

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

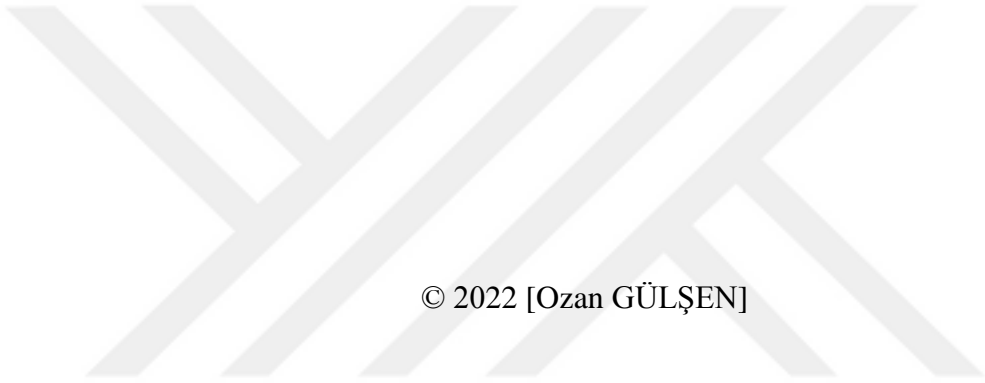
**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI**

**JAPON BALIKLARINDAN (*Carassius auratus*) İZOLE EDİLEN
ADAY PROBİYOTİK MAYA SUŞLARININ İN VİTRO
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ozan GÜLŞEN

**Danışman
Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN**

ISPARTA - 2022



© 2022 [Ozan GÜLŞEN]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Mayaların Balık Gastrointestinal Faunasındaki Varlığı.....	3
2.2. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılabilecek Maya Suşların <i>in vitro</i> Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	6
3.1. Test Bakterisi	6
3.2. Potansiyel Probiyotik Maya Suşları	6
3.3. Aday Probiyotik Mayaların Hidrofobisiteleri.....	6
3.4. Aday Probiyotik Mayaların Safra ve pH Toleranslarının Belirlenmesi.....	6
3.5. Aday Probiyotik Mayaların Patojen Bakterilere Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi.....	7
3.6. Probiyotik Mayaların Patojen Bakteriye Bağlanma Özelliklerinin Tespiti (Adezyon Testi).....	8
4. BULGULAR	9
4.1. Aday Probiyotik Mayaların Hidrofobisite Özellikleri	9
4.2. Aday Probiyotik Mayaların Safra ve pH Toleransları	9
4.3. Aday Probiyotik Maya Suşlarının <i>L. garvieae</i> 'ya Karşı Antimikrobiyal Etkisi. 10	10
4.4. Aday Probiyotik Mayaların <i>L. garvieae</i> 'ya <i>in vitro</i> Ortamda Adezyon Yetenekleri.....	10
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	12
KAYNAKLAR	14
ÖZGEÇMİŞ	18

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JAPON BALIKLARINDAN (*Carassius auratus*) İZOLE EDİLEN ADAY PROBİYOTİK MAYA SUŞLARININ İN VİTRO PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ozan GÜLŞEN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN

Bu tez çalışmasında, japon balıklarının bağırsaklarından izole edilen maya suşları (*Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 ve *Debaryomyces nepalensis* jpn02) *in vitro* probiyotik özellikler açısından taranmıştır. Öncelikle, maya suşlarının hidrofobisiteleri, safra tuzları ve düşük pH şartlarına toleransları belirlenmiştir. Daha sonra, balık maya suşlarının *Lactococcus garvieae*'ya antimikrobiyal etkileri ve adezyon (bağlanma) yetenekleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, her iki maya suşunun, düşük pH (2, 3) ve farklı safra konsantrasyonlarında (%0.6, 1 ve %1.5) hayatta kalabildikleri, hidrofobik özellikte oldukları, *L. garvieae*'ya adezyon yeteneği gösterdikleri saptanmıştır. Bununla birlikte, *L. garvieae*'ya karşı antimikrobiyal etki göstermemişlerdir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda bu maya suşlarının balık yetiştiriciliğinde kullanımları araştırılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus garvieae*, *Debaryomyces nepalensis*, *Cutaneotrichosporon jirovecii*, Probiyotik, Adezyon

2022, 18 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF IN VITRO PROBIOTIC PROPERTIES OF POTENTIAL PROBIOTIC YEAST STRAINS ISOLATED FROM GOLDFISH (*Carassius auratus*)

Ozan GÜLŞEN

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN

In this thesis, yeast strains (*Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 and *Debaryomyces nepalensis* jpn02) isolated from the intestines of goldfish were screened for *in vitro* probiotic properties. Firstly, the hydrophobicity, bile salts and tolerance to low pH conditions of yeast strains were determined. Then, antimicrobial effects and adhesion (binding) abilities to *Lactococcus garvieae* of yeast strains were investigated. As a result of the study, it was determined that both yeast strains were able to survive at low pH (2, 3) and different bile concentrations (0.6, 1% and 1.5%), hydrophobic, and showed adhesion ability to *L. garvieae*. However, they did not show antimicrobial activity against *L. garvieae*. In future studies, the use of these yeast strains in fish farming will be investigated.

Key Words: *Lactococcus garvieae*, *Debaryomyces nepalensis*, *Cutaneotrichosporon jirovecii*, Probiotic, Adhesion

2022, 18 pages

TEŐEKKÖR

Tezimin yűrűtűlmesinde desteęini ve emeęini hiębir zaman esirgemeyen tez danıŐmanım sayın Prof. Dr. Behire IŐıl DİDİNEN'e, mayaların suŐlarının sekans analizindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ertan Emek ONUK'a teŐekkűrlerimi sunarım.

Tezimin her aŐamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ozan GÖLŐEN
ISPARTA, 2022



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. <i>Cutaneotrichosporon jirovecii</i> jpn01 maya suşunun <i>L. garvieae</i> 'ye adezyonu	10
Şekil 4.2. <i>Debaryomyces nepalensis</i> jpn02 maya suşunun <i>L. garvieae</i> 'ye adezyonu	11



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. Aday probiyotik mayaların farklı konsantrasyolardaki safra tuzlarında inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre sayıları (log kob /ml ± SD).....	9
Çizelge 4.2. Aday probiyotik mayaların farklı pH şartlarındaki inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre sayıları(log kob/ml ± SD).....	9



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

pH	Asitlik derecesi
YM Agar	Yeast Mold Agar
°C	Santigrat



1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, sürekli artan dünya nüfusu için sürdürülebilir geçim fırsatları ve gıda güvenliği sağlamada hayati bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, yüksek üretim seviyelerini korumak için su ürünleri uygulamalarının yoğunlaştırılması, suda yaşayan hayvanlarda çevresel stresin artmasına neden olmuştur. Doğrudan bir sonuç olarak, üretimi zayıflatan ve su ürünleri yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğini tehdit eden hastalık salgınları artmıştır. Suda yaşayan organizmaların hastalıklarını kontrol etmek için çok sayıda kimyasal bileşik ve antibiyotik uygulanmıştır. Ancak bu bileşiklerin uygulanması birçok soruna neden olmuştur ve riskleri insan sağlığını dolaylı olarak etkileyebilir. Bu nedenle, daha sağlıklı sucul canlıların yetiştirilmesi için doğa dostu alternatiflerin ve büyüme destekleyicilerin geliştirilmesi önemli ve acil hale gelmiştir (Dawood vd., 2019).

Probiyotik olan mayalar, çoğunlukla sucul canlıların larvaları için taze yem olarak ya da su ürünleri yetiştiriciliğinde yem takviyesi olarak kullanılmıştır (Yun vd., 2021).

Bakteriyel probiyotiklerden daha büyük bir kâr potansiyelinin göstergesi olan mayalar, antibakteriyel bileşiklerden etkilenmez ve çeşitli immün sistemi uyarıcı bileşikler içerdiği bilinmektedir (Caruffo vd., 2015; Banu vd., 2020). Bugüne kadar, iki maya türü, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Debaryomyces hansenii*, yaygın olarak potansiyel probiyotik mayalar olarak kabul edilmektedir (Gatesoupe, 2007; Banu vd., 2020). Balık mikrobiyotasından izole edilen ve probiyotik özellik gösteren diğer maya türleri arasında *Candida deformans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Metschnikowia viticola* ve *Cryptococcus laurentii* bulunmaktadır (Caruffo vd., 2015).

Potansiyel probiyotiklerin gastrointestinal sistemde koloni oluşturabilmesi için pH ve safra toleransları yüksek aynı zamanda bağırsak yüzeylerine yapışma yeteneği olmalıdır (Joborn vd., 1997; Nikoskelainen vd., 2001; Balcazar vd., 2008).

Probiyotik mayaların seçiminde, patojen bakterilere bağlanma kabiliyetinin tespitinde aglütinasyon, adezyon ya da ko-agregasyon testleri kullanılmaktadır. Adezyon testinde, maya hücreleri ve patojen mikroorganizmalar lam üzerinde

birlikte karıştırıldıktan hemen sonra, adezyon olup olmadığı Gram boyama ile teyit edilmektedir (Pérez-Sotelo vd., 2005; García-Hernández vd., 2012). Bir probiyotik suşun patojenik bakterilerle ko-agregasyon yeteneğinin olması, bağırsağın patojenik bakteriler tarafından kolonizasyonunu engelleyebilecek bariyer oluşumunu artırabilmektedir (Kos vd., 2003; Collado vd., 2007; Jankovic vd., 2012). Pizzolitto vd. (2011), mayaların bir mikroorganizmaya bağlanma kapasitesinin, maya suşuna ve ilgili mikroorganizmaya göre değiştiğini göstermiştir. Rubio vd. (2008), 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra *S. cerevisiae* ve etraflarındaki patojenik bakterilerin birlikte oluşturduğu toplulukları kalitatif olarak belirlemiş ve ko-agregasyonun patojenlerin bağırsak epiteline yapışmasını önleyebileceğini ifade etmiştir.

Hidrofobiklik ve oto-agregasyon özellikleri (probiyotik hücreler arasındaki etkileşimi), probiyotiklerin yapışma kapasitesinde ve patojenlerin bağırsakta dışlanmasında rol oynar (Del Re vd., 2000). Hücre yüzeyi hidrofobikliği, oto-agregasyon kabiliyetini dolayısıyla probiyotiklerin epitel hücrelerine ve mukozal yüzeylere yapışma ve kolonizasyon kapasitelerini etkileyebilir (Kos vd., 2003).

Bu tez çalışmasında, tatlı su ve deniz balıklarında görülen laktokokkozis hastalığına neden *Lactococcus garvieae*'ye karşı kullanılabilir potansiyel probiyotik *Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 ve *Debaryomyces nepalensis* jpn02 maya suşlarının *in vitro* olarak patojene antimikrobiyal etkileri ve adezyon yetenekleri, hidrofobisiteleri (bağırsak epitel hücrelerine bağlanma özellikleri), balıkların mide bağırsak boşluğunda hayatta kalabilme kabiliyetlerinin tespiti için safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına toleransları araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Mayaların Balık Gastrointestinal Faunasındaki Varlığı

Mayalar birçok balık türünün solungaç, deri, ağız, dışkı ve bağırsaklarından izole edilebilmektedir. Balık bağırsağındaki maya miktarı değişkendir. Genel olarak bağırsak içeriğindeki maya hücre sayısı 10^7 kob / g'dır (Gatesoupe, 2007).

Yapılan çalışmalarda mayaların, balık mide ve/veya bağırsaklarında 2 familya temsilcisinin bulunduğu tanımlanmıştır. Askomiset ve Basidiyomiset maya ailelerinin farklı türlerinin balık bağırsaklarından izolasyonu mevcuttur. Askomiset mayalarından, *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* ve *Debaryomyces* cinslerinin; Basidiyomiset mayalarından, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* ve *Trichosporon* cinslerinin izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Gatesoupe, 2007).

Metschnikowia zobelii, *Kloeckera apiculata* ve *Debaryomyces sp.* türleri bazı deniz balıklarının (*Tachurus symmetricus* ve *Atherinopsis affinis littoralis*) bağırsak mikroflorasından izole edilmiş ve miktarlarının önemli ölçüde fazla olduğu belirtilmiştir (Navarrete ve Tovar-Ramírez, 2014).

Askomiset: *Debaryomyces hansenii*, *Candida sp.* ve *Saccharomyces cerevisiae*, Basidiyomiset: *Leucosporidium sp.* ve *Rhodotorula glutinis* gökkuşağı alabalığı bağırsaklarından sıklıkla izole edilen baskın maya türleridir (Gatesoupe, 2007).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda Pinheiro vd. (2018), tambatinga balığının (*Colossoma macropomum* × *Piaractus brachypomum*) bağırsaklarında 16 adet *Candida nivariensis* suşu tespit etmişlerdir.

Martínez vd. (2018), gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından *Kazaschtania exigua* maya türünü izole etmişlerdir.

Mandal ve Ghosh (2013), mrigal sazanlarının (*Cirrhinus mrigala*) bağırsaklarından *Pichia kudriavzevii* CM 02 suşunu, rohu balığı (*Labeo rohita*) bağırsaklarından

Candida parapsilosis LR 01 suşunu; nil tilapialarının (*Oreochromis mossambicus*) bağırsaklarından *Candida tropicalis* OM 01 suşunu izole etmişlerdir.

Banerjee ve Ghosh (2014), nil tilapialarının bağırsaklarından yüksek amilolitik ve proteolitik aktiviteye sahip *Candida rugosa* ONF19B maya suşunu izole etmişlerdir. Raggi vd. (2013), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa* maya türlerinin yetiştiriciliği yapılan Atlantik salmonu (*Salmo salar*), gümüş som balığı (*Oncorhynchus kisutch*) ve gökkuşığı alabalıklarının bağırsaklarında baskın olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Mersin balıklarının (*Huso huso*) bağırsaklarından *Candida parapsilosis* izole edilmiştir (Fami Zaghrani vd., 2021).

2.2. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılabilecek Maya Suşlarının *in vitro* Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar

Gökkuşığı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *K. exigua* maya suşlarının düşük pH şartlarına nispeten yüksek tolerans gösterdiklerini saptanmıştır. Bu maya suşları, 90 dakika pH 2'ye maruz kaldıktan sonra hayatta kalabilmişler ve balık yeminden izole edilen maya suşlarına göre düşük pH şartlarına daha toleranslı bulunmuşlardır. İzole edilen bu maya suşları arasında *K. exigua* RC037 ve *K. exigua* RC038, *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlanma (adezyon) özelliği göstermiştir. *K. exigua* RC039 suşu ise *E. coli*'ye bağlanma özelliği göstermiştir. Balık yeminden izole edilen *Debaryomyces hansenii* suşları ise patojenlere bağlanma özelliği göstermemiştir. *K. exigua* RC035 ve *K. exigua* RC037 maya suşları, test edilen tüm patojenleri (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) inhibe edebildikleri için en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi göstermişlerdir (Martínez vd., 2018).

Rubio vd. (2008), laboratuvar ortamında farklı substratlardan (şeker kamışı ve asma) izole edilen mayalar tarafından hücre dışı antimikrobiyal madde üretimi ile *Salmonella* spp., *E. coli* ve *Shigella* spp.'yi inhibe edebildiğini bildirmiştir.

Çeşitli bitki bileşenlerindeki tanenin varlığı, proteazı inhibe etmeleri, ayrıca yemdeki proteinlerle sindirilemeyen kompleksler oluşturarak protein ve kuru madde sindirilebilirliğini engellediği varsayıldığından, balıklar için formüle edilmiş yemlere ilave edilmelerini kısıtlamaktadır (Krogdahl, 1989). Mandal ve Ghosh (2013), omnivor ve herbivor tatlı su balıklarının bağırsaklarından izole ettikleri *Pichia kudriavzevii* CM 02, *Candida parapsilosis* LR 01 ve *Candida tropicalis* OM 01 maya suşlarının yemlerde istenmeyen tanenlerin hidrolize edilmesini sağlayan tannaz enzimi üretimi açısından yüksek aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Tayland'da geleneksel olarak fermente edilen çay yapraklarından izole edilen *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 maya suşunun, pH 2 ve safra tuzlarına karşı toleranslı olduğu, hücre yüzeyi hidrofobitesin yüksek olduğu ve *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ser. thyphimurium* ve *Streptococcus agalactiae* patojenlerine bağlandığı belirlenmiştir (Kanpiengjai vd., 2016; Kanpiengjai vd., 2020).

Yüzey deniz suyundan izole edilen *Debaryomyces hansenii* BCS004 maya suşunun, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulfinicus* ve *P. damsela*'ya *in vitro* antimikrobiyal etki gösterdiği, düşük pH koşullarına ve %10 safra konsantrasyonuna toleranslı olduğu saptanmıştır (Reyes-Becerril vd., 2021).

Deniz sediment örneğinden izole edilen *Kluyveromyces lactis* M3 maya suşu 4.5 ve 5.5. pH şartlarına ve %10 safra konsantrasyonuna toleranslı ve hücre yüzeyi hidrofobitesi yüksek bulunmuştur (Guluarte vd., 2019).

Nil tilapialarının bağırsaklarından izole edilen *Pichia kudriavzevi* ONF7.1C maya suşu %7.5 safra konsantrasyonunda hayatta kalmıştır (Ghosh vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Test Bakterisi

Potensiyel probiyotik mayaların patojen bakteriye adezyon yeteneklerinin tespitinde test bakterisi olarak kullanılan *L. garvieae* suşu daha önceki bir hastalık salgını esnasında gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir. Adezyon testi için kullanılmadan önce derin dondurucudan çıkartılmış ve kültürün saf olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2. Potansiyel Probiyotik Maya Suşları

Bu tez çalışmasında kullanılan maya suşları (*Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 ve *Debaryomyces nepalensis* jpn02) daha önce yapılan bir çalışma esnasında japon balıklarının bağırsaklarından izole edilmiştir. Suşlar izolasyondan sonra -18°C'de gliserin varlığında saklanmıştır.

3.3. Aday Probiyotik Mayaların Hidrofobisitileri

Aday probiyotik mayaların hidrofobisitelerini belirlemek için %0.03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış Yeast Mold (YM) Agarın hazırlanmıştır. Kongo kırmızısı besiyerinin sterilizasyonundan sonra eklenmiştir. Aday probiyotik mayalar kongo kırmızısı ilave edilen YM Agar'a ekilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik) ve beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidropfobik) kabul edilmiştir.

3.4. Aday Probiyotik Mayaların Safra ve pH Toleranslarının Belirlenmesi

Öncelikle, aday probiyotik mayaların 24 saatlik kültürleri (yaklaşık 10^7 kob hücre/ml) hazırlanmıştır. Safra konsantrasyonlarının hazırlanması için, daha önceki çalışmalarda gökkuşağı alabalıklarından alınmış ve -18°C'de saklanmış safra örnekleri kullanılmıştır. Her maya kültüründen 0.5 ml alınarak, 4.5 ml hacmindeki %0 (kontrol), 0.6, 1, 1.5 safra içeren PBS içerisine ekim yapılmıştır. Örnekler 22°C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra, seyreltme plak yöntemiyle Yeast Mold

(YM) Agar' a ekimler yapılmış ve 25°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası maya hücrelerinin sayımı yapılmıştır (Perez-Sanchez vd., 2008).

Aday probiyotik mayaların farklı pH şartlarına toleransının belirlenmesi için farklı pH değerlerine (pH 2, 3, 7.5) sahip PBS içerisinde 10^6 kob/ml olarak hazırlanan maya süspansiyonları 22°C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra seyreltme plak yöntemiyle Yeast Mold (YM) Agar' da maya sayımı yapılmıştır (Perez-Sanchez vd., 2008). İnkübasyon süresi ve sıcaklığı safra toleransının belirlendiği metotta olduğu gibidir.

3.5. Aday Probiyotik Mayaların Patojen Bakterilere Karşı *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi

Aday probiyotik maya suşlarının, *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkilerinin (antimikrobiyal etki) araştırılmasında Çukur Difüzyon Agar testi kullanılmıştır. Bu amaçla;

1. Yeast Mold (YM) Agar'da üretilmiş mayalar Yeast Mold (YM) Broth' a alınarak, 25°C'de 48 saatlik maya kültürleri elde edilmiştir.
2. *L. garvieae* suşu Triptik Soy Broth' a ekilerek 25°C'de 24 saatlik bakteri kültürü elde edilmiştir.
3. Patojen suşun 24 saatlik kültüründen 100 µl alınarak, döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş 100 ml Triptik Soy Agar'a ilave edilmiş ve bakterinin besiyerinde homojen dağılımı için karıştırılmıştır.
4. Patojen bakterinin ilave edildiği besiyerlerinin dökümü yapıldıktan sonra 15 dakika beklenmiş ve besiyeri üzerinde steril Durham tüpleri kullanılarak yaklaşık 3 mm çapında çukurlar açılmıştır.
5. Besiyerleri üzerinde açılan çukurlara, aday probiyotik maya kültürlerinden (sıvı besiyerine ekimi yapılmış 48 saatlik kültürler) 25' er µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
6. İnkübasyon sonrası, çukurların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının ölçümü yapılmıştır (Hjelm vd., 2004).

3.6. Probiyotik Mayaların Patojen Bakteriye Bağlanma Özelliklerinin Tespiti (Adezyon Testi)

Aday probiyotik mayaların patojenlere bağlanma yeteneği aşağıdaki protokole göre yapılmıştır: Lam üzerinde 10 µl aday probiyotik maya süspansiyonu (10^7 kob/ml), 10 µl 24 saat inkübe edilmiş patojen bakteri kültürü (10^9 kob/ml) ile karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden 1 dk sonra karışım lam üzerine yayılmış ve Gram Boyama yapılmıştır. Gram boyama sonucunda mayaların *L. garvieae*' ye adezyonları ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Pérez-Sotelo vd., 2005; García-Hernández vd., 2012).



4. BULGULAR

4.1. Aday Probiyotik Mayaların Hidrofobisite Özellikleri

Aday probiyotik maya suşuna öncelikle hidrofobisite testi yapılmıştır. Bu test sonucunda tüm suşlar pozitif sonuç vermiştir. Böylece bağırsak epitel hücrelerine tutunabilecekleri non spesifik olarak ölçülmüştür.

4.2. Aday Probiyotik Mayaların Safra ve pH Toleransları

Her iki maya suşu safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına toleranslı bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Böylece mide bağırsak boşluğunda hayatta kalabilecekleri ortaya konmuştur.

Çizelge 4.1. Aday probiyotik mayaların farklı konsantrasyonlardaki safra tuzlarında inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre sayıları (log kob /ml ± SD)

Maya suşu	Kontrol	%0.6 safra	%1 safra	%1.5 safra
<i>Cutaneotrichosporon jirovecii</i> jpn01	5.83±0.014 ^b	5.71±0.035 ^{ab}	5.67±0.09 ^a	5.71±0.35 ^{ab}
<i>Debaryomyces nepalensis</i> jpn02	5.23±0.09 ^a	5.43±0.00 ^b	5.16±0.09 ^a	5.14±0.21 ^a

Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

Çizelge 4.2. Aday probiyotik mayaların farklı pH şartlarındaki inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre sayıları(log kob/ml ± SD)

Maya suşu	Kontrol (pH 7)	pH 2	pH 3
<i>Cutaneotrichosporon jirovecii</i> jpn01	5.83±0.014 ^b	5.55±0,169 ^{ab}	5.43±0,049 ^a
<i>Debaryomyces nepalensis</i> jpn02	5.23±0.09	5.43± 0.04	5.31± 0.11

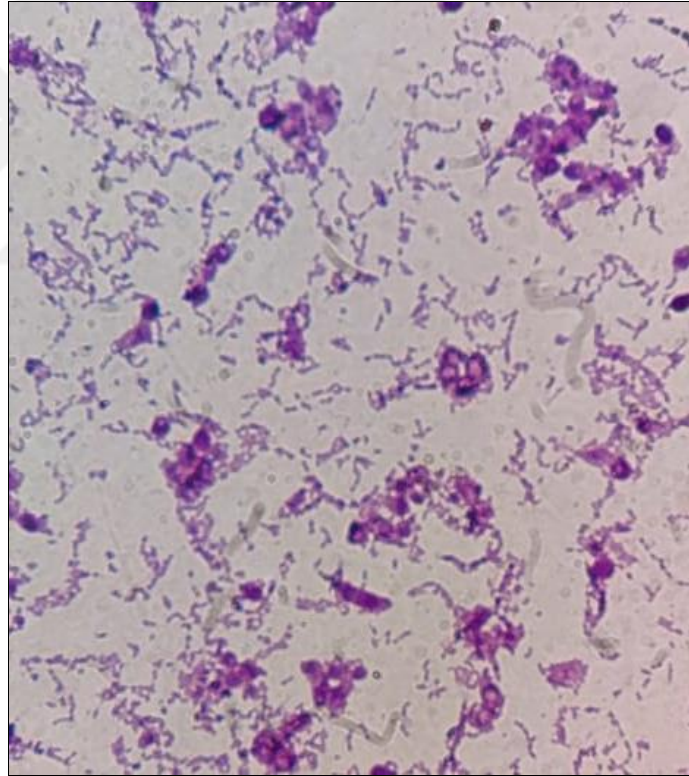
Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

4.3. Aday Probiyotik Maya Suşlarının *L. garvieae*'ya Karşı Antimikrobiyal Etkisi

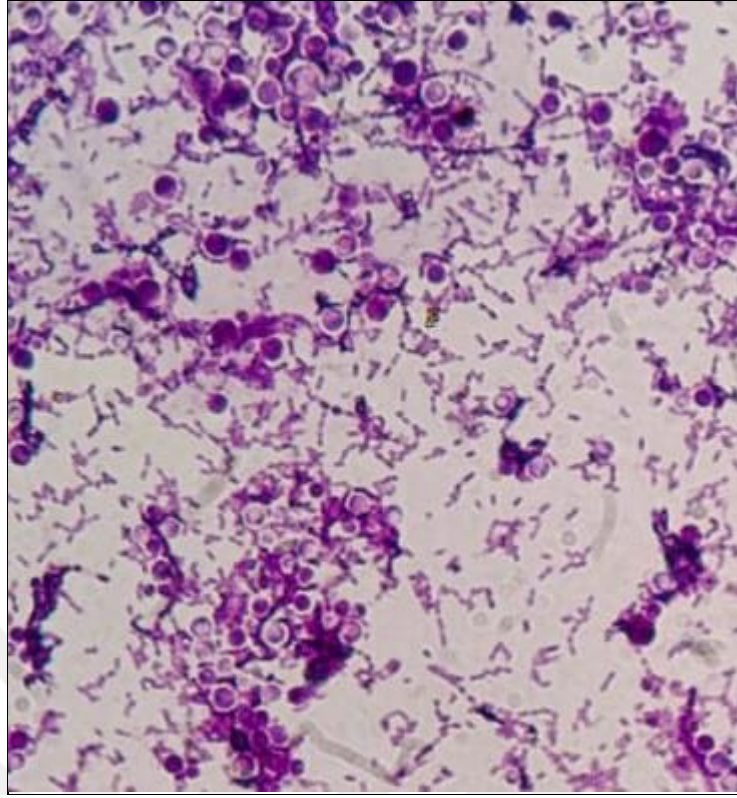
Çukur Difüzyon Agar Testi (*in vitro* antagonizm) sonucunda, aday probiyotik maya suşlarının *L. garvieae*'ye karşı antagonistik (antimikrobiyal) etki göstermedikleri saptanmıştır.

4.4. Aday Probiyotik Mayaların *L. garvieae*'ya *in vitro* Ortamda Adezyon Yetenekleri

Adezyon testi sonucunda maya suşlarının *L. garvieae*'ya *in vitro* ortamda adezyon yeteneği gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. *Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 maya suşunun *L. garvieae*'ye adezyonu



Şekil 4.2. *Debaryomyces nepalensis* jpn02 maya suşunun *L. garvieae*'ye adezyonu

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında japon balıklarının bağırsaklarından izole edilen *Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 ve *Debaryomyces nepalensis* jpn02 maya suşlarının *in vitro* probiyotik özellikleri araştırılmıştır.

Hücre yüzeyi hidrofobikliği, probiyotik mikroorganizmalar arasında profilaktik ve terapötik faydalar sağlayabilecekleri bağırsak epitel hücrelerine tutunmada spesifik olmayan bir etkileşim olarak tanımlanır (Gut vd., 2019; Kanpiengjai vd., 2020). Bağırsak epitel hücre duvarında ve mukozal yüzeylerde kolonizasyon, patojenik bakteri yapışmasını ve yangı reaksiyonları önleyebilir (Kavitha vd., 2018; Kanpiengjai vd., 2020). Bu çalışmada, her iki maya suşunun hidrofobik özellikte olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, deniz sediment örneğinden izole edilen *Kluyveromyces lactis* M3 maya suşunun hücre yüzeyi hidrofobisitesi yüksek bulunmuştur (Guluarte vd., 2019). Tayland'da geleneksel olarak fermente edilen çay yapraklarından izole edilen *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 maya suşunun da hücre yüzeyi hidrofobisitesin yüksek olduğu belirlenmiştir (Kanpiengjai vd., 2020).

Probiyotikler için açıklanan sağlıklı geliştirici özellikler, çoğunlukla iyi bir yapışma ve ardından bağırsak yolunda kolonizasyon ile ilişkilidir (Mohanty vd., 2019). Diğer taraftan, balık safrasına tolerans, karaciğerden gelen safranın salgılandığı balık bağırsağında gelişip, yaşayabilmesi bir probiyotik için çok önemli bir özelliktir (Balcázar vd., 2008). Bu tez çalışmasında probiyotik etkileri araştırılan her iki maya suşun safra tuzlarına toleranslı oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, *Sporidiobolus ruineniae* A45.2, *Debaryomyces hansenii* BCS004, *Kluyveromyces lactis* M3 ve *Pichia kudriavzevi* ONF7.1C maya suşlarının safra tuzlarına toleranslı oldukları bildirilmiştir (Ghosh vd., 2017; Guluarte vd., 2019; Kanpiengjai vd., 2020; Reyes-Becerril vd., 2021).

İyi bir probiyotik maya, gastrointestinal sistem koşullarında başarılı bir şekilde hayatta kalabilmelidir (Kanpiengjai vd., 2020). Çalışmamızda maya suşları düşük pH şartlarına (pH 2 ve 3) toleranslı bulunmuştur. Benzer şekilde, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *Candida tropicalis* ve *Kazaschtania exigua* maya suşlarının düşük pH şartlarına (pH 2 şartlarında 90 dk süreyle

tutulduklarında) yüksek tolerans gösterdikleri bildirilmiştir (Martinez vd., 2018). İlave olarak, Tayland'da geleneksel olarak fermente edilen çay yapraklarından izole edilen *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 maya suşunun pH 2 şartlarına toleranslı olduğu bildirilmiştir (Kanpiengjai vd., 2020). Yüzey deniz suyundan izole edilen *Debaryomyces hansenii* BCS004 maya suşunun da düşük pH şartlarında hayatta kalabildiği not edilmiştir (Reyes- Becerril vd., 2021).

Bir probiyotik suşun patojenik bakterilerle ko-agregasyon yeteneğinin olması, bağırsağın patojenik bakteriler tarafından kolonizasyonunu engelleyebilecek bariyer oluşumunu artırabilmektedir (Kos vd., 2003; Collado vd., 2007; Jankovic vd., 2012). Pizzolitto vd. (2011), mayaların bir mikroorganizmaya bağlanma kapasitesinin, maya suşuna ve ilgili mikroorganizmaya göre değiştiğini göstermiştir. Rubio vd. (2008), 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra *S. cerevisiae* ve etraflarındaki patojenik bakterilerin birlikte oluşturduğu toplulukları kalitatif olarak belirlemiş ve ko-agregasyonun patojenlerin bağırsak epiteline yapışmasını önleyebileceğini ifade etmiştir. Bu çalışmada, heri ki maya suşu da patojen bakteri *L. garvieae*'ye adezyon yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Martinez vd. (2018), gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *K. exigua* RC037 ve *K. exigua* RC038 maya suşlarının *Pseudomonas aeruginosa*'ya; *K. exigua* RC039 maya suşunun *E. coli*'ye bağlanma (adezyon) özelliği gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna karşın aynı araştırmacılar, balık yeminden izole edilen *Debaryomyces hansenii* suşlarının patojenlere bağlanma özelliği göstermediğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte, *Sporidiobolus ruineniae* A45.2 maya suşunun *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ser. *thyphimurium* ve *Streptococcus agalactiae* patojenlerine bağlandığı belirlenmiştir (Kanpiengjai vd., 2016; Kanpiengjai vd., 2020).

Sonuç olarak, japon balıklarının bağırsaklarından izole edilen *Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 ve *Debaryomyces nepalensis* jpn02 maya suşlarının test edilen *in vitro* probiyotik özelliklerin çoğunluğunu sağladığı görülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda bu maya suşlarının balıklar için patojen olup olmadığı araştırılmalıdır. Patojen olmadıkları kanıtlanan maya suş ya da suşlarının farklı tatlı su balık türlerinde gelişim, sağlık ya da bağışıklık parametreleri üzerine etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

- Joborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L. & Kjelle-berg, S. (1997). "Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1", *Journal of Fish Diseases*, 20, 383-392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00316.x>
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G. & Ouwehand, A. (2001). "Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish", *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2430-5. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2430-2435.2001>
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4), 188-191. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>
- Banu, M.R., Akter, S., Islam, M.R., Mondol, M.N. & Hossain, M.A. (2020). Probiotic yeast enhanced growth performance and disease resistance in freshwater catfish gulsa tengra, *Mystus cavasius*. *Aquaculture Reports*, 16, 100237. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100237>
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C.G. & Navarrete, P. (2015). Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in microbiology*, 6, 1093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093>
- Collado, M.C., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007). Interactions between pathogens and lactic acid bacteria: Aggregation and coaggregation abilities. *European Food Research and Technology*, 226, 1065–1073. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093>
- Dawood, M.A., Koshio, S., Abdel-Daim, M.M. & Van Doan, H. (2019). Probiotic application for sustainable aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 907-924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093>
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology*, 31(6), 438-442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
- García-Hernández, Y., Rodríguez, Z., Brandão, L.R., Rosa, C.A., Nicoli, J.R., Iglesias, A.E., Pérez-Sánchez, T., Salabarría, R.B. & Halaihel, N. (2012). Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Research in veterinary science*, 93(2), 798-802. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.09.005>

- Gatesoupe, F.J. (2007). Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*; 267(1-4), 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005>
- Ghosh, K., Banerjee, S., Moon, U.M., Khan, H.A. & Dutta, D. (2017). Evaluation of gut associated extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory microbial community as potential probiotics in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Aquaculture*, 7. 10.5376/ija.2017.07.0023
- Guluarte, C., Reyes-Becerril, M., Gonzalez-Silvera, D., Cuesta, A., Angulo, C. & Esteban, M.Á. (2019). Probiotic properties and fatty acid composition of the yeast *Kluyveromyces lactis* M3. In vivo immunomodulatory activities in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology*, 94, 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.024>
- Gut, A.M., Vasiljevic, T., Yeager, T. & Donkor, O.N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.046>
- Hjelm, M., Bergh, Ø., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorsen, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H. & Gram, L. (2004). Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 360-371.
- Fami Zaghrami, M., Hashemi, M. & Shokohi, T. (2021). Isolation and Molecular Identification of Potential Probiotic Yeasts from the gastrointestinal tract of Beluga Fish. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology*, 11(1), 1471-1478.
- Jankovic, T., Frece, J., Abram, M. & Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research*, 6(1), 17-22.
- Kanpiengjai, A., Chui-Chai, N., Chaikaew, S. & Khanongnuch, C. (2016). Distribution of tannin-tolerant yeasts isolated from Miang, a traditional fermented tea leaf (*Camellia sinensis* var. *assamica*) in northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.044>
- Kanpiengjai, A., Khanongnuch, C., Lumyong, S., Kummasook, A. & Kittibunchakul, S. (2020). Characterization of *Sporidiobolus ruineniae* A45. 2 Cultivated in Tannin Substrate for Use as a Potential Multifunctional Probiotic Yeast in Aquaculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 378. <https://doi.org/10.3390/jof6040378>
- Kavitha, M., Raja, M. & Perumal, P. (2018). Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). *Aquaculture Reports*, 11, 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.07.001>

- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. & Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Krogdahl, A. (1989). *Alternative protein sources from plants contain anti-nutrients affecting digestion in salmonids*. In: *The current status of fish nutrition in aquaculture*. M. Takeda and T. Watanabe (Eds). Proceedings of the Third International, Symposium on Feeding and Nutrition in Fish. Toba, August 28-September 1, University of Fisheries, Tokyo, Japan, pp. 253–261.
- Mandal, S. & Ghosh, K. (2013). Isolation of tannase-producing microbiota from the gastrointestinal tracts of some freshwater fish. *Journal of Applied Ichthyology*, 29(1), 145-153. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.02054.x>
- Martínez, M.P., González Pereyra, M.L., Fernandez Juri, M.G., Poloni, V. & Cavaglieri, L. (2018). Probiotic characteristics and aflatoxin B1 binding ability of *Debaryomyces hansenii* and *Kazaschtania exigua* from rainbow trout environment. *Aquaculture Research*, 49(4), 1588-1597. <https://doi.org/10.1111/are.13614>
- Mohanty, D., Panda, S., Kumar, S. & Ray, P. (2019). In vitro evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM 69 against *Salmonella enterica*. *Microbial pathogenesis*, 126, 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.014>
- Navarrete, P. & Tovar-Ramírez, D. (2014). Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture. In *Sustainable aquaculture techniques*. Intech Open.
- Pérez-Sotelo, L.S., Talavera-Rojas, M., Monroy-Salazar, H.G., Lagunas-Bernabé, S., Cuarón-Ibargüengoytia, J.A., Jimenez, R.M. & Vázquez-Chagoyán, J.C. (2005). In vitro evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. *Rev Latinoam Microbiol*, 47(3-4), 70-75.
- Pizzolitto, R.P., Bueno, D.J., Armando, M.R., Cavaglieri, L., Dalcero, A.M. & Salvano, M.A. (2011). Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: A useful model to determine the most efficient microorganism. In R.G. Guevara-González (Ed.), *Aflatoxins—Biochemistry and molecular biology*, (pp. 323–346). Rijeka, Croatia: InTech
- Pinheiro, R.E.E., Rodrigues, A.M.D., Santos, J.T.D.O., Costa, J.D.A., Pereyra, C.M., Torres, A.M., Rosa, C.A., Santos A.R.O. & Muratori, M.C.S. (2018). Occurrence and diversity of yeast species isolated from fish feed and tambatinga gut. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(4), 837-842.
- Raggi, P., Lopez, P., Diaz, A., Carrasco, D., Silva, A., Velez, A., Opazo, R., Magne, F. & Navarrete, P.A. (2014). *Debaryomyces hansenii* and *Rhodotorula mucilaginosa* comprised the yeast core gut microbiota of wild and reared

carnivorous salmonids, croaker and yellowtail. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2791-2803.

- Reyes- Becerril, M., Angulo, C., Angulo, M. & Esteban, M.Á. (2021). Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 52(6), 2715-2726. <https://doi.org/10.1111/are.15123>
- Rubio, A.M., Hernandez, M.E., Aguirre, A.R. & Poutou, R.P. (2008). In vitro preliminary identification of probiotic properties of *S. cerevisiae* strains. *Revista MVZ Cordoba*, 13, 1157–1169.
- Yun, L., Wang, W., Li, Y., Xie, M., Chen, T., Hu, C., Luo P. & Li, D. (2021). Potential application values of a marine red yeast, *Rhodospiridium sphaerocarpum* YLY01, in aquaculture and tail water treatment assessed by the removal of ammonia nitrogen, the inhibition to *Vibrio* spp., and nutrient composition. *PloS one*, 16(2), e0246841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246841>

ÖZGEÇMİŞ

