

T.C.
KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***TRICHOPHYTON VERRUCOSUM* (BODİN 1902)'NİN FARKLI SUKROZ VE
JELATİN DERİŞİMLERİYLE HAZIRLANMIŞ STABİLİZATÖRLER İLE
LİYOFİLİZASYONU**

SERDAL DURSUN

DANIŞMAN: Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2014

KİLİS

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof.Dr.İsmet HASENEKOĞLU danışmanlığında, Serdal DURSUN tarafından hazırlanan " *Trichophyton verrucosum* (Bodin 1902)'nin farklı sukroz ve jelatin derişimleriyle hazırlanmış stabilizatörler ile liyofilizasyonu " adlı tez çalışması 13/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı, Adı Soyadı (Kurumu)	İmza
Başkan :	Prof.Dr.İsmet HASENEKOĞLU (Kilis 7 Aralık Üniv. Biyoloji ABD)	
Üye :	Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU (Kilis 7 Aralık Üniv. Bit.ve Hay. Ürt.)	
Üye :	Yrd. Doç Dr. Adem İMALI (Kilis 7 Aralık Üniv. Biyoloji ABD)	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2014 tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No :

Doç. Dr. Şükrü ÇAKMAKTEPE

Enstitü Müdür

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***TRICHOPHYTON VERRUCOSUM* (BODIN 1902)'NİN FARKLI SUKROZ VE JELATİN DERİŞİMLERİYLE HAZIRLANMIŞ STABİLİZATÖRLER İLE LİYOFİLİZASYONU**

Serdal DURSUN

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU

YIL: 2014

Sayfa:30

Bu çalışmada *Trichophyton verrucosum* sukroz ve jelatin'in farklı derişimlerde hazırlanmış 5 stabilizatör (A stabilizatörü: Jelatin % 5 - Sukroz %7.5, B stabilizatörü: Jelatin %7.5 - Sukroz % 7.5, C stabilizatörü: Jelatin %10 - Sukroz % 7.5, D stabilizatörü: Jelatin % 5 - Sukroz % 5, E stabilizatörü: Jelatin % 5- Sukroz % 10) ile liyofilizasyon sırasındaki ve sonrasındaki bütün gruplardaki canlılık kayıplarını belirleyerek en iyi stabilizatör seçimi yapılmaya yönelik araştırma yapılmıştır. Bu amaçla Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretim A.Ş. Mantar laboratuvarında *Trichophyton verrucosum* MA yüzeyinde üretilip hazırlanan stabilizatörlerle homojenize edilip mikroskop ve canlılık sayımı yapıldıktan sonra liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası bütün grupların vakum, nem ve sterilite testi yapılmıştır. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımlarına göre % 91.1 ile C stabilizatörü, % 91 ile E stabilizatörü en iyi korumayı gerçekleştirmiştir. Hızlı stabilite testine göre % 35.2, 1. ay canlılık sayımına göre % 85, 3. ay canlılık sayımına göre % 81.5 koruma ile liyofilizasyondan sonra muhafaza süresince en iyi korumayı C stabilizatörü gerçekleştirmiştir. Yapılan bu çalışmada sukroz oranının % 7.5, jelatin oranının % 10 olarak seçilmesinin *Trichophyton verrucosum*'un liyofilizasyonu için en uygun derişim olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Trichophyton verrucosum*, stabilizatör, liyofilizasyon, MA

ABSTRACT

Msc. Thesis

LYOPHILIZATION OF *TRICHOPHYTON VERRUCOSUM* (BODIN 1902) USING STABILIZATORS PREPARED WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SUCROSE AND GELATINE

Serdal DURSUN

Kilis 7 Aralık Universty

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU

Year:2014

Page: 30

The current study was designed to determine the vitality loss in all groups during and after the lyophilization of *Trichophyton verrucosum* using five stabilizers prepared with different concentrations of sucrose and gelatine (A stabilizer: Gelatin 5% - Sucrose 7.5%, B stabilizer: Gelatin 7.5% - Sucrose 7.5%, C stabilizer: Gelatin 10% - Sucrose 7.5%, D stabilizer : Gelatin 5% - Sucrose, 5%, E stabilizer: Gelatin 5% - Sucrose 10%) and then the best stabilizer was ascertained. In this context, The present study was conducted at fungi laboratory at Dollvet Veterinary Vaccine Production and Marketing Company. *Trichophyton verrucosum* was grown in media supplemented with malt agar and homogenized with different stabilizers and then microscobic and vitality countings were followed by lyophilization. After lyophilization, vacuum, moisture and sterility test of all groups were performed. According to the viability countings after lyophilization, the best protection was determined with stabilizer-C (91.1%) and stabilizer-E (91%). According to the fast stability test with 35.2 % protection first month counting with 85,3 % protection and third month counting 81.5% protection after lyophilization, the best protection was determined with stabilizer-C along with storage. In this study, 7.5% of sucrose and 10% of gelatin concentrations were found to be the most suitable for lyophilization of *Trichophyton verrucosum*.

Key words: *Trichophyton verrucosum*, stabilizer, lyophilization, malt agar

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasında öneri ve desteklerinden dolayı danışman hocam Prof. Dr. İsmet HASENEKOĞLU'na

Bu çalışmada laboratuvar imkanlarını kullanmama izin verdiği için Dollvet veteriner Aşı, İlaç, Biyolojik Madde Üretimi Sanayi Ticaret A.Ş. yetkilileri Uzm. Dr. Hüseyin ZENGİN ve Uzm. Dr. Nilay ÜNAL'a

Tez çalışması için gerekli kimyasalları hazırlamada yardımcı olan kimyager Songül ARDA, çalışma sırasında yardım eden kimya müh. Pakize GÜNEŞ ve Dollvet veteriner Aşı, İlaç, Biyolojik Madde Üretimi Sanayi Ticaret A.Ş. mantar laboratuvarı personellerine

Yüksek lisans yaptığım zaman zarfında öneri ve desteklerinden dolayı biyoloji bölümü Arş. Gör. Muhittin KULAK'a

İngilizce makalelerin türkçe çevirisini yapan Ecz. Didem YÜCEL'e

Tez yazımı sırasında önerilerde bulunan biyolog Yusuf AVCIOĞLU ve biyolog İbrahim YAŞAR'a

Okul hayatı ve tez aşamasında maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Serdal DURSUN

Kilis , 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	10
2.1. Materyal.....	10
2.1.1. <i>Trichophyton verrucosum</i> (Bodin) aşI kùltürü.....	10
2.1.2. Kimyasallar.....	10
2.1.3. Laboratuar malzemeleri.....	10
2.2. YÖNTEM.....	12
2.2.1. <i>Trichophyton verrucosum</i> 'un üretimi.....	12
2.2.2. Farklı Derişimlerde Liyostabilizatörlerin Hazırlanması.....	13
2.2.3. Bulk Ürün ile Liyostabilizatörlerin Aynı Oranda Karıştırılması.....	13
2.2.4. Liyofilizasyon Öncesi Mikroskop ve Koloni sayımı.....	13
2.2.5. Liyofilizasyon İşlemi.....	13
2.2.6. Liyofilizasyon Sonrası Canlılık Sayımı.....	14
2.2.7. Liyofilizasyon Sırasındaki Kayıplarının Belirlenmesi.....	15

2.2.8. Hızlı Stabilite Testi.....	15
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
3.1. Vakum testi.....	16
3.2. Sterilite Testi.....	16
3.3. Nem Oranlarını Belirleme.....	16
3.4. Liyofilizasyon Öncesi Mikroskop Ve Canlılık Sayımı.....	17
3.5. Liyofilizasyon Sonrası Canlılık Sayımı.....	18
3.6. Hızlı Stabilite Çalışması.....	18
3.7. Liyofilizasyon Sonrası Gerçek Zamanlı 1. Ay Canlılık Sayımı.....	19
3.8. Liyofilizasyon Sonrası Gerçek Zamanlı 3. Ay Canlılık Sayımı.....	20
4. SONUÇ.....	24
5. KAYNAKLAR	25
6. ÖZ GEÇMİŞ.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

1. Simgeler

ml	Mililitre
%	Yüzde
⁰ C	Santigrat derece

2. Kısaltmalar

Lyf	Liyofilizasyon
CFU	Koloni oluşturan birim
NaCl	Sodyum Klorür

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.4. Liyofilizasyon öncesi mikroskop ve canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.....	17
Çizelge 3.5. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.....	18
Çizelge 3.6. Hızlı stabilite canlılık sayımları ve canlı kalma oranları.....	19
Çizelge 3.7. Liyofilizasyon sonrası gerçek zamanlı 1. ay canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.....	19
Çizelge 3.8. Liyofilizasyon sonrası gerçek zamanlı 3. ay canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.....	20

RESİMLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1. <i>Trichophyton verrucosum</i> MA yüzeyindeki görünümü.....	12
Şekil 2.2.5. Çalışmada kullanılan Liyofilizasyon cihazı.....	14
Şekil 3.3. Nem oranlarını belirlemede kullanılan nem ölçme cihazı.....	17

1.GİRİŞ

Dermatofitler canlılarda deri, saç, kıl ve tüy gibi yapılara yerleşerek canlının bu yapılarında deformasyona sebep olurlar [1-2]. Dermatofit infeksiyonlarına "ringworm" ismi verilmiştir [3].

Uzun zamandır bilinen deri ve üzerindeki yapılara yerleşme eğilimindeki bu hastalığın sebepleri patojenik dermatofitlerdir [4-5].

Dematofitler iklim, hijyen ve coğrafik konum gibi çevresel etkilerin yanı sıra nüfus hareketi ile zamanla değişim gösterebilirler. Türkiyede 1970'lerde en çok gözlenen dermatofitler *Trichophyton verrucosum* ve *Trichophyton rubrum* olduğu belirtilmiştir [6].

Dermatofitler; *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* olmak üzere 3 cinse ayrılır [4-5]. Günümüzde en fazla izole edilen türlerin ise *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes* olduğu belirlenmiştir [7,8-9].

Trichophyton ve *Microsporum*'a ait bir çok tür çiftlik hayvanlarında infeksiyonlara sebep olmaktadır. Sığırlarda *T.verrucosum*, Domuzlarda *Microsporum nanum*, Atlarda *Trichophyton equinum*, *Microsporum gypseum* ve *Microsporum equinum* hastalığa sebep olmaktadır [3-5].

Atlarda Trichophytosis (ringworm) *Trichophyton equinum*'dan dolayı oluşan deride ödem, kılların dökülmesi ve en son olarak kabuk tutarak deriye yerleşen bulaşıcı bir dermatomikozistir [1-11]. Atlarda *Microsporum equinum*, *Trichophyton gypseum* ve *T. mentagrophytes* türleride dermatomikoza sebep olduğu saptanmıştır [12-13].

Trikofitoz sığırlarda, epitel tabakada deri ve kıllara enfekte olan bulaşıcı bir hastalıktır. Bu hastalığın etkeni genellikle *Trichophyton verrucosum*'dur. Fakat *Trichophyton menagrophytes*'in de sığırlarda bazen enfeksiyon oluşturduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton simii* ve *Microsporum gypseum*'un da sığırlarda deri enfeksiyonu oluşturduğu raporlanmıştır [12-14]. Sığırlarda *Tinea annular* deride lezyon oluştururlar [1.3-5].

Domuzlarda dermatofitoz sık görülmeyen bir enfeksiyon çeşididir. Hastalığın görüldüğü zamanlarda ise en sık *Microsporum nanum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in enfeksiyona sebep olduğu gözlemlenmiştir [1-3].

Trichophyton menagrophytes, antropofilik bir mantar olmasına rağmen sığır, at, koyun ve domuzlardada hastalık oluşturur. Bu yüzden zoofiliktir ve yaygın bir şekilde bulaşıcıdır [1-3].

Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, İngiltere, Avusturalya ve Yeni Zellanda da çiftlik hayvanlarındaki dermatofitoz raporlanmıştır [15]. Ülkemizde ise evcil hayvanlarda dermatofitlerin izolasyonu ile ilgili çalışmalar çok az sayıdadır [16-17].

Sığır, at ve domuz gibi çiftlik hayvanlarında enfeksiyon oluşturan dermatofitozun epidemiyolojisine etki eden bir çok farklı etken vardır. Bunlar arasında konakçıya ait faktörler ve çevresel faktörler en önemlileridir [3].

Konakçıyla ilgili faktörlerin başında gelen yaş ve cinsiyet en önemli olan faktörlerdir. Dermatomikozalar en fazla genç çiftlik hayvanlarında enfeksiyon oluşturur [3-18]. Aynı zamanda dermatofitoz prevalansının dişi hayvanlara oranla erkek hayvanlarda daha yüksek olduğu rapor halinde belirtilmiştir [18].

Çevresel faktörlerinde dermatomikozalara etkisi bulunmaktadır. İklimsel faktörler, ortamın durumu, beslenme şekilleri, bulunduğu çiftliğin coğrafik konumu gibi çevresel faktörler çok önemlidir. Nemli ve rutubetli ortamlar, bulunduğu yerin nüfus yoğunluğu ve ışık alıp almaması enfeksiyonun prevalansında değişiklik sağlar [3,12-13-19-20].

Dermatofitler yaşam kaynaklarına göre 3'e ayrılırlar bunlar; Zoofilik, antropofilik ve geofilik'tir. Geofilik grupta bulunan dermatofitler toprağa uyum sağlamışlardır. Hayvanlarda hastalık oluşturan dermatofitler ise zoofilik grupta yer alırlar ve bazen insanlardada bulaşabilirler. En yaygın bulaşma şekli direkt temastır [1,5-17].

Çiftlik hayvanlarındaki dermatomikozaların prevalansında etkili olan faktörler; insan, hayvan ve toprak olduğu belirtilmiştir [17].

Çiftlik hayvanlarında ve insanlarda çok yaygın olarak görülen dermatofitik enfeksiyon zoofilik dermatofitoz olduğu bildirilmiştir. Genellikle zoofilik dermatofitoz çiftlik

hayvanları aracılığıyla bulaşır [20]. En yüksek risk grubunda bulunanlar köylüler, işçiler ve aileleridir [20].

İnsanlarda bulaşma olasılığı en fazla olan kişiler; Çiftçiler, bahçıvanlar, çiftlik hayvanları bakıcıları ve mezbahane işçileridir. Bu kişiler direk veya dolaylı yollarla enfeksiyona yakalanma olasılıkları en yüksek kişilerdir [15].

Çiftçiler toprakla ve çiftlik hayvanlarıyla uğraştıkları için *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Microsporum equinum* ve *Microsporum nanum* türlerinin kendilerinde enfeksiyon oluşturması büyük bir ihtimaldir. Çalışma ortamlarının hijyenik ve steril olmaması dolayısıyla enfeksiyonun oluşması muhtemel olan en yüksek risk grubunda yer alırlar [20-21].

Dermatofitlerin epidemiyolojisinde kalabalık ailelerin bulunduğu toplumlar ve maddi açıdan çok az geliri olduğu için steril ve hijyenik çevre şartlarına sahip olamayan aile fertleri bulunur [20].

Trichophyton verrucosum çiftlik hayvanlarında uzun süreli dermatomikozalara neden olur. Tropikal antifungal ilaçlar kullanımı iyileşmeyi sağlamamaktadır [22]. Evcil hayvanlarda bulunan trikofitozis'de hayvan sahipleri, veterinerler ve direkt veya indirekt olarak bir şekilde bu hayvanlarla temasta bulunanlar içinde enfeksiyona yakalanma olasılığı çok yüksektir [23].

Trikofitozis çiftlik hayvanlarında epitel dokunun kalınlaşarak keratinleşmesine sebep olan ve aynı zamanda kılların dökülmesiyle sonuçlanan dermatofit bir hastalıktır [24]. Trikofitozis saptanan çiftlik hayvanlarında en karakteristik görünüm kalınlaşmış ve kılların döküldüğü keratinize deri bölgeleridir [22].

Canlıları hasta yapma yeteneğindeki mikroorganizmaların zayıflatılarak ya da salgılanan toksik maddelerden arındırılarak sağlıklı canlılara verilerek hastalıktan koruyan biyolojik maddelere aşı denir [25].

Liyofilizasyon aşısı ve diğer biyolojik ürünlerin uzun süre stabil kalması ve depolanması için kullanılan bir yöntemdir [26].

20. yüzyılda liyofilizasyon ilaç, aşı ve endüstriyel alanların dışında gıdaların saklanması amacıyla kullanılmaya başlanmıştır [27].

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte mikroorganizmalar farklı amaçlarla liyofilize edilmektedir. Mikroorganizmaların yanı sıra birçok aşı, enzim, protein, eritrosit ve daha sonra hastalara nakil edilmek için kornea gibi biyolojik metaryaller liyofilize edilmektedir [28, 29-30-31].

Liyofilizasyon işlemi biyolojik materyallerin saklanmasında ve bilimseller araştırmalar için çok büyük kolaylık sağladığı için endüstriyel üretim fabrikalarında ve bilimsel olarak kullanılan bir yöntemdir [32-33].

Kültür koleksiyonlarında ve endüstri alanında kültür kurutma işlemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında uzun süre depolanması için bazı gıda çeşitleri, sperm, eritrosit, plazma, serum'un yanı sıra organ naklinde kullanılmak üzere bazı dokular liyofilize yöntemiyle saklanabilmektedir [34].

Liyofilizasyon işlemi aynı zamanda bazı biyolojik çalışmalar, bitkilerin kurutulması saklanmasında ve hasta dokuların daha sonra incelenmesi için uygulanan bir işlemdir. Geniş yelpazede kullanılan liyofilizasyon işleminin başarısı bu şekilde kanıtlanmaktadır [34].

Liyofilizasyon yöntemi bazı bakteri türlerinde canlılığın uzun süre yüksek oranda kalmasını sağlarken bazı türlerde liyofilizasyonun bakterinin canlı kalmasını da etkili olamadığı saptanmıştır [35-36].

Mikroorganizmaların uzun süre korunmasını sağlayan liyofilizasyon işleminin temel mantığı; sıcaklığın 0 °C'nin altında herhangi bir sıcaklığa getirilerek sublimasyon ile materyal içerisindeki sıvının vakum yardımıyla sıvının direkt olarak gaz haline geçişini sağlayarak materyali kurutma işlemidir. Fakat bütün mikroorganizmalar için aynı oranda başarı yüzdesi yoktur. Bu şekilde korumanın amacı kültürleri uzun süreli saf olarak muhafaza etmektir [34].

Bazı araştırmacılara göre liyofilizasyon işleminin bakterileri koruma yöntemleri içerisinde en iyi yöntemlerden biri olduğu belirtilmiştir [32-33].

Liyofilizasyonun çalışma mekanizması gıda, aşı, bitki ve endüstriyel ürünlerin sıcaklığını 0 °C'nin altına getirip daha sonra sublimasyon işlemi ile su baharını vakumla çekerek kurutma mantığına dayanmaktadır. Liyofilizasyon işlemi sırasında dehidrasyondan dolayı sitoplazma zarında oluşturabileceği zararlardan dolayı bazen çalışma başarısız sonuçlanabilir [37].

Liyofilizasyon sırasında oluşacak zararları azaltmak için farklı şekerler(sukroz, maltoz, laktoz, trehaloz), şeker alkoller(sorbitol, inositol) ve amino asitler(sodyum glutamat) gibi mikroorganizmaların canlılığını stabil tutacak stabilizatörlerde kullanılır [38, 39-40].

Liyofilizasyon işlemini yoğurt bakterileriyle yapan araştırmacılar liyofilizasyon sonrası canlı kalma oranının %100 fakat bekletme süresi uzadıkça canlılık oranının azaldığını rapor etmişlerdir. Bu problem nedeniyle canlılık kaybını en aza indirmek için uygun stabilizatör seçimi üzerine çalışmalar yapmışlardır [41].

Mikroorganizmaların liyofilize edilmesi sonucu canlılıklarının yüksek oranda kalmasında koruyucu maddeler ve kimyasalların yapılan araştırmalar sonucu çok önemli olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar liyofilizasyondan sonra depolama ömrünün daha uzun olması için farklı stabilizerler önermişlerdir [42].

1997 tarihinde Thomas liyofilizasyonda kullanılan koruyucuların içeriğinde bulunan bileşiklerin önemini belirtmiştir [43].

Greaves, liyofilizasyonun stabilitesi üzerinde yaptığı çalışmalara dayanarak stabilite için en uygun şekerin sukroz olduğunu belirtmiştir. Yalnız sukroz oranının %10'u aşmaması gerektiğininide belirtmiştir [44].

Ferry'nin yaptığı çalışmalara göre şeker miktarının %5-%10 arasında bir konsantrasyona sahip olması stabilite için en uygun oran olduğu belirlenmiştir. Liyostabilizatöre ek olarak protein bileşenleri ilave edilince stabilitenin arttığı belirtilmiştir [45].

Proom'un liyofilizasyon için kullandığı jelatin ve metilselülöz mikroorganizmaların liyofilizasyon işlemi sırasında canlı kalma oranını arttırdığını belirtmiştir [46].

Flasdford liyofilizasyon çalışmalarında liyostabilizatör olarak süt proteinleri, plazma ve serum'u kullanmıştır [47].

Liyofilizasyon işlemi sırasındaki mikroorganizmaların ölümünün sebebi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu işlem sırasındaki ölüm oranını azaltmaya yönelik bilim adamlarının çalışmalarındaki vardıkları sonuçlar kendi görüşlerine göre raporlanmıştır. Ama liyofilize çalışması yapan çoğu araştırmacıya göre ölüm oranını azaltmak için yapılacak en doğru şey doğru stabilizatör seçimidir [46-47].

Ringworm (Trichophytosis) *Microsporum* ve *Epidermophyton* 'un insan ve hayvanlarda saç, kıl ve deride oluşturduğu yüzeysel bir enfeksiyondur [48-49].

Trichophytosis sığırlarda ürün kaybı yani et ve deri kalitesinin azalmasına yaptığı etkinin yanı sıra tedavi masrafları ve ithalatın yasaklanmasına sebep olduğu için çok büyük bir problem oluşturmaktadır [50-51].

Hastalığı kontrol altına almak için çiftlik hayvanlarında Ringworm'a karşı veteriner aşıları geliştirilmiş ve uygulanmıştır [52-53]. *Trichophyton verrucosum* türü ile hazırlanan bu aşılardan büyük bir kısmı canlı formdadır ve liyofilize edilmeleri gerekmektedir. Aksi takdirde ömürleri çok kısa olmaktadır. Aşırı uygulayan kişilerde tehlikeli ve virulent forma dönüşme riski bulunmaktadır [53-54].

Rybnikar *Trichophyton verrucosum* canlılığının korunması için liyofilizasyon çalışması yapmıştır. Bu çalışmada *Trichophyton verrucosum* elemanlarının hayatta kalma oranları başlangıç miktarları ile karşılaştırıldığında %27 ile %87 arasında olmuştur (ortalama %54). +4 °C de 6 aylık depolama sonrasında liyofilizasyon sonrası sayım başlangıç sayısı olarak hesaplandığında %100'e yakın bir koruma olduğu saptanmıştır (%98,5). 12. ay sonunda yapılan sayımda ise %90.5 canlılık olduğu belirlenmiştir. Bu sayımlar 2. ve 3. yılda aynı şekilde yapıldığında canlılığın %80 oranında olduğu belirlenmiştir [55].

Liyofilize edilen *Trichophyton verrucosum*'un canlılığının zamanla azalması nem ve liyostabilizatör olarak seçilen süspansiyonlarla alakalı olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [56].

Polonyalı araştırmacı Wawizkiewicz *Trichophyton verrucosum*'un uzun vadeli korunmasını sağlamak için kullanılabilecek en uygun yöntemin liyofilizasyon işlemi olduğunu belirtmiştir [57].

Araştırmacılar *Trichophyton verrucosum*'u malt agar yüzeyinde 14-16 gün arası 28 °C de inokule etmiştir [55].

Malt agar yüzeyinde üreyen *Trichophyton verrucosum* yüzeyden toplanarak fizyolojik tuzlu su ile homojenize edilip daha önce hazırlanan %5 jelatin - %7.5 sukroz oranında hazırlanan liyostabilizatör ile karıştırılmıştır. Hazırlanan bu süspansiyondan alınan bir miktar plaka seyreltme yöntemi ile dilüe edilmiş, mikrokonidyumların sayıları mikroskopik olarak hesaplanmıştır [55-58].

Mikroskopik olarak sayımı yapılan süspansiyondan belirlenen miktarlarda ürün alınarak liyofilizasyon şişelerine doldurulmuştur ve -50 °C'ye kadar soğutulan liyofilizasyon cihazına yerleştirilip 24-48 saat arası vakumlanarak süblimasyon işlemi gerçekteştirilerek liyofilize edilip plastik tıparlarla kapatılıp bazı şişelerin sayımı yapılmıştır ve diğer şişelerde +4°C'de daha sonraki zamanlarda sayılmak üzere muhafaza edilmiştir [55].

Rybnikar'ın çalışmasında liyofilizasyondan sonra belirlenen sayım başlangıç sayısı olarak belirlenip 6, 12, 18, 24 ve 36. aylarda canlılık sayımı yapılmıştır. 6. ayda %98.5, 12. ayda %90.5 ve 2-3. yılda %80 canlı kalma oranları olduğunu belirtmiştir [55-58].

Wawrzkievicz mikrobiyolojik kültürlerin liyofilizasyon işleminin başarılı sonuçlar doğurması için basamakların tek tek doğru yapılmasının yanı sıra doğru liyostabilizatör seçimininde çok büyük katkı sağladığını savunmuştur [57].

Rybnikar liyofilizasyon işleminde en çok kaybın liyofilizasyon esnasında olduğunu belirtmiştir [55].

Buchnicek yaptığı çalışmalara dayanarak *Trichophyton verrucosum*'un depolanma süresince daha fazla miktarda canlı kalması için +4 °C de ve karanlık bir odada saklanmasını önermiştir [59].

Liyofilize *Trichophyton verrucosum* Buchniecek'in verdiği şartlar altında 1 yıl bekletilmiş ve yalnızca %1.5 ile %9.5 arası kayıp gözlenmiştir [55-59].

Rybnikar tarafından liyofilize *Trichophyton verrucosum*'un nem oranının fazla olması sonucu daha fazla canlılık kaybı olduğu belirtilmiştir [55].

Bilim adamları tarafından liyofilize edilen mikroorganizmaların ölüm oranının yüksek çıkması nem oranının fazla olmasına bağlanmıştır [60].

Araştırmacılar nem oranının fazla olmasının yanı sıra sublimasyonun da fazla olması canlılığın azalmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir [61].

Rybnikar yaptığı liyofilizasyon çalışmasında canlılık kaybının nem oranı yada liyostabilizatör seçimi ile ilgili olabileceğini belirtmiştir. Yalnız kesin bir kanıya varmak için daha kapsamlı bir çalışma yapılması gerektiğini savunmuştur [55].

Bosmans, patojenik mantarların liyofilizasyon işlemi için %10 sığır serumu ve %5 sukrozdan oluşan bir karışım önermiştir ve su ile birlikte bactopecton kullanılmasını tavsiye etmiştir [62].

Bosmans, mantar suşlarını canlı tutmak için bir diğer yöntemin katı ortam üzerinde canlı tutmak olduğunu belirtmiştir. Fakat bu teknikte büyük bir iş gücü ve maddi kaynak gerekmektedir. [62].

Rybnikar'ın yaptığı çalışmada (1983) liyofilize *Trichophyton verrucosum* suşları 2 °C ile 6 °C arasında 1 yıl depolanıp canlılık sayımı yapıldığında çok fazla bir kayıp olmadığı anlaşılmıştır ve en çok kayıp %22 olarak belirtilmiştir. Aynı zamanda oda sıcaklığında bekletilen suşlarda daha fazla kayıp olduğu belirtilmiştir. Son olarak ışıklı ve karanlık ortamda aynı şartlar altında bekletilen suşlar arasındaki canlılık sayımı karşılaştırılıp ışıklı ortamda bulunan suşların daha fazla kayıba uğradığı rapor edilmiştir [63].

Liyofilizasyon mikolojide büyük önem taşımaktadır. Liyofilizasyon sayesinde mikroorganizmaların uzun süreli hayati özelliklerini korumasını sağlar. Bu yüzden liyofilizasyon biyoteknolojide önemli bir yere sahiptir ve mikroorganizmaları uzun süreli korumak için en önemli yöntemdir [64].

Rybnikar yaptığı liyofilizasyon çalışmalarında liyofilizasyon sonrası hif, clamidiaconidia ve makroconidialarda azalma olduğunu saptamıştır [65].

Liyofilizasyon sonrası canlılık oranını belirleyen etkenler içinde en önemlileri nem, liyofilizasyon adımları ve liyostabilizatörler içerisindeki kimyasal oranlarıdır [63].

Liyofilize edilmiş mantarların depolanması sırasında canlılık kayıpları olur bunun sebebi nem ve ışıklı ortam olabilir [57,63-64].

Rybnikar'ın yaptığı çalışmada liyofilizasyondan hemen sonra belirlenen başlangıç değerine göre karanlıkta saklanan fungal elamanların hayatta kalma oranlarını suşa bağlı olarak %11,4 ile %74.6 arası olarak ışıklı ortamdakilerin ise %17.2 ile %67.6 arası olarak bulunduğunu belirtmiştir [63].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. *Trichophyton verrucosum* (Bodin) aşısı kültürü

Dollvet Veteriner Aşısı İlaç Biyolojik Madde Üretimi ve Sanayi Ticaret Anonim Şirketi mantar laboratuvarında üretimde kullanılmak üzere bulunan avirulent *Trichophyton verrucosum* aşısı suşu çalışmada ana materyal olarak kullanılmıştır.

2.1.2. Kimyasallar

Malt agar

SDA

Chloramphenicol

Sikloheximide

Thiamin

NaCl

Sukroz

Jelatin

FTM (Fluid Thioglycollate Medium)

SDM (Sıvı Sabaroud Buyyon)

TSB (Tryptic Soy Broth)

2.1.3. Laboratuvar malzemeleri

Liyofilizasyon cihazı (LABCONCO 79480)

Benmari (Huber 77656)

Otoklav (Hiyarama HG_80)

Distile su cihazı (Arium 611VF)

+37 Etüv (Thermo Herathem IGS 100)

+25 etüv (Thermo Herathem IGS 100)

Koloni sayacı (SCAN 100 interscience)

Stereo mikroskop (OLYMPUS 5251)

Işık mikroskobu (OLYMPUS CX21FS1)

+4 (UGUR USS374DTKLYG)

Ph metre (HANNA Hi2211-02)

Manyetik karıştırıcı (Wisestir MSH-20A)

Hassas Terazi (Sartorius GM512-OCE)

Vorteks (DRAGONLAB MX-S)

Blender (Braun 4184)

Pipet tabancası (Ependorf Easypet)

Mikropipet (Ependorf)

Nem ölçer (Sartorius MA 100)

Vakum cihazı (Electro Technic Products, Inc. Bd-10 Av)

Plastik tıpa

Aluminyum kapak

Beher

Mezur

Kapaklı cam şişe

Dilüsyon tüpü

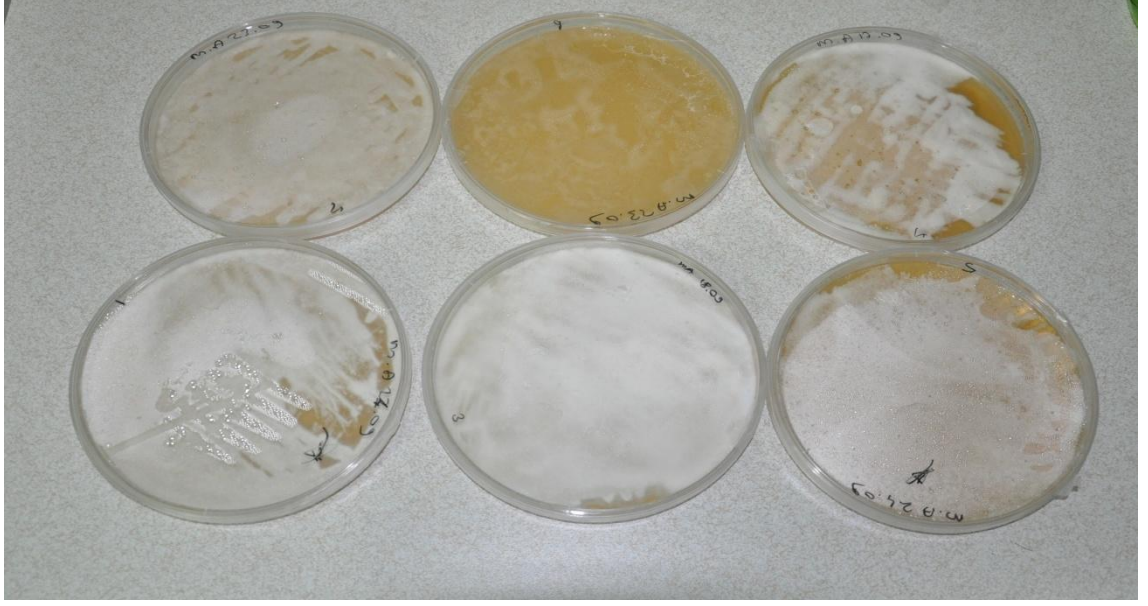
Plastik öze

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Trichophyton verrucosum*'un üretimi

Dollvet Veteriner Aşı, İlaç ,Biyolojik Madde Üretimi Sanayi Ticaret A.Ş. Mantar aşısı üretim laboratuvarında bulunan *Trichophyton verrucosum* suşu açılıp % 0.8 NaCl ile sulandırılıp içerisinde malt agar bulunan 150' lik petrilere pasajlandı. 1.pasaj işlemi yapıldıktan sonra 14-16 gün aralıklarında her petri 10 ml % 0.8 NaCl ile petrilere toplanıp blender yardımıyla homojenize edilip laminar kabin içerisinde steril şartlar altında steril cam spatül veya öze yardımıyla inokulasyon yapılarak pasaj 2 işlemi gerçekleştirildi ve +25 °C de inkubasyona bırakıldı. Bu işlemler basamak basamak pasaj 6'ya kadar gerçekleştirildi. Aynı zamanda pasaj işlemleri yapılırken her pasaj işleminde TSB, SDM ve FTM'ye sterilit kontrol ekimleri yapıldı ve bütün basamaklarda herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır.

Pasaj 6 işlemi yapıldıktan 14 gün sonra +25 °C'de bekletilen petrilere 62 tanesi steril bistüri yardımıyla toplanıp blender'a aktarıldı. her petriye 2ml % 0.8 NaCl denk gelecek şekilde 124 ml % 0.8 NaCl eklenip homojenize edildi. Farklı sukroz ve jelatin derişimlerine sahip 5 liyostabilizatörlerle %50-%50 oranında homojen bir şekilde karıştırılmak üzere kısa bir süre bekletilmiştir.



Şekil 2.2.1. *Trichophyton verrucosum* MA yüzeyindeki görünümü

2.2.2. Farklı Derişimlerde Liyostabilizatörlerin Hazırlanması

Jelatin ve Sukroz kullanılarak farklı oranlarda 5 süspansiyon manyetik karıştırıcıda hazırlanıp otoklav edildikten sonra sterilite kontrol ekimleri yapıp 14. gün sonuna kadar sterilitesinden emin olup kullanılmıştır.

A stabilizatörü: Jelatin % 5 - Sukroz %7.5

B stabilizatörü: Jelatin %7.5 - Sukroz % 7.5

C stabilizatörü: Jelatin %10 - Sukroz % 7.5

D stabilizatörü: Jelatin % 5 - Sukroz % 5

E stabilizatörü: Jelatin % 5- Sukroz % 10

2.2.3. Bulk Ürün ile Liyostabilizatörlerin Aynı Oranda Karıştırılması

Hazırlanan bulk ile farklı oranlardaki stabilizatörler % 50- %50 oranında birbirleriyle karıştırılarak liyofilizasyon işlemine hazır hale getirilmiştir.

2.2.4. Liyofilizasyon Öncesi Mikroskop ve Koloni sayımı

Her grup için yapılan dilüsyon sayesinde mikroskop sayımı ile canlılık sayımları yapıldı ve bütün degerlerin ortalamaları alınıp liyofilizasyon öncesi başlangıç sayısı belirlenmiştir [58-66].

2.2.5. Liyofilizasyon İşlemi

Mikroskop sayımı ve koloni ekimi yapılan Bulk ürün daha önceden hazırlanmış liyofilizasyon tepsisindeki steril 10r şişelere 1' er ml olacak şekilde pipet tabancası yardımıyla aktarılıp ağızları plastik tıpa ile hava alacak şekilde yarım olarak kapatılmıştır. Bu işlem bütün gruplar için aynı şekilde gerçekleştirilip aynı şartlar altında ve aynı zamanda liyofilizasyon cihazına yerleştirildi.

Liyofilizasyon cihazı ilk başta manuel programda -34 °C sıcaklığına getirilir şişeler cihaza yerleştirildikten sonra otomatik program çalıştırılır. Otomatik bölümde 2 program bulunmaktadır.

Liyofilizasyon işlemi 2 program ve toplamda 7 basamakta gerçekleştirildi en son basamak sona erdikten sonra tepsilerin altındaki yastık şişirilerek vakum altında şişelerin ağız kısmındaki plastik tıplar kapatıldı ve liyofilizasyon işlemi bitirildi. Daha sonra liyofilize şişelerden bir kısmı liyofilizasyon sonrası sayım, vakum ölçüm, nem ölçüm ve hızlı stabilite testi yapılması için ayrıldı, geri kalan şişeler ise +4 °C de muhafaza edildi.



Şekil 2.2.5. Çalışmada kullanılan Liyofilizasyon cihazı

2.2.6. Liyofilizasyon Sonrası Canlılık Sayımı

Liyofilize edilen beş farklı gruptan 2' şer şişe seçilerek dilüsyon işlemi yapıp SDA lara koloni ekimi yapıldı ve 8 gün +25 °C'de bekletildikten sonra petri ler koloni sayım cihazında sayılarak liyofilizasyon sonrası canlılık sayıları belirlenmiştir [58].

2.2.7. Liyofilizasyon Sırasındaki Kayıpların Belirlenmesi

Liyofilize edilen 5 grubunda liyofilizasyon öncesi ve sonrası canlılık sayımları belirlendi. Belirlenen sayımlara göre liyofilizasyon sırasındaki çevresel şartlara en fazla dayanıklı grup belirlendi. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayıları 1. ay, 3. ay ve hızlı

stabilite testlerinde zamanla kayıp oranlarını belirlemek için başlangıç sayısı olarak seçilmiştir.

2.2.8. Hızlı Stabilite Testi

Liyofilizasyon çalışması yapan bilim adamları liyofilize ürünlerin +37 °C de 1 hafta bekletilip canlılık sayımı yapılmasıyla gerçek zamanlı 1 yıl sonunda yapılan sayım eşdeğer sonuç verdiğini belirtmişlerdir [67].

Bu çalışmalara dayanarak her gruptan 2' şer örnek +37 °C de 1 hafta bekletilip dilüsyon yöntemi ile canlılık sayımı yapılarak liyofilizasyondan sonraki değerler başlangıç değerleri olarak belirlenip 1 yıllık saklama sonucu en az ve en fazla kayıp veren gruplar belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Trichophyton verrucosum sukroz ve jelatinin farklı oranlarda hazırlandığı 5 farklı stabilizatörler ile liyofilizasyonu yapıldı. Liyofilizasyon sonrası hangi stabilizatörün canlılığa daha fazla katkısı olduğunu bulmak ve en iyi stabilizatörün neden daha iyi koruma yaptığı üzerine bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Liyofilizasyon sonrası her gruptan şişeler alınarak vakum, nem ve sterilite testleri yapıldı. Ayrıca liyofilizasyon sonrası canlılık sayımı, hızlı stabilite testi, gerçek zamanlı 1. ay canlılık sayımı ve gerçek zamanlı 3. ay canlılık sayımı yapılarak kayıp oranları belirlenmiştir.

3.1. Vakum testi

Liyofilizasyon sonrası bütün gruplardan örnek alınarak saklama sırasında canlılığı korumaya katkısı bulunan vakum varlığını tespit için vakum testi yapılmıştır. Bütün gruplarda vakum % 100 olarak belirlenmiştir.

3.2. Sterilite Testi

Bütün gruplardan alınan örneklerle TSB, SDM, FTM den oluşan sterilite takımlarına ekim yapıldı ve herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı test edildi. Beş grubun hiç birinde herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır.

3.3. Nem Oranlarını Belirleme

Bütün gruplardan liyofilize şişeler alınıp nem ölçme cihazında ayrı ayrı bütün grupların nem oranları belirlenmiştir.

A grubu: % 6.11

B grubu: % 5.32

C grubu: % 5.03

D grubu: % 7.91

E grubu: % 5.88



Şekil 3.3. Nem oranlarını belirlemede kullanılan nem ölçme cihazı

3.4. Liyofilizasyon Öncesi Mikroskop Ve Canlılık Sayımı

Liyofilizasyon öncesinde şişelere eklenecek miktarı belirlemek için mikroskop sayımı, liyofilizasyon sırasındaki kayıpları belirlemek içinde canlılık sayımı yapıldı. Bütün sayımların ortalamaları alınıp beş grup için ortalama bir değer belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Liyofilizasyon öncesi mikroskop ve canlılık sayımı ve canlı kalma oranları

	A	B	C	D	E
Lyf öncesi mikroskop sayımı	253.5×10^6 CFU/şişe	253.5×10^6 CFU/şişe	253.5×10^6 CFU/şişe	253.5×10^6 CFU/şişe	253.5×10^6 CFU/şişe
Lyf Öncesi Canlılık Sayımı	436×10^6 CFU/şişe	436×10^6 CFU/şişe	436×10^6 CFU/şişe	436×10^6 CFU/şişe	436×10^6 CFU/şişe

Çizelge 3.4. te belirtildiği gibi liyofilizasyon öncesi mikroskop sayımı bütün gruplar için ortalama 253.5×10^6 CFU/şişe, canlılık sayımı ise 436×10^6 CFU/şişe olarak bulunmuştur.

3.5. Liyofilizasyon Sonrası Canlılık Sayımı

Liyofilizasyondan sonra liyofilizasyon sırasındaki kayıpları belirlemek için canlılık sayımı yapıp stabilizatörlerin strese karşı *Trichophyton verrucosum*'u koruma yetenekleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.

	A	B	C	D	E
Lyf öncesi canlılık sayımı	436x10 ⁶ CFU/şişe	436x10 ⁶ CFU/şişe	436x10 ⁶ CFU/şişe	436x10 ⁶ CFU/şişe	436x10 ⁶ CFU/şişe
Lyf sonrası canlılık sayımı	365x10 ⁶ CFU/şişe	372x10 ⁶ CFU/şişe	397.5x10 ⁶ CFU/şişe	253x10 ⁶ CFU/şişe	397x10 ⁶ CFU/şişe
Lyf sonrası canlı kalma oranları	%83.7	%85.2	%91.1	%58	%91

Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımları, hızlı stabilite, gerçek zamanlı 1. ay sayımı ve gerçek zamanlı 3. ay sayımları için başlangıç sayıları olarak kabul edildi. Daha sonraki sayımlarda canlılık kaybı oranları hesaplanırken liyofilizasyon sonrası değerler göz önünde bulundurulmuştur.

3.6. Hızlı Stabilite Çalışması

Her gruptan 2'şer örnek 1 hafta +37 °C de bekletildikten sonra dilüsyon yöntemine göre sulandırılıp koloni ekimi yapıldı. 8 gün sonra koloni sayım cihazında koloniler sayılarak canlılık değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Hızlı stabilite canlılık sayımları ve canlı kalma oranları

Hızlı stabilite	A	B	C	D	E
Lyf sonrası canlılık sayımı	365x10 ⁶ CFU/şişe	372x10 ⁶ CFU/şişe	397.5x10 ⁶ CFU/şişe	253x10 ⁶ CFU/şişe	397x10 ⁶ CFU/şişe
Hızlı stabilite canlılık sayımları	47.3x10 ⁶ CFU/şişe	102x10 ⁶ CFU/şişe	140x10 ⁶ CFU/şişe	38.1x10 ⁶ CFU/şişe	71.5x10 ⁶ CFU/şişe
Hızlı stabilite Canlı kalma oranları	%12.9	%27.4	%35.2	%15	%18

Hızlı stabilite testine göre en iyi korumayı % 35.2 ile C grubu, en kötü korumayı ise % 12.9 ile A grubu gerçekleştirmiştir.

3.7. Liyofilizasyon Sonrası Gerçek Zamanlı 1. Ay Canlılık Sayımı

Liyofilizasyon sonrası canlılık sayıları belirlenen ve bu sayılar hesaplamalar için başlangıç değeri olarak kabul edilen +4 °C de saklanan liyofileze şişelerin canlılık sayımı yapılmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Liyofilizasyon sonrası gerçek zamanlı 1. ay canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.

	A	B	C	D	E
Lyf sonrası canlılık sayımı	365x10 ⁶ CFU/şişe	372x10 ⁶ CFU/şişe	397.5x10 ⁶ CFU/şişe	253x10 ⁶ CFU/şişe	397x10 ⁶ CFU/şişe
1. Ay gerçek zamanlı canlılık sayımı	280x10 ⁶ CFU/şişe	301x10 ⁶ CFU/şişe	340x10 ⁶ CFU/şişe	192x10 ⁶ CFU/şişe	310x10 ⁶ CFU/şişe
1. Ay gerçek zamanlı Canlı kalma oranı	%76.7	%80.9	%85	%75.8	%78

1. ay sonunda en iyi korumayı % 85 ile C grubu en kötü korumayı ise Jelatin oranı % 5 olan A, D ve E grubu stabilizatörler gerçekleştirmiştir.

3.8. Liyofilizasyon Sonrası Gerçek Zamanlı 3. Ay Canlılık Sayımı

Liyofilizasyon Sonrası Gerçek Zamanlı 1. Ay Canlılık Sayımında yapılan işlemler basamak basamak tekrar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Liyofilizasyon sonrası gerçek zamanlı 3. ay canlılık sayımı ve canlı kalma oranları.

	A	B	C	D	E
Lyf sonrası canlılık sayımı	365x10 ⁶ CFU/şişe	372x10 ⁶ CFU/şişe	397.5x10 ⁶ CFU/şişe	253x10 ⁶ CFU/şişe	397x10 ⁶ CFU/şişe
3. Ay gerçek zamanlı canlılık sayımı	259 x10 ⁶ CFU/şişe	282.5x10 ⁶ CFU/şişe	324x10 ⁶ CFU/şişe	175x10 ⁶ CFU/şişe	290x10 ⁶ CFU/şişe
3. Ay gerçek zamanlı Canlı kalma oranı	%70.9	%75.9	%81.5	%69.1	%73.4

3. ay gerçek zamanlı canlılık sayımında en iyi korumayı % 81.5 ile C grubu gerçekleştirmiştir.

Rybnikar 1980 yılında *Trichophyton verrucosum*'canlılığının korunması için liyofilizasyon çalışması yapmıştır. Bu çalışmada *Trichophyton verrucosum* elemanlarının hayatta kalma oranları başlangıç miktarları ile karşılaştırıldığında %27 ile %87 arasında olmuştur (ortalama %54). +4 °C de 6 aylık depolama sonrasında liyofilizasyon sonrası sayım başlangıç sayısı olarak hesaplandığında %100'e yakın bir koruma olduğu saptanmıştır(%98.5). 12. ay sonunda yapılan sayımda ise %90.5 canlılık olduğu belirtilmiştir.Bu sayımlar2. ve 3. yılda aynı şekilde yapıldığında canlılığın %80 olduğu belirlenmiştir [55].

Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımları başlangıç miktarı olarak belirlenen grupların depolanma süresince canlı kalma oranlarını belirlemek amacı ile hızlı stabilite, 1. ay ve 3.ay canlılık sayımları yapılmıştır.

Liyofilizasyon çalışması yapan bilim adamları liyofilize ürünlerin +37 °C de 1 hafta bekletilip canlılık sayımı yapılmasıyla gerçek zamanlı 1 yıl sonunda yapılan sayımın eşdeğer sonuç verdiğini belirtilmiştir [67].

+37 °C de 7 gün bekletilen liyofilize şişe gruplarının canlılık sayımı yapılarak *Trichophyton verrucosum*'un 1 yıl sonunda canlı kalabilme oranları hesaplanmıştır. Hızlı stabilite testine göre;

A grubu 47.3×10^6 CFU/şişe oranı ile % 12.9, B grubu 102×10^6 CFU/şişe oranı ile %27.4, C grubu 140×10^6 CFU/şişe oranı ile %35.2, D grubu 38.1×10^6 CFU/şişe oranı ile %15, E grubu 71.5×10^6 CFU/şişe oranı ile %18 oranında koruma yaptığı belirlenmiştir.

+4 °C de 1 ay boyunca muhafaza edilen liyofilize ürünlerin canlılık sayımları yapıldı.

1. ay canlılık sayımlarına göre;

A grubu 280×10^6 CFU/şişe ile %76.7, B grubu 301×10^6 CFU/şişe ile %80.9, C grubu 340×10^6 CFU/şişe ile %85, D grubu 192×10^6 CFU/şişe ile %75.8, E grubu 310×10^6 CFU/şişe ile %78 oranında koruma yaptığı belirlenmiştir.

+4 °C de 3 ay boyunca muhafaza edilen liyofilize ürünlerin canlılık sayımları yapıldı.

3. ay canlılık sayımlarına göre;

A grubu 259×10^6 CFU/şişe ile %70.9, B grubu 282.5×10^6 CFU/şişe ile %75.9, C grubu 324×10^6 CFU/şişe ile %81.5, D grubu 175×10^6 CFU/şişe ile %69.1, E grubu 290×10^6 CFU/şişe ile %73.4 oranında koruma yaptığı belirlenmiştir.

Uzun süreli liyofilize *Trichophyton verrucosum*'un depolama süresince canlılık kayıplarını belirlemeye yönelik yapılan hızlı stabilite, 1. ay ve 3. ay canlılık sayımlarının sonuçlarına göre en iyi korumayı C grubu stabilizatör gerçekleştirmiştir.

Rybnikarın yaptığı çalışma baz alınarak gerçekleştirilen bu çalışmada liyofilizasyon stresine en dayanıklı grup C ve E grubu olurken en dayanıksız D grubu olarak belirlendi. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımları başlangıç değerleri olarak hesaplandığında uzun süreli depolamaya en uygun stabilizatör grubunun da yine C grubu olduğu belirlenmiştir.

Liyofilizasyon üzerine çalışmalar yapan araştırmacıların vardığı sonuca göre stabilizatör içerisindeki sukroz miktarının % 5 ile % 10 arasında olması en uygun şeker konsantrasyonu olduğunu belirtmişlerdir [45-69].

Liyofilizasyon sırasında sukroz oranı % 5 olan D grubunda bulunan *Trichophyton verrucosum*'un Sukroz oranları % 7.5 ile % 10 olan diğer gruplara göre hayatta kalma kabiliyetinin daha az olduğu saptanmıştır. Bu sayımlara bakılarak Sukroz oranının düşük olması hayatta kalma kabiliyetini azaltığına kanaat edilmiş ve daha önceki çalışmalara paralel bir sonuç vermiştir.

Hızlı stabilite, 1. ay ve 3. ay canlılık sayım sonuçlarına bakarak Jelatin oranı % 10 ile % 7.5 olan grupların Jelatin oranı % 5 olan gruplara göre liyofilizasyondan sonra uzun süreli saklama koşulları için daha uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Liyofilize edilen *Trichophyton verrucosum*'un canlılığının zamanla azalması nem ve liyostabilizatör olarak seçilen süspansiyonlarla alakalı olabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [56].

Hutton ve arkadaşları nem oranının fazla olmasının yanı sıra kurutmanında fazla olması canlılığın azalmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir [61].

Rybnikar 'ın araştırmalarına göre nemin liyofilizasyon sonrası canlılık üzerine büyük etkisi olduğu belirtilmiştir [63].

Liyofilize ürünlerin nem oranları ve canlılık sayımları hesaplandığında Rybnikar ve Hutton'un yaptığı çalışmalara paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Buchnicek yaptığı çalışmalara dayanarak *Trichophyton verrucosum*'un depolanma süresince daha fazla miktarda canlı kalması için +4 °C de ve karanlık bir odada saklanmasını önermiştir [59].

Buchnicek bütün liyofilize *Trichophyton verrucosum* şişelerini +4 °C de ve karanlık ortamda saklamıştır. Karanlık ortam ile ışıklı ortam ve +4 °C ile oda sıcaklığı arasındaki canlılık kaybı farkları üzerine herhangi bir çalışma yapmamıştır [59].

Wawrzkievicz mikrobiyolojik kùltürlerin liyofilizasyon işleminin başarılı sonuçlar doğurması için aşamaların tek tek doğru yapılmasının yanı sıra doğru liyostabilizatör seçimininde çok büyük katkı sağladığını belirtmiştir [57].

Wawrzkievicz liyofilizasyon işleminde başarılı sonuçlar elde edilmesi için bütün basamakların sırasıyla doğru yapılması ve liyostabilizatör seçimlerinin iyi yapılması gerekmektedir [57].

Stabilizatör seçimleri Rybnikar'ın çalışmasında kullandığı %5 jelatin - %7.5 sukroz dan oluşan süspansiyon ve bu süspansiyonun 4 farklı türevi daha kullanılarak liyofilizasyon stresine daha dayanıklı ve depolama süresince daha iyi koruma yapan stabilizatör seçimi için çalışma yapılmıştır ve bu çalışma Rybnikar'ın yaptığı çalışma ile benzeşmekte ve daha genişletilmiş bir çalışmadır. Fakat çalışma prensibi, çalışma ortamı, kullanılan laboratuvar malzemeleri ve kullanılan liyofilizasyon cihazı vs. Rybnikar çalışmasıyla paralellik göstermemektedir. Bunun sonucu olarak liyofilizasyon sırasında ki ve liyofilizasyon sonrasındaki canlılık kayıpları aynı sonuçları vermemektedir. Bunun sebebi bu çalışmada kullanılan liyofilizasyon cihazının Rybnikar'ın kullandığı liyofilizasyon cihazı ile aynı çalışma prensibine sahip olmaması olabilir.

Bu çalışmanın amacı stabilizatörlerin aynı ortam koşullarında koruma kabiliyetlerini araştırmak olduğu için kullanılan liyofilizasyon cihazının Rybnikar'ın liyofilizasyon cihazının program ve basamakları ile aynı olmaması bir problem oluşturmamaktadır.

Rybnikar yaptığı liyofilizasyon çalışmasında canlılık kaybının nem oranı yada liyostabilizatör seçimi ile ilgili olabileceğini belirtmiştir. Yalnız kesin bir kanıya varmak için daha kapsamlı bir çalışma yapılması gerektiğini savunmuştur [55].

Çalışmanın sonucunda daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak bütün basamaklar doğru bir şekilde gerçekleştirilip *Trichophyton verrucosum* için en uygun stabilizatör seçilmiştir. Fakat en doğru kararın verilebilmesi için daha kapsamlı ve uzun bir çalışma yapılması gerekmektedir.

4. SONUÇ

Bu çalışmada *Trichophyton verrucosum* sukroz ve jelatinden oluşan farklı oranlarda hazırlanmış 5 stabilizatör ile ayrı ayrı homojenize edilip mikroskop ve canlılık sayımları yapılarak liyofilize edildi. Liyofilizasyon öncesi canlılık sayımı yapıldı ve bütün gruplar için ortalama 436×10^6 CFU/ml olarak belirlendi. Bu sayım göz önünde bulundurularak liyofilizasyon sonrası canlılık sayımları, hızlı stabilite testi, ve gerçek zamanlı raf ömrünü hesaplamak amacı ile 1. ve 3. ayda canlılık sayımları yapılmıştır.

Yapılan bu çalışmada nem oranının fazla olmasının liyofilize *Trichophyton verrucosum*'un uzun süreli saklanmasında olumsuz etki yarattığı belirlenmiştir. Liyofilizasyon sırasında sukroz oranı %7.5 ile % 10 arasında değişen stabilizatörler iyi koruma Sukroz oranı %5 olan D grubu ise en kötü korumayı gerçekleştirmiştir. Liyofilizasyon sonrası canlılık sayımlarını başlangıç sayıları olarak belirleyip depolama süresince canlılık kayıplarını hesaplamak için yapılan sayımlarda ise canlılık kayıplarının nem oranıyla doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.

Stabilizatörlerdeki jelatin oranı artıkça nem oranının azaldığı kanısına varılmıştır. Bu yüzden en iyi jelatin oranının da % 10 olduğu belirlenmiş olup bu çalışmadaki stabilizatörlerden *Trichophyton verrucosum* için en kullanışlı olanın % 10 jelatin- % 7.5 sukroz ile hazırlanan C grubu olduğu belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Arda, M., *Mikoloji (Genel ve Özel)*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. No: 366. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1980.127-160.
- [2] Krakhecke, AG., Afonso, E., Ferreira, JC., Candido, RC., 2005. *In vitro* susceptibility testing of *Microsporium gypseum* isolated from healthy cattle and soil samples against itraconazole, terbinafine, fluconazole and topical veterinarian drugs. *Mycopathologia*, 159, 377-380.
- [3] Biberstein, EL., Hirsh, DC. Dermatophytes. *In*, Hirsh, DC., MacLachlan, NJ., Walker, RL., eds. *Veterinary Microbiology*. Oxford Blackwell Publishing Co, 2004. 273-284.
- [4] Soltys, MA., Summer-Smith, G., 1969. Dermatophytes in veterinary practice. *Can Vet J* 10, 111-116.
- [5] Gudding, R., Lund, A., 1995. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can Vet J* 36, 302-306.
- [6] Erkmen, H., Memleketimiz dermatofitleri hakkında, *Türk Hij Tec Biyol Derg* 1958. 18, 275
- [8] Tumbay, E., İnci, R., 1996. Derinin mantar infeksiyonları, " Topcu, W., Soyletir, A., Doganay, G., M (ed). *İnfeksiyon Hastalıkları*", 820 İstanbul.
- [9] Karaaslan, A., Karaaslan, F., Cengiz, AT., 1998. Ankara'nın Kecioren bölgesinde izole edilen dermatomikoz etkenleri, *infek Derg* 12- 93.
- [10] Yeğenoglu, Y., 1996. Klinikimizdeki dermatofitoz etkenlerinin son bir yıla ait değerlendirimi, *Türk Dermatol Derg* 30-16
- [11] Huovinen, S., Tunnela, E., Huovinen, P., Kuijpers, AFA., Suhonen, R., 1998. Human onychomycosis caused by *Trichophyton equinum* transmitted from a racehorse. *Br J Dermatol* 138, 1082-1084.
- [12] Cabanes, FJ., Abarca, ML., Bragulat, MR., 1997. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain., *Mycopathologia* 137, 107-113.
- [13] Khosravi, AR., Mahmoudi, M., 2002. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. *Mycoses* 46-222.
- [14] Mitra, SK., Sikdar, A., Das, P., 1998. Dermatophytes isolated from selected ruminants in India. *Mycopathologia* 142, 13-14.
- [15] Maslen, MM., 2000. Human cases of cattle ringworm due to *Trichophyton verrucosum* in Victoria, Australia. *Aust J Dermatol* 41, 90-94.

- [16] Altay, G., Kökçü, L., Akan, M., Keskin, O., 2003. Evcil hayvanlardan dermatofit izolasyonu. *Vet Hek Mikrobiyol Derg* 3, 5-8.
- [17] Tel, OY., 2005. Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu [Doktora Tezi]. Ankara. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [18] Mitra, SK., Sikdar, A., Das, P., 1998. Dermatophytes isolated from selected ruminants in India. *Mycopathologia* 142, 13-14.
- [19] Ranganathan, S., Balajee, SAM., Raja, M., 1998. A survey of dermatophytosis in animals in Madras, India. *Mycopathologia* 140, 137-140.
- [20] Spiewak, R., Szostak, W., 2000. Zoophilic and geophilic dermatophytoses among farmers and non-farmers in Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 7, 125-129.
- [21] Ranganathan, S., Thangam, M., Selvi, SG., 1995. Effect of socio-economic status on the prevalence of dermatophytosis in Madras. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 61, 16-18.
- [22] Wabacha, JK., Gitau, GK., Bebola, LC., Bwanga, CO., Wamuri, ZM., Mbithi, PM., 1998. Occurrence of dermatomycosis (ringworm) due to *Trichophyton verrucosum* in dairy calves and its spread to animal attendants. *J S Afr Vet Assoc* 69, 172-173.
- [23] Moretti, A., Boncio, L., Pasquali, P., Fioretti, DP., 1998. *Epidemiological aspects of dermatophyte infections horses and cattle*. *Zent Vet B*, 45, 205-208.
- [24] Lund, A., Bratberg, AM., Solbakk, IT., 2001. *In vitro release of interferon-gamma by trichophytin-stimulated whole blood cell cultures from ringworm-vaccinated and control cattles experimentally inoculated with Trichophyton verrucosum*. *Vet Derm*, 12, 75-80.
- [25] Altuğ, N., Özdemir, R., Cantekin, Z., 2013. Ruminantlarda koruyucu hekimlik. I. Aşı uygulamaları. *Erciyes üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 10(1), 33- 44.
- [26] Adams, G. D., 2003. Lyophilization of vaccines: current trends. *Methods in Molecular Medicine* 87, 223-243.
- [27] Flosdorf, E.W., Mudd, S., 1935. Procedure and apparatus for preservation in the lyophile form of serum and other biological substances. *The Journal of Immunology* 29, 389-425.
- [28] Meryman, H. T., 1966. *Freeze-Drying; Cryobiology*. Ed. H. T. Meryman. Academic Pres, London, New York.
- [29] Lapage, S. P., Shelton, E. S., Mitchell, T. G., Mackenzie, A. R., 1970. *Culture Collections and the Preservation of Bacteria*.

- [30] Sawada, T., 1975. Stability of Freze-Dried BCG Vaccine; Proceedings of the First Intersectional Congress of IAMS. Ed. T. Hasegawa. Vol 5. Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo.
- [31] Cemeroglu, B., 1976. Gıda Maddelerinin Dondurarak Kurutulma Prensipleri. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 501. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- [32] Stadhouders, J., Jansen L. A., Hup, G., 1969. Preservation of Starters and Mass Production of Starter Bacteria. Netherlands Milk and Dairy Journal 23, 182-199.
- [33] Tamime, A. Y., Robinson, R. K., 1976. Recent Developments in the Production and Preservation of Starter Cultures for Yogurt. Dairy Industries International 41 (11), 408-411.
- [34] Halkman, A., Doğan, H.B., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 08. Bölüm
- [35] Harris, R. J. C., 1954. Biological applications of freezing and drying. Academic Press, Inc., New York, New York.
- [36] Heckly, R. J., Faunce, K., Elberg, S. S., 1959. Lyophilization of *Brucella melitensis*. The Naval Biological Laboratory, School of Public Health, and the Department of Bacteriology, University of California, Berkeley, California, 52-54
- [37] Lievense, L. C., Verbeek, M. A. M., Noomen, A., vant Riet, K., 1994. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology 41, 90-94.
- [38] Font de Valdez, G., de Giori, G. S., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G., 1983. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjective to freze-drying. Applied and Environmental Microbiology 45, 302-304.
- [39] Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., Crowe, L. M., 1995. Treholose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Applied and Environmental Microbiology 61, 3592-3597.
- [40] Abadias, M., Benabarre, A., Teixó, N., Usall, J., Vinas, I., 2001. Effect of frezedrying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. The International Journal of Food Microbiology 65, 173-182.
- [41] Halkman, A. K., Akyol, E., Çavus, A., 1986. Liyofilizasyon süresinin yoğurt bakterilerinin canlılığı üzerine etkisi. Gıda 11 (2), 95-99.
- [42] Pınarkara, Y., “Liyofilizasyon işlemi Esnasında Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Canlılıkları Üzerine Kriyojenik Koruyucu Maddelerin Etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008.

- [43] Thomas, A., Jennings, S., 1997. Effect of formulation on lyophilisation. Part 1, Technology Magazine1, IV 5 Article Index.
- [44] Greaves, R., 1964. Fundamental aspects of freeze-drying bacterial and living cells. Aspects Theoriques et Industriels de la Lyophilisation, Rey L (ed), Paris, Herman, 410-412.
- [45] Ferry, R.M., 1995. The freeze-drying of bacteria and viruses; Methods in Molecular Biology 38, No.2.
- [46] Proom, H., 1951. Freezing and drying. Inst. of Biology. London. 117.
- [47] Flosdorf, E. W., 1949. Freeze-drying. Reinhold Publ. Corp., New York.
- [48] Gudding R. Lund A: Immunoprophylaxis of Bovine Dermatophytosis. Can Vet J. 36, 302-306, 1995.
- [49] Parker, WM., Yager, JA., 1997. Trichophyton Dermatophytosis A Disease Easily Confused with Pemphigus Erythromatosus. Can Vet J 38, 502-505.
- [50] Wawrzkievicz, K., Wawrzkievicz, J., 1998. Early Immunization of Calves with an Inactivated Vaccine Against Tricophytosis. Polks Arch Wet. 28, 3-4-5-15.
- [51] Rybnikar , A., 1993 Testing the Protective Efficacy of Monovalent and Bivalent Antimycotic Vaccine. Acta vet. Brno. 62, 162-172,.
- [52] Veternik, D., Zadnik T., 1994. Vaccination of cattle against Ringworm on a Farm in Slovenia. The Bov Pract 29, 128-129.
- [53] Şahal, M., Yılmaz, HY., 1998. Börkükü MK, Yardımcı H: tTürkiyede sığırlarda Trichophyte Enfeksiyonuna Karşı ilk Avirüent Aşı Uygulamaları. AÜ Vet Fak Derg. 35(2-3), 567-587.
- [54] Ilgaz, AA., Tandaş, A., 1981. Koyun ve Keçilerde Görülen Fungal Dermatitisin İzolasyon, İdentifikasyon ve Etiyolojisi Üzerinde Çalışmalar. Vet Hay Tar Orm. 5, 21-25.
- [55] Rybnikar, A., 1980. Lyophilization of Trichophyton verrucosum organisms. Acta vet. Brno, 50, 73-77.
- [56] CUTURIC, S., 1968. Etiologija i rasirenost govedeg lisaja na poljoprivrednim dobrima u Hrvatskoj s osvrtom na klinicku sliku bolesti. Veterin. arh., 38, 265-274.
- [57] WAWRZKIEWICZ, K., 1976. Liofilizacja jako metoda przechowywania szczepow Trichophyton verrucosum. Med. Wet. 32, 116-119.
- [58] Gürgün, V., Halkman, AK., 1988. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri., Gıda Teknolojisi Derneği Yayını: 7, Ankara, s. 7-10.

- [59] BUCHNICEK, J., 1974. Biologische Inhibition durch Licht. Acta Univ., Olomuc Fac. med. 71, 161-237.
- [60] PROOM, H., 1951. Some of the factors affecting the viability of bacterial cultures subjected to the freeze- drying process. Freezing and Drying. Report of a Symposium. The Institut of Biology London 117.
- [61] HUTTON, RS., HILMOE, R J., ROBERTS, J., 1951. Some factors that influence the survival of Bruc. abortus during freeze-drying. J. Bact. 61, 309.
- [62] BOSMANS, J., 1974. Ten years lyophilization of pathogenic Fungi, Mycopathologia et mycologia applicata 13-24.
- [63] RYBNÍKAR, A., 1985. Storage of lyophilized dematophyte cultures., Acta vet., Brno, 54 79-83.
- [64] ELLIS, JJ., ROBERSON, JA., 1968. Viability of fungus cultures preserved by lyophilization. Mycologia 60, 399-405.
- [65] RYBNÍKAR, A., DITRICH, O., PYTELA, F., 1983. Lyofilizace nekteľjch kultur dermatofytu Ceska mykologie 37, 93-98.
- [66] Gürgün, V., Halkman, A.K., 1988. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği YayınN: 7, Ankara, s. 46-48.
- [67] OIE., 2008. Terrestrial Manual Chapter 1.1.8. Principles of veterinary vaccine production 90-101.
- [68] Sparkes, J. D., Fenje P., 1972. The effect of residual moisture in lyophilized smallpox vaccine on its stability at different temperatures. Bulletin of the World Health Organization 46 (6), 729-734.
- [69] Fry, R. M., 1951. Freezing and drying, Inst. Of Biology. London. 107-115.

6. ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Serdal DURSUN

Doğum Yeri ve Tarihi : SURUÇ / ŞANLIURFA 10.02.1988

Staj ve Çalıştığı yerler: Şanlıurfa Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji, Biyokimya ve Patoloji Laboratuvarları (staj) 2007 - 2010.

Dollvet Veteriner Aşı, İlaç, Biyolojik Madde Üretimi Sanayi Ticaret A.Ş 2012-2013

E Posta : serdalado@hotmail.com

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans : Rize Üniversitesi 2010, Rize

Yüksek Lisans : Kilis 7 Aralık Üniversitesi (Devam ediyor), Kilis

