



Candida boidinii'nin Farklı Suşlarının Deltamethrini Parçalama Potansiyellerinin *İn-vitro* Koşullarda Belirlenmesi^A

Ayşegül YILDIRIM KUMRAL^{1*}, Nabi Alper KUMRAL² Ozan GÜRBÜZ³

Öz: Bitkisel üretimde kullanılan pestisitlerin gıdalarda kalıntılarının azalmasını etkileyen önemli faktörlerden biri de mikrobiyal faaliyetlerdir. Bu çalışmada, zeytin fermentasyonu salamurasından izole edilen *Candida boidinii*'nin yedi farklı suşunun bitkisel üretimde sıkça kullanılan sentetik piretroitli insektisit deltamethrin'i parçalama potansiyeli invitro koşullarda incelenmiştir. Bu amaçla, maya hücrelerinin esteraz enzim aktiviteleri ve deltamethrini karbon kaynağı olarak değerlendirme durumları tespit edilmiştir. Esteraz enzim aktivitesi ve deltamethrini karbon kaynağı olarak değerlendirme potansiyelleri yüksek olan suşların insektisiti parçalama düzeyleri gaz kromatografisi kütle spektrofotometresi (GC-MS) kullanılarak belirlenmiştir. Test edilen yedi suşun ikisinde (CB-1 ve CB-5) hem hücre gelişimi hem de esteraz aktivitesi açısından önemli düzeyde yüksek faaliyet belirlenmiştir. GC-MS kalıntı analizine göre, iki suşun ilk üç günde deltamethrin miktarında başlangıca göre sırasıyla % 41.4 ve 22.5 oranında azalmaya sebep olduğu, maya bulunmayan kontrol grubunda ise bu oranın sadece %11 olduğu tespit edilmiştir. CB-5 suşunda 10 gün içinde önemli düzeyde daha fazla deltamethrin yıkımı (%91) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *C. boidinii*'nin farklı suşlarının deltamethrinin parçalanmasında rol oynayabileceği yönünde güçlü kanıtlar ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Deltamethrin, esteraz, insektisitler, mayalar, parçalanma, sentetik piretroitler.

^A Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OUB(Z)-2015/9 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: ^{1*} Ayşegül Yıldırım KUMRAL, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye, ayseguly@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0002-3550-7181](https://orcid.org/0000-0002-3550-7181),

² Nabi Alper KUMRAL, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bursa, Türkiye, akumral@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0001-9442-483X](https://orcid.org/0000-0001-9442-483X).

³ Ozan GÜRBÜZ, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye, ozang@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0001-7871-1628](https://orcid.org/0000-0001-7871-1628)

Determination of Deltamethrin Degradation Potentials of Different *Candida boidinii* Strains in *In-vitro* conditions

Abstract: Microbial activities are one of the important factors affecting the reduction of the residues of pesticides used during plant production in foods. In this research, the potential of seven strains of *Candida boidinii* previously isolated from olive fermentation brines for the degradation of synthetic pyrethroid insecticide deltamethrin, commonly used in crop production, was investigated under in-vitro conditions. For this purpose, esterase enzyme activities of yeast cells and evaluation of deltamethrin as a carbon source were determined. Esterase enzyme activity and insecticide degradation levels of strains with high potential to evaluate deltamethrin as a carbon source were determined by using gas chromatography mass spectrophotometer (GC-MS). Two of the seven strains (CB-1 and CB-5) were displayed significant high activity both in terms of cell development and esterase activity. According to the GC-MS residue analysis, it was determined that the two strains caused a 41.4% and 22.5% decrease in the amount of deltamethrin in the first three days, respectively, compared to the initial levels, while this ratio was only 11% in the non-yeast control group. Significant further deltamethrin degradation (91%) was determined within 10 days in CB-5 strain. According to the results obtained, strong evidence has been revealed that the different strains of *C. boidinii* may play a role in the degradation of the deltamethrin.

Keywords: Deltamethrin, esterase, insecticides, yeasts, degradation, synthetic pyrethroids.

Giriş

Son yıllarda bitkisel ürünlerde zararlı organizmalarla mücadele için bazı çevre dostu ve hedefe özel ürünler geliştirilmeye ve kullanılmaya başlansa da, bunların tüm dünya çapında kullanımı halen çok sınırlıdır. Bunun yerine ucuz ve hızlı etki gösteren sinir zehirlerinin kullanımı sıkça tercih edilmektedir (FAO, 2019). Türkiye'nin de dahil olduğu birçok ülkede son 10 yılda organikfosforlu, karbamatlı ve neonicotinoid grubundan birçok sinir sistemini etkileyen pestisitlerin tarımda yasaklanmasıyla beraber, diğer bir sinir zehiri olan sentetik piretroitli kimyasallara olan ilgi ve kullanım miktarı oldukça artış göstermiştir (Anonim, 2020a). Bu kimyasal grupta da en çok tercih edilen etken madde 1980'li yılların başından beri birçok kültür bitkisinde kullanılan deltamethrin'dir (Cycon ve ark., 2014). Etki mekanizması gereği ve hedef organizmada aktivite gösterebilmesi için düşük vücut sıcaklığına ihtiyaç duyması nedeniyle diğer sinir zehirlerine göre memelilere ve diğer sıcakkanlılara daha az zehirli olmaktadır (Simon, 2014). Yine de bu kimyasal grubun yüksek dozlarının insanlarda akut veya kronik olarak hormonal aktivite bozukluklarına, alerjik reaksiyonlara, deri iltihaplarına, lenf nodüllerine, dalak hasarına ve ishale neden olduğu bildirilmektedir (Regueiro ve ark., 2015; Anonim 2020b). Bu nedenle, bu kimyasalın taze meyve ve sebzelerde ve hatta işlenmiş gıdalarda kalıntılarının belirlenen sınır değerlerinin üstünde olmaması istenmektedir. Deltamethrin'in, bulunduğu ortamdaki sıcaklık, asitlik (pH) ve güneş ışığı koşullarına

bağlı olarak 11-72 gün içinde %50 düzeyindeki bir miktarı parçalanabilir. Hatta biyolojik etmenlerin özellikle de bazı mikrobiyal etmenlerin metabolik faaliyetleri ile bu süre çok daha kısalabilmektedir (Roberts ve ark., 1998; Chen ve ark., 2011; Simon 2014). Yine başka bir literatürde laboratuvar koşullarında deltamethrin'in yarılanma ömrününün 28 gün olduğu, yukarıda sayılan dış koşullara bağlı olarak bu sürenin 21 ile 58 gün arasında değiştiği ifade edilmektedir (Wu ve ark., 2006; Anonim, 2020b).

Işık almayan, sıcaklık ve pH değerlerinin değişmediği ortamlarda muhafaza edilen gıdalarda bulunan bu sentetik kimyasalların yıkımında mikrobiyal etmenlerin çok fazla etkisi bulunmaktadır. Bazı bakteri ve maya türlerinin bitkisel veya hayvansal gıdaların fermentasyonu sırasında insektisitleri parçalayabildiği birçok araştırmada ispatlanmıştır (Fatichenti ve ark., 1983, 1984; Misra ve ark., 1996; Cho ve ark., 2009; Islam ve ark., 2010; Zhao ve Wang, 2012; Bajwa ve Sandhu, 2014; Regueiro ve ark. 2015). Fermentasyon süreçlerinde çok önemli rol oynayan ve gıdalarda bulunması istenen *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Oenococcus* cinslerine ait bazı laktik asit bakterilerinin birçok sentetik insektisiti esteraz enzimleri ile hidrolize ederek parçaladığı veya karbon/enerji kaynağı olarak kullandığına dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Sogorb ve Vilanova, 2002; Choi ve ark., 2004; Ruediger ve ark., 2005; Maragkoudakis ve ark., 2006; Cho ve ark., 2009; Islam ve ark. 2010; Solmaz ve Ay, 2010; Kumral ve Kumral, 2013; Kumral ve ark., 2020). Benzer olarak, maya türlerinden *Saccharomyces cerevisiae* ve *Debaryomyces* türlerinin bazı insektisitleri fermentasyon süreçleri sırasında yıkıma uğrattığına dair önemli bulgular bulunmaktadır (Peric ve ark., 1980; Fatichenti ve ark., 1983, 1984; Dordevic ve ark., 2013). Bugüne kadar zeytinden izole edilen maya türlerinin insektisit yıkımındaki etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Özellikle yerli maya suşlarının ve özellikle bunlar arasından insan sağlığına olumlu olanlarının ortaya konması, ülkemizde sürdürülebilir gıda güvenliğinin sağlanması açısından da önemli bir konudur.

Bu nedenle bu çalışmada zeytin fermentasyonu sırasında daha önce tarafımızdan izole edilen *Candida boidinii* türünün farklı suşlarının esteraz enzim aktiviteleri ve insektisitleri karbon/enerji kaynağı olarak kullanma potansiyellerinin laboratuvar ortamında belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu yolla seçilen suşların deltamethrin'i parçalama kapasitesi *invitro* ortamda Gaz kromatografi - Kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak periyodik olarak izlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Test Mikroorganizmaları

Bu çalışmada, Kumral ve ark. (2013) tarafından Bursa ilinden toplanan Gemlik çeşidi zeytinlerin doğal fermentasyonu sırasında izole edilmiş ve tanısı yapılmış 7 farklı *Candida boidinii* suşu kullanılmıştır.

Kimyasallar

Deltamethrin ([[(S) – cyano - 3-phenoxyphenyl] methyl] (1R,3R) -3- (2,2 - dibromoethenyl) - 2,2 - dimethyl cyclopropane -1- carboxylate) standartı Sigma-Aldrich kimyasal firmasından sağlanmıştır. Denemelerde,

çözünürlüğü sağlamak amacıyla standardın dimetil sülfoksit içerisinde hazırlanmış stok çözeltisi kullanılmıştır (1000 mg L⁻¹). Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Mikrobiyal Gelişimin Belirlenmesi

Deltamethrinin maya suşları tarafından karbon/enerji kaynağı olarak kullanılma potansiyelini ölçmek amacıyla, standart Yeast Pepton Dekstroz (YPD) broth, hiçbir karbon kaynağı içermeyen Mineral Tuz Ortamı (MSM) ve karbon kaynağı olarak 0.1 g L⁻¹ konsantrasyonunda deltamethrin etken maddesi içeren MSM-DEL ortamları kullanılmıştır (Çizelge 1). Her üç ortamdaki maya hücresel gelişimi periyodik olarak izlenmiştir. Denemede YPD broth'da gelişmeye bırakılan 18-24 saatlik kültürler kullanılmıştır. YPD, MSM ve MSM-DEL ortamlarına aşılacak kültürler karbon kaynaklarından arındırılmak amacıyla 4°C ve 10.000 g'de 10 dakika olmak üzere 2 kez santrifüjlenmiş ve steril fizyolojik tuzlu su çözeltisi ile yıkanmıştır. Steril ortam çözeltileri ile süspansiyon haline getirilen hücrelerden, tüm deney ortamlarına 10⁷ log KOB mL⁻¹ düzeyinde maya hücresi içerecek şekilde aşılama yapılmıştır. Aşılama ortamları 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Cho ve ark., 2009). Hücresel gelişim düzeyleri 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak spektrofotometrik (Bio-Tek Instruments, Winooski, ABD) olarak izlenmiştir. Tüm deneyler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Hücresel gelişimin izlenmesinde kullanılan besi ortamları (Cho ve ark., 2009).

Bileşen (g L ⁻¹)	YPD* broth	MSM*	MSM-DEL*
Pepton	20	0.01	0.01
Maya ekstratı	10	-	-
Glikoz	20	-	-
Potasyum dihidrojen fosfat	-	2.27	2.27
Sodyum dihidrojen fosfat dodekahidrat	-	5.97	5.97
Sodyum klorür	-	1	1
Magnezyum sülfat heptahidrat	-	0.5	0.5
Kalsiyum klorür dehidrat	-	0.01	0.01
Magnezyum sülfat tetrahidrat	-	0.02	0.02
Ferrous sülfat heptahidrat	-	0.05	0.05
Deltamethrin	-	-	0.1

YPD: Yeast Pepton Dekstroz; MSM: Mineral Tuz Ortamı, MSM-DEL: Deltamethrin İçeren Mineral Tuz Ortamı

Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Maya suşlarının esteraz aktivitesi Morichi ve ark. (1968) tarafından geliştirilen metot uyarlanarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Testlerde YPD broth'da gelişmeye bırakılan 18-24 saatlik kültürler kullanılmıştır. YPD broth'da 30°C'de gelişmeye bırakılan 16-24 saatlik kültürler, 4°C ve 10.000 g'de 10 dakika boyunca 2 kez santrifüjlenerek 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.0) yıkanmış ve aynı tampon içinde (3 mL) süspansiyon edilmiştir. Analiz karışımı olarak, 100 µL maya hücre süspansiyonu, 60 µL 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 20 µL α-naftil asetat (10 mM dimetil sülfoksit içinde çözünmüş) ve 20 µL fast blue RR (1.5 g

L⁻¹) boya çözeltisi kullanılmıştır. Analiz karışımlarının birine 100mg L⁻¹ dozunda deltamethrin standardı katılırken, kontrol olarak diğerine sadece deltamethrinin çözöldüğü dimethyl sülfoksit katılmıştır. Kör örneklerde maya kültürü yerine sadece fosfat tamponu kullanılmıştır. Esteraz aktivitesi 23°C'de 60 dk süreyle 500 nm dalga boyunda kinetik olarak Monokromatörlü Mikroplaka Okuyucu (Bio-Tek, Winooski, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinin µmol p-nitrofenol dk⁻¹ mg protein⁻¹ olarak ifadesi için ilk önce örneklerdeki protein miktarı Bradford (1976) yöntemi ile tespit edilmiştir. Reaksiyon ürünü olan 1-naphthol'ın standart eğrisi, 500 nm'de Fast Blue RR boya kompleksi kullanılarak 7 farklı konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak elde edilmiştir. Bu standart eğrinin linear formülü absorbansın dönüşümünde kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008). Tüm testler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Deltamethrin Parçalanma Düzeylerinin Belirlenmesi

Mikrobiyal gelişme ve esteraz aktivitesi testlerinin sonuçlarına göre, en yüksek potansiyele sahip iki suş (CB-1 ve CB-5) ile deltamethrin parçalanma düzeyleri test edilmiştir. Bu amaçla hiçbir karbon kaynağı bulunmayan MSM ortamına 10⁷ log KOB L⁻¹ düzeyinde olacak şekilde maya hücresi ve 100 mg L⁻¹ dozunda deltamethrin standardı katılmıştır. Kontrol grubu olarak ise MSM ortamına aynı dozda deltamethrin katılırken maya kültürü eklenmemiştir. Deltamethrin'deki kalıntı miktarındaki değişimler 0., 3., 7., 10. ve 14. günde GC-MS metodu kullanılarak belirlenmiştir. Deltamethrinin ekstrasyonu ve saflaştırmasında Aksu (2007)'nin sıvı örneklerde kullandığı metot kullanılmıştır. Kısaca, 5 mL MSM ortamına 5 mL acetonitrile-dichloromethane (1:1, v/v) katılmış ve üzerine 2 g susuz MgSO₄ ve 0.25 g NaCl eklenmiştir. Karışım 2 dakika boyunca vortekste sertçe çalkalanmış ve daha sonra 5 dakika 7000 g'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatanttan 2 mL çekilip, üzerine 0.15g MgSO₄ eklenmiştir. Bu karışımda 2 dakika boyunca vortekste sertçe çalkalandıktan sonra 5 dakika boyunca 7000 g'de santrifüje tabi tutulmuştur. Elde edilen üst fazdan GC-MS cihazına (Perkin Elmer Clarus 680 Gas Chromatography-Clarus SQ8T Mass Spectrometry, Ohio, ABD) 1 µL olarak yüklenmiştir. GC-MS cihazında Elite-5MS (PerkinElmer 30 m, 0.25 mm ID, film kalınlığı 0.25 µm) kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz helyum (1 mL dk⁻¹)'dur. İnjektion sıcaklığı 220°C ve miktarı ise 1 µL'dir. Fırın sıcaklığı lineer olarak artış gösterecek şekilde programlanmıştır: Dakikada 25°C artışla 70'den 150°C'ye; dakikada 2.7°C artışla 150'den 200°C'ye; dakikada 6°C artışla 200'den 285°C'ye ulaşmıştır. Bu protokole göre deltamethrin'in yakalanma zamanı 39.5 dakika olarak belirlenmiştir. Ayrıca, cihazın iyon kütüphanesine göre 51, 77, 91, 181 ve 253 m/z en tipik iyonları olduğu belirlenmiştir. Elde edilen pik alanlarının dönüşümü için deltamethrin'in metanolde hazırlanmış 5 farklı konsantrasyonundan (0.01 ile 100 mg L⁻¹) elde edilen lineer eğrinin formülü kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Farklı maya suşlarının esteraz aktivitelerinde ve deltamethrin kalıntılarındaki ortalamaların zamana bağlı değişimleri iki yollu ANOVA ile analiz edilmiştir. Farklı suşların farklı ortamlardaki hücre gelişmeleri ise tekrarlı ölçülmüş varyans analiz (MANOVA) testine tabi tutulmuştur. Daha sonra Tukey'in post hoc testi (p < 0.05) gerçekleştirilerek ortalamalar arasındaki farklıklar gruplandırılmıştır (SAS 2007).

Bulgular

Maya Hücrelerinin Gelişimi

Candida boidinii'nin farklı suşlarının üç farklı besi ortamında hücre gelişme eğrileri Şekil 1'de verilmiştir. Karbon kaynağınca zengin olan YPD ortamında tüm suşlar diğer ortamlara göre istatistiki anlamda önemli düzeyde daha fazla gelişme göstermiştir ($F_{2,2} = 10703.9$, $P < 0.01$). Maya hücrelerinin gelişimi açısından ikinci sırada karbon kaynağı olarak sadece deltamethrin bulunduran MSM-DEL ortamı yer almakta olup, hiç karbon kaynağı bulundurmeyen MSM ortamına göre önemli seviyede daha fazla maya hücresi gelişmiştir. Kullanılan besi ortamı kadar suşunda aynı ortamlarda istatistiki anlamda gelişme farklılığı gösterdiği belirlenmiştir ($F_{6,6} = 374.2$, $P < 0.01$). Özellikle karbon kaynağı olarak deltamethrin bulunduran besi ortamında CB-5 suşunda gelişme önemli seviyede yüksek bulunurken, bunu takiben sırasıyla CB-1 ve CB-3 suşlarında da diğer suşlara göre daha iyi bir gelişme saptanmıştır ($F_{12,12} = 404.0$, $P < 0.01$). Karbon kaynağı bulundurmeyen MSM besi ortamı hariç diğer besi ortamında maya hücre gelişiminin zamana bağlı olarak istatistiki anlamda farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($F_{5,5} = 1485.1$, $P < 0.01$). YPD besi ortamında birinci günden itibaren hücre gelişimi sürekli bir artış gösterirken, deltamethrin içeren besi ortamında ise bu artış ikinci güne kadar devam etmiştir. Artış trendi suşlara bağlı olarak ya sabitlenmiş ya da düşüş göstermiştir (Şekil 1).

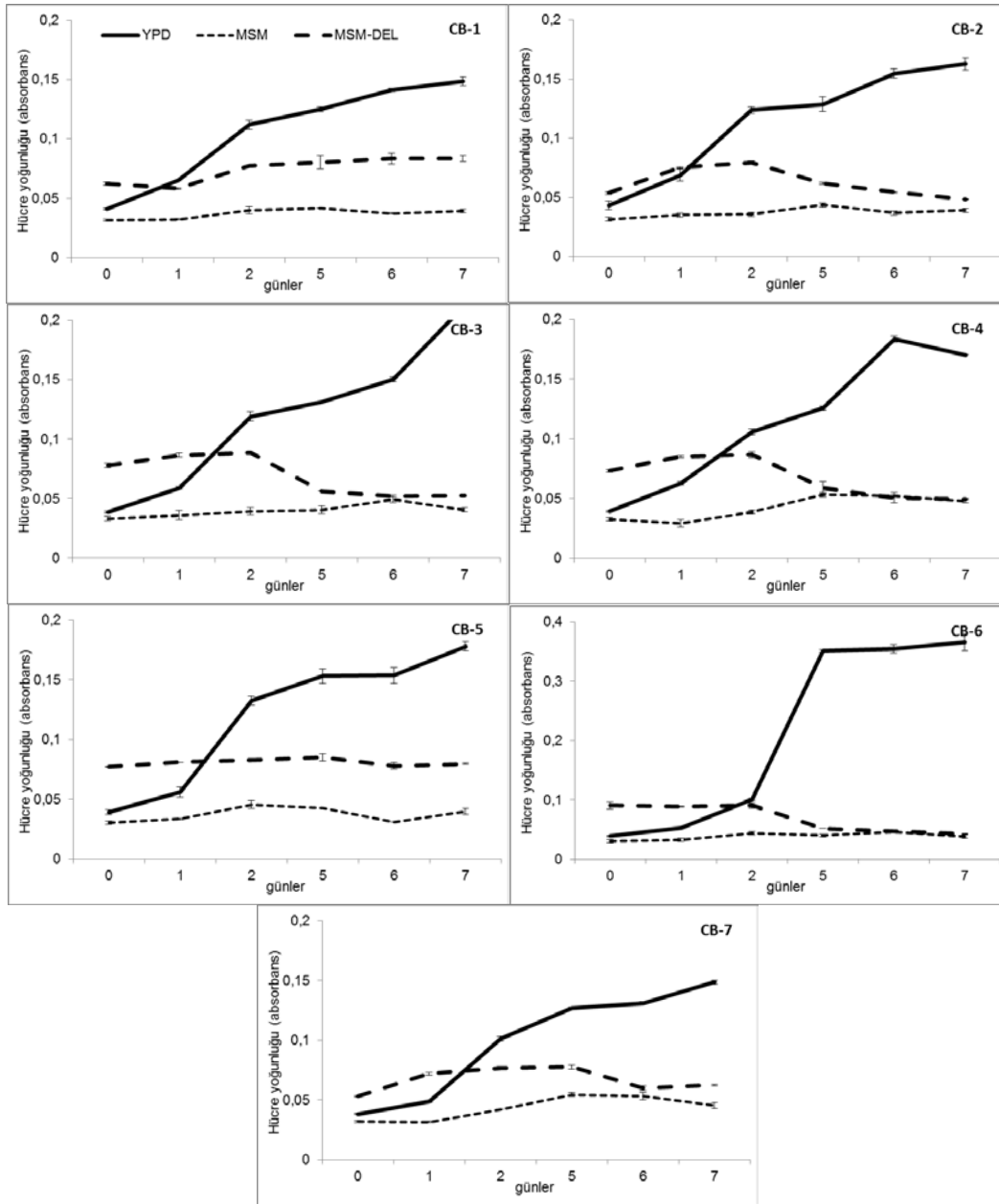
Esteraz Aktivitesi

Candida boidinii'nin farklı suşlarının deltamethrin içeren veya içermeyen ortamlarda esteraz aktivitesi ortalamaları Çizelge 2'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre esteraz aktivitesinin maya suşuna, deltamethrin içermesine ve her ikisinin interaksiyonuna bağlı olarak önemli düzeyde değiştiği belirlenmiştir (maya suşu $F_{6,6} = 3.2$, $P = 0.015$; deltamethrin katkısı $F_{1,1} = 86.0$, $P < 0.01$; suş x deltamethrin $F_{6,6} = 2.9$, $P = 0.02$). Özellikle CB-1 ve CB-5 suşlarına deltamethrin katıldığında esteraz aktivitesinin önemli düzeyde yükseldiği belirlenmiştir. CB-1 ve CB-5 suşlarının deltamethrin katılmayan örneklerine nazaran bu örneklerde sırasıyla 4.31 ve 5.97 kat daha fazla esteraz aktivitesi saptanmıştır. İstatistiki anlamda en düşük aktiviteler deltamethrin katılmayan CB-2, CB-4 ve CB-7 suşlarında bulunmuştur.

Deltamethrin Parçalanma Sonuçları

İki farklı suşun bulunduğu MSM ortamları ile herhangi bir maya içermeyen MSM ortamındaki deltamethrin miktarındaki zamana göre değişim Şekil 2'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre muamelenin ve zamanın deltamethrin yıkımında önemli olduğu belirlenmiştir (muamele $F_{2,2} = 11.1$; $P < 0.01$; zaman: $F_{4,4} = 42.3$, $P < 0.01$; muamele x zaman $F_{8,8} = 1.6$, $P = 0.15$). Maya ile inkübasyondan 3 gün sonra, CB-1 suşunun bulunduğu MSM ortamında deltamethrin miktarı %41.4 oranında azalırken, CB-5 suşunda bu oran %22.4'de kalmıştır. Hiç maya bulunmayan kontrol grubunda ise deltamethrin miktarındaki azalma sadece %11 oranında gerçekleşmiştir. Başlangıç günündeki deltamethrin miktarları muameleler arasında farklılık göstermezken; üçüncü gün sonuçları arasındaki farklılık istatistiki anlamda önemli bulunmuştur. İnokülasyondan 7 gün sonra tüm muamelelerde

deltamethrin miktarının yarıdan fazlasının parçalandığı belirlenmiştir. Ancak, bu gündeki deltamethrin farklılığı önemli bulunmamıştır. Denemenin 10. gününde yapılan ölçümlerde kontrole ve CB-1 suşuna nazaran CB-5 suşunda önemli düzeyde daha fazla deltamethrin yıkımı (%91.2) belirlenmiştir. CB-5 suşundaki deltamethrin miktarındaki düşüş çok daha doğrusal bir eğim oluşturmuştur ($r= 0.96$). Ölçümün 14. gününde ise deltamethrin'in neredeyse tamamının (%96-98) tüm muamelelerde ve kontrolde yıkıldığı belirlenmiştir.



Şekil 1. YPD, MSM ve deltamethrin katılmış MSM ortamlarında *Candida boidinii*'nin ortalama hücre gelişimi

Çizelge 2. *Candida boidinii*'nin farklı suşlarının deltamethrin içeren ve içermeyen ortamlarda esteraz aktivitesi

Muameleler	Esteraz aktivitesi ($\mu\text{mol p-nitrofenol dk}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)*	Aktivasyon artış oranı**
CB-1	12335.5 \pm 854.7cd	-
CB-1 + DEL	53124.6 \pm 12946.5a	4.31
CB-2	9815.5 \pm 365.9d	-
CB-2 + DEL	40920.9 \pm 6883.2abc	4.17
CB-3	15808.6 \pm 6816.0bcd	-
CB-3 + DEL	45063.6 \pm 10449.4ab	2.86
CB-4	9703.1 \pm 373.2d	-
CB-4 + DEL	39371.9 \pm 1893.7abc	4.06
CB-5	10134.2 \pm 460.6d	-
CB-5 + DEL	60498.1 \pm 7984.6a	5.97
CB-6	11518.9 \pm 2015.8cd	-
CB-6 + DEL	21885.9 \pm 5443.1bcd	1.89
CB-7	10044.3 \pm 521.7d	-
CB-7 + DEL	22436.7 \pm 3229.7bcd	2.23

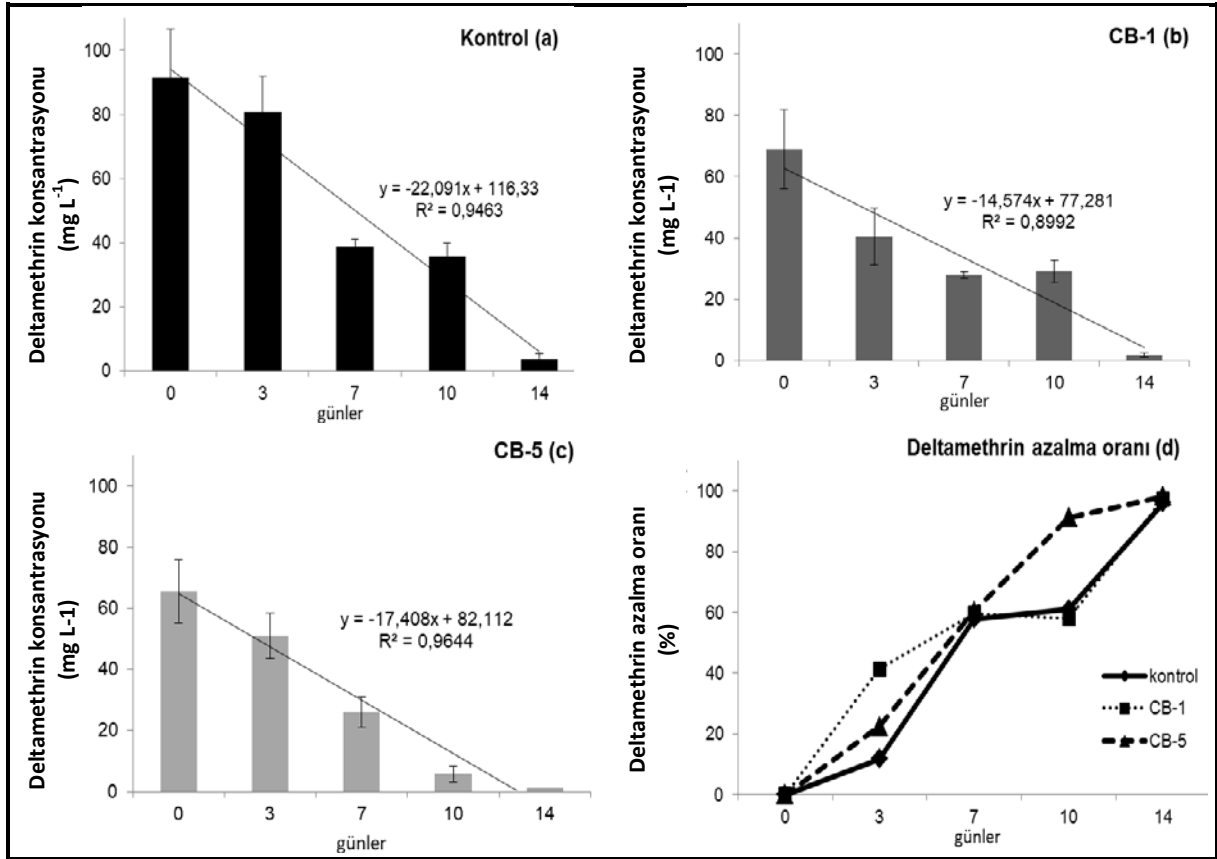
*Aynı sütundaki aynı harfleri taşıyan ortalamalar istatistiki anlamda birbirinden farklıdır (Tukey, $P < 0.01$)

** Deltamethrin kullanılan örneklerdeki esteraz aktivasyonunun kullanılmayan örneklerin esteraz aktivasyon değerine bölünmesi ile elde edilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Zeytinin doğal fermentasyonunda bazı mikroorganizmaların önemli düzeyde olumlu rol oynadıkları bilinmektedir. Fermentasyon sürecinde başlangıçta laktik asit bakterilerinin pH değerini 4'ün altına düşürmesi ile mayaların yoğun aktivite gösterdiği kaydedilmektedir (Randazzo ve ark., 2011; Kara ve Özbaş, 2013). Bizim çalışmamızda kullandığımız *C. boidinii* türü de dahil olmak üzere mayaların zeytinin tat, koku ve yapısına olumlu katkıları bulunurken, aynı zamanda antioksidan-antimikrobiyel özellikleri, acılık veren oleuropeini parçalamaları ve diğer istenmeyen mikroorganizmaları öldürmeleri gibi istenen özellikleri de bulunmaktadır (Psani ve Kotzekidou, 2006; Arroyo-Lopez ve ark., 2008; Alves ve ark., 2012; Kara ve Özbaş, 2013). İyi bilindiği gibi deltamethrin gibi bir çok insektisit asit ortamda daha yavaş parçalanmakta ve hatta uzun süre stabil kalabilmektedir. Bu anlamda, düşük pH ve karanlık koşulların hüküm sürdüğü fermentasyon aşamasında mayalar gibi mikroorganizmaların insektisitleri metabolize edebilme kapasiteleri çok önem arz etmektedir (Roberts ve ark., 1998; Anonim, 2020b; Wu ve ark., 2006). *C. boidinii*'nin yukarıda sayılan olumlu katkılarına ek olarak insektisit kullanma ve parçalama özelliği ile ilgili önemli bulgular da bu çalışma sonuçları ile ortaya konmuştur. Örneğin, *C. boidinii*'nin tüm suşlarının deltamethrin dışında hiçbir karbon kaynağı bulundurmeyen ortamda ilk iki günde en az YPD besi ortamındaki kadar gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Bu potansiyel suşlara

göre farklılık göstermesine rağmen, test sonuçları mayanın deltamethrini karbon/enerji kaynağı olarak kullandığını göstermektedir. Benzer olarak, Cycon ve ark. (2014) toprak orjinli bir bakteri türü olan *Serratia marcescens*'in deltamethrini karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığını göstermiştir. *Bacillus*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Stenotrophomonas* ve *Streptomyces* cinslerine ait birçok toprak kökenli bakterinin de sentetik piretroitleri bu yolla parçalama özelliklerinin bulunduğu kaydedilmektedir (Madiha ve ark., 2013; Cycon ve ark., 2014).



Şekil 2. *C. boidinii*'nin farklı suşlarının deltamethrinin parçalanmasındaki etkisi, (a) herhangi bir maya suşu bulunmayan (kontrol) MSM ortamında deltamethrin miktarı değişimi, (b) CB-1 suşunu bulunduran MSM ortamında deltamethrin miktarı değişimi (c) CB-5 suşunu bulunduran MSM ortamında deltamethrin miktarı değişimi, (d) tüm muamelelerdeki deltamethrin değişim oranı (%).

Mikroorganizmaların insektisitleri metabolize etmelerinde kullandığı diğer bir metabolik yol ise, esteraz enzimi ile insektisitleri hidrolize ederek parçalamalarıdır (Roberts ve ark., 1998; Chen ve ark., 2011; Simon 2014). Bu çalışmada kullanılan *C. boidinii* suşlarının hepsi deltamethrini invitro ortamda hidrolize etmiştir. Ancak, suşlar arasında istatistiki anlamda önemli farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle substrat olarak sadece α -naftil asetatın kullanıldığı örneklerle nazaran deltamethrin katılan örneklerde 2'den 6 kata değişen oranlarda esteraz aktivite artışı belirlenmiştir. Bilindiği gibi enzim kinetiğinde, reaksiyonun hızlanması ve sonlanması

etkileyen faktörler enzim veya substrat varlığı ve miktarıdır. Ortamda, bu iki faktörden biri olmaz veya biterse enzim aktivitesi olmaz veya kısa sürede biter (Temizkan ve Arda, 2008). Bu deneyde ortama deltamethrin katılması aktivite artışına neden olmuştur. Bu da bu maya türünde esteraz aktivitesinin çok yüksek olduğunu ve deltamethrini hidrolize edebildiğini ortaya koymuştur. Benzer kurguyla yapılan farklı çalışmalarda içlerinde laktik asit bakterilerinin de bulunduğu bazı mikroorganizmaların cypermethrin, permethrin, fenvalerate ve deltamethrin gibi sentetik piretroitleri hidrolize edebildiğini gösterilmiştir (Kim ve ark., 1998; Alvarez ve ark., 1999; Sogorb ve Vilanova, 2002; Choi ve ark., 2004).

Bu çalışma kapsamında *invitro* ortamda yapılan diğer bir testte karbon/enerji kaynağı olarak deltamethrin içeren MSM ortamında 3 gün sonra CB-1 ve CB-5 suşlarının bulunduğu örneklerde hiç maya bulunmayan örnekler nazaran istatistiksel anlamda önemli düzeyde deltamethrin miktarında düşüş görülmüştür. Bu azalma gelişme ve esteraz potansiyeli en yüksek suş olan CB-5'de 10. günde en yüksek oranda gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, tekrar bize *C. boidinii* suşlarının deltamethrinin metabolik olarak parçalanması ve kullanılmasında rol aldığını göstermiştir. Yine başka bir çalışma bir laktik asit bakterisinin sentetik piretroit olan bifentrinin 30°C'de gerçekleşen 24 günlük bir buğday fermentasyonu süresince %63 oranında azaltabileceğini göstermiştir (Dordevic ve ark. 2013). Mayaların insektisitleri parçalama özellikleri hakkında çok sınırlı kayıt bulunmaktadır. Bununla ilgili ilk kayıt Peric ve ark. (1980), *Debaryomyces* cinsinden bir maya türünün sucuk fermentasyonu sırasında insektisit DDT'yi tamamen, HCH'yi ise kısmen parçalayabileceğini gösterebilmiştir. Fatichenti ve ark. (1983, 1984), *S. cerevisiae*'nin yapay besi ortamında sentetik piretroitli insektisitlerden deltamethrin, permethrin ve fenvalerate miktarlarını maya bulunmayan kontrol örneklerine göre önemli düzeyde azalttığını ve 10 gün içinde neredeyse tamamının parçalanmasında rol oynadığını ispatlamışlardır. Farklı bir sonuç olarak Dordevic ve ark. (2013), buğday ununun fermentasyonu sırasında bifenthrin parçalanmasında laktik asit bakterilerinin etkisi yüksek bulunurken, *S. cerevisiae*'nin etkisi istatistiksel anlamda yetersiz bulunmuştur. *Candida boidinii* üzerinde bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak, zeytinde olduğu gibi doğal fermentasyon süreçlerinde mayaların olumlu katkıları göz ardı edilememektedir. Hatta günümüzde endüstriyel anlamda bunların starter olarak kullanımları da söz konusudur (Kara ve Özbaş, 2013). Arazi koşullarında ise zararlılarla mücadelede sentetik kimyasalların kullanımının diğer alternatif yöntemler daha uygun fiyatlardan elde edilerek yaygınlaşmaya kadar uzun yıllar süreceği aşikardır (Simon, 2014). Bu bağlamda gıda ortamında bulunması istenen mayaların insektisit parçalayıcı özellikleri ortaya konulabilirse; endüstriyel anlamda bunları kullanmak mümkün olabilir. Bu çalışmayla bu yönde *C. boidinii*'nin tüm olumlu katkılarına ek olarak bu özelliği de gösterilmiştir. İleride çeşitli gıdaların fermentasyonu ortamında yapılacak ek testlerle bu mayaların pratik olarak kullanılma durumları sınanabilir.

Teşekkür Bilgi Notu

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OUAP(Z)-2015/9 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmanın tüm testleri A.Y. KUMRAL, esteraz testleri N. A. KUMRAL ve kalıntı

testleri O. GURBUZ tarafından gerçekleştirilmiştir. Yazarlar tüm makaleyi birlikte hazırlamışlar ve okumuşlardır. Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

Kaynakça

- Aksu, P. 2007. Developing of multi residue analyse method in determining pesticide residues on fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Alvarez, M. E., Augier, M. V. and Baratti, J. 1999. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63: 1865-1870.
- Alves, M., Goncalves, T. and Quintas, C. 2012. Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, 23 (2): 363-368.
- Anonim 2020a. Bitki Koruma Ürünleri Veri Bankası. <https://bku.tarim.gov.tr> (Erişim tarihi: 01.04.2020).
- Anonim, 2020b. The Pesticide Properties Database. www.sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/154.htm (Erişim tarihi: 01.04.2020).
- Arroyo-Lopez, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J. and Garrido-Fernandez, A. 2008. Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (2): 189-196.
- Bajwa, U. and Sandhu, K. S. 2014. Effect of handling and processing on pesticide residues in food - a review. *Journal Food Science and Technology*, 51: 201-220.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chen, S., Lai, K., Li, Y., Hu, M., Zhang, Y. and Zeng, Y. 2011. Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1471-1483.
- Cho, K. M., Math, R. K., Islam, S. M. A., Lim, W. J., Hong, S. Y., Kim, J. M., Yun, M. G., Chon, J. J. and Yun, H. D. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos by lactic acid bacteria during kimchi fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1882-1889.
- Choi, Y. J., Miguez, C. B. and Lee, B. H. 2004. Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 3213-3221.
- Cycon, M., Zmijowska A. and Piotrowska-Seget, Z. 2014. Enhancement of deltamethrin degradation by soil bioaugmentation with two different strains of *Serratia marcescens*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11: 1305-1316.

- Dordevic, T. M., Siler-Marinkovic, S. S., Durovic, R. D., Dimitrijevic-Brankovic, S. I. and Gajic Umiljendic, J. S. 2013. Stability of the pyrethroid pesticide bifenthrin in milled wheat during thermal processing, yeast and lactic acid fermentation, and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 3377-3383.
- FAO 2019. Food and Agriculture Organisation, FAOSTAT, Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Erişim tarihi: 26.08.2019).
- Faticenti, F., Farris, G. A., Deiana, P., Cabras, P., Meloni, M. and Pirisi, F. M. 1983. A preliminary investigation into the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on pesticide concentration during fermentation. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, 18: 323–325.
- Faticenti, F., Farris, G. A., Deiana, P., Cabras, P., Meloni, M. and Pirisi, F. M. 1984. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on concentration of dicarboximide and acylamide fungicides and pyrethroid insecticides during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20: 419–421.
- Islam, S. M. A., Math, R. K., Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., Kim, J. M. Yun, M. G. Cho, J. J. and Yun, H. D. 2010. Organophosphorus hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5380-5386.
- Kara, G. N. ve Özbaş, Z. Y. 2013. Sofralık zeytin üretiminde doğal maya florasının önemi. *Gıda*, 38(6): 375-382.
- Kim, H. K., Park, S. Y. Lee J. K. and Oh, T. K. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62: 66-71.
- Kumral, A. Y. and Kumral, N. A. 2013. Decontamination of insecticides by lactic acid bacteria. *Proceedings of the 24th International Scientific-Expert-Conference of Agriculture and Food Industry*, 25-28 September, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, pp. 293-296.
- Kumral, A.Y., Korukluoğlu, M., Türkel, S., Bektaş, D. 2013. Gemlik çeşidi siyah zeytinlerin fermentasyonunda bazı bileşenlerin değişimi ve etkili laktik asit bakterileri ile mayaların tanısı. Yayınlanmamış proje raporu (UAP(Z) 2010/49).
- Kumral, A Y., Kumral, N. A. and Gurbuz, O. 2020. Chlorpyrifos and deltamethrin degradation potentials of two *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen, 1919) (Lactobacillales: Lactobacillaceae) strains. *Turkish Journal of Entomology*, 44 (2): 165-176.
- Madiha, F. M., Farghaly, S., Zayed, M. A., Soliman D. and Soliman, M. 2013. Deltamethrin degradation and effects on soil microbial activity. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48: 575-581.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Misra, A. K., Vinod, R. S. and Bhattacharyya, A. 1996. Degradation of fenvalerate (pyrethroid) pesticide in milk by lactic acid bacteria. *Indian Journal of Dairy Science*, 49: 635–639.

- Morichi, T., Sharpe, M. E. and Reiter, B. 1968. Esterases and other soluble proteins of some lactic acid bacteria. *Microbiology*, 53: 405-414.
- Peric, M., Raseta, J., Visacki, M. S. and Spiric A. 1980. Degradation of organochlorine pesticides as influenced by micrococci isolated from fermented sausages. *Technologia Mensa*, 21: 132-133.
- Psani, M. and Kotzekidou, P. 2006. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (12): 129-1336.
- Randazzo, C. L., Fava, G., Tomaselli, F., Romeo, F. V., Pennino, G., Vitello, E. and Caggia, C. 2011. Effect of kaolin and copper based products and of starter cultures on green table olive fermentation. *Food Microbiology*, 28: 910-919.
- Regueiro, J., Lopez-Fernandez, O., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B. and Simal-Gándara, J. A. 2015. Review on the fermentation of foods and the residues of pesticides - biotransformation of pesticides and effects on fermentation and food quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 839-863.
- Roberts, T. R., Hutson D. H. and Jewess, P. J. 1998. *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Insecticides and Fungicides (Vol. 1)*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1476 pp.
- Ruediger, G. A., Pardo, K. H., Sas, A. N., Godden, P. W. and Pollnitz, A. P. 2005. Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 3023-3026
- SAS, 2007. SAS Institute. JMP version 7.0.2 Release Notes Cary, NC: SAS Institute Print Center, 1-20.
- Simon, J. Y., 2014. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC press, Boca Roton, Florida, USA, 380pp.
- Sogorb, M. A. and Vilanova, E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128: 215-228.
- Solmaz, S. ve Ay, R. 2010. Akar ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Enzimler. *Bursa Uludag Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 24 (2): 137-148.
- Temizkan, G. O. ve Arda, N. 2008. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*, No 3, 3. Baskı, 345s.
- Wu, P. C., Liu, Y. H., Wang, Z. Y., Zhang, X. Y., Li, H., Liang, W. Q., Luo N., Hu, J. M., Lu, J. Q., Luan, T. G. and Cao, L. X. 2006. Molecular cloning, purification, and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase from *Klebsiella* sp. strain ZD112. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 836-842.
- Zhao, X. H. and Wang, J. 2012. A brief study on the degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in skimmed milk cultured with *Lactobacillus* spp. at 42 degrees C. *Food Chemistry*, 131: 300-304.

