

Klinik ve Çevresel *Exophiala* İzolatlarında Biyosurfaktan Üretiminin Karşılaştırılması

A Comparison of Biosurfactant Production Between Clinical and Environmental *Exophiala* Isolates

Çağrı ERGİN¹, Levent AKSOY¹, Engin KAPLAN², Macit İLKİT³

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

² Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin.

² Mersin University Advanced Technology Education Research and Application Center, Mersin, Turkey.

³ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

³ Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

* Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017HZDP018 proje numarası ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 14.12.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.03.2018

ÖZ

Exophiala cinsi esmer mantarlar hidrokarbon ile kontamine ortamlarda kolonize olabilmekte ve bağıışıklık sistemi baskılanmış insanlarda hastalık oluşturabilmektedirler. *Exophiala* türlerinde biyosurfaktan üretimi, değişen hücre hidrofobitesinin, izolatların patojen hale dönüşmesiyle ilişkili olabilmektedir. Bu çalışma, klinik örneklerden elde edilen *Exophiala* izolatlarında biyosurfaktan üretiminin, toksik ortamlardan (bulaşık makinesi ve demiryolu traversleri) elde edilen çevresel izolatlarla göre daha düşük olduğu hipotezini kanıtlamak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, moleküler yöntemlerle tanımlanmış, 108'i çevresel (82'si bulaşık makinesi, 36'sı demiryolu traversi) ve 14'ü klinik örneklerden elde edilen toplam 122 *Exophiala* izolatu incelenmiştir. Biyosurfaktan aktivitesi, biyosurfaktan varlığının göstergesi olarak mikrotitrasyon plağının yüzeyinde yağa damlatma testi ve ham petrol üzerine yağ yayılımı yöntemiyle araştırılmıştır. Ham petrol kullanılarak yapılan yağ yayılım testi verileri, bilgisayarda açık kaynak kodlu ImageJ programıyla değerlendirilmiştir. Test edilen izolatların tamamında +2 standart sapmadan daha yüksek ölçülen temiz yüzey alanı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Araştırma kapsamında incelenen 122 *Exophiala* izolatının 11 (%9.0)'i yağa damlatma yöntemiyle, 10 (%8.2)'u yağ yayılım testiyle biyosurfaktan aktivitesi göstermiştir. Yağa damlatma yöntemi ile yağ yayılım testleri arasında kabul edilebilir seviyede uyum saptanmıştır (Cohen κ değeri= 0.30). Biyosurfaktan aktivitesi gösteren izolatların varlığına rağmen, *Exophiala* türleri arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p= 0.72$). Çevresel izolatların biyosurfaktan düzeyleri hastalardan elde edilen izolatlardan daha yüksek bulunmuştur ($p= 0.03$). En

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Çağrı Ergin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye.

Tel (Phone): +90 258 296 2491, E-posta (E-mail): cagri@pau.edu.tr

yüksek biyosurfaktan aktivite düzeyi, bulaşık makinesinden izole edilen bir *Exophiala phaeomuriformis* izolatında görülmüştür. Bulaşık makinelerinden elde edilen izolatlar ile demiryolları traverslerinden elde edilen izolatlar arasında biyosurfaktan üretme düzeyleri bakımından fark saptanmamıştır ($p= 0.66$). Biyosurfaktan üretimi, *Exophiala* türlerinde virülansın beklenenden daha önemli bir göstergesi olabilir. Sunulan araştırmada, çevresel izolatlardaki biyosurfaktan aktivitesi, klinik örneklerden elde edilen izolatlardan daha yüksek bulunmuştur. Biyosurfaktan tarama protokolleri üzerinde anlaşmaya varılması, çevresel *Exophiala* izolatlarının neden daha az virülansa sahip oldukları hakkında yardımcı olabilir. Planlanacak ileri çalışmalarla, hastalardan elde edilen daha fazla sayıda *Exophiala* izolatının biyosurfaktan aktivitesi araştırılmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Exophiala*; biyosurfaktan; çevresel; klinik örnek.

ABSTRACT

Black yeast in the genus *Exophiala* are able to grow in hydrocarbon-contaminated environments and are pathogenic in immunosuppressed hosts. The biosurfactant produced by *Exophiala* species may be associated with strain pathogenicity by changing the hydrophobicity. The aim of this study was to prove the hypothesis that biosurfactant production in *Exophiala* strains isolated from clinical samples is lower than the strains isolated from toxic (dishwasher and railway sleepers) environments. A total of 122 *Exophiala* isolates 108 environmental (isolated from 82 dishwashers and 36 railway sleepers) and 14 clinical isolates confirmed by molecular tests were included in the study. Biosurfactant activity was tested by the drop collapse method, in which the surface of a microtiter plate well was evaluated for the presence of a biosurfactant, and by the oil spreading technique on crude oil. An open source analyses program, ImageJ®, was used for crude oil spreading technique data. A clear surface zone that differs more than two standard deviations from the mean size was accepted as a positive result. Among the 122 *Exophiala* species, 11 (9.0%) and 10 (8.2%) strains showed biosurfactant activity by the drop collapse test and oil spreading method, respectively. An acceptable relation was found between the drop collapse test and oil spreading method (Cohen κ coefficient= 0.30). Despite the presence of isolates showing biosurfactant activity, no statistically significant difference was detected between *Exophiala* strains ($p= 0.72$). The biosurfactant levels of environmental isolates were higher than the isolates obtained from the patients ($p= 0.03$). The highest biosurfactant level was observed in one *Exophiala phaeomuriformis* strain isolated from a dishwasher. There was no difference between the biosurfactant levels of the dishwasher and railway sleeper isolates ($p= 0.66$). Biosurfactant production may be a more important determinant of virulence in *Exophiala* species than expected. In this study, biosurfactant activity was higher in environmental isolates compared to the clinical isolates. Consensus of multiple biosurfactant screening protocols may clarify why environmental *Exophiala* species are less virulent. Further studies should evaluate biosurfactant activity in additional clinical *Exophiala* isolates. The biosurfactant activity of more *Exophiala* isolates obtained from patients should be investigated with further planned studies.

Keywords: *Exophiala*; biosurfactant; environmental; clinical sample.

GİRİŞ

Biyosurfaktanlar, hücre dışı ortamda bulunan karmaşık yapıli kimyasal maddelerin parçalanmasını ve hücre içine alınarak çoğunlukla karbon kaynağı olarak kullanılmasını sağlarlar. Doğada parçalanmayan kimyasal yapıların yoğunlaştığı bölgelerdeki mikroorganizmalarda biyosurfaktan yapımı yaşamsal öneme sahiptir^{1,2}. Ülkemizde de petrokimya artıklarının yoğunlaştığı ortamlardan *Exophiala* türleri izole edilmiştir³⁻⁵.

Exophiala cinsinde görülen virülans değişikliklerinin dış ortam özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sıvı ortamda maya evresinde, ortamın kurumasıyla birlikte hidrofobik özellikteki hif evresi görülmektedir. *Exophiala* izolatlarında küçük yapışkan konidyalar, ek fiyalidler ile birlikte aderansı artırmaktadır. Konak içinde, enfeksiyöz yapılar epitel

hücrelerine tutunarak konak savunma mekanizmalarına daha dirençli olan muriform hücrelere dönüşmektedir. Söz konusu direnç durumu, hidrofilik ekstraselüler polisakkarit yapıya bağlı rölatif hücresel hidrofobisite ile artış göstermektedir⁶. Bu çalışmada, klinik ve çevresel ortamlardan izole edilen *Exophiala* izolatlarında biyosurfaktan üretiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada 108'i çevresel, 14'ü klinik olmak üzere toplam 122 *Exophiala* izolatı incelendi. Çevresel izolat olarak daha önceki araştırmalarda elde edilen ve ITS dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanmış izolatlar kullanıldı³⁻⁵. Klinik izolatlar Centraalbureau voor Schimmelmcultures (Westerdijk Fungal Biodiversity, Utrecht, Hollanda)'dan temin edildi (Tablo I). *Exophiala* izolatlarında biyosurfaktan üretimlerinin varlığı ham petrolde yağ yayılımı ve yağ damlatma testleri ile araştırıldı^{1,7,8}.

Her iki yöntem için; izolatlar sıvı besiyerinde (NH_4NO_3 3 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, maya özütü 0.5 g/L, %5 palm yağı, pH= 5.3) 10 gün süre ile 26°C'de, her gün 20 saniye vorteksenerek üretildi⁷. Besiyerlerinin süpernatantları ayrılarak test örnekleri elde edildi.

Ham Petrolde Yağ Yayılımı Testi

Petri plakları (çap: 20 cm) distile su ile dolduruldu. Üzerine 100 µl ham petrol damlatılarak, su üzerinde ince bir petrol tabakası oluşması sağlandı. Surfaktan aktivitesi ölçülecek test örneğinden 10 µl ham petrol tabakasının ortasına damlatıldı ve oluşan bölgenin alanı, genel lisanslı ImageJ (ver 1.51; NIH, Bethesda, Maryland, ABD) bilgisayar programıyla hesaplandı. Tüm izolatlar için test edilen değerlerin ortalamasının +2 standart sapma üzerinde elde edilen veriler pozitif olarak kabul edildi. Pozitif kontrol olarak Triton X-100 (AppliChem, GmbH, Darmstadt, Almanya), negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı.

Tablo I. Çalışmada İncelenen *Exophiala* İzolatlarının Tür ve İzolasyon Yerlerine Göre Dağılımı

Türler	Demiryolu traversleri	Bulaşık makinesi	Klinik izolat	Toplam
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	6	16	-	22
<i>Exophiala dermatitidis</i>	20	56	10	86
<i>Exophiala heteromorpha</i>	8	-	-	8
<i>Exophiala xenobiotica</i>	1	-	2	3
<i>Exophiala oligosperma</i>	-	-	1	1
<i>Exophiala castellanii</i>	-	-	1	1
<i>Exophiala crusticola</i>	1	-	-	1
Toplam	36	72	14	122

Yağa Damlatma Testi

Düz tabanlı, 96 kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plaklarına 5 µl sıvı parafin damlatılarak kuyucuk kaplandı ve kurumaya bırakıldı. Kuyucuğun dibini kaplamış olan kuru parafin üzerine test örneğinden 5 µl damla bırakılarak gözlemlendi. Damlacığın bir dakika içinde yayılarak kuyucuğun bir kısmını kaplaması (+), tamamını kaplaması (++) olarak değerlendirildi. Deney, her örnek için üç kez tekrar edildi.

Bulguların değerlendirilmesinde Minitab 16.1.1 (Köln, Almanya) programı kullanıldı. İstatistiksel hata payı %5 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan 122 izolat içerisinde; yağ damlatma testi ile 11 (%9.0), yağ yayılımı testi ile 10 (%8.2) izolatta biyosurfaktan aktivite varlığı saptanmıştır (Tablo II; Cohen $\kappa= 0.30$). Yağ damlatma testinde 1 (++) ve 10 (+) izolat yayılma göstermiştir (Tablo II).

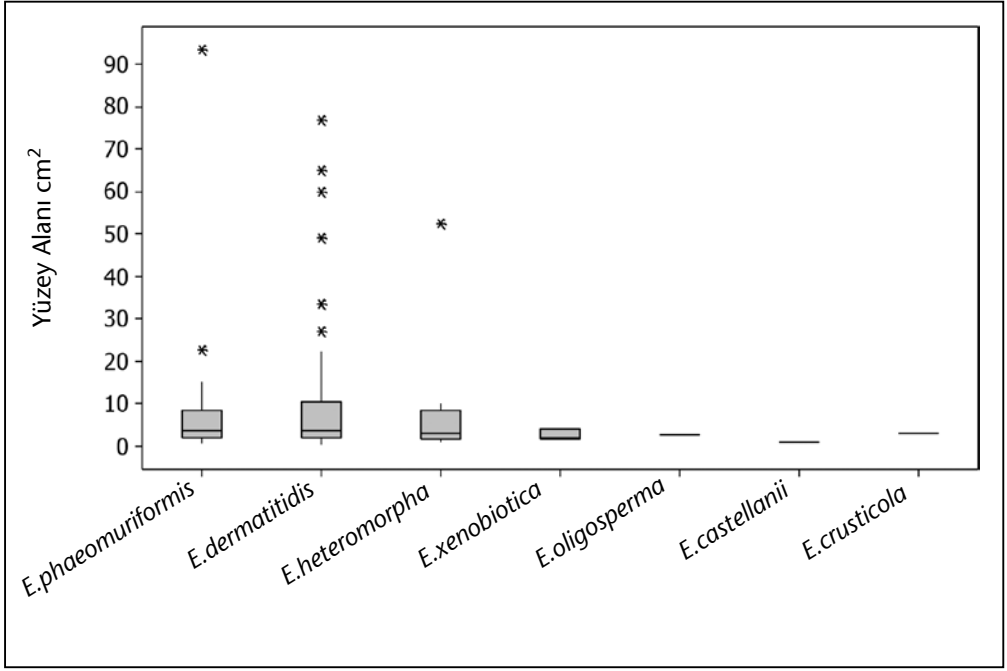
Yağ yayılımı testi değerlerine göre; *Exophiala* izolatları arasında surfaktan üreten izolatlar olmasına rağmen, türler arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (Şekil 1; $p= 0.72$).

Klinik izolatlar ile karşılaştırıldığında, çevresel izolatlar arasında daha fazla surfaktan varlığı gösteren izolat saptanmıştır (Şekil 2; $p= 0.03$). Demiryolu ile bulaşık makinesi izolatları arasında biyosurfaktan varlığı yönünden istatistiksel fark saptanmamıştır ($p= 0.660$). En yüksek biyosurfaktan aktivitesini gösteren izolatın, bulaşık makinesinden elde edilmiş bir *E.phaeomuriformis* izolatı olduğu belirlenmiştir (Şekil 1, Şekil 2).

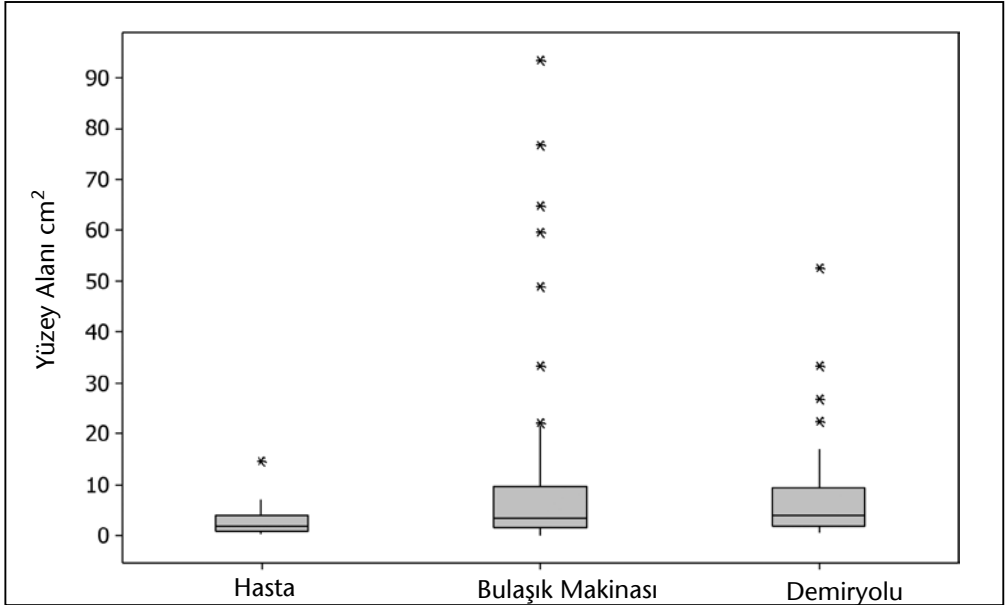
Tablo II. Biyosurfaktan Üreten *Exophiala* İzolatlarının Test ve Türe Göre Dağılımı

(+) Kökenler	Ham petrolde yağ yayılım testi ile	Yağ damlatma testi ile	
		(+)	(++)
<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	2	1	1
<i>Exophiala dermatitidis</i>	7	-	9
<i>Exophiala heteromorpha</i>	1	-	-
Toplam (N= 122)	10 (8.2)	11 (9.0)	

n, %; Cohen $\kappa= 0.30$



Şekil 1. Biyosurfaktan üreten *Exophiala* izolatları olmasına karşılık (* ile işaretli), *Exophiala* türleri arasında baskın olarak biyosurfaktan üreten türün saptanmaması ($p= 0.72$).



Şekil 2. Çevresel ortamdan izole edilen *Exophiala* izolatlarının, klinik izolatlardan daha sık biyosurfaktan üretmesi ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Biyosurfaktanların mikroorganizmaların doğaya adaptasyonunda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Özellikle mantarlarda hidrofobisitenin değişmesine sebep olan biyosurfaktanlar, konidyal bölünmenin (germinasyonun) azalmasına sebep olurlar. Çalışmamızda, çevresel ortamdan izole edilen *Exophiala* izolatlarında biyosurfaktan üretiminin hastalardan elde edilen izolatlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$, Şekil 2). Bu durumun, in vivo ortamdaki muriform hücrelerin biyosurfaktan üretimlerinin düşük olmasına bağlı olarak, hücrelerin hidrofobik yapılarını korumaları sonucunda gerçekleşmiş olabileceği düşünülebilir. Hidrokarbon ile zengin ortamlarda kolonize olabilen *Exophiala* izolatlarında, sayısal eşik değerin üzerine çıkmaları durumunda oluşturacakları mikrobiyal birlikteliklerinin devamını sağlayacak yapıyı korumaya yönelik biyosurfaktan üretmeleri de mümkün olmaktadır⁹. İn vivo ortama geçen *Exophiala* ise, daha uygun enerji kaynakları olarak biyosurfaktan üretimine ihtiyaç duymamaktadır. Bu durum, petrokimya artıkları ile kirlenen ortamlarda çoğalan *Exophiala* izolatlarının düşük virülansa sahip olabileceğini desteklemektedir⁶.

Mikrobiyal biyosurfaktan aktivitesi varlığının araştırılmasında kullanılan farklı yöntemler arasında uyumsuzluklar bulunmaktadır^{1,10}. Çalışmamızda da izolatların biyosurfaktan aktivitelerini saptayan testler arasındaki uyum düşük seviyede bulunmuştur (Tablo II; Cohen $\kappa = 0.30$). Biyosurfaktan varlığı araştırmalarında genel olarak benzer sorunlar tespit edilmektedir. Güncel literatürde biyosurfaktan varlığını araştıran yayınlar giderek artmaktadır^{1,10,11}. Ancak bu çalışmaların çoğunda karşılaşılan problemler; biyosurfaktan üreten mikroorganizmanın tanımlanmaması, biyosurfaktanın yetersiz karakterizasyonu ve yetersiz metodolojiden kaynaklanan güvensizliktir^{10,11}.

Sunulan araştırmanın en önemli bulgusu ve sınırlılığı, klinik *Exophiala* izolatlarında düşük seviyede biyosurfaktan varlığının bulunmasıdır. Petrokimya kirliliği bulunan ortamlardan elde edilen izolatların düşük virülans özellikleri olmasının bir nedeninin de biyosurfaktan salınımına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Ham petrol örneğinin sağlanmasında Dr. Öğr. Üyesi Ali Gökgöz'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods 2004; 56(3): 339-47.
2. Kaur K, Sangwan S, Kaur H. Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments. Environ Monit Assess 2017; 189(12): 603.
3. Döğen A, Kaplan E, İlkit M, de Hoog GS. Massive contamination of *Exophiala dermatitidis* and *E.phaeomuriformis* in railway stations in subtropical Turkey. Mycopathologia 2013; 175(5-6): 381-6.
4. Döğen A, Kaplan E, Öksüz Z, Serin MS, İlkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol 2013; 51(5): 493-8.

5. Gümral R, Özhak-Baysan B, Tümgör A, et al. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. *Fungal Divers* 2016; 76(1): 1-9.
6. Seyedmousavi S, Netea MG, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE, de Hoog GS. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(3): 527-42.
7. Jain DK, Collins Thompson DL, Lee H, Trevors JT. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* 1991; 13(4): 271-9.
8. Chiewpattanakul P, Phonnok S, Durand A, Marie E, Thanomsub BW. Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20(12): 1664-71.
9. Wang S, Yu S, Zhang Z, et al. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(21): 6724-32.
10. Irorere VU, Tripathi L, Marchant R, McClean S, Banat IM. Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; 101(10): 3941-51.
11. Claus S, Van Bogaert INA. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; 101(21): 7811-21.