyebilir ve böylece araştırmacılara organik floroforlar kullanılarak gerçekleştirilemeyen hücre içi dinamikleri izleme olanağı sağlayabilmektedir³²⁻³⁴. Bunun kadar önemli olan diğer bir durum, nanopartikül temelli terapötikler için subselüler hedeflemedir. Mitokondri gibi sitoplazmik organellerin doğrudan hedeflenmesi, fotodinamik terapilerde ışığa duyarlı hasarı artırabilirken, gen terapisi için oligonükleotidleri taşıyan NPLer, terapötik açıdan etkili olan hücrelerin sitosol ve çekirdekleri üzerinde yer almalıdır^{32,35-38}. Nanopartiküllerin hücrelere ve bunların subselüler hedeflerine ulaştırılması için, öncelikle plazma zarını geçebilmeleri gerekmektedir. NP'ler, ya doğrudan membrana gömülü reseptörler ile etkileşime girerek ya da dolaylı olarak iki tabakalı lipit ile ilişkilendirilerek içselleştirilebilir. İlk yaklaşımda, NP'ler hücre üzerinde yüksek afinite ve özgüllüğe sahip reseptörlere bağlanan ligandlar ile fonksiyonel hale getirilir. Ligandlar, sağlıklı ve hastalıklı hücreler üzerinde aşırı ifade edilmiş reseptörleri hedeflemek için seçilebilir veya tasarlanabilir. Ortaya çıkan reseptör-ligand komplekslerinin içselleştirilmesi daha

sonra NP'lerin reseptör aracılı endositozuna yol açar. Alternatif olarak, NP'ler, membran ile hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler aracılığıyla etkileşime girebilir ve hücre içine pinositoz yoluyla sıvı faz alımı şeklinde alınabilir. Hücreler, hücre içi yükleri farklı hücre içi lokasyonlara ve etkileşimlere yönlendirmek için çok sayıda mekanistik olarak farklı ve yüksek ölçüde düzenlenmiş endositik yollar kullanmaktadır. Endositik süreçlerin sadece besinleri ve membranla ilişkili molekülleri içselleştirmeyi değil, aynı zamanda hücre sinyalleme devresinin uzaysal dinamiklerini düzenlediği bilinmektedir³⁹. Çünkü, NP'lerin hücre alım mekanizmalarının anlaşılması, sinyalin nerede ve nasıl modüle edildiğini ve hücrenin sonraki moleküler tepkisinin belirlenmesi açısından önemlidir⁴⁰⁻⁴³. Daha önceden bildirildiği gibi, makromoleküller veya NP'ler, endositoz adı verilen bir işlem yoluyla hücrelerin içine alınabilir. Özellikle, tüm hücre tiplerinde pinositoz ortaya çıkar ve en az dört temel mekanizma buna aracılık eder: a) makropinositoz, b) klattrin aracılı endositoz, c) kaveolaya bağlı endositoz ve d) klattrin-kaveola ve dinamin-bağımsız endositoz⁴⁴. Bunlar arasında klattrin aracılı endositoz, en çok anlaşılan ve bilinen reseptör aracılı endositoz yoludur^{32,45}. Örneğin, Harush-Frenkel ve ark'ları, NP'lerin klattrin aracılı endositik yolağa hedeflenmesi çalışmalarında, yüzeylerinde ya negatif ya da pozitif yüke maruz bırakılan NP'lerin HeLa hücrelerine endositozunu karşılaştırmışlardır. Sonuçta, maruz kalan yüke bağlı olarak, kullanılan hücre alım mekanizmasının yanı sıra içselleştirme yeteneklerini önemli ölçüde etkilediğini kaydetmişlerdir. Negatif yüklü NP'ler, düşük bir endositoz oranı gösterirler ve klattrin

aracılı endositoz yolunu kullanmazlar. Öte yandan, pozitif yüklü NP'ler klatrin aracılı yolak aracılığıyla hızla içselleştirilmiştir. Bu yol engellendiğinde, NP'ler daha da yüksek NP birikimiyle sonuçlanan telafi edici endositoz yolunu harekete geçirir. Bu sebeple, NP'lere pozitif yük eklenmesinin, ilaç dağıtımı için NP'lerin taşıyıcı potansiyellerini artırabileceğini düşündürmüştür. Nanopartikül boyutu, yüzey özellikleri ve fizyolojik koşullar gibi birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler, hem hücrel etkileşimleri hem de sistemik dağılımı etkileyebilir. Bu faktörler arasında, partikül büyüklüğünün, özellikle 500 nm'den daha küçük olan NP'ler için plazma membranına yapışma, hücrel alım ve sonraki hücre içi işlemlerde önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür⁴⁶⁻⁴⁷. Bu durum, Oh ve ark.'nın çalışmalarında, etkili hücrel alım ve ilaç dağıtım yolu için katmanlı çift hidroksit (LDH) NP'lerinin optimum büyüklüğünü tanımlamak amacıyla, kristal büyütme oranını modüle ederek ve her LDH nanopartikülünü bir silan (kimyasal bağlama ajanı) bağlama reaksiyonu kullanılarak bir florofor ile etiketlemiş ve dar boyut dağılımı ile farklı boyutlu LDH NP'lerini hazırlamışlardır. Çalışmanın sonunda araştırmacılar, LDH'lerin hücrel alım oranının partikül büyüklüğüne (50>200≥100>350 nm, NP boyutu küçüldükçe alım artar) yüksek oranda bağlı olduğunu bulmuşlardır. 50 ila 200 nm arasında değişen partikül boyut aralığı, geçirgenliği ve tutulması ile birlikte klatrin aracılı endositoz yoluyla hücrelere seçici olarak içselleştirilmiştir. Çalışmalarında açıkça, sadece partikül büyüklüğünün, endositik yolakta ve işlemlerde önemli bir rol oynadığını değil, aynı zamanda LDH NP'lerinin boyut kontrolünde, bölgeye özel klatrin aracılı

endositoza yönelik hedeflenmiş alımıyla sonuçlandığını göstermişlerdir⁴⁶.

Hücre zarı, erken endozomlar, geç endozomlar ve lizozomlar, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi, mitokondri, çekirdek ve sitosolik iletim belli başlı subselüler hedeflerdir. Örneğin en çok kullanılan subselüler hedef mitokondrilerdir. *Mitokondri*, çift-membrana sahip, hücrenin reaktif oksijen türlerinin (ROT) çoğunu üreten, hücrenel redoks durumunu düzenleyen, hücrenel apoptozisi başlatan, hücrenin ATP'sinin çoğunu üretmek için O₂'nin yaklaşık %95'ini tüketen ve böylece çeşitli biyokimyasal süreçleri düzenleyerek ökaryotik hücrelerin merkezinde yer alan subselüler bir organeldir⁴⁸⁻⁵¹. Mitokondriyal hedefleme moleküllerinin tasarlanması, diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere geniş yelpazedeki hastalıklarından sorumlu olan mitokondriyal fonksiyonların raporlanması ve manipüle edilmesinde oldukça önemlidir⁵¹⁻⁵³. Örneğin, Yu ve ark., mitokondrilerde hedefleme ajanı olarak kullanılan rotaksan 2 (R2) NP'lerinin HeLa hücrelerine karşı sitotoksitesinin, HEK293 hücrelerine göre daha yüksek olduğu ve bunun normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde seçici olarak biriktiğini kaydetmişlerdir. Bu durumun HeLa hücreleri tarafından R2 NP'lerin daha yüksek hücrenel alımından kaynaklandığı bildirilmiştir. R2 NP'leri genellikle endositoz tarafından içselleştirildiği ve endo/lizozomlara transloke olduğunu varsaymışlardır. Ayrıca, hedefleme, görüntüleme ve terapötik ajanların fonksiyonlarını değiştirmeden bir rotaksana sokulabileceğini göstermiştir, ki bu da

kanser tedavisinde büyük bir avantaj sağlar⁵¹. Hücre içi ve subselüler uygulamalar için yapılan bazı çalışmalara örnekler; Li ve ark., 2011'de toprak solucanında (*Eisenia fetida*) çinko oksit (ZnO) NP'lerinin toksisitesi ve Zn'nin subselüler fraksiyonlanmasını çalışmışlardır. Diferansiyel santrifüjleme sonuçlarına göre, ZnO nanopartikül maruziyetinin, solucanlarda Zn'nin farklı hücre içi dağılımlarına yol açtığını göstermiştir. 100 mg ZnO/kg agar'a maruz kaldığında, birikmiş Zn'nin %76'sından fazlası, çinko oksit NP'leri ve çözünmüş Zn²⁺ iyonlarına ayrılmaksızın organellerde ve sitosolde (Fraksiyon C) tutulmuştur⁵⁴. Bununla birlikte, son yıllarda, çok çeşitli NP'ler biyomedikal alanda görüntüleme araçları, fototerapötik ajanlar ve gen taşıyıcı olarak yoğun şekilde kullanılmış ve araştırılmıştır⁵⁵⁻⁵⁸. NP'lerin hücre zarlarıyla etkileşimleri, bu tür uygulamalar için oldukça önemlidir. Örneğin, birçok ilaç dağıtım sistemi, terapötik ajanların, NP'ler tarafından hücrelerin sitoplazmasına veya çekirdeğine taşınmasına dayanmaktadır. Hücre zarlarından hücre içi hedef bölmelere ulaşması için geçiş sırasında sitotoksite oluşturmadan verimli bir şekilde taşınması sağlanmalıdır⁵⁹⁻⁶⁰. Bununla birlikte, birkaç nanometre boyutundan daha büyük olan hiçbir sentetik malzeme, biyolojik engellerin (hücresel yapılar) bütünlüğünü bozmadan zarlardan geçememiştir⁵⁸. Örneğin, katyonik kuantum noktaları veya dendrimerler gibi yüklü partiküller hücre zarından geçiş için hücre zarının geçici olarak porasyonunu indükler, ki bu da sitotoksite ile ilişkili bir süreçtir⁶¹. Alternatif olarak, NP'ler hücrelere zorla girebilmek için endolisozomal membranları açıkça bozmak üzere tasarlanmıştır veya CPP şaperonları gibi eksojen

ajanlarla desteklenerek hücreye girer^{58,62}. NP'lerin yüzey özellikleri, hücrelerle etkileşimlerinin sonucunu belirlemede kritik bir rol oynamaktadır⁶³. Nano ölçekli nesnelere, tipik olarak hücreler tarafından membran sınırlı endozomlara içselleştirilir ve sitosolik hücre mekanizmasına erişememektedirler. Bazı biyomakromoleküller aşırı membran bozulması olmaksızın hücre zarlarına nüfuz edebilir veya kaynaşabilirken, henüz karşılaştırılabilir boyuttaki hiçbir sentetik malzeme bu özelliği göstermemiştir. Katyonik nano-objeler, hücre zarlarından geçerek, geçici delikler oluşturarak, sitotoksiste ile ilişkili bir süreçten geçerler. Hücreye nüfuz eden nanomateryallerin üretilmesine yönelik çalışmalar boyut, şekil ve kompozisyonun etkisine odaklanmıştır. Bunu göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada, benzer bir bileşime (aynı hidrofobik muhtevaya) sahip iki nanopartikül izomeri ile membran penetrasyonu karşılaştırılmıştır. Biri alternatif anyonik ve hidrofobik grupların subnanometre çizgilerini kaplar, diğeri aynı partiküller ile kaplanmış fakat rastgele bir dağılımdadır. İlk nanopartikülün iki tabakalı bozulma olmadan plazma membranına nüfuz ettiğini, buna karşın sonuncunun çoğunlukla endozomlarda yakalandığını rapor etmişlerdir⁵⁸. Huang ve ark., 2013'de NP'lerin hücre zarlarıyla etkileşimlerinde yapının önemini vurguladıkları çalışmalarında, yüzey heterojenliğinin nanopartikül-protein etkileşimindeki rolünü sistematik olarak araştırmışlardır. Yüzey bileşimi ve yapısal heterojenliğin, kendiliğinden toplanmış tek tabakalı kaplamalı altın (Au) NP'ler ve farklı boyut ve şekillerdeki iki protein kullanılarak protein-NP etkileşimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. AuNP'ler, boyut

dağılımı, şekli, yüzey yükü ve ligand yoğunluğu bakımından hemen hemen aynıdır, sadece yüzeydeki ligandların kompozisyonu ve düzenlemesinde niceliksel farklılıklar vardır^{58,64-65}. Nano boyutlu yüzey özelliklerine sahip partiküller için ıslanabilirlik, arayüzey enerjisi ve hücre penetrasyonu ile ilgili ilginç özelliklerin yüzey bileşimi ve yapısına bağlı olduğu bulunmuştur^{58,66-67}. Bu nedenle, bu özelliklerin proteinlerin (ubikuitin ve fibrinojen) adsorpsiyon davranışları ile nasıl ilişkili olduğunu incelemek önemlidir. Heterojeniteyi (dağılım ve uzunluk ölçeğinde) sağlamak için farklı türlerde partikül ve proteinleri (ubikuitin ve fibrinojen) seçmişlerdir. Bu proteinler, hayvan plazmasındaki bollukları, boyut, şekil ve özelliklerdeki farklılıklar nedeniyle seçilmiştir. Amaçları, heterojenliğin rolünü ve partikül-protein etkileşimindeki uzunluk ölçeğini açıklamaktır. Protein yüzeyindeki yük heterojenliği ile ilgili olan proteinlerin izoelektrik noktalarının üstünde ve altında farklı etkileşimleri ortaya çıkarmak için dinamik ışık saçılımı ve dairesel dikroizm spektroskopisini kullanmışlardır. Buna göre, PH 7.4'te, NP üzerine adsorbe edilen tek bir protein tabakası vardır ve proteinlerin ikincil yapısı bozulmadan kalmıştır. PH 4.0'da, nanopartikül-protein komplekslerinin büyük agregatları oluşmuş ve proteinlerin ikincil yapıları önemli ölçüde bozulmuştur. Etkileşim termodinamiği açısından, izotermal titrasyon kalorimetrisi sonuçları, ubikuitinin, (1) nano ölçekli yapıya (66-34 OT) düzenlenmiş yüklü ve kutupsuz terminalleri olan AuNP'ler, (2) rastgele dağıtılmış terminalleri ile AuNP'leri (66-34 brOT), (3) homojen yüklü terminallere (MUS) sahip AuNP'lerin farklı olarak adsorbe olduğunu göstermiştir. Adsorpsiyon

davranışındaki bu farklılık, Au NP'lerin fibrinojen ile etkileştiğinde gözlenmemiştir. Sonuçlar, proteinler ve AuNP'ler arasındaki etkileşimin, AuNP'ler üzerindeki yüzey heterojenliğinden etkilendiğini ve bu etkinin, yüzey heterojenliği ve proteinlerin boyutuna bağlı olduğunu göstermiştir⁶⁸.

2. KANSER TEDAVİSİ

Anti-kanser ajanlarının spesifik ve hedefe yönelik bir şekilde iletilmesini amaçlayan araştırmalar son 10 yıl içinde muazzam bir şekilde artmıştır ve böylece yeni ilaçların yanı sıra ilaçların tümörlere yönlendirilmesi için yeni yollar geliştirilmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesi fotodinamik kanser tedavisidir. Fotodinamik kanser tedavisi sitotoksik olan, lazer tarafından üretilen atomik oksijen ile kanser hücrelerinin yok edilmesine esasına dayanır. Atomik oksijeni üretmek için kullanılan özel bir boya sağlıklı doku ile karşılaştırıldığında kanser hücreleri tarafından alınır⁶⁹. Bu nedenle, sadece kanser hücreleri yok edilir ve daha sonra bir lazer radyasyonuna maruz kalır. Ne yazık ki, kalan boya molekülleri cilde ve gözlere göç eder ve hastayı gün ışığına maruz kalmaya karşı duyarlı kılar. Bu etki altı hafta kadar sürebilir. Bu yan etkiyi önlemek için, boya molekülünün hidrofobik versiyonu gözenekli bir nanopartikülün içine konularak önlenmeye çalışılmıştır⁷⁰. Boya, ormosil NP içinde sıkışıp kalır ve vücudun diğer bölgelerine yayılmaz. Aynı zamanda, oksijen üretme kabiliyeti etkilenmez ve oksijenin yayılması için yaklaşık 1 nm'lik gözenek boyutuna sahiptir⁶⁹. NP'ler, yüzey özelliklerine bağlı olarak genellikle karaciğer, dalak ve RES'nin diğer kısımları tarafından alınır.

Daha hidrofobik yüzeylere sahip olan partiküller tercihen karaciğer tarafından alınır, bunu dalak ve akciğerler takip eder⁷¹⁻⁷². Örneğin, Poli(vinil pirolidon)'dan hazırlanan hidrofilik NP'ler (35 nm çap), dalak ve karaciğer tarafından % 1'den daha az alım gösterir ve enjeksiyondan 8 saat sonra bile kan dolaşımında % 5–10 oranında kalır⁷³. Daha uzun sirkülasyon süreleri olan NP'ler ilgili bölgeyi hedefleme kabiliyetleri 100 nm veya daha az çapta olmalı ve makrofajlar tarafından temizlenmeyi azaltmak için hidrofilik bir yüzeye sahip olmalıdır⁷⁴. Kanser tedavisinde, tümör vaskülatürünü hedeflemek, çok çeşitli tümör tiplerine hedefli ulaştırmayı mümkün kılan bir stratejidir^{71,75-76}. Son çalışmalar, aynı zamanda, gen dağıtımının, lipit bazlı katyonik NP'lerin, tümör taşıyan farelerde bir integrin $\alpha v\beta$ -hedefleyici ligand ile birleştirilmesiyle yeni damar sistemine hedeflenebileceğini de göstermiştir⁷⁷. Bununla birlikte, kanser tedavisinde kullanılan paklitaksel, doksorubisin, 5-Fluorourasil, antineoplastik ajanlar, gen dağıtıcı ilaç ve ajanlar NP'ler kullanılarak, kanser tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır. Örneğin, paklitaksel, hücre bölünmesi için gerekli olan dinamikleri bozarak hücre ölümüne neden olan tübülün polimerizasyonunu destekleyen bir mikrotübül dengeleyici maddedir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak biyo-bozunabilir NP formülasyonları Wang ve arkadaşları tarafından 1996 yılında araştırılmıştır ve geleneksel formülasyonlara benzer aktivite ve çok daha hızlı uygulama göstermiştir^{71,78-79}. Paklitaksel, aseton ve PLGA kullanılarak nano çökeltme yöntemi kullanılarak çok yüksek yükleme verimi (% 100'e yakın) sağlar. En güçlü ve yaygın olarak kullanılan anti-kanser ilaçlarından biri, kanser

hücreleri içindeki nükleik asitlerin sentezini inhibe ederek çalışan doksorubisindir⁸⁰. Doksorubisin yüklü PLGA NP'lerinin, 12 güne kadar tümör büyümesini baskılayabildiğini göstermiştir⁸⁰. Kanser hücrelerine seçici hedefleme gösteren diğer ligandlar, transferrin (Tf) ve epidermal büyüme faktörüdür (EGF)⁸¹⁻⁸³. DNA iletimi için kompleksler Tf veya EGF ile kaplanan poli (etilen glikol) (PEG) ile bağlantılı polietileniminden (PEI) oluşan, 49-1200 nm çap aralığında NP çapları ile hazırlanmıştır. Farelerde yapılan *in vivo* çalışmalarda Lusiferaz üretimini kodlayan plazmid pCMVLuc bu NP'lerin içine konulmuş ve, hedeflenen sistemlerin uygulanmasından elde edilen gen ifadesinin, tümörlerde diğer organlara göre 10 ila 100 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir⁸⁴⁻⁸⁵.

3. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği, günümüzde çok hızlı büyüyen bilimsel alan olup, hücre ve/veya hücrelerin biyomateryallerle kombinasyonlarını kullanarak hücre, doku ve organları oluşturmak, onarmak ve/veya değiştirmek için kullanılır ve bu sayede vücudun doğal doku/dokularına çok benzeyen materyaller üretmeye yardımcı olur. Doku mühendisliği; mühendislik materyalleri, tıp ve biyoloji ile bağlantılı bir disiplindir⁸⁶⁻⁸⁷. Tipik doku mühendisliği hücrelerinde, yapışkan yüzeyler sağlayan biyomimetik iskele üzerinde tohumlanırlar ve daha sonra hücreler daha fazla biyo-uyumlu olmak için kendi proteinlerini depolarlar. Fakat uygun şekilde vaskülarize edilemezler, işlevsel hücrelerin yokluğu, mühendislik hücrelerinin düşük mekanik mukavemeti, immünolojik olarak konakçı ile uyumlu değildirler.

Besin sınırlaması doku ve doku mühendisliği alanında klasik bir konudur⁸⁸. Yeni biyomimetik “iskelet“ ve “modern teknoloji“ konumlandırılmada daha fazla doğruluk, yaşayabilirlik, karmaşıklık, etkileşim gibi üretim için mikro ve nanoteknoloji kullanarak geliştirilmiş ve analitik kontrol araçlarıyla geliştirilmiştir⁸⁹. Mikro ve nanoteknoloji, hücelere büyümeleri için yapışma, çoğalma ve aktif madde temini için basit bir substrat sağlamaktadır. Doku mühendisliğinde nanofabrikasyon teknikleri, malzeme bilimi, yüzey, mikro ve nano kalıplama, hücrelerin büyümesi gereken en iyi mikro ortamın sağlanmasında yardımcı olur⁹⁰. Doku mühendisliği için mikro ve nano fabrikasyon teknikleri kullanmanın birçok yararı vardır. İşlenecek olan biyomateryaller, hücre dışı sıvılar, kemik iliği, kalp dokuları vb. gibi nanometre boyutlarından dolayı, nanoteknoloji doğal dokuları taklit etmek için kullanılabilir^{86,91}. Sıradaki bölümde doku mühendisliğinde en sık kullanılan nano yapılar tartışılmıştır.

3.1. Elektrospun nanofiberler

Biyomimetik yapı iskelesi için kullanılan ve kemik, kardiyak kas doku mühendisliği için kullanılan alettir. Hücre uyumunu yönlendirmek ve kan damar benzeri yapıları oluşturmak için hizalanmış poli(L-laktik-ko-ε-kaprolakton) nanofibreleri kullanılmıştır^{86,92}. Bir çalışmada, poli(laktik-co-glikolid) ve poli(L-laktik asit) iskele nöral kök hücreleri kullanılarak incelenmiştir^{86,93}. Bu lifler, iskele fonksiyonunu kontrol edebilmekte, diğer bir deyişle yapıştırma yüzeyini biyomimetik hale getirebilmekte, ayrıca kapsüllenmiş moleküllerin "Kontrollü Salımı" için çekirdek yapıları nano-lifler kullanılmıştır⁹⁴⁻⁹⁵.

3.2. Doku mühendisliği için nanodokulu substratlar

Hücre-substrat etkileşimleri doku mühendisliği, medikal implantların geliştirilmesinde ve farmasötik ürünlerin üretiminde önemlidir. Hücre-substrat etkileşimi, *in vivo* ve *in vitro* hücre davranışlarındaki farklılıkları da açıklayabilir. Bu etkileşimler hakkında bilgi edinmek için, canlı sistemlerde hücrelerin bağlandığı ve büyüdüğü substratları araştırmak mantıklı bir yaklaşımdır. Bazal membranlar omurgalı gövdesi boyunca bulunur ve üstte bulunan hücresel yapılar için substrat görevi görür. Bazal membranlar, fibröz kollajen, hiyalüronik asit, proteoglikanlar, laminin ve fibronektin dahil olmak üzere hücre dışı matriks (HDM) bileşenlerinden oluşur. Örneğin, hyaluronik asidin hücre-hücre yapışmasını inhibe ettiği ve hücre göçünü desteklediği ve laminin hücre göçünü önleyebildiği gösterilmiştir⁹⁶⁻⁹⁸. Bazal membranlar, biyokimyasal ve mekanik özelliklerine ek olarak, nanometre boyutlu özelliklerinden kaynaklı kompleks, üç boyutlu bir topografyaya sahiptir. Fiziksel topografinin hücre davranışını etkilediği bilinmektedir. Rosenberg, 1962 ve 1963 yıllarda nanometre boyutundaki özelliklerin hücreleri etkilediğini iddia etmiştir^{96,99-100}. Vücutta protein, DNA ve atom gibi doğal olarak bulunan çeşitli nano yapılar mevcuttur. Yapışma için bazal membran ve diğer hücresel davranışlar ve yapışma için bazal membran 5-200 nm'dir^{86,96}. Poli (laktik-ko-glikolid) nano yüzey NaOH ile muamele edildiğinde kimyasal hücre yoğunluğu artar¹⁰¹. E-ışın litografisi, nano doku mühendisliğinde yararlıdır¹⁰². Nanoteknoloji, hücre yapışmasının ve vaskülarizasyonun daha iyi düzenlenmesine yardımcı olur. Örneğin,

osteoblast hücre adezyonunda (yapışmasında) karbon nanotüpten oluşturulan uyumlu epitel taban zarı benzeri yapı aynı zamanda daha önce kullanılan bir substrat olarak cam üzerinde nanofibrelerin daha etkili olduğunu göstermektedir^{86;103}.

3.3. Kendinden montajlı nanomalzemeler

Doku mühendisliğinde kendiliğinden bir araya getirme yöntemleri, biyomimetik kaplama, elektrolitik çökeltme (ELD) ve pH indüksiyonudur. Bunun için peptid amfil (PA), hiyalüronan, kitosan ve apatit/amelogenin gibi bir çok malzeme kullanılmıştır^{86;91;104}. Hidrofobik ve hidrofilik bölgelerden oluşan kendiliğinden oluşturulmuş peptitlerin tabakaları/lifleri ve daha fazla montajı, hidrojel formunda koruyucu olarak yüklenmelidir^{91;105}. 3 boyutlu kendiliğinden monte edilmiş fiberlerde yüksek görüntü oranlı nanofiberler PA kullanılarak yapılabilir. PA, kemik morfojenetik proteininin kontrollü salınmasında kullanılır, ancak daha az hücre eki bağlantısına sahiptir. Daha az selektif bağlanma maddesi, arginin-glisin-aspartik asit (RGD) ile konjuge edilmiş fosfoglikolik asit (PGA) ile ilişkili dallanmış PA ile aşılabilir¹⁰⁶. Elektrolitik biriktirme ayrıca, katotta kolajen liflerinin kristal büyümesi için kullanılan nano yapıyı geliştirmek için kullanılır, bu nedenle osteoterapi ve biyo-kompozit emayelerde geniş bir uygulaması vardır ve kendinden toplanmış amelogenin ve kalsiyum fosfat ile kaplanır ve ayrıca kemik iliği stromal hücre ekini incelemek için de kullanılır^{86;107-108}.

Doku mühendisli uygulamalarında, doğal kemik yüzeyi, genellikle 100 nm civarında olan özellikler içerir. Yapay bir kemik implantının yüzeyi pürüzsüzse vücut onu reddetmeye çalışacaktır. Bu pürüzsüz yüzeyin, implantın yüzeyini kaplayan lifli bir dokunun üretilmesine neden olması muhtemeldir. Bu tabaka, implantın gevşemesi ve daha fazla iltihap ile sonuçlanabilecek kemik implant temasını azaltır. Kalça veya diz protezi yüzeyinde nano boyutta özellikler oluşturularak, osteoblastların üretimini teşvik etmenin yanı sıra reddedilme şansını azaltabildiği gösterilmiştir. Osteoblastlar, kemik matrisinin büyümesinden sorumlu olan hücrelerdir ve gelişmekte olan kemiğin ilerleyen yüzeyinde bulunurlar. Bu etki, polimerik, seramik ve daha yakın zamanlarda metal malzemelerle gösterilmiştir. Süspanse halde bulunan insan kemik hücrelerinin % 90'ından fazlası nanoyapılı metal yüzeye yapışmıştır, ancak kontrol örneğinde yapışma sadece % 50 civarındadır. Sonuç olarak bu bulgular daha dayanıklı ve daha uzun süreli kalça ya da diz replasmanlarının tasarlanmasını ve implantın gevşeme şansını azaltmayı mümkün kılar^{109;69}. Titanyum; ortopedi ve diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan, yüksek kırılma direnci, süneklik ve mukavemet oranına sahip ve iyi bilinen bir kemik tamir malzemesidir. Fakat, titanyum kendi kendine yapışma ve büyümeyi iyi desteklemediğinden, biyoaktivitesi eksiktir. Bu nedenle, titanyum üzerine biyoaktif ve kemiğe yapıştığı bilinen apatit malzeme kaplanmıştır. Biyomimetik bir yaklaşımla uyarlanmış vücut sıvısından nanoyapılı apatit filmin yavaş bir şekilde büyümesinin, kuvvetli yapışma oluşmasıyla, tekdüze nano-gözenekli tabakanın oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir^{110;69}. Gerçek bir kemik, esas olarak

kollajenden oluşan organik matriks içindeki hidroksiapatit kristalitlerden oluşan nanokompozit bir malzemedir. Bu sayede, kemik mekanik olarak sert ve aynı zamanda plastiktir, dolayısıyla mekanik bir hasardan kurtulabilir.

Doku mühendisliğinin bir uygulaması da miyokard enfarktüsünü tedavi uygulamasıdır. Hücreleştirilmiş matrisler miyokard enfarktüsünü tedavi etmek için fonksiyonel kardiyak yamaların oluşturulması için değerli iskeleler olup komşu hücreler arasında hızlı ve verimli elektrik bağlantısı olmaması tedavinin başarısını etkilemektedir. Bunun üstesinden gelmek için, lifli hücreleştirilmiş omental matrisler üzerinde altın nanopartiküller biriktirilmiş ve hibrit iskeleler içinde tasarlanan kardiyak hücrelerin, uzun ve hizalanmış morfoloji, masif çizgiler ve organize edilmiş konneksin 43 elektriksel bağlantı proteinleri sergilediği gösterilmiştir¹¹¹.

Teşekkür

Merhum babam Murat ÖZKAN'a emeklerinden dolayı teşekkür ederim. Allah rahmet eylesin.

KAYNAKLAR

- Lanone, S. (2006). Boczkowski J. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms, *Current molecular medicine*, Vol. 6, No. 6, pp 651-663.
- West, J. L., Halas, N. J. (2000). Applications of nanotechnology to biotechnology: Commentary, *Current opinion in Biotechnology*, Vol.11, No. 2, pp 215-217.
- Werner, M. E., Copp, J. A., Karve, S., Cummings, N. D., Sukumar, R., Li, C., Napier ME et al. (2011). Folate-Targeted Polymeric Nanoparticle Formulation of Docetaxel is an Effective Molecularly Targeted Radiosensitizer with Efficacy Dependent on the Timing of Radiotherapy, *ACS Nano*, Vol. 5, pp8990–8998.
- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li X., Rotello, V. M. (2012). Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing, *Chem. Rev.*, Vol.112, pp 2739–2779.
- Nam, J.-M., Thaxton, C. S., Mirkin, C. A. (2003). Nanoparticle Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins, *Science*, Vol. 301, pp 1884–1886.
- Nam, J.M., Wise, A. R., Groves, J. T. (2005). Colorimetric BioBarcode Amplification Assay for Cytokines, *Anal. Chem.*, Vol. 77, pp 6985–6988.
- Georganopoulou, D. G., Chang, L., Nam, J. M., Thaxton, C. S., Mufson, E. J., Klein, W. L. (2005). Mirkin CA. Nanoparticle based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer’s disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 102, pp 2273–2276.
- Haun, J. B., Yoon, T. J., Lee, H., Weissleder, R. (2010). Magnetic nanoparticle biosensors, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, Vol. 2, pp 291–304.
- Edgar, R., McKinstry, M., Hwang, J., Oppenheim, A. B., Fekete, R. A., Giulian, G., et al. (2006). High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol.103, pp 4841–4845.

- Cristofanilli, M., Hayes, D. F., Budd, G.T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Reuben, J. M., et al. (2005). Terstappen, Circulating Tumor Cells: A Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer, *J. Clin. Oncol.*, Vol. 23, pp 1420–1430.
- Myung, J. H., Gajjar, K. A., Saric, J., Eddington, D. T., Hong, S. (2011). Dendrimer-Mediated Multivalent Binding for the Enhanced Capture of Tumor Cells, *Angew. Chem., Int. Ed.*, Vol. 50, pp 11769–11772.
- Wang, E. C., Wang, A. Z. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology, *Integrative Biology*, Vol. 6, No. 1, pp 9-26.
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 41, pp 2740–2779.
- Lee, J.-H., Lee, K., Moon, S.H., Lee, Y., Park, T.G., Cheon, J. (2009). All-in-One Target-Cell-Specific Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Molecular Imaging and siRNA Delivery, *Angew. Chem., Int. Ed.*, Vol. 48, pp 4174–4179.
- Welch, M. J., Hawker, C. J., Wooley, K. L. (2009). The Advantages of Nanoparticles for PET, *J. Nucl. Med.*, Vol. 50, pp 1743–1746.
- Cai, W., Chen, K., Li, Z.-B., Gambhir, S. S., Chen, X. (2007). Dual Function Probe for PET and Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor Vasculature, *J. Nucl. Med.*, Vol. 48, pp 1862–1870.
- Clarke, S., Pinaud, F., Beutel, O., You, C., Piehler, J., Dahan, M. (2010). Covalent Mono functionalization of Peptide Coated Quantum Dots for Single-Molecule Assays, *Nano Lett.*, Vol. 10, pp 2147–2154.
- Howarth, M., Liu, W., Puthenveetil, S., Zheng, Y., Marshall, L. F., Schmidt, M. M., et al. (2008). Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells, *Nat. Methods*, Vol. 25, pp 397–399.
- Dağlıoğlu, Y., Yılmaz Öztürk, B. (2018). Effect of concentration and exposure time of ZnO-TiO₂ nanocomposite on photosynthetic pigment contents, ROS production ability, and bioaccumulation of freshwater algae (*Desmodesmus multivariabilis*), *Caryologia*, Vol. 71, No. 1, pp13-23.

- Cai, W., Shin, D.-W, Chen, K., Gheysens, O., Cao, Q., Wang, S. X., Gambhir, S. S., Chen, X. (2006). Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects, *Nano Lett.*, Vol. 6, pp 669–676.
- de Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P, Maraganore, J., Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discovery*, Vol. 6, pp 443–453.
- Lebedeva, I., Stein, C. (2001). Antisense Oligonucleotides: Promise and Reality, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Vol. 41, pp 403–419.
- Sahay, G., Querbes, W., Alabi, C., Eltoukhy, A., Sarkar, S., Zurenko, C., et al. (2013). Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling, *Nat. Biotechnol.*, Vol. 31, pp 653–658.
- Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G., Heitz, F. (2005). Cellpenetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.*, Vol. 62, pp 1839–1849.
- Alabi, C. A., Sahay, G., Langer, R., Anderson, D.G. (2013). Development of siRNA-probes for studying intracellular trafficking of siRNA nanoparticles, *Integr. Biol.*, Vol. 5, pp 224–230.
- Dağlıoğlu, Y. (2018). Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, Vol. 30, No.1, pp 1-17.
- Alabi, C. A., Love, K. T., Sahay, G., Stutzman, T., Young, W. T., Langer, R., Anderson, D. G. (2012). FRET-Labeled siRNA Probes for Tracking Assembly and Disassembly of siRNA Nanocomplexes, *ACS Nano*, Vol. 6, pp 6133–6141.
- Peer, D., Park, E. J., Morishita, Y., Carman, C. V., Shimaoka, M. (2008). Systemic Leukocyte-Directed siRNA Delivery Revealing Cyclin D1 as an Anti-Inflammatory Target, *Science*, Vol. 319, pp 627–630.
- Novobrantseva, T. I., Borodovsky, A., Wong, J., Klebanov, B., Zafari, M., Yucius, K., ... & Koteliansky, V. (2012). Systemic RNAi-mediated gene silencing in nonhuman primate and rodent myeloid cells. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 1, e4.2012;1,

- Silva, A. T., Nguyen, A., Ye, C., Verchot, J., Moon, J. H. (2010). Conjugated polymer nanoparticles for effective siRNA delivery to tobacco BY-2 protoplasts. *BMC Plant Biology*, Vol. 10, No.1, pp 1-14.
- Karve, S., Werner, M. E., Sukumar, R., Cummings, N. D., Copp, J. A., Wang, E. C., et al. (2012). Revival of the abandoned therapeutic wortmannin by nanoparticle drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 109, pp 8230–8235.
- Chou, L. Y., Ming, K., Chan, W. C. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, Vol. 40, No. 1, pp 233-245.
- Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A., Dahan, M. (2010). Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nature methods*, Vol. 7, No. 4, pp275.
- Delehanty, J. B., Mattoussi, H., Medintz, I. L. (2009). Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Vol. 393, No. 4, pp 1091-1105.
- Buytaert, E., Dewaele, M., Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, Vol. 1776, No. 1, pp. 86-107.
- Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A. M. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, Vol. 9, No. 1, pp 49-89.
- Putnam, D. (2006). Polymers for gene delivery across length scales. *Nature materials*, Vol. 5, No. 6, pp 439.
- Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological reviews*, Vol. 58, No. 1, pp 32-45.
- Scita, G., Di Fiore, P. P. (2010). The endocytic matrix. *Nature*, Vol. 463, No. 7280, pp 464.
- Jiang, W., Kim, B. Y., Rutka, J. T., Chan., W. C. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent, *Nature nanotechnology*, Vol. 3, No. 3, pp 145.

- Thomas, T. P., Shukla, R., Kotlyar, A., Liang, B., Ye, J. Y., Norris, T. B., Baker, J. R. (2008). Dendrimer– epidermal growth factor conjugate displays superagonist activity, *Biomacromolecules*, Vol. 29, No. 2, pp 603-609.
- Soenen, S. J., Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. (2010). High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling, *Small*, Vol. 6, No. 7, pp 832-842.
- Huang, Y. F., Liu, H., Xiong, X., Chen, Y., Tan, W. (2009). Nanoparticle-Mediated IgE– Receptor Aggregation and Signaling in RBL Mast Cells. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 131No. 47, pp 17328-17334.
- Conner, S. D., Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* Vol. 422, pp 37–44.
- Schmid, S. L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annual review of biochemistry*, Vol. 66, No. 1, pp 511-548.
- Oh, J. M., Choi, S. J., Lee, G. E., Kim, J. E., Choy, J. H. (2009). Inorganic Metal Hydroxide Nanoparticles for Targeted Cellular Uptake Through Clathrin-Mediated Endocytosis. *Chemistry–An Asian Journal*, Vol. 2, No. 1, pp 67-73.
- Win, K. Y., Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* Vol. 26, pp 2713–2722.
- Takahashi, A., Zhang, Y., Centonze, V. E., Herman, B. (2001). Measurement of mitochondrial pH in situ. *BioTechniques*, Vol. 30, pp 804–815.
- Chalmers, S., Caldwell, S. T., Quin, C., Prime, T. A., James, A. M., Cairns, A. G., et al. (2012). Selective uncoupling of individual mitochondria within a cell using a mitochondria-targeted photoactivated protonophore, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.134, pp 758–761.
- Chen, Y., Zhu, C., Cen, J., Bai, Y., He, W., Guo, Z. (2015). Ratiometric detection of pH fluctuation in mitochondria with a new fluorescein/cyanine hybrid sensor, *Chemical science*, Vol. 6, No. 5, pp 3187-3194.

- Yu, G., Wu, D., Li, Y., Zhang, Z., Shao, L., Zhou, J., Huang, F. (2016). A pillar [5] arene-based [2] rotaxane lights up mitochondria, *Chemical Science*, Vol. 7, No. 5, pp 3017-3024.
- Park, S. Y., Oh, K. T., Oh, Y. T., Oh, N. M., Youn, Y. S., Lee, E. S. (2012). An artificial photosensitizer drug network for mitochondria-selective photodynamic therapy, *Chemical Communications*, Vol. 48, No 19, pp 2522-2524.
- Jung, H. S., Han, J., Lee, J. H., Lee, J. H., Choi, J. M., Kweon, H. S., Kang, C. (2015). Enhanced NIR radiation-triggered hyperthermia by mitochondrial targeting, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 137, No. 8, pp 3017-3023.
- Li, L. Z., Zhou, D. M., Peijnenburg, W. J., Van Gestel, C. A., Jin, S. Y., Wang, Y. J., Wang, P. (2011). Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn, *Environment International*, Vol. 37, No. 6, pp 1098-1104.
- Weissleder, R. (2006). Molecular imaging in cancer, *Science*, Vol. 312, No. 5777, pp 1168-1171.
- Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T., Weissleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells, *Nature biotechnology*, Vol. 18, No. 4, pp 410
- El-Sayed, I. H., Huang, X. H. El-Sayed, M. A. (2006). Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer Lett.* Vol. 239, pp 129–135,
- Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H. S., Watson, N., ... & Stellacci, F. (2008). Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles, *Nature materials*, Vol. 7, No. 7, pp 588.
- Allen, T. M., Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: Entering the mainstream, *Science* Vol. 303, pp 1818–1822.

- Choleris, E. et al. (2007). Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 104, 4670–4675.
- Lovric, J. et al. (2005). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots, *J. Mol. Med.* Vol. 83, pp 377–385.
- Shukla, R. et al. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview, *Langmuir*, Vol. 21, pp 10644–10654.
- Colvin, V. (2007). Correlating the physical and chemical properties of nanoparticles to their biological activity, *Environ, Mol. Mutagen.* Vol. 48, 533–pp 533.
- Jackson, A. M., Hu, Y., Silva, P.J., Stellacci, F. (2006). From Homoligand- to Mixed-Ligand- Monolayer-Protected Metal Nanoparticles: A Scanning Tunneling Microscopy Investigation, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 128, pp 11135–11149.
- Uzun, O., Hu, Y., Verma, A., Chen, S., Centrone, A., Stellacci, F. (2008). Water-soluble amphiphilic gold nanoparticles with structured ligand shells, *Chem. Commun.*, pp 196–198.
- Centrone, A., Penzo, E., Sharma, Myerson, M.J.W., Jackson, A.M., Marzari, N., Stellacci, F. (2008). The role of nanostructure in the wetting behavior of mixed-monolayer-protected metal nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 105, pp 9886–9891.
- Kuna, J. J., Voitchovsky, K., Singh, C., Jiang, H., Mwenifumbo, S., Ghorai P.K., Stevens, M.M., Glotzer, S.C., Stellacci F. (2009). The effect of nanometre-scale structure on interfacial energy, *Nat. Mater.*, Vol. 8, pp 837–842.
- Huang, R., Carney, R. P., Stellacci, F., Lau, B. L. (2013). Colloidal stability of self-assembled monolayer-coated gold nanoparticles: The effects of surface compositional and structural heterogeneity, *Langmuir*, Vol. 29, No 37, pp 11560-11566.
- Salata, 2004 (Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of nanobiotechnology*, Vol. 2, No. 1, pp 3.

- Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Bergey, E. J., Oseroff, A. R., Morgan, J., Dougherty, T. J., Prasad, P. N. (2003). Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J Am Chem Soc*, Vol. 125, pp 7860-7865.
- Brannon-Peppas, L., Blanchette, J. O. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced drug delivery reviews*, Vol. 64, pp 206-212.
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 54, pp 631–651.
- Gaur, U., Sahoo, S. K., De, T. K., Ghosh, P. C., Maitra, A., Ghosh, P. K. (2000). Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 202, pp. 1–10.
- Storm, G., Belliot, S.O., Daemen, T., Lasic, D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 17, pp 31–48.
- Eatock, M. M., Schätzlain, A., Kaye, S. B. (2000). Tumor vasculature as a target for anticancer therapy, *Cancer Treatment Reviews*, Vol. 26, pp 191–204.
- Reynolds, A. R., Moghimi, S. M., Hodivala-Dilke, K. (2003). Nanoparticle-mediated gene delivery to tumor vasculature, *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 9, pp 2–4.
- Hood, J.D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R.A., Xiang, R., Cheresch, D. A. (2002). Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature, *Science*, Vol. 296, pp 2404–2407.
- Wang, Y. M., Sato, H., Dachi, I., Horikoshi, I. (1996). Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for targeted delivery of novel anticancer agent, taxol, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 44, pp 1935–1940.
- Si-Shen, F., Guofeng, H. (2001). Effect of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymer, *Journal of Controlled Release*, Vol. 71, pp 53–69.

- Yoo, H. S., Park, T. G. (2000). In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates, *Polymer Preparation*, Vol. 41, pp 992–993.
- Kircheis, R., Kichler, A., Wallner, G., Kursa, M., Ogris, M., Felzmann, T., Buchberger, M., Wagner, W. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene transfer, *Gene Therapy*, Vol. 4, pp 409–418.
- Blessing, T., Kursa, M., Holzhauser, R., Kircheis, R., Wagner, E. (2001). Different strategies for formulation of PEGylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery, *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 12, pp 529–537.
- Ogris, M., Steinlein, P., Carotta, S., Brunner, S., Wagner, E. (2001). DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression, *AAPS PharmSciTech* 3, 21.
- Qin, L. C., Zhao, X., Hirahara, K., Miyamoto, Y., Ando, Y., Iijima, S. (2000). The smallest carbon nanotube, *Nature*, Vol. 408, pp 50.
- Ogris, M., Walker, G., Blessing, T., Kircheis, R., Wolshek, M., Wagner, E. (2003). Tumor targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethyleneimine/DNA complexes, *Journal of Controlled Release*, Vol. 91, pp 173–181.
- Kingsley, D. J., Ranjan, S., Dasgupta, N., Saha, P. (2013). Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications, *journal of pharmacy research*, Vol. 7, pp 200-204.
- Khetani, S. R., Bhatia, S. N. (2006), Engineering tissues for in vitro applications, *Curr Opin Biotechnol*, Vol. 17, No. 5, pp 524-531.
- Rivron, N. C., Liu, J., Rouwkema, J., de Boer, J., van Blitterswijk, C. A. (2008). Engineering vascularised tissues in vitro, *Eur Cell Mater*, 15, pp 27e40.
- Ryu, W., Fasching, R. J., Vyakarnam, M., et al. (2006). Microfabrication technology of biodegradable polymers for interconnecting microstructures, *J Microelectromech Syst*, Vol. 15, No. 6, pp 1457-1465.

- Nakanishi, J., Takarada, T., Yamaguchi, K., et al. (2008). Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences, *Anal Sci*, Vol. 24, No. 1, pp 67-72.
- Geun, C. B., Lifeng, K., Ali, K. (2007). Micro-and nanoscale technologies for tissue engineering and drug discovery applications, *Expert Opin Drug Discov.*, Vol. 2, No. 12, pp 1-16.
- Xu, C., Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S. (2004). Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, *Biomaterials*. Vol. 25, No. 5, pp 877-886.
- Yang, F., Murugan, R., Wang, S., Ramakrishna S. (2005). Electrospinning of nano/micro scale poly(L -lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials*, Vol. 26, No. 15, pp 2603-2610.
- Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., Ramakrishna, S. (2005). Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue En*, Vol. 11, No. 12, pp 101-109.
- Montigny, W. J., Houchens, C. R., Illenye, S., Gilbert, J., Coonrod, E., Chang, Y. C., Heintz, N. H. (2001). Condensation by DNA looping facilitates transfer of large DNA molecules into mammalian cells, *Nucleic Acids Res*, 29, pp 1982-1988.
- Flemming, R. G., Murphy, C. J., Abrams, G. A., Goodman, S. L., Nealey, P. F. (1999). Effects of synthetic micro and nano-structured surfaces on cell behaviour, *Biomaterials*, Vol. 20, No. 6, pp 573-588.
- Coopman, P. J., Bracke, M. E., Lissitzky, J. C. et al. (1991). Influence of basement membrane molecules on directional migration of human breast cell lines in vitro, *J Cell Sci*, 98, pp 395-401.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990). Multicellularity: cell-cell and cell-matrix interactions, *Molecular Cell Biology*. New York: Scientific American Books Inc, pp 903-51.
- Rosenberg, M. D. (1962). Long-range interactions between cell and substratum. *Proc Natl Acad Sci*, 48, pp 1342-9.
- Rosenberg, M. D. (1963). Cell guidance by alterations in monomolecular films. *Science*, Vol. 2, No. 139, pp 411.

- Miller, D. C., Thapa, A., Haberstroh, K. M., Webster, T. J. (2004). Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly (lactic- co -glycolic acid) with nano-structured surface features, *Biomaterials*, Vol. 25, No. 1, pp 53-61.
- Dalby, M. J., Marshall, G. E., Johnstone, H. J, Affrossman S, Riehle, M.O. (2002). Interactions of human blood and tissue cell types with 95-nm-high nanotopography, *IEEE Trans Nanobioscience*, Vol. 1, No.1, pp 18-23.
- Schindler, M., Ahmed, I., Kamal J, et al. (2005). A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo -like organization and morphogenesis for cells in culture, *Biomaterials*, Vol. 26, No. 28, pp 5624-5631.
- Zhang, S., (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol*, 21(10), pp 1171e1178.
- Dağlıoğlu, Y., Öztürk, B. Y. (2008). The assessment of biological accumulation on exposure in boron particles of *Desmodesmus multivariabilis*, *Biological Diversity and Conservation*, Vol. 9, No. 3, pp 204-209.
- Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Khademhosseini, A., Kobayashi, H. 2007 Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold, *J Control Release.*; Vol. 117, No. 3, pp 380-386.
- Fan, Y., Sun, Z., Wang, R., Abbott, C., Moradian-Oldak, J. (2007). Enamel inspired nanocomposite fabrication through amelogenin supramolecular assembly. *Biomaterials*. Vol. 28, No. 19, pp 3034-3042.
- Wang J, Apeldoorn A, Groot K. Electrolytic deposition of calcium phosphate/chitosan coating on titanium alloy: growth kinetics and influence of current density, acetic acid, and chitosan. *J Biomed Mater Res A*. Vol. 76, 3, pp 503-511.
- Gutwein LG, Webster TJ: Affects of alumina and titania nanoparticulates on bone cell function. American Ceramic Society 26 th Annual Meeting Conference Proceedings 2003 in press.

- Ma, J., Wong, H., Kong, L. B., Peng, K. W. (2003). Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology* Vol.14, pp 619-623.
- Shevach, M., Maoz, B. M., Feiner, R., Shapira, A., Dvir, T. (2013). Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 1, No. 39, pp 5210-5217.

BÖLÜM 8

BÖCEKLERDE SİNDİRİM SİSTEMİNE KISA BİR GİRİŞ

Öğr. Gör. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU¹

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye.
damlamutkan@gazi.edu.tr. ORCID 0000-0002-4780-8520

GİRİŞ

Bu bölümde böceklerin sindirim sistemi ve beslenme alışkanlıkları hakkında genel bilgiler verilecektir. Sindirim sistemi, farinks, özofagus (yemek borusu), kursak ve proventrikulus kısımlarını içeren bir ön bağırsak; gastrik çekum ve ventrikulustan oluşan bir orta bağırsak; ve ileum, kolon ve rektumdan meydana gelen son bağırsaktan oluşur. Bu sistem, depolama, sindirim, besin emilimi, suyun geri emilimi ve dışkı oluşumu gibi gıda işlenmesindeki tüm adımlardan sorumludur. Bu süreçler, sindirim sisteminde ön bağırsaktan son bağırsağa kadar kademeli olarak gerçekleşir. Böceklerin çeşitli besin tercihleri nedeniyle sindirim sistemlerinde önemli adaptasyonlar bulunmuştur.

Bu çalışma iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde böceklerin beslenme alışkanlıklarına kısaca değinilmiştir. Her böceğin beslenme alışkanlıkları birbirinden farklıdır. Böcek türleri arasında besin tercihi oldukça çeşitlidir. Bitkiyle beslenen türler olduğu gibi dışkıyla beslenen türler de bulunmaktadır. Böceklerin bu besin tercihlerini bilmek, sindirim sisteminin yapısının türler arasında nasıl farklılık gösterebileceğini anlamamıza yardımcı olacaktır.

İkinci bölümde böceklerin sindirim sistemleri hakkında kısa bilgiler verilmiştir. Sindirim sisteminin bölümleri anlatılmıştır; işlevleri ve hücre tipleri açıklanmıştır. Konuyla ilgili verilen bilgiler kaynak bölümünde kullanılan bazı makale ve kitaplardan derlenmiştir.

1. BÖCEKLERİN BESLENME TERCİHLERİ

Böcekler, şaşırtıcı derecede çok çeşitli besinlerle beslenirler. Bunlar canlı ve cansız bitkiler ve hayvanlar olabilir. Bitkilerin kök, yumru, soğan, sap, çiçek, meyve ve tohum gibi kısımlarını yiyerek beslenen böcekler bitkilere zarar verir (Brues, 1946; 1952; Snogress, 1967; Gangwere, 1972; 2004; Bernays ve Chapman, 1994). Böceklerin çok çeşitli yiyeceklerle beslenebilmesi sayesinde, beslenme kanalı morfolojik olarak uyum sağlayacak şekilde gelişmiştir. Bu nedenle sindirim sisteminin yapısı aydınlatılmadan önce bu bölümde böceklerin beslenme alışkanlıklarından kısaca bahsedilmektedir.

Ağaç zararlısı tırtıllar (Lepidoptera), çekirgeler (Orthoptera) ve Coleoptera takımından bazı böcekler bitkilerle beslenir ve bu böceklere fitofag böcekler denir. Bu tür beslenme, böcekler arasında en yaygın beslenme alışkanlıklarından biridir (Brues, 1946; 1952; Snogress, 1967; Gangwere, 1972; 2004; Bernays ve Chapman, 1994). Bu böceklerin, bir bitki türü ile beslenenlerine monofag, aynı familyadan farklı tür bitkiyle beslenenlere oligofag ve her tür bitkiyle beslenenlere ise polifag türler denir. Örnek olarak Dermaptera, Orthoptera, Heteroptera türlerine ait böcek türleri verilebilir (Brues, 1946; 1952; Snogress, 1967; Gangwere, 1972; 2004; Bernays ve Chapman, 1994; Chapman, 1998; Nation, 2015).

Bunların dışında zoofag olan ve et, kan, pislik ve diğer böcekleri yiyen böcekler de vardır. Bok böcekleri (Coleoptera), böcekler arasında sadece dışkı, mukus ve ölü hayvanları tüketmekle kalmaz,

aynı zamanda taze ve çürümüş bitki ile de beslenirler. Bu nedenle, doğanın ayrışma sürecinde önemli bir rol oynarlar (Brues, 1946; 1952; Snogross, 1967; Gangwere, 1972; 2004; Bernays ve Chapman, 1994).

Orthoptera takımından Tettigidea ve Tetrax cinslerine ait bazı çekirge türleri, genellikle toprakla beslenir. Sadece organik bileşenle beslenmekle kalmazlar, aynı zamanda kum ve diğer organik olmayan bileşenleri de tüketirler (Brues, 1946; 1952; Snogross, 1967; Gangwere, 1972; 2004; Bernays ve Chapman, 1994).

Ölü bitkileri ve hayvanları yiyen böcekler de vardır. Coleoptera takımından Glischrochilus cinsinin bazı üyeleri bu beslenme alışkanlığına örnek olarak verilebilir (Brues, 1946; 1952; Snogross, 1967; Gangwere, 1972; 2004; Bernays ve Chapman, 1994).

Termitler (Isoptera) gibi birçok böcek türü odunla beslenir ve selüloz bu böcekler için ana besin kaynağıdır. Bu türlerde beslenme alışkanlıklarına göre son bağırsak yapıları genişlemiştir.

Birçok böcek çürüten organik maddelerle beslenir. Bunlara ise saprofag böcekler denir (Chapman, 1998; Nation, 2015).

Birçok böcek ise, insanların veya hayvanların kanını emerek beslenir. Tahtakuruları (Hemiptera), pireler (Siphonaptera) ve sivrisinekler (Diptera) bu gruptaki böceklere örnek olarak verilebilir.

Kural olarak, sindirim sistemi etle beslenenlerde en kısa, bitki ile beslenenlerde daha uzun ve dışkı yiyenlerde ise en uzundur. Farklı

besin tercihlerine bağlı olarak, böcek türleri arasında sindirim sisteminin yapısı değişiklik gösterir.

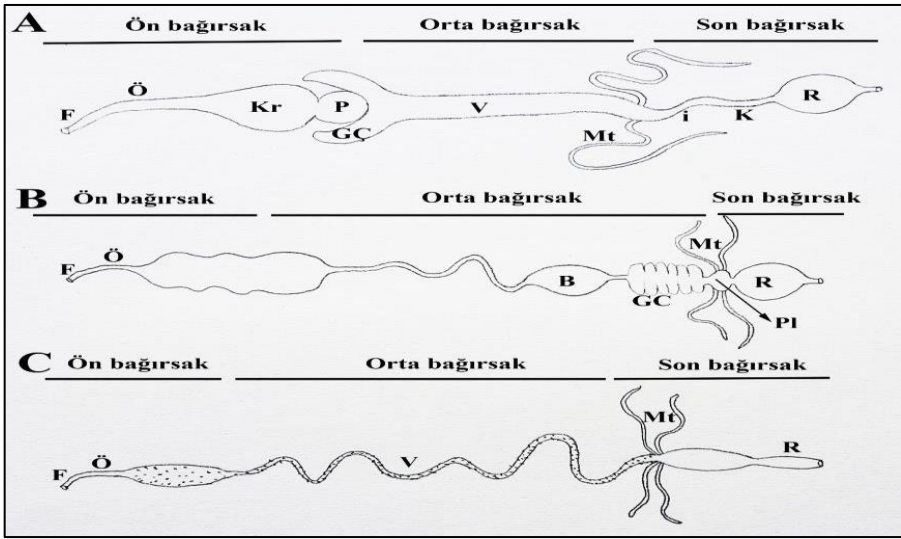
2. SİNDİRİM SİSTEMİNİN GENEL YAPISI

Tüm canlılar, aldıkları besinleri ayırmak için sindirim sistemini kullanırlar. Besinlerin çoğu, makromoleküller ve amino asitler gibi kompleks maddeler Şeklinde alındığından, vücut hücreleri tarafından kullanılmadan önce basit Őekerlerin daha küçük moleküllere ayrılması gerekir. Bunları da enerji, büyüme ve üreme gibi aktiviteler için oldukça önemlidir. Bu ayrışma/parçalanma sürecine sindirim adı verilir (Chapman, 1998; Jurenka, 2019). Yaşamak için tüm canlıların beslenmesi gerektiğinden sindirim sistemi ile ilgili çalışmalar büyük önem taşıtmaktadır (Amutkan, 2012; Jurenka, 2019).

Ağızdan anüse kadar tüp Şeklinde devam eden yapıya sindirim sistemi denir. Bceğın sindirim sisteminin n bağırsak, orta bağırsak ve son bağırsak olmak üzere üç ana bölgesi vardır (Şekil 1). n bağırsak ve orta bağırsak, orta bağırsak ve son bağırsağın birleştiği yerde kapakçık veya sfinkter bulunur. Bu kapakçık veya sfinkter, yiyeceklerin beslenme kanalından geçişini kontrol eder. n bağırsak ve son bağırsak ektodermal kökenli olmalarına rağmen orta bağırsak endodermal kökenlidir (Santos ve Serro, 2006; Biagio ve ark., 2009; Chapman, 1998; Terra ve Ferreira, 2009; Gullan ve Cranston, 2014).

n bağırsak, başta ağız açıklığı ile başlar. Epitel tabakası, kütikül (intima) içerir (Santos ve Serro, 2006; Resh ve Card, 2009). n bağırsak, farinks, özofagus (yemek borusu), kursak ve proventrikulus

olmak üzere bölümlere ayrılır (Fontanetti ve Zefa, 2000). Farinks, yiyeceğin yutulmasına ve geri itilmesine hizmet eder. Bu nedenle dış yüzeyinde iyi gelişmiş bir kas tabakasına sahiptir. Özofagus (yemek borusu) genellikle farinks ile kursağı birbirine bağlayan basit bir tüptür (Chapman, 2013; Snodgrass, 2018). Çoğu böcekte kursak, özofagustan sonra gelen ve depolama görevi yapan bir organdır (Chapman, 2013). Proventrikulus yapısındaki büyük dişler sayesinde gıdanın parçalanmasında görev yapmak üzere farklılaşmış bir organdır (Şekil 2) (Fontanetti ve Zefa, 2000; Chapman, 2013, Amutkan Mutlu, 2020; Amutkan Mutlu ve Suludere, 2020).



Şekil 1: Böceklerin sindirim sisteminin şematik görüntüsü A. Orthoptera takımına ait böceklerin genel sindirim sistemi. B. Heteroptera alt takımına ait böceklerin genel sindirim sistemi. C. Coleoptera takımına ait böceklerin genel sindirim sistemi.

F: Farinks; Ö: Özofagus (yemek borusu); Kr: Kursak; P: Proventrikulus; GC: Gastrik çekum; V: Ventrikulus; B: Bulb; Mt: Malpighi tüpleri; İ: İleum; K: Kolon; R: Rektum; Pl: Pylorus. Şekil, Damla Amutkan Mutlu tarafından çizilmiştir



Şekil 2: Orthoptera takımına ait bir tür olan *Isophya nervosa*'da geniş sklerotize tabanlı altı dişe sahip olan proventrikulusun enine kesitinin ışık mikroskop görüntüsü (Hematoksilen-Eosin boyaması)

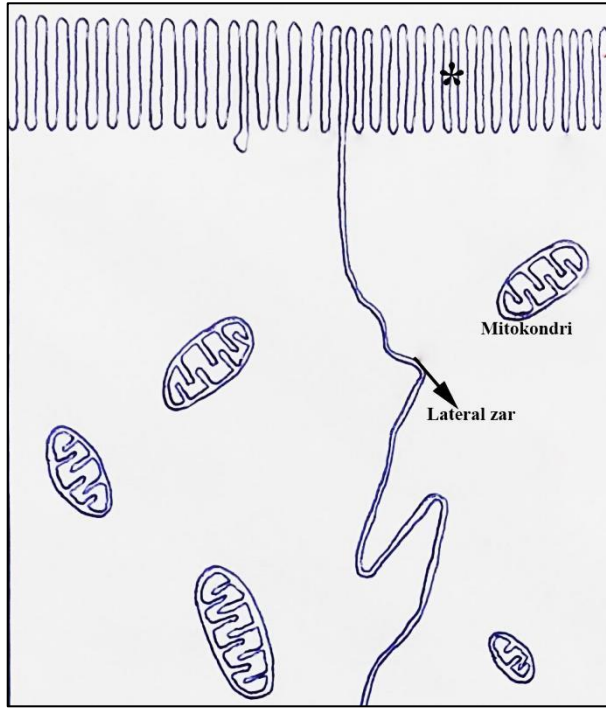
Ön bağırsakta bulunan hücreler salgılama veya emilim yapamaz. Ancak ön bağırsağın her bölümünde hücrelerin apikal yüzeyinde farklı kalınlıklarda kütikül tabakası vardır (Chapman, 1998; Amutkan, 2012). Ön bağırsağın böcek türlerinde farklı olan kısımlarından biri de proventrikulustur. Proventrikulus, öğütme/parçalama görevi gören bir organdır. Yapısında farklı sayıda sklerotize dişlere sahiptir. Bu organ özellikle Orthoptera, Blattodea ve Coleoptera gibi çiğneyici ağız kısımlarına sahip böcek türlerinde görülmektedir. Heteroptera takımına ait türler delici ve emici ağız parçalarına sahip oldukları için ön bağırsaklarında proventrikulus bulunmaz. Ön bağırsakta dıştan içe doğru kas tabakası, epitel tabakası ve kütiküler intima tabakası bulunur. Epitel tabakası tek tabakadır. Epitel hücrelerinin apikal

tarafında kütiküler intima tabakası vardır. Bu tabakanın kalınlığı ve üzerindeki dikenler böcek türlerine göre değişiklik gösterebilir.

Orta bağırsak, ön bağırsaktan sonra gelir ve böcek sindirim sisteminin önemli bir parçasıdır. Ayrıca metabolizma, bağışıklık tepkisi, elektrolitlerin homeostazı, ozmotik basınç, dolaşım ve diğer fizyolojik düzenlemelerde kritik roller oynar (Takeda, 2012). Genellikle ventrikulus ve gastrik çekum olmak üzere iki ana bölgeye sahiptir. Ventrikulus tübüler bir şekle sahipken; gastrik çekumun şekli, sayısı ve konumu değişiklik gösterebilir (Li ve ark., 2018; Amutkan Mutlu, 2020). Gastrik çekumun genellikle orta bağırsağın ön ucunda yer aldığı, ancak orta bağırsakta veya orta bağırsağın posteriyor ucunda da bulunabildiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2018; Amutkan Mutlu, 2020). Gastrik çekumun bazı Diptera larvalarında 2, Acrididae (Orthoptera) türlerinde 6, Culicidae (Diptera) larva ve Blattodea takımındaki türlerinde 8 ve bazı Coleoptera takımındaki türlerde çok sayıda bulunur. Bazı böceklerde gastrik çekum yoktur (Chapman, 1998; Amutkan, 2012).

Ön bağırsak gibi orta bağırsak da dışarıdan içeriye peristaltik hareketlere neden olan bir kas tabakasından ve bir epitel tabakasından oluşur (Klowden, 2013; Jurenka, 2019). Orta bağırsakta kütiküler intima tabakası yoktur. Bunun yerine hücrelerin apikal tarafında mikrovillus vardır. Orta bağırsak belirgin bir sadeliğe sahip olmasına rağmen, hücresel bir çeşitlilik ile karakterizedir. Bu varyasyon, sindirim enzimi salgılanmasından besin emilimine kadar devam eden ardışık aktivitelere izin verebilmek için gereklidir (Bruno ve ark.,

2019). Böceklerin orta bağırsak epitelleri genellikle tek tabakadan oluşur ve silindirik hücreler, rejeneratif hücreler, goblet hücreleri ve endokrin hücreler gibi farklı işlevlere sahip hücreler vardır. Silindirik hücreler ana hücrelerdir ve çok sayıda bulunur (Şekil 3) (Klowden, 2013; Bruno ve ark., 2019). Orta bağırsak hücreleri aktif olarak enzim üretimi ve salgılanmasının yanı sıra besinlerin emiliminde de görevlidir (Silva, 1995).



Şekil 3: Böceklerin orta bağırsağındaki ana/silindirik hücrenin şematik görüntüsü. *: Mikrovillus. Şekil, Damla Amutkan Mutlu tarafından çizilmiştir

Böceklerin orta bağırsak epitelinde, onu kaba besin parçacıklarının zararlı etkilerinden koruyacak hücelere sahip değildir. Özellikle katı besinlerle beslenen böceklerde peritrofik membran (peritrofik zar) adı

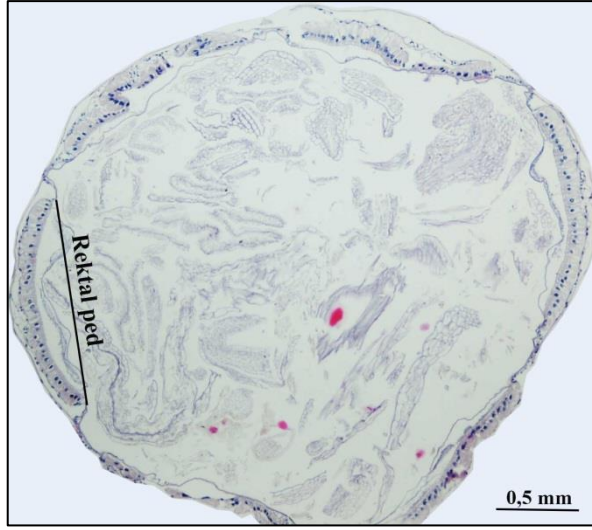
verilen koruyucu bir yapı salgılanır. Bu zar, film benzeri bir yapıdır ve kitin ve proteinlerden oluşur. Peritrofik membran, orta bağırsağın tüm hücreleri (Tip I) veya yalnızca orta bağırsağın anterior tarafında bulunan bir grup hücre (Tip II) tarafından üretilir. Tip 1 peritrofik membran Coleoptera, Ephemeroptera, Hymenoptera, Orthoptera ve Diptera takımlarına ait türlerde bulunur. Tip 2 peritrofik membran ise Isoptera, Lepidoptera, Dermaptera takımlarına ait böceklerde bulunur (Chapman, 2013; Gullan ve Cranston, 2014). Sindirilen yiyecekler ve sindirim enzimleri bu zardan geçer. Bu zar, bitki sıvılarını ve kanı emen böceklerde oluşmaz. Bu böceklerde ise mikrovillusu kaplayan perimikrovillar membran adı verilen ve peritrofik membrana benzer bir membran bulunur. Peritrofik ve perimikrovillar membran, virüs ve bakteri gibi mikroorganizmalara karşı bariyer görevi görmesinin yanı sıra gıda parçacıklarının aşındırıcı etkisinden de orta bağırsak hücrelerini korur (Lehane, 1997; Resh ve Cardé, 2009; Amutkan 2012; Terra ve Ferreira, 2012).

Peritrofik zar, büyük moleküllerin, bakterilerin ve besin parçacıklarının doğrudan orta bağırsak hücrelerine ulaşmasını sınırlarken küçük moleküllerin geçişine izin veren gözeneklere sahiptir (Gullan ve Cranston, 2014). Bu gözeneklerin çoğu 7-9 nm aralığındadır, ancak bazıları 36 nm kadar büyük olabilir (Terra, 2001; Chapman, 2013; Jurenka, 2019). Lepidoptera larvalarında bu gözeneklerin boyutları 21-29 nm çapında iken, orthopteran türlerinde gözenekler 24-36 nm çapında olabilmektedir. Böylece peritrofik membran, moleküllerin serbest hareketini engeller (Terra, 2001;

Bolognesi ve ark., 2008; Chapman, 2013; Gullan ve Cranston, 2014; Jurenka, 2019).

Son bağırsak, ön bağırsak gibi ektodermal kökenlidir, bu nedenle kütiküler intima ile kaplıdır. Bu alanda artık maddeler uzaklaştırılarak suyun geri emilimi gerçekleştirilir. Orta bağırsak ile son bağırsak arasında atık maddelerin atılımdan sorumlu Malpighi tüpleri vardır. Azotlu atıkların hemolenften uzaklaştırılmasından sorumludur. Malpighi tüplerinin sindirim sistemine bağlandığı yerden başlayarak sırasıyla ileum, kolon ve rektum bölgeleri gelir ve bunlar son bağırsağın parçalarıdır. Birçok böceğin rektumunda rektal pedler veya rektal şişkinlik adı verilen alanlar vardır. Bunlar, son bağırsağın özel yapılarıdır (Şekil 4). Son bağırsakta tek tabakalı bir epitel vardır. Hücreler bir bazal laminaya otururlar ve bir kas tabakası ile çevrilidirler. Hücrelerin apikal taraflarında kütiküler intima tabakası bulunur (Peacock, 1985; Phillips ve ark., 1987; Biagio ve ark., 2009).

Ön bağırsakta emilim çok düşüktür. Çoğunlukla hamamböceği (Blattodea) kursağında yağın emilimi başlar. Orta bağırsak, emilimin ana merkezidir. Bununla birlikte, suyun çoğu son bağırsakta yeniden emilir.



Şekil 4: Orthoptera takımına ait bir tür olan *Isophya nervosa*'da rektumun enine kesitinin ışık mikroskop görüntüsü (Hematoksilen-Eosin boyaması)

Böceklerin besinleri genel olarak protein, karbonhidrat ve lipid olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bu besinleri parçalamak için sindirim kanalındaki hücrelerden amilaz, maltaz, invertaz, laktaz, proteaz, karbonhidraz, peptidaz, lipaz, selülaz gibi enzimler salgılanır. Tükürük bezleri ayrıca sindirime yardımcı olmak için enzimler salgılar. Böceklerin çoğunun tükürüklerinde amilaz enzimi vardır ve bazı arıların tükürüklerinde de invertaz enzimi bulunur. Böceklerde sindirim ve emilim kural olarak orta bağırsakta meydana gelirse de, termitlerde (Isoptera) sindirim son bağırsaktadır. Termitlerin sindirim sisteminde selülozlu besinleri sindirecek enzimleri bulunmadığından, sindirimi son bağırsaktaki mikroorganizmalar yapar (Chapman, 1998; 2013).

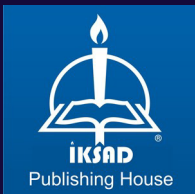
Sonuç olarak, bu derleme çalışmasında böceklerin sindirim sisteminin genel yapısı ve böceklerin beslenme alışkanlıkları anlatılmaktadır. Böceğin beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak sindirim sisteminde değişiklikler olabilir. Aynı zamanda beslenirken çevreye de zararlı olabilirler. Bu zararın kontrol altına alınabilmesi için böceklerin iç sistemlerinin bilinmesi gerekir. Bununla birlikte, birçok çalışma böceklerin sindirim sisteminin histolojisine, morfolojisine veya fizyolojisine ve haşere yönetimine odaklanmıştır. Bu çalışmaların yapılabilmesi için sindirim sistemi ile ilgili temel bilgilerin anlaşılması önemlidir. Bu çalışmanın içeriğinin, böceklerin sindirim sistemi üzerine yapılan çalışmalara temel teşkil etmesi amaçlanmıştır.

KAYNAKÇA

- Amutkan Mutlu, D. (2012). Ultrastructural of digestive canal of *Graphosoma lineatum* (Linneaus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae) (Master dissertation). Gazi University, Institute of Science and Technology, Ankara, 1-106. (in Turkish)
- Amutkan Mutlu, D. (2020). Ultrastructural features of digestive, excretory, female and male reproductive systems of *Isophya nervosa* Ramme, 1931 (Orthoptera: Tettigoniidae) (Doctoral dissertation). Gazi University, Science Institute, Ankara, 1-163. (in Turkish)
- Amutkan Mutlu, D. and Suludere, Z. (2020). Ultrastructure of the proventriculus in adult *Isophya nervosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). Munis Entomology and Zoology Journal, 15(2), 647-654.
- Bernays, E. A. and R. F. Chapman. (1994). Host-plant selection by phytophagous insects. In Contemporary Topics Entomology, 2, Chapman & Hall, New York, pp. 312.
- Biagio, F. P., Tamaki, F. K., Terra, W. R., and Ribeiro, A. F. (2009). Digestive morphophysiology of *Grylodes sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae). Journal of Insect Physiology, 55(12), 1125-1133.
- Bolognesi, R., Terra, W. R., and Ferreira, C. (2008). Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: theoretical and experimental models. Journal of Insect Physiology, 54(10-11), 1413-1422.
- Brues, C. T. (1946). Insect dietary. An account of the food habits of insects. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 466.
- Brues, C. T. (1952). How insects choose their food plants. In A. Stefferud et al. (Eds). Insects: The yearbook of agriculture. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, pp. 37-42.
- Bruno, D., Bonelli, M., Cadamuro, A. G., Reguzzoni, M., Grimaldi, A., Casartelli, M., and Tettamanti, G. (2019). The digestive system of the adult *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae): morphological features and functional properties. Cell and Tissue Research, 378(2), 221-238.

- Chapman, R. F. (1998). Alimentary canal, digestion and absorption. In *The Insect: Structure and Function* (4th ed.). Cambridge University press, United Kingdom, pp. 38-68.
- Chapman, R. F. (2013). Alimentary canal digestion and absorption. In S. J. Simpson and A. E. Douglas (Eds). *The insect structure and function*. Cambridge University press, United Kingdom, pp. 46-80.
- Fontanetti, C. S. and Zefa, E. (2000). Morphological characterization of the proventriculus of *Gryllus assimilis* Fabricius (Orthoptera, Gryllidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(1), 193-198.
- Gangwere, S. K. (1972). Host finding and feeding in the Orthopteroidea, Especially as modified by food availability: a review. *Revista de la Universidad de Madrid*, 21(82), 107-158.
- Gangwere, S. K. (2004). Food habits of insects. In *Encyclopedia of entomology*. Springer, Dordrecht.
- Gullan, P. J. and Cranston, P.S. (2014). Internal anatomy and physiology. In *The insects: An outline of entomology* (5th ed.). John Wiley & Sons, pp. 77-86.
- Jurenka, R. (2019). Molecular physiology of insect midgut. In W. R. Terra, I.G. Barroso, R.O. Dias, and C. Ferreira (Eds.). *Advances in insect physiology*. Academic Press, United Kingdom, pp. 117-164.
- Klowden M. J. (2013). Metabolic systems. In *Physiological systems in insects* (3rd ed.). Academic press, Cambridge, pp. 305-347.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Reviews Entomology*, 42, 525-550.
- Li, K., Zhang, J. H., Yang, Y. J., Han, W., and Yin, H. (2018). Morphology and fine organization of the midgut of *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). *PloS One*, 13(7), 1-13.
- Nation Sr, J. L. (2015). Digestion. In *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC press, pp. 33-98.
- Peacock, A. J. (1985). Distribution of (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase in the hindgut of *Glossina morsitans morsitans* Westwood. *Experientia*, 41(11), 1438-1440.

- Phillips, J. E., Hanrahan, J., Chamberlin, M., and Thomson, B. (1987). Mechanisms and control of reabsorption in insect hindgut. *Advances in Insect Physiology*, 19, 329-422.
- Resh, V. H. and Cardé, R. T. (Eds.). (2009). *Encyclopedia of insects* (2nd ed.). Academic Press, Cambridge, pp. 1132.
- Santos, C. G. and Serrão, J. E. (2006). Histology of the ileum in bees (Hymenoptera, Apoidea). *Journal of Morphological Sciences*, 23(3-4), 405-413.
- Silva, C. P., Ribeiro, A. F., Gulbenkian, S., and Terra, W. R. (1995). Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells, *Journal of Insect Physiology*, 41(12), 1093-1103.
- Snodgrass, R. E. (2018). *Principles of insect morphology*. Cornell University Press, New York, pp. 352.
- Snodgrass, R. E. (1967). *Insects: Their ways and means of living*. Dover Publications, pp. 362.
- Takeda, M. (2012). Structures and functions of insect midgut: The regulatory mechanisms by peptides, proteins and related compounds. *Hemolymph Proteins and Functional Peptides: Recent Advances in Insects and Other Arthropods*, 1, 94-110.
- Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(2), 47-61.
- Terra, W. R., and Ferreira, C. (2009). Digestive system. In *Encyclopedia of insects* (2nd ed.). Academic Press, pp. 273-281.
- Terra, W. R., and Ferreira, C. (2012). Biochemistry and molecular biology of digestion. In *Insect molecular biology and biochemistry*. Academic Press, pp. 365-418.



ISBN: 978-625-7636-79-7