



Anaerobik Gut Funguslarının Uzun Süreli Muhafazalarında Agarlı Besi Yerlerinin ve Ön Soğutma İşleminin Etkinliğinin Araştırılması[#]

Effectiveness of Agar Nutrient and Precooling Process for Long Term Storage of Anaerobic Gut Fungi

Tuğçe TURGUT^{1*} 0000-0003-2147-5526 Ayşe Nur TANIŞ^{1,2} 0000-0002-4369-0916 Emin ÖZKÖSE¹ 0000-0001-5710-4175
M. Sait EKİNCİ¹ 0000-0001-7994-0203

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Kahramanmaraş

² Şimdiki adresi: Konya Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Konya

ÖZET

Amaç: Anaerobik gut funguslarının (AGF) kültüre alınması ve uzun süreli muhafazası özellikle aerobik mikroorganizmalar ve prokaryotik gut mikrobiyom ile karşılaştırdıklarında göreceli olarak düşük verimlidir. Anaerobik koşullar altında yapılan bu muhafaza işleminde hücre yapılarının düşük sıcaklıklarda uzun süreli korunması amacıyla gliserol, dimetil sülfoksit (DMSO), kan serumu, polivinilpirolidon (PVP) ve sorbitol gibi kriyoprotektanlar kullanılır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada farklı enerji kaynakları (buğday samanı, sükröz, dekstroz, ksiloz ve glikoz) kullanılarak dağ keçisi dışkılarından izolasyonu ve saflaştırılması yapılan *Caecomyces* GMLF77 izolatı ile kültür koleksiyonundan temin edilen *Orpinomyces* GMLF18 izolatı 6 aylık süreyle eğik agar ve Roll tüp agar besi yerlerinde farklı sıcaklık kombinasyonlarında muhafaza edilmiş ve izolatların yaşama oranları analiz edilmiştir.

Bulgular: *Caecomyces* GMLF77 izolatı en yüksek yaşama oranını (%67) ksiloz içeren eğik agar içerisinde %15 gliserol varlığında doğrudan -196 °C'de (sıvı azot) muhafazaya alındığında göstermiştir. *Orpinomyces* GMLF18 ise glikoz içeren eğik agarlı besi yerinde, 6 aylık süreyle ön soğutmasız -196 °C'de muhafazasında %83 yaşama oranı göstermiştir. Diğer taraftan her iki izolat da kullanılan tüm besi yeri ve enerji kaynaklarında 4 °C'de ön soğutmaya tabi tutulduklarında yaşama şansı bulamamışlardır.

Sonuç: Sonuçlar fungal izolatların sıvı azota aktarılmadan önce ön soğutma işlemine tabi tutulmalarının uzun süreli yaşama oranlarının artırılmasına önemli bir katkı sağlamadığını ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Agar, anaerobik gut fungus, kriyoprotektan, mikrobiyal muhafaza, sıvı azot.

ABSTRACT

Objective: Culturing and long term storage of anaerobic gut fungi (AGF) is a more challenging process compared to aerobic and prokaryotic gut microbiome. For prolonged storage, carried out under anaerobic conditions, various cryoprotectants such as glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), blood serum, sorbitol, and polyvinylpyrrolidone (PVP) are widely used to protect the cell from possible damages of freezing.

Materials and Methods: *Caecomyces* GMLF77 was isolated and purified from wild goat feces using various energy sources (wheat straw, sucrose, dextrose, xylose and glucose), and *Orpinomyces* GMLF18 was obtained from the culture collection. Both isolates were stored in agar slant and Roll tube agar media at different temperature combinations until 6 months and later survival rates of the isolates were analyzed.

Results: The isolate *Caecomyces* GMLF77 showed the highest survival rate (67%) when it was grown in the agar slant medium containing xylose as sole energy source and stored directly at -196 °C (liquid nitrogen) under the preservation of 15% glycerol. The isolate *Orpinomyces* GMLF18 showed survival rate of 83% after the six-month storage period when it was grown in agar slant medium containing glucose as sole energy source and kept at -196 °C without any precooling. No survival was observed for both isolates when they were treated at 4 °C, regardless of medium type and energy source used in the experiment.

Conclusion: The results suggest that precooling of fungal isolates in low temperatures just before long-term storage in liquid nitrogen has no remarkable positive effect on their survival rates.

Keywords: Agar, anaerobic gut fungi, cryoprotectant, microbial preservation, liquid nitrogen.

Geliş tarihi (Received): 09.12.2022

Kabul tarihi (Accepted): 17.03.2023

*Sorumlu yazar (correspondence): tugceturgut@ksu.edu.tr

[#]Bu makale sorumlu yazarın doktora tezinden elde edilmiştir.

Atf: Turgut, T., Tanış, A.N., Özköse, E., Ekinci, M.S. 2023. Anaerobik gut funguslarının uzun süreli muhafazalarında agarlı besi yerlerinin ve ön soğutma işleminin etkinliğinin araştırılması. Hayvansal Üretim 64(1): 17-26. <https://doi.org/10.29185/hayuretim.1217042>

Citation: Turgut, T., Tanış, A.N., Özköse, E., Ekinci, M.S. 2023. Effectiveness of agar nutrient and precooling process for long term storage of anaerobic gut fungi. Journal of Animal Production 64(1): 17-26. <https://doi.org/10.29185/hayuretim.1217042>

GİRİŞ

Mikoplazma, bakteriler, arkea, protozoanlar ve funguslar gibi mikroorganizmaların izolasyon ve saflaştırılma aşamalarından sonraki en önemli husus uzun süreli canlılıkları koruma amaçlı muhafaza edilmeleridir. Herhangi bir mutasyona ve genetik varyasyona uğramadan mikroorganizmaların saf kültür şeklinde ve temel niteliklerini kaybetmeden korunmaları hayati bir konudur. Kültürlerin saf olarak özelliklerini koruyabilmeleri ve daha uzun süreli canlılıklarını koruyabilmeleri açısından muhafaza koşullarının iyileştirilmesi önem arz etmektedir. Günümüzde kültürlerin güvenli bir şekilde muhafaza edilebilmeleri için kısa süreli ve uzun süreli saklama yöntemleri kullanılmaktadır. Kısa süreli saklama uygulamaları en yaygın ve en basit yöntem olan döngüsel alt kültüre alma, sıvı parafin altında saklama ve damıtılmış su içerisinde saklama şeklinde sıralanabilir (Ekinci ve ark., 2006; Öztürk ve ark. 2015). Bu yöntemlerin göreceli kolay uygulanabilir ve ekonomik olmasına karşın, süreklilik gerektirmesi ve bulaş riski altında bulunması gibi nedenlerle önemli dezavantajları da bulunmaktadır (Öztürk ve ark. 2015). Diğer taraftan hücrelerin dondurulması ve kristalize formdaki hücre içi sıvının vakum altında süblimasyon ile ortamdan uzaklaştırılması (liyofilizasyon) (Morgan ve ark. 2005) ve düşük sıcaklıklarda korunma (kriyoprezervasyon) yöntemleri ise son yıllarda en yaygın olarak kullanılan uzun süreli mikroorganizma muhafaza yöntemini oluşturmaktadır (Patapoff ve Overcashier, 2002; Çömlekçioğlu ve ark., 2008; Clark ve Stensvold, 2016). Özellikle liyofilizasyon olarak adlandırılan dondurarak kurutma, temel anlamda prokaryotik mikroorganizmaların geniş kültür koleksiyonlarını depolamak, taşımak ve uzun süreli muhafaza etmek için tercih edilen yöntemdir (Morgan ve ark. 2005).

Mikroorganizmaların hücre yapılarının saklama koşullarından etkilenmemesi için koruyucu kimyasallar kullanılmaktadır. Bu kimyasallar içerisinde yaygın olarak kullanılmakta olan gliserol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve polietilen glikol (PEG) gibi kriyoprotektanlar hücre içerisine de girerek donma zararına karşı hücre bütünlüğünü hem içerden hem de dışardan korurken, sakkaroz, glikoz, sorbitol, mannitol, dekstran ve nişasta gibi maddeler koruyuculuklarını sadece hücre dışından sergilemektedirler (Korbitt ve ark. 1997). Bu aditifler içerisinde anaerobik gut

fungusları (AGF)'nin ökaryotik hücre yapılarının korunması amacıyla en yaygın olarak kullanılanları ise moleküler ağırlığı (MW) 92.09 olan ve göreceli daha yavaş bir hücre penetrasyonuna sahip gliserol ile düşük moleküler ağırlıklı (MW=78.13) ve hücre penetrasyonu 30 dakikadan daha kısa süren DMSO'dur (Yarlett ve ark., 1986).

AGF'nin ilk olarak kültüre alınmaları 1975 yılında Orpin (1975) tarafından gerçekleştirilmiştir. AGF, ruminantlar başta olmak üzere birçok herbivor ile bazı sürüngenlerin sindirim sisteminde yaşam alanı bulurlar (Davies ve ark., 1993; Atanasova-Pancevska, Kungulovski, 2018). Günümüze kadar 20 cinsi rapor edilmiş olan ve enerji gereksinimi için mitokondri yerine hidrojenozom içeren (Yarlett ve ark., 1986; Yazdıç ve ark., 2021) bu mikroorganizmaların hemen tamamına yakınının ortak özelliği hayvanlar tarafından alınan bitkisel biyokütlenin di(mono)merlerine kadar enzimatik ve kısmen fiziki olarak parçalanması olduğu bilinmektedir (Joblin, 1989; Ekinci ve ark. 2006; Hooker ve ark., 2018). Geniş yelpazeli endüstriyel öneme sahip enzimatik sistemleri (Akyol ve ark., 2009) nedeniyle hayvan besleme dahil günümüz biyoteknolojik çalışmalarında (Özköse ve ark., 2009) yoğun olarak kullanılan bu mikroorganizmaların uzun süreli muhafaza edilmeleri konusu her geçen gün önemini biraz daha artırmaktadır (Chetverikova 2009; Solomon ve ark., 2016).

AGF *in vitro* şartlarda kullanılan besi yerindeki karbon kaynağının yapısına bağlı olarak (glikoz, ksiloz gibi suda eriyebilir hazır enerji kaynakları kullanıldığında daha kısa olmak üzere) 8-32 saat süren bir hayat döngüsüne sahiptir (Lowe ve ark., 1987; Özköse ve ark.2001). AGF'nin *in vitro* şartlarda ideal kültür sıcaklığı 39 °C'dir ve bu sıcaklıkta uzun süreli kültüre alınabilmeleri için 2-5 günlük süreler içerisinde yeni besi yerlerine aktarılmaları gerekir. Bu işlem yapılmadığı durumlarda karbon kaynağının azalması, metabolik faaliyet sonucu açığa çıkan gazlar nedeniyle ortam basıncının yükselmesi ve en önemlisi pH seviyesinin düşmesi gibi nedenlerle fungusların yaşam kıstasları önemli ölçüde kısıtlanmakta ve sonunda kültür ölümü gerçekleşmektedir (Milne ve ark., 1989). Diğer taraftan bazı monosentrik üreme sistemine sahip fungal izolatların 7 aya kadar enerji kaynağı olarak sisal içeren bazal besi yerlerinde 39 °C'de alt kültüre alınmadan yaşamlarını sürdürdükleri rapor edilmiştir (Joblin 1981). Benzer şekilde polisentrik

üreme sistemine sahip *Anaeromyces* sp EO12 suşunun yaklaşık 2 ay kadar benzer şartlarda canlılığını koruyabildiği bilinmektedir (Brookman ve ark., 2000, Özkose, 2001). Anaerobik fungal cinsler içerisinde yer alan ve küresel rizodial yapıya sahip *Cyllumyces* sp. ve *Caecomyces spp'*ye ait bireyler diğerlerine göre düşük sıcaklıkta muhafaza sonrası canlandırmalarında/aktifleştirilmelerinde düşük canlılık oranlarına sahiptirler (Özkose, 2001; Nagpal ve ark. 2012). Bu cinslerin kültür koleksiyonlarındaki canlılık oranlarını arttırmak amaçlı sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda -70 °C'de en iyi saklama yöntemi %10 gliserol ile saklama olarak önerilmiştir. Bunu %10 DMSO ve %10 etilen glikol takip etmiştir. Ancak bütün bu çalışmalar yine diğer cinsler arasındaki canlılık oranının altında kalmakta ve yine diğer cinslere oranla daha kısa zaman diliminde canlı kalabilmektedirler (Nagpal ve ark. 2012). *Neocallimastix patriciarum*, kriyoprotektan olarak %5 DMSO içeren sıvı ortamda başarıyla muhafaza edilebildiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Orpin ve Bountiff, 1978). Bu cinsle ait muhafaza çalışmalarında -80 °C'de uzun süreli muhafaza test edilmiş ancak fungusun sadece sıvı azot ile uzun süreli muhafazada başarı elde edilebildiği rapor edilmiştir (Yarlett ve ark., 1986). Rumenin iki önemli ökaryotik mikrobiyal grubunu oluşturan protozoa ve AGF'nin *in vitro* koşullarda uzun süreli muhafazaları diğer grupları oluşturan ökaryotik mikroorganizmalara göre çok daha problemlidir (Campbell ve ark., 2020). Gerek AGF gerek protozoa grubu için henüz etkin bir uzun süreli muhafaza yöntemine ait protokol oluşturulamamış olup, özellikle funguslar için kullanılan protokoller ise çok çeşitli etkinlikler göstermektedir. Bu nedenle bu çalışmada küresel (bulbous body) rizodial sisteme sahip *Caecomyces* sp GMLF77'nin izolasyonu, saf kültürünün elde edilmesi, putatif olarak tanımlanması yapılmış ve ön soğutma ile iki farklı agarlı besi yerinin düşük sıcaklıklarda uzun süreli muhafaza koşullarının optimize edilmesindeki etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Uzun süreli muhafaza şartlarının belirlenmesi aşamasında misel yapısında bir rizoidal tallus sistemine sahip olan ve polisentrik üreme özellikleri gösteren *Orpinomyces* sp GMLF18 ile birlikte araştırmaya tabi tutulmuştur. Böylece küresel rizoidal sisteme sahip fungal izolat ile misel/filament formunda rizoidal yapıya sahip izolat arasında uzun süreli muhafaza yöntemlerinin karşılaştırılmasına olanak sağlanmıştır. Aynı zamanda anaerobik fungusların muhafaza altına alınması sırasında kullanılan ön soğutma işlemine tabi tutulmuş dondurulma yöntemi ile muhafazanın funguslar aktifleşme oranları üzerindeki etkileri de araştırılmış ve böylece optimum süre ve optimum sıcaklık ile kullanılan fungal

kültürlerin uzun süreli canlı kalabilme yeteneklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Anaerobik Gut Funguslarının İzolasyonu, Saflaştırılması ve Kültür Şartları

KSÜ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı (BİGEM) dışkı koleksiyonunda bulunan Kahramanmaraş'ın Adıran ilçesi kırsalından toplanmış dağ keçisi dışkı fungus izolasyonu kaynağı olarak kullanılmıştır. Fungal izolasyon aşamasında Orpin'in (1976) anaerobik besi yerlerinde buğday samanı, sükröz, dekstroz, glikoz veya ksiloz (5 g/L) tek enerji kaynağı olarak kullanılmış (katı besi yerlerine %1 agar eklenmiştir) ve CO₂ akımı altında kültür tüplerine aktarılmıştır (Theodorou ve ark., 1994). İzolat katı besi yeri olan ve enerji kaynağı olarak ksiloz içeren Roll tüp metodu kullanılarak saflaştırılmış (Joblin, 1981) ve bu izolat GMLF77 olarak adlandırılmıştır. GMLF77 için yapılacak olan deneysel çalışmalarda karşılaştırma yapabilmek amacıyla yine BİGEM fungus kültür koleksiyonunda (sıvı azot içerisinde) yer alan ve putatif şekilde *Orpinomyces* olarak tanımlanmış filamentli tallus yapısına sahip GMLF18 izolatı kullanılmıştır.

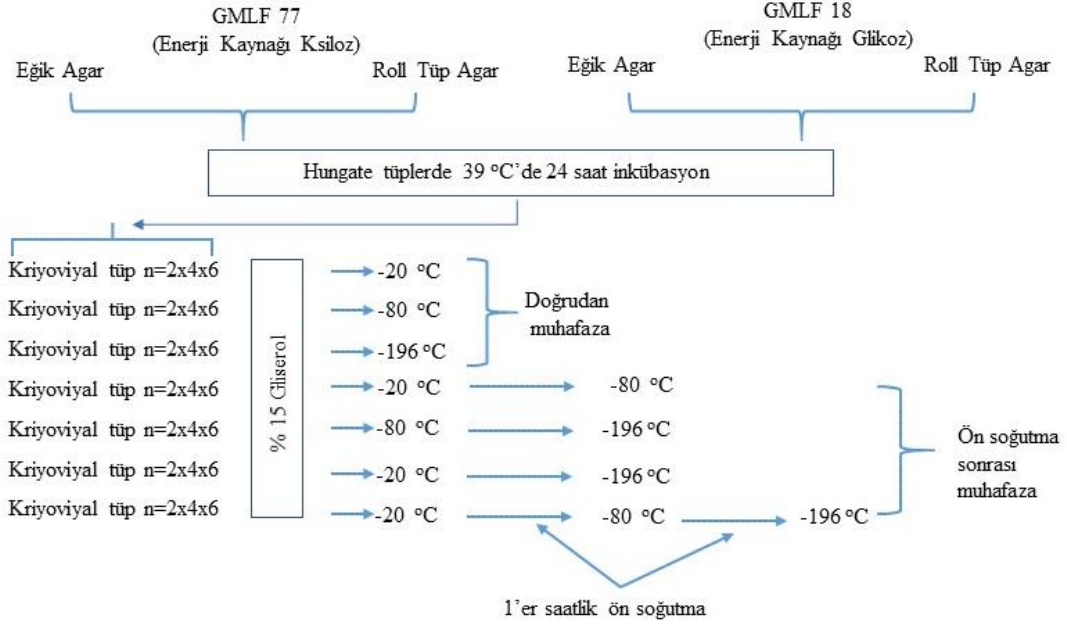
GMLF18 izolatının aktive edilmesi

İzolatların dondurulma ve tavlama işlemleri Çömlekçiöğlü ve ark. (2008) tarafından rapor edilmiş olan metodoloji kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada GMLF18 izolatı sıvı azottan çıkartıldıktan sonra yavaş tavlama (buz içerisinde bekletilerek) şeklinde çözüldürülmüştür. Daha sonra CO₂ akımı altında kriyoprotektan olarak kullanılan gliserol enjektör yardımı ile alınmış ve fungal hücreler enerji kaynağı olarak glikoz içeren anaerobik sıvı besi yerlerine aktarılmıştır. Olası mikrobiyal bulaşığı engellemek amacıyla kültür şartları ve inokülasyon prosedürlerinde gerekli önlemler alınmıştır (Brookman ve ark., 2000).

Uzun süreli muhafaza deneme deseni

Uzun süreli muhafaza yönteminde Roll tüp agar ve eğik agar ile birlikte kullanılmak üzere hazırlanan ve enerji kaynağı olarak sırasıyla ksiloz ve glikoz içeren besi yerlerine GMLF77 ve GMLF18 izolatları inoküle edilerek 39 °C'de 24 saat süreyle Hungate tüplerinde (125x16 mm, Bellco Glass Inc., USA) inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda eğik agar ve roll tüp agar denemelerinde her bir örnek hattı için 24'er adet kriyoviyal tüp (4 muhafaza süresi x 6 tekrür) %15 gliserol (Solomon ve ark., 2016) kullanılarak muameleye alınmıştır. Bu örnekler ya doğrudan -20 °C, -80 °C ve -196 °C'de (sıvı azot - LN₂) muhafazaya tabi tutulmuş ya da dört farklı aşamalı soğutma ile



Şekil 1. Uzun süreli saklama koşullarını belirlemek üzere planlanan deneme deseni. Her bir izolat (GMLF77 ve GMLF18) için kurulan deneme hattında 2×4×6 (agar çeşidi × muhafaza süresi × tekrür) = 48 adet kriyoprotektan (%15 gliserol) içeren kriyoviyal tüp kullanılmıştır.

Figure 1. Experimental design planned for long-term storage conditions. In the experimental line established for each isolate (GMLF77 and GMLF18), 2×4×6 (agar type × storage period × repeats) = 48 cryovials including cryoprotectant (15% glycerol) were used.

muhafazaya tabi tutulmuştur. Bu aşamalarda örnekler; i) -20 °C'de 1 saat soğutulup -80 °C'de muhafaza edilmiş; ii) -80 °C'de 1 saat soğutulup sonra -196 °C'de muhafaza edilmiş; iii) -20 °C'de 1 saat soğutulup -196 °C'de muhafaza edilmiş; iv) sırasıyla -20 °C ve -80 °C'de 1'er saat soğutulup -196 °C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 1). Muhafaza süreleri her bir örnek hattı için 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta ve 6 ay olarak uygulanmıştır.

Her bir muhafaza periyodundan (1 hafta, 2 hafta, 3 hafta ve 6 ay) sonra soğuk muhafaza ortamından çıkarılan kriyoviyal tüpler (6'şar adet) buza konularak oda sıcaklığında çözündürülmüştür (yavaş çözünme). Çözünmüş olan GMLF77 izolatu enerji kaynağı olarak ksiloz, GMLF18 izolatu ise glikoz içeren sıvı besi yerlerine (ortamdaki kriyoprotektan madde uzaklaştırıldıktan sonra) karbondioksit akımı altında öze kullanılarak aktarılmıştır. Anaerobik fungusların optimum gelişim gösterdiği 39 °C'de inkübatöre bırakılan örneklerin gelişimleri 14 gün süreyle ters (inverted) mikroskop (SOIF XDS-1B) kullanılarak gözlemlenmiştir (Theodorou ve ark., 1994).

BULGULAR

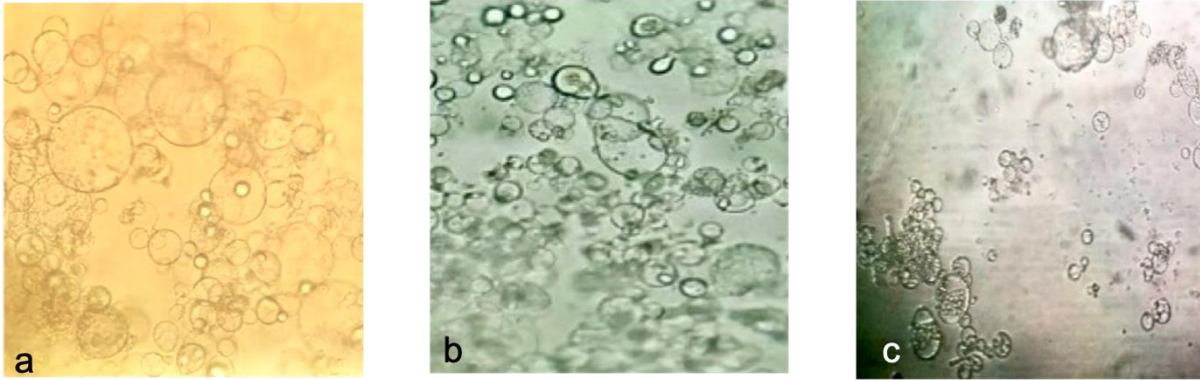
GMLF77 izolatının izolasyonu aşamasında 5 farklı enerji kaynağı (buğday samanı, sükröz, dekstroz, glikoz veya ksiloz) kullanılmış ve izolatın optimum gelişim ve üremeyi besi yerlerinde ksiloz kullanıldığında gerçekleştirdiği belirlenmiştir. İzolat en zayıf metabolik faaliyeti ise besi yerlerinde enerji kaynağı olarak sükröz kullanıldığında göstermiş, hatta uzun süreli sükröz içeren besi yerlerinde alt kültür çalışması yapıldığında izolatın gelişiminin oldukça yavaşlaması ve kültürün kaybedilme riskinin ortaya çıkması söz konusu olmuştur. Fakat dönüşümlü olarak sükröz-dekstroz veya sükröz-glikoz ya da sükröz-ksiloz gibi sıralı kültür çalışmaları yapıldığında izolatın normal gelişimine devam ettiği gözlemlenmiştir. Besi yerlerinde suda erimeyen enerji kaynağı olan buğday samanı kullanıldığında ise metabolik faaliyetin minimum olduğu ve gelişimin göreceli olarak zayıf olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda enerji kaynağı olarak buğday samanı kullanıldığında GMLF77'ye ait gelişim incelenmiş ve popülasyonda zoospor salınımı gözlemlenememişken, enerji kaynağı olarak ksiloz bulunan besi yerinde ise yaygın bir zoospor salınımı gözlemlenmiştir (veri gösterilmemiştir). Bu nedenle araştırmada GMLF77 izolatının kültür çalışmaları ve

uzun süreli muhafazaları denemelerinde besi yerlerinde enerji kaynağı olarak ksiloz kullanılmıştır.

GMLF77 izolatının ağ şeklinde filamentli yapıda değil küresel rizoidal yapıda tallus formuna sahip olması, zoosporlarının çok kamçılı olması, her bir tallus için bir adet kese boynu ve bir adet zoospor kesesi içermesi gibi temel morfolojik özelliklerinden dolayı putatif olarak *Caecomyces* olarak tanımlanmıştır (Şekil 2).

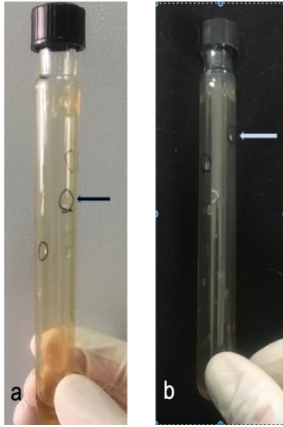
Orpinomyces GMLF18 izolatı sıvı azottan çıkarıldıktan sonraki kültür çalışmalarında besi yerlerinde dekstroz,

sükroz, ksiloz, glikoz ve buğday samanı olmak üzere 5 farklı enerji kaynağı kullanılmıştır. Araştırmanın ilk aşamaları olan kültüre alıştırma döneminde (5-6 alt kültür) kullanılan bu enerji kaynaklarının tamamında GMLF18 izolatının benzer büyüme aktivitesi göstermesi (veriler gösterilmemiştir) ve agarlı besi yerlerinde kullanım kolaylığı nedeniyle glikoz enerji kaynağı olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla araştırmanın sonraki aşamalarında (kültüre alma ve uzun süreli muhafaza denemeleri) GMLF18 izolatı için besi yerlerinde enerji kaynağı olarak glikoz kullanılmıştır.



Şekil 2. GMLF77 izolatının farklı enerji kaynakları içeren besi yerlerindeki gelişimini örnekleyen mikroskopik görüntüler. Enerji kaynağı olarak ksiloz içeren besi yerinde gelişim (a), glikoz içeren besi yerindeki gelişim (b), dekstroz içeren besi yerindeki gelişim (c) (100 × 0.25 SOIF XDS-1B ters mikroskop görüntüsü).

Figure 2. Exemplified microscopic images of the isolate GMLF77 growing on the media containing various energy sources. Xylose (a), glucose (b), and dextrose (c) as sole energy sources (100 × 0.25 SOIF XDS-1B inverted microscope image)



Şekil 3. Enerji kaynağı olarak ksiloz içeren Roll tüp agar tüplerinde GMLF77 izolatında 48 saat sonunda gelişim gözlenmeye başlamışken (a), glikoz içeren besi yerinde inkübe edilen GMLF18 izolatında ilk koloni gelişimi 24 saatin sonunda gerçekleşmiştir (b).

Figure 3. In Roll tube agar tubes containing xylose as an energy source, the GMLF77 isolate started to grow at the end of 48 hours (a), while the first colony development in the GMLF18 isolate incubated in the medium containing glucose was observed at the end of 24 hours (b).

Fungal gelişimi belirlemek amacıyla *Caecomyces* GMLF77 ve *Orpinomyces* GMLF18 izolatları enerji kaynağı olarak sırasıyla ksiloz ve glikoz kullanılmış olan roll tüp agara ekimleri yapılmış, 39 °C'de koloni gelişimi görülene kadar inkübasyona bırakılmıştır. Mevcut çalışma kapsamında izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiş olan GMLF77 izolatı için 48 saatlik inkübasyon sonrası koloni gelişimi gözlemlenmişken (Şekil 3a), GMLF18 izolatı için daha hızlı bir gelişim sözü konusu olmuş ve 24 saatin sonunda koloni gelişimi gözlemlenmiştir (Şekil 3b). Bu durum aynı şekilde izolatlar eğik agar içerisinde kültüre alındıklarında da gözlemlenmiştir.

Farklı Sıcaklıklardaki Muhafaza Sonuçları

Fungal izolatların muhafaza sıcaklığı olarak -20 °C, -80 °C ve -196 °C ile bu sıcaklıkların dört farklı kombinasyonu denenmiştir. Bu düşük sıcaklıklarda 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta ve 6 ay süreyle muhafaza edilen izolatlar yavaş çözünme ile çözdürülmüş (her bir deneme için 6 kriyoviyal tüpün tamamı) ve GMLF77 izolatı ksiloz içeren, GMLF18 izolatı ise glikoz içeren sıvı besi yerlerine aktarılmıştır. Deneme hatasını minimize etmek amacıyla her birinden 2 tüpe aktarım yapılmış

Turgut ve ark.

olan izolatlarda 39 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince tüm tüpler günlük olarak mikroskop yardımıyla incelenmiş ve pozitif tüpler belirlenmiştir. İnkübasyonun 14. gününde hala fungal gelişim gözlenemeyen tüpler negatif (aktifleşme gerçekleşmeyen) olarak değerlendirilmiştir. *Caecomyces* GMLF77 izolatu, muhafaza sıcaklığının -20 °C olduğu ve bu sıcaklıkla başlayan tüm sıcaklık kombinasyonlarında yaşama şansı bulamamış sadece -20 °C ve sonrasında -196 °C'ye aktarıldığında 1. hafta sonunda %17'lik zayıf bir aktifleşme söz konusu olmuştur. Muhafaza sıcaklığı olarak doğrudan -196 °C kullanılması durumunda ise %67 ile en yüksek aktifleşme oranı gözlemlenmiştir. *Orpinomyces* GMLF18 izolatu ise 1 haftalık muhafaza sürecinde kullanılan tüm sıcaklıklar ve sıcaklık kombinasyonlarında yaşama şansı bulmuştur. Bu izolatin en yüksek aktifleşme oranı (%100) ise kültürün doğrudan -196 °C'ye aktarılması ve bu sıcaklıkta muhafaza edilmesi durumunda elde edilmiştir. *Orpinomyces* GMLF18 izolatu için de GMLF77 izolatına benzer şekilde, doğrudan -20 °C'ye aktarılma ve -20 °C

ön soğutma ile başlayan muhafaza sıcaklıkları deneme sonunda ölçülen aktifleşme oranları, -20 °C ve sonrasında -196 °C'ye aktarma hariç, en düşük seviyede gerçekleşmiştir (Çizelge 1, Çizelge 2). Çalışma kapsamında ön soğutma olarak 1 saatlik 4 °C (buzdolabı sıcaklığı) muamelesi de denenmiş fakat hiçbir kombinasyon ve muhafaza sürecinde her iki izolat için de aktifleşme gerçekleşmemiştir (veri gösterilmemiştir).

Eğik Agar Üzerinde Uzun Süreli Muhafaza

Eğik agar tekniği ile muhafaza sonuçları incelendiğinde, hiçbir ön soğutma işlemi uygulanmadan -196 °C'de 1 haftalık muhafazadan sonra GMLF77 ve GMLF18 izolatlarına ait aktifleşme oranları sırası ile %67 ve %100 olarak belirlenmiştir. Diğer yandan doğrudan -20 °C'ye aktarılmış örnekler ile -20 °C'de ön soğutma yapıp -80 °C'de muhafaza edilen ve eğik agar üzerinde kültüre alınmış olan GMLF77 izolatında deneme sürelerinin hiçbirinde aktifleşme / canlılık görülmemiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Eğik agarda farklı sürelerde düşük sıcaklıklarda muhafazadan sonra aktifleştirilen GMLF77 ve GMLF18'in enerji kaynağı olarak sırasıyla ksiloz ve glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşama oranları (---: Aktifleşme negatif).

Table 1. Survival rates of the isolates GMLF77 and GMLF18, activated after storage at low temperatures for different periods of time in the agar slant, in media containing xylose and glucose as energy sources, respectively (---: No resuscitation)

EĞİK AGAR								
Saklama Süreleri	GMLF77 (Enerji Kaynağı Ksiloz)				GMLF18 (Enerji Kaynağı Glikoz)			
	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	6. Ay	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	6. Ay
Doğrudan -20 °C	---	---	---	---	%33.3	---	---	---
Doğrudan -80 °C	%16.6	%33.3	%50	%16.6	%33.3	%66.6	%50	%33.3
Doğrudan -196°C	%66.6	%50	%50	%66.6	%100	%66.6	%66.6	%83.3
-20 °C'den -80 °C	---	---	---	---	%16.6	%16.6	%16.6	---
-80 °C'den -196°C	%33.3	---	%33.3	---	%66.6	%33.3	%50	%33.3
-20 °C'den -196°C	%16.6	---	---	---	%50	%16.6	---	---
-20 °C' -80°C ve -196°C	---	---	---	---	%33.3	%33.3	%33.3	---

İki haftalık muhafaza sürecinin sonunda -20 °C'de muhafaza edilen GMLF77 ve GMLF18'e ait örneklerin hiçbir tekerrüründe canlılık gözlemlenmemiştir. Ön soğutma işlemi yapılmamış ve doğrudan -196 °C'de muhafaza edilen her iki örnek için kullanılan 6 kriyoviyal tüpten yapılan aktifleştirme sonucunda GMLF18 izolatında %67 aktifleşme söz konusu iken, GMLF77 izolatında %50 oranında gelişim belirlenmiştir.

Eğik agar yöntemi ile yapılan 3 haftalık muhafaza süresinin sonunda GMLF77 izolatının aktifleşme oranı diğer haftalarla karşılaştırıldığında -80 °C'de arttığı ancak en yüksek yaşama oranına ise izolatin ön soğutma işlemi yapmadan doğrudan -196 °C'ye alındığı ve bu sıcaklıkta muhafaza edildiği durumda gerçekleştiği belirlenmiştir (Çizelge 1).

GMLF18 ve GMLF77 izolatlarının aynı deneme deseninde 1 aylık ve 3 aylık uzun süreli muhafaza sonucu yaşama oranlarının 3 haftalık muhafaza sonuçları ile paralel gerçekleştiği belirlenmiştir (veri gösterilmemiştir). Eğik agarda 6 aylık muhafaza süresi sonunda en yüksek aktifleşme oranı GMLF77 ve GMLF18 izolatları için sırası ile %67 ve %83 ile ön soğutma uygulanmadan -196 °C 'de muhafaza edilen kriyoviyallerde gözlemlenmiştir. Her iki izolat için de -20 °C ve ön soğutmada -20 °C'nin kullanıldığı tüm kombinasyonlarda, GMLF18 için bazı istisnalar dışında, aktifleşme oranının en düşük seviyede gerçekleştiği tespit edilmiştir (Çizelge 1). Eğik agar denemesi değerlendirildiğinde genel olarak uzun süreli muhafaza işleminde başarı yüzdesi oldukça düşük olan GMLF77 izolatı ve diğer izolat GMLF18 için en uygun muhafaza yönteminin doğrudan -196 °C uygulaması olduğu belirlenmiştir.

Roll Tüp Agar Üzerinde Uzun Süreli Muhafaza

Roll tüp yönteminde agar içeren besi yerleri kültür tüplerinin iç yüzeyinde göreceli ince (ca 0.5 mm) bir

tabaka oluşturması ve fungal gelişimin temel olarak agar yüzeyinde gerçekleşmesi nedeniyle eğik agar metodundan ayrılmaktadır. Bu farklılığın fungusların uzun süreli düşük sıcaklıkta muhafaza koşullarında yaşama oranlarına olası etkisi de bu çalışma kapsamında araştırılmıştır. Bu amaçla aşamalı olarak düşük sıcaklıklarda tutulan her iki fungal izolat eğik agarda yetiştirilen izolatlar ile aynı deneme modeline tabi tutulmuş (Şekil 1) ve aynı periyotlarda yeniden aktifleştirme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle farklı ön soğutma muamelelerine tabi tutulmuş ve belirlenen sürelerde muhafaza edilmiş izolatlar ait bulgular Çizelge 2'de verilmiştir. Roll tüp agar kullanılarak yapılan deneme sonucunda her iki izolat için en iyi gelişimlerin kültürlerin doğrudan -196 °C sıcaklığa aktarılmaları ve burada muhafaza edilmeleri durumunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Muhafaza sıcaklıklarından -20 °C'nin kullanıldığı denemelerde ise GMLF77 izolatında aktifleşme olmazken, GMLF18 izolatında en düşük aktifleşme oranı gözlemlenmiştir.

Çizelge 2. Roll tüp agarda farklı sürelerde düşük sıcaklıklarda muhafazadan sonra aktiveleştirilen GMLF77 ve GMLF18'in enerji kaynağı olarak sırasıyla ksiloz ve glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşama oranları (---: Aktifleşme negatif).

Table 2. Survival rates of the isolates GMLF77 and GMLF18, activated after storage at low temperatures for different periods of time in the Roll tube agar, in media containing xylose and glucose as energy sources, respectively (---: No resuscitation)

ROLL TÜP AGAR								
Saklama Süreleri	GMLF77 (Enerji Kaynağı Ksiloz)				GMLF18 (Enerji Kaynağı Glikoz)			
	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	6. Ay	1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	6. Ay
Doğrudan -20 °C	---	---	---	---	%33.3	%16.6	---	---
Doğrudan -80 °C	%33.3	%50	%33.3	---	%83.3	%50	%50	%33.3
Doğrudan -196°C	%66.6	%50	%50	%50	%83.3	%83.3	%83.3	%66.6
-20 °C'den -80 °C	---	---	---	---	%33.3	---	---	---
-80 °C'den -196°C	%33.3	---	---	---	%66.6	%33.3	%33.3	%33.3
-20 °C'den -196°C	---	---	---	---	%16.6	---	---	---
-20 °C' -80°C ve -196°C	---	---	---	---	%16.6	---	---	---

Roll tüp agar muhafaza denemesinde GMLF77 ve GMLF18 izolatları için en kısa süre olan 1 haftalık muhafaza süresinde en yüksek canlılık oranı sırası ile %67 ve %83 ile doğrudan -196 °C'de saklanan örneklerde gözlemlenmiştir. Bu besi yerinde 2 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF77 ve GMLF18 izolatları için elde edilen aktifleşme verilerinin, 1 haftalık muhafaza süresinde elde edilen veriler ile

yaklaşık özellikleri taşıdığı belirlenmiştir. En uzun süreli saklama süreci olan 6 aylık dönem için en yüksek canlılık oranı GMLF77 ve GMLF18 izolatları için sırası ile %50 ve %67 oranında doğrudan -196 °C'de muhafaza edilen kültürlerde gözlemlenmiştir. Roll tüp agar kullanılarak doğrudan -196 °C'de yapılan 6 aylık muhafaza işleminin GMLF77 izolatının yaşama oranına önemli bir etkisinin olmadığı fakat GMLF18 izolatının

%83 olan aktifleşme oranının bu süreç sonunda kısmen etkilenecek %67'ye gerilediği belirlenmiştir. Buna göre Roll tüp agar yöntemi ile stok alınan GMLF77 ve GMLF18 izolatlarının muhafaza süresinin uzamasının (6 aya kadar belirlenmiştir) stoklardaki canlılık oranlarını önemli ölçüde değiştirmedeği görülmüştür (Çizelge 2).

Roll tüp agar ile muhafaza çalışmasının diğer zaman dilimlerinden 1 aylık zaman dilimi ile 3 aylık zaman dilimindeki muhafaza sonuçları (veri gösterilmemiştir) ile 6 aylık muhafaza süreci sonunda elde edilmiş olan aktifleşme oranları benzer bulunmuştur. Bir başka anlamda bu süreler içerisinde aktifleşme oranlarında bir azalma görülmediği gibi aktifleşme gözlemlenmeyen sıcaklıklarda da herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak hem *Caecomyces* GMLF77 hem de *Orpinomyces* GMLF18 izolatlarının ön soğutma işlemine tabi tutularak daha sonra düşük sıcaklıklarda (LN₂ içerisinde) muhafazasının kültürlerde aktifleşme oranının kayda değer oranlarda düşmesine neden olduğu görülmüştür. Diğer taraftan doğrudan -196 °C sıcaklıklarda muhafaza edilen hücrelerin ise muhafaza sürelerinin uzamasına paralel olarak aktifleşme oranlarının önemli ölçüde azalmadığı belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde ise Roll tüp agar kullanılarak yapılan uzun süreli muhafaza sonucunda kültürlerin aktifleşme oranının aynı şartlarda eğik agar yöntemi kullanılarak yapılan uzun süreli muhafazaya göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Caecomyces GMLF77 izolatının enerji kaynağı olarak ksiloz içeren sıvı besi yerlerinde 24 saatlik zaman diliminde gelişimini tamamladığı (bir sonraki generasyonu oluşturma süresi) ve zoospor salınımının tetiklenerek daha fazla zoospor popülasyonunun olduğu gözlemlenmiştir. *Caecomyces spp.*'nin farklı enerji kaynakları kullanıldığında yaşam siklusunun 48 saatlere kadar çıkması ve çok az zoospor salınımı görülen bir cins (Chen 2007; Henske ve ark. 2017) olarak bilinmesi nedeniyle bu cinsin kültür çalışmalarında besi yerlerinde enerji kaynağı olarak ksiloz kullanımı önerilebilir. Mevcut çalışmada Roll tüp agar içerisinde bu izolatın ancak 48 saat sonra gözlemlenebilir hale gelmesi ise ilk kültür esnasında inoküle edilen canlı hücre sayısının sınırlı olması ile açıklanabilir.

Çalışmada kullanılan her iki AGF izolatu için eğik agar üzerinde kültüre alındıklarında en uygun muhafaza yöntemi doğrudan sıvı azot (LN₂) içerisinde saklanmaları olmuştur. Bu şekilde yapılan muhafaza işleminde GMLF18 ve GMLF77 izolatları için 6 ay sonunda sırasıyla %83 ve %67'lik bir aktifleşme söz konusu olmuştur. Özellikle LN₂ içerisinde uzun süreli

muhafazası göreceli olarak daha zor olan *Caecomyces spp* göz önünde bulundurulduğunda (Ozkose, 2001) GMLF77 için 6 aylık süreç sonunda ulaşılan %67'lik aktifleşme oranı önem arz etmektedir. *Caecomyces spp*, diğer AGF izolatlarında olduğu gibi kısa süreli muhafaza edebilmek adına laboratuvar koşullarında temel besi yerlerinde 2-7 gün içerisinde taze besi yerlerine alt kültüre alınması gerekir (Theodorou ve ark., 1994). Ayrıca *Caecomyces* cinsinin uzun süreli muhafazası için -80 °C'de koruyucu madde olarak etilen glikol ya da DMSO kullanılması durumunda gliserol kullanımına oranla daha yüksek aktifleşme oranları elde edilmiş (Nagpal ve ark., 2012), ancak en yüksek korunma oranı DMSO kullanıldığında yine LN₂ içerisinde muhafaza edildiğinde gerçekleşmiştir. Mevcut çalışmada GMLF77 izolatının -80 °C'de koruyucu etken madde olarak gliserol kullanılmasına rağmen aktifleşme oranlarının düşük olması önceki çalışmaları destekler niteliktedir. Ayrıca çalışmaya ait en uzun muhafaza (6 ay) süresi içerisinde optimum aktifleşmelerin kültürler doğrudan LN₂'ye (-196 °C) aktarıldığında gerçekleştiği belirlenmiştir. *Caecomyces spp.* için Orpin besi yerinde (Orpin, 1976) yapılan çalışmada buzdolabı sıcaklığı olan 4-7 °C'ler arasında ikinci haftadan sonra kültürler yaşama şansı bulamadığı gibi (Nagpal ve ark., 2012) mevcut çalışmada ön soğutma kısmında 4 °C'de yapılan denemelerin hiç birinde aktifleşme gerçekleşmemiştir.

Caecomyces sp.'i düşük sıcaklıktan alıp tekrar aktifleştirmek için denenen farklı yöntemler olmasına rağmen aktifleşme yüzdesinin diğer cinslerin yaşama oranları göz önünde bulundurulduğunda düşük olduğu görülmüştür. Mevcut çalışma kapsamında etkinlikleri araştırılmış olan Roll tüp agar ile eğik agar içerisinde yapılan uzun süreli muhafaza yöntemlerinde ise eğik agar kullanımının temel anlamda daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Eğik agar yönteminin göreceli olarak daha başarılı olması ise bu yöntemde agarın AGF hücrelerini sarması ve düşük sıcaklıklara karşı hücre yapılarının ve bütünlüğünün korunmasında kriyoprotektan maddelere yardımcı olmasından kaynaklandığı öngörülmektedir. Fakat bu etkinlikte, kullanılan kriyoprotektanın hücre içine emilim hızının mı (Gaidhani ve ark., 2015) etkili olduğu yoksa agar miktarının mı kritik öneme haiz olduğu henüz bilinmemektedir. Bununla birlikte, dondurarak saklamada DMSO kullanımının, çözündürme sonrasında kültüre alma noktasında yaklaşık %30-50 oranında kayıpla sonuçlanabildiği rapor edilmiştir (Yarlett ve ark., 1986). Bu çalışmada ise DMSO yerine %15 gliserol kullanılmış ve dondurarak muhafaza edilerek agar içerisindeki kolonilerin düşük sıcaklıklardan daha az etkilenecek hücre bütünlüklerinin korunması amaçlanmıştır. Yine aynı şekilde mikroorganizmaların

istemleri doğrultusunda optimum gelişim gösterdiği enerji kaynaklarında gelişimleri de göz önünde bulundurulmuş ve buradan doğabilecek olumsuzluklar da giderilmek istenmiştir. Dolayısı ile GMLF77 izolatu için enerji kaynağı olarak en iyi metabolik faaliyet gösterebildiği ksiloz kullanılarak agarlı besi yeri içerisindeki gelişimlerinin iyileştirilmesi sağlanmıştır.

GMLF18 izolatu için uzun süreli düşük sıcaklıkta muhafazadan sonra elde edilmiş olan sonuçlar GMLF77 izolatu ile paralellik göstermiştir. Enerji kaynağı olarak glikoz kullanılan besi yerlerinde kültüre alınan ve agarlı besi yerlerinde uzun süreli muhafazaya alınmış olan bu izolat için en uygun yöntemin ön soğutma uygulanmadan kriyoviyallerin doğrudan LN₂'ye aktarılması olduğu belirlenmiştir. Ancak GMLF77 izolatıyla karşılaştırıldığında daha yüksek aktifleşme oranına (%100'e varan) sahip olduğu belirlenmiştir. Bu izolat için de en düşük aktifleşme oranı ön soğutma olarak -20 °C'nin kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir. Diğer bir ökaryotik mikroorganizma grubu olan algler (Campbell ve ark., 2020) ile ökaryotik anaerobik gut mikroorganizması olan protozoanlar (Ksidayova, 1995) için uygulanan iki aşamalı muhafaza yönteminde daha başarılı sonuçlar elde edilmesine karşın benzer sonuçlar bu deneme kapsamında kullanılan AGF için söz konusu olmamıştır.

Sıcaklık değişimleri göz önüne alındığında -20 °C'de, -80 °C'ye ya da -196 °C'ye göre daha yavaş donduğu için canlılıklarını yitirdikleri düşünülmektedir. Aynı zamanda -80 °C'de ya da -196 °C'de bekletilen fungusların daha hızlı donup daha az hücre ölümünün gerçekleşmesinden dolayı çözüldürüldüklerinde aktifleşme şansının -20 °C'de muhafaza edilenlere göre daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, fungusların muhafaza edildikleri ortamlarda canlılıklarını kaybetmemeleri ve farklı karakterlere sahip olan cinslerin geri kazanımları sırasında canlılık oranlarının önemi büyüktür. Anaerobik gut funguslarının açık alanda hava ile temaslı konumda 10 ay kadar dışkı içerisinde canlı kalabilmeleri (Milne ve ark. 1989; Theodorou ve ark. 1990; McGranaghan ve ark. 1999) veya dondurulmuş dışkı içerisinde popülasyon çeşitliliği ve miktarında önemli bir değişiklik olmadan muhafaza edilebilmeleri (Griffith ve ark., 2009), saf kültür halinde uzun süreli muhafaza edilmelerine bir alternatif olarak düşünülebilir. Fakat bu gibi durumlarda mikroorganizmanın tekrar izolasyon ve uzun süren bir saflaştırma işlemine tabi tutulması gerekir ki bu olgu önerilen alternatiflerin kullanımını önemli ölçüde kısıtlamaktadır.

Günümüze kadar anaerobik gut funguslarının düşük sıcaklıkta uzun süreli muhafazası için henüz optimum muhafaza koşullarını içeren standart bir protokolün mevcut olmayışı bu konuda yeni çalışmaların

oluşturulmasını kaçınılmaz kılmaktadır. Mevcut çalışma, bu bağlamda, güncel bilgi birikimimize önemli katkılar sunacaktır. Özellikle kriyoprotektan maddelerin korunması planlanan hücre içerisine geçiş hızları ve LN₂ içerisine konmadan önce mikroorganizmaların kriyoviyal içerisinde optimum kalma sürelerinin belirlenmesi (kriyoprotektanların hücre içerisine emilimine vakit tanınması açısından) bu konudaki bilgi birikimine önemli katkılar sağlayacak sonraki çalışmalar olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmaya Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri birimince (2021-6-17D) kısmi maddi destek sağlanmıştır. Makalenin oluşturulmasında Tuğçe Turgut'un doktora çalışması verilerinden kısmen faydalanılmıştır.

KAYNAKLAR

- Akyol I, Comlekcioglu U, Kar B, Ekinci M, Ozkose E. 2009. Cloning of a xylanase gene xyn2A from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia*, 64(4), 664-670.
- Atanasova-Pancevska N, Kungulovski D. 2018. Fermentative activity of five strains of *N. frontalis* cultivated on a different substrates. *Macedonian Journal of Animal Science*, 8(1), 33-40.
- Brookman JL, Ozkose E, Rogers S, Trinci AP, Theodorou MK. 2000. Identification of spores in the polycentric anaerobic gut fungi which enhance their ability to survive. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 261-267.
- Campbell NC, Field J, MacKechnie K, Saxon RJ, Menéndez CR. 2020. Cryopreservation to sustain long term maintenance of algae and protozoa in the culture collection of algae and protozoa (CCAP). *Cryobiology*, 97, 279.
- Chen YC, Tsai SD, Cheng HL, 2007. *Caecomyces sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*. *Mycologia*, 99(1): 125-130.
- Chetverikova EP. 2009. The problem of stability of organisms after cryopreservation (fungi as example). *Biophysics*, 54(5), 626-630.
- Clark CG, Stensvold CR. 2016. Blastocystis: isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. *Current Protocols in Microbiology*, 43(1), 20A-1.
- Comlekcioglu U, Akyol I, Ozkose E, Kar B, Ekinci MS. 2008. Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7. *Annals of Microbiology*, 58 (1) 115-119.
- Davies, D.R., Theodorou, M.K., Lawrence, M.I. and Trinci, A.P.J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1395-1400.
- Ekinci MS, Özköse E, Akyol İ. 2006. Effects of sequential sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*. *Turkish Journal of Biology*, 30(3), 157-162.

- Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS. 2015. Lyophilization / freeze drying - A review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), 516-543.
- Griffith GW, Ozkose E, Theodorou MK, Davies DR. 2009. Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecology*, 2:87-97.
- Henske JK, Gilmore SP, Knop D, Cunningham FJ, Sexton JA, Smallwood CR, O'Malley MA. 2017. Transcriptomic characterization of *Caecomyces churrovii*: a novel, non-rhizoid-forming lignocellulolytic anaerobic fungus. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-12.
- Hooker CA, Hillman ET, Overton JC, Ortiz-Velez A, Schacht M, Hunnicutt A, Mosier NS, Solomon KV. 2018. Hydrolysis of untreated lignocellulosic feedstock is independent of S-lignin composition in newly classified anaerobic fungal isolate, *Piromyces* sp. UH3-1. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1-14.
- Hubalek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46: 205-229
- Hungate RE. 1969. Chapter IV A Roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 3, pp. 117-132). Academic Press.
- Joblin KN. 1981. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in Roll tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 1119-1122.
- Joblin KN, Naylor GE. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 65(1-2), 119-122.
- Korbitt GS, Rayat GR, Ezekowitz J, Rajotte RV. 1997. Cryopreservation of rat pancreatic islets: Effect of ethylene glycol on islet function and cellular composition. *Transplantation*, 64(7), 1065-1070.
- Lowe SE, Theodorou MK, Trinci APJ. 1987. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12) 105-121.
- McGranaghan P, Davies JC, Griffith GW, Davies DR, Theodorou MK. 1999. The survival of anaerobic fungi in cattle faeces. *FEMS Microbiology and Ecology*, 29(3), 293-300.
- Milne A, Theodorou MK, Jordan MGJ, King-Spooner C, Trinci APJ. 1989. Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva and in pure culture. *Experimental Mycology* 13: 27-37.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods* 66:183-193.
- Nagpal R, Puniya AK, Sehgal JP, Singh K. 2012 Survival of anaerobic fungus *Caecomyces* sp. in various preservation methods: a comparative study. *Mycoscience*, 53(6), 427-432.
- Orpin CG. 1975. Studies in the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 1975, 91, 249-262.
- Orpin CG. 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology* 94: 270-280.
- Orpin CG, Bountiff L. 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 104(1), 113-122.
- Ozkose E, Thomas BJ, Davies DR, Griffith GW, Theodorou, MK. 2001. *Cyllumyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6), 666-673.
- Ozkose E. 2001. Morphology and Molecular Ecology of Anaerobic Fungi (Doctoral dissertation, University of Wales).
- Ozkose E, Akyol I, Kar B, Comlekcioglu U, Ekinci MS. 2009. Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants. *Folia Microbiologica*, 54(4), 335-342.
- Öztürk S, Çakır İ. 2015 Mikroorganizma kültürlerinin korunmasında kullanılan kurutma yöntemleri. *Akademik Gıda Dergisi*, 75(82), 94-100.
- Patapoff TW, Overcashier DE. 2002. The importance of freezing on lyophilization cycle development. *Biopharm*, 15(3), 16-21.
- Solomon KV, Henske JK, Theodorou MK, O'Malley MA. 2016. Robust and effective methodologies for cryopreservation and DNA extraction from anaerobic gut fungi. *Anaerobe*, 38, 39-46.
- Theodorou MK, Gill MK, King-Spooner C, Beever DE. 1990. Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: A novel method for the quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1073-1078.
- Theodorou MK, Davies DR, Orpin CG. 1994. Nutrition and survival of anaerobic fungi. In: *Anaerobic Fungi: Biology, Ecology and Function* (edt DO Mountford and CG Orpin). Marcel Dekker, New York. p. 107-128.
- Yarlett N, Orpin CG, Munn EA, Yarlett NC, Greenwood CA. 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochemical Journal*, 236(3), 729-739.
- Yazdıcı FC, Yazdıcı F, Kar B, Özköse E, Ekinci MS. 2021. Anaerobik funguslarda hidrojenozomlar: Hidrojen üreten organeller. *Mantar Dergisi*, 12(2), 190-208.