

SPECIAL TOPICS IN BIOLOGICAL SCIENCES

EDITOR

Nimet YILDIRIM TİRGİL

AUTHORS

Agus SABDONO

Aseel J. KADIM

Çiğdem KÜÇÜK

Demet HANÇER AYDEMİR

Endang SRI LESTARI

Hakan BOZDOĞAN

Luay Q. ABDULHAMEED

Mada Triandala SIBERO

Margaretha MONALISA

Mohanad W. Mahdi ALZUBAIDY

Nimet YILDIRIM TİRGİL

Saja Mohammed MOHSEN

Şeyda BERK



İKSAD
Publishing House

SPECIAL TOPICS IN BIOLOGICAL SCIENCES

EDITOR

Nimet YILDIRIM TİRGİL

AUTHORS

Agus SABDONO

Aseel J. KADIM

Çiğdem KÜÇÜK

Demet HANÇER AYDEMİR

Endang SRI LESTARI

Hakan BOZDOĞAN

Luay Q. ABDULHAMEED

Mada Triandala SIBERO

Margaretha MONALISA

Mohanad W. Mahdi ALZUBAIDY

Nimet YILDIRIM TİRGİL

Saja Mohammed MOHSEN

Şeyda BERK



Copyright © 2022 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 Publicator: 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 – 2022©

ISBN: 978-625-8246-06-3
Cover Design: İbrahim KAYA
October / 2022
Ankara / Türkiye
Size = 16x24 cm

CONTENTS

PREFACE

Dr. Nimet YILDIRIM TİRGİL1

CHAPTER 1

MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES

Assist. Prof. Dr. Demet HANÇER AYDEMİR.....3

CHAPTER 2

WEARABLE BIOSENSOR SYSTEMS FOR DIAGNOSTIC APPLICATIONS

Dr. Nimet YILDIRIM TİRGİL21

CHAPTER 3

BITKİ SAĞLIĞI İLE DOST FUNGİ:

TRICHODERMA SPP.

Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK41

CHAPTER 4

KOLOREKTAL KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE KÜLTÜRÜ

Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK63

CHAPTER 5

GORGONIAN ELLISELLA SP.-ASSOCIATED BACTERIA AS A PROMISING ANTIPATHOGENIC AGENT AGAINST SKIN DISEASES IN HUMANS

Margaretha MONALISA

,Agus SABDONO

Endang SRI LESTARI

Mada Triandala SIBERO.....91

CHAPTER 6

ASSOCIATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE 2 GENE POLYMORPHISM RS4880 WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AMONG IRAQI WOMEN

Luay Q. ABDULHAMEED

Mohanad W. Mahdi ALZUBAIDY

Aseel J. KADIM

Saja Mohammed MOHSEN117

CHAPTER 7

LATİN AMERİKA ÜLKELERİ'NDE YÜRÜTÜLEN BİYOLOJİK MÜCADELE ÇALIŞMALARI **Biological control studies in Latin American countries**

Doç. Dr. Hakan BOZDOĞAN129

PREFACE

As a field of science, biological sciences help us understand the living world and how its many species (including humans) function, evolve and interact. Advances in medicine, agriculture, biotechnology, and many other areas of biological sciences have brought improvements in the quality of life. Biological sciences are highly multidisciplinary since they have their foundations in many disciplines, including biology, microbiology, biochemistry, chemistry, and chemical and even materials engineering.

The chapters in this book have various areas of expertise in biological science. Therefore, this book is interdisciplinary and is written for readers with a wide range of areas, including microbiology, biosensors, biomedical sciences, bacterial and fungal research, cancer-related research, biological control studies, and so on.

The book consists of seven chapters with independent contents related to interdisciplinary biological sciences. I hope readers will benefit from this book, which presents the research of our esteemed authors.

Dr. Nimet YILDIRIM TİRGİL
Ankara/2022

CHAPTER 1

MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDES

Assist. Prof. Dr. Demet HANÇER AYDEMİR¹¹

¹ Süleyman Demirel University, Isparta Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Isparta, Türkiye, demetaydemir@sdu.edu.tr, ORCID ID 0000-0003-0174-8769

INTRODUCTION

Microorganisms synthesize three different types of polysaccharides; intracellular (storage) polysaccharides, extracellular polysaccharides, and structural polysaccharides. Exopolysaccharide forms are capsular structures that may be fused with the cell wall, or are produced as independent secretions that accumulate outside the cell wall in large quantities and diffuse into the culture medium (Donot et al., 2012).

In the industrial field, polymers obtained from algae and plants are generally used. Alginate, cellulose, starch, mannan are examples of commercially used polymers. However, it is not always cheap to obtain polymers or chemical derivatives of polymers from all plant and algae species. Sustainable and economical production of bioactive polysaccharides in industry is faster and higher in microorganisms than plants and algae under fully controlled fermentation conditions. While herbal production takes place in 3-6 months depending on seasonal and geographical conditions, microbial production can be carried out within days or weeks. In addition, both the sun and various carbon sources are needed for biopolymer production by microalgae. There is no need for solar energy for microbial production, microorganisms can use a wide variety of organic sources as a source of fermentation. Apart from these, it also has advantages such as energy efficiency, recyclability of industrial wastes and less space requirement. However, cost is the most important factor limiting microbial production. A significant part of the cost consists of needs such as substrate source and bioreactor (Donot et al., 2012). It has been determined that many bacteria, yeast, mold and archaea species are capable of producing microbial exopolysaccharide, but bacteria are the best exopolysaccharide producers in terms of quantity and variety (Donot et al., 2012; Kumar, 2012). From this point of view, microorganisms are preferred in the production of bioactive polysaccharides.

This chapter summarizes valuable insights into the properties of different types of exopolysaccharides secreted by various microorganisms, as well as their application in the modern era.

1. General Properties of Exopolysaccharides

Exopolysaccharides produced by microorganisms are basically straight or branched, water-soluble, ionic or non-ionic biopolymers formed by the bonding of monosaccharides with glycosidic bonds. The monosaccharides that make up the exopolysaccharides are mostly hexoses, but pentoses can also be found in the structure of some exopolysaccharides. Apart from polysaccharides, exopolysaccharides can also contain compounds such as proteins, nucleic acids, phospholipids (Bhaskar & Bhosle, 2005; Nadzir et al., 2021). Therefore, they carry different functional groups such as acetyl, pyruvyl, succinyl (Singh et al., 2011).

Exopolysaccharides have many types that differ greatly in their composition and structure. While some of these polymers have high chemical similarity with cell wall components, most of them have different chemical structures that are not related to cell components. In addition to their location and chemical composition, there are other criteria such as molecular mass and conformation that affect the properties of polysaccharides (Sutherland, 1990).

Exopolysaccharides are more difficult to identify than carbohydrate-containing polymers found in the microbial cell wall. Exopolysaccharide-producing microorganisms can be recognized by the mucoid appearance of colonies on solid surfaces. In broths, cultures producing exopolysaccharide can become highly viscous (Sutherland, 1990).

Microbial exopolysaccharides are divided into two groups as homopolysaccharides and heteropolysaccharides according to the simple sugars in their structure (Welman & Maddox, 2003).

1.1. Homopolysaccharides

Most homopolysaccharides consisting of repeating units of a single type of monosaccharide are glucans and fructans. Important exopolysaccharides in homopolysaccharide structure include cellulose, dextran, mutant, alternan, pullulan, levan, kurdlan (Welman & Maddox, 2003). There are three different types of homopolysaccharides. The first of these are linear, neutral glucans

containing a single type of bond. In addition, polyanionic homopolymers containing acyl groups are also available. The third type, scleroglucan type homopolysaccharides, is more complex and rarely encountered. Such homopolysaccharides have tetrasaccharide units due to repeating 1,6- α -D-glycosyl side chains (Sutherland, 1990). Homopolysaccharides are usually synthesized by extracellular enzymes using sucrose (Majee et al., 2017).

Homopolysaccharides are divided into four groups as follows;

- α -D-glucans (alternan, dextran, mutant, reuteran),
- β -D-glucans (cellulose, curdlan),
- fructans (inulin, levan) and
- polygalactans (Nadzir et al., 2021).

α -D-glucans are generally produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. β -D-glucans are produced by *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, fructans are produced by *Streptococcus saliva* (De Vuyst & Degeest, 1999).

1.2. Heteropolysaccharides

Heteropolysaccharides, which contain several different monosaccharides in their structure, are in the form of repeats of oligosaccharides. Each repeating unit contains two or more monosaccharides and shows a different bond structure (Welman & Maddox, 2003). It has been stated that the repeating units are generally D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine and glucuronic acid (Duboc & Mollet, 2001). All of the heteropolysaccharides show polyanionic properties due to the uronic acid in their structure (Singh et al., 2008). In the structure of heteropolysaccharides, there are also side chains of different lengths containing one to four sugars. Short side chains in the heteropolysaccharide structure may rarely show branching within themselves. Exopolysaccharides with some different side chains can

also be found. These differing side chains are often in the form of a single monosaccharide attached to the main chain.

Important members of heteropolysaccharides are as follows;

- Xanthan gum (glucose, mannose, glucuronic acid),
- hyaluronic acid (N-acetyl glucosamine, glucuronic acid),
- gellan (D-glucose, L-rhamnose, D-glucuronic acid),
- kefiran (glucose, galactose) and
- alginate (β -d- mannuronate, α -L-gluronate) (Nadzir et al., 2021).

Heteropolysaccharides are mostly synthesized intracellularly and constitute an important part of the bacterial exopolysaccharide group. The biosynthesis pathway of heteropolysaccharides is more complex than homopolysaccharides. Heteropolysaccharide synthesis takes place in three steps; assimilation of simple sugars and their conversion to nucleotide derivatives; adding pentasaccharide subunits to lipid carriers; polymerization of repeating pentasaccharide units and their secretion into the external environment. Lipid transporters play a critical role in heteropolysaccharide production and are associated with exopolysaccharide secretion. These transporters are long chain ester and isoprenoid alcohols, the same as those in lipopolysaccharide, O-antigen and peptidoglycan biosynthesis (Donot et al., 2012). Heteropolysaccharides are generally produced by mesophilic lactic acid bacteria such as *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *L. rhamnosus*, *L. casei* and thermophilic lactic acid such as *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *Streptococcus thermophilus* (Vaningelgem et al., 2004).

Microbial exopolysaccharides are also classified according to their cellular location, chemical and physical structure properties and functions. Accordingly, exopolysaccharides are divided into three main classes;

- capsular polysaccharides covalently attached to the cell surface;
- polysaccharides, which are a component of the cell wall;
- non-covalent, weakly bonded polysaccharides secreted into the external environment or with the cell surface (Singh et al., 2006).

2. Physiological Properties of Exopolysaccharides

The function of exopolysaccharides is to protect the cell from negative external effects. Exopolysaccharides have important roles such as storage of macromolecules such as protein and phosphate, protection of genetic information, energy production, energy reduction, defense against dangerous environmental factors such as antibacterial and heavy metals (Donot et al., 2012).

Exopolysaccharides protect the microorganism against desiccation, phagocytosis, phage attacks, antibiotics, heavy metals, toxic compounds and osmotic stress. In addition, it is effective in biofilm formation by enabling the cell to adhere to solid surfaces (Vu et al., 2009).

Exopolysaccharides regulate the intestinal flora, improve the immune system, lower cholesterol, and have antiulcer and antitumor activities (De Vuyst & Degeest, 1999). Therefore, the demand for the use of lactic acid bacteria as probiotics is increasing. Exopolysaccharide production provides various benefits to the probiotic strain, such as protection from the negative effects of stomach and intestinal conditions and increasing colonization in the intestine. Exopolysaccharides show prebiotic properties because they cannot be broken down by bacteria in the digestive system. Exopolysaccharide produced by members of *Bifidobacteria* has been shown in studies to modify the interaction between microorganisms in the intestine (Salazar et al., 2008).

Synthetic and natural antioxidants are used to prevent free radical damage to the organism. Since synthetic antioxidants are known to cause carcinogenesis and liver damage, the production of natural and non-toxic antioxidants that protect human health from free radicals has

emerged (Liu et al., 2009; Mahapatra & Banerjee, 2013). For this reason, the use of exopolysaccharides, which have antioxidant and free radical binding properties, has increased. Exopolysaccharides carry out the oxidation of vegetable oils by binding free radicals (Kishk & Al-Sayed, 2007).

3. Exopolysaccharide Producing Microorganisms

Many different species that produce exopolysaccharide have been isolated. These polysaccharides have been isolated from archaea, bacteria, cyanobacteria, fungi, microalgae and mostly from mesophilic, thermophilic and halophilic microbial groups (Singha, 2012).

The most widely used and best-known exopolysaccharides (xanthan, dextran, gellan and curdlan) are produced by *Xanthomonas*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes* species. Dextran, synthesized by lactic acid bacteria (such as *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus mutans*), is the first microbial polysaccharide commercialized and approved for food use. Pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* and scleroglucan produced by *Sclerotium glaucum* are the most well-known fungal polysaccharides (Kazak et al., 2010).

In the mesophilic group, many lactic acid bacteria (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus spp.*, and *Streptococcus spp.*) can synthesize exopolysaccharide in capsule or slime form. Other exopolysaccharide producers in this group are *Acetobacter spp.*, *Sinorhizobium spp.*, *Aureobasidium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia spp.*, and *Acetobacter spp.* (Singha, 2012).

Thermophilic bacteria and archaea isolated from various environments are also capable of producing exopolysaccharide. These microorganisms include bacteria such as *Alteromonas infernus*, *Alteromonas macleodii subsp. fijiensis*, *Vibrio diabolicus*, *Thermotoga maritima* and some archaea belonging to the genera *Thermococcus* and *Sulfolobus* (Kazak et al., 2010).

Even in recent years, there is very little knowledge about halophilic microorganisms that have the capacity to produce exopolysaccharides. Halophilic Archaea include *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus*, and *Halobacterium* species (Ergene & Avci, 2016). The most common exopolysaccharide producing halophilic bacteria are *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis* (Mata et al., 2006). Exopolysaccharide producing *Halomonas* species produce unusually high sulfate and significant amounts of uronic acid, which determines the gelling property (Ergene & Avci, 2016).

A halophilic micro-algae (*Dunaliella salina*) and two halophilic Cyanobacteria (*Cyanothece sp. 113* and *Aphanocapsa halophytica*) were also reported as exopolysaccharide producer (Kazak et al., 2010).

4. Exopolysaccharide Production

Exopolysaccharide production is associated with bacterial growth, and this production reaches its highest level under optimum conditions. Bacterial growth and exopolysaccharide production vary depending on the substances such as carbohydrates, nitrogen sources, vitamins, salt, and incubation temperature, duration, oxygen level, pH (De Vuyst & Degeest, 1999). Bacterial exopolysaccharide production usually takes place under aerobic conditions. Maximum ventilation is required for exopolysaccharides such as xanthan gum, while microaerophilic conditions are sufficient for bacterial alginate (Rehm, 2009).

Exopolysaccharide secretion begins with the secretion of specific pheromones, called 'Quorum Sensing', depending on the bacterial density. Secreted pheromones initiate biochemical events such as antibiotic production, biofilm formation, and sporulation (Donlan, 2002).

Polysaccharides are synthesized at varying rates according to the strain and different stages of the microbial growth stage. The synthesis event can occur in the membrane as well as outside the cell (Donlan, 2002). Bacterial exopolysaccharide synthesis takes place inside the cell and is secreted out of the cell as a macromolecule.

Secreted enzymes convert the substrate to polymer outside the cell. Apart from this, there are exceptional cases where exopolysaccharide synthesis and polymerization occur outside the cell, such as levan and dextran (Freitas et al., 2011).

Many enzymes that are not specific to polysaccharide synthesis are involved in the formation of exopolysaccharides. These enzymes can be listed as follows (Sutherland, 1977):

- UDP-glucose-dehydrogenase
- glucosyl-transferase
- galactosyl – transferase 1 and 2
- polymerase

Heteropolysaccharides are synthesized inside the cell and then taken out of the cell and surround the cell. The presence of many enzymes is required during the processes, and some of these enzymes are involved in the synthesis of lipopolysaccharides. Synthesis of neutral homopolysaccharides such as levan and dextran is different from each other. These exopolysaccharides are produced extracellularly in the presence of sucrose by the activity of levansucrase and dextransucase enzymes, respectively (Sutherland, 1990).

Exopolysaccharide synthesis is an intracellular process (Kumar et al., 2007). It is mostly regulated by genes localized to chromosomes, but in some species it is controlled in two different ways as megaplasmid and chromosome (Mishra & Jha, 2013). According to the produced polymer, a gene sequence of 12-17 kb is needed (Freitas et al., 2011).

Exopolysaccharides can be produced on agar plates or in liquid culture (Yang et al., 2001). The production of most microbial polysaccharides is carried out in stirred tank fermenters using medium containing glucose or sucrose as the carbon and energy source. The synthesis is usually carried out in medium with high C:N ratios. Due to the high viscosity of the fermentation broth, effective mixing and aeration are required with significant energy input (Sutherland, 2002).

The rheology of the fermentation liquid is important in EPS production. The increase in viscosity causes a decrease in the

homogeneity of the medium. This makes mixing, aeration, and control of bioreactor conditions difficult (Freitas et al., 2011).

5. Application Areas of Exopolysaccharides

Although microorganisms commonly produce exopolysaccharides, it has been reported that a limited number of exopolysaccharides are suitable for industrial usage due to their physicochemical properties. The important microbial exopolysaccharides used in industry today are pullulan, gellan, xanthan, dextran, kurdlan and levan (Kazak et al., 2010). Exopolysaccharides, which are considered as a new biomaterial and secreted out of the cell, have gained many applications in different industries such as medicine, pharmacology, petroleum, food, textile, detergent, cosmetics, river treatment process, stream bed cleaning, fermentation, mining and metallurgical industry, agriculture and wastewater treatment due to their different physicochemical and rheological properties (Freitas et al., 2011). This situation allows the interest in microbial origin exopolysaccharides to increase gradually and make them more valuable.

Until recently, industrial usage of polysaccharides were with materials extracted from plants (starch, cellulose, pectins, galactomannans, gums) or algae (carrageenan, alginates, agar). However, in the last 30 years, biotechnology systems have begun to be developed for the microbial production of extracellular polysaccharides. Microbial polysaccharides are widely used in the food industry, biotechnology, medicine and pharmacy (Sutherland, 2002; Mironescu, 2003).

Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria are used in the food industry because exopolysaccharides have viscosity-increasing, structure-regulating, water-binding, emulsifying and stabilizing properties. Exopolysaccharides, which are in the GRAS status (generally accepted as safe) and produced by lactic acid bacteria, are used industrially in the fermentation of raw foods, vegetables and meat, especially in the dairy industry (Welman & Maddox, 2003).

In addition to their properties such as forming a biofilm layer, exopolysaccharides are also used as an adjunct to physiological activity agents such as anti-tumor, anti-viral and anti-inflammatory in the pharmaceutical industry (Becker et al., 1998). This has led to an increasing interest in microbial exopolysaccharides and make them more valuable.

Dextran is the first microbial polysaccharide to be commercialized and approved for food use. It is also used in medicine as an intravenous infusion as a plasma volume expander due to its favorable physiological properties and very weak antigenic properties (Sutherland, 2002).

Some of the microbial polysaccharides such as xanthan are produced with modern biotechnological systems. Xanthan gum is widely used in the food, cosmetic, paint, paper, oil and textile industry, due to its non-toxicity, resistance to acids and salts, being effective even at low concentrations and showing quite a lot of pseudoplastic properties (Becker et al., 1998; Garcia-Ochoa et al., 2000).

Jellan is widely used in foods in the USA and Europe as a gelling, stabilizing and suspending element, alone or in combination with other hydrocolloids. It provides enrichment in agar-based bacterial media and growth can be seen. Thermostable gel structure can eliminate the problems caused by agar in the development of thermophilic microorganisms. Other usage areas of gellan are gelling element in dental products, personal care products and its mixture with starch is used in the paper industry (Sutherland, 1998).

Kurdlan is used to improve the textural structure, increase the water holding capacity and provide thermal stability in various foods (Zhou et al., 2014). It is also widely used for shaping processed products and pastry (Sutherland, 1998).

Levan has different uses such as emulsifier, stabilizer, thickener, coating agent, osmo-regulator and protection against cold in different industrial areas such as food, cosmetics, medicine and chemistry. Levan also has radioprotective, antitumor and antihyperlipidemic properties that prolong drug activity (Kang et al., 2009).

Alginate is produced by brown seaweeds or by many bacteria, including *Azotobacter vinelandii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Today, large-scale production is more economical for algae alginate. But microbial alginate production has important advantages such as stable composition, stable yield and little contamination, and if the process is optimized, microbial alginate production becomes more advantageous. Commercially, alginates are used in many fields due to their water-retaining, gelling, stabilizing and emulsifying properties. In the food industry, alginates are used as a stabilizer in ice cream, as a shaping agent in bakery fillings and sugar coatings, as a gelling agent in pudding and dessert gels (Urtivia et al., 2017).

Pullulan is an economically important and industrially attractive homopolysaccharide. It is produced extracellularly by *Aureobasidium pullulans*, a mold with yeast characteristics. Recently, however, it has been determined that pullulan can also be produced by the yeast *Rhodotorula bacarum* (Lee, 2002). It has the characteristics of bio-reducing, oil-resistant, heat-proof, oxygen-proof, non-toxic, and therefore it has the feature of being easily converted into edible films. Pullulan is an industrially interesting biopolymer due to its properties and can be used in many areas of industry. Among the uses of pullulan in the food industry are its use as a food coating and packaging material, and its use as a substitute for starch in low-calorie food formulations. It can also be used as a microencapsulating agent for flavorings and spices (Oğuzhan & Yangılar, 2013).

Some polysaccharides are included in the composition of vaccines when they bound to a suitable protein. For this purpose, multivalent polysaccharide vaccines against *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella spp.* have been formulated. It has been determined that a homopolymer called 'Scleroglucan' or 'Schizophyllan' obtained from several fungal species has a role in tumor suppression and stimulation of immune response. Therefore, β -linked glucans have been clinically tested in Japan and proven to be effective against certain types of tumors (Sutherland, 2002). Due to their toxic, immunogenic, mutagenic and non-carcinogenic nature, pullulan and its derivatives are used in gene therapy, various biomedical applications including tissue

engineering, and also as denture adhesives (Mata et al., 2006; Rekha & Sharma, 2007; Singh et al., 2008).

6. CONCLUSION

As a result, the increase in environmental awareness, the demand for renewable resources and the developments in biotechnology have increased the interest in microbial exopolysaccharides in recent years. The most important factor in the increasing commercial importance of exopolysaccharides is that they find many applications in various fields, from being a food additive to being used in crude oil refining. However, the fact that production costs are higher than other polysaccharides is the most important factor limiting the production and usage area. Therefore, more research is needed on exopolysaccharide production using cheap carbon sources.

Microbial polysaccharides have advantages over polysaccharides obtained from other sources, such as not having limited production areas and supply opportunities, no seasonal changes in their supply, more balanced physicochemical properties and less waste in production processes. The major handicap of microbial polysaccharides is that their production costs are in most cases too high to compete with other polysaccharides. In addition, the fact that toxicological examinations have not yet been carried out for all polysaccharides is another disadvantageous situation.

Today, academicians and engineers from different professions are working intensively to optimize the production of microbial polysaccharide and to reduce the production costs. Microbial polysaccharides have found many industrial uses today, and in the light of the studies, it is clear that their use will increase in the future.

REFERENCES

- Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., & Lelpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 50:145-152.
- Bhaskar, P. & Bhosle, N.B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, 88(1):45-53.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2):153-177.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9):881-890.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., & Schorr-Galindo S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2):951-962.
- Duboc, P., & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9):759-768.
- Ergene, E., & Avcı, A. (2016). Microbial exopolisaccharides. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2):193-202.
- Freitas, F., Alves, V.D. & Reis, M.A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8):388-398.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A., & Gomez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7):549-579.
- Kang, S.A., Jang, K.H., Seo, J.W., Kim, K.H., Kim, Y.H., Rairakhwada, D., Seo, M.Y., Lee, J.O., Ha, S.D., Kim, C.H., & Rhee, S.K. (2009). Levan: Applications and Perspectives, In: *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives*, Rehm, B.H.A. (ed) Caister Academic Press, U.K.
- Kazak, H., Öner, E.T., & Dekker, R.F.H. (2010). Extremophiles as sources of exopolysaccharides. In: Ito, R., Matsuo, Y. (eds.) *Handbook of carbohydrate polymers: Development, properties*

and applications. Nova Science Publishers, Inc.

- Kishk, Y.F., & Al-Sayed, H.M. (2007). Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2):270-277.
- Kumar, A.S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2):103-117.
- Kumar, T. (2012). Microbial extracellular polymeric substances production, isolation and applications. *IOSR J Pharmacol*, 2(2):276-281.
- Lee, I-Y. (2002). Curdlan. In: Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbüchel, A. (eds.), *Biopolymers. Polysaccharides I*, Wiley, Weinheim.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., & Zeng, X. (2009). Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, 78(2):275-281.
- Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Evaluation of in vitro antioxidant potency of exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53:62-66.
- Majee, S.B., Avlani, D., & Biswas, G.R. (2017). Rheological behavior and pharmaceutical applications of bacterial exopolysaccharides. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(9):224-232.
- Mata, J.A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C., & Quesada, E. (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbio*, 157(9):827–835.
- Mironescu, M. (2003). Microbial polysaccharides production, characterisation and properties. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technol*, 7(2):26-38.
- Mishra, A., & Jha, B. (2013). Microbial exopolysaccharides. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E.,

- Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nadzir, M.M., Nurhayati, R.W., Idris, F.N., & Nguyen, M.H. (2021). Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review. *Polymers(Basel)*, 13(4):530.
- Oğuzhan, P., & Yangılar, F. (2013). Pullulan: Production and usage in food industry. *African Journal of Food Science*, 4(3):57-63.
- Rehm, B.H. (2009). *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Horizon Scientific Press.
- Rekha, M., & Sharma, C.P. (2007). Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 20(2):116-121.
- Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A.M., Ruas-Madiedo, P., & Clara, G., (2008). Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(15):4737-4745.
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R.K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in microbiology*, 14(9):389-397.
- Singh, R.P., Shukla, M.K., Mishra, A., Kumari, P., Reddy, C.R.K., & Jha, B. (2011). Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(3):1019-1026.
- Singh, R.S., Saini, G.K., & Kennedy, J.F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4):515-531.
- Singha, T.K. (2012). Microbial extracellular polymeric substances: production, isolation and applications. *IOSR J Pharmacol*, 2(2):276-281.
- Sutherland, I.W. (1977). *Microbial exopolysaccharide synthesis*. American Chemical Society.
- Sutherland, I.W. (2002). A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. *Microbiology Today*, 29:70-71.

- Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol*, 16(1):41-46.
- Sutherland, I.W. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge University Press.
- Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F. Peña C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol* 33(11):198.
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & De Vuyst, L. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2):900-912.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., & Ivanova, E.P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7):2535-2554.
- Welman, A.D., & Maddox, I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.*, 21(6):269-274.
- Yang, B.Y., Brand, J.M., Gray, J.S., & Montgomery, R. (2001). Extracellular polysaccharides of modified strains of *Erwinia* spp. *Carbohydrate Research*, 333(4):295-302.
- Zhou, F., Wu, Z., Chen, C., Han, J., Ai, L., & Guo, B. (2014). Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. *Food Hydrocolloid*, 36:362-368.

CHAPTER 2

**WEARABLE BIOSENSOR SYSTEMS FOR DIAGNOSTIC
APPLICATIONS**

Dr. Nimet YILDIRIM TIRGİL¹

¹ Ankara Yildirim Beyazit University, Biomedical Engineering Department, Ankara,
TURKEY

INTRODUCTION

1. Biosensors

Wearable and flexible sensors are fast becoming a growing and interesting area of research. Wearable electronics is a fast-expanding industry that has just lately begun to deliver commercially successful items to the consumer electronics market. This technology, as an important sensor product, are defined as all electronic devices that can be attached to the body and placed inside clothes or accessories. With these devices, computers can communicate with the Internet of Things (IoT) and data can be transferred. Thus, many health data of the person can be accessed. This data is then processed using artificial intelligence and used to improve people's living standards. Wearable technology products are designed as specialized electronic monitoring devices synchronized to a computer or smartphone to provide long-term data tracking wirelessly in many cases. Rings, smart glasses, smart watches, shoes, wristband or bracelet, etc. (Büyükgöze 2019). The current state of the art routinely uses functional but expensive, bulky equipment designed for long-term use. Inexpensive and disposable wearable sensors are needed to make disposable measurements, especially for the detection of biomarkers. Wearable technology products and its market are developing together with many branches of science. In addition to important areas such as health, education, production, security, it is also used in daily routines such as performing daily activities.

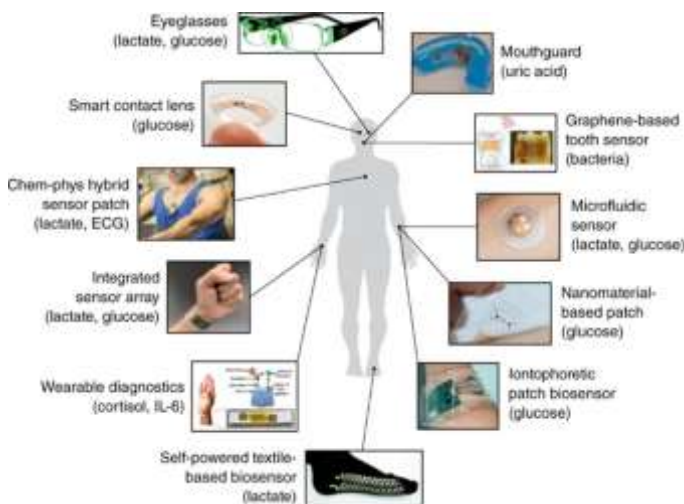


Figure 1. Types of wearable biosensors (Kim et al. 2019).

In biosensors, electronic textiles serve a critical role in chemical detection of perspiration, temperature, pressure, and tension. The electrodes of flexible biosensors must be designed stretchable and bendable (Takaloo and Zand 2021). Electroconductive fabrics also provide several other benefits, including as flexibility, air and moisture permeability, and ease of incorporation into daily clothes. Flexible biosensor electrodes must be engineered to be stretchy and bendable. Flexibility is significant for a variety of reasons, including adapting to the body's natural shapes, enabling skin-compatible devices, providing wearability, and improving skin-electrode interaction.

Biosensors or biological sensors are analytical and self-contained integrated devices that selectively detect the biological sample, and therefore, results gives us specific quantitative or semi-quantitative analytical information. This can be done by using a biological recognition element, in other word ‘a biochemical receptor’. A biological sensor mainly includes three components: biorecognition element/receptor, transducer and amplification and detection system. The analyzing of the signal with their presence and concentrations can be easily utilized in terms of optical, electrical and thermal. Biosensors have been adapted easily and existed for a long time in our life due to biocompatible with human body, tiny, easy to use, responses in a short

time and getting accurate information with only small sample volume. Ideal characteristics exist for biosensors such as response time, lifetime, recovery, linear concentration range, selectivity, sensitivity, etc. Classification of biosensors is dependent on biorecognition elements using for target detection such as enzyme, antigen and nucleic acid. In addition, biosensors can be classified in terms of transmission modes of sample to be analyzed (Thvenot et al. 1999).

1.1. Electrochemical Biosensors

An electrochemical biosensor is a type of biosensor that include an electrochemical transducer. There are different types of electrochemical transducers, such as potentiometric, amperometric, conductometric, impedimetric and ion charge or field effect, and classification depends on types of measurements. The classification of electrochemical transducer is given in Table 1 (Thvenot et al. 1999). Also, it can be considered as chemically modified electrode (CME) because electrically conducting materials are coated with a film including biochemical. Electrochemical biosensors have great contributions to wearable biosensor technologies because of low cost, easy to use, label-free system, robust detection limits, and high specificity and binding affinity with the bioreceptors (Pillai et al. 2022).

Table 1. Types of electrochemical transducers and their measurement methods. Reproduced from (Thvenot et al. 1999)

Types of Measurements	Types of Transducers	Analyte
<u>Potentiometric</u>	Ion-selective electrode, glass, gas and metal electrode	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ , CO ₂ , NH ₃ ,...
<u>Amperometric</u>	Metal or C electrode, chemically modified electrode	O ₂ , sugar, alcohols,...
<u>Conductometric and Impedimetric</u>	Metal electrode, interdigitated electrode	Urea, charged species,...
<u>Ion charge or field effect</u>	Ion-sensitive field effect transistor	H ⁺ , K ⁺ ,...

Wearable and Flexible Electrochemical Biosensors

There are increasingly demands for wearable and flexible chemical biosensors with continuous, real-time and out-of-clinic monitoring during the recent years. Wearable biosensors can be worn with human skin. Some parameters can be observed for human's activities, such as skin temperature, hearth rate, respiration time, and bodily motion, by wearable devices. Generally, sweat analysis is the basis of the wearable electrochemical biosensors by non-invasive monitoring (Lei et al. 2019). Biofluids, such as sweat and sweat metabolites, tears, and saliva, can be easily analyzed by means of biochemical analysis. There is a challenge to improve wearable and flexible electrochemical biosensors in terms of endurance and elasticity in curvilinear skin (Wang et al. 2020). In general, wearable biosensors are classified in two groups: bio-analyte based and design & utility based biosensors. In terms of design of biosensor, wearable and flexible electrochemical biosensors have mainly two design: patch-based design and fiber/textile-based design (Wang et al. 2021). Since patch-based biosensors have properties such as easy assembling and operations, they are commonly used. Patch-based biosensors can be used during exercises. Analysis of concentration of different sweat metabolites can be recorded and carried out to the smart phone (Gao et al. 2016). Textile-based biosensors are the advantage of daily usage because they can be easily integrated onto everyday clothing. Moreover, combination of patch-based and textile-based wearable electrochemical biosensor exists to perform the measurement of lactate (He et al. 2019). Wearable biosensors have some ideal requirement such as comfort, biocompatibility, miniaturized design, portability, stability, monitoring several parameters and analyte and low cost (Pillai et al. 2022). Electrochemical biosensors can be fabricated by several methods such as gravure printing, screen printing, 3D printing, flexographic printing, inkjet printing, electrodeposition of some nanoparticles, and so on. Materials and structures of wearable electrochemical biosensors are textile/fiber-based, plastic-based and paper-based materials. Tattoo-based, stretchable design, tear sensors,

sweat sensors, and so on are the applications of wearable biosensors. Fabrication techniques, materials and structures, and applications are schematically represented in Figure 1 (Yang and Cheng 2020).

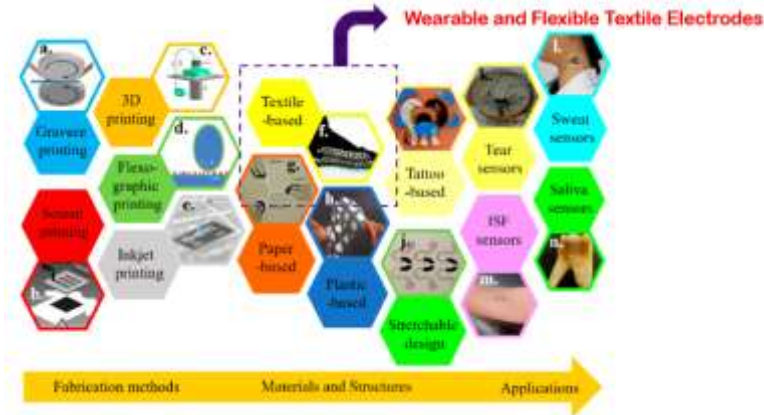


Figure 1. General view of wearable and flexible electrochemical biosensor. Reproduced from (Yang and Cheng 2020)

1.2. Wearable Glucose Sensors

There are 3 generations of glucose sensors These are classified as first, second and third generations glucose biosensors.

The first of these was developed by Clark and Lyons in 1962. In 1962, Clark and Lyons were able to measure the glucose level of the blood by combining the enzyme Glucose oxidase (Gox) with an O₂ electrode. As a result, a new analytical system was born. This method has provided a fantastic chance for diabetic therapy. Due to the electrochemical method, first-generation glucose biosensors demonstrated good sensitivity and inexpensive manufacturing costs. But at the same time in first generation glucose biosensors the expensive metal platinum is used. So this method do not reach all humanity, because of the cost.

Second generation biosensor is that next generation improvements have been realized by replacing oxygen with non-physiological electron acceptors called redox mediators. Ferrocene is a promising mediator for glucose biosensors since it does not react with oxidized or reduced oxygen, has reversible electron transfer kinetics

independent of pH, reacts swiftly with enzymes, and has similar characteristics. However, due to the high toxicity of the mediators employed in second generation glucose biosensors, new generation glucose biosensors have been developed.

In the third-generation biosensors, direct electrical communication is provided between the redox center of the enzyme and the electrode surface, so there is no need for redox mediators. The lack of need for mediators in this type of glucose biosensors has led to an increase in the selectivity in the biosensor. In the following years, non-enzymatic glucose

biosensors have been developed. In this technique there is directly transfer of the electron unlike first and second generations (Whiting et al. 2011). This electron transfer is shown in figure 5.

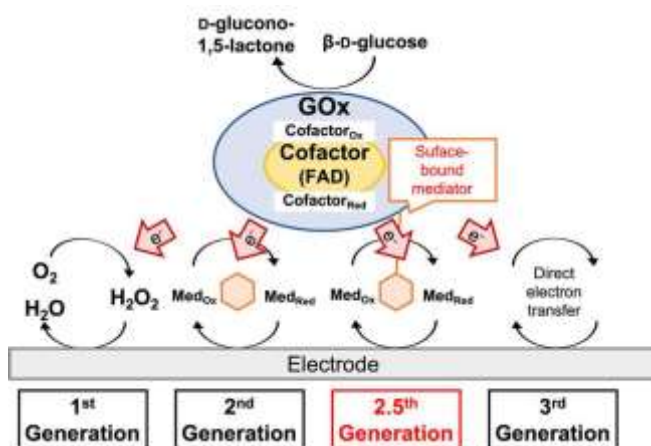


Figure 2. Generations of Biosensor (Suzuki et al. 2020).

1.2.1. Wearable Epidermal Glucose Biosensors

This type of glucose biosensors is a type of small device that is attached to the skin. Glucose is followed by sweat or blood taken from the right capillaries under the skin. The epidermal biosensors capture data from the capillaries beneath the skin and communicate it to the individual while they are attached to the skin. The most popular biosensors are epidermal biosensors. There are some kind of epidermal wearable glucose biosensors. For expamle, in reverse iontophoresis, the

negative charge of the skin at buffered pH causes it to be permselective to cations causing solvent flow towards the cathode. The epidermal detection method aimed to detect a relevant analyte in the ISF fluid, since subcutaneous cells are surrounded by intracellular fluid (ISF). Here, a correlation can be established between the ISF concentration of the analyte and the blood diffusing directly from the capillary endothelium. With a comprehensive understanding of sweat chemistry and metabolite transport mechanism, advances in sweat sampling and detection technologies can accelerate the reasonable utility of sweat-based diagnostic opportunities. In addition, another reason why this technology needs to be improved is that epidermal wearable devices provide better skin contact and moreover, they have a longer lifespan than many other wearable biosensors. As shown in the figure 3, the epidermal wearable sensors have a waterproof band at the top. Then the patch and electronic device are on the patch. An electrochemical sensor is used. Glucose data measured from sweat is collected using an electrochemical transducer (Chu et al. 2011).

1.2.2. Wearable Saliva Glucose Biosensors

Cavitas wearable biosensors are used and analyzed by attaching them to body cavities such as contact lenses and mouthguards. These sensors provide information from biological fluids found inside body cavities. One of the examples of these systems is the wearable saliva glucose biosensors. Scientists have researched mouth guard sensors for real-

time monitoring of chemicals in saliva. A mouth guard glucose sensor based on MEMS (microelectrochemical system) was fabricated with enzyme membrane immobilized glucose oxidase. By using a telemetry system, these sensors can detect glucose in artificial saliva at very small ranges, with stable and long-term real-time monitoring for more than 5 hours (Chu et al. 2011). As we can see in the figure 4. In the mouthguard there is an glucose biosensor that is working by the electrochemical technique and there is an wireless transmitter to transfer the datas (Arakawa et al. 2020).

1.2.3. Wearable Eye Glucose Biosensors

Human tears are a complex biological fluid composed of various proteins, electrolytes, metabolites, and excess water, such as saliva and sweat. Thanks to the multiple components of tears, they are potentially useful for diagnosing human metabolites. So tears can be followed for glucose monitoring. From the 20th century onwards, the development of tear-based devices has received great attention. It also has more potential to be explored in wearables for tear tracking with the wearable contact lens. Contact lenses are a convenient system to collect tears without causing any damage to the eye and are in direct contact with the tear. In this way, they can be easily integrated with the necessary biosensing systems. Initially, contact lens-based sensing platforms were developed for glucose monitoring in tears based on the interaction of glucose with concanavalin derivatives via optical measurements. A contact lens-based biosensor for in situ monitoring of glucose in tear fluid was first developed in 2011. However, lower costs are needed for all people to enter its service. For example, in the first design, silver and platinum metals were sputtered onto a PDMS substrate integrated with counter and reference (Ag/AgCl) electrodes, and the electrodes were fixed to the surface of contact lenses using PDMS. A copolymeric mixture was used for the immobilization of GOx to measure Glucose (Chu et al. 2011). The first teardrop glucose biosensor produced showed a promising relationship between varying glucose concentration. Subsequently, scientists mostly used commercial contact lenses as sample collectors. Although it may appear scary at first, tear fluid is increasingly being employed as a fluid medium in wearable biosensors due to its ease of access and potential association with blood glucose (Arakawa et al. 2020).

2. FABRICATION METHODS

There are different types of fabrication techniques for wearable and flexible electrochemical biosensors. Traditionally, these devices are prepared by electrodeposition and screen printing techniques. By means of these techniques, poor shelf life in the whole sensor patch can be observed due to fast deactivation of enzymes with a lot of testing.

Therefore, the fabrication methods have great importance to achieve optimum electrode structure in terms of sensitivity, stability, mechanical friction and deformation of devices. Delamination of the enzyme layer and mechanical failure of the structure are the one of the main challenge (He et al. 2019).

Graphene films have a large scale of usage area such as flexible and stretchable electronics. The graphene is produced by chemical vapor deposition (CVD) technique. However, graphene synthesized by chemical vapor deposition has a limitation in terms of electrochemically active defects (Kim et al. 2008). Therefore, MXene, which is a new type of 2D nanomaterial, is produced by etching(Lei et al. 2019). There are different types of MXene phases, such as $Ti_3C_2T_x$ having metallic conductivity and electrochemical activity (Lei et al. 2019), (Lei et al. 2019).

In order to maximize the mechanical properties of wearable and flexible textile electrochemical biosensor, polyurethane (PU)-based sensors can be used. As shown in Figure 2, polyurethane-based membrane and carbon nanotube ink were attached with Ecoflex and Ag/AgCl ink. These materials were combined with reference electrode (Parrilla et al. 2016). Therefore, potential response under extreme mechanical forces were aimed for highly stretchable textile-based biosensor.



Figure 2. a) Manufacturing processes and materials of stretchable materials; b) image of ion-selective membranes. Reproduced from (Parrilla et al. 2016)

Moreover, there are different types of design to minimize the mechanical stresses on the stretchable biosensors. According to a conducted study, surface strain redistributed elastic fiber (SSRE-fiber)

was designed to increase durability under different strain conditions (Wang et al. 2020). As shown in Figure 3, SSRE-fiber was firstly coated with CNT film and cured by electrochemical active material . Then, Ecoflex was dropped onto the pre-stretched or not pre-stretched fiber surface. Finally, SSRE-based electrode was coated with CNT film for prevention from delamination and exfoliation. Before the applying CNT film, glue used for the adhesion of CNT film (Wang et al. 2020).

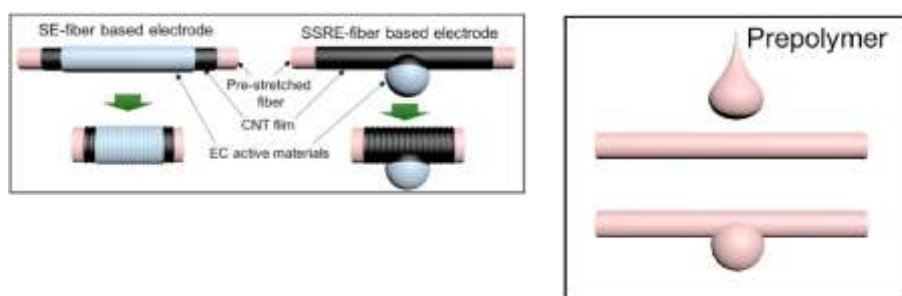


Figure 3. Illustration of fabrication process of stretchable electrochemical sensors for SE-fiber and SSRE-fiber. Reproduced from (Wang et al. 2020)

3. CURRENT STUDIES

According to a conducted study (Lei et al. 2019), stretchable, wearable and multifunctional biosensor system composed of 2D MXene nanosheets and $Ti_3C_2T_x$ /Prussian Blue (PB) composite working electrode with hydrophobic substrate were produced. This biosensor was designed to detect three main analyte, such as glucose, lactate and pH levels. The aim of this study is to design the $Ti_3C_2T_x$ /Prussian Blue composite electrode for durable and sensitive detection of biomarkers, such as glucose and lactate, in sweat (Lei et al. 2019).

After the synthesize of 2D MXene nanosheets and $Ti_3C_2T_x$ /Prussian Blue composite electrode, some characterization studies were conducted by using transmission electron microscopy (TEM). As can be seen in Figure 4(a), the size of nanosheet was measured around 4 μm (Lei et al. 2019). In addition, well-dispersed nanoparticles were achieved on the 2D MXene nanosheet surface, as

shown in Figure 4(b,c). Also, the particle size of the nanoparticles was measured nearly 30 nm (Lei et al. 2019).

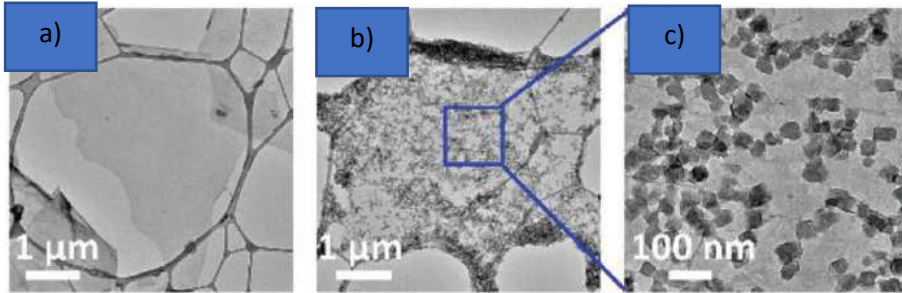


Figure 4. a) TEM image of $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ MXene nanosheets; b, c) TEM images of $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ /Prussian Blue composite electrode. Reproduced from (Lei et al. 2019)

According to electrochemical measurements for glucose and lactate, electrochemical sensitivity for glucose and lactate were measured as $35.3 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ and $11.4 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ using artificial sweat, respectively. During the in situ measurement on human body, high sensitivity and good repeatability were achieved for the measurement of glucose and lactate level (Lei et al. 2019).

Another study was conducted to design highly stretchable and printable-based potentiometric sensor array for in situ sweat analysis (Parrilla et al. 2016). This sensor was fabricated by variety of fabric materials for applications of fitness and healthcare. In order to create this type of biosensor, polyurethane (PU) based ion-selective membrane with printed carbon nanotube (CNT) was used due to increasing the durability of sensor, further resistance to mechanical stress and minimizing the unwanted inflammation and fouling (Parrilla et al. 2016).

In order to observe the durability under mechanical stresses, stretchability test were conducted under different strain conditions, as shown in Figure 5 (Parrilla et al. 2016). These tests were conducted and repeated ten times under strain conditions of 0%, 25%, 50%, 75%, and 100% (in Figure 5a). Bending tests were performed at different angles of 0° , 45° , 90° , and 180° (in Figure 5b). In addition to bending tests, crumpling test also conducted with hand for different times (in Figure

5c). Finally, sensor was immersed in water with intensive agitation between 10 to 40 min (in Figure 5c).

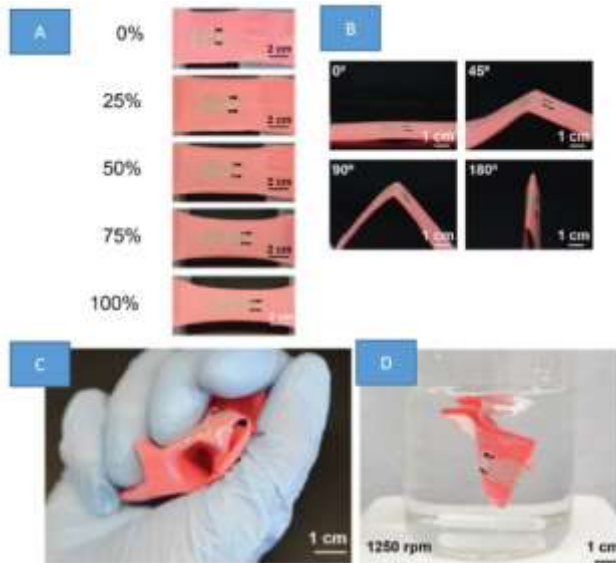


Figure 5. Stretchability tests under different strain conditions. Reproduced from (Parrilla et al. 2016)

As a result, there are several findings in terms of durability towards mechanical stresses for wearable and flexible textile electrochemical biosensor (Parrilla et al. 2016):

- i. Used materials in the designed biosensor containing PU, Ecoflex, and CNTs have a durability towards the high tensile stress without any crack formation.
- ii. If the stretchable sensor is exposed to external forces, Ecoflex with combining in Ag/AgCl ink, PU and CNT ink can absorb the stresses.
- iii. Electrical conductivity and physical contact between multilayer conductive particles are achieved under high strain conditions and extreme stress levels.

The other study in the design of stretchable electrochemical biosensor were conducted for a highly stretchable potentiometric ion

sensor based on the surface strain redistributed elastic fiber (SSRE-fiber) (Wang et al. 2020). It is reported that this design is a good choice to minimize the mechanical stresses in the application of biochemical detection systems due to the advantages of SSRE-fiber in terms of designed wrinkles and island-bridge structure.

After the fabrication processing of SSRE-fiber based electrodes, strain distribution was analyzed by using COMSOL Multiphysics, as shown in Figure 6a (Wang et al. 2020). Different fiber designs were simulated by using FEM simulation. According to conducted simulations, homogeneous surface strain distribution during stretching was observed for SE-fiber electrode (top model). On the other hand, unilateral hemisphere structure on the fiber changed the strain distribution (middle model). According to the bottom model, strain distribution was extremely reduced near hemisphere structure with 200% of applied strain (Wang et al. 2020). As given in Figure 6c, spindle-like structure was observed with gradually deformed of hemisphere structure, which showed the nearly same result with simulations.

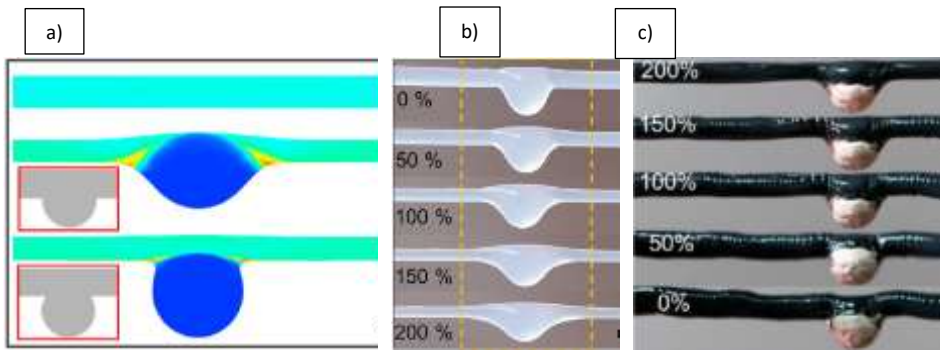


Figure 6. a) FEM simulation for SE-fiber and SSRE-fiber electrodes; b) non-stretched SSRE-fiber and c) stretched SSRE-fiber under different strain conditions. Reproduced from (Wang et al. 2020), (Wang et al. 2020)

4. CONCLUSION

To sum up, demonstrated wearable and flexible textile based electrochemical biosensor systems are explained and detailed from different studies in terms of fabrication techniques, electrode design

and types of target. Fabrication methods and experimental studies of novel design of SSRE-fiber based electrodes are explained. Also, MXene $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x/\text{PB}$ based composite electrodes were developed for durable and sensitive detection of target in sweat, and details give in fabrication techniques and experimental studies. Furthermore, PU-based biosensor systems are examined in terms of mechanical behavior.

Funding Statement: The authors received no specific funding for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest to report regarding the present study.

REFERENCES

- Arakawa, Takahiro, Keisuke Tomoto, Hiroki Nitta, Koji Toma, Shuhei Takeuchi, Toshiaki Sekita, Shunsuke Minakuchi, and Kohji Mitsubayashi. 2020. "A Wearable Cellulose Acetate-Coated Mouthguard Biosensor for in Vivo Salivary Glucose Measurement." *Analytical Chemistry* 92(18):12201–7.
- Büyükgöze, Selma. 2019. "Sağlık 4.0'da Giyilebilir Teknolojilerden Sensör Yamalar Üzerine Bir İnceleme." *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* (17):1239–47.
- Chu, Ming Xing, Kumiko Miyajima, Daishi Takahashi, Takahiro Arakawa, Kenji Sano, Shin-ichi Sawada, Hiroyuki Kudo, Yasuhiko Iwasaki, Kazunari Akiyoshi, and Manabu Mochizuki. 2011. "Soft Contact Lens Biosensor for in Situ Monitoring of Tear Glucose as Non-Invasive Blood Sugar Assessment." *Talanta* 83(3):960–65.
- Gao, Wei, Sam Emaminejad, Hnin Yin Yin Nyein, Samyuktha Challa, Kevin Chen, Austin Peck, Hossain M. Fahad, Hiroki Ota, Hiroshi Shiraki, Daisuke Kiriya, Der Hsien Lien, George A. Brooks, Ronald W. Davis, and Ali Javey. 2016. "Fully Integrated Wearable Sensor Arrays for Multiplexed in Situ Perspiration Analysis." *Nature* 529(7587):509–14.
- He, Wenya, Chunya Wang, Huimin Wang, Muqiang Jian, Wangdong Lu, Xiaoping Liang, Xin Zhang, Fengchun Yang, and Yingying Zhang. 2019. "Integrated Textile Sensor Patch for Real-Time and Multiplex Sweat Analysis." *Science Advances* 5(11):1–9.
- Kim, Jayoung, Alan S. Campbell, Berta Esteban-Fernández de Ávila, and Joseph Wang. 2019. "Wearable Biosensors for Healthcare Monitoring." *Nature Biotechnology* 37(4):389–406.
- Kim, Keun Soo, Yue Zhao, Houk Jang, Sang Yoon Lee, Jong Min Kim, Kwang S Kim, Jong-hyun Ahn, Philip Kim, Jae-young Choi, and Byung Hee Hong. 2008. "Large-Scale Pattern Growth of Graphene Films for Stretchable Transparent Electrodes." *Nature* 457(7230):706–10.
- Lei, Yongjiu, Wenli Zhao, Yizhou Zhang, Qiu Jiang, Jr Hau He, Antje

- J. Baeumner, Otto S. Wolfbeis, Zhong Lin Wang, Khaled N. Salama, and Husam N. Alshareef. 2019. "A MXene-Based Wearable Biosensor System for High-Performance In Vitro Perspiration Analysis." *Small* 15(19):1.
- Parrilla, Marc, Rocío Cánovas, Itthipon Jeerapan, Francisco J. Andrade, and Joseph Wang. 2016. "A Textile-Based Stretchable Multi-Ion Potentiometric Sensor." *Advanced Healthcare Materials* 996–1001.
- Pillai, Sangeeth, Akshaya Upadhyay, Darren Sayson, Bich Hong Nguyen, and Simon D. Tran. 2022. "Advances in Medical Wearable Biosensors: Design, Fabrication and Materials Strategies in Healthcare Monitoring." *Molecules* 27(1):2–4.
- Suzuki, Nanami, Jinhee Lee, Noya Loew, Yuka Takahashi-Inose, Junko Okuda-Shimazaki, Katsuhiko Kojima, Kazushige Mori, Wakako Tsugawa, and Koji Sode. 2020. "Engineered Glucose Oxidase Capable of Quasi-Direct Electron Transfer after a Quick-and-Easy Modification with a Mediator." *International Journal of Molecular Sciences* 21(3):1137.
- Takaloo, Saeed and Mahdi Moghimi Zand. 2021. "Wearable Electrochemical Flexible Biosensors: With the Focus on Affinity Biosensors." *Sensing and Bio-Sensing Research* 32:100403.
- Thvenot, Daniel R., Klara Toth, Richard A. Durst, and George S. Wilson. 1999. "Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report)." *Pure and Applied Chemistry* 71(12):2333–48.
- Wang, Ren, Qingfeng Zhai, Tiance An, Shu Gong, and Wenlong Cheng. 2021. "Stretchable Gold Fiber-Based Wearable Textile Electrochemical Biosensor for Lactate Monitoring in Sweat." *Talanta* 222(August 2020):1.
- Wang, Shuqi, Yuanyuan Bai, Xianqing Yang, Lin Liu, Lianhui Li, Qifeng Lu, Tie Li, and Ting Zhang. 2020. "Highly Stretchable Potentiometric Ion Sensor Based on Surface Astrain Redistributed Fiber for Sweat Monitoring." *Talanta* 214(February):1.

- Whiting, David R., Leonor Guariguata, Clara Weil, and Jonathan Shaw. 2011. "IDF Diabetes Atlas: Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2011 and 2030." *Diabetes Research and Clinical Practice* 94(3):311–21.
- Yang, Xudong and Huanyu Cheng. 2020. "Recent Developments of Flexible and Stretchable Electrochemical Biosensors." *Micromachines* 11(3):2.

BÖLÜM 3

BITKİ SAĞLIĞI İLE DOST FUNGİ: TRICHODERMA SPP.

Prof. Dr. Çiğdem KÜÇÜK¹

¹ Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye E-mail: ckucuk@harran.edu.tr Orcid No: 0000-0001-5688-5440

GİRİŞ

Tarımsal üretimin azalması nedeniyle gıda üretiminin ve çevre güvenliğinin geleceği tehlike altındadır. Ayrıca pestisitlerin ve sentetik gübrelerin aşırı kullanımı canlıları kimyasal bileşiklerin yüksek toksisitesine maruz bırakmaktadır. Tarımsal atıkların yanlış yönetimi de çevreyi kirletmektedir. Bu sorunların en iyi çözümü *Trichoderma* spp. gibi mikroorganizmaların kimyasalların yerine tarım ürünlerinde kullanılması ile biyolojik mücadele uygulamasıdır (El Komy ve ark., 2015). *Trichoderma* spp. bitki patojenik mikroorganizmaların büyümesini önemli ölçüde bastırıp, bitki büyümesini düzenlemektedir (Baiyee ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar, kök çürüklüğü, kuruma, solgunluk, meyve çürüklüğü gibi yaygın bitki hastalıklarının *Trichoderma* spp. kullanımı ile önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (Mbarga ve ark., 2012; Zin ve Badaluddin, 2020).

Trichoderma spp. tarafından salgılanan ikincil metabolitler, patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellemiş ve bitki büyümesini teşvik etmedeki rolünü kanıtlamıştır (Contreras-Cornejo ve ark., 2015a, 2015b; Kubicek ve ark., 2001). Ayrıca *Trichoderma* spp., bitkinin kök uzunluğunun artışına katkı sağlayarak bitki tarafından besin alımının etkinliğini arttırmıştır (Cai ve ark., 2015). *Trichoderma* spp.'nin pestisitleri ve herbisiti detoksifiye ettiği ortaya konmuştur (Vazquez ve ark., 2015). Bu potansiyellerin her ikisi de kirlilikle ilgili sorunların üstesinden gelmek için tarım endüstrisine önemli avantajlar sağlamaktadır. Tarım endüstrisindeki sorunlar arttığından, biyolojik kontrol yaklaşımı ile sürdürülebilir stratejiler gereklidir. Dolayısıyla *Trichoderma* sp. biyolojik ajan olarak bu bağlamda mükemmel bir yaklaşım gibi görünmektedir. Bu bölümde, *Trichoderma* sp.'nin bitki büyümesini hızlandırıcı ajan, bitki hastalıklarının biyokontrol ajanı, biyoremediasyon için biyolojik ajan olarak potansiyelini açıklayan çalışmalar özetlenmiştir.

1. *Trichoderma* spp.

Trichoderma cinsi, çok çeşitli ekosistemlerde bulunmaktadır. Tipik olarak, orman veya tarım topraklarında bol bulunurlar. *Trichoderma* suşları, parlak yeşil bir konidial pigmentli olan, hızlı

büyümeye sahip ve tekrarlayan bir şekilde dallanmış olan morfolojik özellikleri ile tanımlanabilir. *Trichoderma*, genellikle rizosferin sakinlerinden biri olan Hypocreaceae familyasındaki bir mantar cinsidir. *Trichoderma* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması sırasında karşılaşılan zorluklar, morfolojik farklılıkların nadir olması ve gözlemlenmesi güç olması nedeniyle daha da önem kazanmaktadır. 1969'da Rifai, "tür topluluğu" kavramını tanıtmış ve *Trichoderma* suşlarını morfolojik özelliklere dayalı olarak dokuz kümeye ayırmıştır (Papavizas, 1985). Fakat "tür kümelenmesinin" bir kısmı, ayırt edilemeyen iki veya daha fazla morfolojiden oluşur. Daha sonra konidiofor dallanma sisteminin özellikleri de dahil olmak üzere morfolojiye dayalı tür kavramına benzer formlar açıklanmıştır (Harman ve ark., 2004). Sonuçta *Trichoderma* beş bölüme ayrılmıştır: *Saturnisporum*, *Pachybasium*, *Longibrahmatum*, *Trichoderma* ve *Hypocreanum*. Genellikle, *Trichoderma* türlerini sınıflandırmak için morfolojik özellikler kullanılmıştır. Waghunde ve ark. (2016), *Trichoderma* cinsine ait türlerin en hızlı büyüyen yaklaşık 10.000 türe sahip olduğunu belirtmiştir. Başlangıçta, *Trichoderma* suşları beyaz ve pamuksu görümlü, özellikle büyüyen bir noktanın merkezinde veya agar yüzeyinde aynı merkezden halka benzeri bölgelerde sarımsı-yeşil, koyu yeşil oluşumlar oluşturmaktadır (Harman, 2006).

Yapılan araştırmalarda; *Trichoderma* spp.'nin bitki patojenlerini inhibe edebildiği, bitki büyümesini teşvik ettiği açıklanmıştır (El Komy ve ark., 2015; Contreras-Cornejo ve ark., 2015a; Garnica-Vergara ve ark., 2016; Naher ve ark., 2014). Ayrıca *Trichoderma* spp.'nin toksik bileşikleri detoksifiye etme ve organik materyalin bozulmasını hızlandırma kabiliyeti kanıtlanmıştır (Vazquez ve ark., 2015; Zafra ve ark., 2015). *Trichoderma* spp.'nin toprak ekosisteminde ve doğal ayrıştırıcı olarak rolünün; büyümeyi hızlandırma ve besin alımındaki yeteneği ile rizosfer özelliklerini değiştirme yeteneğinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Uygun olmayan ortamlara tolerans gösterebilmekte ve bitki patojenik mikroorganizmaları inhibe etme yeteneğine de sahiptir (Harman, 2006). Halifu ve ark. (2019), *Trichoderma* türleri tarafından selülaz, kitinaz ve glukanaazlar gibi hücre duvarı parçalayıcı enzimlerin salgılanmasının,

rizosferde besin emilimi gibi mikrobiyal hücre fonksiyonlarının bozulduğunu açıklamışlardır. Cai ve ark. (2015), tarafından bildirildiği gibi *Trichoderma* spp. toprak mikroorganizmaları üzerinde bazı etkilere sahiptir; kök gelişimini ve bitki büyümesini artıran hormon benzeri bileşikler salarak bitki büyümesini teşvik eder; bitkinin hızla büyümesi, önemli miktarlarda kök salgılarının salgılanması yoluyla mikrobiyal popülasyonlar indüklenir, bu da mikrobiyal tüketim için besinlerin varlığını artırır (Carvalhais ve ark., 2015). Bununla birlikte, *Trichoderma* cinsinde türlerin morfolojik olarak ayırt edilmesi güçtür. Bu nedenle, moleküler, morfolojik, genomik ve fizyolojik analiz gibi çeşitli tekniklerin birlikte incelenmesi olan polifazik yaklaşım, yeni bir türün karakterizasyonunu keşfetmek için kullanılmaktadır (Badaluddin ve ark., 2018).

2. Bitki hastalıklarının biyokontrol ajanı olarak *Trichoderma* spp.

Biyokontrol, patojen popülasyonunu baskılamak için canlı organizmaların kullanılması olarak tanımlanabilir, doğa dostudur (Hajek ve Eilenberg, 2018). Woo ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada; *Trichoderma* spp.'nin kök, sürgün ve hasat sonrası patojenlere karşı en yaygın kullanılan bir biyokontrol ajanı olduğu bildirilmiştir. Naher ve ark. (2014) ise; köklerin özellikle kök yüzeyleri boyunca ve kök hücrelerinin en dış tabakasının altında, *Trichoderma*'nın ana yaşam alanı haline geldiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, *Trichoderma* spp.'nin tohum ile muamele edilmesinin, kolonizasyonu sağlamada başarılı bir teknik olduğunu belirtmişlerdir. (Gava ve Pinto, 2016; Siddaiah ve ark., 2017). *Trichoderma*'nın fungal patojenleri ile doğrudan etkileşim içinde geliştirdiği temel biyokontrol stratejileri; mikoparazitizm, rekabet ve antibiyoz olarak açıklanmıştır (Harman, 2006). Mikoparazitizm, bir fungal türünün diğerini doğrudan inhibe etmesi olarak tanımlanır, *Trichoderma* spp.'nin en önemli antagonistik mekanizmaları arasındadır. Mikoparazitik potansiyele sahip yaklaşık 75 *Hypocrea/Trichoderma* türü daha önce rapor edilmiştir. Çok sayıda *Trichoderma* suşlarının *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Botrytis*

cinerea, *Pythium* spp. ve *Ustilago maydis* gibi bitki patojenik fungiye saldırdığını ve parçaladığını gösteren araştırmalar vardır (Hyakumachi ve Kubota, 2003; Küçük ve Kıvanç, 2004; Naber ve ark., 2014; Zin ve ark., 2020).

Yaklaşık 70 yıl önce, bu mikoparazitik reaksiyonu ilk fark eden Weindling olmuştur (Harman, 2006). Bu karmaşık süreç ardışık olayları içermektedir. İlk olarak, *Trichoderma* ile hedef mantar arasındaki tanımlama, *Trichoderma*'nın hücre duvarında bulunan karbonhidratların diğerinin lektinlerine bağlanması aracılığıyla gerçekleşir. Bunu, gliserol gibi daha fazla sayıda ozmotik bileşiği kapsayan hifsel döndürme ve appresorium gelişimi takip eder. Başarılı penetrasyonundan sonra *Trichoderma*; glukanaz, kitinaz ve proteaz gibi çok sayıda fungitoksik hücre duvarı parçalayıcı enzimler üreterek konağın hüresel mekanizmasına saldırıyı başlatır (Waghunde ve ark., 2016). Bu bileşiklerin etkisi, konakçı hücre duvarlarının znmesine neden olur ve sonuçta hedef fungusun parazitleşmesine neden olur. Biyokontrol ajanları sadece hedef fungusun hücre duvarını bozmakla kalmaz, aynı zamanda patojenik fungusun bitki dokularını kolonize etmesi ve nüfuz etmesi için gerekli olan enzimlerini (pektinazlar vb.) inaktive eder (Waghunde ve ark., 2016). Waghunde ve ark. (2016); *Trichoderma*'nın rizosferde patojenik miselyum varlığını hissedebildiğini ve patojen alanının yönüne doğru çoğaldığını bildirmiştir. Ayrıca enzimlerden başka *Trichoderma*, fungitoksik peptaibol antibiyotikleri salgılar (Contreras-Cornejo ve ark., 2016). Besin maddelerinin sınırlı olması, mantar topluluklarının rekabetine ve fitopatojen gelişimine yol açar (Harman, 2006). *Trichoderma* türlerinin bitki rizosferinde besinler, biyolojik nişler veya patojenlerle enfeksiyon noktaları için rekabet ettiği iyi bilinmektedir (Waghunde ve ark., 2016). *Trichoderma*, diğer rizosferik mikroorganizmalara göre topraktaki besinleri mobilize etme ve emme konusunda daha iyi bir yetenek sergilemektedir. Kök salgıları ve rizosfer, karbonhidratlar, amino asitler, organik asitler, vitaminler, Fe, vb. gibi besinler açısından özellikle zengindir, ancak *Trichoderma* ile *Rhizoctonia solani*, *F.oxysporium*, vb. gibi patojenik mantarlar arasında karbon kaynağı için rekabet olmaktadır (Gava ve ark., 2016). Topraktaki diğer

mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında, hareketsiz besinlerin mobilizasyonu ve kullanımı *Trichoderma*'ya üstünlük sağlar. Bu amaçla *Trichoderma*, glukonik, sitrik ve fumarik gibi organik asitlerin biyosentezi ve salınımı yoluyla toprak pH'nın düşmesini indükler. Ayrıca bu organik asitler, mikro besinlerin ve fosfatlar, Fe, Mn ve Mg gibi mineral katyonların çözünürlüğünü daha da kolaylaştırmaktadır (Naher ve ark., 2014).

Antibiyoz, difüze olabilen düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin etkileşime girdiği ve diğer mikroorganizmaların büyümesini azalttığı süreçtir. Antibiyoz, parazitik bir fungus üzerinde engelleyici veya ölümcül bir sonuç sergileyen ikincil metabolitlerin üretimine odaklanır. *Trichoderma* cinsine ait mantar türlerinden farklı kimyasal ürün sınıflarını gösteren 180'den fazla ikincil metabolit izole edilmiştir (Contreras-Cornejo ve ark., 2016). Biyosentetik kökenlerine bağlı olarak bu bileşikler peptaibol, poliketid ve terpen olarak gruplandırılabilir (Contreras-Cornejo ve ark., 2016). Çeşitli *Trichoderma* spp.'nin moleküler ağırlığı 500 ila 2200 Da arasında değişen polipeptit antibiyotikler olan peptaibollerden oluşan amino asit (özellikle a-aminoizobutirik) ürettiği bilinmektedir. Bu bileşiklerin kendine özgü özelliği, N-terminalinin asetillenmesi, C-terminalinin ise amino alkollere sahip olmasıdır (Contreras-Cornejo ve ark., 2016). Bu peptitler, ribozomal olmayan peptit sentetazlar (NRPS'ler) tarafından sentezlenir. *Trichoderma* spp. poliketid sentazlar (PKS'ler) olarak adlandırılan bir enzim kompleksi tarafından katalize edilen sıralı olaylar yoluyla poliketidler olarak adlandırılan farklı bir savunma metaboliti sınıfını sentezleme yeteneğine sahiptir. *Trichoderma*'nın farklı suşları, çok çeşitli antibiyotikleri sentezler; örneğin, *T.viride* trikotoksin A ve B, trichodecenins, tricchorovins ve tricchocellins üretir. Benzer şekilde, trikorzianinler A ve B, trikorzinler, HA ve MA *T.harzianum*'un kültür filtratından izole edilmiştir. *T.longibrachiatum* tricholongins BI ve BII üretirken; longibrachin ve trichokonin *T.koningii*'den izole edilmiştir; atroviridinler A-C ve neoatroviridinler A-D *T.atroviride* kültürlerinden elde edilmiştir. Ayrıca diğer antibakteriyel ve mantar öldürücü metabolitler, örneğin koninginler, viridin, dermadin, trichoviridin, lignoren ve koningik asit *T. koningii*,

T. harzianum, *T. aureoviride*, *T. viride*, *T. virens*, *T. hamatum* ve *T. lignorum* kültürlerinden izole edilmiştir (Garnica-Vergara ve ark., 2016; Vinale ve ark., 2013). *R.solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii*, *Fusarium oxysporum* ve *Bipolaris sorokiniana* gibi toprak kaynaklı patojenlerin büyümesinin Koninginin D varlığında olumsuz etkilendiği gözlenmiştir (Vinale ve ark., 2013). *T.harzianum* türevli harzianik asit, in vitro kültürde *Pythium*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *R.solani*'ye karşı antibiyotik aktivite göstermiştir (Vinale ve ark., 2013). Genel olarak, *Trichoderma* türleri tarafından üretilen antibiyotik aktivite, litik enzimlerle işbirliği içindedir. İkili etkileri, antibiyotiklerin veya tek başına hareket eden enzimlerin aktivitesinden daha ileri düzeyde bir antagonizma sunar (Harman, 2006). Çeşitli *Trichoderma* suşları; fitopatojene karşı gösterdikleri antagonistik özelliklerden dolayı bitki hastalıklarını kontrol etmek amacıyla tarımsal ürünlere uygulanmıştır. Tarlada *Trichoderma* suşlarının biyokontrol ajanı olarak kullanımlarının etkisi, girdi maliyeti ve bitkisel verimlilik ile ilgili olarak değerlendirilmiştir. *Trichoderma* etken maddeli ürünlerin uygulanması ile girdi maliyetinin kimyasal girdilerle karşılaştırıldığında ekonomik ve düşük maliyetli olduğu, ürün verimliliğinin ise yüksek olduğu tespit edilmiştir (Masso ve ark., 2016). *Trichoderma* spp.'nin uygulanması sadece ürün kayıplarını azaltmakla kalmamış, ayrıca verimliliği artırarak gelirden bir artışa da neden olmuştur (Imran ve ark., 2020). *Trichoderma* spp.'nin kompostla birlikte ekim alanına uygun şekilde uygulanması, pahalı kimyasal gübrelerin kullanımını azaltabilmiş veya kimyasal gübrelere alternatif olabileceği rapor edilmiştir (Imran ve ark., 2020). Toprak sağlığının korunması açısından *Trichoderma* kullanımı sürdürülebilir yaklaşımdır. *Trichoderma* spp.; *Pythium arrhenomanes*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria tenuis* ve *Botrytis cinerea* gibi bitki patojenlerinin gelişmesini baskılamıştır (Bhat, 2017; Gava ve Pinto, 2016; Halifu ve ark., 2019). Garnica-Vergara ve ark. (2016), ikincil metabolitlerin salınımı ve miktarı, hedef fitopatojene etkinliğinin *T.harzianum* izolatları arasında farklılaşmasından kaynaklanabileceğini belirtmiştir. *T.harzianum* ve *T.asperellum*'un bitki hastalıklarını kontrol etmedeki etkinliği yapılan çeşitli çalışmalar ile bildirilmektedir.

Mbarga ve ark. (2012) tarafından *T.asperellum*'un, *Pythium myriotylum* büyümesini %60'tan fazla inhibe ettiği rapor edilmiştir. El Komy ve ark. (2015), hücre duvarı parçalayıcı enzimlerin yüksek oranda *T.asperellum* izolatları tarafından üretildiğini ve *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* izolatlarına karşı yüksek antagonistik aktivite gösterdiğini belirtmiştir. Brotman ve ark. (2010), *Trichoderma* spp.'nin penetrasyon sırasında kanca benzeri bir yapı oluşturarak konakçı hücre duvarına nüfuz ettiğini açıklamışlardır. Penetrasyon işlemi sırasında mekanik ve enzimatik olarak hücre duvarını parçalayan enzimler salgılanmaktadır (Harman, 2006). Penetrasyon sırasında hücre duvarını parçalayan enzimler ve ikincil metabolitler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretiminin gerçekleştiği saptanmıştır (Zin ve Badaluddin, 2020). Baiyee ve ark. (2019); *T.spirale* T76-1 kültür filtratlarından hücre dışı metabolitlerini toplamış, *Corynespora cassiicola* ve *Curvularia aerea*'ya karşı etkinliklerini değerlendirmiştir. *T.spirale* T76-1 izolatı, *C.cassiicola* ve *C.aeria*'nın büyümesini sırasıyla % 84.68 ve % 93.03 oranında inhibe eden metabolitler üretmiştir. Benzer bir etki, yer fıstığında kök çürüklüğü hastalığının etmeni olan *Sclerotium rolfsii*'nin gelişiminin *T.virens* NBAII Tvs12 ile inhibe edildiği rapor edilmiştir (Hirpara ve ark., 2017). Ayrıca, hücre duvarını parçalayan enzimlerden kitinaz ve β -1,3-glukanaz aktivitesinin, test edilen diğer *Trichoderma* suşları arasında da en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Hirpara ve ark., 2017). Bu izolatın biyolojik kontrol aktivitesinin, sıcaklık ve nem gibi çevre koşullarını geliştirerek maksimuma çıkarılabileceği de açıklanmıştır (Hirpara ve ark., 2017). Çevresel koşullar altında fitopatojenik organizma ile etkileşim sırasında biyokontrol ajanın büyümesinde bir artış olacaktır. Endofitik mantarlar olarak da kabul edilen *Trichoderma* cinsi yaprak dokusunda veya köklerde bulunabilmekte, konukçularına çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Cummings ve ark., 2016). *Trichoderma* cinsi bitki konakçıları üzerinde bitkiye katkıda bulunan bir dizi biyoaktif ikincil metabolit salgılamaktadır. Aynı zamanda, bitki konakçasındaki genomik ve metabolik modifikasyon, kök oluşumu sırasında bu endofitik mantarlar tarafından tetiklenmektedir (Ghaffari ve ark., 2016).

3. Bitki büyümesini destekleyici ajan olarak *Trichoderma* spp.

Hyakumachi ve Kubota (2003), bitki büyümesini teşvik eden fungiyi bitki büyümesini uyarabilen bir mikroorganizma olarak tanımlamaktadır. Bu fungusun başlıca etkileri genellikle bitkisel ürünün büyümesi, verimin kalitesi üzerinedir. *Trichoderma* spp. uygun bir ortamda ve büyük miktarda ikincil metabolit üretimi yaparak genel bitki sağlığını iyileştirmektedir. Sıcaklık, ışık yoğunluğu, besin varlığı ve mikrobiyal topluluk gibi bitki büyümesini etkileyen çok sayıda faktör vardır. Rizosfer, köklerden salınan büyük miktarda fotosentetik yan ürün nedeniyle besinlerle konsantre olan, bitki kökünü çevreleyen özel toprak bölgesidir (Yuan ve ark., 2016). Rizosferde bulunan mikrobiyal topluluk, bitki büyümesine fayda, nötr veya zararlı etki gösterebilir. Cai ve ark. (2015), *T.harzianum* SQR-T037 izolatu tarafından salgılanan harzianolid adlı ikincil metabolitin 0.1 ppm ve 1 ppm konsantrasyonlarda, domates fidesinin büyümesini önemli ölçüde indüklediğini göstermişlerdir. Ayrıca, harzianolidin kök uzunluğunu ve kök uçlarını artırarak bitki büyümesinin erken aşamalarında bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir. *T.virens* ve *T.atroviride*'nin indol asetik asit (IAA) ve oksin ürettiği bulunmuştur (Contreras-Cornejo ve ark., 2009; 2014). *Trichoderma* spp. tarafından salgılanan oksin, harzianik asit ve harzionalidin kök gelişiminin iyileştirilmesinde etkili olduğu açıklanmıştır (Contreras-Cornejo ve ark., 2009; Vinale ve ark., 2013). Yedidia ve ark. (2001), *T.harzianum* ile aşılanan bitkilerin 28. günde kök alanını önemli ölçüde artırdığını; aşıllanmış kökte Cu, P, Fe, Zn, Mn ve Na konsantrasyonunun arttığını açıklamışlardır. Aynı zamanda, bitkinin sürgününde Mn, Zn ve P konsantrasyonunun sırasıyla %70, %25 ve %30 oranında arttığı belirlenmiştir.

Trichoderma tarafından proteinler, terpenoid, fitoaleksinler (rishitin, lubimin, fitotuberol, kumarin, resveratrol vb.) ve antioksidanlar (askorbik asit, glutatyon vb.) sentezlenir (Khatabi ve ark., 2012). Fungi istilasının sonucu olarak bitkiler; fitoaleksinler, flavonoidler, terpenoidler, fenolik yan ürünler, aglikonlar ve antimikrobiyal bileşikler gibi savunma bileşikleri üreterek *Trichoderma* kolonizasyonuna yanıt verir. *Trichoderma* suşları normalde bu tür

bileşiklere dirençlidir. Bu direnç, bitki köklerini kolonize etmek için önemli bir ön koşul olarak kabul edilir (Khatabi ve ark., 2012).

T.harzianum, kavundaki jasmonik asit ve salisilik asit seviyelerini yükseltmiş ve böylece *F.oxysporum*'a karşı bitki reaksiyonlarını değiştirmiştir (Martinez-Medina ve ark., 2010). Benzer şekilde, LOX ve PAL1 genlerinin (sırasıyla jasmonik asit ve salisilik asidin biyosentezinde yer alır) ve ETR1 ve CTR1 genlerinin (etilen sinyal yollarına katılan) ekspresyonunun *T. asperellum* T203 uygulamasından sonra arttığı gözlemlenmiştir (Shoresh ve ark., 2005). *Trichoderma* spp uygulamasının kök-sürgün uzunluğu, biyokütle, bitki boyu, yaprak sayısı, kardeşlenme, meyve oluşumu vb. gibi bitki morfolojik özelliklerini desteklediği açıklanmıştır (Contreras-Cornejo ve ark., 2009). Örneğin, toprağın *T.atrovirde* ile aşılması, *A.thaliana*'daki yan köklerin yanı sıra kök kıl sayılarını da arttırmıştır (Contreras-Cornejo ve ark., 2009). Benzer şekilde, *T.harzianum*'un hıyar köklerine uygulanması biyokütleyi ve yanal kök oluşumunu arttırmıştır (Sood ve ark, 2020). Benzer şekilde, *T.longipile* ve *T.tomentosum* uygulaması, serada lahananın toplam yaprak alanını ve taze ağırlığı önemli ölçüde arttırmıştır (Sood ve ark, 2020). *Trichoderma* spp. bitkilerde fotosentez, stoma iletkenliği, gaz değişimi, besin emilimi ve asimilasyon, su kullanım verimliliği vb. gibi çeşitli fizyolojik süreçleri pozitif olarak düzenlemiş, hem kök gelişimini hem de topraktan mineral besin alımını iyileştirmiştir. *Trichoderma* spp., enzimatik aktiviteyi katalize etmenin yanı sıra fotosentez ile ilgili genleri düzenlemede de rol oynayan önemli bir klorofil bileşeni olan Mg alımını önemli ölçüde iyileştirmiştir. Ayrıca, *Trichoderma* uygulanan çeltikte, NPK (Azot, Fosfor ve Potasyum) gübrelemesi uygulananlara göre fotosentetik hız, stoma iletkenliği ve su kullanım verimliliği önemli ölçüde uyarılmıştır (Doni ve ark., 2014).

Trichoderma ile muamele edilmiş bitkilerin kökleri, topraktan daha fazla mineral alımı sergilemiştir. Sood ve ark. (2020) *Trichoderma*'nın farklı türlerinin, çoğu toprakta bitkiler tarafından erişilemez gibi görünen fosfor iyonları ile ilişkili olan kumarik, glukuronik ve sitrik asit gibi çeşitli asitler yaydığını açıklamışlardır. Toprakta *T.harzianum* 1295-22'nin ortamda P'nin yanı sıra Fe ve Zn'un

içeriğini arttırmıştır (Altomare ve ark., 1999). Benzer şekilde, *T.asperelloides* T-203'ün uygulanması, rizosferdeki mevcut Fe ve P miktarını sırasıyla %30 ve %90 miktarına yükseltmiştir. Ayrıca, *Trichoderma* aşılması ile kök ve sürgün büyümesi, diğer mikro besinlerin yanı sıra Cu, Na ve Zn alımının artmasına neden olmuştur (Li ve ark., 2015). Alkali topraktaki demir eksikliği, tarımda bitkisel üretim için büyük bir dezavantajdır. *Trichoderma*'nın siderofor üretimindeki potansiyeli, bu problemle başa çıkmak için kullanılabilir. *T.asperellum*'un (T-6) hıyar köklerine uygulanmasının topraktaki Fe^{+2} ve siderofor içeriğinin yanı sıra Fe^{+2} ve Fe^{+3} şelat redüktaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Altomare ve ark., 1999). Colla ve ark. (2015), *T.atroviride*'nin MUCL45632 suşu tarafından iki tür sideroforun (hidroksamat ve katekol) üretildiğini bildirilmiştir. Bu çalışmalar, toprakta *Trichoderma* uygulamasının bitkiye Fe^{+3} 'nün Fe^{+2} 'ya indirgenmesine yardımcı olduğunu ve bunun sonucunda çözünürlüğünü ve alımını artırdığını vurgulamaktadır. Bitkiler sıklıkla çeşitli abiyotik streslere maruz kalırlar. Toprağın farklı *Trichoderma* suşları ile aşılması, stresli koşullar altında bitki büyümesini ve gelişmesini iyileştirir. Tuzluluk stresine maruz kalan bitkilerde, örneğin *T.asperellum* Q1 ile muamele edilmiş hıyar (Qi ve ark., 2013) ve *T.asperelloides* T203 (Brotman ve ark., 2013) ile muameleli *Arabidopsis thaliana* fidelerinde de benzer bulgular elde edilmiştir. *Trichoderma* spp.'nin sıcak ve soğuk streslerinin hafifletilmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, bitkiler *T.harzianum* AK20G suşları ile muamele edildiğinde domates bitkilerinde soğuk stresinin etkileri azaldığı incelenmiştir (Ghorbanpour ve ark., 2017).

4. Biyoremediasyonun biyolojik bir ajanı olarak *Trichoderma* spp

Tarım endüstrisinde aşırı pestisit ve sentetik gübre kullanımı başta su kirliliği ve toprak kirliliği olmak üzere çeşitli kirliliğe neden olmuştur. Ahlawat ve ark. (2010), kimyasalların salındıktan sonra bileşiklerin farklı oranlarda parçalandığını ve bunun fizikokimyasal özelliklere bağlı olduğunu belirtmiştir. Fakat bu kimyasallar anında bozulmazlar, bitkiler tarafından alınabilir, kök bölgesinin altına

sızabilir veya su kütlelerine toprak parçacıklarına yapışabilir veya atmosferde uçucu hale gelebilirler. Kimyasal bileşiklerin uzaklaştırılması biyolojik veya kimyasal yöntemle gerçekleştirilebilir (Zin ve ark., 2020).

Trichoderma spp.'nin farklı türdeki pestisitleri metabolize etme yetenekleri kanıtlanmıştır (Vazquez ve ark., 2015). Vazquez ve ark. (2015), *T.harzianum* suşunun, bir tür sülfonilüre herbisiti başarılı bir şekilde detoksifiye ettiğini ortaya koymuştur. Linhart ve ark. (2019), meyve ve sebze bazı yaprak ve toprak kaynaklı mantar hastalıklarını kontrol etmek için uygulanan penthiopyrad adlı bir mantar ilacının çevreyi kontamine ettiğini bildirmiştir. Bu pentiopyrad kalıntıları insan sağlığı ve biyolojik çeşitlilik için risklidir. Bugüne kadar *Trichoderma* içeren bir ürün olan Zumba Plant, Polonya'da elma ağaçlarına uygulandığında pentiopyrad %20'ye varan maksimum bozunma göstermiştir (Podbielska ve ark., 2020). Fenoller, siyanürler ve nitratlar gibi çeşitli zararlı organik kirleticiler sıklıkla *T.harzianum* yoluyla parçalanır. Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH'ler) detoksifikasyonunda *T.harzianum* etkili bulunmuştur (Huang ve ark., 2018). *T.hamatum*, Cr (VI) ile kontamine atık suların biyoremediasyonunda önemli bir rol oynayarak, Cr (VI) konsantrasyonlarını tamamen azalttığı açıklanmıştır (Morales-Barrera ve ark., 2008). Benzer şekilde *Trichoderma harzianum*, Cd ile kirlenmiş toprağın detoksifikasyonunda rol oynamıştır (Faedda ve ark., 2012).

4.1. Endüstriyel Uygulamalarda *Trichoderma* spp.

Trichoderma tarafından üretilen selülozlar da tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır (Ahmed ve ark., 2009). Ayrıca, *Trichoderma*'dan elde edilen enzimler, lif özelliklerini değiştirmenin yanı sıra lignin içeriğini azaltmak için kullanılır (Shafique ve ark., 2010). *T.harzianum* türevli enzim plak oluşumunu önlemek için diş macununa eklenebilir (Shafique ve ark., 2010). Gıda endüstrisinde, enzimleriyle birlikte farklı *Trichoderma* türlerinden elde edilen metabolitler kullanılmaktadır. Örneğin, *T.viride*'den ve daha sonra *T.atroviride*'den elde edilen fındık aromasını andıran bileşikler,

antibiyotik özellikli bileşikler elde edilmiştir (Sharma ve ark., 2020). Bira endüstrisinde de *Trichoderma* spp.'den elde edilen enzimler kullanılır. Ayrıca, meyve ve sebze sularının üretimi için gıda katkı maddeleri için de kullanılabilirler. Bu enzimler aynı zamanda şarap aromasını iyileştirmek, biranın fermantasyonunu, filtrasyonunu ve mükemmelliğini artırmak için de kullanılabilir. Her şeyden önce, *Trichoderma*'dan türetilen biyoaktif bileşiklerin potansiyeli, çeşitli iyileştirici özellikleri nedeniyle farmasötik endüstrisinde kullanılabilir (Han ve ark., 2019).

5. Sonuç

Tarımda, yenilikler tarım ürünlerinin verimini artırır. Ne yazık ki, geleneksel uygulamaların birçoğu çevre üzerinde yıkıcı bir etki yaratmaktadır. Modern çiftçiliğin karşılaştığı zorluk, çevre dostu bir şekilde çok sayıda verim elde etmektir. Bu nedenle, çevre dostu çözümler bulma konusunda hızlı hareket edilmelidir. Farklı patojenik mikroorganizmalara karşı biyokontrol ajanları olarak *Trichoderma* suşlarının başarısı yapılan bir çok çalışmada da açıklanmıştır. Mevcut bulgular, bu mantarların aynı zamanda bitki direncini, bitki büyümesini ve gelişimini artırdığını, verim üretiminde artışa yol açtığını ortaya koymuştur. Bu artışta rol oynayan mekanizmalar; antibiyotikler, mikoparazitizm, besinler için rekabet ve bitkilerde sistemik direncin uyarılmasıdır. Son zamanlarda, *Trichoderma* spp. sürdürülebilir hastalık yönetim sisteminde bitki hastalıklarını kontrol etmek için kullanılmaktadır. *Trichoderma* suşları tarafından bozulmuş komposttaki besin değerindeki artış, birkaç çalışmada açıklanmıştır. Ayrıca *Trichoderma* spp. bitkilerde sistemik direnç ve stres toleransının uyarılması ile birlikte bitki büyümesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan çeşitli metabolitleri sentezler. Bitki reseptörleri tarafından *Trichoderma* elisitörlerinin ve efektörlerinin tanınması, bu ortak yaşamda konukçu savunma metabolizmasını indüklemeleri için bir temel olarak hizmet eden konakçı genetik aparatın sinyalleşmesini ve düzenlenmesini başlatır. Hastalıkların çevre dostu yönetimi için çiftçiler arasında *Trichoderma* bazlı formülasyonların popülaritesi artırılmalıdır. Mikroorganizmalar tarafından salınan metabolitler, tarım

endüstrisinde sentetik/kimyasal gübre uygulaması yerine yeni biyogübrelerin uygulanmasını destekleyebilir. *Trichoderma* spp. bitki üretimini iyileştirmek için biyogübre olarak etkili bir strateji olabilir. Böylece sentetik/kimyasal gübre kullanımından kaynaklanan kirlilik en aza indirgenebilir. İnsan sağlığını ve çevreyi korumayı amaçlayan çağımızda, *Trichoderma* türlerinin pestisitlere karşı alternatif olarak kullanılması teşvik edilmelidir.

KAYNAKÇA

- Ahlawat, O.P., Gupta, P., Kumar, S., Sharma, D.K., Ahlawat, K., 2010. Bioremediation of fungicides by spent mushroom substrate and its associated microflora. *Indian J. Microbiol.* 50, 390–395.
- Ahmed, S., Bashir, A., Saleem, H., Saadia, M., Jamil, A. 2009. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pak. J. Bot.* 41, 1411–1419.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2926–2933.
- Badaluddin, N.A., Jamaluddin, S.N.T., Ihsam, N.S., Sajili, M.H., Khalit, S.I., Mohamed, N.A. 2018. Molecular identification of isolated fungi from Kelantan and Terengganu using internal transcriber spacer (ITS) region. *J. Agrobiotech.* 9, 222–231
- Baiyee, B., Pornsuriya, C., Ito, S.I., Sunpapao, A. 2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aerea*. *Biol. Control* 129, 195–200.
- Bhat, K.A. 2017. A new agar plate assisted slide culture technique to study mycoparasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporium*. *Int. J. Cur. Microbiol. Appl. Sci.* 6, 3176–3180
- Brotman, Y., Kapuganti, J.G., Viterbo, A. 2010. *Trichoderma*. *Curr. Biol.* 20, R390–R391
- Cai, F., Chen, W., Wei, Z., Pang, G., Li, R., Ran, W., Shen, Q. 2015. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant Soil* 388, 337–350.
- Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Badri, D.V., Kidd, B.N., Vivanco, J.M., Schenk, P.M. 2015. Linking jasmonic acid signaling, root

- exudates, and rhizosphere microbiomes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 1049–1058.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., Rouphael, Y. 2015. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196, 28–38.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortes-Penagos, C., Lopez-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 1579–1592.
- Contreras-Cornejo, H.A., Lopez-Bucio, J.S., Mendez-Bravo, A., Macias-Rodriguez, L., Ramos- Vega, M., Guevara-Garcia, A.A., Lopez-Bucio, J. 2015a. Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 701–710.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L., Vergara, A.G., Lopez-Bucio, J. 2015b. *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *J. Plant Growth Regul.* 34, 425–432.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., Larsen, J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
- Cummings, N.J., Ambrose, A., Braithwaite, M., Bissett, J., Roslan, H.A., Abdullah, J., Stewart, A., Agbayani, F.V., Steyaert, J., Hill, R.A. 2016. Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycol. Progress.* 15, 50.
- El Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y. 2015. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathol. J.* 31, 50–60
- Faedda, R., Puglisi, I., Sanzaro, V., Petrone, G., Cacciola, S.O. 2012. Expression of genes of *Trichoderma harzianum* in response to

- the presence of cadmium in the substrate. *Nat. Prod. Res.* 26, 2301–2308.
- Doni, F., Isahak, A., Zain, C.R.C.M., Ariffin, S.M., Mohamad, W.N.W., Yusoff, W.M.W. 2014. Formulation of *Trichoderma* sp. SL2 inoculants using different carriers for soil treatment in rice seedling growth. *Springerplus* 3, 532.
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Munoz-Parra, E., Raya-Gonzalez, J., Mendez-Bravo, A., Macias-Rodríguez, L., Lopez-Bucio, J. 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytol.* 209, 1496–1512.
- Gava, C.A.T., Pinto, J.M. 2016. Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *melonis* using seed treatment with *Trichoderma* spp. and liquid compost. *Biol. Control* 97, 13–20.
- Ghaffari, M.R., Ghabooli, M., Khatabi, B., Hajirezaei, M.R., Schweizer, P., Salekdeh, G.H. 2016. Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. *Plant Mol. Biol.* 90, 699–717.
- Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ali, M., Ghanbary, M.A.T., Pirdashti, H. 2017. The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia Horticulturae.* 230, 134-141.
- Hajek, A.E., Eilenberg, J. 2018. *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*. Second Ed. Cambridge University Press, New York.
- Halifu, S., Deng, X., Song, X., Song, R. 2019. Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, Rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. *Forests* 10, 758.
- Han, M., Qin, D., Ye, T., Yan, X., Wang, J., Duan, X., Dong, J. 2019. An endophytic fungus from *Trichoderma harzianum* SWUKD3.

- 1610 that produces nigranoic acid and its analogues. *Nat. Prod. Res.* 33, 2079–2087.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathol.* 96, 190–194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.
- Hirpara, D.G., Gajera, H.P., Hirpara, H.Z., Golakiya, B.A. 2017. Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* Sacc.: evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonists. *J. Mol. Microb. Biotech.* 27, 22–28
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., Wu, Z. 2018. Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: A review. *Molecules* 23, 2313.
- Hyakumachi, M., Kubota, M. 2003. Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. In: Arora, D.K. (Ed.), *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Application*. Marcel Dekker, New York, pp. 101–110.
- Imran, A., Arif, M., Shah, Z., Bari, A. 2020. Soil application of *Trichoderma* and peach (*Prunus persica* L.) residues possesses biocontrol potential for weeds and enhances *growth and profitability of soybean (Glycine max)*. *Sarhad J. Agric.* 36, 10–20.
- Khatabi, B., Molitor, A., Lindermayr, C., Pfiffi, S., Durner, J., von Wettstein, D., Kogel, K.H., Schafer, P. 2012. Ethylene supports colonization of plant roots by the mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *PLoS ONE* 7, e35502
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M. 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* 83, 11–23
- Küçük, Ç., Kıvanç, M. 2004. In Vitro Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum* . *Turkish Journal of Biology* 28, 111-115.

- Li, R.X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.R., Li, R., Chen, W. 2015. Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. PLoS ONE 10, e0130081.
- Linhart, C., Niedrist, G.H., Nagler, M., Nagrani, R., Temml, V., Bardelli, T., Wilhalm, T., Riedl, A., Zaller, J.G., Clausing, P., Hertoge, K. 2019. Pesticide contamination and associated risk factors at public playgrounds near intensively managed apple and wine orchards. Environ. Sci. Eur. 31, 28.
- Martinez-Medina, A., Pascual, J.A., Perez-Alfocea, F., Albacete, A., Roldan, A. 2010. *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. Phytopathology 100, 682–688.
- Masso, C., Mukhongo, R.W., Thuita, M., Abaidoo, R., Ulzen, J., Kariuki, G., Kalumuna, M. 2016. Biological inoculants for sustainable intensification of agriculture in subSaharan Africa smallholder farming systems. In climate change and multidimensional sustainability in African agriculture. Springer, Cham, pp. 639–658.
- Mbarga, J.B., Ten Hoopen, G.M., Kuate, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M.E.L., Ambang, Z., Begoude, B.A.D. 2012. *Trichoderma asperellum*: a potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. Crop Prot. 36, 18–22.
- Morales-Barrera, L., Cristiani-Urbina, E. 2008. Hexavalent chromium removal by a *Trichoderma inhamatum* fungal strain isolated from tannery effluent. Water Air Soil Pollut. 187, 327–336.
- Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A., Hossain, K. 2014. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. Pak. J. Bot 46, 1489–1493.
- Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review Phytopathology, 23: 23-54.

- Podbielska, M., Kus-Liskiewicz, M., Jagusztyn, B., Piechowicz, B., Sadlo, S., Slowik- Borowiec, M., Twaruzek, M., Szpyrka, E. 2020. Influence of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on penthiopyrad degradation under laboratory and field studies. *Molecules* 25, 1421.
- Qi W. Z., Zhao L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J. Basic Microbiol.* 53 355–364.
- Siddaiah, C.N., Satyanarayana, N.R., Mudili, V., Gupta, V.K., Gurunathan, S., Rangappa, S., Huntrike, S.S., Srivastava, R.K. 2017. Elicitation of resistance and associated defense responses in *Trichoderma hamatum* induced protection against pearl millet downy mildew pathogen. *Sci. Rep.* 7, 43991
- Shafique, S., Bajwa, R., Shafique, S. 2010. Molecular characterisation of UV and chemically induced mutants of *Trichoderma reesei* FCBP-364. *Nat. Prod. Res.* 24, 1438–1448
- Sharma, A., Sharma, P., Singh, J., Singh, S., Nain, L. 2020. Prospecting the Potential of Agroresidues as Substrate for Microbial Flavor Production. *Front. Sustain. Food Syst.* 4, 18.
- Shoresh, M., Yedidia, I., Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology.* 95, 76–84.
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M.S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., Sharma, A. 2020. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants* 9, 762
- Vazquez, M.B., Barrera, V., Bianchinotti, V. 2015. Molecular identification of three isolates of *Trichoderma harzianum* isolated from agricultural soils in Argentina, and their abilities to detoxify in vitro metsulfuron methyl. *Bot.* 93, 793–800.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S.L., Lorito, M. 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Letters.* 347, 123–129.

- Waghunde, R.R., Shelake, R.M., Sabalpara, A.N. 2016. *Trichoderma*: a significant fungus for agriculture and environment. Afr. J. Agric. Res. 11, 1952–1965.
- Woo, S.L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Lorito, M., 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. Open. Mycol. J. 8, 71–126.
- Yedidia, I., Srivastya, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations on increased growth of cucumber plants. Plant and Soil. 235, 235-242.
- Yuan, H., Zhu, Z., Liu, S., Ge, T., Jing, H., Li, B., Liu, Q., Lynn, T.M., Wu, J., Kuzyakov, Y. 2016. Microbial utilization of rice root exudates: ¹³C labeling and PLFA composition. Biol. Fert. Soils. 52, 615–627.
- Zafra, G., Moreno-Montano, A., Absalon, A.E., Cortes-Espinosa, D.V. 2015. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 1034–1042
- Zin, N.A., Badaluddin, N.A. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences 65, 168–178

BÖLÜM 4

KOLOREKTAL KANSER KÖK HÜCRE İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE KÜLTÜRÜ

Dr. Öğrt. Üyesi Şeyda BERK¹

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas, Türkiye. e-posta:sberk@cumhuriyet.edu.tr
ORCID ID: 0000-0003-4687-0223

GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK), kanser ölümlerinin üçüncü nedeni olarak bilinir ve dünya çapında en yaygın malignite türleri arasındadır (Inamura, 2018). Bu hastalık için farklı tedavi yöntemleri ile çeşitli cerrahi ve medikal tedaviler uygulanmaktadır (Pellino ve ark., 2018). Kanser tedavisinde hastanın sağ kalımını ve yaşam kalitesini artırmak çok önemlidir ve bu alanda önemli gelişmeler olmuştur. Buna rağmen kansere bağlı ölümlerde sürekli artışlar gözlenmektedir (Yadav ve ark., 2017). Genel olarak, kolon epitel hücrelerinin iç duvarlarında kolorektal kanser erken tespit edildiğinde cerrahi olarak çıkarılabilmektedir. Ancak hasta bu aşamada tedavi edilmezse kanser kemoterapiye bile duyarsız hale gelir ve kanser hücreleri farklı organlarda farklı bölgelere metastaz yapabilmektedir (Gothai ve ark., 2018). Kansere bağlı ölümlerin sadece %10'u birincil tümörlerden kaynaklanmaktadır; çoğu metastatik tümörlerden kaynaklanır. Tümör hücrelerinin metastatik gücünün, kanser kök hücreleri (KKH'ler) olarak bilinen tümör hücrelerinin kök hücre benzeri bir alt popülasyonunun özelliklerine atfedildiğine inanılmaktadır (Moghbeli ve ark., 2014). Kanser kök hücreleri kemoterapötik tedavilere dirençlidir ve tümör hücrelerinde uzun süre uyku halini indükleyebilmektedirler. Katı tümörlerde KKH'lerin tespiti, izolasyonu ve karakterizasyonu, son yıllarda kanser hedefli tedavilerin ayırt edici özellikleridir (Moghbeli ve ark., 2014). Normal ve kanser kök hücreleri arasında kaçınılmaz benzerlikler vardır; bu nedenle, bunları ayırt etmek için spesifik yöntemler veya belirteçler bulmak kanser tedavileri için kritik öneme sahiptir. KKH'lerin tümör nüksü ve kemoterapötik dirençle ilgisi göz önüne alındığında, bu tür hücrelerin tümörlerde tanımlanması, etkili hedefe yönelik tedavi için zorunludur. KKH'leri *in vitro* izole etme ve yayma olasılığı, KKH popülasyonundaki seçici olarak aktive edilmiş sinyal iletim yolları üzerinde daha fazla çalışmaya, onların hayatta kalma stratejilerinin altında yatan mekanizmayı daha iyi anlamak ve anti-tümör tedavisinde yeni yaklaşımlar tanımlamak için olanak sağlayacaktır. Bu bölümde, kolorektal kanser kök hücrelerin tanımlanmasında ve izolasyonunda kullanılan hücre yüzey reseptörleri

ve bazı izolasyon yöntemleri ile birlikte izolasyon sonrası kök hücrelerin kültür koşulları açıklanmaktadır.

1. KOLOREKTAL KANSER

1.1. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser, başladığı yere bağlı olarak kolon kanseri veya rektum kanseri olarak da adlandırılabilir. Kolon kanseri ve rektum kanseri, birçok açıdan ortak özelliklere sahip oldukları için sıklıkla birlikte gruplandırılmaktadır. Kolorektal kanser, dünya çapında en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında sayılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından 2021 yılında yapılan araştırmanın sonuçlarına göre, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında dünya genelinde kolorektal kanser vaka sayısı 1931590 olarak belirlenmiştir (Sung ve ark., 2021). Yine bu araştırma sonucuna göre kolon kanseri dünyadaki yeni kanser vakalarının %10,7'sini oluşturmakla birlikte, malign tümörler arasında her iki cinsiyette meme kanseri (%12,5) ve akciğer kanserinden (%12,2) sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser, 2020'de meydana gelen 935173 ölümle, akciğer kanserinden (%18,2) sonra dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir ve her iki cinsiyet için toplam kanser ölümlerinin yaklaşık %9,5'ini oluşturmaktadır (Sung ve ark., 2021). Kolorektal kanser (%11,4) erkeklerde insidans açısından akciğer (%15,4) ve prostat (%15,1) kanser türlerinden sonra en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerde akciğer (%21,6) ve karaciğer (%10,5) kanser tiplerinden sonra üçüncü (%9,4) sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise kolorektal kanser (%9,9) meme kanserinden (%25,8) sonra en sık tanı konulan kanser türü olmakla birlikte kansere bağlı ölümler arasında ise meme (%15,6) ve akciğerden (%13,8) sonra üçüncü (%9,5) kansere bağlı ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Sung ve ark., 2021). Beş yıllık sağkalım oranına bakıldığında ise kolorektal kanser (%65,7) için bu oran prostat (%92,9) ve meme (%89,6) gibi önde gelen birçok kanser türünden daha düşük olduğu kaydedilmiştir (Petrelli ve ark., 2017). Ayrıca hastalık kolonda oluştuğunda bu oran %91, rektumda oluştuğunda ise %89 olarak

kaydedilmiştir. Metastaz durumunda ise bu oranlar %14 (kolon) ve %16 (rektum) olarak tespit edilmiştir (Petrelli ve ark., 2017).

1.2. Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Kolon kanseri sporadik (%70), ailesel (%20) ve kalıtsal (%10) sendromlar şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Sporadik kolon kanserinin ortalama tanı yaşı genellikle 50 yaş üstüdür ve çoğunlukla çevresel faktörlere bağlı olarak 50 yaş altında görülebilmektedir, geriye kalan %20'lik kısım ise bilinen kalıtsal sendromun yokluğunda ailesel faktörlerden kaynaklanarak ortaya çıkabilmektedir. Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve Lynch sendromu (kalıtsal polip dışı kolorektal kanser-HNPCC) en yaygın kalıtsal KRK sendromları arasındadır (Allen & Sears, 2019; Snyder & Hampel, 2019). Tüm KRK'ın yaklaşık %5'i bu iki kalıtsal sendromla karakterize edilmektedir, ancak seçilmemiş KRK hastalarının %10 ila %15'inin FAP veya HNPCC ile ilgili olmayan yüksek riskli bir mutasyona sahip olması mümkündür (Recio-Boiles & Cagir, 2022).

Kolorektal mukozada hiperplastik ve adenomatöz polip olmak üzere iki ana histolojik tipe polip bulunabilmektedir. Hiperplastik poliplerde başlayan karsinojenez, tırtıklı adenomlar yoluyla gelişir ve mikrosatelit kararsızlığından (MSI) kaynaklandığı öne sürülmüştür (Jass, 2005; Thorstensen ve ark., 2005). Çoğu kolon karsinomu, tübüler (%75), villus (%10) ve tübülovillöz (%15) olmak üzere histolojik olarak üç farklı tipe ayrılan adenomlardan kaynaklanmaktadır. Displazinin derecesi, villusun boyutu ve yapısının artması, malignite riskinin artmasıyla ilişkilidir (Atkin ve ark., 1992; Thiis-Evensen ve ark., 1999). Villöz veya tubulovillöz displazili polipler, kişisel veya ailesel kolorektal kanser ve adenomatöz polipler, rezeksiyondan sonra (5 yıl veya daha uzun) bir tarama aralığı gerektiren senkron ve metakron kolorektal primer kanser için %3 ila %5 artmış riskin göstergesidir. Ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD), kolon kanseri ile yüksek oranda ilişkilidir. Öte yandan Crohn hastalığı, özellikle ileokolik kısımda ise kolon kanseri riskini artırabilir (Recio-Boiles & Cagir, 2022). Abdominal radyasyon (30 Gy'den fazla) aldıktan sonra çocukluk çağında kanserden kurtulanlar kolorektal

kanser için risk altındadır ve 10 veya 35 yaşından sonra tarama önerilmektedir. Diabetes mellitus/insülin direnci, uzun süreli bağımsızlığı baskılanmış böbrek nakli ve kontrolsüz akromegali, KRK riskini artıran diğer hastalıklar arasında sayılabilir (Recio-Boiles & Cagir, 2022). Epidemiyolojik çalışma sonucunda çevresel koşullar ve yaşam tarzının KRK ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle tütün, alkol ve kırmızı/işlenmiş et tüketimi, obezite, kolesistektomi ve androjen yoksunluğu tedavisi, KRK riskini artırmaktadır. Öte yandan, geniş popülasyon çalışmaları sonucunda diyet (meyve ve sebzeler, balık, lif), sarımsak ve kahve tüketimi, fiziksel aktivite, vitamin takviyeleri (D vitamini, folat, kalsiyum, piridoksin B6, magnezyum) ve ilaçlar [steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), aspirin, postmenopozal hormon replasman tedavisi, bifosfonat ve anjiyotensin inhibitörleri ve statinler] KRK için koruyucu faktörler olarak tanımlanmıştır (Recio-Boiles & Cagir, 2022).

1.3. Kolorektal Kanser Tedavisi

Tedaviye genellikle Modifiye Astler-Coller (MAC) veya Dukes sınıflandırma sistemine göre karar verilir. Aşamalar tercihen Tümör Nodu Metastazı (TNM) sınıflandırması ile belirlenmesi gerekmektedir (Eisenberg ve ark., 1982; Newland ve ark., 1981; Olson ve ark., 1980). International Union Against Cancer (UICC) ve American Joint Committee on Cancer'a (AJCC) göre, TNM sistemi kolorektal kanser için uluslararası klinikopatolojik evreleme sistemi olarak kabul edilmektedir (Tablo 1) (Edge & Compton, 2010; Greene, 2002; Wittekind ve ark., 2002). TNM sistemi, yaygın anatomik hastalığın üç bileşenine dayanmaktadır ve bunlar şu şekildedir: Primer tümörün lokal yaygınlığı için T, bölgesel lenf nodu metastazlarının kapsamı için N ve diğer organlara metastazların yokluğu veya varlığı için M (Edge & Compton, 2010). TNM sınıflandırma sistemi, klinik (tedavi öncesi) ve patolojik (ameliyat sonrası histopatolojik) sınıflandırmayı içermektedir ve bu iki sınıflandırma farklı araştırma yöntemlerine dayandığından ve farklı amaçlara hizmet ettiğinden, ikisini birbirinden ayırmak gerekmektedir (Sobin ve ark., 2011). Evre I, Dukes A veya MAC A veya B1 ile aynıdır ve tümör bağırsak duvarı ile sınırlıdır (mukoza,

muskularis mukoza, submukoza ve muskularis propria). Evre II, Dukes B veya MAC B2 veya B3 ile aynıdır ve tümör ektramural dokuya yayılmıştır. Aşama III, Dukes' C (MAC C1-C3) ile aynıdır ve bölgesel düğümler içermektedir (Labianca ve ark., 2010).

Tablo 1: Kolorektal Kanser için AJCC/UICC'nin TNM Evreleme Sistemi (Edge & Compton, 2010)

Primer Tümör (T)	Bölgesel Lenf Nodu (N)	Uzak Metastaz (M)
TX: Primer tümör değerlendirilemez	NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez	M0 Uzak metastaz yok
T0: Primer tümör kanıtı yok Tis Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelyal veya lamina propria invazyonu	N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok	M1 Uzak metastaz
T1: Tümör submukozayı istila eder	N1 1-3 bölgesel lenf nodlarında metastaz	M1a Bir organ veya bölgeyle sınırlı metastaz (örneğin karaciğer, akciğer)
T2: Tümör muskularis propriaya invaze	N1a Bir bölgesel lenf nodlarında metastaz	M1b Peritonun birden fazla organında/bölgesinde metastazlar
T3: Tümör, muskularis propria yoluyla perikolorektal dokulara invaze olur.	N1b 2-3 bölgesel lenf nodlarında metastaz	
T4a: Tümör visseral peritonun yüzeyine nüfuz eder	N1c Bölgesel nodal metastaz olmaksızın subseroza, mezenter veya peritonealize olmayan perikolik veya perirektal dokulardaki tümör birikintileri	
T4b: Tümör, diğer organ veya yapılara doğrudan invaze olmuş veya yapışmıştır.	N2 4 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz	
	N2a 4-6 bölgesel lenf nodunda metastaz	
	N2b 7 veya daha fazla bölgesel lenf nodunda metastaz	

Cerrahi rezeksiyon, uygun başarı etkinliği ve optimize edilmiş komorbiditeler ile her yaşta metastatik olmayan kolon kanseri evrelemesi için birincil tedaviyi oluşturmaktadır. Bir polipte (cT0-1) seçilmiş riskli ve erken evre kolon karsinomlarında endoskopik rezeksiyon (ER) uygulanırken, neoadjuvan tedavide kolon kanseri için standart uygulama yerine ileri hastalık cerrahi müdahale uygulanmaktadır. Adjuvan tedavi ise patolojik evreleme ile

öngörülebilir nüks ve ölüm riskini azaltmak için uygulanan sistemik bir tedavi yöntemidir (Sobin ve ark., 2011). Ayrıca evre III hastalarda adjuvan kemoterapi standart olarak uygulanırken evre II'de rolü daha az belirgindir. Metastatik durumda kemoterapi, sağkalımı uzatmak ve yaşam kalitesini iyileştirmek ve sürdürmek için ilk tedavi seçeneğini sunar. Ayrıca oligo-metastatik akciğer ve karaciğer hastalığında perikemoterapi ile birlikte cerrahi küratif bir tedavi yöntemi olabilir. Bu aşamadaki hastalar, oksaliplatin ve 5FU/LV (FOLFOX4 veya FLOX) içeren ikili bir programla tedavi edilir. Bazı durumlarda, çoğunlukla infüzyon programları (DeGramont, AIO rejimleri) veya oral floropirimidinler (kapesitabin veya UFT) ile birlikte FU/LV monoterapisi önerilebilir (Alvarez-Gonzalez ve ark., 2019; Board, 2002; Peters, 2019).

1.4. Kolorektal Kanserde Genomik Kararsızlık

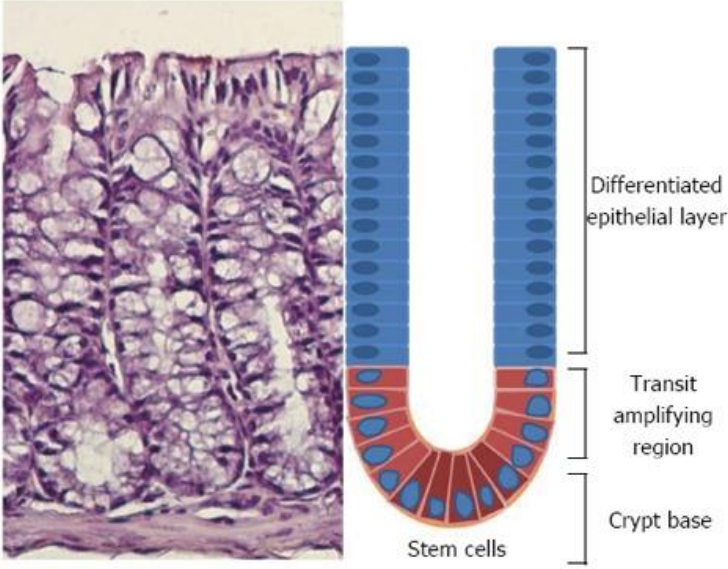
Kanser gelişimi, mutajenik olayların teşviki ile başlayan çok adımlı bir süreçtir. Bu tümör başlangıcını, ek mutajenik olaylar ve epigenetik olaylar takip etmektedir. Bu çoklu mutasyonlar, tümör hücrelerinin proliferasyonunu uyarır ve bu süreç, kanserin ilerlemesinin izlediği tümör gelişimi olarak bilinmektedir. Kolon kanseri, tümör gelişiminin bu farklı aşamalarını keşfetmek için benzersiz bir modeli temsil etmektedir (Scatena ve ark., 2011). Adenom → karsinoma dizi modeli adı verilen bir model ilk olarak Fearon ve Vogelstein tarafından önerilmiştir ve mutasyonların kanser ilerlemesinin farklı aşamalarına bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (Fearon & Vogelstein, 1990). Bu modele uygun olarak, tümör başlangıcı, adenom oluşumundan ve “displastik kriptlerin” gelişiminden sorumlu olan *APC* geni seviyesinde meydana gelen mutasyonlar tarafından tetiklenmektedir. Daha sonra, adenomun artan büyüme hızı ile *K-ras* (v-Ki-ras2 Kirsten sıçan sarkom viral onkogen homologu), *p53* (protein 53) ve *SMAD4* (small mothers against decapentaplegic 4) düzeyindeki ek mutasyonlar, tümör gelişimi ve ilerlemesi sürecinde ortaya çıkmaktadır. Sonunda, tümör invazyonu ve metastaz, bireysel özellikle malign klonların genişlemesiyle meydana gelmektedir (Scatena ve ark., 2011). İnsan kolon hücreleri üzerinde yapılan son çalışmalar, *APC* kaybının bağırsak farklılaşmasına

neden olduğunu göstermiştir. Öte yandan, çoğalma kusurları ve β -katenin nükleer birikimi, *K-ras*'ın ek aktivasyonunu gerektirmektedir (Phelps ve ark., 2009). *APC* mutasyonunun neden olduğu bağırsak farklılaşma kusurlarının etkileri, transkripsiyonel korpresör C-terminal bağlayıcı protein-1'e (*CtBPI*) bağlıdır. Bu nedenle, *CtBPI*, ilk adım olarak kanserin başlamasına katkıda bulunurken, K-ras aktivasyonu ve β -katenin nükleer lokalizasyonu, ikinci adım olarak adenomun karsinomlara ilerlemesini teşvik etmektedir (Phelps ve ark., 2009). Bu nedenle, adenom \rightarrow karsinom dizi modeli, büyüyen genomik kararsızlığın kolon kanseri tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını gösterir. Daha sonraki çalışmalar kolon kanserinde gözlenen mutasyonların genomik kararsızlık, kromozomal kararsızlık ve mikro uydu kararsızlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Scatena ve ark., 2011). Kromozomal instabilite kolon kanserlerinin yaklaşık %70'inde gözlenmiştir ve adenom \rightarrow karsinom dizi modelini izleyen gen setindeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Miyazaki ve ark., 1999). Öte yandan, mikro uydu kararsızlığı kolon kanserlerinin yaklaşık %15'inde gözlendi ve kusurlu DNA uyumsuzluğu onarım genlerinin bir sonucu olarak meydana gelen mikro uydu dizilerinin uzunluğundaki mutasyonlar veya varyasyonlar ile karakterize edildi. DNA uyumsuzluğu onarım genlerindeki kusurların yanı sıra, mikro uydu kararsızlığı, *BAX* (*BCL2* ile ilişkili X proteini), insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü (*IGF2R*) ve dönüştürücü büyüme faktörü reseptörü 2'yi (*TGF β R2*) içeren özel bir gen setinin mutasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir (Walther ve ark., 2009). Mikro uydu kararsızlığı ile ilişkili kolon kanserleri, kromozomal kararsızlık ile bağlantılı kolon kanserleriyle karşılaştırıldığında daha iyi bir prognoza sahiptir. Bununla birlikte, kromozomal kompozisyonda değişikliklere, mikro uydularda kararsızlıklara veya farklı proliferasyon, istila ve metastaz paternleri ile malign transformasyonu indükleyebilen epigenetik değişikliklere neden olan KRK'nin gelişiminde birçok başka gen yer almaktadır (Conlin ve ark., 2005; Frigola ve ark., 2006; Jass, 2007; Smith ve ark., 2006; Soreide ve ark., 2006).

2. KOLOREKTAL KANSER KÖK HÜCRELERİ (KRK-KH)

Kök hücreler kendilerini uzun süre koruyabilme (kendini yenileme) özelliğine sahiptir ve farklılaşmış tüm hücreleri üretebilirler (multipotens). Kolon epitelinin tüm terminal olarak farklılaşmış hücreleri, multipotent kök hücrelerden türetilmektedir (Barker ve ark., 2008). Kolon çok yapılandırılmış bir organdır. Bağırsak epiteli, bir dizi invaginasyon veya kript oluşturmak için katlanır. Bu kriptler, epitelin kapladığı yüzey alanını artırarak besleyici bileşiklerin etkin bir şekilde adsorpsiyonunu sağlar. Günümüzde, kolon kript hücre değişiminin, her kript tabanında bulunan multipotent kök hücreler tarafından sağlandığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Cammaraeri ve ark., 2008). Kök hücreler, kolon epitelinin parmak benzeri invajinasyonları olan kriptlerin alt kısmında yer alır (Şekil 1). Asimetrik bir bölünme yoluyla kök hücreler kendi kendini yeniler ve geçişi güçlendiren hücreler üretir (Fanali ve ark., 2014). Kolonda terminal olarak farklılaşmış dört epitel soy vardır ve bunlar kolonositler, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler ve Paneth hücreleridir (Sancho ve ark., 2003) (Şekil 1).

Kök hücre nişlerinin, hücresel bileşenler ve belirli bir mikroçevre oluşturan hücre dışı matris tarafından oluşturulduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu özel mikro çevre, kök hücre nişi, kök hücre özelliklerini korumak, kök hücreleri farklılaşan ve apoptotik uyaranlardan korumak ve çeşitli sitokinlerin büyüme faktörlerinin etkileşimi ve salgılanması yoluyla doğrudan çoğalma ve farklılaşma arasındaki dengeyi düzenlemek için önemlidir (Moore & Lemischka, 2006). Kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması ayrıca bağırsak alt epitelyal miyofibroblastları tarafından salgılanan morfogenetik faktörlerin yanı sıra bakteri veya epitel hücrelerinden türetilen kript lümenindeki bileşenlerden de etkilenmektedir (Medema & Vermeulen, 2011).



Şekil 1: Farklı hücre tiplerinin konumunu gösteren tek bir kolon kriptinin şematik gösterimi. Kök hücreler kriptin altında bulunur ve asimetric bir bölünme yoluyla kript-villus eksenini boyunca tüm epitel hücre tiplerinin üretilmesinden sorumludur (Fanali ve ark., 2014).

2.1. Kolorektal Kanser Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Kolon kök hücreleri, spesifik belirteçlerin ekspresyonu yoluyla tanımlanabilmektedir. Musashi 1 (Msi-1) proteini, ilk kolon kök hücre belirteci olarak tanımlanmıştır. Msi-1, başlangıçta duyu organı öncü hücrelerinin erken asimetric bölümlerinde önemli bir rol oynadığı *Drosophila*'da tanımlanan bir RNA bağlayıcı proteindir (Nakamura ve ark., 1994). Msi-1, Notch sinyal yolunu pozitif olarak etkileyen mRNA hedefi olan m-Numb'ı bastırmaktadır (Imai ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada, Msi-1 pozitif hücrelerin, çoğalan bölgede, kolon kriptinin daha derin üçte ikisi içinde lokalize olduğu bulunmuştur (Nishimura ve ark., 2003). Bu nedenle, Msi-1, insan kolon epiteli için yararlı bir kök hücre belirteci olabileceği ön görülebilir. Diğer bir çalışmada ise, Wnt hedef geni *Lgr5*'in ifadesinin, farelerin kolon kriptlerinde olduğu kadar ince bağırsakta da daha güçlü bir kök hücre işareti olarak öne sürülmüştür (Barker ve ark., 2007).

Bağlı kolon hücrelerinin hızlı devir hızı, proliferasyon, yaşlanma ve apoptozun düzenlenmesinde kök hücreler tarafından homeostatik bir dengenin korunması gerektiği anlamına gelmektedir. Diğer tüm epitel hücre tipleri kısa ömürlü olduğundan, kolon epitel kök hücrelerinin karsinomaya yol açan bir dizi somatik mutasyona maruz kalma riski taşıyan başlıca hücre tipi olduğu varsayılmaktadır (Cammarelli ve ark., 2008). Kolorektal kanser kök hücreleri (KRK-KH) ve ayrıca diğer tümörler üzerine yapılan araştırma, bu hücrelerin izolasyonu, amplifikasyonu ve bu hücrelerin karakterizasyonu için faydalı hücre zarı yüzey belirteçlerinin tanımlanması ve *in vivo* deneylerin geliştirilmesi ile karakterize edilmiştir. Kolorektal kanser kök hücrelerinin tanımlanması için en yararlı olarak iki membran belirteci seti birleştirilmiştir. Bunlar CD133 (Prominin-1) (Marzesco ve ark., 2005; O'Brien ve ark., 2007; Puglisi ve ark., 2009; Ricci-Vitiani ve ark., 2007) ve CD44 (Nagano & Saya, 2004; Sreaton ve ark., 1992; Sneath & Mangham, 1998) hücre yüzey belirteçleridir. EpCAM, CD166, CD29, CD24 ve Lgr5 dahil olmak üzere KRK kök hücrelerinin diğer potansiyel belirteçleri de tanımlanmıştır (Tablo 6). KRK-KH'ler için biyobelirteçlerin tanımlanması, temel tümör büyümesi ve ilerlemesi mekanizmasını aydınlatılması açısından oldukça önem taşımaktadır (Corbeil ve ark., 2000).

Tablo 2: Kolorektal kanserde varsayılan kanser kök hücre belirteçleri olarak önerilen hücre yüzeyi ve hücre içi moleküller ve en önemli özellikleri (Fanali ve ark., 2014)

Marker	Diğer ismi	Gen Lokasyonu	İşlevi	Referans
EpCAM	ESA, CD326, MK-1, KSA, HEA125, BerEp4, 17-1A, GA733-2, KS1/4, EGP-2, EGP34, TROP-1	Chr 2 (p21)	Epitel hücre yapışma molekülü	(Baeuerle & Gires, 2007)
CD29	B1 Integrin	Chr 10 (p11.2)	Hücre dışı matris proteinleri için reseptör; hücre göçü, çoğalma, hayatta kalma, farklılaşma ve ölümün düzenlenmesinde yer alır	(Brizzi ve ark., 2012)

CD24	HSA	Chr 6 (q21)	Müsin benzeri hücre yapışma molekülü	(Kristiansen ve ark., 2004)
CD133	Prominin-1, AC133	Chr 4 (p15.32)	Plazma zarı mikro alanlarını içeren kolesterolü bağlayan bir pentaspan transmembran glikoproteininin kodlanması	(Miraglia ve ark., 1997)
Lgr5	GPR49	Chr 12 (q22-q23)	R-spondin proteinleri için reseptör; yetişkin kök hücreler için işaretleyici	(Van der Flier ve ark., 2007)
CD44	PGP-1, HUTCH-1, GP90, EPICAN, CDW44, MIC4	Chr 11 (p13)	Hücre yapışma molekülü; Lenf düğümü ve lenfosit aktivasyonu ile ilgili	(Screaton ve ark., 1992; Sneath & Mangham, 1998)
CD166	ALCAM	Chr 3 (q13.1)	Hücre yapışma molekülü	(Lehmann ve ark., 1989)

2.2. Kolorektal Kanser Kök Hücre İzolasyon Yöntemleri

Kanser kök hücreleri çeşitli yöntemlerle saptanır ve izole edilir. Seçim yöntemi her zaman tümör tipine özgü yüzey belirteçlerini kullanmıştır ve hem pozitif hem de negatif hücre seçimi için kullanılabilen manyetik veya akış sitometrik hücre sınıflandırmasına dayanmaktadır (Takaishi ve ark., 2009; Tirino ve ark., 2009). Bununla birlikte, mesane geçiş hücresi kanseri gibi bazı kanserler için hiçbir kanser kök hücre belirteci mevcut değildir ve bu da diğer izolasyon yöntemlerinin önemini vurgulamaktadır (Wu & Alman, 2008). Kolorektal kanseri için Tablo 2’de de belirtildiği üzere kök hücre belirteçleri tanımlandığından dolayı genellikle manyetik veya akış sitometrik hücre sınıflandırmasına bağlı olarak izolasyon gerçekleştirilmektedir.

Manyetik-aktive edilmiş hücre ayırma (MACS) teknolojisi, kolon karsinomu dokusunun mekanik ve enzimatik ayrışmasından hemen sonra ya da hücre hatlarının pasajı sonrası, CD133 gibi belirli bir kök hücre belirtecinin ekspresyonuna dayalı hücreleri seçmek için en sık kullanılan tekniklerden biridir (www.miltenyibiotec.com). Bu

teknolojiyi kullanarak, ilgili hücreler, pozitif bir seçim stratejisiyle ayrılmaktadır. Optimum performans için, manyetik ayırmadan önce ayırma yoluyla tek hücreli bir süspansiyon elde etmek oldukça önemlidir. Hedef hücreler, karşılık gelen antijeni eksprese eden yüksek oranda saf hücreleri izole etmek için yüksek düzeyde spesifik bir monoklonal antikor veya kök belirteçleri ile konjuge edilmiş süper paramanyetik MACS MicroBeads ile özel olarak etiketlenir. MACS MicroBeads, ökaryotik bir hücreden hacim olarak yaklaşık bir milyon kat daha küçüktür ve hücreler kültürlendiğinde biyolojik olarak parçalanabilir. Manyetik etiketlemeden sonra hücreler, güçlü bir kalıcı mıknatısa yerleştirilmiş bir ayırma kolonundan geçirilir. Manyetik olarak etiketlenmiş hücreler kolonda tutulur ve içinden geçen etiketlenmemiş hücrelerden ayrılır. Kolonu manyetik alandan çıkardıktan sonra, fraksiyon belirli bir tamponla ayrıştırılabilir. Manyetik ayırmadan sonra hücre canlılığı, tripan mavisi dışlama yöntemi ile değerlendirilir. Pozitif olarak seçilen hücreler, spesifik kök hücre ortamında kültürlenme için veya daha sonraki uygulamalar için hemen kullanılabilir. İzole edilen pozitif hücreler, bir yıldan fazla bir süre boyunca serumsuz ortamda farklılaşmamış tümör küreleri olarak *in vitro* olarak katlanarak büyüebilmektedirler.

Kök hücreleri izole etmek için alternatif bir yöntem Floresan Etkinleştirilmiş Hücre Sıralama veya FACS akış sitometrik sıralamadır. FACS, süspansiyon halindeki hücreleri yüksek saflık ve geri kazanımlarla iki veya daha fazla kapta ayırabilen bir tür akış sitometrisidir. Farklı emisyon dalga boylarına sahip florokromlar, çok parametrelili ayrımlara izin vererek aynı anda kullanılabilir. Doğrudan bir immünofloresan boyamada hücreler, doğrudan fikoeritrin veya floresein izotiyosiyanat gibi florokroma konjuge edilmiş kök hücre belirteç antikorları ile inkübe edilir; dolaylı bir immünofloresan boyamada, etiketlenmemiş antikor, daha sonra bir florokrom konjuge sekonder antikor ile muamele edilen hücrelere doğrudan uygulanır. Etiketli hücreler, akış sitometresinde analiz edilir ve sınıflandırılır. Bu hücreler ayrı ayrı saptanabilir ve elde edilen hücresel havuz, spesifik kök hücre ortamında yetiştirilebilir veya sonraki analizler için kullanılabilir. FACS'in dezavantajları, geri kazanılan hücrelerin düşük

canlılığı, yüksek maliyeti ve karmaşık bir ekipman kullanmanın zorluğudur. MACS, FACS'den daha basit olmasına ve daha az karmaşık ekipman gerektirmesine rağmen, monoparametrik ve aynı anda birden fazla işaretleyici yoluyla hücreleri izole edemez. Ancak MACS-MultiSort tekniği ile ard arda yapılan MACS ile iki farklı kök hücre yüzey belirteci ekspresyon eden hücreleri seçilebilmektedir.

Aldehit dehidrojenaz (ALDH), Aldefluor yöntemi yoluyla akış sitometrisi ile KKH'leri izole etmek için kullanılabilen bir hücre içi belirteçtir. Bu teknik, bazı durumlarda süspansiyonda görüntülenmeden daha faydalı olabilen tek katmanlı kültürlerde tek hücreli görüntülemeye izin verir (Almanaa ve ark., 2013). Diğer bir yöntem, Hoechst 33342 boya boyama kullanılarak ABC taşıyıcılarının ekspresyonu ile hücre tarafı popülasyonlarına (SP) dayanmaktadır. Bu yöntemde, SP hücreleri, boyayı ABC taşıyıcıları aracılığıyla dışlar ve zayıf boyanır. Bu tür taşıyıcılar ayrıca kemoterapötik tedavilere direnç gösteren ilaçları da dışlar (Song ve ark., 2010). Akış sitometrisi, Hoechst ile muamele edilen hücrelerde tipik olarak $< \%2$ olan küçük bir çift negatif SP'yi tespit edebilir (Gilbert & Ross, 2009). Her yöntemin avantajları ve dezavantajları vardır. Hiçbir yöntem tek başına kanser kök hücre izolasyonunu garanti edemez, bu da kombinasyonel tekniklerin önemini vurgulamaktadır.

2.3. Kolorektal Kanser Kök Hücre Kültürü

Kolorektal kanser kök hücre izolasyonu sonrasında en önemli karar kanser kök hücrelerin verimli bir şekilde kültürlenme yönteminin ne olacağıdır. Literatürde pek çok çalışma olmakla birlikte kanser kök hücrelerin daha etkili kültür koşullarının geliştirilmesi gerekmektedir. KKH'lerin yakın zamanda bildirilen bir özelliği, ankrandan bağımsız koşullar altında serumsuz tanımlanmış bir ortamda (büyüme faktörleriyle desteklenmiş) sınırlı sayıda kaplandığında *in vitro* küresel koloniler oluşturabilmeleridir. Nörosferler (Bar ve ark., 2010), mammosferler (Rappa & Lorico, 2010) ve kolonosferler (Kanwar ve ark., 2010) için bildirildiği gibi, küre oluşturan deneyleri kullanarak büyümelerine ve çalışmalarına izin veren yöntemler artık geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kolonosferlerin biyolojisi ve genetiği

hakkında çok az şey bilinmektedir. Sferoid hücrelerin biyolojik karakter özellikleri ayrıca kolon kanseri kemo direnci ve metastazında yer alan mekanizmaları incelemek için iyi bir model sağlamaktadır ve KKH'lerin kolon kanserindeki rolünü daha fazla açıklamaya yardımcı olabilir.

Küre oluşturan kültür ilk olarak Reynold ve Weiss tarafından kök hücreleri izole etmek için kullanılmış ve o zamandan beri yaygın olarak kullanılmaktadır (Reynolds & Weiss, 1992). Bu teknikte hücreler, hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını sınırlayan hücre dışı matrise (ECM) bağlanır. Hücreler ECM'ye tutunamaz ve süspansiyon halinde büyüyemezse anoikis yoluyla ölürlür (Frisch & Francis, 1994; Ruoslahti & Reed, 1994). Ancak kök hücrelere benzer özelliklere sahip hücreler ECM'den etkilenmez ve sadece hücre-hücre etkileşimi yoluyla çoğalabilirler. Bu özellikleri kullanarak Reynold ve Weiss, insan beyninden elde edilen kök hücreleri kullanarak nörosfer kültürü adı verilen serbest yüzen bir küre kültürü elde etmişlerdir (Reynolds & Weiss, 1992). Küre oluşturan kültürün en önemli bileşenlerinden biri optimal kültür ortamıdır. Tek katmanlı kültürde kullanılan kültür ortamı genellikle küre oluşturan kültürde kullanılanı farklıdır. Küre oluşturan kültür ortamı serumsuzdur ve epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), b27 takviyesi ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri ile desteklenir. Eklenen büyüme faktörlerinin konsantrasyonu, farklı hücre türleri için farklıdır ve her büyüme faktörünün etkisi de farklıdır. Örneğin, EGF sinyali, EGF reseptörleri tarafından aktive edilir ve nörogloma kök hücrelerinde pluripotensi sürdürmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Soeda ve ark., 2008). FGF'nin, tümör küreleri oluşturmada ve kullanılan belirteçler temelinde ana popülasyondan farklı olan hücrelerin alt popülasyonu olan yan popülasyonu artırmada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Kondo ve ark., 2004). B27, tümör küreleri oluşturmada ve küre oluşturan hücrelerin özelliklerini korumada rol oynar (Gu ve ark., 2011).

Kolorektal kanser kök hücreleri uygun izolasyon yöntemiyle elde edildikten sonra hücre süspansiyonu, klonal yapışmayan küresel kümeler olarak kapsamlı çoğalmayı teşvik etmek için düşük yapışkan koşullarda "kök hücre ortamı" adı verilen özel ortamda düşük yoğunlukta yetiştirilir. Kök hücre ortamı, fetal bovine serumdan (FBS) yoksundur ve temel fibroblast büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü (EGF) dahil olmak üzere kök hücre büyümesini destekleyen çeşitli faktörlerle desteklenir. Kök hücre proliferasyonunu indüklediği bilinen hidrokortizon, insülin ve progesteron, temel fibroblast büyüme faktörü ile reseptörü arasındaki ilişkiyi stabilize eden heparinde olduğu gibi ortama eklenebilir. Kolorektal kanser kök hücrelerin bu uygun kök hücre kültür koşullarında birçok çalışmada yetiştirilmiş ve başarılı olmuşlardır (Chen ve ark., 2014; Leng ve ark., 2013; Todaro ve ark., 2007; Weiswald ve ark., 2015)

SONUÇ

Miyeloid lösemi, meme ve beyin tümörlerinde olduğu gibi, tümör oluşumundan ve sürdürülmesinden sorumlu, kök hücre özelliklerine sahip nadir bir hücre popülasyonu, kolon veya kolorektal karsinomunda da karakterize edilmiştir. Kolorektal KKH'lerinin saflaştırılması, kültürü ve çoğaltılması için ana unsurların özeti bu bölümde sunulmuştur. Kısaca, kolorektal kanser kök hücrelerin izolasyonu sonrasında, büyüme faktörleri ve hormonlar, KKH'lerin seçimine ve karakteristik kürelerin oluşumuna izin veren tüm bileşikleri içeren spesifik bir serumsuz ortamda yetiştirilmektedir. Ayrıca, kolorektal KKH'leri CD133 veya diğer belirteçlerin ifadesi yoluyla tanımlanabilir ve MACS ve FACS teknolojileri olmak üzere iki farklı teknikle izole edilebilmektedir. KKH'leri *in vitro* izole etme ve genişletme olasılığı, önemli terapötik etkilere sahiptir. Elde edilen hücreler moleküler düzeyde karakterize edilebilir ve bu bilgi, mevcut olanlardan daha seçici bir şekilde yeni terapötik stratejiler geliştirmek için kullanılabilir. KKH'leri *in vitro* izole etme ve yayma olasılığı, hayatta kalma stratejilerinin altında yatan mekanizmayı daha iyi anlamak ve anti-tümör tedavisinde yeni yaklaşımlar tanımlamak için KKH popülasyonundaki seçici olarak aktive edilmiş sinyal iletim

yollarının daha fazla araştırılmasına izin verecektir. Ayrıca KRK-KH'lerin kanser gelişimindeki etkileri net olarak belirlenmemiş olmakla birlikte kök hücreleri hedef alan yeni yaklaşımlar, metastaz ve nüksün tedavisi için yeni ilaç adayların geliştirilmesine öncülük edebilir.

KAYNAKÇA

- Allen, J., & Sears, C. L. (2019). Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: contributions to colorectal cancer development. *Genome Med*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0621-2>
- Almanaa, T. N., Geusz, M. E., & Jamasbi, R. J. (2013). A new method for identifying stem-like cells in esophageal cancer cell lines. *J Cancer*, 4(7), 536-548. <https://doi.org/10.7150/jca.6477>
- Alvarez-Gonzalez, M. A., Pantaleon, M. A., Flores-Le Roux, J. A., Zaffalon, D., Amorós, J., Bessa, X., Seoane, A., & Pedro-Botet, J. (2019). Randomized Clinical Trial: A Normocaloric Low-Fiber Diet the Day Before Colonoscopy Is the Most Effective Approach to Bowel Preparation in Colorectal Cancer Screening Colonoscopy. *Dis Colon Rectum*, 62(4), 491-497. <https://doi.org/10.1097/dcr.0000000000001305>
- Atkin, W. S., Morson, B. C., & Cuzick, J. (1992). Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med*, 326(10), 658-662. <https://doi.org/10.1056/nejm199203053261002>
- Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*, 96(3), 417-423. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603494>
- Bar, E. E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., & Eberhart, C. G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*, 177(3), 1491-1502. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091021>
- Barker, N., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev*, 22(14), 1856-1864. <https://doi.org/10.1101/gad.1674008>
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small

- intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003-1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Board, P. D. Q. A. T. E. (2002). Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. In *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US).
- Brizzi, M. F., Tarone, G., & Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol*, 24(5), 645-651. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.07.001>
- Cammareri, P., Lombardo, Y., Francipane, M. G., Bonventre, S., Todaro, M., & Stassi, G. (2008). Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol*, 86, 311-324. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)00014-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)00014-9)
- Chen, X., Wei, B., Han, X., Zheng, Z., Huang, J., Liu, J., Huang, Y., & Wei, H. (2014). LGR5 is required for the maintenance of spheroid-derived colon cancer stem cells. *Int J Mol Med*, 34(1), 35-42. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1752>
- Conlin, A., Smith, G., Carey, F. A., Wolf, C. R., & Steele, R. J. (2005). The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, 54(9), 1283-1286. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.066514>
- Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W., & Huttner, W. B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 275(8), 5512-5520. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5512>
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17(6), 1471-1474. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>
- Eisenberg, B., Decosse, J. J., Harford, F., & Michalek, J. (1982). Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer*, 49(6), 1131-1134.

- Fanali, C., Lucchetti, D., Farina, M., Corbi, M., Cufino, V., Cittadini, A., & Sgambato, A. (2014). Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*, 20(4), 923-942. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.923>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R. A., Peinado, M. A., & Clark, S. J. (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet*, 38(5), 540-549. <https://doi.org/10.1038/ng1781>
- Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124(4), 619-626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>
- Gilbert, C. A., & Ross, A. H. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem*, 108(5), 1031-1038. <https://doi.org/10.1002/jcb.22350>
- Gothai, S., Muniandy, K., Mohd Esa, N., Subbiah, S., & Arulselvan, P. (2018). Anticancer potential of *Alternanthera sessilis* extract on HT-29 human colon cancer cells [Basic Research]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(8), 394-402. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.239427>
- Greene, F. L. (2002). The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. *Bull Am Coll Surg*, 87(7), 13-15.
- Gu, Y., Fu, J., Lo, P.-K., Wang, S., Wang, Q., & Chen, H. (2011). The effect of B27 supplement on promoting in vitro propagation of Her2/neu-transformed mammary tumorspheres.
- Imai, T., Tokunaga, A., Yoshida, T., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., Weinmaster, G., Nakafuku, M., & Okano, H. (2001). The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its

- mRNA. *Mol Cell Biol*, 21(12), 3888-3900. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.12.3888-3900.2001>
- Inamura, K. (2018). Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*, 10(1), 26. <https://www.mdpi.com/2072-6694/10/1/26>
- Jass, J. R. (2005). Serrated adenoma of the colorectum and the DNA-methylator phenotype. *Nat Clin Pract Oncol*, 2(8), 398-405. <https://doi.org/10.1038/ncponc0248>
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), 113-130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>
- Kanwar, S. S., Yu, Y., Nautiyal, J., Patel, B. B., & Majumdar, A. P. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*, 9, 212. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-212>
- Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 781-786. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307618100>
- Kristiansen, G., Sammar, M., & Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*, 35(3), 255-262. <https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000032357.16261.c5>
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., & Wils, J. (2010). Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 74(2), 106-133. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010>
- Lehmann, J. M., Riethmüller, G., & Johnson, J. P. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), 9891-9895. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9891>

- Leng, Z., Tao, K., Xia, Q., Tan, J., Yue, Z., Chen, J., Xi, H., Li, J., & Zheng, H. (2013). Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells. *Plos One*, 8(2), e56082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056082>
- Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci*, 118(Pt 13), 2849-2858. <https://doi.org/10.1242/jcs.02439>
- Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351), 318-326. <https://doi.org/10.1038/nature10212>
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K., & Buck, D. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90(12), 5013-5021.
- Miyazaki, M., Furuya, T., Shiraki, A., Sato, T., Oga, A., & Sasaki, K. (1999). The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Res*, 59(20), 5283-5285.
- Moghbeli, M., Moghbeli, F., Forghanifard, M. M., & Abbaszadegan, M. R. (2014). Cancer stem cell detection and isolation. *Medical Oncology*, 31(9), 69. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0069-6>
- Moore, K. A., & Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*, 311(5769), 1880-1885. <https://doi.org/10.1126/science.1110542>
- Nagano, O., & Saya, H. (2004). Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci*, 95(12), 930-935. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.x>
- Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J. A., & Montell, C. (1994). Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila

- adult external sensory organ development. *Neuron*, 13(1), 67-81. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90460-x](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90460-x)
- Newland, R., Chapis, P., Pheils, M., Chir, M., & Macpherson, J. (1981). The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. *Cancer*, 47(6), 1424-1429.
- Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K., & Mitsufuji, S. (2003). Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci*, 48(8), 1523-1529. <https://doi.org/10.1023/a:1024763723240>
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>
- Olson, R., Perencevich, N., Malcolm, A., Chaffey, J., & Wilson, R. (1980). Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer*, 45(12), 2969-2974.
- Pellino, G., Warren, O., Mills, S., Rasheed, S., Tekkis, P. P., & Kontovounisios, C. (2018). Comparison of Western and Asian Guidelines Concerning the Management of Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*, 61(2), 250-259. <https://doi.org/10.1097/dcr.0000000000001012>
- Peters, W. R. (2019). What Every Colorectal Surgeon Should Know About the New American Cancer Society's Colorectal Cancer Screening Guidelines. *Dis Colon Rectum*, 62(4), 397-398. <https://doi.org/10.1097/dcr.0000000000001302>
- Petrelli, F., Tomasello, G., Borgonovo, K., Ghidini, M., Turati, L., Dallera, P., Passalacqua, R., Sgroi, G., & Barni, S. (2017). Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*, 3(2), 211-219. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4227>

- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W., & Jones, D. A. (2009). A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell*, *137*(4), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.037>
- Puglisi, M. A., Sgambato, A., Saulnier, N., Rafanelli, F., Barba, M., Boninsegna, A., Piscaglia, A. C., Lauritano, C., Novi, M. L., Barbaro, F., Rinninella, E., Campanale, C., Giuliante, F., Nuzzo, G., Alfieri, S., Doglietto, G. B., Cittadini, A., & Gasbarrini, A. (2009). Isolation and characterization of CD133+ cell population within human primary and metastatic colon cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *13 Suppl 1*, 55-62.
- Rappa, G., & Lorico, A. (2010). Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. *Exp Cell Res*, *316*(9), 1576-1586. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.01.012>
- Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2022). Colon Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, *255*(5052), 1707-1710. <https://doi.org/10.1126/science.1553558>
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, *445*(7123), 111-115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- Ruoslahti, E., & Reed, J. C. (1994). Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, *77*(4), 477-478. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90209-7)
- Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, *15*(6), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.012>
- Scatena, R., Mordente, A., & Giardina, B. (2011). *Advances in cancer stem cell biology*. Springer Science & Business Media.

- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., & Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(24), 12160-12164. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12160>
- Smith, D., Ballal, M., Hodder, R., Selvachandran, S. N., & Cade, D. (2006). The adenoma carcinoma sequence: an indoctrinated model for tumorigenesis, but is it always a clinical reality? *Colorectal Dis*, *8*(4), 296-301. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2005.00936.x>
- Sneath, R. J., & Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol*, *51*(4), 191-200. <https://doi.org/10.1136/mp.51.4.191>
- Snyder, C., & Hampel, H. (2019). Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Semin Oncol Nurs*, *35*(1), 58-78. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.12.011>
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons.
- Soeda, A., Inagaki, A., Oka, N., Ikegame, Y., Aoki, H., Yoshimura, S., Nakashima, S., Kunisada, T., & Iwama, T. (2008). Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem*, *283*(16), 10958-10966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704205200>
- Song, J., Chang, I., Chen, Z., Kang, M., & Wang, C. Y. (2010). Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *Plos One*, *5*(7), e11456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011456>
- Soreide, K., Janssen, E. A., Körner, H., & Baak, J. P. (2006). Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J Pathol*, *209*(2), 147-156. <https://doi.org/10.1002/path.1999>
- Sung, H., Ferlay, J., & Siegel, R. L. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S. A., Shimada, Y., & Wang, T. C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, *27*(5), 1006-1020. <https://doi.org/10.1002/stem.30>
- Thiis-Evensen, E., Hoff, G. S., Sauar, J., Langmark, F., Majak, B. M., & Vatn, M. H. (1999). Population-based surveillance by colonoscopy: effect on the incidence of colorectal cancer. Telemark Polyp Study I. *Scand J Gastroenterol*, *34*(4), 414-420. <https://doi.org/10.1080/003655299750026443>
- Thorstensen, L., Lind, G. E., Løvig, T., Diep, C. B., Meling, G. I., Rognum, T. O., & Lothe, R. A. (2005). Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia*, *7*(2), 99-108. <https://doi.org/10.1593/neo.04448>
- Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Malanga, D., La Rocca, A., Viglietto, G., Rocco, G., & Pirozzi, G. (2009). The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*, *36*(3), 446-453. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2009.03.063>
- Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., & Stassi, G. (2007). Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*, *1*(4), 389-402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001>
- Van der Flier, L. G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegbarth, A., De Palo, M., Anti, M., Van Gijn, M. E., Suijkerbuijk, S., Van de Wetering, M., Marra, G., & Clevers, H. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*, *132*(2), 628-632. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.039>

- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(7), 489-499. <https://doi.org/10.1038/nrc2645>
- Weiswald, L. B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*, 17(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>
- Wittekind, C., Compton, C. C., Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2002). TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*, 94(9), 2511-2516. <https://doi.org/10.1002/cncr.10492>
- Wu, C., & Alman, B. A. (2008). Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*, 268(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.048>
- Yadav, N. K., Arya, R. K., Dev, K., Sharma, C., Hossain, Z., Meena, S., Arya, K. R., Gayen, J. R., Datta, D., & Singh, R. K. (2017). Alcoholic Extract of *Eclipta alba* Shows In Vitro Antioxidant and Anticancer Activity without Exhibiting Toxicological Effects. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 9094641. <https://doi.org/10.1155/2017/9094641>

CHAPTER 5

**GORGONIAN ELLISELLA SP.-ASSOCIATED BACTERIA AS
A PROMISING ANTIPATHOGENIC AGENT AGAINST SKIN
DISEASES IN HUMANS**

Margaretha MONALISA¹, Agus SABDONO^{2*}, Endang SRI LESTARI³,
Mada Triandala SIBERO⁴

¹ Marine Science Department, Fisheries and Marine Science Faculty, Diponegoro University, Indonesia

² Marine Science Department, Fisheries and Marine Science Faculty, Diponegoro University, Indonesia

³ Microbiology Department, Faculty of Medicine, Diponegoro University, Indonesia

* Corresponding author: agus_sabdon@yahoo.com

⁴ Marine Science Department, Fisheries and Marine Science Faculty, Diponegoro University, Indonesia

1. INTRODUCTION

Skin disease ranks fourth as a contributor globally [1]. It is estimated that around 30-70% of the human population around the world is at risk of being infected with skin diseases, with the highest risk being in densely populated areas [2]. Skin diseases can be caused by the infection of opportunistic pathogens on the skin, such as *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* [3–5]. Various kinds of commercial antibiotics are commonly used in the treatment of skin diseases such as penicillin, amoxicillin, cephalexin, dicloxacillin, doxycycline, vancomycin, tetracycline, fluconazole [6–9]. However, continuous use of antibiotics and not paying attention to the dose causes multidrug-resistant (MDR) skin pathogens [10]. Pathogens resistant to more than three classes of antibiotics are categorized as MDR [10]. MDR pathogen causes the treatment of skin diseases with antibiotics to be ineffective. Prestinaci *et al.* (2015), reported that the increase in cases of MDR-type pathogens resulted in the deaths of up to 23,000 people annually [11]. Therefore, the study is important to conduct studies to obtain new antibiotic compounds that can fight multidrug-resistant pathogens.

Indonesia's marine resources are a source of new antimicrobial compounds with potential prospects [12]. More than 100 bioactive compounds have been isolated from Indonesian marine organisms [13]. New compounds were mostly isolated from marine invertebrates, such as sponges. A new compound has been reported successfully isolated from *Haliclona* sp. Sulawesi are halioxepine and meroditerpene [14]. Besides sponges, One of the potential sources of new antimicrobial compounds to study and still under exploration is the gorgonian. Gorgonians are sessile colonial animals from the phylum Cnidaria that can produce secondary metabolites as a defense mechanism and nutrition for the surrounding environment [15, 16]. Previous studies reported that crude extracts from *Ellisella* sp. have triterpenoid and quinone [17]. Previous studies have reported that crude extracts from *Ellisella* sp. contain briaranes, these compounds have antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [18]. However, of the total new compounds that have been isolated,

only 15.8% have been isolated from cnidarian [12]. Isolate bioactive compounds continuously from gorgonians would require large amounts. Therefore, gorgonian-association bacteria are another way to obtain bioactive compounds. The study Keller-Costa *et al.* (2017), states that bacteria associated with the host are able to produce compounds similar to their hosts with same activities [19]. However, research on the gorgonian association bacteria *Ellisella* sp. never been reported. Therefore, this study aims to obtain gorgonian association bacteria *Ellisella* sp. from Karimunjawa, Central Java, Indonesia has the potential as an antimicrobial against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*, and detects genes encoding PKS and NRPS through a molecular approach.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Gorgonian sample collection

Ellisella sp. samples were collected from Pulau Burung (S 05°53'27.9"; E 110°20'46.2"), Gelean Island (S 05°52'56.0"; E 110°21'29.5"), Seruni Island (S 05°51'13.3"; E 110°34'36.8"), Sambangan Island (S 05°50'27.8"; E 110°34'54.8"), Karimunjawa, Central Java, Indonesia. A sampling of the *Ellisella* sp. was done by scuba diving. Gorgonian *Ellisella* sp. samples were collected in a ziplock and stored in a cool box [20]. All collected specimens were documented and identified based on their morphological appearance [16, 21].

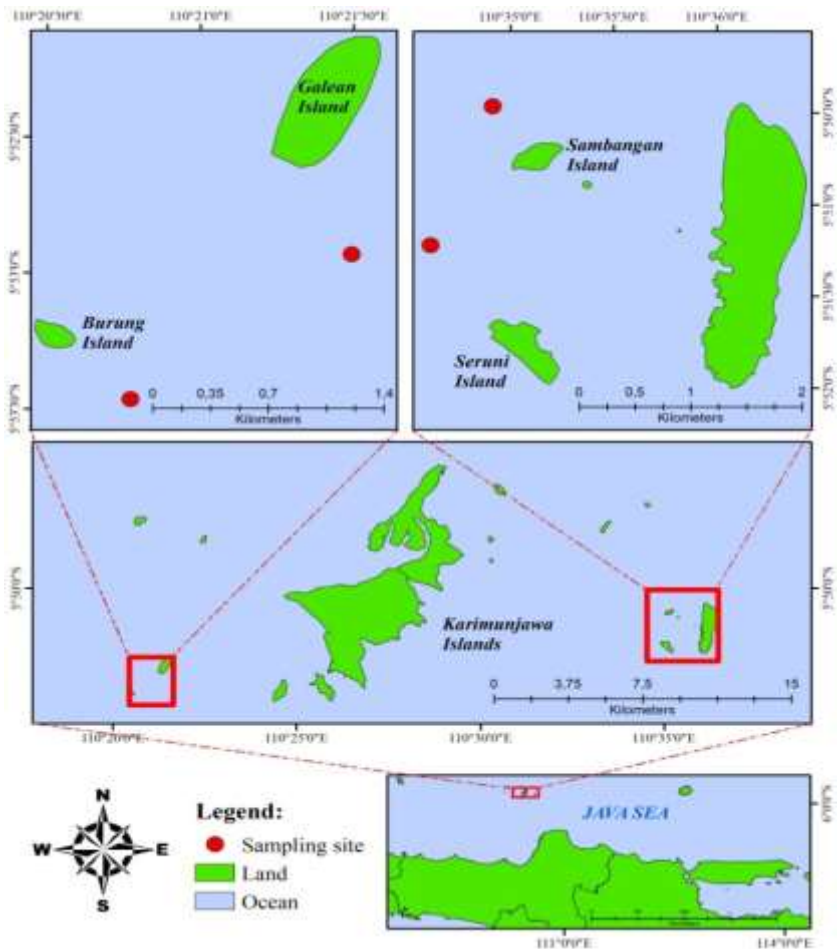


Figure 1. Sampling site in Burung, Gelean, Seruni, Sambangan islands of Karimunjawa, Indonesia

2.2. Isolation and purification

Gorgonian-associated bacterial isolation was carried out using the serial dilution method. The gorgonian samples were crushed until smooth with a mortar. Gorgonian samples were diluted in sterile seawater at a concentration of 10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3} . Dilution concentration 10^{-3} was plated on Zobell Marine Agar media and incubated at 37°C . Gorgonian-associated bacterial colonies were purified by the streak method in Zobell Marine Agar media [22, 23].

2.3. Screening of antibacterial activity

The method used in antibacterial activity screening is the agar plug method against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. Plug agar from gorgonian-associated bacterial culture was inoculated on Mueller Hinton Agar (MHA) medium, which had been inoculated with pathogenic bacteria with a standard 0.5 McFarland. The medium was incubated for 2x24 hours. Antibacterial activity was indicated by the clear zone formed around the agar plug. Bacterial isolate with antibacterial activity will be continued in further stages [20, 24].

2.4. Morphology characterization

Morphological characterization of gorgonian association bacteria that has antibacterial activity was carried out macroscopically and microscopically. Macroscopic characterization was performed by observing the color, shape, margin, elevation, size, aerial hyphae color, substrate hyphae color, and bacterial colony pigmentation on Zobell Marine Agar media [25]. Microscopic morphological characterization was performed by observing the gram stain and the shape of the bacterial colony cells under a microscope at 1000x magnification. The gram stain was carried out with the MERCK gram staining kit protocol [26].

2.5. Biochemistry test

The biochemical tests include catalase test, cellulase, amylase test, lipase test, sugar reduction test, sugar fermentation test, gas production, motility test, H₂S test, and citrate test. A Catalase test was carried out by dripping 3% H₂O₂ on each bacterial isolate [27]. Cellulase, amylase, and lipase assays according to Gupta *et al.* (2004) with several modifications, each bacterial isolate was inoculated on an agar medium containing 1% Carboxy Methyl Cellulose (CMC) or 0.2% starch, or 1% tween 80 and incubated for six days. Finished the incubation period, the cellulase and amylase medium were poured into the iodine solution [28] Sugar reduction assays according to Giri and Kindo (2015) with several modifications. Each bacterial isolate was inoculated on a broth medium containing 1% fructose or mannitol or

trehalose as a source of sugar [29]. Biochemical tests of sugar fermentation, gas production, motility, H₂S, and citrate were carried out by inoculating bacterial isolate into a tube Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Sulfide Indole Motility (SIM), and Simmon Citrate Agar (SCA).

2.6. Salinity experiment

The salinity test aims to determine of bacterial isolates were classified as marine obligate bacteria or marine facultative bacteria using the streak method. A salinity test was performed by inoculating bacterial isolate into Nutrient Agar medium had a salinity of 0 ppm and 35 ppm. The results are discovered by observing the growth of bacteria on agar media [30].

2.7. Molecular identification

Molecular identification of bacterial isolate was conducted using sequencing of the 16S rRNA gene. The first step was DNA extraction was carried out according to the Zymo Quick-DNA Miniprep Kit DNA extraction protocol. Amplification of DNA fragments from isolated bacteria was carried out using the Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR tube consisting of 1µl DNA template, 12.5µl GoTaq®RedMaster Mix Promega, 9.5 µl ddH₂O, 1 µl primer 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) and 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). The amplification temperature setting was initial denaturation at 95°C for 3 minutes, denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute, and elongation at 72° C for 7 minutes for 34 cycles. The PCR results were gel electrophoresed with a voltage of 100V for 30 minutes and visualized to observe DNA bands. In addition, the PCR results were sent to PT. Genetics, Jakarta, Indonesia for the determination of nitrogen base composition 16S rRNA. Identification of bacterial isolate based on sequence homology in NCBI BLAST. The phylogenetic tree analysis was constructed using MEGA X software with 1000x bootstrap [21, 22, 32].

2.8. Detection of biosynthetic gene cluster

Detection of Biosynthetic Gene Clusters (BGC) aims to detect genes encoding for a Polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal peptide synthesis (NRPS). Detection of BGC was performed by using Polymerase Chain Reaction (PCR) with the same composition as the previous step and specific primers. In this study, the gene encoding PKS I was detected using primers KS α -F (5'-TSGCS TGCTTGGAYGCSATC-3') and KS α -R (5'-TGGAANC CGCCGAABCCGCT-3') at 700bp-800bp [24]. The gene encoding PKS II was detected using primers IIPF6 (50-TSG CST GCT TCG AYG CSA TC-30) and IIPR6 (50-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-30) at 600bp-700bp [33], [34]. Meanwhile, the gene encoding NRPS was detected using primers A2gamForward (50-AAG GCN GGC GSB GCS TAY STG CC-3') and A3gamReverse (50-TTG GGB IKB CCG GTS GIN CCS GAG GTG-3') at 200bp-300bp [32], [35]. The PCR results were gel electrophoresis and visualized to observe DNA bands

2.9. Metabolite extraction

Extraction of metabolites secondary according to Sibero *et al.* (2018) and Wijaya *et al.* (2022) with several modifications, each bacterial isolated was cultivated on some Zobell Marine Agar medium and incubating for 7-14 days. Bacterial isolate cultures were extracted using the maceration method with ethyl acetate at a ratio of 2:1 (solvent: media). The filtrate was concentrated using a rotary evaporator at a temperature of 40°C. The crude extract was weighed and stored in the freezer [24, 34].

2.10. Antibacterial assay of crude extracts

Antibacterial activity crude extract of the bacterial isolate was performed by using the Kirby-Bauer Disc Diffusion method. The crude extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a concentration of 1 mg/ml. Extract dilution of 10 μ l was injected into sterile disc paper. Paper disks containing the extract were inoculated on Mueller Hinton Agar (MHA) medium which had been inoculated with the

pathogen *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. The medium test was incubated for 2x24 hours and the clear zone around the paper disk indicated the presence of antibacterial activity [36], [37]

3. RESULT AND DISCUSSION

A Total of 6 gorgonian *Ellisella* sp. were collected at four sampling sites from Burung Island, Gelean Island, Sambangan Island, and Seruni Island. Each gorgonian sample collected showed the appearance of polyps and tentacles with orange, red, to brown colony colors and bushes branching patterns. Based on the morphological appearance, polyps, colony color, and branching pattern, gorgonian samples were classified as *Ellisella* sp [16], [21]. The abundance of gorgonian *Ellisella* sp. on sampling location is influenced by various factors, such as temperature and salinity of the environment. In This study, the sampling location has a temperature (29-31°C) and salinity (33-35‰) as a habitat for gorgonian *Ellisella* sp. [38][39]. Another factor that affects the abundance of gorgonians is the availability of food at the sampling location [40]. The results of previous studies showed that abundance of plankton in Karimunjawa waters[41].

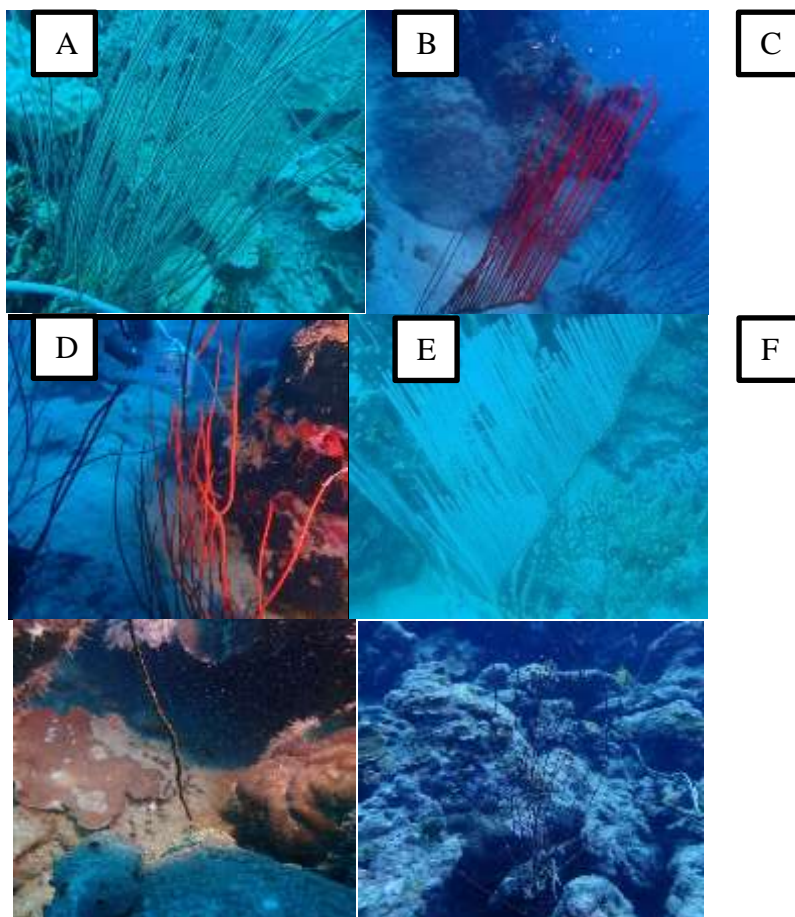


Figure 2. Gorgonian *Ellisella* sp. from Burung Island (A), Gelean Island (B, C, D), Seruni Island (E), and Sambangan Island (F)

In This study, a total of 46 bacterial isolates were isolated from gorgonian BU.19 (8 isolates), GL.1 (1 isolate), GL. 9 (4 isolates), GL.17(14 isolates), SE.2 (14 isolates), SA.16 (5 isolates). The composition of the Zobell Marine Agar medium consists of peptone, yeast extract, NaCl, and stimulated minerals according to marine environmental conditions so that marine bacteria associated with gorgonians grow on the Zobell Marine Agar medium [44].

Table 1. Antibacterial activity of Gorgonian-associated bacteria

Sampling Locations	Total Isolate	Active Isolate	Medium	Code Isolate	<i>C. acnes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
Burung Island	8	2(25%)	Zobell Marine Agar	BU.19.1	+	+	+
				BU.19.2	+	+	+
				BU.19.3	-	-	-
				BU.19.4	-	-	-
				BU.19.5	-	-	-
				BU.19.6	-	-	-
				BU.19.7	-	-	-
				BU.19.8	-	-	-
Gelean Island	19	2(10,53%)	Zobell Marine Agar	GL.4.1	-	-	-
				GL.9.1	-	-	-
				GL.9.2	-	-	-
				GL.9.3	-	-	-
				GL.9.4	-	-	-
				GL.17.1	-	+	-
				GL.17.2	-	-	-
				GL.17.3	-	-	-
				GL.17.4	-	-	-
				GL.17.5	-	-	-
				GL.17.6	-	-	-
GL.17.7	-	-	-				
GL.17.8	+	+	-				
GL.17.9	-	-	-				
GL.17.10	-	-	-				
GL.17.11	-	-	-				

				GL.17.12	-	-	-
				GL.17.14	-	-	-
				GL.17.16	-	-	-
Seruni Island	14	0(0%)	Zobell Marine Agar	SE.2.1	-	-	-
				SE.2.2	-	-	-
				SE.2.3	-	-	-
				SE.2.4	-	-	-
				SE.2.5	-	-	-
				SE.2.6	-	-	-
				SE.2.7	-	-	-
				SE.2.8	-	-	-
				SE.2.9	-	-	-
				SE.2.10	-	-	-
				SE.2.11	-	-	-
				SE.2.12	-	-	-
				SE.2.13	-	-	-
				SE.2.14	-	-	-
Sambangan Island	5	0(0%)	Zobell Marine Agar	SA.16.1	-	-	-
				SA.16.2	-	-	-
				SA.16.3	-	-	-
				SA.16.4	-	-	-
				SA.16.5	-	-	-
				SA.16.6	-	-	-

(+) : presence of clear zone
 (-) : absence of clear zone

All isolates of gorgonian-association bacteria were screened for antibacterial activity against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. The result of the antagonistic approach obtained 4 isolates, which showed a clear zone against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. The clear zone formed around the agar plug indicated that the bacterial isolate had antibacterial activity. Details of the results of

screening antibacterial activity from gorgonian-association bacteria are presented in Table 1. According to Sabdaningsih *et al.* (2019), microorganisms produce secondary metabolites for self-defense mechanisms [45]. Besides, secondary metabolites produced by bacteria can have potential bioactive compounds such as antibacterial activity. The diameter of the clear zone gradually decreases in every observation, indicating the antimicrobial compound produced by each isolate is categorized as bactericidal [46].

Table 2. Morphological Characterization

Morphological Characterization	Isolate Code			
	BU.19.1	BU.19.2	GL.17.8	GL.17.1
Color	White	White	Yellow	White
Shapes	Circular	Circular	Circular	Circular
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire
Elevation	Flat	Flat	Umbonate	Raised
Size	Large	Large	Small	Moderate
Aerial hyphae color	White	White	-	-
Substrate hyphae color	Cream	Cream	-	-
Pigmentation	Brown	Brown	Yellow	-
Gram stain	Positif	Positif	Positif	Positif
Cell Shape	Filamentous	Filamentous	Tetracoccus	Bacilli

Morphological characterization showed that isolate BU.19.1 and BU.19.2 had circular colonies with entire margins and flat elevation white-colored hyphae. These isolates are categorized as gram-positive with filamentous cell shapes. Isolate GL 17.1 has white-colored circular colonies with entire margins and raised elevation. These isolates are categorized as gram-positive with shape cells of bacilli. Isolate GL 17.8 has yellow-colored circular colonies with entire margins and umbonate elevation. These bacterial isolates are categorized as gram-positive with a tetrad occurs cell shape. The results of morphological characterization are presented in Table 2. Gram-positive bacteria have a small lipid membrane with a thick peptidoglycan membrane on the cell wall [47].

Biochemical tests were used to determine the physiological properties of each bacterial isolate. The results of the biochemical test showed that isolate BU.19.1 is capable of producing enzymes catalase, amylase, and lipase with the ability to reduce fructose, mannitol, trehalose, ferment lactose, sucrose, and produce H₂S. Isolate BU.19.2 had similar physiological results with isolate BU.19.1, only isolate BU.19.2 cannot reduce mannitol and trehalose. Isolate GL.17.1 showed the ability to produce enzymes catalase, and amylase and able to reduce fructose, trehalose, ferment glucose and produce H₂S. Meanwhile, isolate GL. 17.8 showed to produce catalase and amylase with the ability to reduce fructose, and produce citrate, and H₂S. Detailed biochemical test results are presented in table 3. The production of catalase enzyme through observation of the reaction process bubbles from bacterial isolate reducing H₂O₂ ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Catalase Enzyme} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) [27]. Cellulase and amylase enzymes reacted with iodine solution to form a clear zone around the bacterial isolate. The presence of a clear zone around bacterial isolate is an indicator of the production of amylase and cellulase. According to previous studies, an iodine solution can bind some polysaccharides yet is unable to bind to polysaccharides that have been enzymatically degraded [48]. Different from the production of lipase enzymes, bacteria capable of producing lipase will form fatty acid deposits that are cloudy white around the bacterial isolate. Bacteria will hydrolyze oil into lipids [28]. The occurrence of the process of reduction and fermentation of carbohydrates in bacteria is indicated by a change in the color of the medium from red to yellow. Fermentation and reduction processes convert carbohydrates into acid products. Meanwhile, there are types of bacteria that can utilize citrate as an energy source. Production citrate was indicated by the change in the color of the SCA medium from green to blue. Bacteria will convert citrate to pyruvate which is used in bacterial metabolism [24]. Bacteria that do not grow spread in SIM media were categorized as non-motile bacteria. Bacteria-associated organisms are commonly categorized as non-motile bacteria that move by a rolling mechanism [24]. The black precipitate formed in the SIM medium indicated that the bacterial isolate produce H₂S. The black

precipitate is ferric sulfide formed from the reaction of H₂S with ferrous ammonium sulfate [49].

Table 3. Biochemical test result

Biochemical Test	Isolate Code			
	BU.19.1	BU.19.2	GL.17.8	GL.17.1
Enzyme				
Catalase	+	+	+	+
Cellulase	-	-	-	-
Amylase	+	+	+	+
Lipase	+	+	-	-
Reducing Sugars				
Fructose	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	-
Trehalose	+	-	-	+
Glucose	-	-	-	+
Lactose	+	+	-	-
Sucrose	+	+	-	-
Production Gas				
Citrate	-	-	+	-
Motility	-	-	-	-
H ₂ S	+	+	+	+

(+) : positive reaction

(-) : negative reaction

Bacteria were able to grow in both 0 ppm and 35 ppm medium as marine facultative bacteria, and bacteria were able to grow in 35 ppm marine obligate bacteria. The results of the salinity experiment showed that isolates BU.19.1 and BU.19.2 were categorized as marine obligate bacteria. Bacterial isolates GL.17.1 and GL.17.8 were categorized as marine facultative bacteria. The presence of facultative marine bacteria in the marine environment indicates that these bacteria can adapt to the marine environment [50].

Table 4. Salinity experiment result

Isolate Code	NaCl	
	35 ppm	0 ppm
BU.19.1	+	-
BU.19.2	+	-
GL.17.8	+	+
GL.17.1	+	+

(+) : the presence of bacterial growth

(-) : absence of bacterial growth

Bacterial identification was performed by using DNA barcoding based on NCBI BLAST homology in the 16S ribosomal RNA region (Figure 3). Based on the results of molecular identification, isolate BU.19.1 was identified as *Nocardiopsis salina* with 98.99% similarity to *Nocardiopsis salina*. Isolate BU.19.2 was identified as *Nocardiopsis salina* with 98.79% similarity to *Nocardiopsis salina*. Isolate GL.17.1 was identified as *Bacillus paramycoides* with 99.42% similarity to *Bacillus paramycoides*. Isolate GL.17.8 was identified as *Kocuria palustris* with 99.98% similarity to *Kocuria palustris*. All isolate belong to the same group of *Terrabacteria* [51].

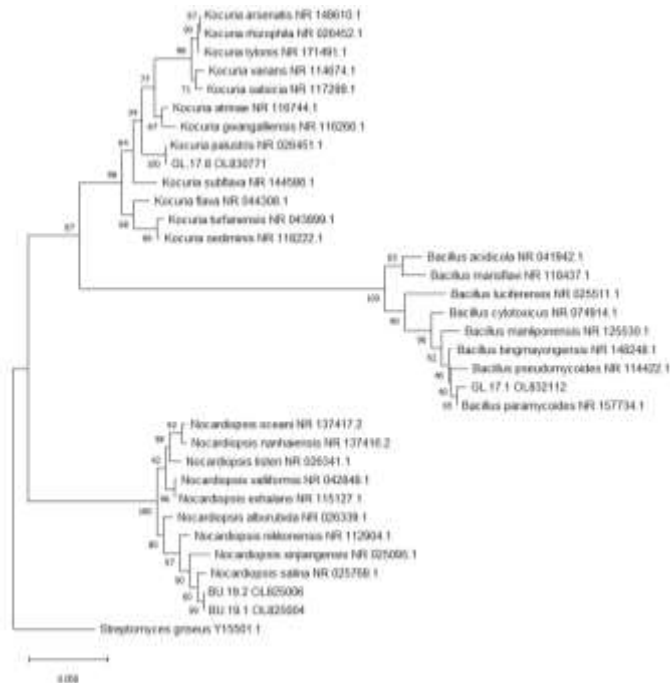


Figure 3. Filogenetic Tree

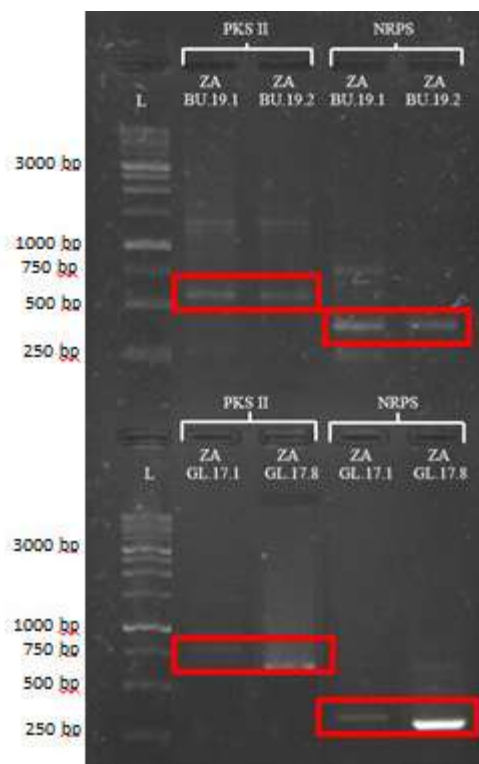


Figure 4. Biosynthetic Gene Cluster PKS II and NRPS

Previous studies reported that *Nocardiopsis* sp. produces secondary metabolites with antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Serratia marcescens* [52]. Meanwhile, previous studies reported that *Bacillus paramycoides* had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* [53]. The antibacterial activity of *Bacillus paramycoides* is influenced by the secondary metabolites produced, as though bacteriocins [54]. According to the research of Iquebal (2021) *Kocuria palustris* produces secondary metabolites with antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, and *Escherichia coli* [55]. Based on Martin *et al.* (2013) *Kocuria palustris* produces secondary metabolites from thiazolyl peptide and polyketide, such as kocurin compounds[56].

All bacterial isolates showed the presence of genes encoding PKS II and NRPS enzymes (figure 4). Biosynthetic gene clusters have an important role in producing secondary metabolites in bacteria. Bacteria use secondary metabolites as a self-defense mechanism in environmental conditions. Meanwhile, secondary metabolites can also be used as antibiotics, anti-tumor agents, immunostimulants, and others. PKS and NRPS were used to determine bacteria's secondary metabolites including polyketides and peptides. Several commercial antibiotics are derived from polyketides and peptides such as rifampicin, gentamicin, and althiomycin [57].

The results of the antibacterial activity test on the crude extract of each bacterial isolate showed no clear zone was formed. Several factors can affect the difference in the results obtained between the results of the antibacterial activity screening and the results of the crude extract test, such as the influence of the solvent and the multidrug-resistant nature of the pathogen.

4. CONCLUSIONS

A total of 46 bacterial isolates were successfully isolated from gorgonian *Ellisella* sp. at Karimunjawa, Jawa Tengah, Indonesia. Among the gorgonian-associated bacteria, four isolates with code BU.19.1, BU.19.2, GL.17.1, and GL.17.8 showed antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. All active isolates had genes encoding PKS II and NRPS. The study results indicate that gorgonian-association bacteria can represent a potential source of new antipathogenic compounds for skin diseases.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the support given by the Research and Public Service Institution, Diponegoro University through the WCR-UNDIP-B scheme, Contract no.118-04/UN76.1/PP/2021

REFERENCES

- [1] K. Urban *et al.*, “Burden of skin disease and associated socioeconomic status in Asia: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 1990-2017,” *JAAD Int.*, vol. 2, pp. 40–50, 2021, doi: 10.1016/j.jdin.2020.10.006.
- [2] R. J. Hay *et al.*, “The global burden of skin disease in 2010: An analysis of the prevalence and impact of skin conditions,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, no. 6, pp. 1527–1534, 2014, doi: 10.1038/jid.2013.446.
- [3] D. Seth, K. Cheldize, D. Brown, and E. E. Freeman, “Global Burden of Skin Disease: Inequities and Innovations,” *Curr. Dermatol. Rep.*, vol. 6, no. 3, pp. 204–210, 2017, doi: 10.1007/s13671-017-0192-7.
- [4] T. Sullivan and E. De Barra, “Diagnosis and management of cellulitis,” *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London*, vol. 18, no. 2, pp. 160–163, 2018, doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-160.
- [5] J. Talapko *et al.*, “Candida albicans-the virulence factors and clinical manifestations of infection,” *J. Fungi*, vol. 7, no. 2, pp. 1–19, 2021, doi: 10.3390/jof7020079.
- [6] E. Ebimiewei and A. Ibemologi, “Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives,” *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Rsearch*, vol. 4, no. September 2017, pp. 90–101, 2016.
- [7] K. U. Zaidi, A. Mani, V. Thawani, and A. Mehra, “ Total Protein Profile and Drug Resistance in Candida albicans Isolated from Clinical Samples ,” *Mol. Biol. Int.*, vol. 2016, pp. 1–6, 2016, doi: 10.1155/2016/4982131.
- [8] E. Ksiezopolska and T. Gabaldón, “Evolutionary emergence of drug resistance in candida opportunistic pathogens,” *Genes (Basel).*, vol. 9, no. 9, pp. 1–24, 2018, doi: 10.3390/genes9090461.
- [9] E. Marschall, M. J. Cryle, and J. Tailhades, “Biological, chemical, and biochemical strategies for modifying glycopeptide antibiotics,” *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 49, pp.

- 18769–18783, 2019, doi: 10.1074/jbc.REV119.006349.
- [10] S. Basak, P. Singh, and M. Rajurkar, “Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study,” *J. Pathog.*, vol. 2016, pp. 1–5, 2016, doi: 10.1155/2016/4065603.
- [11] F. Prestinaci, P. Pezzotti, and A. Pantosti, “Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon,” *Pathog. Glob. Health*, vol. 109, no. 7, pp. 309–318, 2015, doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
- [12] N. Hanif, A. Murni, C. Tanaka, and J. Tanaka, “Marine natural products from Indonesian waters,” *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 6, 2019, doi: 10.3390/md17060364.
- [13] M. Y. Putra and T. Murniasih, “Research Center for Oceanography, Indonesian Institute of Sciences, Jl. Pasir Putih I, Ancol Timur, Jakarta 14430, Indonesia,” *J. Coast. Life Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 104–107, 2016, doi: 10.12980/jclm.4.2016j5-236.
- [14] A. Trianto, I. Hermawan, N. J. De Voogd, and J. Tanaka, “Halioxepine, a new meroditerpene from an Indonesian sponge *Haliclona* sp.,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 59, no. 10, pp. 1311–1313, 2011, doi: 10.1248/cpb.59.1311.
- [15] D. Matulja, M. Kolympadi Markovic, G. Ambrožić, S. Laclef, S. K. Pavelić, and D. Marković, “Secondary Metabolites from Gorgonian Corals of the Genus *Eunicella*: Structural Characterizations, Biological Activities, and Synthetic Approaches,” *Molecules*, vol. 25, no. 1, p. 129, Dec. 2019, doi: 10.3390/molecules25010129.
- [16] Y. Tuti and L. P. Van Ofwegen, *Gorgonians in Indonesian waters*, no. 1. 2018.
- [17] Y. H. Teffu, A. G. O. Kase, A. Trianto, and D. P. Wijayanti, “Secondary metabolites compound of sea plumes gorgonian (*Rumphella*, *Isis* and *Ellisella*) from Maumere Water- East Nusa Tenggara Indonesia,” *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 823, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1757-899X/823/1/012046.
- [18] P. J. Sung, W. T. Tsai, M. Y. Chiang, Y. M. Su, and J. Kuo, “Robustolides A-C, three new briarane-type diterpenoids from

- the female gorgonian coral *Ellisella robusta* (Ellisellidae),” *Tetrahedron*, vol. 63, no. 32, pp. 7582–7588, 2007, doi: 10.1016/j.tet.2007.05.042.
- [19] T. Keller-Costa, D. Eriksson, J. M. S. Goncalves, N. C. M. Gomes, A. Lago-Leston, and R. Costa, “The gorgonian coral *Eunicella labiata* hosts a distinct prokaryotic consortium amenable to cultivation,” *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 93, no. 12, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1093/femsec/fix143.
- [20] R. Kristiana *et al.*, “Isolation And Partial Characterization Of Bacteria Activity Associated With Gorgonian *Euplexaura* sp. Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 55, no. 1, p. 012056, Feb. 2017, doi: 10.1088/1755-1315/55/1/012056.
- [21] A. Sabdono, O. . Radjasa, A. Trianto, M. . Sibero, R. Kristiana, and S. J. . Larasati, “Comparative Assessment of Gorgonian Abundance and Diversity Among Islands With Different Anthropogenic Stressors in Karimunjawa Marine National Park, Java Sea,” vol. 13, no. 1, pp. 341–348, 2022.
- [22] R. Kristiana *et al.*, “Antibacterial potential of nudibranch-associated bacteria from Saparua and Nusa Laut Islands, Indonesia,” *Biodiversitas*, vol. 20, no. 7, pp. 1811–1819, 2019, doi: 10.13057/biodiv/d200704.
- [23] Sarjito *et al.*, “Exploration of bacteria associated with Nudibranchs to control *Vibrio* spp.,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 530, no. 1, pp. 0–7, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/530/1/012031.
- [24] A. P. Wijaya, A. Sabdono, M. T. Sibero, A. Trianto, and O. K. Radjasa, “Screening of the antifungal potential of nudibranch *Chromodoris lineolata* associated bacteria against *Candida albicans*,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 967, no. 1, p. 012043, Jan. 2022, doi: 10.1088/1755-1315/967/1/012043.
- [25] M. Kasech, E. Wondmeneh, and A. Takele, “Isolation and characterization of bacteria associated with yolk sac infection (Omphalitis) in chicken from three hatcheries in Bishoftu, Ethiopia,” *African J. Microbiol. Res.*, vol. 11, no. 43, pp. 1551–

- 1557, 2017, doi: 10.5897/ajmr2017.8363.
- [26] M. Y. Nasution, S. Ahmad Shafwan, Pulungan, E. Prasetya, and S. Rezeqi, "Isolation and Characterization of Bacteria from River Origin in Mandailing Natal North Sumatera," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1819, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1742-6596/1819/1/012044.
- [27] Y. S. Ismail, C. Yulvizar, and B. Mazhitov, "Characterization of lactic acid bacteria from local cows milk kefir," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 130, no. 1, 2018, doi: 10.1088/1755-1315/130/1/012019.
- [28] R. Gupta, N. Gupta, and P. Rathi, "Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 6, pp. 763–781, 2004, doi: 10.1007/s00253-004-1568-8.
- [29] S. Giri and A. J. Kindo, "Evaluation of Five Phenotypic Tests in the Identification of Candida Species," *Natl. J. Lab. Med.*, vol. 4, no. 4, pp. 13–18, 2015.
- [30] A. P. Wijaya, K. G. Bondar, E. H. Frederick, Y. Igarashi, and M. T. Sibero, "Identification of marine bacteria HPP.4A and HPP.T13 and its anticancer activity against P388 murine leukaemia cell," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 584, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/584/1/012005.
- [31] D. Ayuningrum *et al.*, "Tunicate-associated bacteria show a great potential for the discovery of antimicrobial compounds," *PLoS One*, vol. 14, no. 3, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0213797.
- [32] M. T. Sibero *et al.*, "Characterization of a yellow pigmented coral-associated bacterium exhibiting anti-Bacterial Activity Against Multidrug Resistant (MDR) Organism," *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 81–87, 2019, doi: 10.1016/j.ejar.2018.11.007.
- [33] A. A. Tomaseto, M. C. Alpiste, A. F. de C. Nassar, and S. A. L. Destéfano, "Antibacterial activity of phytopathogenic Streptomyces strains against bacteria associated to clinical diseases," *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*, vol. 87, pp. 1–7, 2020,

doi: 10.1590/1808-1657000142020.

- [34] O. K. Radjasa and A. Sabdono, “Ecological Role of A Softcoral-Associated Bacterium *Arthrobacter* sp . on Marine Biofilm-Forming Bacteria,” *Microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 84–88, 2008.
- [35] D. Zhang, X. Xu, Q. Song, Y. Bai, and Y. Zhang, “in Eastern China based on a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene,” vol. 11, pp. 1113–1121, 2016.
- [36] M. T. Sibero, D. Herdikiawan, O. K. Radjasa, A. Sabdono, A. Trianto, and D. W. Triningsih, “Antibacterial activity of sponge associated fungi against vibriosis agents in shrimp and its toxicity to *Litopenaeus vannamei*,” *AACL Bioflux*, vol. 11, no. 1, pp. 10–18, 2018.
- [37] E. H. Frederick *et al.*, “Preliminary Evaluation of Anti Fish Pathogenic Bacteria and Metabolite Profile of Andaliman Fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) Ethanol Extract,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 750, no. 1, 2021, doi: 10.1088/1755-1315/750/1/012026.
- [38] L. Sánchez–tocino, A. de la Linde Rubio, M. J. López–rodríguez, and J. M. Tierno de Figueroa, “Conservation status of *paramuricea clavata* (Risso, 1826) (anthozoa, alcyonacea) in the chafarinas islands (mediterranean sea),” *Anim. Biodivers. Conserv.*, vol. 42, no. 2, pp. 253–256, 2019, doi: 10.32800/abc.2019.42.0253.
- [39] G. P. Schmahl, E. L. Hickerson, and W. F. Precht, “Biology and Ecology of Coral Reefs and Coral Communities in the Flower Garden Banks Region, Northwestern Gulf of Mexico,” *Coral Reefs USA*, pp. 221–261, 2008, doi: 10.1007/978-1-4020-6847-8_6.
- [40] S. Cocito *et al.*, “Nutrient acquisition in four mediterranean gorgonian species,” *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 473, no. January, pp. 179–188, 2013, doi: 10.3354/meps10037.
- [41] S. Suryanti, C. Ain, N. Latifah, and S. Febrianto, “Mapping of Sea Urchin Abundance as Control of Algae Expansion for the Balance of Coral Reef Ecosystem in Karimunjawa Islands,” vol.

- 7, no. 12, pp. 120–127, 2017, [Online]. Available: <https://www.textroad.com/pdf/JAEBS>
- [42] Avrionesti and M. R. Putri, “Study of Ecosystems Condition in Karimun Jawa and Its Effect on Growth Rate Prediction of Barramundi (*Lates Calcarifer*) Based on Average Temperature in 2010 - 2017,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 618, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/618/1/012031.
- [43] HIMEDIA, “Zobell Marine Agar 2216,” pp. 8–10, [Online]. Available: <http://himedialabs.com/TD/M384.pdf>
- [44] F. A. Laksmi, I. Nuryana, E. Agustriana, S. Muhyiddin, E. Yetti, and H. Wijaya, “Screening of Indonesian marine bacteria and their potential for D-tagatose production,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 976, no. 1, 2022, doi: 10.1088/1755-1315/976/1/012035.
- [45] A. Sabdaningsih *et al.*, “Anti MDR acinetobacter baumannii of the sponges-associated fungi from Karimunjawa national park,” *AACL Bioflux*, vol. 12, no. 5, pp. 1970–1983, 2019.
- [46] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [47] Lakna, “Difference Between Gram Positive and Gram Negative Bacteria Stunning images of cells Discover how scientists use Main Difference – Gram Positive vs Gram Negative Bacteria,” *Pediaa*, no. April, p. 13, 2017.
- [48] Z. Xu, F. Zhong, Y. Li, C. F. Shoemaker, W. H. Yokoyama, and W. Xia, “Effect of polysaccharides on the gelatinization properties of cornstarch dispersions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 2, pp. 658–664, 2012, doi: 10.1021/jf204042m.
- [49] S. Jahan, S. M. Z. Hasan, and R. S. Lia, “Biochemical characterization and biological control measures of citrus variegated chlorosis (CVC) bacteria,” vol. 6, no. 5, pp. 1567–1571, 2017.
- [50] H. Wang *et al.*, “Underlying mechanisms of ANAMMOX bacteria adaptation to salinity stress,” *J. Ind. Microbiol.*

- Biotechnol.*, vol. 46, no. 5, pp. 573–585, 2019, doi: 10.1007/s10295-019-02137-x.
- [51] D. Megrian, N. Taib, J. Witwinowski, C. Beloin, and S. Gribaldo, “One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide,” *Mol. Microbiol.*, vol. 113, no. 3, pp. 659–671, 2020, doi: 10.1111/mmi.14469.
- [52] N. D. Trivedi, “Bioactivity, Chemical Profiling and 16S rRNA-based Phylogeny of Haloalkaliphilic Nocardiosis sp. GhM-HA-6 Isolated from the Gulf of Khambhat, Gujarat, India,” *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.*, vol. 14, no. 3, pp. 1294–1301, 2021, doi: 10.21786/bbrc/14.3.58.
- [53] A. Trianto, Nirwani, O. Susanti, D. Maesaroh, and O. K. Radjasa, “The bioactivity of bacterium and fungi living associate with the sponge reniera sp. Against multidrug-resistant staphylococcus aureus and escherichia coli,” *Biodiversitas*, vol. 20, no. 8, pp. 2303–2307, 2019, doi: 10.13057/biodiv/d200827.
- [54] Y. Sondang, K. Anty, and R. Siregar, “Identification of Endophytic and Rhizosphere Bacteria in Maize (*Zea mays* L.) in Limapuluh Kota Region, West Sumatra, Indonesia,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 347, no. 1, 2019, doi: 10.1088/1755-1315/347/1/012002.
- [55] M. A. Iquebal *et al.*, “Microbiome of Pukzing Cave in India shows high antimicrobial activity against plant and animal pathogens,” *Genomics*, vol. 113, no. 6, pp. 4098–4108, 2021, doi: 10.1016/j.ygeno.2021.10.004.
- [56] J. Martín *et al.*, “Kocurin, the true structure of PM181104, an anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) thiazolyl peptide from the marine-derived bacterium *Kocuria palustris*,” *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 2, pp. 387–398, 2013, doi: 10.3390/md11020387.
- [57] S. Müller *et al.*, “Paenilamicin: Structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *paenibacillus* larvae,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 53, no. 40, pp. 10821–10825, 2014, doi:

10.1002/anie.201404572.

CHAPTER 6

ASSOCIATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE 2 GENE POLYMORPHISM RS4880 WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AMONG IRAQI WOMEN

Luay Q. ABDULHAMEED¹

Mohanad W. Mahdi ALZUBAIDY²

Aseel J. KADIM³

Saja Mohammed MOHSEN⁴

University of Diyala, College of Education for Pure Sciences, Department of biology, Diyala ¹
– Iraq

E-mail: biology.man1986@gmail.com, ORCID No: 0000-0003-3414-4961

University of Diyala, College of Education for Pure Sciences, Department of biology, Diyala ²
– Iraq

E-mail: mohanad@uodiyala.edu.iq, ORCID No: 0000-0002-4609-1265

³ University of Diyala, College of Education for Pure Sciences, Department of biology, Diyala
– Iraq

E-mail: aseel199347@gmail.com, ORCID No: 0000-0001-5246-4411

Middle Technical University, Baquba Technical Institute, Medical laboratory Techniques ⁴
Department, Diyala, Iraq

E-mail: sajamohammad@mtu.edu.iq, ORCID No: 0000-0001-5552-538X

INTRODUCTION

The Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is one of the most common problems women face during their reproductive years. It is characterized by hyperandrogenism, less frequent ovulation in enlarged ovaries including multiple follicular cysts [1]. Characterized Symptoms of PCOS include obesity, irregular cycles, menstrual irregularities, hirsutism, infertility, acne and endocrine abnormalities (including hyperandrogenemia, high LH/FSH ratio, and blood hyperinsulinemia) [2]. PCOS affects 6 to 14 percent of women of childbearing age, 30 to 75 percent of obese women with PCOS, and as many as 28 percent of obese and overweight women with PCOS [3]. Medical studies using ultrasound have found that one in four women has polycystic ovaries, But most of them do not suffer from any other symptoms associated with PCOS syndrome or do not show them [4]. Even though PCOS has been studied for a long times, its etiology and pathophysiology are still largely unknown . inflammatory state, endothelial injury, oxidative stress, and genetic mechanisms all play important role in PCOS [5]. It has been shown that PCOS is associated with oxidative stress Women with PCOS have abnormal levels of circulating markers of oxidative stress, according to Murri and colleagues' meta-analysis. This suggests that oxidative stress may be involved in PCOS' pathophysiology [6]. Oxidative stress is characterized by an imbalance between oxidants and antioxidants and the production of excessive amounts of reactive oxygen species (ROS) [7]. A class of molecules known as antioxidants is capable of reducing free radical damage. It is either enzymatic (superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxide (GPx), and glutathione reductase (GR)) or non-enzymatic (glutathione (GSH), -tocopherol (vitamin E), ascorbate (vitamin C), and -carotene) or both. Female fertility and the pathogenesis of female infertility have been linked to these antioxidants [8,9]. One of the antioxidant is SOD, which catalyzes the conversion of superoxide to elemental oxygen and hydrogen peroxide. Convert of two molecules of superoxide anions into molecular oxygen and hydrogen peroxide[10]. There are three types of SOD is present in humans in three different forms: SOD1 is a dimer consists of two units and present in the cytoplasm, SOD2 and SOD3 are

tetramers (four subunits), SOD2 is present in the mitochondria, and SOD3 is present extracellular. SOD1 and SOD3 are composed of copper and zinc, while SOD2 is composed of manganese in its reactive center [11]. In antioxidant reactions against reactive oxygen species, SOD dismutates the superoxide anion into hydrogen peroxide and is considered the first line of defense against ROS [12]. Regarding the molecular aspect, SOD genes regulation is critical for maintaining in balancing the level of ROS [13]. This is due to the forms of SODs and their control at both expression and activity levels. These enzymes help to prevent the occurrence of oxidative stress, by inhibiting the generation and propagation of endogenous free radicals produced by the cell's metabolism [14]. So, SNPs of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD2, rs4880) have been identified in the coding which affect the net activity of the enzymes [15]. The purpose of this study is to determine the impact of SNP rs4880 of SOD2 in Iraqi women with polycystic ovarian syndrome.

Materials and Methods

Participants

58 PCOS-affected women were enrolled in the study, regardless of their marital status, with group consists of 27 healthy women without any symptoms considered a control group and both group ranged age (28-54) years. This study was conducted at the Maternity Teaching Hospital (Al-Batool) in Baquba City / Diyala Governorate, Iraq, between February and August of 2021 year, according to the study. Informed consent was obtained from each participant after they were informed of the study and given a special questionnaire to collect information. All patients underwent an ultrasound. Patients were diagnosed by obstetric and gynecologist specialists. Blood samples were kept in tubes EDTA and the samples were saved frozen at 20-25C until used for each isolate to extract DNA.

Preparation and extraction of DNA

In accordance with the manufacturer's instructions, total DNA was extracted from 2mL of peripheral blood from each patient using the Relia Prep DNA extraction kit from Promega.

Preparation PCR mixture and PCR Conditions

Using Primer3plus software designed the forward and reverse primers for rs4880, and Macrogen/Korea provided them. The forward primer sequence 5'CCAACGCCTCCTGGTACTTC3' and the reverse: 5'GTGCTTTCTCGTCTTCAGCAC3'. Polymerase chain reactions were performed using thermocycler device (USA). The PCR products were successfully amplified using a reaction mixture consisting of 12.5µL of Go Tag Green Master Mix/ Promega, 1,5 µL of each primer, 6.5 µL of D.W and 3 µL of patient's DNA, with final volume 25 µL. Amplification conditions were for final thermocycling program was as follows: the initial denaturation was single cycle for 95 °C at 7 min , 35 cycles each one includes denaturation at 95 °C for 30s, annealing at 58°C for 30s and extensions at 72 °C for 30s, then final cycle extension at 72 °C for 4 min. The size of PCR product is 215bp.

Statistical analysis

Alleles and genotype frequencies were analyzed using chi-square tests, while Hardy-Weinberg Equation was used to determine the populations studied were in genetic equilibrium from site <https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg>. The calculation of the differences in genotypical and allelic frequency between studied groups was based on WINPEPI Computer program (version 11.63), to calculate Fisher's exact test, calculate the relative risk (RR), Preventive or Etiological fraction (PF or EF) with a 95% confidence interval (CI). $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference [16].

Results

Three genotypes (CC, CT, and TT) and two alleles (C and T) were presented for the rs4880 (C/T; Chromosome6). The genotypes in Iraqi women with PCOS and healthy participants were found to be in agreement with the equilibrium, with no significant differences ($p > 1.120-0.796$) between the observed and expected genotype frequencies (Table 1).

Discussion

According to the results of this study, the SOD2 gene - rs4880 resulted in the emergence of three genotypes (CC, CT, and TT) that correspond to two alleles (Table 1). (C and T). These genetic patterns were found that consistent with the Hardy–Weinberg equation (HWE) in Table2.

Table 1: Numbers and percentage frequencies (observed and expected) of SOD2 gene (rs4880) genotypes and their (HWE) in women with PCOS and control individuals

Groups			CRP gene rs4880 - Genotypes or alleles					H-WX2 P ≤
			CC	CT	TT	C	T	
women with PCOS (No. =58)	Observed	No.	8	22	28	38	78	1.120
		%	13.79	37.93	48.28	67.24		
					32.76			
	Expected	No.	6.22	25.56	26.22	Not estimated		
%		10.72	44.07	45.21				
Controls (No. =27)	Observed	No.	3	15	9	21	33	0.796
		%	11.11	55.56	33.33	38.89	61.11	
	Expected	No.	4.08	12.84	10.08	Not Estimated		
		%	15.11	47.56	37.33			

Using Fisher's exact test, the rs4880 polymorphism analysis showed that frequency of all genotypes was non-significantly higher in the patients group than in the control group. The genotype CC and C allele recorded lower ratio in both the patients (13.79vs 32.76%) and control groups (11.11 vs 38.89% respectively) with Probability Fisher (0.869vs 0.440), making it the least frequent genotype in the Iraqi population. On the other hand, the frequency of TT genotype and T allele (48.28vs 67.24%respectively) was significantly elevated in patients compared to the control group (33.33vs 61.11% respectively) with Probability Fisher (0.202vs 0.440). Depending on the values of RR (1.28, 1.87), both CC, TT genotypes and T allele (1.31) were considered the etiological fraction and associated with PCOS. While, the frequencies of CT genotype was high significant in control compared to patients (55.56vs. 37.93% respectively), with values of RR (0.49). Beside that, CT genotype and C allele (0.77) were considered the Preventive fraction and no associated with PCOS.

Table 2: Statistical analysis of association between genotypes and alleles of SOD2 gene (rs4880) for women with PCOS versus Controls

Type of comparison	Statistical Evaluation			Fisher's Exact Probability	95% Confidence Intervals
	rs4880 Genotype or Allele	Relative Risk (RR)	Preventive or Etiological fraction (PF or EF)		
women with PCOS versus Controls	CC	1.28	21.9%	0.869	0.32-6.41
	CT	0.49	28.4%	0.131	0.19-1.25
	TT	1.87	22.4%	0.202	0.72-4.99
	C	0.77	23.4%	0.440	0.39-1.51
	T	1.31	23.4%	0.440	0.66-2.56

Genetic polymorphisms play an important role in PCOS susceptibility, and they have a significant impact on its clinical manifestations [17]. We found that at 16 sites in mitochondrial targeting sequence (MTS) of the SOD2 precursor, occurring substitution alanine to valine and this produces rs4880 is a single-nucleotide polymorphism (SNP), which has been shown to affect SOD2 activity in mitochondria [18]. Furthermore, this genotypic variability may also be linked to increased risks of diabetes and its complications, cardiovascular diseases, obesity, breast cancer, prostate cancer, and pulmonary arterial hypertension [19]. Results in presented study were consistent with the results [20] demonstrates that the SOD2 rs4880 genetic polymorphism is associated with the risk of PCOS in Chinese women and may be related to endocrine abnormalities of the reproductive axis and the impairment of antioxidant function and thus may contribute to the pathogenesis of PCOS in patients. Other studies indicate that SNP rs4880 is associated with an increased 2-fold-risk of PCOS when TT genotype and T allele are present [21]. Moreover, an association between PCOS and the CC genotype was found in a previous study [20]. This corresponds to our current study results.

Researchers found that genetic variation in genes for antioxidative enzymes and inflammatory pathway mediators not only modifies PCOS risk, but also influences PCOS patients' metabolic characteristics [22]. It has been shown that conformational changes in polymorphism rs4880 can affect the efficiency of transport of SOD2 into mitochondria as well as to alterations in SOD2 structure, Sod2 has also been linked to proinflammatory states and metabolic changes such as levels higher of cholesterol, glucose and leptin [23]. So far, Genetic studies of a large scale improve our understanding of PCOS pathogenesis, and they could identify polymorphisms that could be used as a predictive biomarker for evaluating the risk of developing PCOS and for predicting treatment response in an individual patient [24, 25].

In conclusion, this is the first publication to describe the genotype distribution of the SOD2 rs4880 genetic polymorphism in Iraqi women with polycystic ovarian syndrome and to show related between SOD2 gene rs4880 genotypes and polycystic ovarian syndrome disease.

Acknowledgments

The authors would like to thank the physicians and nurses at the Maternity Teaching Hospital (Al-Batool) for their valuable assistance during this study. The authors also extend their gratitude to all of the women with PCOS who participated in the study and wish them good health in their personal lives.

Ethical approval

The local ethical committee at Council College of Education for Pure Sciences/ the University of Diyala approved the project.

Funding

Neither the public, commercial, nor non-profit sectors provided any funding for this research.

Conflicts of Interest None

REFERENCES

- 1- Hasan, H. A., Selman, M. O., & Jwad, M. A. (2020). Effect of Body Mass Index on Serum CA125 Level in Females with PCOS. *Iraqi Journal of Embryos and Infertility Researches*, 10(1), 101-118.
- 2- Al-Hashimy, D. H., Al-Rikaby, H. R., & Al-Khayaat, E. S. (2019). Study of some hormonal disorders associated with polycystic ovarian syndrome in women in Thi Qar Governorate. *Journal of Education for Pure Science*, 9(2).
- 3- Murri, M., Luque-Ramírez, M., Insenser, M., Ojeda-Ojeda, M., & Escobar-Morreale, H. F. (2013). Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 19(3), 268-288.
- 4- Marbut, M. M., Awwad, N. Y., Yousif, M. N., & Ahmed, M. S. (2019). Hormonal assessment in women with polycystic ovary syndrome in Tikrit city. *Journal of Madenat Alelem University College*, 11(1), 1-9.
- 5- Mohammadi, M. (2019). Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: a brief review. *International journal of preventive medicine*, 10, 86.
- 6- Sulaiman, M. A., Al-Farsi, Y. M., Al-Khaduri, M. M., Saleh, J., & Waly, M. I. (2018). Polycystic ovarian syndrome is linked to increased oxidative stress in Omani women. *International journal of women's health*, 10, 763-771.
- 7- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763: Obtenido de Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative.
- 8- Zuo, T., Zhu, M., & Xu, W. (2016). Roles of oxidative stress in polycystic ovary syndrome and cancers. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

- 9- Sabuncu, T., Vural, H., Harma, M., & Harma, M. (2001). Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease☆. *Clinical biochemistry*, 34(5), 407-413.
- 10- Hadi, Z. K., & Al-Maamori, J. A. I. (2020). Evaluation some oxidants-Enzymatic endogenous antioxidants status among women patients with polycystic ovary syndrome. Paper presented at the AIP Conference Proceedings.
- 11- Seleem, A. K., El Refaeey, A. A., Shaalan, D., Sherbiny, Y., & Badawy, A. (2014). Superoxide dismutase in polycystic ovary syndrome patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(4), 499-504.
- 12- Najah, A., Salman, S. A., Akram, H. M., Ahmed, M. A.-A., Ameer, L. A. A., & Khairi, A. W. A. (2017). Measurement of serum Superoxide dismutase levels in women with polycystic ovarian syndrome and chronic periodontitis. *Journal of Baghdad College of Dentistry*, 29(4), 76-81.
- 13- Miao, L., & Clair, D. K. S. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 344-356.
- 14- Lei, X. G., Zhu, J.-H., Cheng, W.-H., Bao, Y., Ho, Y.-S., Reddi, A. R., . . . Arnér, E. S. (2016). Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiological Reviews*, 96(1), 307-364.
- 15- Hernández-Guerrero, C., Parra-Carriedo, A., Ruiz-de-Santiago, D., Galicia-Castillo, O., Buenrostro-Jáuregui, M., & Díaz-Gutiérrez, C. (2018). Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes CAT and SOD affect the outcome of clinical, biochemical, and anthropometric variables in people with obesity under a dietary intervention. *Genes & nutrition*, 13(1), 1-10.
- 16- Alzubadiy, M. W. M., Almohaidi, A. M. S., Sultan, A. A., & Abdulhameed, L. Q. (2019). Evaluation of E-selectin rs 5367 C/T Polymorphism in Iraqi Diabetic Foot patients. Paper presented at the *Journal of Physics: Conference Series*.

- 17- Branavan, U., Muneeswaran, K., Wijesundera, S., Jayakody, S., Chandrasekharan, V., & Wijeyaratne, C. (2018). Identification of selected genetic polymorphisms in polycystic ovary syndrome in Sri Lankan women using low cost genotyping techniques. *Plos one*, 13(12).
- 18- Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Capanec, C., Pessayre, D., & Degoul, F. (2003). The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics and Genomics*, 13(3), 145-157.
- 19- Lewandowski, Ł., Urbanowicz, I., Kepinska, M., & Milnerowicz, H. (2021). Concentration/activity of superoxide dismutase isozymes and the pro-/antioxidative status, in context of type 2 diabetes and selected single nucleotide polymorphisms (genes: INS, SOD1, SOD2, SOD3)–Preliminary findings. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111396.
- 20- Liu, Q., Liu, H., Bai, H., Huang, W., Zhang, R., Tan, J., . . . Fan, P. (2019). Association of SOD2 A16V and PON2 S311C polymorphisms with polycystic ovary syndrome in Chinese women. *Journal of endocrinological investigation*, 42(8), 909-921.
- 21- Polat, S., & Şimşek, Y. (2020). Five variants of the superoxide dismutase genes in Turkish women with polycystic ovary syndrome. *Free Radical Research*, 54(6), 467-476.
- 22- Herman, R., Jensterle, M., Janež, A., Goričar, K., & Dolžan, V. (2020). Genetic Variability in Antioxidative and Inflammatory Pathways Modifies the Risk for PCOS and Influences Metabolic Profile of the Syndrome. *Metabolites*, 10(11), 439.
- 23- de Oliveira Paludo, F. J., de Bittencourt Pasquali, M. A., de Vargas, A. R., de Oliveira, I. B., Gonçalves, L. V. B., Gelain, D. P., & Moreira, J. C. F. (2021). Influences of the polymorphisms of the Sod2 gene (rs4880) on the motility and vigor of X-and Y-bearing sperm at different pH values. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 111993.

- 24- Sagvekar, P., Dadachanji, R., Patil, K., & Mukherjee, S. (2018). Pathomechanisms of polycystic ovary syndrome: multidimensional approaches. *Front Biosci (Elite Ed)*, 10(3), 384-422.
- 25- Dapas, M., Lin, F. T., Nadkarni, G. N., Sisk, R., Legro, R. S., Urbanek, M., . . . Dunaif, A. (2020). Distinct subtypes of polycystic ovary syndrome with novel genetic associations: An unsupervised, phenotypic clustering analysis. *PLoS medicine*, 17(6), e1003132.

BÖLÜM 7

LATİN AMERİKA ÜLKELERİ'NDE YÜRÜTÜLEN BİYOLOJİK MÜCADELE ÇALIŞMALARI

Biological control studies in Latin American countries

Doç. Dr. Hakan BOZDOĞAN¹

¹ Kırşehir Ahi Evran University, 40100, Kırşehir, Turkey,
E-mail:hakan.bozdogan@ahievran.edu.tr.<https://orcid.org/0000-0002-6836-4383>

1. GİRİŞ

Eklembacaklıların doğal düşmanları ve mikrobiyal kontrol ajanları ile biyolojik mücadele, Latin Amerika ve Karayipler’de 1895 yılından beri uygulanmaktaydı. Inter Amerikan Bilim Akademileri Ağı (IANAS Bölgesel Raporu, 2017) Latin Amerika bölgesinin dünyanın biyolojik çeşitliliği en fazla olan on ülkesinden beşini (Brezilya, Kolombiya, Ekvador, Meksika ve Peru) içeren bir biyolojik çeşitlilik süper gücü olduğunu rapor etmişti. Öyle ki tek başına Güney Amerika; dünyanın biyolojik çeşitliliğinin %40’ından ve ormanlarının dörtte birinden fazlasına, tatlı suyun %30’una ve ekilebilir arazinin yaklaşık yine %30’una ev sahipliği yapıyor ve bu durum da bölgeyi gezegen için bir genetik rezerv ve tedarikçi haline getiriyordu. Tropikal Tarım Araştırma ve Yüksek Öğrenim Merkezi, CATIE 1942’de Kosta Rika’da kurulmuştu. Görev alanı, Amerikan tropiklerindeki tarım ve doğal kaynaklarda araştırma ve eğitimdi. Bugün CATIE, kendini Amerikan tropiklerindeki tarım bilimleri, doğal kaynaklar ve ilgili konularda araştırma yapan, varlığını yükseköğrenim ve sosyal yardıma adanmış, uluslararası, kar amacı gütmeyen bir kurum olarak temsil etmektedir. CATIE’nin Belize, Bolivya, Brezilya, Kolombiya, Kosta Rika, Dominik Cumhuriyeti, El Salvador, Guatemala, Honduras, Meksika, Nikaragua, Panama, Paraguay ve Venezuela olmak üzere 14 üyesi bulunmaktadır. Bir başka ifadeyle CATIE’nin misyonu Latin Amerika ve Karayipler’de sürdürülebilir ve kapsayıcı insan refahını artırmak, kalkınma için eğitim, araştırma ve yeniliği teşvik etmek, tarımın sürdürülebilir yönetimini ve doğal kaynakların korunmasını sağlamaktır. CATIE projeleri aynı zamanda biyokontrol konusunda araştırma ve öğretimi de içermekteydi. Geçtiğimiz 40 yıl boyunca, biyokontrol ajanlarının ithalatı ve salınımı ile ilgili bir dizi yönetmelik geliştirilmiştir. Latin Amerika bölgesindekiler de dahil olmak üzere çoğu ülke, özellikle Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi (SCBD, 2011) tarafından geliştirilen ve uygulanan politikalar olmak üzere bu düzenlemelere uymak zorunda kalacaktı (Van Lenteren ve ark., 2020).

Miconia calvescens (Melastomataceae), Hawaii ve diğer Pasifik adalarının doğal ekosistemleri için çok ciddi bir tehdit olarak kabul edilen istilacı bir ağaçtır. *M. calvescens*' in çiçek salkımları veya yapraklarıyla beslenen dokuz doğal düşman türü biyolojik kontrol ajanları potansiyeli açısından değerlendirilmiş, hedef bitki üzerindeki etkileri, konak özgünlüğü ve biyotik etkileşime karşı kırılganlıkları karşılaştırılmıştır. *M. calvescens*'in üreme yapılarına saldıran otoburlar arasında, Brezilya'dan bir yaban arısı, *Allorhogas* sp. (Hymenoptera: Braconidae) ve Kosta Rika'dan bir çiçek ve meyveyle beslenen güve, *Mompha* sp. (Lepidoptera: Momphidae), çalışılan en umut verici ajanlar olmuştur. Brezilya testere sineği *Atomacera petroa* Smith ise (Hymenoptera: Argidae), değerlendirilen yaprak dökücüler arasında en yüksek potansiyele sahip iki kanatlıydı (Perez ve ark., 2008).

Brezilya

Brezilya, 1960'lı yıllardan bu yana başta eklembacaklılar olmak üzere pek çok diğer canlı gruplarında biyolojik mücadeleyi etkin bir biçimde kullanan ülkelerin başında yer almaktaydı. Öyle ki Brezilya, tarımsal alanlardaki biyolojik kontrolü sağlamada adeta Latin Amerika ülkeleri içerisinde liderlik hedeflemekteydi. Ayrıca söz konusu ülke böcek kontrolünde entomopatojenik mikroorganizmaların kullanılması yönüyle başarılı pek çok biyolojik kontrol vakalarının lokasyonu haline gelmişti. Hatta ülkede, 1960-1970 yılları arasında kamuoyu biyolojik mücadele noktasında bilinçlendirilmeye ve tarımda akılcı olmayan kimyasal kullanımına karşı örgütlenmeye başlanmıştır. Transgenik çeşitliliğin 40 milyon hektardan fazla olduğu Brezilya'da mahsullerdeki pestisitleri azaltmak için biyolojik kontrol uygulaması alternatif bir çözüm olarak pek çok sektöre hizmet etmekteydi (Parra, 2014). Buna ilave olarak Fungal insektisitler (mikoinsektisitler), entegre haşere yönetiminde (IPM) giderek artan rollere sahip olup özellikle Brezilya ve Kolombiya'da piyasaya sunulmaktaydı. Brezilya'da ayrıca Entomopatojenik funguslar 1920'lerde *Penicillium anisopliae*'nin iki tükürük böceği türüne saldırdığı tespit edildiğinden bu yana incelenmekteydi.

Öte yandan *B. bassiana* mantarı, muz biti *Cosmopolites sordidus* (Batista Filho, Leite, Raga ve Sato 1990; Batista Filho, Leite, Raga, Sato ve Oliveira 1995) ve akar *Tetranychus urticae* gibi zararlıların kontrolü için ticarileştirilmişti (Li ve ark., 2010).

1972 yılına gelindiğinde Brezilya’da Brezilya Entomoloji Derneği’nin kurulmasıyla biyolojik mücadele çalışmaları hız kazanmaya başlamıştı. 1976’da ise entegre haşere yönetimi (IPM)’ni içeren farklı alanlar için böceklerin üretilmesi, diğer bir ifade ile zararlı sayısını ekonomik zarar seviyesinin altında tutacak önlemleri bünyesinde barındıran bir dizi programlar geliştirilmişti (Parra ve Coelho 2022).

Şili

Başka bir Latin Amerika ülkesi olan Şili’de tarımsal ekoloji, tozlaşma, biyolojik kontrol ve ayrışma gibi mahsul verimliliğini artıran mevcut organizmaları “kaynak biyotası” olarak değerlendiren uygulamaları yürürlüğe girdirmiş ve bu yönde önemli bir adım niteliğinde araştırma başlatmıştı. Söz konusu çalışmada araştırmacılar endüstriyel tarımın peyzajları ve biyolojik çeşitliliği basitleştirdiğini ve tarımsal üretime katkılarını engellediğini savunmuşlar, gübreler ve pestisitler gibi kimyasal formülasyonların sıklıkla modifiye edilmiş tohumlarla birlikte kullanılabileceğini iddia etmişlerdi. Neotropik zon içerisinde Şili, olağanüstü bir çeşitlilik ve yerli tozlayıcı zenginliğine ev sahipliği yapan ve oldukça endemik biyocoğrafik bölgeleri bünyesinde barındıran bir ülke konumundaydı. Öte yandan Şili Matorral bölgesi benzer şekilde yüksek endemizm ile önemli bir arı türü çeşitliliğine de ev sahipliği yapıyordu (Henríquez-Piskulich ve ark., 2021). Şili’de ayrıca 1970’den beri, *Orgilus obscurator* (Ness) (50.000 ha) ve *Trichogramma nerudai* parazitoitlerinin salımları ile çam sürgün güvesinin (*Rhyacionia buoliana* [Shiff.]) kontrolü için büyük bir büyütme projesi yürütülmeye başlanmıştı. Bunun yanı sıra sera domateslerinde, çeşitli *Encarsia* ve *Eretmocerus* türleri ile beyaz sera sineği (*Trialeurodes vaporariorum* [Westwood]) ve *T. nerudai* ile yaprak avcısı tırtıl *T. absoluta* için biyolojik kontrol programları geliştirilmişti (Bueno ve Lenteren, 2002).

Uruguay

Uruguay'da ise bahçecilik veya yağlı tohum ürünlerinde kimyasal böcek öldürücülerin yerine biyolojik böcek öldürücülerin uygulanmasına dayanan biyolojik kontrol önem kazanmaya başlamıştı. Lage y Cía SA şirketi ile birlikte Ulusal Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne (INIA) dayanan Lecafol, Uruguay'da seralardaki beyazsinek *Trialeurodes vaporariorum*'un (Westwood) kontrolü için *Lecanicillium lecanii* mantarına dayalı olarak formüle edilen ilk biyolojik böcek ilacı olarak kayıtlara geçmişti. 1970-1980'lere gelindiğinde, piretroidleri içeren "üçüncü nesil" böcek öldürücüler Uruguay pazarına sunulmaya başlanmış ancak bu öldürücülerin bazıları yoğun kullanım nedeniyle etkinliğini yitirdiğinden, önceki "nesil" in aktif bileşenlerinin yenilenmesi anlamına geliyordu. Bu nesil, memelilere karşı düşük toksisiteye sahipti, ancak hedef dışı (faydalı) omurgasızlar ve balıklar için geniş etki yelpazesi nedeniyle risk taşıyordu. Yüksek temas aktivitelerinden dolayı lepidopteran larvalarının kontrolünde etkili araçlardı ve DDT'den 100 kat daha aktif moleküllerdi. Aynı şekilde düşük toksisiteleri nedeniyle halk sağlığı ve endüstriyel ortamlar (tahıl ve gıda depolama) için faydalı moleküller halini almışlardı. Bu grubun etkinliği, uzun vadede zararlıların hızlı direnç geliştirmesiyle tehdit edilmişti. Uruguay'da piretroidlerin ilk kaydı 1979'da (fenvalerat) gerçekleşmişti, ardından bunu deltametrin, permetrin ve sipermetrin gibi diğer moleküller bunu izlemişti. Piretroidlerin kullanımı, 1977'de domates yetiştiriciliğinde *Tuta absoluta* (Meyrick) gibi bazı zararlıların kontrolü üzerinde büyük etkilere sahipti (Basso ve Cibils-Stewart 2020). Biyolojik kontrol yöntemleri, Uruguay'da dünyada olup bitenlere ve sentetik kimyasal insektisitlerin etkisine yabancı olmayan bir evrimi izlemişti. Bir anlamda Uruguay, biyolojik haşere kontrol girişimlerinin uygulanmasında Güney Amerika'daki öncü ülkelerin başında yer alıyordu (Basso ve Cibils-Stewart 2020).

2000'li yıllara gelindiğinde Uruguay'da biyolojik mücadelenin yelpazesi belirgin oranda genişletilmişti. Vero ve ark (2002) 2002 yılında yürüttükleri bir çalışmada sağlıklı elmaların yüzeyinden izole edilen iki maya antagonisti *Cryptococcus laurentii* ve *Candida ciferrii*

(suşu 283) ile *Penicillium expansum*'un neden olduğu elmanın mavi küfü kontrol edilmeye çalışılmıştı. Her iki antagonist de 25 °C'de mavi küf oluşumunu %80 oranında azaltmayı başarmıştı. 5 °C'de *ciferrii* hastalık kontrolünün etkinliğini korumayı başarsa da *C. laurentii*, hastalık insidansını yalnızca %50 azaltabilmişti. Ayrıca *C. ciferrii*, *C. laurentii*' den daha düşük konsantrasyonlarda önemli koruma sergilemişti. Uruguay'da yapılan bir başka biyolojik mücadele örneği karıncalarla yürütülmüştü. *Acromyrmex crassispinus* ve *Acromyrmex heyerii*, Uruguay'da bulunan yaprak kesici karıncalardan ikisiydi. Bu karıncalar, Neotropiklerde baskın otçullardı ve tarım-ormancılıkta ekonomik açıdan önemli bir zararlı oluşturarak çok genç bitkilerde ciddi yaprak dökülmelerine neden oluyordu. Yapılan araştırma neticesinde *M. anisopliae* conidia germinasyonu, fipronil ve sulphluramide karşı *B. bassiana*'dan daha hassas bulunmuştu. Kombine uygulamalar, genişletilmiş koşullar altında karınca kontrolü için etkili bulunmuştu. *A. heyeri* ise yuva inhibisyonu için *A. crassispinus*'tan daha etkili olarak saptanmıştı (Corallo ve ark., 2017).

Kosta Rika

Kosta Rika Üniversitesi'nde *Miconia calvescens*'in potansiyel biyolojik kontrol ajanları üzerine araştırmalar 2000 yılında başlamıştı. *M. calvescens* belirli bölgelerde oldukça yaygın olabilse de, Kosta Rika'da genellikle nadirdi ve kapalı gölgelikli ormanlarda yerleşik hale gelmekten aciz görünmekteydi. Elliden fazla böcek türünün bu bitkiyle beslendiği tespit edilmişti, ancak bunların çoğu muhtemelen yeterince konakçıya özgü olmadıkları için daha ileri kapsamlı araştırmalara dahil edilmemişti (Hanson ve ark., 2010).

Dünyanın en kötü tropikal su yabancı otlarının çoğu Neotropiklere özgüydü. Ayrıca, dünyanın bu geniş coğrafyasındaki en agresif sucul yabancı otların çoğu endemikti ve bu nedenle de o bölgedeki biyolojik kontrol ajanlarının araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktaydı.

Sadece 1970'lerin sonlarında bitki patoloğları, klasik biyokontrol ajanları veya mikoherbisitler değerlendirmek ve kullanmak için Neotropiklerdeki sucul yabancı otların mantar patojenlerinin

sporadik koleksiyonlarını başlatmışlar ve su sümbülü ile diğer bitki türlerinin mikobiyotasının yoğun olarak araştırılması yeni olmasına rağmen, şimdiden yeni sayılabilecek bir dizi yeni potansiyel biyokontrol ajanı üretmişlerdi (Barreto ve ark., 2000).

Dominik Cumhuriyeti

Dominik Cumhuriyeti'nden elde edilen Meksikalı kekik (*Lippia graveolens*) uçucu yağının insektisit ve antifungal özellikleri, depolanmış tahılların iki ana zararlısı olan *Sitophilus zeamais* ve *Fusarium verticillioides*'e karşı laboratuvar koşullarında araştırılmıştı. 600 µl/l havadaki kekik esansiyel yağının fümigasyon ile 24 saat *S. zeamais*'a maruz bırakıldıktan sonra önemli bir ölümle sonuçlanmasa da, bu uçucu yağın in vitro olarak güçlü bir asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörü olduğu saptanmıştı. Sonuçlar, kekik esansiyel yağının ve p-simenin, sırasıyla *F. verticillioides* ve *S. zeamais*'e karşı sentetik pestisitlere alternatif olarak kullanılabileceğini göstermekteydi (Peschiutta ve ark., 2016).

Küba

Küba, tarım-gıda sisteminde biyolojik kontrolün önemli bir rol oynadığı ve haşere sorununun ekolojik-sürdürülebilir bir yaklaşımla ele alındığı ender ülkeler arasında yer almaktaydı. Küba'da ayrıca ülke genelinde bulunan 176 Entomofaj ve Entomopatojen (CREE) Üreme Merkezinde ilkel üretim gerçekleştiriliyordu ve pilot tesisler ile araştırma merkezlerindeki tesisler gibi dört endüstriyel üretim tesisi faaliyetliydi. En çok çoğaltılan biyolojik kontrol ajanı parazitoitler *Lixophaga diatraeae* (Townsend) (Diptera: Tachinidae) ve *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) olarak kaydedilmişti (Pérez-Consuegra ve ark., 2018). Küba'da hayata geçirilen ve klasik biyolojik mücadele stratejisinin parçası olan çok sayıda uygulama vardı (Pérez, 2007; Wyckhuys, 2013).

Bunlar, özellikle doğal düşman rezervuarlarının tarım üreticileri tarafından yönetilmesini içeriyordu. Küba'da küçük üreticilerin koruma uygulamaları kapsamındaki rezervuar yönetiminin kökeninin, *Pheidole megacephala* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) türlerinin karınca yuvalarını, başlıca türü olan *C. formicarius*'u kontrol etmek için tatlı

patates tarlalarına götürme geleneğine dayandığı düşünölmekteydi. 1980'lerde, bu geleneğin gözlemlenmesi, bu predatörleri incelemeye olan ilgiyi daha da artırmıştı (Pérez, 2007). Bu predatörlerin, üreticilerin topraklarındaki rezervuarlarından salınması zaman içinde istikrarlı hale gelmişti. 2004 ve 2014 yılları arasında, bu türler her yıl 15.000 hektardan fazla alana salınmaya başlanmıştı (Vázquez ve Pérez, 2016).

Küba'lı çiftçiler, bilim insanları ve planlamacılar, artık mevcut olmayan ithal gıda ve Yeşil Devrim girdilerini telafi etmek için alternatif tarım teknolojisiyle karşılık vermeye başlamışlardı. Biyolojik haşere kontrol uygulamalarıyla ilgili bugüne kadarki Küba deneyiminin gözden geçirilmesi, bir yandan da diğer ölkeler için bir model teşkil edebilecek önemli ilerlemeler kaydedildiğini göstermekteydi. Öte yandan, Küba'nın gerçekten sürdürülebilir bir tarım yaratması için kat edilmesi gereken uzun bir yolu vardı (Rosset, 1997).

Küba'nın tarım sistemi, başlıca ihracat bileşeni olarak şeker kamışı veya mikro çiftliklerde kısmen kendi kendine yeterli olan ya da hiç toprağı olmayan bir kırsal köylü kitlesi ile hakim olan latifundio-minifundio modeline dayanıyordu. Tarımsal üretim büyük ölçüde pestisitlere bağımlı olmasına rağmen, Küba'nın 1930'lara kadar uzanan bir dizi biyolojik kontrol çabası geleneğı vardı. O zamandan beri, şeker kamışı kurdu ve narenciye karasineğinin parazitoitleri biyolojik kontrol ajanları olarak değerlendiriliyordu ve bu dönemde çeşitli enstitülerdeki birçok Küba'lı bilim insanı biyokontrol konusuna gayri resmi bir yaklaşım göstermişti (Nicholls ve ark., 2002).

Narenciye karasineğı, *Aleurocanthus woglumi*, önemli bir narenciye zararlısı olarak 1916'da Küba'da belirmişti. Narenciye karasineğı 1930'da Singapur'dan parazitoit *Eretmocerus serius*'un getirilmesinden sonra biyolojik kontrol altına alınmıştı (Hagen ve Franz 1973). Aynı dönemde, pamuksu yastık ölçeğı *Icerya purchasi*'nin biyolojik kontrolü için *Rodolia cardinalis* ortaya çıkmıştı (Vazquez & Castellanos 1997).

Endemik parazitoid sinek olan *Lixophaga diatraeae*'yi yetiştirmek ve salıvermek için bir program, şeker kamışı sondası

Diatraea sacharalis'in popülasyonlarını düzenlemek için 1930'da başlatılmıştı.

Küba'da geniş bir alanda polikültür benimsenmesinin çarpıcı bir örneği, *Thrips palmi* popülasyonlarının düzenlenmesi için sebze ve sıra ekinlerinde mısır şeritlerinin kullanılmasıydı. Asya kökenli bu böcek zararlısı 1997'de Küba'da ortaya çıkmıştı ve 29.000 tondan fazla yumru kök, tahıl ve sebze kaybına yol açan 20 farklı ürün türüne saldırmıştı (Nicholls ve ark., 2002).

Küba'da kentsel tarım, kent sakinlerinin kendilerini yeni sosyo-ekonomik koşullara adapte etme stratejisi olarak ortaya çıkmıştı. Ancak, kentsel tarımı bir geçim stratejisi olarak benimseyen insanların çoğu çiftçilik deneyiminden yoksundu (Altieri ve ark., 1999). Bu nedenle, acemi kentli çiftçiler, şehirlerinde verimli gıda üretim sistemleri kurmak için kendilerini denemeye ve yenilik yapmaya zorlandıklarını görmüşlerdi. Gıda güvenliğini sağlamak, geliri artırmak ve toprak verimliliğini korumak, deney yapmanın ana esasları arasında yer alıyordu (Nielsen, 2001). Görüşülen Küba'lı kentli çiftçilerin deney yapmaya karar vermelerinin en yaygın nedeni, algılanan bir sorunu çözme ihtiyacıydı. Küba'da gıda güvenliği nadiren bir sorun olarak algılanmaktaydı. Bunun yerine, görüşü alınan kişiler hem tarımsal üretimi hem de yerel olarak mevcut kaynakların kullanımını iyileştirme potansiyelini algılamışlardı. Karşılaştırma, sonuçları değerlendirmek için önemli bir stratejiydi. Küba'daki deneysel süreç veya sonuçların belgelenmesi, Sumberg ve Okali'nin 1997 tarihli bulgularıyla çelişiyor gibi görünüyordu. Yazılı not alan katılımcıların yüksek yüzdesi, Küba'nın kentsel tarımındaki zorunlu belgeleri yansıtmaktaydı (Leitgeb ve ark., 2010).

Arjantin

Akdeniz meyve sineği (Medfly), *Ceratitis capitata* (Wiedemann), Arjantin'deki meyve mahsullerinin başlıca zararlılarından biriydi ve taze meyve ihracatının önündeki bitki sağlığı için adeta bir engel niteliğindedi. Arjantin'in Cuyo olarak bilinen orta-doğu bölgesinde yer alan San Juan Eyaletinde, meyve üretimi yapılan sulanan vadilerde Medfly'ye karşı kontrol stratejileri, Ulusal Meyve

Sineği Kontrol ve Eradikasyon Programı tarafından eyalet hükümeti ve hükümetle ortaklaşa uygulanıyordu. Yine Arjantin’de ekonomik öneme sahip tephritid meyve sineklerinin varlığı, farklı meyve yetiştirme bölgelerinde farklılıklar göstermekteydi. Örneğin, Arjantin’in Cuyo olarak bilinen orta doğu bölgesinde yer alan Mendoza ve San Juan eyaletlerinin ılıman meyve üreten bölgelerindeki iklim koşulları nedeniyle, bitki sağlığına zarar veren tek meyve sineği türü *C. capitata* olmuştu. San Juan’da, ProCEM aracılığıyla, eyalet hükümeti ve üreticilerle ortaklaşa Medfly’ye karşı uygulanan stratejiler, entegre bir SIT (steril böcek tekniği), kültürel ve kimyasal kontrol kullanımına dayanmaktaydı (Suarez ve ark., 2014).

Arjantin’in Santa Fe bölgesinde yapılan bir çalışmada mahsulde bulunan ana örümcek ailelerini belirlemek ve spontan marj florasının kolonizasyon üzerindeki etkisini saptamak için Santa Fe’nin merkezinde iki ardışık soya fasulyesi döngüsünde denemeler yapılmıştı. Numuneler, ağ ve tuzaklar süpürülerek gerçekleştirilmiş ve şu sonuçlara varılmıştı: 1. Oxyopidae, hem kenarlarda hem de soya fasulyesi mahsulünün otsu tabakasında en sık görülen familya iken, alt tabakada Lycosidae; 2. Soya fasulyesi partisindeki kenar şeritleri, mahsulün hava alışkanlıklarına sahip örümcekler tarafından kolonizasyonuna katkıda bulunmuş ve ayrıca barınak görevi gördüklerinden, pestisit uygulamalarının ardından yeniden kolonizasyonu teşvik etmişti. Karasal alışkanlıkların örümcekler üzerindeki etkisi biraz daha düşüktü; 3. Karasal alışkanlıklara sahip örümcek popülasyonlarının dağılımı, doğrudan tohumlanan bir soya fasulyesinde homojendi ve bu predatörler, sahanın her noktasında zararlıları kontrol etmek için daha büyük bir kapasiteye sahipti (Beltramo ve ark., 2006).

SONUÇ

Latin Amerika ile ülkemiz Türkiye arasındaki kültürel, ticareti ve tarımsal ilişkiler her geçen gün artmaktadır. Dünyada istilacı türlerin sayı ve etkilerinin artış göstermesi, yeni doğal düşmanların ithal edilmesi noktasında, tarım çalışanlarının biyolojik mücadeleyi evrensel bir platformda değerlendirmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca çok çeşitli mikroiklim bölgelerinin gözlendiği ülkemizde biyolojik mücadele uygulama yöntemleri latin Amerika ülkeleri ile kısmi olsa da benzerlikler taşımaktadır. Tüm bu gerekçeler dikkate alındığında bu çalışmanın biyolojik mücadele uygulayıcılarına katkı sağlaması öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Badenes-Perez, F. R., Alfaro-Alpizar, M. A., Castillo-Castillo, A., Johnson, M. T., Julien, M. H., Sforza, R., ... & Rector, B. G. (2008). Biological control of *Miconia calvescens* with a suite of insect herbivores from Costa Rica and Brazil. In Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. CAB International, Wallingford, UK., Montpellier, France (pp. 129-132).
- Barreto, R., Charudattan, R., Pomella, A., & Hanada, R. (2000). Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi. *Crop Protection*, 19(8-10), 697-703.
- Basso, C., & Cibils-Stewart, X. (2020). Foundations and developments of pest management in Uruguay: a review of the lessons and challenges. *Agrociencia Uruguay*, 24(2), 1-28.
- Beltramo, J., Bertolaccini, I., & González, A. (2006). Spiders of soybean crops in Santa Fe province, Argentina: influence of surrounding spontaneous vegetation on lot colonization. *Brazilian Journal of Biology*, 66(3), 891-898.
- Bueno, V. H. P., & Van Lenteren, J. C. (2002). The popularity of augmentative biological control in Latin America: history and state of affairs. In Proceedings of the 1st symposium on biological control of Arthropods, Honolulu, Hawaii (pp. 180-184).
- Corallo, B., Tiscornia, S., Galvalisi Carzoglio, U., Lupo Rizzo, S. A. E., & Bettucci Rossi, L. J. (2017). Combined biological and chemical control of Neotropical leaf-cutting ants (*Acromyrmex* spp.) under field conditions. *Trends in Entomology*, 2017, 13, 103-108.
- Hanson, P., Nishida, K., Allen, P., Chacón, E., Reichert, B., Castillo, A., ... & Johnson, T. (2010). Insects that feed on *Miconia calvescens* in Costa Rica. In In: Loope, LL, J.-Y. Meyer, BD Hardesty and CW Smith (eds.), Proceedings of the International Miconia Conference, Keanae, Maui, Hawaii, May 4-7, 2009, Maui Invasive Species Committee and Pacific Cooperative

- Studies Unit, University of Hawaii at Manoa. 12 p. www.hear.org/conferences/miconia2009/proceedings/.
- Henríquez-Piskulich, P. A., Schapheer, C., Vereecken, N. J., & Villagra, C. (2021). Agroecological strategies to safeguard insect pollinators in biodiversity hotspots: Chile as a case study. *Sustainability*, 13(12), 6728.
- Leitgeb, F., Sanz, S. E., & Vogl, C. R. (2010, July). Farmers' experiments in Cuba's urban agriculture. In *Building sustainable rural futures: the added value of systems approaches in times of change and uncertainty*. 9th European IFSA Symposium, Vienna, Austria (pp. 4-7).
- Li, Z., Alves, S. B., Roberts, D. W., Fan, M., Delalibera Jr, I., Tang, J., ... & Rangel, D. E. (2010). Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 20(2), 117-136.
- Nicholls, C. I., Pérez, N., Vasquez, L., & Altieri, M. A. (2002). The development and status of biologically based integrated pest management in Cuba. *Integrated Pest Management Reviews*, 7(1), 1-16.
- Parra, J. R. P. (2014). Biological control in Brazil: an overview. *Scientia Agricola*, 71(5), 420-429.
- Parra, J. R. P., & Coelho, A. (2022). Insect Rearing Techniques for Biological Control Programs, a Component of Sustainable Agriculture in Brazil. *Insects*, 13(1), 105.
- Pérez-Consuegra, N., Mirabal, L., Jiménez, L. C., Kapuscinski, A. R., Locke, K., Fernandez, M., & Nelson, E. (2018). The role of biological control in the sustainability of the Cuban agri-food system. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 6.
- Peschiutta, M. L., Arena, J. S., Ramirez Sanchez, A., Gomez Torres, E., Pizzolitto, R. P., Merlo, C., ... & Zygadlo, J. A. (2016). Effectiveness of Mexican oregano essential oil from the Dominican Republic (*Lippia graveolens*) against maize pests (*Sitophilus zeamais* and *Fusarium verticillioides*).

- Rosset, P. M. (1997). Cuba: ethics, biological control, and crisis. *Agriculture and Human Values*, 14(3), 291-302.
- Suarez, L., Murúa Bruna, A. F., Lara, N., Escobar, J., Tareti, G., Rubio, J. L., ... & Ovruski Alderete, S. M. (2014). Biological control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina: releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in fruit-producing semi-arid areas of San Juan.
- van Lenteren, J. C., Bueno, V. H., Luna, M. G., & Colmenarez, Y. C. (2020). Biological Control in Latin America and the Caribbean: Information Sources, Organizations, Types and Approaches in Biological Control. In *Biological control in Latin America and the Caribbean: its rich history and bright future*. (pp. 1-20). CABI.
- Vero, S., Mondino, P., Burgueno, J., Soubes, M., & Wisniewski, M. (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 91-98.



ISBN: 978-625-8246-06-3