

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

POLİAROMATİK HİDROKARBONLARI
PARÇALAYAN MAYALARIN KONVANSİYONEL VE
MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLERLE TANISI

Diğdem TUNALI

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.04.00

Sunuş Tarihi : 23.11.2012

Bornova-İZMİR

2012

Diğdem TUNALI tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Poliaromatik Hidrokarbonları Parçalayan Mayaların Konvansiyonel ve Moleküler Biyolojik Yöntemlerle Tanısı**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 23.11.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Füsun B. UÇAR	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ	
Üye	: Prof. Dr. Abdurrahman Ü. TAMER	

ÖZET**POLİAROMATİK HİDROKARBONLARI PARÇALAYAN
MAYALARIN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİK
YÖNTEMLERLE TANISI**

TUNALI, Diğdem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Füsün B. UÇAR

Kasım 2012, 160 sayfa

Mersin Limanı'dan petrol ile kontamine olmuş toprak örneklerinin yanı sıra Tüpraş petrol rafinerisinden alınan aktif çamur, toprak ve atık su örneklerinden 100 maya izolatu izole edilmiş ve bu izolatların fenotipik identifikasyonları, Barnett et al. (2000) göre yapılmıştır. Tanılanan izolatların 9 genusa ait 31 farklı tür olduğu saptanmıştır.

İzolasyonu yapılan ve fenotipik olarak tanılanan strainlerin iki halkalı naftalen, üç halkalı fenantren, dört halkalı piren olarak seçilen poliaromatik hidrokarbonları ve ham petrolü parçalama yetenekleri mikrotitre plate yöntemi ile belirlenmiştir. Mikrotitre plate yöntemi sonucu 93 strainden 28 tanesinin birden fazla poliaromatik hidrokarbonu parçalama kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızda, hidrokarbonları parçalama kapasitesine sahip fenotipik olarak tanılanan 28 strainin moleküler identifikasyonu için 26S rDNA bölgesi D1/D2 domaininin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonucuna göre, 12 numaralı izolat *Pichia kudriavzeii*, 13 *Rhodotorula glutinis*, 14 *Saccharomyces cerevisiae*, 15 ve 80 *Rhodosporidium diobovatum*, 17, 29, 43, 45, 54, 85, 87, 88, 89, 90 ve 93 *Rhodotorula muciliginosa*, 22 ve 39 *Candida sinolaborantium*, 27 *Cryptococcus albidus*, 40, 66 ve 100 *Candida davisiana*, 44 *Cryptococcus diffluens*, 69 *Candida parasilopsis* ve 67, 79, 82 ile 83 ise *Cryptococcus uzbekistanensis* olarak tanılanmıştır. Çalışmada, tanılamayı kesinleştirmek için birden fazla moleküler biyolojik yöntem kullanılmıştır. 26S

rDNA bölgelerinin sekans analizi sonucuna göre aynı tür olarak tanılanan maya strainleri arasından birer tanesi seçilmiş ve bu strainlerin ITS bölgelerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda, toplam 14 adet maya straininden 11 tanesinin moleküler identifikasyonu, ITS bölgelerinin dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bunların yanı sıra, 40, 66 ve 100 numaralı maya strainlerinin identifikasyonunda farklılık tespit edilmiştir. 26S rDNA bölgelerinin dizi analizi ile *Candida davisiana* olarak tanılanan bu maya strainleri, ITS bölgelerinin dizi analizine göre ise *Sporobolomyces lactosus* olarak tanılanmıştır.

Anahtar sözcükler: İdentifikasyon, maya, poliaromatik hidrokarbon, 26 S rDNA, ITS-PCR

ABSTRACT**IDENTIFICATION OF POLYAROMATIC HYDROCARBONS
DEGRADING YEASTS BY CONVENTIONAL AND MOLECULAR
BIOLOGICAL METHODS**

TUNALI, Diğdem

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

Nov 2012, 160 Pages

One hundred yeast isolates were isolated from active sludge, soil and waste water samples obtained from Tupras Petroleum Refinery as well as soil samples contaminated with petroleum from Mersin harbour and phenotypical identification of these isolates were performed by Barnett et al. (2000). The identified isolates represented 31 species belonging to 9 genera.

Capabilities of the phenotypically identified strains to degrade two-ringed naphthalene, three-ringed phenanthren, four-ringed pyrene hydrocarbons and crude petroleum were determined by microtiter plate method. As a result of the microtiter method, it was determined that 28 out of 93 strains had degradation capabilities of more than one polyaromatic hydrocarbons.

In the research, for the molecular identification of phenotypically identified 28 strains having degradation capability of the hydrocarbons, sequence analysis of D1/D2 domain of 26S rDNA region was performed. As a result of the sequence analysis, isolate no. 12 was identified as *Pichia kudriavzeii*, 13 as *Rhodotorula glutinis*, 14 as *Saccharomyces cerevisiae*, 15 and 80 as *Rhodosporidium diobovatum*, 17, 29, 43, 45, 54, 85, 87, 88, 89, 90 and 93 as *Rhodotorula muciliginosa*, 22 and 39 as *Candida sinolaborantium*, 27 as *Cryptococcus albidus*, 40, 66 and 100 as *Candida davisiana*, 44 as *Cryptococcus diffluens*, 69 as *Candida parasilopsis* and 67, 79, 82 and 83 as *Cryptococcus uzbekistanensis*. In the study, multiple molecular biological methods were used to confirm the identification. One each of the yeast strains identified as same species were

selected according to the result of sequence analysis of 26S rDNA regions and sequence analysis of ITS regions of these strains were performed. As a result of the sequence analysis, molecular identification of 11 out of 14 yeast strains were confirmed with sequence analysis of the ITS regions. In addition to these, difference was observed in the identification of isolates numbered as 40, 66 and 100. These strains, identified as *Candida davisiana* by the sequence analysis of 26S rDNA regions, were identified as *Sporobolomyces lactosus* by the sequence analysis of ITS regions.

Keywords: Identification, yeast, polyaromatic hydrocarbon, 26S rDNA, ITS-PCR

TEŞEKKÜRLER

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım, ilgi ve desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirileriyle beni daima yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Füsun B. UÇAR'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımnda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın Araş Gör. Dr. H. Tansel ÖZTÜRK YALÇIN ve doktora öğrencisi Cengiz ÇORBACI'ya, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmayı 2012- FEN- 007 numaralı proje kapsamında destekleyen EÜ Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı'na teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de bana maddi ve manevi her türlü desteklerini esirgemeyen annem Mualla TUNALI'ya, babam Ahmet TUNALI'ya, ablam Burcu TUNALI'ya ve ikizim Çiğdem TUNALI ayrıca her zaman yanımda olan, beni destekleyen, fikirlerini benimle paylaşan nişanlım Emrah BOZ'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	9
2.1 Maya Taksonomisinin Tarihçesi	9
2.2 Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi	11
2.3 Tanımlamada Kullanılan Yöntemler	13
2.3.1 Konvensiyonel yöntemlerle mayaların tanımlanması	14
2.3.2 Moleküler biyolojik yöntemlerle mayaların tanımlanması	15
2.4 Poliaromatik Hidrokarbonlar	28
2.4.1 Poliaromatik hidrokarbonların tarihçesi	29
2.4.2 Başlıca poliaromatik hidrokarbonlar	32
2.4.3 Poliaromatik hidrokarbonların fiziksel ve kimyasal özellikleri	33
2.4.4 Poliaromatik hidrokarbonların sağlık üzerine etkisi	35

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.5 Poliaromatik hidrokarbonların kaynakları	38
2.5 Poliaromatik Hidrokarbonların Giderilmesinde Kullanılan Yöntemler	42
2.5.1 Fiziksel sistemler	42
2.5.2 Kimyasal sistemler.....	42
2.5.3 Biyolojik sistemler	43
2.5.4 Petrol hidrokarbonlarının parçalanmasını etkileyen faktörler	49
2.6 Hidrokarbon Parçalayan Mayalarla Yapılan Çalışmalar	55
2.7 İdentifikasyon ve Aromatik Hidrokarbonları Kullanan Mayalarla İlgili Yapılan Yurtiçi Çalışmalar	60
3. MATERYAL VE METOD	61
3.1 Materyal	61
3.1.1 Kullanılan örnekler	61
3.1.2 Kullanılan besiyerleri.....	61
3.1.3 Çözelti, Tampon ve Boyalar	67
3.2 Metod.....	72
3.2.1 Örneklerin alınımı.....	72
3.2.2 Örneklerden mayaların izolasyonu.....	72

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.3 İzolatların tanılanmasında kullanılan fizyolojik testler.....	72
3.2.4 İzolatların tanılanmasında kullanılan mikroskopik ve morfolojik testler.....	78
3.2.5 İzolatların petroldeki poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneklerinin belirlenmesi.....	79
3.2.6 Poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneği olan izolatların moleküler karakterizasyonu	81
4. BULGULAR.....	86
4.1 İzolatların Elde Edilmesi.....	86
4.2 İzolatların Fenotipik Tanılanması	86
4.3 İzole Edilen Mayaların Sistemik Kategorileri.....	99
4.4 Tanılanan İzolatların Dahil Olduğu Genusların Özellikleri.....	101
4.5 Fenotipik Olarak Tanılanan İzolatların Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	105
4.6 İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları	118
4.7 İzolatların Poliaromatik Hidrokarbonları Kullanma Kapasiteleri.....	129
4.8 Poliaromatik Hidrokarbonları Parçalama Yeteneği Olan İzolatların Moleküler Karakterizasyonu.....	138
4.8.1 DNA izolasyonu.....	138

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.8.2 26S rDNA-PCR	138
4.8.3 ITS-PCR	142
4.9 Moleküler Karakterizasyonu Sonucu Saptanan İzolatların Sistematik Kategorileri	145
5. TARTIŞMA	146
KAYNAKLAR DİZİNİ	161
ÖZGEÇMİŞ	184

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Primer Hedef Bölgeleri İçeren Fungal Ribozomal Genlerin Şematik Gösterimi	26
2.2 Batman-Yumurtalık BOTAŞ Petrol Boru Hattı'nın Bozova ilçesine bağlı Yığınak Köyü Akyakı Mezrası yakınlarında ki bir borusunun yırtılması ile meydana gelen sızma ve ardından başlayan yangın görüntüleri	31
2.3 Enkaz bölgesinin konumu	32
2.4 Alifatik ve aromatik hidrokarbonların yapıları	33
2.5 Amerika Ulusal Çevre Koruma Ajansı (US EPA) ve Dünya Sağlık Örgütü(WHO) tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınan 16 PAH bileşeninin molekül yapıları	35
2.6 Çevredeki petrol ve PAH kaynakları	39
2.7 PAH'ların biyolojik döngüsü	40
2.8 Hidrokarbonların aerobik şartlar altında parçalanması	48
2.9 Hidrokarbonların anaerobik şartlar altında parçalanması	49
4.1 12 numaralı izolat olan <i>Pichia kudriavzeii</i> 'nin MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'de 3 günlük görünümü	119
4.2 45 numaralı izolat olan <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 'nın MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'de 3 günlük görünümü	119
4.3 12 numaralı straininin Asetat Agar'da askosporlarının 27°C'de 15 günlük görünümü	120

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 12 numaralı izolat olan <i>Pichia kudriavzeii</i> 'nin MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü.....	120
4.5 45 numaralı izolat olan <i>Rhotorula muciloginosa</i> 'nın MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü.....	121
4.6 D- Glukoz içeren Yeast Extract Broth'da 27 ° C'de 5 günlük fermentasyon testi	121
4.7 Malt Yeast Glukoz Pepton Agar'da Askomisetik mayaların sonuçları ve pozitif kontrolün 27°C'de 10 günlük DBB testi.....	122
4.8 Malt Yeast Glukoz Pepton Agar'da Basidiomisetik mayaların sonuçları ve negatif kontrolün 27°C'de 10 günlük DBB testi	122
4.9 Fenotipik tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra; 1-100 arası izolat numaraları.....	123
4.10 N-Base Agarda 27°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü	123
4.11 5-keto-D-Glukonat içeren N-Base Agarda 27°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü	124
4.12 D Glukozamin içeren N-Base Agarda 27°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü	124
4.13 % 0,1 Sikloheksimid içeren N-Base Agarda 27°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü	125
4.14 %0,01 Sikloheksimid içeren N-Base Agarda 27°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü	125
4.15 Nitrat içeren C-Base Agarda 27°C'de kolonilerin 2 günlük görünümü	126

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.16 Kadeverin içeren C-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	126
4.17 Fenotipik tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra; 1-100 arası izolat numaraları	127
4.18 L-arabinitol içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	127
4.19. Me- α -D-Glukozid içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	128
4.20 D-Glusitol içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü	128
4.21 %16 NaCl içeren Yeast Ekstrakt Agarda 27°C’de kolonilerin 7 günlük görünümü	129
4.22 Mikrotitre plate yönteminde izolatların ekilmesinde izlenen sıra.....	130
4.23 BHM’de mikrotitre platede 27°C’de 21 günlük görünümü	130
4.24 BHM’de Naftalen hidrokarbonun mikrotitre platede düz 27°C’de 21 günlük görünümü	131
4.25 BHM’de Naftalen hidrokarbonun mikrotitre platede tersten 27°C’de 21 günlük görünümü	131
4.26 BHM’de Piren hidrokarbonun mikrotitre platede düz 27°C’de 21 günlük görünümü	132
4.27 BHM’de Piren hidrokarbonun mikrotitre platede tersten 27°C’de 21 günlük görünümü	132

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.28 BHM’de Fenantren hidrokarbonun mikrotitre platede düz 27°C’de 21 günlük görünümü	133
4.29 BHM’de Fenantren hidrokarbonun mikrotitre platede tersten 27°C’de 21 günlük görünümü.....	133
4.30 BHM’de Petrolün mikrotitre platede düz 27°C’de 21 günlük görünümü	134
4.31 BHM’de Petrolün mikrotitre platede tersten 27°C’de 21 günlük görünümü.....	134
4.32 Seçilen izolatların 26S rDNA bölgelerinin elektroforez sonucu	140
4.33 Seçilen izolatların ITS-PCR elektroforez sonucu	142

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Maya karakterizasyonunda kullanılan geleneksel kriterler.....	14
2.2 Maya identifikasyonu için asimilasyon ve fermentasyon testlerinde kullanılan bileşikler.....	15
2.3 Çoklu Doymamış C18 Yağ Asidi Kompozisyonuna Göre 3 Gruptaki Mayaların Dağılımı.....	19
2.4 Önemli Bazı Mayaların ITS1 / 5,8S rDNA / ITS2 Bölgesinin Boyutları	26
2.5 Poliaromatik Hidrokarbonlar	29
2.6 EPA listesinde Yer Alan 16 PAH Türü	32
2.7 EPA öncelikli kirleticiler listesindeki PAH’ların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	34
2.8 PAH’ların fiziksel, kimyasal ve sağlık üzerine etkisi	37
2.9 Poliaromatik Hidrokarbonların Genetik Zehirliliği ve Kanserojenitesi.....	37
2.10 Biyolojik İyileştirme Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları	44
2.11 Alifatik Hidrokarbonların Parçalanmasında Rol Alan Mikroorganizmalar.....	46
2.12 Poliaromatik Hidrokarbonların Parçalanmasında Rol Alan Mikroorganizmalar.....	47
3.1 Örneklerin alındığı yerler.....	61
4.1 Mayaların izole edildiği kaynaklar ve izolat numaraları	86

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 İzolatların Tanılanmasında Kullanılan Testler	89
4.3 Glukozu fermente eden mayaların tayin anahtarı	90
4.4 Glukozu fermente edemeyen mayaların tayin anahtarı	92
4.5 Pembe koloni oluşturan mayaların tayin anahtarı	96
4.6 Mayaların izole edildiği kaynaklara göre genus ve türlerin dağılımı	97
4.7 İzole edilen mayaların sistematik kategorileri	99
4.8 İzole edilen mayaların sistematik kategorileri	100
4.9 1- 20 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları.....	106
4.10 21-40 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları.....	108
4.11 41-60 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları.....	111
4.12 61- 80 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları.....	113
4.13 81-100 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları.....	116
4.14 Test edilen poliaromatik hidrokarbonların ve petrolün mikrotitre plate sonuçları.....	135

4.15 Fenotipik olarak tanılanan maya strainlerinin 26S rDNA-PCR analiz sonuçları	140
4.16 26S rDNA-PCR ie tanılanan 14 maya strainlerinin ITS-PCR sonuçları	143
4.17 Mayaların sistematik kategorileri.....	145

1.GİRİŞ

Maya ve benzeri organizmalar funguslar içerisinde homojen olarak dağılmış çok büyük bir gruptur ve bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 1500 maya türü bulunmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990; Barnett et al., 2000; Boekhout et al., 2003; Öztürk, 2007).

Mayaların taksonomisi moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesine bağlı olarak sürekli değişmektedir. 1970 yılında genus sayısı 39 iken 1984’de bu sayı 60’a tür sayısı da 239’dan 500’e yükselmiştir. Kurtzman et al. (2003) ise bu sayıyı 1500 olarak belirlenmişlerdir. Maya taksonomisinde değişimin başlıca nedeni kromozom analizleri ve moleküler biyolojik yöntemlerin yaygınlaşmaya başlamış olmasıdır. Ayrıca Jakobsen and Narvhus (1996) ve Öztürk (2007) tarafından yapılan çalışmalar maya ve maya taksonomisine ilginin artması da tür sayısının yükselmesine neden olmuştur.

Ekmek, bira ve şarabın bulunuşu ile insan toplumu ile ilişki mayaların tarihi hemen hemen benzerdir. Bu ürünlerin mikrobiyal bilimi, ilk olarak Antonie van Leewenhoek (Hollanda) tarafından maya hücrelerinin gözlenmesiyle birlikte 1600’lü yılların ortalarında başlamıştır. Bu buluşun önemi, 1850–1900 yılları sırasında Pasteur (Fransa) ve Hansen’in (Danimarka) klasik çalışmalarına kadar pek önemsenmemiştir. Bilindiği gibi bu iki araştırmacının yaptığı çalışmalar, mikrobiyoloji ve biyokimya disiplinlerinin başlangıcı sayılmaktadır. 1900’lü yılların başında Guilliermond (Fransa) ve Kluyver (Hollanda) tarafından yapılan müteakip çalışmalar, mayaları besin ve meşrubat üretiminde önemli role sahip olan mikroorganizma gruplarından bir tanesi yapmıştır (Fleet, 2006). 1950’lerden bu yana da, birçok klasik tekste besin ve meşrubatlarda mayaların ticari ve sosyal önemi özellikle üzerinde durulan bir konu olmuştur (Deak and Beuchat, 1996; Boekhout et al., 2003; Fleet, 2006).

Mayalar ticari amaç için kullanılan önemli mikroorganizma gruplarından bir tanesidir. Bilindiği gibi en iyi fermentatif organizmalardır. En iyi bilenen özellikleri alkol üretimi ve ekmek yapımı olsa da, meşrubatların üretiminde, turşu üretiminde, endüstriyel polisakkaritlerin üretiminde, tek hücre proteini üretiminde,

lipidlerin üretiminde ve B12 gibi birçok vitaminin üretiminde oldukça kullanışlı organizmalardır (Phaff et al., 1966; Deak, 1995; Jakobsen and Narvhus, 1996; Hierro et al., 2004; Öztürk, 2007). Ayrıca, birçok endüstriyel enzimin, interferonların ve birçok tıbbi ilaç hammaddelerinin üretiminde de kendilerine yer bulmuşlardır (Jakobsen and Narvhus, 1996; Öztürk, 2007). Bunların yanı sıra, ökaryotik hücreler içinde en iyi tanınan ve laboratuvar ortamında manipulasyonu en kolay olan organizmalar olmaları sebebi ile en ideal konakçı olma özelliği göstermektedirler. Ticari açıdan bakıldığında benzer şekilde maya hücreleri bakterilere nazaran daha avantajlı görünmektedir. Maya hücrelerinin ürettikleri proteinleri bulundukları ortama salgılama yeteneklerinin de yüksek olması, ticari açıdan önemli bir avantajdır (Hierro et al., 2004; Öztürk, 2007).

Mayalar ayrıca ekonomik, zirai, çevresel ve tıbbi alanlarda kullanılan ve birçok ekosistemde bulunan önemli mikrobiyal üyelerdir. Dolayısıyla, yeni maya strainlerinin hatta yeni maya türlerinin keşfi için doğru identifikasyon son derece önemlidir. Mayaların konvansiyonel yöntemlerle identifiye edilmesi zaman alıcı, kompleks ve yanlış yönlendirmelere neden olmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda moleküler genetik teknikleri geliştirilmiştir. Moleküler biyolojik yöntemler, bakteriler ve insanlar ile canlılığın diğer formları olmak üzere çeşitli organizmalar arasındaki ilişkinin netlik kazanmasını sağladığından maya taksonomisinde de önemi gittikçe artmaktadır (Fernandez-Espinar et al., 2000). Bu nedenle organizmaların karakterizasyonu, identifikasyonu ve sınıflandırmasında moleküler tekniklerin kullanımı gittikçe yaygınlaştırılmaktadır. Bu teknikler arasında 26S rRNA geninin büyük alt birimi D1/D2 domainin dizi analizleri, 18S rRNA-RFLP, ITS-RFLP, mitokondriyal DNA RFLP ve RAPD analizi bulunmaktadır. Ayrıca aynı genustan farklı türleri identifiye etmek için DDGE analizleri de kullanılmaktadır (Arias et al., 2002; Kurtzman and Robnett, 2003 ; Deak, 2007; Hesham and Yang, 2010).

Çeşitli uluslararası kuruluşlar tarafından “20. yüzyılın kanseri” olarak tanımlanan ve 21. yüzyılda da dünyadaki sorunların ilk sırasında yer alan çevre ve çevre sağlığı sorunları, kalkınma ve yaşam standartlarını geliştirme gayreti içinde olan insanlığın yarattığı ve sonucunda da yine kendisinin etkilendiği bir sorundur.

Yenilenebilir kaynaklar da dahil olmak üzere dünyamızdaki hiç bir kaynak sınırsız değildir. Tam tersine, en bol olduğu sanılan havanın bile kirlenmesi bize, kaynaklarımızın kısıtlı olduğu ve bilinçli kullanılmamaları durumunda doğabilecek sorunların geleceğimizi ne ölçüde tehdit edebileceğini göstermektedir.

Endüstriyel çalışmalardaki artışla beraber, dünya çapında şehirlerin büyümesi, araç kullanımının artması, hızlı endüstrileşme ve buna karşılık planlama ve çevresel düzenlemelerdeki eksiklikler sonucu gittikçe artan hava kirliliği pek çok ülkede sağlık ve çevre sorunlarına yol açmıştır.

Toplumun ekonomik büyümesi, dünya nüfusundaki artış ve buna paralel olarak endüstrileşme sürecindeki hızlı değişim ile birlikte çevreye yayılan kirleticilerin miktarı ve çeşidi her geçen gün artmaktadır. Canlı ve yaşadığı çevre üzerinde yapısal zararlar meydana getiren, organik ve inorganik yapıdaki kirleticilerin hava, su ve toprağa karışması olayına "çevre kirliliği" adı verilmektedir (Kösesakal, 2011). İnsan aktivitelerinin bir sonucu olarak çevreye bırakılan organik ve inorganik bileşiklerin büyük kısmı ciddi çevresel problemlere sebep olmaktadır. Toksik, mutajen, karsinojen ve/veya kalıcı özellikteki kirleticiler, insan sağlığını, tarımsal verimliliği ve çevreyi tehdit etmektedir. Bu kirleticilere örnek olarak toplam petrol hidrokarbonları (TPH), polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH), halojenli hidrokarbonları, pestisitleri, solventleri ve metalleri verebiliriz (Greenberg et al., 2007).

Bu kirleticilerden olan ve endüstriyel gelişme ve düzensiz ve kontrolsüz kullanım sonucu doğaya bulaşan poliaromatik hidrokarbonlar çok büyük tehlikeler ve olumsuzluklar meydana getirirler. Bu nedenle dünyanın karşılaştığı en büyük çevresel problemlerden bir tanesi, çeşitli dizilerde iki veya daha fazla aromatik zincire sahip benzen türevi poliaromatik hidrokarbonlar (PAHs) içeren kimyasal toksikler ile su, hava ve toprağın kontamine olmasıdır (Hesham and Yang, 2010).

Ormanların tahribi ve erozyon, düzensiz şehirleşme ve yeşil alan azalması, kıyıların bozulması, sanayide kullanılan kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki

olumsuz etkileri, nükleer enerjili termik santraller ve poliaromatik hidrokarbon (PAH)'ların ekolojik dengede yapmış oldukları tahribat sadece Türkiye'de değil, dünya da çözümleri aranan sorunlar haline gelmiştir. Dünyada, çoğu antropojenik kaynaklardan olmak üzere yılda, 1,7- 8,8 milyon metre ton petrol üretildiği ve bunun önemli bir miktarının da zararlı olarak ya kullanım sonucu ya da kullanılmadan çevreye döndüğü bilinmektedir (Demir ve Demirbağ, 1999). Uğruna yıllarca savaşların yapıldığı 'kara inci'(petrol) ve türevlerinin çevreye dökülmeleri, çevre kirliliği oluşturmaları yönünden de bunları dünya gündeminde 1. sıraya yükseltmiştir.

Petrol hidrokarbonları çözünürler, aromatikler, asfaltlar (fenol, yağ asitleri, keton ve porfirin) ve rezinler (piridinler, quinolinler, karbazoler, sülfokridler ve amidler) olmak üzere dört sınıfa ayrılırlar. Yapılarındaki bu farklılığa bağlı olarak mikrobiyal tutunma yönünden de hidrokarbonlar farklı hassasiyetlere sahiptirler. Bu hassasiyetleri n-alkanlar > dallı alkanlar > küçük moleküler ağırlıklı aromatikler > sikloalkanlar şeklinde sıralanabilir. Parçalanma oranlarının en yüksek çözünürlerde olduğu, bunun düşük moleküler ağırlıklı aromatikler ve yüksek moleküler ağırlıklı aromatikler tarafından takip edildiği belirlenmiştir (Jobson et al., 1972). Dolayısıyla, bu hidrokarbonların hepsini parçalayan tek bir mikroorganizma straini bulunmadığı için her bir hidrokarbon tipini parçalayabilen farklı mikroorganizma strainlerinin izolasyonu ve identifikasyonu çevre kirliliği açısından büyük önem arz etmektedir. Bu strainlerin ko-kültürleri arazi çalışmalarında kullanıldığında petrolle kirlenmiş alanların temizlenmesi açısından yararlı olacaktır. Ayrıca, rekombinant DNA yöntemleri ile de her bir hidrokarbonu parçalayan mikroorganizmalardan bu genler, tek bir maya straininde toplanabilir ve bu tür strainler endüstriye kazandırılabilir. Bu nedenle, öncelikle doğadaki farklı hidrokarbonları parçalayan mikroorganizma kaynaklarının gözden geçirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Petrol hidrokarbonları kökenli çevresel kirlilik kaynaklarının tüm dünyada artış göstermesi bunların doğal ortamdan uzaklaştırılmalarına yönelik tekniklerin geliştirilmesi zorunluluğunu getirmiştir. Petrolün biyolojik olarak parçalanması kirliliğin uzaklaşmasında primer mekanizma olarak doğada kendiliğinden 5-10 yılda olurken, ortama nutrient veya mikroorganizma ilavesi ile müdahale edilerek

yapılan ve biyolojik iyileştirme (bioremediasyon) olarak isimlendiren çalışmalar ile 2-5 sene gibi daha kısa sürede olabilmektedir (Korda et al., 1997).

Petrol hidrokarbonlarının mikroorganizmalar tarafından parçalanması Zobell (1946) çalışması ile başlamıştır. Hidrokarbon parçalanması ile ilgili bakteriler, aktinobakteriler, siyanobakteriler ve fungusları da içeren çok sayıda araştırma ile sürdürülmüştür (Leahy and Colwell, 1990; Kim et al., 1999; Barathi and Vasudevan, 2001; Daugulis and McCracken, 2003; Chaillan et al., 2004; Brooijmans et al., 2009). Özellikle alkan, alken ve thiophene ve polisiklik hidrokarbonları kullandığı bilinen mayalar son yıllarda petrol tanklarından yüksek oranda yağ kazanımı için emülsüfiye ajanlar ve tek hücre protein üretiminde kullanılmaktadır (Kim et al., 1999; Ward et al., 2003). Alifatik hidrokarbonları parçalayan bakteriler ile ilgili araştırmalar mayalarla ilgili olanlara nazaran daha yoğunluktadır (Hesham and Yang, 2010). Yapılan çalışmalarda, bakteriler özellikle LMW'li PAH'ların parçalanmasında daha etkili iken, mayaların, HMW'li PAH'ların parçalanmasında bakterilere nazaran daha yüksek kapasitelere sahip oldukları belirtilmektedir (Ward et al., 2003; Hesham and Yang, 2010).

Çevreden mümkün olduğu kadar fazla kontaminantın çıkarılması veya daha az toksiklere dönüştürülmeleri için çok sayıda araştırma çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu PAH'ları indirgeyebilecek mikroorganizmalar üzerinedir. Mayaların petrol degradasyonunda aktif olduğu ve değişen çevre koşullarına toleranslı olmalarına rağmen özellikle yüksek molekül ağırlıklı PAH'ların parçalanmasıyla ilgili bilgiler sınırlıdır. Son zamanlarda ise mayalar yüksek molekül ağırlıklı indirgeme yeteneklerinden dolayı ilgi çekici olmaya başlamışlardır. Biyolojik iyileştirme metotları bu yüzden önem kazanmış ve özellikle son yıllarda mikrobiyal ekoloji çalışmalarına da konu olmuştur (Cohen, 2002).

Son yıllarda, *Yarrowia lipolytica*, *Candida palmioleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia* ve *Candida guilliermondii*, alifatik ve aromatik hidrokarbon parçalayıcıları olarak bilinmektedir (Arie et al., 2000; Zinjarde and Pant, 2002; Chaillan et al., 2004). Bu mayalar, yağ parçalanmasında aktif olmakla birlikte, çevre şartlarında ki

değişikliklere de toleranslıdır. Ancak, özellikle yüksek moleküler ağırlıklı PAH'ların mayalar tarafından kullanılması ile ilgili bilgi sınırlıdır. Çeşitli çalışmalarda, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida lipolytica*, *Candida albicans* ve *Candida maltosa* gibi mayaların, tek karbon kaynağı olarak yüksek moleküler ağırlıklı PAH'ları kullanamadığı gösterilmiştir (Romero et al., 1998; Zinjarde and Pant, 2002). Ancak, Pan et al. (2004) *Pichia anomala* staini tarafından yüksek moleküler ağırlıklı olan 4 halkalı chrysene'i yalnızca ko-metabolizma yolu ile kullanıldığını bulmuşlardır. Yukarıda bahsedildiği gibi bazı durumlarda mayaların bakterilere karşı üstünlükleri bulunmaktadır. Ancak spesifik koşullar dışında, mayalar çevre mühendisliği alanında göz ardı edilmiş durumdadırlar (Hesham and Yang, 2010).

Enerji kaynağı olarak kullanılan petrol için artan ihtiyaç, ciddi sorunları da beraberinde getirmektedir. Rafinerilere petrolün transportunda kullanılan temel yol ise gemiler vasıtasıyla denizlerden olmaktadır. Gerek akaryakıt tanker kazaları gerekse gemilerin boşaltımlarından ortaya çıkan petrol ve petrol ürünlerinin neden olduğu kirlilik; ekolojik, ticari, estetik ve rekreasyonel açıdan önemlidir. Özellikle ham petrol yapısında bulunan hidrokarbonlar; toksik, mutajenik ve kanserojenik etkiye sahip olmaları sebebiyle karasal ve sucul canlılar için büyük bir tehlike arz etmektedir (Levinton, 1995). Atmosferde gaz ve partikül fazlarında bulunabilen PAH'lar gerek deri yoluyla, gerekse solunum yoluyla canlı bünyesine girebilmektedirler. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) yaptığı sınıflandırmaya göre belirli PAH bileşikler kanserojen ve mutajen olarak belirtilmektedir. PAH'lar başta deri, akciğerler ve mesane olmak üzere vücudun çeşitli organlarına zarar verebilmektedirler. Hayvanlar üzerinde geçmişte yapılan araştırmalarda ise mutajenik ve kanserojenik etkilerinin yanında farklı zehirli özelliklerinin de olduğu görülmüştür (Castellano et al., 2003).

PAH'lar şehir atmosferinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmalarından ve insan sağlığına ispatlanmış zararlı etkilerinden dolayı son yıllarda dünyada hava kirliliği çalışmalarında yer almıştır. Buna rağmen PAH'larla ilgili Türkiye'de sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çeşitli araştırmacılar tarafından, PAH parçalayıcıları olarak bakteri türleri izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bakterilere nazaran mayalar, özellikle petrol yağlarının parçalanmasında daha

aktif ve çevre şartlarındaki değişikliklere daha toleranslıdır. Ayrıca mayaların yüksek tuz veya substrat konsantrasyonlu çevrelerde üreyebilme kapasitelerinden olmaları bakteriye nazaran düşük nem ve düşük pH koşullarında büyüebilmeleri onları endüstriyel ve çevre çalışmalarında önemli kılmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalar gösteriyor ki aşırı kirli atık suların ve petrol ile kontamine olmuş suların temizlenmesinde bakterilerden daha fazla avantaja sahip olduklarıdır (Hesham and Yang, 2010).

Çevre ve doğal kaynakların kirlenmeye karşı korunması, çevre kirliliğinin önlenmesi açısından kritik öneme sahip olmakla birlikte kirlenmiş alanların temizlenmesi de mevcut çevre kirliliklerinin çözümünde büyük önem taşımaktadır. Toprak ve suya karışan ve buralarda birikme yapan kirleticiler, mikrobiyal aktiviteye, toprak verimliliğine, biyolojik çeşitliliğe ve ürün kayıplarına, hatta besin zinciri yoluyla çevre ve insan sağlığı problemlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Çevresel kirlilik kaynaklarının tüm dünyada artış göstermesi bunların doğal ortamdan uzaklaştırılmalarına yönelik tekniklerin geliştirilmesi zorunluluğunu da beraberinde getirmiştir. Petrolle kirlenmiş karasal ve akuatik çevrelerden kontaminantların uzaklaştırılması için kullanılan yöntemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerdir.

Yakma, termal desorpsiyon, toprağın yıkanması ve solvent ekstraksiyonu gibi fiziksel ve kimyasal arıtım teknolojileri topraklardaki petrollü hidrokarbonların ortadan kaldırılması için geliştirilmekte ve test edilmektedir (Stegmann et al., 2001). Önceleri bu iki yöntem yoğun olarak kullanılsada günümüzde biyolojik yöntemlere doğru ciddi bir geçiş söz konusudur. Bunun en önemli nedenleri ise; bazı zorlu çevrelerde fiziksel ve kimyasal yöntemlerin etkili bir şekilde uygulanamaması, fiziksel ve kimyasal yöntemlerin uygulanması sırasında yapılan işlemler ile kullanılan kimyasalların ekosisteme zarar vermesi, çeşitli kimyasal maddelere ve ekipmana ihtiyaç duyulması sebebiyle maliyetin yüksek olması şeklinde sıralanabilir (Yanık et al., 1994; Del'Arco and França, 1999; Vidali, 2001).

Fiziksel ve kimyasal teknolojiler kirlenmiş toprakların ıslah edilmesinde başarılı bulunmasına rağmen, sadece toprak yapısını bozmaları yada toprağı

biyolojik olarak yoksullaştırmaları değil, bazen tamamen steril bir ortam sağlasalar bile genellikle çok yüksek bir maliyet gerektirirler. Buna karşın biyolojik toprak arıtım teknolojileri land farming (arazi düzenlenmesi), kompostlaştırma ya da bio-yığın arıtım, sıvı bioremediasyon ve bioventing (hava-buhar uygulaması) gibi, sadece düşük maliyetli olmaları değil genellikle ortamdaki petrolü hidrokarbon kirleticilerinin seviyelerini azalttıkları ve toprak kalitesini bozmadıkları bilinmektedir. Sonuç olarak bioremediasyon petrolle kirlenmiş topraklar için yaygın olarak kullanılan arıtım teknolojisidir (Baker and Herson, 1994; Cookson, 1995).

Mikroorganizmaların petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş ortamlara eklenmesiyle harekete geçen biyolojik parçalama mekanizması, hem ekosisteme zararsız olması, hem de diğer yöntemlere kıyasla düşük maliyetli olması sebebiyle cazip bir arıtma alternatifi olmuştur.

Ülkemizde, biyodegradasyon üzerine yapılan çalışmalar genellikle düşük moleküler ağırlıklı petrol hidrokarbonları kapsamaktadır. Ayrıca, yüksek moleküler ağırlıklı polisiklik aromatik hidrokarbonların parçalanması ile ilgili araştırmalar ağırlıklı olarak bakteri ve filamentli funguslar üzerinedir. Mayalar ile ilgili çalışmalar ülkemiz için henüz yenidir. Bu nedenle, yüksek aktivitede PAH parçalayan maya strainlerinin elde edilmesi ulusal ekonomimiz ve insan sağlığı açısından son derece önemlidir. Bunun yanı sıra, PAH parçalanmasında etkili olan maya strainlerinin izolasyonu ve identifikasyonu ileride yapılacak olan rekombinant DNA çalışmalarına da temel oluşturacağı düşünülmektedir. Belirtilen nedenlerle bu çalışmada, etkili bir şekilde PAH parçalayan maya strainleri Tüpraş Petrol Rafinerisi (2011) ve Mersin Limanı (2011)'ndan ham petrol ile kontamine olmuş toprak, arıtma suyu (2010) ve aktif çamur (2010) örnekleri izole edilecek, konvansiyonel ve moleküler biyolojik yöntemlerle tanıları gerçekleştirilmiştir. Bu strainler tarafından ham petrol, iki halkalı naftalen, üç halkalı fenantren, dört halkalı piren olarak seçilen poliaromatik hidrokarbonları en fazla sayıda parçalayan strainlerin seçilmiştir. Poliaromatik hidrokarbonlar ile kirlenmiş ortamlardan izole edilecek PAH parçalayan mayaların, hidrokarbon bulaşmış ortamlara ekilmeleri, ekosistem dengelerinin yeniden kurulmasına büyük katkılar sağlayacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Maya Taksonomisinin Tarihçesi

Fermentasyondan sorumlu olan bu organizmalar, 19. yüzyılın başına kadar yaşayan canlılar olarak fark edilememiştir (Öztürk, 2007).

1836 ve 1838 yılları arasında, Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing ve Theodor Schwann mayaların yaşayan organizma gruplarından bir tanesi olduğunu göstermişler ve Schwann bu grup organizmaların funguslar içinde yer aldığını belirtmiştir. 1838’de Julius Meyen, *S. cerevisiae*, *S. pomorum* ve *S. vini*’yi içeren *Saccharomyces* genusunu bulmuştur (Barnett, 2004).

1839’da, Schwann mayaların karakteristik özelliklerini tanımlarken bir cümlesinde açık bir biçimde askosporları tarif etmektedir; ‘Hücre içerisinde hali hazırda mevcut bulunan ve ana hücrenin patlaması sonucu serbest kalan yeni hücreler yaratılmaktadır’. Bu gözlem 1857 yılında Miles Berkeley tarafından da desteklenmiştir (Barnett, 2004).

Emil Christian Hansen 1880’li yılların başında saf maya kültürlerinin elde edilmesini sağlayan teknikler geliştirmiş ve bu sayede maya taksonomisinde pratiklik artmıştır. Aynı araştırmacı 19. yüzyılın sonlarına doğru 200 tür hakkında yayın yapmış ve tanılamasını yaptığı 90 tür halen günümüzde bilinmektedir. 1893 ve 1911 yılları arasında askospor oluşturan birçok yeni maya genusu tanımlanmıştır. 1893’de Paul Lindner, tomurcuklanma ile değilde fizyon ile çoğalan *Schizosaccharomyces pombe*’yi tanıladığını rapor etmiştir (Barnett, 2004).

1904’de Hansen, *Saccharomycetes*’lerin sistematigi ile ilgili bir yayın yapmış ve bu yayın mayaların sınıflandırılmasında önemli bir basamak oluşturmuştur (Barnett, 2004).

1928’de Guilliermond, 22 genusu kapsayan ve mayaların identifikasyonu için ayırıcı bir anahtar oluşturmuştur. Araştırmacı identifikasyon için, vejetatif hücrelerin görünümü, askosporların varlığı veya yokluğu, eğer varsa sayısı ve

şekli ve ayrıca mayaların bazı şekerleri fermente etme kapasitelerini dikkate almıştır (Barnett, 2004).

1931’de, Stelling-Dekker tarafından ilk sınıflandırma çalışması yapılmış ve yayınlanmıştır (Phaff et al., 1966; Barnett, 2004).

1942’de, Diddens’in yardımı ile Lodder doktora tezinde bazı anaskosporogenik mayaların sistematigi üzerine çalışmalar yapmış ve çalışmasında kullandığı mayaların çoğunun şekerleri fermente edememesinden dolayı okzonografik metodu kullanarak mayaların karbon kaynaklarını aerobik olarak asimile etme kapasitelerini de test etmiştir (Barnett, 2004).

1951’de Lynferd Wickerham, mayaların ekoloji ve taksonomisini yetersiz bularak bu kategorilerle ilgili çalışmalar yapmış ve asimilasyon ve/veya fermentasyon için test edilen karbon kaynaklarının sayısını 30’a çıkarmıştır (Barnett, 2004; Öztürk, 2007).

1952’de, Lodder ve Kreger-van Rij en gelişmiş maya sınıflandırmasını bir kitap altında toplamışlardır (*The Yeasts: Taxonomic Study*). Bu sınıflandırmayı yaparken de önceki çalışmalarda kullanılan benzer teknikleri kullanmışlardır ve 180 türü 3 familya altında toplamışlardır; askosporogenik olan *Endomycetaceae*, asporogenik (fungi imperfecti) olan *Cryptococcaceae* ve basidiomisetik yada fungi imperfecti olan *Sporobolomocetaceae* (Barnett, 2004).

1970’de Lodder, *The Yeasts: a Taxonomic Study*’nin ikinci baskısını yayınlamıştır. Bu baskı için 4300 strain çalışılmış ve bu strainler 29 genus ve 349 tür altında sınıflandırılmıştır. Lodder, Wickerham ve belki birkaç araştırmacıdan daha etkilenecek karbon kaynaklarının asimilasyon testlerini 30 ila 40 şekere çıkarmış ve 5 ila 13 arasında da şeker fermentasyonu testi kullanmıştır. Bu kitapta toplanan genuslar, *Ascomycetes*, *Ustilaginales*, *Sporobolomycetaceae* ve diğer anaskosporogenik mayalar şeklinde 4 grup altında sınıflandırılmıştır (Barnett, 2004).

Alexopoulos et al. (1979) mayaları askomisetik, basidiomisetik ve deuteromisetik mayalar adı altında üç grupta incelemiştir. Askomisetik mayaları, *Ascomycetes* sınıfı, *Hemiascomycetidae* alt sınıfı, *Endomycetales* ordosu ve *Saccharomycetaceae* familyası altında, basidiomisetik mayaları ise *Ustilaginales* ordosu ve *Ustilaginaceae* familyası altında incelemiştir (Alexopoulos et al., 1996).

1984 yılında Kreger-van Rij, 1998 yılında Kurtzman, Fell ve diğer 36 araştırmacı tarafından *The Yeasts: Taxonomic Study* kitabının üçüncü ve dördüncü baskısı yapılmış ama birkaç küçük ayrıntı dışında ilk iki baskı temel alınmıştır (Barnett, 2004).

Alexopoulos et al. (1996), moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesine bağlı olarak yaptıkları sistematikte bazı değişiklikler yapmışlardır. Askomisetik mayalar tekrar *Saccharomycetales* ordosu ve *Saccharomycetaceae* familyası altında incelenmekle beraber, bazı genuslar aynı ordo altında farklı familyalara sokulmuştur. Daha önce yapılan sistematikte *Saccharomycetales* ordosunda yer almayan bazı mayalar bu ordo içerisine alınmıştır.

Barnett et al. (2000), Askomisetik mayaları, *Archiascomycetes*, *Saccharomycetes* ve *Hemiascomycetes* sınıfları altında toplarken Basidiomisetik mayaları *Hymenomycetes*, *Urediniomycetes* ve *Ustilaginomycetes* sınıfları altında toplamıştır. Tez kapsamındaki izole edilen türlerin sistematigi de hem Alexopoulos et al. (1996) hem de Barnett et al. (2000) göre yapılmıştır.

2.2 Mayaların Mikrobiyal Ekolojisi

Sıcaklık, su aktivitesi, pH, mevcut O₂, besin maddelerinin bulunması, inhibitörlerin varlığı gibi birçok çevresel faktör mayaların büyümesini etkilemektedir. Mayaların optimum büyüme sıcaklığı 24-48°C arasında olduğundan dolayı büyük çoğunluğu (%98) mezofil olarak dikkate alınmaktadır. Çevresel faktörler mayaların büyüme sıcaklığını etkilemektedir. Solüt konsantrasyonunda bir artış veya su aktivitesinde bir düşüş organizmanın

optimum büyüme sıcaklığında 2-6°C kadar artışa neden olmaktadır (Deak, 2006; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Mikroorganizmanın metabolik aktivitesi için suyun bulunması (A_w) gıdalardaki mikroorganizmaların büyümesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Su aktivitesi çözelti konsantrasyonuna göre değişmektedir. Tuz ve şeker toleransı ile sükröz ve glukoz toleransı arasında farklılıklar vardır. Mayaların büyük çoğunluğu aynı su aktivitesinde tuza göre şekerin daha yüksek konsantrasyonlarına tolerans gösterebilmektedir. Gıdalarda bozunmaya neden olan mayaların büyük çoğunluğu minimum 0,90-0,95 arasındaki su aktivitesinde büyüebilmektedirler. Az sayıda osmotolerant maya genuslarına dahil türler oldukça düşük bir su aktivitesinde büyüebilmektedir. Örneğin, *Zygsaccharomyces rouxii*, 0,62 gibi düşük su aktivitesine sahip yüksek şekerli gıdalarda büyüeyebilen osmotolerant bir mayadır (Deak, 2006; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Gıdaların mikrobiyal ekolojisinde önemli bir diğer faktör pH'dır. Mayaların çoğu 3 ila 10 arasındaki pH değerlerini tolere edebilir ve optimum pH aralıkları 4.5'dan 6.5'a kadar değişebilmektedir. pH'ya olan tolerans, asitin türüne bağlıdır. Genellikle organik asitler inorganik asitlerden daha inhibitör etkiye sahiptir (Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Mayanın canlılığını sürdürebilmesi ve büyüebilmesi için hücrenin plazma membranına karşı bir proton gradiyenti oluşturarak intraselüler pH'yı 6.5 civarında tutması gerekmektedir. Asit tolerant türler düşük pH'lı çevrelerde protonları hücre dışına aktif olarak pompalayan aktif transport sistemine sahiptir. Etanol konsantrasyonu membran geçirgenliğini etkiler ve bu nedenle maya hücrelerinin hücre içi pH'larını da etkilemektedir (Loureiro and Querol, 1999; Deak, 2006; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

2.3. Tanımlamada Kullanılan Yöntemler

2.3.1. Konvensiyonel yöntemlerle mayaların tanılanması

50 yılı aşkın süredir mayalar; morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve üreme karakteristikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmaktadır. Bu özelliklerine bağlı olarak mikroskobik, kültürel ve biyokimyasal testler geliştirilmiştir (Loureiro and Querol, 1999; Hierro et al., 2004; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Askomisetik, Basidiomisetik ve imperfect mayaların morfolojik özellikleri, tanılamının ilk basamağında mikroskobik testlerle belirlenir. Hücre şekli, gerçek ve/veya pseudohif oluşturup oluşturumaması, eşeysiz çoğalmanın tomurcuklanma ile mi yoksa fizyonla mı gerçekleştiği, DBB testi, sporların yapısı, yüzey özellikleri, sayısı ve şekli mikroskobik karakteristikler arasında incelenmektedir (Cosentino et al., 2001; Vaughan-Martini, 2003; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Deak and Beuchat (1996) tarafından mayaların karakterizasyonunda kullanılan geleneksel kriterler Çizelge 2.1’de özetlenmiştir. Sporların varlığı ve yokluğu ile şekilleri, konjugasyon tipi ve tomurcuklanma, boyut ve hücrenin şekli, hif ve/veya pseudohifin oluşumu, besiyerindeki koloni morfolojisi, karbon kaynaklarının fermentasyonu, karbon ve azot kaynakları üzerinde büyüyebilme, vitamin gereksinimlerinin belirlenmesi, çeşitli sıcaklıklar ile yüksek şeker ve tuz konsantrasyonlarında büyüyebilme, üre hidrolizi ve antibiyotiklere dirençlilik, bugün kullanılan tipik identifikasyon prosedürlerindeki en genel testlerdendir (Loureiro and Querol, 1999; Barnett et al., 1983, 2000; Cosentino et al., 2001; Kurtzman and Robnett, 2003; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Çizelge 2.1. Maya karakterizasyonunda kullanılan geleneksel kriterler (Deak and Beuchat, 1996)

Morfolojik Testler	Fizyolojik Testler	Biyokimyasal Testler
Eşeyli üreme Konjugasyon tipi Sporangiosporların şekli Basidiosporların oluşumu	Şekerlerin fermentasyonu	DBB reaksiyonu
Eşeysiz üreme Tomurcuklanma Fizyon Arthroconidia Ballistoconidia	Karbon kaynaklarının asimilasyonu	Üreaz reaksiyonu
Mikroskopik büyüme Hücrelerin şekli ve boyu Gerçek hif veya pseudohif Klamidosporlar	Azot kaynaklarının asimilasyonu	Coenzim Q tipi
Mikroskopik büyüme Besiyerindeki koloniler Sıvı kültürler	Vitamin gereksinimleri Nişasta oluşumu	DNA baz kompozisyonu
	Büyüme sıcaklığı Asetik asit üretimi Sikloheksimide dirençlilik	DNA dizi homolojisi

Genel olarak tanılamada çok fazla önemi olmayan kültürel testler içerisindeki en değerli parametreler, kolonilerin ürettiği pigmentler (sarı, kırmızı, pembe, turuncu, kahverengi gibi) ile koloninin tekstürüdür (düz, mukoid, gibi) (Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Geleneksel tanılamada kullanılan tekniklerin son grubunu biyokimyasal testler oluşturmaktadır. Mikroskopik karakterizasyonu takiben yapılan bu testler, taksonomistler tarafından mikroskopik gözlemlerle birlikte kullanılmaktadır (Verachtert and De Mot, 1990; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008). 1990 yılında Kurtzman et al. bu grup içerisindeki en önemli testlerin, şekerlerin fermentasyonu ile karbon ve azot kaynaklarının asimilasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılara göre Çizelge 2.2’de gösterilen bileşiklerden, Glukoz, Galaktoz, Maltoz, Me- α -D-Glukozid, Sellobioz, Melibioz, Sükroz, Melezitoz, Rafinoz ve Ksiloz, hem asimilasyon hem de fermentasyon testlerinde kullanılan karbon

kaynaklarıdır (Kurtzman, 1990; Verachtert and De Mot, 1990; Wolf, 1996; Barnett et al., 1983, 2000; Boekhout et al., 2003; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008).

Çizelge 2.2. Maya identifikasyonu için asimilasyon ve fermentasyon testlerinde kullanılan bileşikler (Kurtzman, 1990; Verachtert and De Mot, 1990; Wolf, 1996; Barnett et al., 1983, 2000; Boekhout et al., 2003; Öztürk, 2007; Çorbacı 2008).

Bileşik Grubu	Bileşik Adı
Heksozlar	D-glukoz, D-galaktoz , L-ramnoz, L-sorboz
Pentozlar	D-ksiloz, D-riboz, L-arabinoz, D-arabinoz
Disakkaritler	sükroz, maltoz, sellobioz, trehaloz, laktoz, melibioz
Trisakkaritler	rafinoz, melezitoz
Polisakkaritler	çözünür nişasta, inulin
Glukozidler	α -Me-D-glukozid, arbutin, salisin
Organik asitler	süksinat,sitrat,DL-lactat,D-glukonat, D glukuronat,D-galakturonat,2-keto-D-glukonat,5-keto-D-glukonat
Alkoller	eritritol, ribitol(adonitol), D-mannitol, myo-Inositol, metanol, etanol, gliserol, propan 1,2diol, butan 2,3 diol,galaktitol(dulcitol), D-glusitol(sorbitol), ksilitol
Diğer bileşikler	Glukano- δ -lakton, D-glukozamin-HCl, N-asetil D-glukozamin, dekan, hegzadekan

2.3.2. Moleküler biyolojik teknikler ile mayaların tanılanması

Moleküler biyolojik yöntemler, bakteriler ve insanlar ile canlılığın diğer formları olmak üzere çeşitli organizmalar arasındaki ilişkinin netlik kazanmasını sağladığından maya taksonomisinde de önemi gittikçe artmaktadır. Mayaların tanılanması ve karakterizasyonunda fenotipik karakteristiklere dayanan yöntemlerle moleküler genetik yöntemler karşılaştırıldığında moleküler yöntemler oldukça etkili olmaya başlamıştır (Latouche et al.,1997; Fernandez-Espinar et al., 2000). Bu nedenle organizmaların karakterizasyonu, identifikasyonu ve sınıflandırmasında moleküler tekniklerin kullanımı gittikçe yaygınlaştırılmaktadır.

Daha önceleri bu metodlar izoenzim profillemeye, nükleik asit tiplendirme analizleri, maya hücrelerinin uzun zincirli yağ asidi veya toplam protein analizleri üzerine dayanmaktaydı. Bu yöntemlerin çoğu tanılama ile ilişkili olarak taksonominin bir kısmını saptamak için kullanılmaktaydı ve endüstride uygulanabilmesi ayrıntılı bir şekilde geliştirilememiştir. Ayrıca bu yöntemler gıda ile ilişkili olan mayaları ayırt etmede yeterli derecede etkili olamamıştır. Son yıllarda proteine dayalı moleküler karakterizasyonların yanında moleküler biyolojideki son ilerlemeler maya tanınması ve karakterizasyonunda yeni tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Bu teknikler elektroforetik karyotiplendirme, mitokondriyal DNA restriksiyon analizi, ribozomal DNA restriksiyon analizi, DNA fingerprint, RAPD analizleri ve 5,8S rRNA genlerini (rDNA) ifade eden ITS dizilerinin restriksiyon analizleridir (Van der Vassen et al., 1996 ; Gomes et al., 2000; Deak et al., 2000 ; Hierro et al., 2004).

2.3.2.1. Baz kompozisyonu analizi

Nükleer DNA'daki G-C içeriğinin belirlenmesi, maya taksonomisinde kullanılan moleküler kriterlerin ilkidir (Boekhout et al., 2003). %G-C içeriği, denatürasyonda uygulanacak sıcaklığı belirleyen kriter olması açısından da oldukça önemlidir. (Verachtert and De Mot, 1990; Vaughan-Martini, 2003). Benzer G-C içeriği strainlerin aynı türe ait olduğu anlamına gelmese de, iki strainin farklı türleri temsil edip etmediği baz kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntemle bağlı olarak bir dereceye kadar anlaşılabilir. G-C içeriğinin belirlenmesinde kullanılan Bouyant Density yönteminde, bir türün strainleri arasındaki G-C oran farkı genellikle % 1' den azdır. Ancak Termal Denatürasyon yönteminde daha büyük farklılıklar gösterebilir ve tür içi strainler arasındaki G-C oran farkı %2'ye kadar çıkabilir (Boekhout et al., 2003).

Askomisetik mayaların DNA'larındaki G-C içeriği % 27- 50 mol civarında olmasına karşın Basidiomisetik mayalarda bu değer % 50-70 mol arasında olup % 48-52 mol arasındaki dar mesafede girişim meydana gelmektedir (Boekhout et al., 2003). G-C oranının taksonomik kullanımı, bilinen maya türlerindeki DNA'nın G-C içeriğinin yaklaşık % 27- 70 mol arasında bulunması ve akraba olmayan türlerde dahi girişim yapması nedeniyle özellikle genus ve tür seviyesinde

tanılama yapmak için sakıncalıdır (Verachtert and De Mot, 1990). Maya taksonomisinde artık primer öneme sahip olmasa da, G-C oranının saptanmasına olan ilgi halen devam etmektedir (Boekhout et al., 2003).

2.3.2.2. DNA dizi homolojisi

G+C değerleri taksonların ayrılmasında önemli olmasına rağmen tür ayırımında kullanımı sınırlıdır. Akrabalık derecelerini belirlemede kullanılmak üzere geliştirilen bir diğer test, nükleer DNA ilişkilerinin saptanmasıdır. Tip strain ve izole edilen DNA'nın %80 üzerinde komplementeri olması, türlerin aynı genusa ait olduğunu göstermektedir.

Kurtzman ve arkadaşları heterotallik mayaların DNA karşılaştırmalarının fertilite ile kuvvetli bir korelasyon gösterdiğini söylemişlerdir. Bu çalışmaların ilki *Pichia amylophila* ve *Pichia mississippiensis* türleri iyi bir şekilde eşleşmişler ama askospor oluşturmamışlardır. Bu iki tür sadece %25 DNA homolojisine sahiptir. Dolayısıyla eşeyli üremenin eksik olduğunu bulmuşlardır. DNA ilişkileri ve fertilite arasında kuvvetli bir korelasyon olmasına karşılık bunun dışına çıkan olaylar da vardır. Yüksek oranda DNA homolojisi gösteren türler arasında fertilitesinde düşüklük gözlenmiştir. Kromozomdaki değişiklikler strainler arasındaki fertiliteyi etkilemektedir.

Pichia lindneri ve *Hansenula minuta* arasında %75 DNA homolojisi saptanmasına karşın bu 2 genus sadece nitrat asimilasyonu testiyle birbirinden ayrılmıştır. Dolayısıyla, G-C içeriğinin saptanmasında olduğu gibi DNA homolojisi de tek başına taksonomik bir kriter olarak kullanılamamaktadır (Verachtert and De Mot, 1990).

2.3.2.3. Uzun zincirli yağ asitleri

Yağ asitleri genel olarak çift karbon sayılı, cis konfigürasyonda, dallanmamış ve düz zincirli monokarboksilik asitlerdir. Az olmakla birlikte doğada trans konfigürasyonda (elaidik asit), tek karbon sayılı (propiyonik asit, valerik asit gibi) ve dallanmış yağ asitleri (tüberkülostearik asit veya laktobasillik

asit metil grubu ile dallanma gösteren doymuş yağ asitleridir) ile siklik yağ asitleri (hidnokarpik asit ve şolmugrik asit) de bulunmaktadır. Yağ asitleri, hidrokarbon zincirdeki bağlara göre doymuş veya doymamış yağ asitleri olmak üzere iki grupta incelenebilir. Doymamış bağların sayısı bir veya daha fazla olabilir ve doymamış yağ asitleri kolaylıkla okside olabilirler. Özellikle çift bağ sayısının artması oksidasyonu kolaylaştırmaktadır. Isı, ışık oksidasyonu hızlandırmaktadır.

Bir biomarkır olarak membran yağ asitleri profilinin kullanımı gıda endüstrisinde bozulmaya neden olan mayaların tanımlanmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. İlk başlarda bu konuda karşılaşılan bazı problemler şunlardır:

- ✓ Mayaların büyüme koşullarına bağlı olarak total yağ asidi kompozisyonlarının değişmesi.
- ✓ Mayaların yağ asidi kompozisyonundaki düşük varyasyonlar.
- ✓ Zaman alan yüksek maliyetli tekniklerin kullanılması.
- ✓ Bu tekniklerin uygulanmasında uzman personele ihtiyaç duyulması.

Fakat zamanla bu problemlerin de üstesinden gelinmiştir. Çünkü petride dahi büyüme koşullarını standardize edilip toplam lipit kompozisyonundaki varyasyonları en aza indirmek mümkündür. Maya strainleri eğer yavaş büyümüyorsa, izolasyon ve saflaştırma işlemlerinden sonraki iki gün içerisinde sonuçların alınabildiği, ayrıca bu tekniğin diğer kullanılan hızlı tiplendirme tekniklerinin çoğundan da daha pahalı olmadığı anlaşılmıştır. Bu yaklaşımın en önemli avantajı gıda kaynaklı mayaları linoleik C 18:2 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 \text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$) ve linolenik C 18:3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$) yağ asitlerinin varlığına bağlı olarak 3 temel gruba ayırmasıdır. Bozulmaya sebep olan mayaların çoğunda hücrede büyük miktarlarda C 18:2 mevcut, C 18:3 yağ asitlerinin ise bulunmamaktadır. C 18:2 ve C 18:3 yağ asitlerinin maya hücrelerinde bulunmaması hijyenik şartların olmaması veya koruyucuların yetersiz kullanımını yansıtırken çoklu doymamış C 18 yağ asitlerinin yokluğu da *Saccharomyces* genusuna ait fermentatif strainler gibi bozulmaya neden olan organizmaların varlığını göstermektedir. Çeşitli gıda

ürünlerinde dominant olan bu türlerin üç temel grubu Çizelge 2.3’de gösterilmiştir. Bu şartlar altında morfolojik karakteristiklere bağlı olarak besiyeri üzerindeki maya kolonilerinin seçimi zor olmayıp verilen bir gıdadaki farklı maya türleri arasındaki ilişki tahmin edilebilmektedir. Gıda endüstrisinde en büyük güçlük temel gıdaların kontaminasyonunu gerçekleştiren mayalara ait uzun zincirli yağ asidi profillerini içeren bir veri bankasının olmayışdır (Loureiro and Querol, 1999).

Çizelge 2.3. Çoklu Doymamış C18 Yağ Asidi Kompozisyonuna Göre 3 Gruptaki Mayaların Dağılımı (Loureiro and Querol, 1999)

Grup I C18:2(-); C18:3 (-)	Grup II C18:2 (+); C18:3(-)	Grup III C18:2 (+) ; C18:3 (+)
<i>Hanseniospora uvarum</i>	<i>Dekkera anamola</i>	<i>Candida catenulata</i>
<i>Hanseniospora quilliermondi</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida quilliermondii</i>
<i>Hanseniospora vineae</i>	<i>Dekkera naardenensis</i>	<i>Candida sake</i>
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Pichia etchellsii</i>	<i>Candida rugosa</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Saccharomyces chevalieri</i>	<i>Torulaspora delbrückii</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Torulaspora globosa</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>Saccharomyces unisporus</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Debaryomyces polymorphus</i>
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	<i>Issachenkia orientalis</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
	<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
		<i>Pichia anamola</i>
		<i>Pichia fermentans</i>
		<i>Pichia quilliermondii</i>
		<i>Pichia membranifaciens</i>
		<i>Rhodotorula glutinus</i>
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
		<i>Saccharomyces kluyveri</i>

2.3.2.4.Elektroforetik karyotiplendirme (pulsed field elektroforez)

Kromozomal DNA'ların elektroforetik bantları maya sistematigi çalışmalarında potansiyel olarak kullanılan verileri sağlamaktadır. Pulsed-field teknikleri ile karyotiplerin analizi maya sistematigi ve genetiğinde geniş kullanım alanına sahiptir. Bireysel kromozomların sayısı ve büyüklüğü, toplam genom boyutunun tahmini, kromozomlardaki yeni düzenlemeler ve gen değerlendirmesi çalışılan özellikler arasındadır. Taksonomik olarak bu veriler türler arasındaki farklılıkların ve/veya populasyonların ayırımında kullanılmaktadır (Querol et al.,1992; Deak, 1995).

Bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen hücreler, düşük erime ısıli agoroza karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agoroz içine karıştırılan hücreler deterjan veya enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Liziz işlemini takiben agoroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein veya karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agoroz jel içinde tutulu kalır. Agoroz içindeki DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve elektrik akıma tabi tutulmaktadır. Elektroforez sonucunda jel etidium bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale gelmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımı ile değerlendirilerek suşların birbiriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır.

Elektroforetik karyotiplendirme fungusların kromozomal DNA kompozisyonunun analizi için yararlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca fungusların taksonomisinde, medikal olarak önemli mayaların, bira ve şarap mayalarının spesifik strainlerinin saptanmasına olanak sağlamıştır (Deak, 1995).

Son 10 yılda pulsed jel elektroforezde (PFGE) önemli ilerlemeler yapılmıştır. Elektroforezin süresi, jel konsantrasyonu, elektrik alan şiddeti gibi çeşitli faktörlerin kromozomal DNA'nın ayrımı üzerine etkileri açıklanmıştır (Querol et al., 1992; Deak,1995).

6 Mb'a kadar olan kromozomal DNA ayrımının yapılabilmesine karşın 10 Mb'a kadar olan ayrımlar da rapor edilmiştir. 6 Mb'dan daha büyük kromozomal DNA'nın ayrımı güç olup uzun yükleme ve çalışma süresine gereksinim duyulmaktadır. Boyut standartları için ; *Saccharomyces cerevisiae* , *Pichia canadensis* (=Hansenula wingei) ve *Schizosaccharomyces pombe*'nin kromozomal DNA'ları ticari olarak mevcuttur (Boekhout et al., 2003).

Bilinmeyen karyotipe sahip her bir maya türü için, elektroforez sırasında kullanılan parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir (Boekhout et al., 2003).

2.3.2.5. Elektroforetik izoenzim profilleri

Farklı organizmalardaki enzimlerin aminoasit sırasındaki farklılıklar, organizmalar arasındaki filogenetik farklılığı göstermektedir. Bir proteinin sentezlenmesi sırasında bir aminoasitin yerine başka bir aminoasitin geçmesi, elektroferetik jel üzerinde enzimlerin yürütülmesi ile anlaşılabilir (Loureiro, 2000). Strainlerin saflaştırılmasını takiben 48 saat süren bu yöntem, oldukça duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Maya türlerinin tanımlanmasında kullanılabilen bu yöntemin en büyük sakıncası, izoenzim bantlarını içeren geniş bir veri bankasının oluşturulmamış olmasıdır (Loureiro and Querol, 1999; Loureiro, 2000).

2.3.2.6. PCR'a dayalı teknikler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'a dayalı teknikler yüksek duyarlılıkta ve spesifiklikte DNA dizi değişikliklerinin aranmasına izin vermiştir. Temel PCR protokolü DNA sentezini başlatmak için DNA'nın her bir ipliği üzerinde hedef sequensin yanındaki sequense bağlanabilen iki oligonukleotid primerin

kullanımını içermektedir. Hedef bölgenin çoğaltılmasını mümkün kılan PCR ' ın keşfiyle beraber tanılamada kullanılabilecek yeni moleküler teknikler geliştirilmiştir. PCR teknikleri ile genus ve tür seviyesinde ayırım yapılabilmektedir (Ness et al., 1993; Lopes et al., 1996).

Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) PCR, maya türlerinin ve bir türün bireysel strainlerinin ayırımında geniş bir kullanım alanına sahiptir. RFLP-PCR'da küçük alt birim rRNA'yı kodlayan bölge çoğaltılır ve değişik restriksiyon endonukleazları ile kesilerek oluşan fragmentler, aynı restriksiyon enzimleriyle tip tür DNA'sının kesimi sonucunda oluşan fragmentlerin agaroz jelde yürütülmesiyle karşılaştırılır. (Loureiro, 2000; Cappa and Cacconcelli, 2001). Uygun endonukleazların kullanıldığı durumlarda sonuçların tekrarlanabilirliğinin daha yüksek olması sebebiyle, türlerin ve strainlerin tanınmasında bu yöntem oldukça yararlıdır (Loureiro, 2000 ; Andrighetto et al., 2000; Boekhout et al., 2003).

PCR kullanılarak farklı yaklaşımlar denenmektedir. Rastgele (Random) Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği 5-15 bazlık tesadüfi nükleotid dizisinin tekli ve kısa primerleri ile DNA'nın tesadüfi segmentlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. RAPD ya da "Arbitrarily" keyfi başlatılan PCR (AP-PCR), DNA düzeyinde tüm genomda karşılaştırılan iki sistemin nitelik ve nicelik bakımından özelliklerinin saptanmasını sağlayan bir tekniktir. 1990 yılında Welsh ve Mc Cleland tarafından tanımlanan yöntem, her tür mikroorganizma analizinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine tesadüfi olarak seçilen bir veya daha fazla primerlerle DNA'daki bir çok bölgenin çoğaltılması hedeflenmektedir. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları, agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genellikle 5-15 bazlık kısa primerler olup G-C içeriği zengindir. (en az %40 mol G+C içermeli). Seçilen primerler, düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, agaroz jel elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılıklar

gösterecektir. Amplifikasyon sonucunda jelde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır (Gomes et al., 2000).

Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilmesi açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olması ve stabilitesi düşük bantların oluşmasıdır. Bu sorunları gidermek için; kullanılan hedef DNA ekstraksiyon protokolü, DNA konsantrasyonu, primerlerin baz dizilimi ve konsantrasyonu, $MgCl_2$ konsantrasyonu, tampon ve Taq DNA polimeraz enzim miktarının çalışma süresince sabit tutulması gerekmektedir.

RAPD tekniği, özellikle organizmaların tiplendirilmesi ve maya türlerinin tanımlanmasında uygun bir yöntemdir. Bu teknik , *Candida lipolytica*, *C.valida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* ve *Z. rouxii* gibi bozunmaya sebep olan bazı tipik mayaları ayırt etmek için kullanılmıştır (Paffetti et al., 1995; Loureiro and Querol, 1999).

RAPD-PCR, RFLP-PCR yöntemine göre daha avantajlıdır. Bu yöntemde, DNA kolay bir şekilde ekstrakte edilir ve yüksek bir saflaştırmaya gerek yoktur. DNA'nın çok az bir miktarı analiz için yeterlidir. Ayrıca sonuçlar kolayla elde edilmektedir. Bütün RAPD analiz prosedürleri bir günde tamamlanmasına karşın RFLP analizi için en az üç gün gerekmektedir (Couto et al., 1994; Loureiro and Querol, 1999 ; Andrighetto et al., 2000). Ancak RAPD-PCR'nın bütün basamakları esnasında çok dikkatli olunması gerekmektedir (Gomes et al., 2000). Kullanılan primerlere bağlı olarak RAPD analizleri değişkenlik gösterdiğinden, uygun primerin seçimi zor ve zaman almaktadır (Perez et al., 2001). Ayrıca RAPD-PCR analizinde oldukça kompleks veriler oluşabildiğinden, taksonomik sonuçlar için verilerin toplanması ve okunması zor olabilmektedir (Couto et al., 1995).

Diğer bir PCR tabanlı yaklaşım ise, mikrosatellit olarak adlandırılan basit tekrarlayıcı DNA sekanslarının spesifik oligonukleotidlerle çoğaltılmasını kapsamaktadır. Genomda işlevleri bilinmeyen, yüzlerce hatta yüz binlerce kez tekrarlanan birçok DNA dizisi bulunur. Bunların bazıları genomda yaygın olarak bulunurlar; bazıları ise ardışık olarak tekrarlanırlar ve genomda sadece bazı özel

bölgelerde bulunabilirler (satellit DNA). Tekrarlanan diziler genetik tiplendirme için kullanıma uygun çok kopyalı işaretlerdir. Satellit DNA dizileri içerdikleri tekrar birimleri sayısına göre iki grup altında toplanmaktadır. Minisatellitler ~ 10-200 bp boyutunda birimlerden oluşan tekrarlardır; mikrosatellitler ise ~ 2-6 bp boyutunda birimlerden oluşurlar. Mikrosatellit markırlar tekrar sayısı genellikle 30, oldukça polimorfik, genom boyunca dağılmış ve PCR ile kolaylıkla saptanabilen dizilerdir. Maya tanınması ve karakterizasyonunda (GTC)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ primerleri, M13 faj DNA'sı ve yalnızca M13 sekansı (GAGGTGGCCGTTCT) kullanılmıştır. Bu teknik, birleşme sıcaklığının yüksek olması sebebiyle (37°C yerine 55°C) RAPD tekniğinden daha fazla tekrarlanabilir niteliktedir. Baleiras Couta ve arkadaşları bu tekniği kullanarak, mayonez ve salata soslarında mevcut olan *Z. bailii* ve *Z. bisporus*'un strainlerini tanılamışlardır (Loureiro and Querol, 1999).

Mitokondriyal DNA (mtDNA) polimorfizmi, genomun organizasyonundaki değişikliklerin saptanmasında yaygın olarak kullanıldığı gibi taksonomik çalışmalarda da önemli bir araç haline gelmiştir (Loureiro and Querol 1999; Lopez et al., 2001). Söz konusu yöntem, mitokondriyal DNA'nın ekstrakte edilerek restriksiyon enzimleriyle kesimini takiben elektroforezde yürütülmesi ve mDNA profilinin çıkarılması şeklinde özetlenebilmektedir. Tüm genomla çalışmak zaman alan, hacimli ve zahmetli bir iş olduğundan mDNA ile çalışmak daha pratiktir. Mc Arthur ve Clarck Walker, mDNA restriksiyon yol izlerini perfect-imperfect ilişkileriyle korele etmek için *Dekkera* (Askomisetik) ve *Brettanomyces* (İmperfekt) genusları üzerinde çalışmışlardır. Sonuçta, *Dekkera bruxellensis* ve *Brettanomyces lambicus* çifti için identik yol izi bulmuşlardır. Başka türler arasında da benzer yol izleri bulunmasına karşın, elde edilen bu sonuçların DNA homolojilerinden elde edilen verilerden daha doğru olabildiği konusunda bir bilgi mevcut değildir. Ayrıca, maya türleri arasında mDNA'daki boyut farklılıkları sözkonusu yöntemin uygulanabilirliğini sınırlamaktadır (Verachtert and De Mot, 1990).

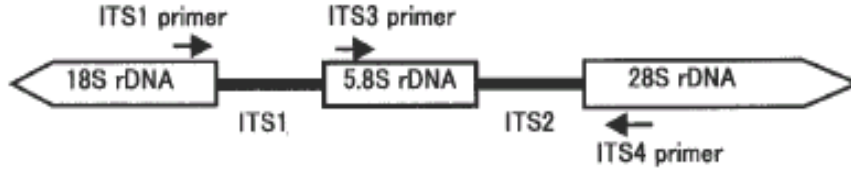
2.3.2.6.1. ITS-PCR

Son yıllarda ribozomal RNA (rRNA) genlerini hedefleyen PCR teknikleri oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bazı hemiascomisetik mayaların rRNA genleri, 9 kb'lık bir fragmentin 100-150 ardışık tekrarından oluşan genomik bir bölgedir. Bu fragmentler 2 transkripsiyonel birim içermektedir. Bunlardan birincisi (7kb) 18S, 5,8 S ve 28S'lik rRNA'lar ile ITS1 ve ITS2 olarak adlandırılan iki internal transcribed spacer (ITS) için kod oluşturan gen kümelerinden oluşmaktadır. Zıt yönde transkribe edilen ikinci birim ise 5S'lik rRNA'ya ait kodu içermektedir (Loureiro and Querol, 1999; Caggia et al., 2001; Martorell et al., 2005).

ITS bölgelerinin uzunluğu türe göre değişiklik göstermesine karşın bütün türlerde 18S , 5,8S ve 28S rRNA'ların boyutu esasen aynıdır (Fernandez et al., 1999). ITS1 bölgesi, 18S ve 5,8S rRNA genleri arasında bulunurken ITS2 bölgesi, 28S rRNA genleri arasında bulunmaktadır. ITS1-5,8S rDNA-ITS2 bölgelerinin sequensleri veya fragment boyutları türler arasında farklıdır (Çizelge 2.4). Bu nedenle ITS1 ve ITS2 bölgeleri, fungusların aranmasında ve identifikasyonunda kullanılmaktadır (Guillamon et al., 1998; Fujita et al., 2001).

ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanılmasıyla fungusların 5,8S rDNA bölgesi ile ITS1 ve ITS2 bölgeleri amplifiye olmaktadır. ITS3 ve ITS4 primer çiftinin kullanılmasıyla da ITS2 bölgesi amplifiye olmaktadır. ITS1 primeri 18S, ITS3 primeri 5,8S ve ITS4 primeri 28S rDNA bölgelerini kodlamaktadır (Şekil 2.1) ITS1 ve ITS4 primerleri ile test edilen bütün funguslar 350-880 bp. boyutunda fragment oluştururken ITS3 ve ITS4 primerleri ile 233-432 bp. boyutunda ürün oluşmuştur. Amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutları bazı türlerde hemen hemen aynıdır. Örneğin, *C. parapsilosis* ve *C.tropicalis* 'de yaklaşık 520 bp., *C. saitoana* ve *P. anamola* 'da yaklaşık 614 bp.'dir. Fakat bu organizmaların ITS3 ve ITS4 primer çifti ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu, türe spesifik farklılıklar göstermiştir. Bunun tam tersi ITS3 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu *C.utilis* ve *Stephanoascus ciferri* için yaklaşık 356 bp. iken ITS1 ve ITS4 primerleri ile amplifiye olan PCR ürünlerinin boyutu türe spesifik farklılıklar oluşturmuştur (Fujita et al., 2001).

Son zamanlarda Esteve-Zarzoso ve arkadaşları (1999), ITS ve 5,8S'lik rRNA geninin restriksiyon analizi üzerine kurulu rutin maya identifikasyonu için hızlı ve kolay bir yöntem önermişlerdir. 25 farklı genusa ait toplam 132 maya türünü tanılamak için başlangıç veri tabanı sunmuşlardır. Bu metodu kullanarak, izole edilmiş kolonileri ya da direkt olarak gıda örneğinden mayaları tanılamak mümkün olmuştur. Bu, çok sayıda maya türünün tanınması için bilgi sağlayan ilk moleküler metod olmuştur. Dlauchy ve arkadaşları aynı yöntemi kullanıp farklı bölgeleri çoğaltarak (18S rRNA ve ITS1) özellikle gıda, bira, şarap ve yumuşak içeceklerle bağlantılı 128 türün restriksiyon fragment bantlarının veri tabanını inşa etmişlerdir (Loureiro and Querol,1999).



Şekil 2.1. Primer Hedef Bölgeleri İçeren Fungal Ribozomal Genlerin Şematik Gösterimi (Loureiro and Querol,1999)

Çizelge 2.4. Önemli Bazı Mayaların ITS1 / 5,8S rDNA / ITS2 Bölgesinin Boyutları (Arlorio et al., 1999, Guillamón et al., 1998 ; Fujita et al., 2001)

Tür	Boyut (bp)
<i>Cryptococcus albidus</i>	550
<i>Pichia pastoris</i>	380
<i>Rhodotorula muciliginosa</i>	640
<i>Candida sinolaborantium</i>	600
<i>Pichia anamola</i>	614
<i>Candida zeylanoides</i>	620
<i>Debaryomyces hansenii</i>	640
<i>Cryptococcus diffluens</i>	620
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	740
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	630
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850

2.3.2.6.2. 26S rDNA -PCR

Moleküler biyolojideki gelişmeler, mayaların tanımlanması ve tiplendirilmesi için yeni tekniklerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Fenotipik özelliklerle kıyaslandığında, nükleik asit dizisinde gözlenen genotip, büyüme esnasında çevresel etkilerle değişmediğinden dolayı daha karardır. Bununla birlikte DNA molekülleri, çok yakın türler ve hatta aynı türe ait suşlar arasında rekombinasyon ve mutasyonla farklılaşabilmektedir. Ayrıca, evrimsel süreç esnasında, genetik materyaldeki değişimler farklı bir taksonomik seviyedeki organizmaların ayırımına izin vermekte ve bu organizmaların filogenetik ilişkilerini kavramamızı sağlamaktadır (Deak, 2007).

DNA sekansı ile tanılama, taksonomik ve filogenetik çalışmalar için kullanılan en önemli araçlardan bir tanesidir. Ribosomal DNA'nın avantajı, bütün yaşayan organizmalarda bulunması ve çoklu kopyalar halinde ortak bir evrimsel orijine sahip olmasıdır. Yüksek derecede korunmuş olan rDNA, bir türe ait olan bütün suşlar arasında hem farklılıkları göstermek hem de daha yüksek taksonları betimlemek için kullanılmaktadır (Kurtzman, 2006). Hem taksonomik amaç hem de filogenetik ilişkileri oluşturmak için iki rDNA bölgesini hedef alan yöntemler tercih edilmektedir. Bu bölgelerden ilki, rDNA'nın küçük ribozomal alt birimi olan 18S rDNA'nın bir kısmı veya tamamıdır ve diğeri ise ribozomun büyük alt biriminin yaklaşık 600 nükleotid uzunluğunda olan D1/D2 domainidir. Kurtzman and Robnett (1995, 1998 ve 2003), bütün bilinen askomisetik mayaların D1/D2 domaininin sekansını saptamışlar ve neredeyse bütün askomisetik mayaların ayırımı için bu domainin yeterli olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Sadece birkaç çok yakın ilişki içerisinde olan türün ayırımında bu domainin yeterli olmadığı belirtilmiştir ancak, %1'den daha fazla sekans farklılığı gösteren strainlerin farklı türler olabileceği ortaya koyulmuştur. Fell et al. (2000) ise bütün bilinen basidiyomisetik mayalar için bu domaininin sekans analizini gerçekleştirmişler ve basidiyomisetik mayaların ayırımında bu domainin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Son on yılda, büyük alt birim (26S) rRNA'nın nükleotid bilgisi kullanılarak, mayaların identifikasyonu için pek çok PCR primeri dizayn edilmiştir ve bu yöntem, hem tanılama hem de filogeni çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Genel olarak maya taksonomisinde kullanılan belli başlı testler yukarıda sıralanmıştır. Türlerin tanımlanmasında ilk olarak fizyolojik testler rol oynamaktadır (Loureiro and Querol, 1999). Moleküler teknikler yalnızca mayalar arasındaki bağlantıların açığa çıkarılmasında değil aynı zamanda evölüsyonel ilişkilerin belirlenmesinde de kullanıldığı için sınıflandırmada önemli bir kriter olabilir. Fakat bu teknikler, rutin identifikasyon prosedürlerine kolaylıkla dahil edilemedikleri ve kullanılmaları halinde karşılaşılabilecek sakıncalar nedeniyle mayaların identifikasyonu bugün halen fizyolojik testler ve üreme yapıları üzerine kuruludur. Dolayısıyla, moleküler biyolojik tekniklerin, konvansiyonel tanılama teknikleri ile desteklenmesi gerekmektedir (Acheampong, 2000).

2.4. Poliaromatik Hidrokarbonlar

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) doğal ve antropojenik kaynaklardan ve petrol kökenli kirleticilerin bilinçli veya kaza sonucunda çevreye bırakılmaları, kentsel/endüstriyel tesislerin üretim sonucu atık çıktıları ve taşıt faaliyetleri sonucunda ortaya çıkan tehlikeli organik maddelerdir. Bu çevresel kirletici maddeler yüksek sıcaklıklarda organik maddelerin tam olarak yanmaması sonucu oluşur (Restrepo et al., 2008). Ayrıca petrol ve petrol türevi olan PAH'lar, kullanım esnasındaki hatalar ve ihmaller sonucunda, petrol dökülmesi ve fosil yakıtların tamamen yanmadan atılmalarıyla çevreye bulaşan ve sucul ve karasal ekosistemlerde uzun süre kalabilen çevresel bileşikler sınıfındadırlar (Karakaya, 2003; Yunker et al., 2003; Martinez et al., 2004).

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) 2-7 halkalı hidrokarbon bileşikleri olup her türlü yanma prosesi sonucu atmosfere verilen ve 100 den fazla farklı türü içinde barındıran kimyasal bir gruptur (Li et al., 2003; Telli-Karakoç et al., 2002). Bunlardan iki halkalı olan naftalin, üç halkalı olanlar antrasen ile fenantren ve halka sayısı fazla olan poliaromatik hidrokarbonlarda kendilerine özgü isimlerle ifade edilmektedir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Poliaromatik hidrokarbonlar (Li et al., 2003)

Benzo(a)antrasen	Benzo(a)piren	Dibenzo(ah)piren
Benzo(b)floranten	Krizen	Dibenzo(ai)piren
Benzo(j)floranten	Siklopenta(cd)piren	Dibenzo(al)piren
Benzo(k)floranten	Dibenzo(ah)antrasen	İndol(1,2,3-cd)piren
Benzo(ghi)perilen	Dibenzo(ae)piren	5-Metilkrizen

Poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), pirojenik yapıları ve kompleksitelerinden dolayı petrol hidrokarbonlarının en önemli sınıflarından bir tanesidir. Bu PAH'ların doğadaki temel kaynakları, fosil yakıtlar, fabrika atık gazları, odun muamele yöntemleri, otomobil egzozları ve yakılan atıklardır. Gaz ve yağ ekstraksiyonu esnasında üretilen atık buhar, PAH'ların nispeten yüksek konsantrasyonlarını içerir. Bu PAH'ların doğada bulunması insan sağlığı açısından son derece zararlıdır. Düşük moleküler ağırlıklı PAH'ların çoğu sucul organizmaların ölüm hızını ve üremesini etkilemektedir. Yüksek moleküler ağırlıklı PAH'ların (HMW) çoğu ise insan ve hayvanlara mutajenik, teratojenik ve karsinojeniktir (Hesham and Yang, 2010).

2.4.1 Poliaromatik hidrokarbonların tarihçesi

PAH ilk defa 1775'te Percival Pott tarafından baca temizlikçilerinde tanımlanmıştır. Bu kişilerde, çok küçük yaşta çalışmaya başladıklarından iste bulunan benzo-(a)-pyren'in neden olduğu cilt kanserine rastlanmıştır. 1875'te Almanya'da katran endüstrisinde çalışan işçilerde deri kanseri gözlenmiştir. Dahasonra 1947 ve 1872'de gaz endüstrisi ve katran işçilerinde kanser araştırması yapılmıştır (Alloway and Ayres, 1997). 150 yılı aşkın bir süre sonra ise zift ve katranın yapısındaki kanserojenik bileşikler polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) olarak tanımlanmıştır. 1976 yılında 30'dan fazla PAH bileşiği ve yüzlerce PAH türevinin kanserojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. PAH'lar günümüzde kimyasal kanserojenlerin en geniş sınıfı olarak bilinir (Bjorseth et al., 1985).

Günümüzde PAH'larla ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve tehlike boyutu büyük olduğu için araştırmalar devam etmektedir. PAH bileşiklerinden

kaynaklanan muhtemel tehlikeler Dünya Sağlık Örgütü'nün Kanseri Önleme Kurulu tarafından beyan edilen içme suyu standartlarında tanınmıştır ve birçok ulusal örgüt PAH'ların gıdalar, atmosfer, endüstriyel atıklar ve mobil kaynaklarla olan ilişkisini ortaya koymuştur (Eisler, 2000).

Tarımda ve Dünya sanayiinde en önemli enerji kaynağı olarak kullanılan petrol; Orta Doğu, Türki Cumhuriyetler ve Rusya Federasyonu'ndan çıkarıldıktan sonra Türkiye üzerinden bağıta Avrupa olmak üzere tüm dünyaya dağıtılmaktadır. Türk Boğazlar Sistemi ve petrol boru hatları, petrol ve/veya petrol türevlerinin Avrupa ve Uzak Doğu'ya yayılmasında köprü vazifesi görmektedir. Bu stratejik önem ekonomiye büyük katkılar sağlamasına karşın; kara (tarım alanları) ve deniz ekosistemleri üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Petrol ve/veya petrol türevlerinin yaratacağı kirlilik, öncelikle kullanılabilir toprak ve su alanlarını kirletecek, dolayısıyla besin zinciri bundan olumsuz etkilenecektir. Bu da insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturmaktadır. Kara tanker taşımacılığı ve petrol boru hatlarının geçtiği tarım alanları da petrol ve/veya petrol türevlerinin kirlilik tehdidi altındadır (Memon et al., 2006).

Petrol ve türevleri, dünyada kullanımının yaygın olması sebebi ile muhtemelen toprakta her yerde birden bulunan organik kirleticilerdendir. Her yıl yaklaşık 40.000 varil ham petrol boru hatlarındaki arıza nedeni ile toprağa dökülmektedir (Salanitro, 2001; Türkoğlu, 2006).

Petrol bulaşmalarına örnekler verecek olursak; ilk olarak 19 Temmuz 1970'de meydana gelen Nigerian Petrol Enstitüsündeki kirlilik olayıdır. Bunun sonucunda rüzgar ile savrulan küllerin 607 hektar tarım arazisini kirlittiği saptanmıştır. Buna göre petrol ve petrol ürünlerinden kaynaklanan toprak kirliliği ortaya çıkmıştır (Awobajo, 1981). 24 Mart 1989'da, Alaska'daki Exxon Valdez petrol tankerinde ham petrolün 11 milyon galonundan fazlası dökülmüştür. Bu olay tarihin en büyük petrol kazasıdır. Ocak 1993'de Braer tankerinden 85.000 ton Norwegian ham petrolü Shetland adası boyunca denize dökülmüştür (The Mariner Group, 2001). Daha da yakınlarda Ocak 2001'de 250.000 galon dizel ve kömür yakıtı nadir bitki ve hayvan türlerine ev sahipliği yapan Galapagos adası ve çevredeki denize sızmıştır (Charles Darwing Foundation, 2001). 1967 – 2004

yılları arasında tüm dünyada sadece denizlerde meydana gelen irili ufaklı petrol kirliliği vakaları yüzü aşmaktadır (The Mariner Group, 2004). En son ABD'nin Meksika Körfezi'nde kıyıya 40 mil uzaklıkta İngiliz BP petrol platformunda 20 Nisan 2010 tarihinde meydana gelen patlama ve yangının ardından yayılan petrol en önemli çevre kirliliği problemlerindendir (Kerr et al., 2010).

13 Nisan 2005, ülkemizde meydana gelen ve kentin içme suyunun da karşılandığı, balık ve kaplumbağa üretimi de yapılan Atatürk Barajı Göleti'ne binlerce ton petrol sızdı. Sabah saatlerinde meydana gelen olay nedeniyle gölete sızan ham petrol su üzerinde geniş bir alanda 4 santim kalınlığında bir tabaka oluşturdu. Batman-Yumurtalık BOTAS Petrol Boru Hattı'nın Bozova ilçesine bağlı Yığınak Köyü Akyakı Mezrası yakınlarında ki bir borusunun yırtılması ile meydana gelen sızma ve ardından başlayan yangın dünyada yalnızca Fırat Nehri'nde bulunan Refetus Kaplumbağalarının yaşamını da tehdit etmiştir.(Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Batman-Yumurtalık BOTAS Petrol Boru Hattı'nın Bozova ilçesine bağlı Yığınak Köyü Akyakı Mezrası yakınlarında ki bir borusunun yırtılması ile meydana gelen sızma ve ardından başlayan yangın görüntüleri

Çok yakın tarihte, 19 Ocak 2010 en çok Demirciköy sahili Uzunya plajı ve Cennet Koyu plajını etkileyen İstanbul Kilyos Güven Burnu önlerinde karaya oturan ve gövdesi ikiye ayrılan Moldova bayraklı "Orçun C" isimli kuru yük gemisinininden dökülen akaryakıt petrol kazalarına örneklerdendir. Meydana gelen olay nedeniyle gölete sızan ham petrol su üzerinde geniş bir alanda 5 santim kalınlığında bir tabaka oluşturdu. İstanbul Çevre Orman Bakanlığı'nın yaptığı açıklamada uzun süreli kirliliğin devam edeceği yönünde ve bunun etkisi en az 20 yıl süreceği tahmin edilmektedir.



Şekil 2.3. Enkaz bölgesinin konumu

2.4.2. Başlıca poliaromatik hidrokarbonlar

PAH'lar iki ve daha fazla benzen halkası ile oluşmuş düz, küme veya açılal olarak birbirine eklemiş polar olmayan kimyasal yapılardır. İki ve üç halkalı yapılar düşük moleküllü, üçten fazla halkalı ise yüksek moleküllü PAH olarak sınıflandırılmıştır. Doğada 100'den fazla PAH olmasına rağmen, Çevre Koruma Ajansı (U.S. EPA)'ya göre bunların 16 tanesinin mutajenik/genotoksik ve kanserojenik özellikte olduğunu kanıtlamıştır (Pierre et al., 2006). Bu kirleticiler mutajenik, toksik ve kanserojen özelliklere sahiptir (Santos et al., 2008). EPA listesinde yer alan 16 PAH Çizelge 2.6' de verilmiştir (Yu, 2005).

Çizelge 2.6. EPA listesinde Yer Alan 16 PAH Türü (Yu, 2005)

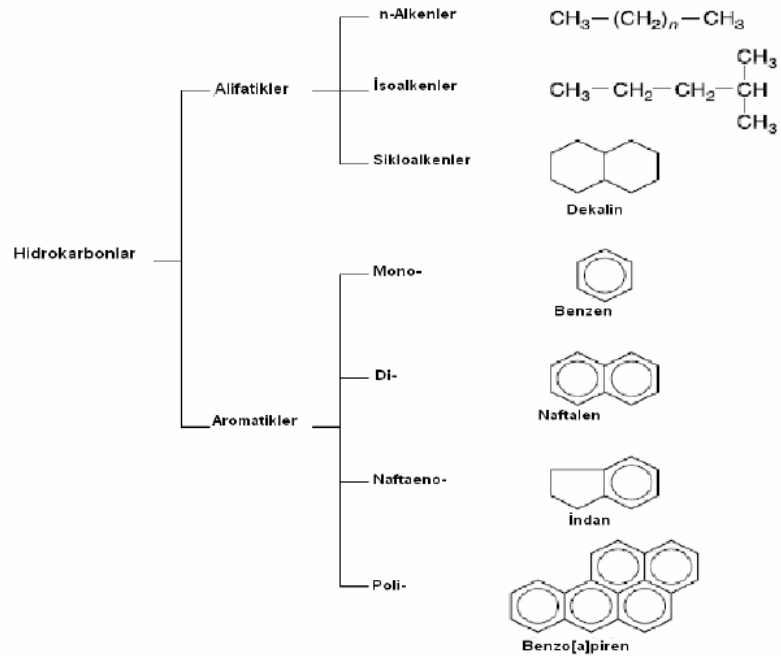
BİLEŞİK İSMİ	KISALTMASI	KANSEROJEN SINIFI
Asenaftilen	Acy	D
Asenaften	Ace	D
Antrasen	Ant	D
Benzo(a)antrasen	BaA	B2
Benzo(a)pyrene	BaP	B2
Benzo(b)floranten	B(b)F	B2
Benzo(k)floranten	B(k)F	B2
Benzo(g,h,i)perilen	B(ghi)Pe	B2
Krisen	Chr	B2
Dibenzo(a,h)antrasen	DbA	D
Floranten	Flt	B2
Floren	Flr	D
Indeno(1,2,3-c,d)piren	IP	B2
Naftalen	Naph	D
Fenantren	Phe	D
Piren	Pyr	D

Poliaromatik hidrokarbonlar halka numaraları, sayısı ve atom kompozisyonlarına göre sınıflandırılırlar. Düşük molekül ağırlıklı PAH'lar 2 veya

3 tane aromatik halka içerirken yüksek molekül ağırlıklı PAH'lar 3 den daha fazla aromatik halka içermektedir. Basit PAH bileşikleri naftalen ve 2-bromo-naftalendir ve 2 halkalıdır (Smith, 1990; Jussila, 2006). Asenaftalen, asenaften, fluoren, fenantren ve antrasen 3 halkalı, fluoranten, piren, krizen ve benzo(a)antrasen 4 halkalı, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)piren ve dibenzo(a,h)antrasen 5 halkalı ve indeno(1,2,3-c,d)piren ve benzo(g,h,i)perilen 6 halkalı PAH'lardandır (Pizzul, 2006).

2.4.3. Poliaromatik hidrokarbonların fiziksel ve kimyasal özellikleri

Yapısında sadece karbon (C) ve hidrojen (H) atomu bulunan PAH'lar 2 veya daha fazla aromatik halkanın bir araya gelmesiyle oluşur (Wade et al., 2007). PAH'ların yapıları halka şeklinde olduğu için düz zincir yapısını içeren alifatiklerden ayrılır. Şekil 2.4'de alifatik ve aromatik hidrokarbonların yapıları gösterilmiştir (Yu, 2005).



Şekil 2.4. Alifatik ve aromatik hidrokarbonların yapıları (Yu, 2005)

PAH'lar saf bileşik halinde genellikle renksiz,beyaz veya soluk sarı-yeşil renklere, güzel bir kokuya sahiptirler. Bu yarı uçucu organik bileşiklerden olan PAH'lar oda sıcaklığında katıdırlar. 2 veya daha fazla bileşik benzen halkasından oluşan (genellikle 3-7 adet) PAH'lar hidrofobik bileşiklerdir. Hidrofobik yapılarından olayı, sularda ölçülen çözünmüş PAH derişimleri oldukça düşüktür (Çıtak, 2006).

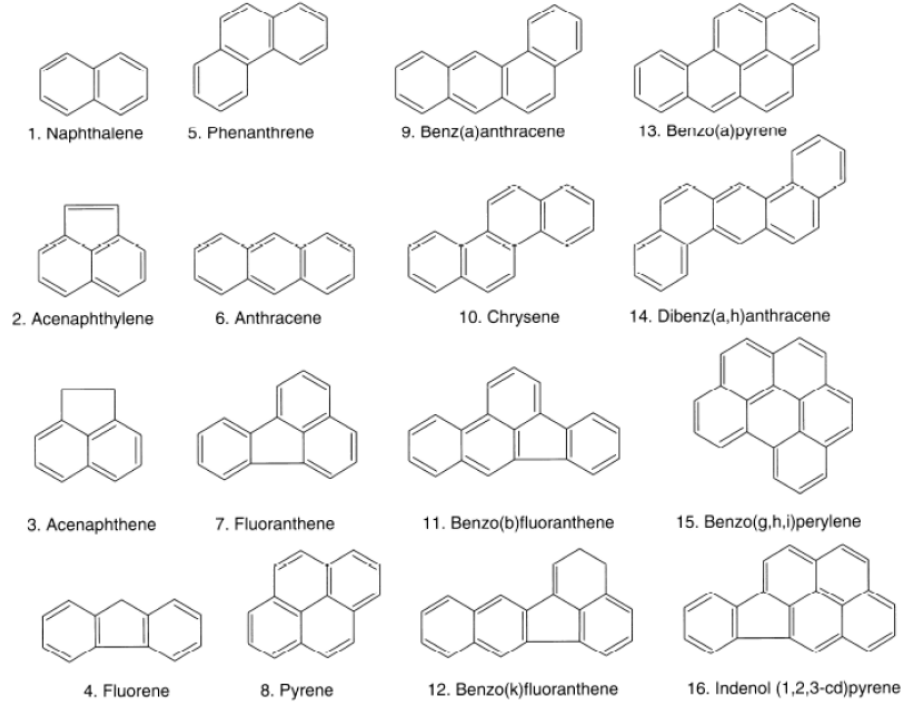
Genel karakteristik özellikleri; yüksek erime ve kaynama sıcaklığına, düşük buhar basıncına ve düşük suda çözünürlüğe sahip olmalarıdır. Bu özelliklerinden suda bulunan PAH'ların büyük çoğunluğu sedimentte birikim eğilimi göstermektedir. Molekül ağırlıkları arttıkça sudaki çözünürlükleri ve biyolojik parçalanma hızları azalır. PAH bileşiklerinin dayanıklılığı halka sayısının artmasıyla doğru orantılıdır (Arı, 2008).

PAH'ların su ortamından gideriminin çok yavaş olması sonucu bu bileşikler gıda zinciri ile balıklara ve insanlara geçerek vücutta birikim özelliği göstermekte ve bu sayede balıkların ve insanların yağ dokularında uzun yıllar kalarak, stres ve açlık neticesinde kana geçip, uzun yıllar sonra bile toksik etkilerini göstermektedirler. Poliaromatik hidrokarbonların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 2.7'de verilmiştir (Prabhukumar et al., 2010).

Çizelge 2.7. EPA öncelikli kirleticiler listesindeki PAH'ların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Prabhukumar et al., 2010)

PAH	Molekül Formülü	Bağıl Moleküller Kütle	25°C'de Suda Çözünürlük (µg/L)	Log Kow (Log Koc)	CAS Number
Naphthalene	C ₁₀ H ₈	128,2	3,17 x 10 ⁴	3,29 (2,97)	91-20-3
Acenaphthylene	C ₁₂ H ₈	152,2	3,4 x 10 ³	4,07 (3,40)	208-96-8
Acenaphthene	C ₁₂ H ₁₀	154,2	3,93 x 10 ³	3,98 (3,66)	83-32-9
Fluorene	C ₁₃ H ₁₀	166,2	1,98 x 10 ³	4,18 (3,86)	86-73-7
Phenanthrene	C ₁₄ H ₁₀	178,2	1,29 x 10 ³	4,45 (4,15)	85-01-8
Anthracene	C ₁₄ H ₁₀	178,2	73	4,45 (4,15)	120-12-7
Fluoranthene	C ₁₆ H ₁₀	202,3	260	4,90 (4,58)	206-44-0
Pyrene	C ₁₆ H ₁₀	202,3	135	4,88 (4,58)	129-00-0
Benz(a)anthracene	C ₁₈ H ₁₂	228,3	14	5,61 (5,30)	56-55-3
Chrysene	C ₁₈ H ₁₂	228,3	2	5,16 (5,30)	218-01-9
Benzo(b)fluoranthene	C ₂₀ H ₁₂	252,3	1,2	6,04 (5,74)	205-99-2
Benzo(k)fluoranthene	C ₂₀ H ₁₂	252,3	0,76	6,06 (5,74)	207-08-9
Benzo(a)pyrene	C ₂₀ H ₁₂	252,3	3,8	6,06 (6,74)	50-32-8
Benzo(ghi)perylene	C ₂₂ H ₁₂	276,3	0,26	6,50 (6,20)	191-24-2
Indeno(1,2,3cd)pyrene	C ₂₂ H ₁₂	276,3	62	6,58 (6,20)	193-39-5
Dibenz(a,h)anthracene	C ₂₂ H ₁₄	278,4	0,5 (27°C)	6,84 (6,52)	53-70-3

Amerika Ulusal Çevre Koruma Ajansı (US EPA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 16 PAH bileşenini (Naphthalene, Acenaphthylene, Acenaphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benzo(a)anthracene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Benzo[g,h,i]perylene, Dibenzo(a,h)anthracene ve Indeno(1,2,3-cd)pyrene) öncelikli kirleticiler olarak listelemiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Amerika Ulusal Çevre Koruma Ajansı (US EPA) ve Dünya Sağlık Örgütü(WHO) tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınan 16 PAH bileşeninin molekül yapıları (Prabhukumar et al., 2010)

2.4.4. Poliaromatik hidrokarbonların sağlık üzerine etkileri

PAH'lar, yaklaşık 100 tanesi yaygın çevre kirleticisi olarak tanımlanan ve karbon içeren bileşiklerin eksik yanmasından oluşan bir bileşik grubudur. Dış ortam havasında yaygın olarak bulunan birçok PAH bileşiğinin kanıtlanmış mutajenik ve/veya kanserojenik etkileri bulunmaktadır (Lodovici et al., 2003).

Atmosferde gaz ve partikül fazlarında bulunabilen PAH'lar gerek deri yoluyla, gerekse solunum yoluyla canlı bünyesine girebilmektedirler. Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) yaptığı sınıflandırmaya göre belirli PAH bileşikler kanserojen ve mutajen olarak belirtilmektedir. PAH'lar başta deri, akciğerler ve mesane olmak üzere vücudun çeşitli organlarına zarar verebilmektedirler. Hayvanlar üzerinde geçmişte yapılan araştırmalarda ise mutajenik ve kanserojenik etkilerinin yanında farklı zehirli özelliklerinin de olduğu görülmüştür (Castellano et al., 2003).

Son zamanlarda PAH'ların DNA yapısını bozarak bazı genetik değişikliklere sebep oldukları, üzerinde çalışılan bir sağlık etkisidir. Sigara içen ve işyerinde veya dışarda yüksek miktarda PAH derişimine maruz kalan insanlar üzerinde yapılan araştırmalarda bu DNA mutasyonlarına rastlanmıştır (Chen et al., 2006).

Bazı PAH bileşikler ve bunların metabolitleri hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmalar üzerinde onarılamaz hasarlara yol açarak balık ve memelilerde tümör ve kanser oluşumuna yol açmaktadır. PAH' lar yağ dokuda çözünebildiklerinden biyoakümülyasyon vasıtasıyla besin zincirine girebilmektedirler. Özellikle benz(a)antrasen, krisen, benz(b)floranten, benz(k)floranten ve benz(a)piren (BaP), insanlar üzerinde olası kanserojenik etkileri olan PAH bileşikler olarak bilinmektedirler (Arı, 2008). Bu sebeple insan sağlığının korunması için PAH alımını belli sınır derişimleri geçmemesi gerekmektedir.

Bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikler ile beraber sağlık üzerine etkileri Çizelge 2.8'de verilmiştir. D sınıfına ait bileşiklerin kanserojenlikleri hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. B2 sınıfındaki PAH bileşikler ise muhtemel kanserojenlerdir (Yu, 2005).

Çizelge 2.8. PAH'ların fiziksel, kimyasal ve sağlık üzerine etkisi (Randhir et al., 2003)

PAH	Halka Sayısı	Molekül Ağırlık	Çözünürlük (µg/l)	Log K _{ow}	Kanser Sınıflandırması	
					U.S. EPA	IARC
Naphthalene	2	128	31000	3.4	D	3
Acenaphthylene	3	152	16500	4.0	D	3
Acenaphthene	3	153	3800	4.2	D	3
Fluorene	3	166	1900	4.3	D	3
Phenanthrene	3	178	1100	4.4	D	3
Anthracene	3	178	45	4.5	D	3
Flouranthene	4	202	130	5.2	D	3
Pyrene	4	202	260	5.3	D	3
Benzo(a) anthracene	4	228	11	5.9	B2	2A
Chrysene	4	228	6	5.6	B2	3
Benzo (b) flouranthene	5	252	1.5	5.7	B2	2B
Benzo (k) flouranthene	5	252	0.8	6.2	B2	2B
Benzo (a) pyrene	5	252	3.8	6.3	B2	2B
Dibenz(a,h) anthracene	5	278	0.6	6.5	B2	--
Benzo[g,h,i]perylene	6	276	0.3	6.7	B2	--
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	6	276	0.2	6.9	B2	--

D, 3: sınıflandırılmamış

2A-B2-2B: kanser riski yüksek

Ayrıca kısa vadede veya uzun vadede genetik mutasyon yani gen bozukluğu ve kanser yapıcı etkileri üzerinde yapılmış birçok çalışma vardır. PAH'ların genetik zehirliliği ve kanserojenliği üzerine yapılmış araştırma sonuçları Çizelge 2.9'da verilmiştir (IPCS, 1998).

Çizelge 2.9. Poliaromatik Hidrokarbonların Genetik Zehirliliği ve Kanserojenitesi(IPCS, 1998).

Bileşen	Genetik zehirlilik	Kanserojenite
Naphthalene	-	(?)
Acenaphthene	(?)	(?)
Acenaphthylene	(?)	Çalışma yok
Fluorene	-	-
Phenanthrene	(?)	(?)
Anthracene	-	-
Fluoranthene	+	(+)
Pyrene	(?)	(?)
Benz[a]anthracene	+	+
Chrysene	+	+
Benzo[b]fluoranthene	+	+
Benzo[k]fluoranthene	+	+
Benzo[a]pyrene	+	+
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	+	+
Dibenzo[a,h]pyrene	(+)	+
Benzo[ghi]perylene	+	-

+: pozitif -: negatif ? şüpheli –Parantezli olanlar, sadece az veri ile elde edilen sonuçlar

Poliaromatik hidrokarbonlar kalıcı, biyolojik olarak biriken, mutajenik olduklarından dolayı toksisite, doğum bozuklukları, davranış değişiklikleri gibi ciddi sağlık problemlerine sebep olabilmektedirler. Bu zararlı etkileri göz önüne alındığında PAH'lara son zamanlarda ilgi artmıştır. Ayrıca poliklorlu bifenil (PCB), PAH ve pestisit gibi kirleticilerin çevrede beraber bulunmalarının tek başına bulunmalarından daha tehlikeli olduğu belirtilmektedir (Lee et al., 2001).

Atmosferde hem gaz hem de partikül formda bulunan PAH'lar her iki fazda da hem deri yoluyla, hem de içten akciğerler yoluyla canlı vücuduna girebilmektedir. Bazı PAH'lar IARC sınıflandırmasına göre önemli mutajenik ve kanserojenik ajanlardır. PAH'ların hareketleri canlının vücudunun tamamını önemli ölçüde etkilemektedir. Kanserogen olduğu kabul edilen benzo[a]piren ve benz(a)antrasen ve fare derilerinde tümör aktivitelerine sebep olan benzo(b)fluoranten'i içeren atmosferdeki partiküllerin yanmayla ilişkileri ortaya çıkmaktadır. Diğer çoğu PAH'larla ilgili daha az bilgi bulunmaktadır (Lee et al., 1995)

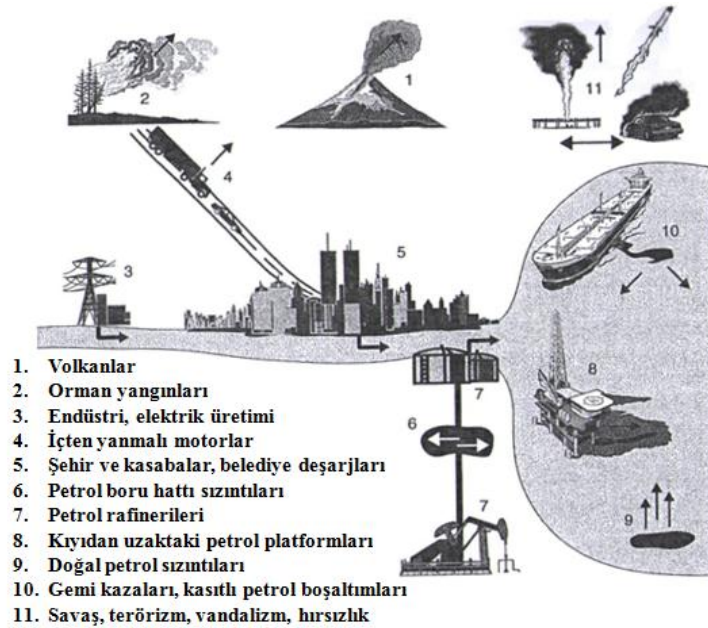
2.4.5. Poliaromatik hidrokarbonların kaynakları

Son 20 yılda bu maddelerin mutajenik ve kanserojenik olmalarının anlaşılmasından sonra çevredeki varlıkları araştırılmaktadır. Çevredeki PAH'lar temel olarak; yanma kökenli (pirojenik), petrol kökenli (petrojenik) ve canlı kökenli (biyojenik) olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Boehm et al., 1998). PAH'ların doğal kaynakları; orman yangınları, volkanlar, bitkiler, mantarlar ve bakterilerdir. Antropojenik kaynakları ise petrol, elektrik enerjisi üretimi, atık yakma ve evsel ısıtma (kok kömürü, is, kömür katranı ve asfalt üretimi) ve içten yanmalı motorlardır (Neff, 1985; Eisler, 2000).

PAH'ların ana kaynakları sabit ve hareketli olmak üzere 2 kategoriye ayrılır. Sabit kaynakları; evsel ısınma, çöplerin yakılması, kok üretimi, alüminyum üretimi, demir-çelik endüstrisi, petrol rafineri işlemleri, asfalt üretimi, güç ve ısı üretimi, orman yangınları ve tarım artıklarının yakılmasıdır. Hareketli kaynakları ise motorlu taşıtların egzoz gazları oluşturmaktadır. Yukarıda sayılan kirletici kaynaklarının her birinden atmosfere verilen PAH bileşiklerinin türleri ve

miktarları birbirinden farklıdır. Başlıca doğal kaynakları volkanik aktiviteler ve orman yangınları olan PAH bileşikleri, doğal kaynaklara kıyasla çok daha yüksek miktarlarda insan aktiviteleri sonucu oluşmaktadırlar. Bilinen önemli PAH kaynakları ise fosil yakıt tüketimi, petrol rafineri işlemleri, kok ve katran üretimi, endüstriyel işlemler ve motorlu araçlardan kaynaklanan emisyonlardır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip (4, 5, 6 ve 7 halkalı) PAH bileşikleri özellikle kok fırınları, elektrik arklı kalorifer ocakları ve ağır yakıtların yakıldığı tesislerden kaynaklanır. Emisyon kaynaklarının özelliklerine bağlı olarak bulunan indikatör PAH' lar ise şöyledir: Endüstriyel atıkların yakılmasından kaynaklanan PAH' lar indeno(1,2,3-c,d) piren ve krisen, çimento tesislerinden kaynaklanan PAH' ların tamamı ise 3 halkalı olan asenaftalin, asenaften, antrasendir (Arı, 2008).

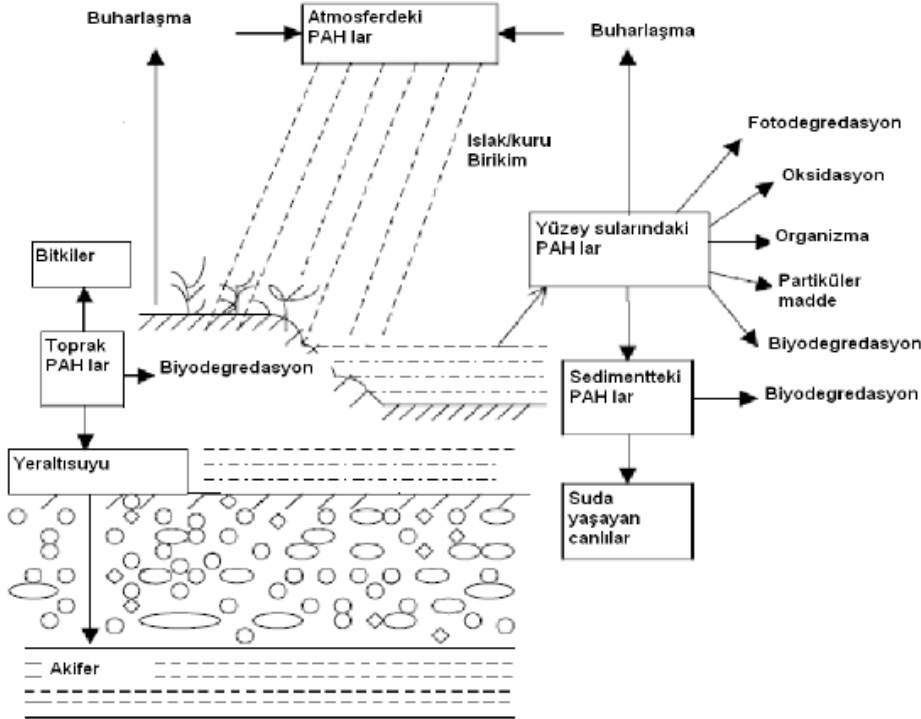
PAH'ların sebep olduğu atmosferik kirliliğin birincil mekanizması, belirtilen bu kaynaklardan gelen organik maddenin tamamlanmamış yanmasıdır. PAH'ların suda yarattığı kirliliğe; petrol boşaltımı, deşarjlar ve sızıntılar, sanayi kuruluşlarına ve şehre ait atıksular, kentsel akış ve atmosferik çökelti neden olmaktadır. PAH'ların yol açtığı karasal kirliliğe ise petrol dökülmesi ve deşarjı, orman yangınları, volkanlar, endüstriyel ve kentsel katı atıklar ve atmosferik çökelti sebep olmaktadır (Şekil 2.6) (Terzi, 2011).



Şekil 2.6. Çevredeki petrol ve PAH kaynakları (Oklar, PAH'lar ve petrolün hava, su ve toprağa doğru ilk hareketini göstermektedir) (Terzi, 2011)

Atmosfere salınan PAH bileşikleri kuru ve ıslak birikimle kara ve su yüzeyine taşınırlar. Su yüzeyine taşınan PAH'ların bir kısmı buharlaşarak tekrar atmosfere geri döner, diğer kısmı fotodegradasyon, oksidasyon ve biyodegradasyona uğrar, bir kısmı canlı bünyesine alınır, bir kısmı suda askıda kalır, geri kalan kısmında sedimentte birikir. Sedimentte biriken PAH'ların bir kısmı biyolojik olarak bozunur, kalan kısmı da suda yaşayan canlıların bünyesine alınır (Rathore et al., 1993; Eisler, 2000) (Şekil 2.7).

Kara yüzeyine ulaşan PAH'ların bir kısmı da su yüzeyindekiler gibi buharlaşır, bir kısmı biyolojik bozunmaya uğrar, geri kalan kısmı yer altı sularına karışır oradan da akifere ulaşır. Su yüzeyinde bulunan PAH'lar için en önemli bozunma prosesleri bakteriler ve mayalarca gerçekleştirilen fotodegradasyon, oksidasyon ve biyodegradasyondur ve suda bulunan PAH'ların sadece %33'ü suda çözünmüş halde bulunmaktadır. Suda çözünmüş halde bulunan PAH'lar en hızlı fotooksidasyonla bozunur; yüksek sıcaklık, oksijen miktarı ve solar radyasyon bu prosesin hızını arttırmaktadır (Rathore et al., 1993; Eisler, 2000)(Şekil 2.7).



Şekil 2.7. PAH'ların biyolojik döngüsü (Rathore et al., 1993; Eisler, 2000)

Poliaromatik hidrokarbonlar ile ilgili yapılan çalışmalar, birçok örnekte bu kirleticilerin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu örneklerden bazıları aşağıda verilmiştir.

- ✓ Toprakta(kuru ağırlıkta 40-1300 mg/kg)
- ✓ Bitkisel sıvı yağlar, margarinler, tereyağında
- ✓ Tütsülenmiş et ve balık gibi gıda maddelerinde
- ✓ Buğday, çavdar, mercimek gibi tahıllarda
- ✓ Tahıllardan üretilen gıdalar (kek ve çocuk mamaları)
- ✓ Sigara dumanı ile odun kömür dumanında
- ✓ Sebzelerde (kuru ağırlıkta 10-20 mg/kg)
- ✓ Deniz ve nehir suyunda
- ✓ Açlıkta satılan balıklarda
- ✓ Kuyu (kaynak) suyu gibi içme sularında

Gıda maddelerinde ve bitkisel yağlarda bulunan poliaromatik hidrokarbonların kaynakları ve bunların nasıl ortaya çıktığı çok önemlidir. Çünkü PAH'ların bu tür gıdalarda maddelerinde olması sağlık açısından zararlıdır (Moret and Conte, 2000). Çeşitli gıda maddelerinde bulunan PAH'ler gıda maddelerinin üretim şekillerine göre gıdalara bulaştıkları belirlenmiştir. Tütsülenmiş ürünlerde benzo[a]anthracene, dibenzo[ah]anthracene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]pyrene gibi oldukça kanserojen olan bileşiklerin varlığı yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Bu yüzden PAH'ların tütsü bileşimi içindeki miktarının azaltılması yönünde çalışmalar önem kazanmıştır (Lawrence et al., 1984).

Sigara dumanında da çok miktarda kanserojenik poliaromatik hidrokarbon bulunmaktadır. Poliaromatik hidrokarbonlardan en kanserojen olanı ve sigara dumanında en çok bulunanı benzo[a]pyrene'dir. Sigara içen insanlarda dudak ve akciğer kanserinin fazla görülmesinin sebebi diğer kanserojenlerle birlikte benzo[a]pyrene'dir. Ayrıca petrol ürünlerinin kullanıldığı plastik ve boya maddesi yapımı içeren sanayiler ile yüksek sıcaklıktaki fırınların kullanıldığı tesislerde de PAH'ların meydana geldiği belirlenmiştir (Harold et al., 1998).

2.5. Petrol Hidrokarbonların Uzaklaştırılmasında Kullanılan Yöntemler

Gün geçtikçe petrole duyulan ihtiyacın artması petrol üretiminde, işlenmesinde ve ham petrolün dağıtılmasında önemli ölçüde artış olmasına sebep olmuştur. Bu artışa bağlı olarak, petrol giderek büyüyen bir çevresel kirlilik problemi haline dönmüştür (Gutnick et al., 1977). Ayrıca petrol türevli ürünler endüstriyel ve günlük hayatta enerji ihtiyacı için temel kaynaklardan biridir. Farklı kullanım alanları olan petrol türevleri plastikler, boyalar ve kozmetik ürünler gibi pek çok kimyasal ürünün ham maddesi olarak da kullanılmaktadır (Harayama et al., 1999).

Kuvvetli kanser yapıcı etkisi nedeniyle veya mikrobiyal metabolizma ile kanserojen hale dönüştürülebilene maddeler taşıdıklarından petrol hidrokarbonları ekosistem ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadırlar (Molobela, 2005).

2.5.1. Fiziksel sistemler

Arıtımda yaygın olarak kullanılan fiziksel yöntemler gravite ayrımı, hava flotasyonu ve buharlaştırmadır. Gravite ayırıcılar hemen hemen tüm rafinerilerde inşa edilmiştir ve yüzen yağların, çökebilene katıların uzaklaştırılması için kullanılmaktadır ve bu yolla %50-99 oranında yüzebilen yağ ve %10-85 askıda katı madde giderimi sağlamaktadır. Buharlaştırma yönteminde kirletici giderme verimi çok yüksektir fakat iklim ve arazi kullanılabilirliği ile kısıtlanmaktadır. Flotasyon kimyasal madde ilavesiyle veya kimyasal madde ilave etmeden doğrudan uygulanabilmektedir ve farklı arıtma verimleri elde edilmektedir (Timur ve Altınbaş, 1997).

2.5.2. Kimyasal sistemler

Kimyasal arıtımda adsorpsiyon, koagülasyon, iyon değişimi, kimyasal oksidasyon, pıhtılaştırma, yumaklaştırma ve çökeltme şeklinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal madde ilavesi ile flotasyon işlemi yapmak; yağ, kül ve askıda katı madde giderme açısından çok verimlidir. Organik maddeler daha çok

biyolojik parçalanabilir özellikte olduğu için oksidasyon kısmi olarak gerçekleşmekte, bazı yöntemlerde sık pH kontrolü gerekmektedir. Kimyasal yöntemler ile kolloidal maddelerin tam giderimi sağlanırken, organik madde giderimi bu yöntemlerle tam olarak gerçekleştirilememektedir (Feriello et al., 1976)

2.5.3. Biyolojik sistemler

Petrol dökülmelerine müdahalede kullanılan diğer bir yöntem de biyolojik sistemlerdir. Petrol hidrokarbonlarının doğal parçalanmasını hızlandırmak için çeşitli biyolojik iyileştirme metotlarını geliştirmek üzere 1990'lerden bu yana artan yoğun bir ilgi söz konusudur (Del'Arco, 2001).

Petrol ve türevleri ile kontamine olmuş sucül ortamların arıtılmasında aktif çamur sistemleri, damlatmalı filtreler, havalandırılmalı lagünler ve oksidasyon havuzları gibi biyolojik arıtma yöntemleri uygulanabilmektedir. Genelde seçilecek bu biyolojik arıtma süreçleri, petrolün ön arıtma ile giderilmesi ve pH kontrolü, koku kontrolü, yağ giderme, toksik maddelerin giderilmesi gibi ön ve son işlemler gerektirmektedir. Özellikle aktif çamur sistemlerinde ön arıtımın gerekliliği ve çamurun uzaklaştırılması sistem maliyetini ve uygulama süresini arttırmaktadır (Kanemitsu et al., 1990). Bu noktada petrol ve türevleri gibi hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin mikrobiyal degradasyon yolu ile giderimi alternatif bir yöntem olarak kullanılabilmektedir.

Petrol ve türevleri ile kontamine olmuş kirlenmiş topraklar ya yerinde (in situ) ya da özel ekipmanlar ile kazılarak taşınır ve başka bir yerde (ex situ) bioremediasyona tabi tutulurlar. Sadece yüzey toprağı ham petrol ve türevleri olan yakıtsal ürünlerle kirlenmiş ise buradaki hidrokarbonlar arazi düzenleme yöntemiyle (land farmig) yerinde ıslaha tabi tutulurlar.

Biyolojik iyileştirmenin amacı, besinlerle mikroorganizmaları harekete geçirmek ve kirleticileri yok etmektir. Mikroorganizmaların çalışmasını desteklemek için en uygun besin düzeyini ve metabolizmaları için gerekli kimyasalları sağlamak gereklidir. Bu yüzden, günümüzün biyolojik iyileştirme

sistemleri doğal mikroorganizmaların yetenekleri ile sınırlandırılmıştır. Biyolojik iyileştirme sınırlı aralıktaki kirleticilerin temizlenmesi için ticari olarak kullanılmasına rağmen, mikroorganizmalar tüm organik kirleticileri ve birçok inorganik kirleticileri biyolojik olarak bozabilme yeteneğine sahiptir.

Biyolojik iyileştirme yönteminin kirleticilerin uzaklaştırılmasında büyük bir güce sahip olduğu iyi bilinmekte ancak halen bu yöntemin prensipleri ve teknikleri üzerinde çalışmalar sürmektedir (Vidali, 2001). Bu yöntemin avantaj ve dezavantajları OTA (Anon, 1991) tarafından özetlenmiştir ve Çizelge 2.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.10. Biyolojik İyileştirme Yönteminin Avantaj ve Dezavantajları (Anon, 1991)

AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Genellikle uygulandığı alanlarda önemsiz fiziksel bozulmalar meydana getirmesi	Petrol dökülmelerinin pek çok tipi için bu yöntemin etkilerinin tanımlanmamış olması
Doğru kullanıldığında önemli bir negatif etkisinin olmaması	Açık denizler için uygun olmaması
Petrolün toksik bileşenlerinden bazılarının uzaklaştırılmasında yardımcı olması	Başarılı sonucun alınmasında zamana ihtiyaç duyulması
Mekanik teknolojilerden daha basit ve mükemmel çözümler sunması	Her kirlenmiş alan için yöntemin ortam şartlarına göre özelleştirilmesi gerekliliği
Diğer teknolojilerden daha ucuz olması	

2.5.3.1. Mikrobiyal degradasyon

Petrol ile kontamine olmuş ortamda biyokimyasal süreçlerle mikroorganizmaların karbon ve enerji kaynağı olarak petrol hidrokarbonlarını kullanabildikleri bilinmektedir. Dolayısıyla petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş alanların temizlenmesinde, seçilmiş mikrobiyal flora kullanılarak gerçekleştirilen biyolojik iyileştirme uygulamaları tercih edilebilmektedir (Vasudevan and Rajaram, 2001).

Petrol ve türevlerinin doğal mikroorganizma populasyonları tarafından biyolojik olarak parçalanmaları, bu tür kirliliklerinin yok edilmesinde primer mekanizmadır (Altınbaş vd., 1995).

Kronik bir petrol kontaminasyonunun gerçekleştiği bölgedeki hidrokarbon kullanıcılarının sayısı, kontaminasyonun olmadığı bölgelere oranla daha fazladır. Bozulmamış ekosistemlerde hidrokarbon parçalayıcıları mikrobiyal komünitenin %0.1’den azını oluştururken, petrol kontaminasyonunun olduğu bölgelerde mevcut mikroorganizmaların %100’ e varan kısmını temsil etmektedirler (Venosa and Zhu, 2003).

Düşük moleküler ağırlığa sahip kısa zincirli n-alkanlar (C_{10} - C_{22}) en hızlı metabolize edilen petrol hidrokarbonlarındanır. Bu grubu sırasıyla izoalkanlar, yüksek moleküler ağırlıklı n-alkanlar, olefinler (alkenler ve alkinler), monosiklik aromatik hidrokarbonlar, PAH’lar ile sikloalkanlar, resinler ve asfaltanlar takip etmektedir (Capone and Bauer, 1992).

Hidrokarbonların gideriminde mikroorganizmaların etkin olduğu tespit edilmiştir (Olivera et al., 1997). Yayınlanmış çalışmalarda hidrokarbonun bir eşitisi olan alifatik hidrokarbonlar bakteri, maya ve filamentli fungusları içerisine alan geniş bir mikroorganizma grubu tarafından asimile edilmektedir (izelge 2.11). Petrol hidrokarbonları içerisinde büyük oranda bulunan bu bileşikler parçalanmaya en yatkın hidrokarbonlardır (Umbreit, 1965; Rose,1971; Atlas, 1981; Gibson, 1984; Capone and Bauer, 1992; Riser-Roberts, 1998; Van Hamme et al., 2003).

Çizelge 2.11.Alifatik Hidrokarbonların Parçalanmasında Rol Alan Mikroorganizmalar (Gibson, 1984; Türkmen; 2005)

Bakteriler	Mayalar	Filamentöz Funguslar
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Absidia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Endomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Mycotorula</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodospiridium</i>	<i>Dematium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Helicostylum</i>
<i>Methylococcus</i>	<i>Sporidiobolus</i>	<i>Helmintosporidium</i>
<i>Methylosinus</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Monilia</i>
<i>Micromonospora</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Mucor</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Nocardia</i>		<i>Rhizopus</i>
<i>Pseudomonas</i>		<i>Syncephalastra</i>
<i>Spirillum</i>		<i>Trichoderma</i>
<i>Vibrio</i>		

Doğal ve insan yapımı aromatik bileşiklerin parçalanması karbon döngüsündeki önemli bir basamaktır (Umbreit, 1961). Ancak benzen ve benzenle ilişkili bileşikler gibi aromatik hidrokarbonlar negatif rezonans enerjisine sahip olmaları nedeniyle yüksek termodinamik stabilite göstermektedirler (Gibson, 1984). Toksik çevresel kirleticilerin en yaygın temsilcileri fenolik bileşiklerdir. Özellikle fenol ve türevleri başta olmak üzere aromatik bileşiklerin metabolizması prokaryotik organizmalarda yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Aleksieva et al., 2002). Poliaromatik hidrokarbonların parçalanmasında rol alan mikroorganizmalar Çizelge 2.12’ de gösterilmiştir.

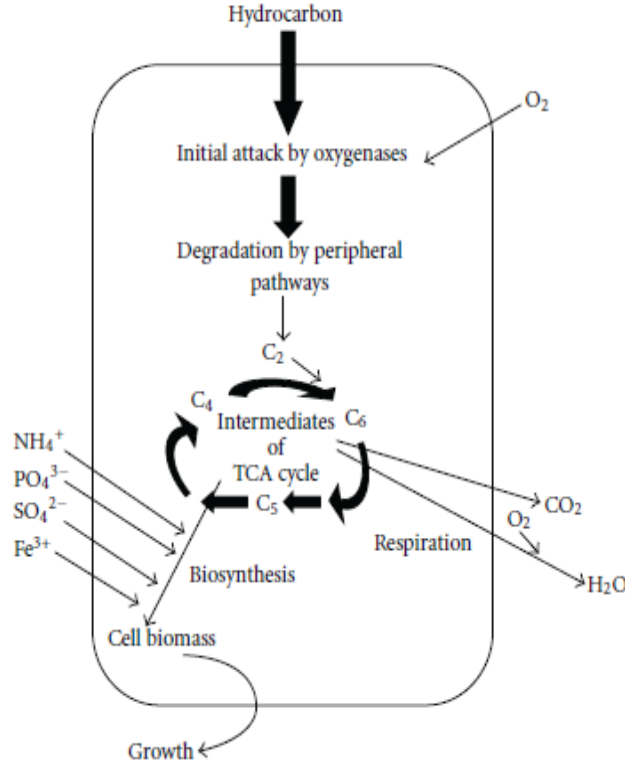
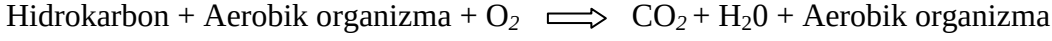
Çizelge 2.12. Poliaromatik Hidrokarbonların Parçalanmasında Rol Alan Mikroorganizmalar (Umbreit, 1961; Rose, 1971; Atlas, 1981; Gibson, 1984; Türkmen,2005)

Bakteriler	Mayalar	Filamentöz Funguslar
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Cylindrocarpum</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Rhodospiridium</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Phanerochaete</i>
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Trichosporon</i>	
	<i>Yarrowia</i>	

Mikroorganizmalar hidrokarbonlar gibi organik kirleticileri enerji ve karbon kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Bu hidrokarbonların anaerobik koşullarda parçalanmalarına karşın, parçalanmanın önemli bir bölümü aerobik şartlar altında gerçekleşmektedir.

Aerobik şartlar altında biyolojik parçalanmanın gerçekleşmesi için oksigeneaz adı verilen enzimlerle oksijenin aktive edilmesi gerekmektedir. Substrata ilave ettikleri oksijen atomunun sayısına bağlı olarak enzimlerin bu grubu, monooksigenazlar ve dioksigenazlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Monooksigenazlar, O₂ molekülündeki bir atomu organik substrata katarken diğerini de suya indirgerler. Demir içeren dioksigenazlar ise, O₂ molekülünün her iki atomunu da yapıya ilave ederler (Verachtert and De Mot, 1990).

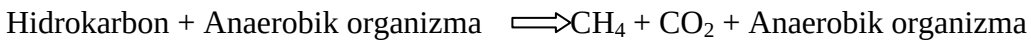
Oksijen yardımı ile gerçekleşen organik bileşiklerin parçalama yöntemi sırasında Periferel degradasyon yol izleri organik kirleticileri basamak basamak ara bileşenlere ve merkezdeki ara bileşenler metabolizmasına dönüştürmektedir. Hücre biyokütlesi asetilcoA, süksinat, piruvat gibi merkezi prekürsör metabolitlerden elde edilir. Parçalanma sonucunda CO₂ konsantrasyonu artarken, hidrokarbon ve O₂ konsantrasyonu azalmaktadır (Şekil 2.8) (Das and Chandran, 2011).

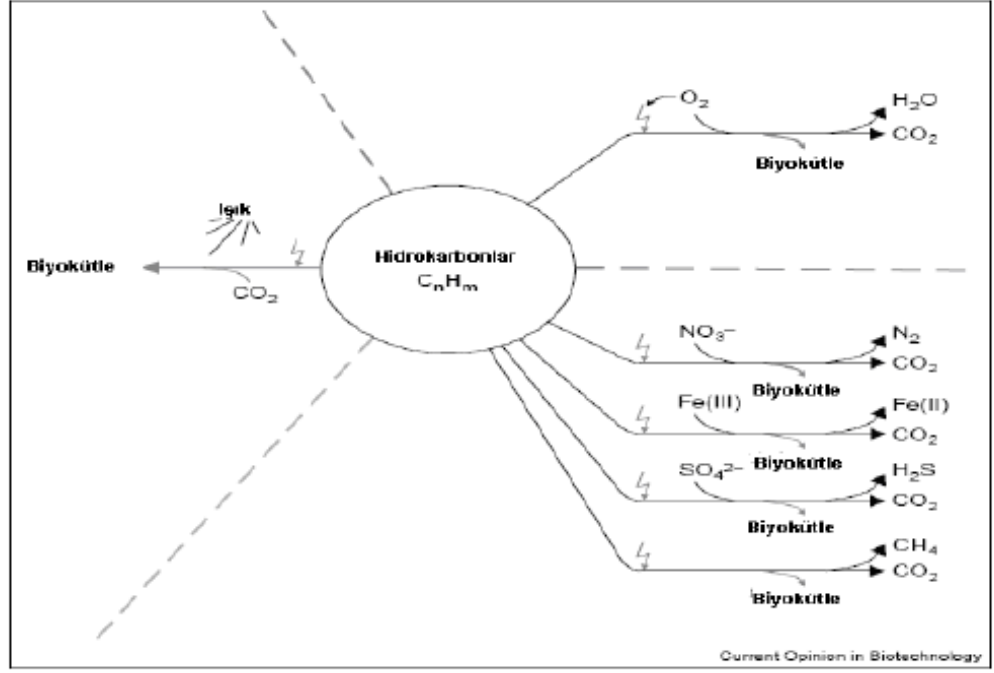


Şekil 2.8. Hidrokarbonların aerobik şartlar altında parçalanması (Das and Chandran, 2011)

Serbest oksijenin bulunduğu durumlarda meydana gelen biyooksidasyon reaksiyonlarında genellikle hidrojen peroksit oluşmaktadır. Aerobik mikroorganizmalar bunu kendilerinde bulunan özel katalaz enzimleri ile ayrıştırırlar ancak, anaeroblar oksijen ile ilişkili herhangi mekanizmaya (sitokrom oksidaz, katalaz, peroksidaz, vs.) sahip değildirler ve dolayısıyla bu enzim olmadığından, H₂O₂ ayrıştırılamamaktadır. Su ve toprak ekosistemlerindeki anaerob mikroorganizmalarda oksijen toksik etki yaratmaktadır (Arda, 2000).

Widdel and Rabus'un çalışmasında (2001) özetlediği üzere, hidrokarbonların anaerobik biyolojik parçalanması ise çoğunlukla denitrifikasyonun gerçekleştiği ortamlarda ya da sülfatın indirgendiği şartlar altında meydana gelmektedir. Parçalanma sonunda NO₃⁻, SO₄²⁻ ve Fe³⁺ gibi elektron alıcıların konsantrasyonu azalırken, N₂, H₂S ve Fe²⁺ gibi indirgenen bileşiklerin konsantrasyonları artmaktadır (Şekil 2.9).





Şekil 2.9. Hidrokarbonların anaerobik şartlar altında parçalanması (Widdel and Rabus, 2001)

2.5.4. Petrol hidrokarbonlarının biyoloji parçalanmasını etkileyen faktörler

2.5.4.1 Biyotik faktörler

Çevreye bulaşmış PAH'lar primer olarak bakteri ve funguslar tarafından parçalanırlar. Mikroorganizmalar, hidrokarbonları yalnız başlarına, sadece sınırlı oranda metabolize ederler. Bu nedenle toprak, su ve deniz ortamlarında kompleks hidrokarbonları parçalayabilmek için geniş enzimatik kapasitelerinden dolayı karışık kültürlerle ihtiyaç duyulur.

Su ve kara ekosistemlerindeki PAH parçalanmasında fungus ve bakterilerin etkinlikleri yoğunca gözlenmiştir. Bakteri ve funguslar, toprakta da fazla miktarda bulunurlar ve her iki grubun yoğunlukları PAH'la biyolojik olarak parçalanmalarını ayarlamaktadırlar. Hidrokarbon kullanan bakteri ve funguslar PAH bulaşmış topraklardan kolayca izole edilebilirler. Petrol ve petrolü maddelerin toprağa inokülasyonları, ortamdaki bakteri ve fungusların sayılarının artmasına sebep olur. Topraktaki hidrokarbonların bakteri ve funguslar tarafından parçalanma oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kum dolu bir yerde n-

heksadekanın kullanımının %82'sinin bakteriler ve sadece %13'ünün funguslar tarafından yapıldığı gözlenmiştir (Demir ve Demirbağ, 1999).

Alg ve protozoalar da sucul ve karasal ekosistemlerin her ikisinde de bulunabilen mikrobiyal kormünitenin önemli üyelerindendirler. Ancak, hidrokarbon parçalamadaki gereklilikleri kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, ham petrol karışmış bir hidrokarbon substratını kullanabilen bir alg olan *Prototheca zopfii* izole edilmiştir. Yine benzer bir çalışmada, naftaleni okside eden 9 siyanobakter, 5 yeşil alg, 1 kırmızı alg, 1 kahverengi alg ve 22 diatome tespit edilmiştir (Cerniglia, 1980). Protozoaların hidrokarbon kullanmadığı bilinmektedir. Hidrokarbon kullanan maya ve bakterilerin bulunduğu bir ortama protozoa kültürü ekildiğinde, bunun ham petrolü direkt olarak kullanamadığı belirlenmiştir.

2.5.4.2 Abiyotik faktörler

Mikrobiyal degradasyon farklı mikrobiyal komünite gibi biyotik faktörlerin yanında hidrokarbon konsantrasyonu ve kompozisyonu, sıcaklık, PH, tuzluluk gibi çeşitli biyolojik faktörlerden de etkilenmektedir.

2.5.4.2.1. Sıcaklık

Biyolojik parçalanmayı etkileyen en önemli parametrelerden birisidir. Söz konusu bileşik su ya da toprak yüzeyinde bulunuyorsa, kış mevsiminin düşük sıcaklığı organik substratın parçalanmasını en aza indirecek ya da engelleyecektir. Mevsim değişikliğinin beraberinde getirdiği sıcaklık artışıyla birlikte daha uygun koşullar sağlandığı için mikrobiyal aktivitede artış meydana gelmektedir. Sıcaklıktaki belli bir artma veya azalmaya karşı verilen yanıtın büyüklüğü, o bölgede bulunan popülasyonun fizyolojisini yansıtacak şekilde bileşiğe ve çevreye bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Alexander, 1999).

Sıcaklık mikrobiyal metabolizmayı, petrolün kimyasal kompozisyonun ve fiziksel yapısını direkt etkilediği için hidrokarbon degradasyonunu da etkilemektedir. Düşük sıcaklıklarda ham petrolün viskozitesi artarken düşük

moleküler ağırlıklı toksik hidrokarbonların uçuculuğu azalır ki bu da biyolojik parçalanmanın başlamasını geciktirir. Kısa zincirli alkanlar gibi bazı hidrokarbonlar düşük sıcaklıklarda, düşük moleküler ağırlıklı aromatik hidrokarbonlar da yüksek sıcaklıklarda daha fazla çözünebilirler.

Hidrokarbon biyolojik parçalanması geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleşmesine karşın, genellikle biyolojik parçalanma oranı düşen sıcaklıkla beraber azalmaktadır. Karasal çevrelerde 30-40 °C, tatlı sularda 20-30 °C, tuzlu sularda ise 15-20 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum düzeyde gerçekleşmektedir (Vidali, 2001; Venosa and Zhu, 2003). Leahy and Colwell (1990) ise hidrokarbon degradasyonu -1.1° C'ye kadar ki sıcaklıklarda topraklarda gerçekleşebildiğini rapor etmiştir. Fakat biodegradasyon oranlarının 15° C'nin altında yavaşladığı tahmin edilmektedir (Dibble and Batrha, 1979).

2.5.4.2.2. Oksijen

Hidrokarbonların ileri çevresel yıkımı için genellikle aerobik koşullar gereklidir (Venosa and Zhu, 2003). Çünkü alifatik ve aromatik hidrokarbonların bakteri ve funguslar tarafından degradasyonunun ilk adımı moleküler oksijenin ihtiyaç duyduğu oksijenazlar aracılığı ile oksidasyonudur (Leahy and Colwell 1990). Birçok çalışma, oksijen azalmasının karasal ve denizel çevrelerdeki biyolojik parçalanma seviyesini belirgin ölçüde azalttığını göstermiştir (Vidali, 2001; Venosa and Zhu, 2003). Oksijen sınırlaması, tatlı ve tuzlu sulardaki su kolonunun üst seviyelerinde mevcut değildir. Ancak akuatik sedimentlerde, sediment yüzeyindeki ince tabaka haricinde kalan bölgeler genellikle anoksiktir. Topraktaki oksijen mevcudiyeti ise; mikrobiyal oksijen tüketiminin seviyesine, toprağın tipine, toprağın suya olan doygunluğuna ve oksijen azalmasına neden olan kullanılabilir substratın varlığına bağlıdır (Leahy and Colwell, 1990). Topraktaki oksijen konsantrasyonunun %2-5 (v/v) değerlerinin altına düştüğü zaman hidrokarbon biodegradasyonunun gözle görünür şekilde yavaşladığı gözlenmiştir (Huesemann and Truex, 1996; Hurst et al., 1997; Leeson and Hinchee, 1997; Hupe et al., 1999).

Oksijen konsantrasyonu, özellikle topraktaki ham petrolün biyolojik parçalanmasında hız sınırlayıcı değişken olarak tanımlanabilir. Mikroorganizmalar tarafından göz ardı edilebilen seviyelerde gerçekleşen petrol hidrokarbonlarının anaerobik şartlarda biyolojik olarak parçalanması bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Leahy and Colwell, 1990). Parçalanmanın bu türünün ekolojik önemi düşük olsada son yıllarda yapılan çalışmalar, anaerobik hidrokarbon metabolizmasının bazı durumlarda önemli rol oynayabileceğini göstermiştir (Leahy and Colwell, 1990; Venosa and Zhu, 2003; Salminen et al., 2004).

2.5.4.2.3. PH

Petrol hidrokarbonlarının parçalanmasını etkileyen bir diğer parametre de pH'dır. Deniz pH'ı genellikle sabit ve hafif alkali özelliktedir. Bunun tam aksine, tatlı sular ve karasal çevrelerin pH'ı değişkenlik göstermektedir. Organik topraklar çoğunlukla asidik iken mineral topraklar nötral ve alkali pH'ya sahiptir (Leahy and Colwell, 1990). Heterotrofik bakteri ve fungusların çoğu nötral pH'yı sevmesine karşın, asidik koşullara toleranslı olan grup funguslardır (Venosa and Zhu, 2003). Araştırmalar, pH artışıyla beraber parçalanma hızının arttığını ve optimum parçalanmanın hafif alkali koşullar altında gerçekleştiğini göstermiştir (Leahy and Colwell, 1990).

2.5-11.0 aralığındaki pH değerlerinde hidrokarbon yapıdaki bileşiklerin mikrobiyal degradasyonu gerçekleşebilmektedir. Ekstrem pH koşulları mikrobiyal degradasyonu olumsuz yönde etkilemektedir (Leahy and Colwell, 1990). Dibble ve Bartha, topraktaki hidrokarbon kirliliğinin degradasyonunu 5.0-7.8 aralığında test etmiş ve optimum degradasyonun pH 7.8' de gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

2.5.4.2.4. Hidrokarbonun konsantrasyonu

Hidrokarbonun konsantrasyonu, biyolojik bozunabilirliğini ve onu bozan organizmalara karşı olan toksisitesini etkileyebilir. Yüksek konsantrasyonlardaki bir hidrokarbon organizmalara karşı engelleyici olabilir. Sudaki 1-1000 µg/ml ya

da topraktaki 1-100 µg/mg aralığındaki hidrokarbon konsantrasyonu bakteri ve mantarlara karşı toksik değildir. Bazı durumlarda, yüksek konsantrasyonlardaki bir kirletici (>100 mg/l), organik kirleticiyi parçalayan mikropların çoğalmasını sağlayabilir. Bununla birlikte, 10 µg/l' den daha az konsantrasyonlardaki maddeler genellikle etkilenmezler. Eğer hiçbir bozunma faaliyeti olmayan bir kirlenmiş alandan su örneği alındığında ve daha sonra oksijen ve besin eklendiğinde, kısa bir süre sonra konsantrasyon değeri 1 µg/l ve daha az olan hidrokarbonların bozunması başlar. Bu, başlangıçta hidrokarbon konsantrasyonunun 10 mg/l' nin altında olmasını gerektirmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda adaptasyon süresi beklenebilir. Eğer konsantrasyonlar 1-10 mg/l' den daha fazla ise, bileşiğin metabolizması suda bulunan oksijeni azaltabilir.

2.5.4.2.5. Nutrientler

Teoride; 1 g hidrokarbonun hücre materyaline dönüştürülmesi için yaklaşık olarak 150 mg azot ile 30 mg fosfor kullanılmaktadır (Venosa and Zhu, 2003). Bir ekosistemde önemli bir saçılma meydana geldiğinde, karbon kaynakları belirgin ölçüde yükselir ve azot ile fosfor, parçalanmada sınırlayıcı faktör haline gelir. Denizel çevrelerdeki besin sınırlaması ise genellikle denizlerdeki düşük N ve P seviyesi ile korelasyon gösterir. Biyolojik parçalanma hızını etkileyen bu nutrientlerin miktarı, mevsime bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Ward and Brock (1976) , petrol kontaminasyonunun olduğu bir gölde besin içeriğinin yüksek olduğu durumlarda degradasyonun en yüksek seviyesinin erken ilkbaharda gerçekleştiğini bulmuşlardır. Yaz aylarına doğru artan algal produktivite sebebiyle N ve P seviyesi azaldığı için, degradasyon oranı da düşmektedir (Vidali, 2001; Venosa and Zhu, 2003).

Topraktaki azot (N) ve fosfor (P) miktarları yetersiz ise hidrokarbon biodegradasyon oranı önemli ölçüde kısıtlanır. Optimal C:N oranı ve C:P oranlarının geniş bir sıralaması verilecek olursa Frankerberger (1992), bir C:N:P oranını 100:10:1 olarak tavsiye ederken, Dibble and Bartha (1979), optimal petrol biodegradasyonunun sırasıyla C:N ve C:P oranlarını 60:1 ve 800:1 olarak bulmuşlardır. Buna karşın Brown et al. (1983) rafineri atıklarının

biodegradasyonu için C:N oranını optimal 9:1 olarak rapor etmişlerdir. Huddleston et al. (1984) ise C:N oranının 25 ve 38 arasında muhafaza edilmiş olması gerektiğini belirtmişlerdir.

2.5.4.2.6. Tuzluluk

Hidrokarbonların mikrobiyal parçalanması üzerine tuzluluğun etkileriyle ilgili olarak yayınlanmış çok az çalışma bulunmaktadır (Leahy and Colwell,1990). Tuzluluk miktarındaki değişiklik, mikrobiyal populasyonların değişimine sebep olduğu için parçalanmayı etkilemektedir. Denizel organizmaların, tatlı su formları ile karıştığı çevrelerde (östarin) tuzluluk ileri düzeyde bir varyasyon gösterebilir. Bunun aksine birçok marin türün optimum tuzluluk aralığı %2.5-3.5 arasında bulunmaktadır ve %1.5-2' den düşük tuz konsantrasyonlarda büyüme zayıf yada hiç gözlenmemektedir (Venosa and Zhu, 2003). Shiaris, sedimentlerdeki fenantren ve naftalen mineralizasyon oranı ile tuzluluk arasında genellikle pozitif korelasyon olduğunu rapor etmiştir. Hipersalin göletlere ilişkin bir çalışmada Ward and Brock (1976), hidrokarbon metabolizmasının seviyesinin, % 28.4-3.3 aralığında artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığını bulmuşlar ve sonuçları mikrobiyal metabolizma hızında genel bir redüksiyona sebep olduğu şeklinde yorumlamışlardır (Leahy and Colwell, 1990) .

2.5.4.2.7. Su aktivitesi

Toprağın su aktivitesi (a_w) ya da su potansiyeli 0-0.99 arasında değişkenlik göstermesine karşın akuatik çevrelerde bu değer 0.98 civarında bir değerde sabittir. Dolayısıyla karasal ekosistemlerdeki hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanması, mikrobiyal büyüme ve metabolizma için gereken su miktarını sınırlamaktadır (Vidali, 2001; Leahy and Colwell, 1990).

2.6. Hidrokarbon Parçalayan Mayalarla Yapılan Çalışmalar

Petrol hidrokarbonlarının mikroorganizmalar tarafından parçalanması Zobell (1946) çalışması ile başlamıştır. Ham petrol yapısındaki aromatik hidrokarbonların parçalanmasına yönelik mayalar üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda önem kazanarak güncel bir çalışma konusu haline gelmiştir.

Macgillivray and Shiaris (1993) tarafından yapılan çalışmada Massachesetts'deki 13 kıyı şeridi sedimentlerindeki maya varlığı belirlenmiş ve poliaromatik hidrokarbonları biyotransformu için potansiyel maya izolatları tespit edilmiştir. Sedimentteki maya sayısı 102 ila 107 cfu/g arasında değişkenlik göstermektedir. En fazla izole edilen ve tanımlanan genuslar *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* ve *Trichosporon*'dur. Yoğun bir şekilde kontamine olan bölgelerden izole edilen izolatların %50'sinden daha fazlası fenantreni transforme etmiştir ki bu bulgu spray-plate tarama ile belirlenmiştir. Fenantreni transforme eden maya sayısı sedimentin fenantren konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bireysel izolatlar tarafından fenantren ve benzantracenin dönüşümü 120 saatlik inkübasyon sonunda gramda 8.15'ten 0.15'e değişen büyük ölçüde değişmiştir. İzole edilen mayalardan *Trichosporon penicuiatum* fenantren transformasyonu için en büyük kapasiteye sahiptir. PAH'ların transforme edilebilirliğinin kıyı şeridi sedimentlerindeki mayalar arasında yaygın olduğu görülmektedir.

Ijah (1998) tarafından yapılan çalışmada ham petrol kontaminasyonunun olduğu topraktan izole ettiği iki bakteri izolatı (*Serratia marcescens* ve *Acinetobacter calcoeticus*) ile petrol kontaminasyonunun olmadığı topraktan izole ettiği bir maya izolatının (*Candida tropicalis*) ham petrolü parçalama kapasitelerini gravimetrik analizler ve kapillar gaz kromatografi teknikleri ile ölçmüştür. Çalışmaları sonucunda, *Candida tropicalis*'in (%68.9) ham petrolü, *S.marcescens* (%51.5) ve *A.calcoeticus* (%45.5)' dan daha etkili bir şekilde parçaladığını ortaya koymuştur. Toksik etki sebebiyle kısa zincirli alkanları parçalayamayan bakteriyal izolatların, kapillar gaz kromatografi tekniği ile C₂₀-C₂₈ (*S.marcescens*) ve C₂₂-C₃₀ (*A.calcoeticus*) arası uzunluktaki hidrokarbonları parçaladığını bulmuştur. *C. tropicalis*' in bu konuda daha geniş bir spektruma

(C₁₂-C₃₂) sahip olduğunu belirleyen Ijah, farklılığı etkili degradatif enzim sistemine sahip olmasına ve bu sistemin ham petrolün inhibitör bileşenlerinden etkilenmemesine bağlamıştır.

Cazau et al. (1998) tarafından yapılan çalışmada kontaminasyonun gerçekleştiği bir akarsudan izole ettikleri mikroorganizmalar tarafından fenantren'in parçalanması üzerine bir çalışma yapmışlardır. Kontamine çevrelerde mayaların, yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar olduğuna ve PAH'ları alternatif karbon kaynağı olarak okside ettiklerine dikkati çeken araştırmacılar; izole edilen mayaların %63 'ünü *Rhodotorula glutinis*'in, bakteriyal kültürlerin de %55'ini *Pseudomonas aeruginosa*'nın oluşturduğunu bulmuşlardır. Her iki organizmanın fenantren üzerindeki büyümesi; mikrobiyal yoğunluk, spesifik büyüme oranı, ikilenme süresi ve biyomasa göre yapılarak *R.glutinis*'in, *P.aeruginosa* kadar aktif olduğu sonucuna varılmıştır.

Salicis et al. (1999) tarafından yapılan çalışmada çoğunlukla topraktan izole edilmiş ve çeşitli taksonomik gruplara ait olan, poliklorlanmış aromatik hidrokarbonları iyi bir şekilde degrade ettiği bilenen 39 Mikromycetes suşunun seleksiyonu floranten degradasyonu için araştırılmıştır. İlk olarak katı ortam Malt Ekstrat Agar (MEA)'da kontrol edilen toksisite analizleri, funguslar için herhangi bir floranten toksisitesi (1-100 mg/L) göstermemiştir. Halbuki katı sentetik ortamdaki tüketim analizleri 100 mg/L'de toksisite göstermiştir. Floranten degradasyonu (10 mg/L) daha sonra 4 gün boyunca sıvı sentetik ortamda araştırılmış ve HPLC ile değerlendirilmiştir. Test edilen 39 suş arasında 18 tanesi florantenin %60 veya daha fazlasını degrade etmiş ve *Zygomycetes*'lerin en etkin grup olduğu görülmüştür (ortalama degradasyon : 90%). Bu 18 suşun 10 tanesi herhangi bir literatürde henüz bildirilmemiştir: *Sporormiella australis*, *Cryptococcus albidus*, *Cicinobolus cesatii*, *Pestalotia pahnarum*, *Beauveria alba*, *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella blakesleeana*, *C. echinulata*, *Mortierella ramanniana* and *Rhizopus arrhizus*. Funguslarda floranten adsorpsiyonu floranteni degrade eden suşlar için oldukça düşüktür (ortalama adsorpsiyon: %4). Halbuki, *Colletotrichum dematium* (%47) ve *Penicillium italicum* (%43) gibi bazı suşlar daha fazla adsorplamıştır.

Ekundayo and Obuekwe (2000) tarafından yapılan çalışmada dört haftalık bir periyod içerisinde 6 farklı örnekleme istasyonundan aldıkları petrol ile kontamine olmuş toprak örneklerinden 35 adet hidrokarbon parçalayıcı maya izole etmişlerdir. Barnett ve ark. ile Beech ve ark.'na göre gerçekleştirdiği tanılama sonrasında izolatların *Candida* ve *Endomycopsis* genusuna ait olduğunu bulmuşlardır. İzolatların hepsinin uzun zincirli alkanları kullandığını söyleyen araştırmacılar, aynı izolatların kısa zincirli alkanlar, aromatik ve alisiklik hidrokarbonlar üzerinde büyüme kapasitesinde olmadığını da belirtmişlerdir (Ekundayo ve Obuekwe, 2000).

Romero et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada fungal grupların lignin benzeri yapıların depolimerizasyonu ve mineralizasyonunda içerilen enzimlerinin düşük substrat spesifikliğine sahip olması özelliğinden yola çıkarak, mayalar (*R. glutinis* ve *R. minuta*) ile filamentöz funguslar (*Cylindrocarpon didymum*, *Penicillium variable*, *Fusarium solani*)'ın MM (Mineral Medium)'da piren' i parçalama kapasitelerini kıyaslamışlardır. Tek karbon kaynağı olarak piren içeren MM' a yapılan inokülasyon ve 20 günlük inkübasyonu takiben tüketilen piren miktarının, *F. solani*' de %32, *R. glutinis*'te %37 olduğunu bulunmuştur. Inkübasyon periyodunun ilk zamanlarında *R. glutinis*'in piren tüketim hızının, *F. solani*'den 2 kat fazla olduğu ve maya kültürlerinin kosubstrat (glukoz) varlığında parçalanma seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.

Pan et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada ham petrol ile kontamine olan topraktan izole edilen *Pichia anomala*'nın naftalen, dibenzotiofen, fenantren ve krizen' i tek tek yada kombine halde asimile etme yeteneği çalışılmıştır. Araştırmacılar, denemeler sonucunda naftalenin 24 saat içinde parçalanmasına karşın fenantren degradasyonunun 24 saatlik bir uyum fazından sonra başladığını görmüşlerdir. Test edilen 4 PAH'ın karışımı aynı denemelere tabi tutulduğunda, maya strainin ilk 24 saat içinde naftaleni tamamen parçaladığı ve sonraki 48 saat içinde sırayla fenantren ve dibenzotiofen'i kullandığı halde, krizen'in 96 saat sonunda bile parçalanmaya uğramadan kaldığı gözlenmiştir.

Hesham et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada, beş farklı PAH degrade edeci maya suşunu içeren karışık kültür ile havaya maruz bırakılmış ham

petroldeki polisiklik aromatik hidrokarbonların biyodegradasyonunu araştırmak için çamur yataklı reaktörler kullanılmıştır. Mayalar karbon kaynağı olarak fenantren kullanılarak zenginleştirilmiş kültür ile petrol içeren topraktan izole edilmiş ve 26S ribozomal DNA sekansı temel alınarak tanımlanmıştır. Maya suşları *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* ve *Sporidiobolus* genuslarına aittir. Deneme oda sıcaklığında katı:sıvı oranı %50 w/w olacak şekilde 6 haftalık periyotlarla gerçekleştirilmiştir. Bulgular, hem düşük molekül ağırlıklı hem de yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin dahil olduğu tüm PAH'lar için yüksek giderme veriminin elde edildiğini göstermiştir (6 hafta içinde sırasıyla %89.3-98.6 ve %66.3-89.4).

Hesham et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada petrolle kontamine olmuş toprak örneklerinden MBS (Mineral Basal salts) içeren ortamda tek karbon kaynağı olarak fenantreni kullanan 3 tane maya izole edilmiştir. Bu izolatlardan karbon ve enerji kaynağı olarak PAH ile kaplanmış agar üzerinde hızlı büyüme gösteren AH 70 izolatu PAH degradasyonunda aktif izolat seçilmiştir. Maya, büyük alt birim ribozomal DNA'nın değişken D1 /D2 domaininin sekans analizine göre tanımlanmıştır. Bunu takiben 26 S rDNA sekans analizi sonucunda %100 baz homolojisi ile *Candida viswanathii* olduğu tespit edilmiştir. 26 SrDNA sekans analizi *Candida viswanathii*'nin PAH degradasyonu GC MS analizi ile doğrulanmış ve düşük ve yüksek molekül ağırlıklı Pahların karışımını parçalamaya yeteneğinde olduğu, 10 günün sonunda naftaleni %89,76, fenantreni %77,21, Pireni %60,77 ve benzo(a)pireni %55,53 oranında parçaladığı bulunmuştur.

Sood and Lal (2009) tarafından yapılan çalışmada yeni bir maya türü *Candida digboiensis* TERI ASN6, Dignoi rafinerisindeki (Kuzey Hindistan) asidik petrolü çamur ile kontamine olmuş toprak örneklerinden izole edilmiştir. TERI ASN6 suşu haftada pH 3'te ortamda bulunan petrol hidrokarbonlarının %73'ünü degrade edebilmektedir. Bu suş dimorfik davranışa sahiptir ve düşük pH, petrol hidrokarbonlarını içeren ortam gibi stres koşulları altında büyütüldüğünde misel morfolojisi göstermiştir. *C. digboiensis* suşu asidik petrol çamurundaki alifatik ve aromatik fraksiyonları etkin bir şekilde degrade edebilmektedir ki bu bulgu gaz kromatografisi ile doğrulanmıştır. TERI ASN6

suşunun dibenzotiyofende büyümesi sırasında, DBT- sülfon ve bifenil-2-ol bileşikler tespit edilmiştir. Hidrokarbon oksidasyonunda yer alan aktif sitokrom P450 sistemi de korunmuş bölgeleri temel alarak tasarlanan primerler kullanılarak bu mayada tespit edilmiştir. Bu maya hidrokarbon ile kontamine olmuş asidik toprakların biyoremediyasyon uygulamaları için potansiyel bir adaydır. Fizyolojik davranışı sayesinde diğer hidrokarbon degrade eden bakterilerin hayatta kalamayacağı koşullarda etkin bir şekilde çalışabilmektedir.

Song et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada *Rhodococcus* sp. P14, ham petrol ile kontamine sedimentlerden izole edilmiştir. Bu suş karbon ve enerji kaynağı olarak fenantren, piren ve benzopirenin dahil olduğu üç ve beş halkalı polisiklik aromatik hidrokarbonları kullanabilmektedir. Her bir PAH için 50 mg/L konsantrasyonda PAH içeren ortamda kulture edildiğinde P14 suşu, 30 günde %43 Phe, %34 Pyr ve %30 BaP degrade etmiştir. Suş P14 tarafından Phe'den türevlenmiş dört farklı hidroksifenantren ürünü SPME-GC-MS kullanılarak tespit edilmiştir. P14 suşu ayrıca 17 ile 21 karbon zincir uzunluğuna sahip n-alkanları içeren mineral yağları da degrade edebilmektedir. Glukoz içeren ortamda büyüyen hücrelerle karşılaştırıldığında, PAH içeren ortamda büyüyen hücreler kısa-zincirli yağ asidi (6C 16:0) içeriğini azaltmış, C18:0 içeriğini artırmış, Me-C19:0 ve tek karbonlu yağ asitlerini ise tamamen ortadan kaldırmıştır. Petrol içeren ortamda büyüyen hücreler ise doymamış C19:1, Me-C19:0 içeriğini artırmış ve C18:0 içeriğini azaltmıştır. Aynı zamanda, P14 suşu madeni yağ ile desteklenmiş sıvı ortamda kulture edildiğinde sıvı yüzeyinde bulunma eğilimindedir. P14 suşunun alkanları ve PAH'ları degrade edebilmesi ve sıvı yüzeyinde durma eğilimi, gelecekteki petrol sızıntının biyoremediyasyon uygulamaları için oldukça yararlı olabilecektir.

Hassanshahian et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada Basra Körfezi'ndeki petrol ile kontamine olmuş alandan izole edilmiş ham petrolü degrade eden altı maya arasından iki maya suşu alifatik hidrokarbonlar için yüksek degradasyon aktivitesi göstermiştir. Biyokimyasal özelliklerin ve 18S rRNA sekanslarının analizi sayesinde bu suşlar *Yarrowia lipolytica* suş PG-20 ve PG-32 olarak tanımlanmıştır. 30°C'de 1 hafta inkübasyondan sonra kültür

ortamındaki arta kalan ham petrolün gaz kromatografi analizi PG-20 ve PG-32 suşlarının sırasıyla ham petrolün %68 ve %58'sini degrade ettiğini göstermiştir.

2.7. İdentifikasyon ve Aromatik Hidrokarbonları Kullanan Mayalarla İlgili Yapılan Yurtiçi Çalışmalar

Şafak vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, Kambuça çayından izole edilen 15 maya izolatu koloni morfolojisi, farklı sıcaklıklarda büyüme, karbon kaynaklarının asimilasyonu, nişasta ve jelatin hidrolizi, nitrat indirgenmesi ve üreaz testlerine tabi tutulmuşlardır. İdentifikasyon sonucunda maya izolatlarının *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Kloeckera* genusuna dahil olduğunu bulmuşlardır (Şafak et al., 2002).

Öztürk ve Uçar (2001) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, mandıra ürünleri ve bitkisel yağlardan toplanan 14 farklı örnekten ekstraselüler lipaz üreten 64 maya suşu izole edilmiş ve bu suşların identifikasyonları Barnett ve ark. (1983)' na göre yapmışlardır. Bu izolatların *Geotrichum*, *Torulopsis*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Williopsis*, *Saccharomyces*, *Pichia* ve *Sporidiobolus* genuslarını içeren 23 farklı tür olduğunu belirlemişlerdir. Bu izolatların ekstraselüler lipaz aktivitesi, Tribütirin Agar yöntemi kullanılarak denenmiş ve en yüksek aktiviteyi *Candida ernobii* ile *Yarrowia lipolytica*'nın gösterdiğini bulmuşlardır (Öztürk ve Uçar, 2001).

Türkmen (2005) tarafından yapılan çalışmada ham petrol ile kontaminasyonun olduğu toprak ve deniz suyu örnekleri ile petrol rafinelerinden alınan toprak, aktif çamur ve atık su örneklerinden farklı izolasyon yöntemleri kullanılarak 44 maya izolatu elde edilmiş ve bu izolatların identifikasyonu Barnett et al. (2000)'a göre yapmış ve *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodospiridium* ve *Rhodotorula* genuslarına ait 11 farklı tür olduğunu belirlenen izolatların, aromatik hidrokarbonları parçalama yetenekleri, benzen, naftalen, f enantren, piren ve fluoren için test etmişler (Türkmen, 2005).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan örnekler

Petrol ve yapısındaki poliaromatik hidrokarbonların parçalanmasında rol alan mayaların izolasyonu için Tüpraş Petrol Rafinerisi (2011) ve Mersin Limanı (2011)'ndan ham petrol ile kontamine olmuş toprak, arıtma suyu(2010) ve aktif çamur (2010) örnekleri alınmıştır. Örneklerin alındığı yerler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Alınan örnekler aseptik şartlarda laboratuvara getirilerek analize alınmıştır.

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı yerler

Örnek	Kaynak
1	Arıtma suyu (Tüpraş)
2	Aktif çamur (Tüpraş)
3	Petrol (Tüpraş)
4	Toprak 1 (Mersin limanı)
5	Toprak 2 (Mersin limanı)
6	Toprak 3 (Mersin limanı)
7	Toprak 4 (Mersin limanı)

3.1.2. Kullanılan besiyerleri

3.1.2.1. Wort Agar

Malt Ekstrakt	15.0
Pepton	0.75
Maltoz	12.75
Dekstrin	2.75
Gliserol	2.75

KH ₂ PO ₄	0.4
NH ₄ Cl	1.0
Agar	20.0
Distile su	1000 ml.

Besiyeri bileşimine ilave olarak 100 mg/lt kloramfenikol ilave edilmiştir. Kloramfenikol eklenmesi ile olası bakteri kolonizasyonunun önlenmesi amaçlanmıştır. İçerik daha sonra distile suda çözülerek otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri, petrol ve yapısındaki poliaromatik hidrokarbonları parçalayan mayaların izolasyonu amacıyla izolasyon besiyeri olarak kullanılmıştır (Kutty and Philip, 2008).

3.1.2.2. Yeast Extract Glukoz Pepton Agar (YEPD)

Yeast Ekstrakt	10.0
Glukoz	20.0
Pepton	20.0
Agar	20.0
Distile su	1000 ml

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların asetik asit üretiminin kullanılmıştır (Öztürk, 2007).

3.1.2.3. Yeast Extract Broth

Yeast Ekstrakt	3.0
Pepton	5.0
Distile Su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri organizmaların şekerleri fermente etme kapasitelerin belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000; Tamer vd., 1989; Öztürk, 2007).

3.1.2.4. Malt Yeast Glukoz Pepton Broth / Agar (MYGP)

Malt Ekstrakt	3.0
Yeast Ekstrakt	3.0
Pepton	5.0
Glukoz	10.0
Agar	20.0
Distile su	1000ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri saf kültürlerin stoklanması, pseudomisel oluşturmaya vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesinde, testlerde kullanılmak üzere taze kültürlerin hazırlanmasında, DBB testinde ve farklı sıcaklıklarda büyüme testlerinde kullanılmıştır (Wickerham, 1951; Beech and Davenport, 1971; Barnett et al., 1983, 2000; Kirsop, 1984; Kirsop and Kurtzman, 1988).

3.1.2.5. Yeast Carbon Base Agar

Yeast Carbon Base	11.7
Agar	20.0
Distile su	1000ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri organizmaların aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000). Test edilecek azot kaynağının 5 gramı distile suda çözüldükten sonra membran filtre ile steril edilerek aseptik koşullarda ortam şişelerine aktarılmıştır.

3.1.2.6. Yeast Nitrogen Base Agar

Yeast Nitrogen Base	6.7
Agar	20.0
Distile su	1000ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri organizmaların aerobik büyüme için karbon kaynaklarını kullanma kapasitelerinin belirlenmesinde ve sikloheksimid varlığında büyümenin belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000). Test edilecek karbon kaynağının 5 gramı distile suda çözüldükten sonra membran filtre ile steril edilerek aseptik koşullarda ortam şişelerine aktarılmıştır.

3.1.2.7. Vitamin Free Agar

Vitamin Free Yeast Base	5.0
Agar	20.0
Distile su	1000ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri organizmaların vitamin ihtiyacının belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.2.8. Gorodkova Agar

Glukoz	1.0
Pepton	10.0
NaCl	5.0
Agar	20.0
Distile su	1000ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri askosporların incelenmesinde kullanılmıştır (Phaff et al., 1966; Van der Walt, 1970; Barnett et al., 1983, 2000; Tamer et al., 1989).

3.1.2.9. Asetat Agar

Potasyum Asetat	9 .8
Glukoz	1.0
NaCl	1.2

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.7
Yeast Ekstrakt	2.5
Agar	20.0
Distile su	1000 ml.

İçerik distile suda çözülerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri askosporların incelenmesinde kullanılmıştır (Phaff et al., 1966; Van der Walt, 1970; Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.2.10. Osmofilik Yeast Extract Agar

Yeast Ekstrakt	3.0
Pepton	5.0
Agar	20.0
Distile su	1000 ml.

Besiyeri bileşimine ilave olarak %50 ve %60 (w/v) olacak şekilde D-Glukoz eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların yüksek şeker konsantrasyonlarında büyüebilme kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.2.11. Yeast Extract Agar

Yeast Ekstrakt	3.0
Pepton	5.0
Glukoz	10.0
Agar	20.0
Distile su	1000 ml.

Besiyeri bileşimine ilave olarak %10 ve %16 (w/v) olacak şekilde önceden çözünmüş NaCl eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüebilme kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.2.12. Rice Extract Agar

Rice Ekstrakt Agar	25.0
Distile su	1000 ml.

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Hazırlanan ortamlar pseudomiselli büyümenin mikroskopik olarak incelenmesinde kullanılmıştır (Van der Walt, 1970; Rechcigl, 1978; Barnet et al., 1983, 2000; Atlas, 2004).

3.1.2.13. Üre Agar

Glukoz	2.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Pepton	1.0
Fenol Kırmızısı	0,012
NaCl	5.0
Agar	20.0
Distile su	1000 ml.

Besiyeri bileşimine ilave olarak membran filtre ile steril edilmiş %20’lik 20 ml/litre üre solüsyonu, otoklavda 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilen ortama steril koşullarda ilave edilmiştir. Bu besiyeri izolatlarda ayırdedici bir özellik olan üreaz aktivitesinin bulunup bulunmadığının belirlenmesinde kullanılmıştır (Van der Walt, 1970; Rechcigl, 1978; Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.2.14. Bushnell-Haas Medium (BHM)

Magnezyum sülfat	0.2
Kalsiyum Klorit	0.02
Monopotasyum fosfat	1.0
Dipotasyum fosfat	1.0
Amonyum nitrat	1.0

Ferrik klorit	0.05
Distile su	1000 ml.

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Hazırlanan ortamlar izolatların hidrokarbonları kullanma kapasitelerinin tespiti için kullanılmıştır (Malatova, 2005).

3.1.3. Çözelti, Tampon ve Boyalar

3.1.3.1.Diazonyum Blue B (DBB) Çözeltisi

0.1 M Tris-HCl çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltinin her ml’si için 1 mg DBB tuzu eklenmelidir. Eğer DBB testi hemen yapılmayacaksa DBB tuzu eklenmeden Tris-HCl çözeltisi -20°C’de bekletilmelidir. Bu çözelti, organizmaların askomisetik mi yoksa basidiomisetik mi olduğunun ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Van der Walt, 1970; Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.3.2. Malaşit Yeşili

5 g malaşit yeşili 100 ml distile suda çözülür. Bu boya askosporların incelenmesinde kullanılmıştır (Van der Walt, 1970).

3.1.3.3. Safranin

0.5 g safranin 100 ml distile suda çözülür. Bu boya malaşit yeşili ile birlikte askosporların incelenmesinde kullanılmıştır (Van der Walt, 1970).

3.1.3.4. Peptonlu Su

Pepton	1.0
Distile su	1000 ml

İzolasyon aşamasında örneklerin dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.5. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum Klorür(NaCl)	8 g
Distile Su	1000 ml

8 g NaCl 1000 ml distile su içerisinde iyice çözündürülmüş ve otoklavda 121 °C de 15 dakika steril edilerek örneklerin dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.6. Vitamin Çözeltisi

P-aminobenzoik asit	200.0µg
Biotin	20.0µg
Folik asit	2.0µg
Nikotinik asit	400.0µg
Pyridoksin HCl	400.0µg
Riboflavin	200.0µg
Tiamin HCl	400.0µg
Myo_inositol	10.0 mg
Pantotenat (Ca)	2.0 mg
Distile su	1000ml

Belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan vitamin çözeltilerini, her defasında bir yada bir kaç eksik tutulacak şekilde Vitamin Free Agar ortamına aktarılarak izolatların vitamin ihtiyaçlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.3.7. Lugol İyot Çözeltisi

İyot	5 g
KI	10 g
Distile su	100 ml

Kullanım için çözeltinin 1:5 oranında seyreltilmesi gerekmektedir. Bu çözeltiden özellikle *Cryptococcus* genusuna ait belli türlerin ayırt edilmesi amacı

ile kullanılmakta olan hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretilmesi testinde indikatör olarak yararlanılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.1.3.8. Poliaromatik Hidrokarbon Çözeltileri

Naftalen, piren ve fenantren poliaromatik hidrokarbonları, ethanol, methanol (MeOH), dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO) diklorometan, ve aseton gibi organik solventlerde rahatlıkla çözünabilmektedir (Dong et al., 2002; Margesin et al., 2003; Türkmen, 2005; Leyton, 2005; Alderman, 2007; Llado, 2009). Hidrokarbonların suda çözünürlüklerinin düşük olması ve asetonun uçucu özelliğinden dolayı, çalışmamızda bu amaç için aseton tercih edilmiştir. Her bir 200 µl'lik mikropate kuyucuğuna final konsantrasyonu 5.6 µM olacak şekilde aseton (%99.9 saflıkta) çözündürülmüş hidrokarbon bileşiklerinin stok solüsyonlarından 10'ar µl ilave edilmiştir. Stok solüsyonları, fenantren ve piren için 10 ml'de 0,2 mg (0,0002 g/10 ml), naftalen için 10 ml'de 0,15 mg (0,00015 g/10 ml) olacak şekilde hazırlanmıştır (Margesin et al., 2003).

3.1.3.9. Trifenil Tetrazolium Klorür Çözeltisi

Mayaların üremesini kontrol amaçlı olarak Fluka marka trifenil tetrazolium klorür üreme indikatörü kullanılmıştır. 0,1 gr trifenil tetrazolium klorür tartılarak 10 ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Yıldız, 2010).

3.1.3.10. Aseton Çözeltisi

%99.9 saflıkta aseton çözeltisi poliaromatik hidrokarbonları çözündürülmesinde kullanılmıştır.

3.1.3.11. DNA İzolasyonunda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

- Lizis Tamponu

Tris-HCl (pH8,0)	400 mM
EDTA (pH8,0)	60 mM
NaCl	150 mM

SDS % 1

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- Potasyum-Asetat Solüsyonu

Potasyum-asetat (5M)	60 ml
Glisial asetik asit	11,5 ml
Distile Su	28,5 ml

Bu solüsyon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE) (5x/L)

Trisma base	54g
Borik asit	27,5g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20ml

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- Soğuk İzopropil Alkol

-%70'lik Soğuk Etanol

3.1.3.12. 26S rDNA Analizinde Kullanılan Materyaller

dNTP karışımı (Fermentas; 100 mM)

Primerler (Fermentas)

NL1 – 5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG – 3'

NL4 – 5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG – 3'

Taq DNA Polimeraz (Fermentas 500 U)

Marker DNA (Fermentas; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

Agaroz (Prona)

Gel Red (Nükleik asit jel boyası)

3.1.3.13. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA Analizinde Kullanılan

Materyaller

dNTP karışımı (Fermentas; 100 mM)

Primerler (Fermentas)

ITS1 – 5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'

ITS4 – 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'

Taq DNA Polimeraz (Fermentas 500 U)

Marker DNA (Fermentas; GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

Agaroz (Prona)

Gel Red (Nükleik asit jel boyası)

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin alınımı

Petrolü parçalama yeteneğinde mayaların olduğu düşünülerek alınan örnekler laboratuvar ortamına aseptik koşullarda getirilmiş ve çalışma yapılana kadar soğuk zincir kuralına göre saklanmıştır.

3.2.2. Örneklerden mayaların izolasyonu

Mayaların izolasyonu için önceden hazırlanmış ve içerisinde steril peptonlu su bulunan 90 ml'lik erlenlere örneklerden katı örnekler için 10 g veya sıvı örnekler için 10 ml aktarılmış ve bu şekilde 10^{-1} 'lik seyreltmeler elde edilmiştir. Karışımlar vorteks ile iyice karıştırılarak homojenizasyon sağlanmış ve içerisinde steril 9'ar ml peptonlu su bulunan tüplere steril pipetler yardımı ile bu seyreltmelerden 1'er ml alınarak 10^{-2} 'lik seyreltmeler hazırlanmıştır. Aynı işlemler tekrarlanarak 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} 'lık seyreltmeler hazırlanmıştır. Bu son dört seyreltmeden 1'er ml alınarak steril petrilere aktarılmıştır. İzolasyon besiyeri olarak Yeast Extract Glukoz Pepton Agar kullanılarak dilüsyonlar için dökme plaka yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Daha sonra petriler, 27°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kolonilerden elde edilen maya izolatları saf kültürler elde etmek üzere yatık olarak hazırlanmış Malt Yeast Glukoz Pepton (MYGP) agar ortamlarına aseptik koşullarda alınarak 27°C'de 2 gün inkübasyondan sonra stok olarak kullanılmış ve stoklar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, stok kültürler iki ayda bir yenilenmiştir.

3.2.3. İzolatların tanılanmasında kullanılan fizyolojik testler

3.2.3.1. Aerobik büyüme için karbon kaynağı olarak organik bileşikler kullanma kapasitesi

Maya türlerini, organik bileşikler tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneklerine göre ayırt etmek mümkündür. Bu organik bileşikler, alditoller ve organik asitlerden oluşmaktadır. Bu testler “asimilasyon testleri” olarak

adlandırılmakta ve mayaların aerobik büyümesi için bu bileşikleri kullanma kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu testlerde en yaygın olarak kullanılan yöntemler, tüplerde sıvı besiyeri kullanımı, agarlı besiyerinde okzonogram ve replika plate yöntemidir.

Replika plate (baskı ekim) yönteminde, bir “esas” petrideki MYGP agarın yüzeyi, iğne öze ile yaklaşık 25 maya suşuyla belli bir plana göre inoküle edildikten sonra, ayrı küçük kolonilerin oluşması için petri inkübasyona bırakılır. Petri üzerine işaret konularak belli bir yön oluşturulmalıdır. Baskının yapılacağı petrilerin her biri 25 mM karbon kaynağı ve Yeast Nitrogen Base Agar içermelidir. Baskı işleminin yapılacağı kadife bez ve bezin sarılı olduğu petri kabına sığacak boyutta tahta blok, sterilize edilmelidir. “Esas” petri, bu bloğa bastırılarak kolonilerin kadife üzerine çıkması sağlandıktan sonra, bloklar sırayla diğer petrilere baskı ekim yapılarak, petriler inkübasyona bırakılmalıdır (Barnett et al., 1983, 2000).

Denemelerde replika plate yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Yeast Nitrogen Base Agara %0.5 oranında test edilecek karbon kaynağı ilave edilmiş ve steril petrilere dökülmüştür. MYGP agarda büyütülmüş bir gecelik kültürden birer öze ile alınarak %0.85 fizyolojik su içine konulan maya izolatları petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra her petriye maya izolatları belli bir plana göre 4-5 µl inoküle edilmiş ve petriler inkübasyona bırakılmıştır. Test edilen karbon kaynakları; D-Glukoz, D-Galaktoz, L-Sorboz, D-Glukozamin, D-Riboz, D-Ksiloz, L-Arabinoz, D-Arabinoz, L-Ramnoz, Sükroz, Maltoz, α,α -Trehaloz, Me- α -D-Glikosit, Sellobioz, Salisin, Arbutin, Melibioz, Laktoz, Rafinoz, Melezitoz, İnulin, Nişasta, Gliserol, Ribitol, Ksilitol, L-Arabinitol, D-Glisitol, D-Mannitol, Myo-Inositol, D-Glikono-1,5-Lakton, 2-Keto-D-Glikonat, 5-Keto-D-Glikonat, Quinik Asit, Dulsitol, Eritritol, D-Glikonat, D-Glikoronat, D-Galakturonik Asit, DL-Laktat, Süksinat, Sitrat, Metanol, Etanol, Propan-1,2-Diol, Butan-2,3-Diol’dür.

3.2.3.2. Aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitesi

Nitrati tek azot kaynağı olarak kullanma kapasitesinin belirlenmesi oldukça önemli bir testdir çünkü türlerin yaklaşık dörtte biri nitrati kullanabilmektedir. Ayrıca nitrit, etilamin ve L-lisin gibi diğer bazı azot kaynaklarında test substratı olarak faydalı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Aerobik büyüme için azot kaynaklarını kullanma kapasitesi testi, karbon kaynakları için kullanılan yöntemle aynı şekilde yapılmaktadır. Tek fark, Yeast Nitrogen Base yerine Yeast Carbon Base ile hazırlanmış besiyerinin kullanılmasıdır (Barnett et al., 1983, 2000). Test edilen azot kaynakları; Nitrat, Nitrit, L-Lizin, Kadaverin, Kreatin, Kreatinin, Etilamin, D-Glukozamn, İmidazol, D-Triptofan'dır.

3.2.3.3. Şekerleri anaerobik olarak kullanma kapasitesi

Karbohidrat fermentasyonu, bir organizmanın tanısının kesin olarak yapılmasının zorunlu olduğu zaman karbohidratı kullanma testine ilave olarak yararlıdır (Sandven, 1990). Maya türlerinin yarısından fazlası, en azından D-Glukozu yarı anaerobik olarak fermente etmektedir. Bu testte, 14 bileşiği (heksozlar ve heksoidler) kullanma kapasitesi, CO₂ gazı oluşumu gözlenerek değerlendirilmektedir (Barnett et al., 1983, 2000). Karbohidratların çözüldürüldüğü bazal ortam, azot ve diğer besin maddelerini, iz elementleri ve vitaminleri içermelidir. Böylece karbohidratların sentezi ve taşınmasında görevli enzim sistemlerinin sentezi için optimum koşullar sağlanmış olur. Bazal ortamda, diğer fermente edilebilir şekerler bulunmamalıdır (Van der Walt, 1970). Tüplere 10 ml Yeast Ekstrakt Broth ve 50 mM test şekeri eklenmiştir. Negatif kontrol tüplerine şeker konulmamıştır. Ayrıca her tüpe ters çevrilmiş Durham tüpü konulmuştur. Her tüpe, aktif olarak büyümekte olan kültürlerden alınmış 10⁶-10⁷ hücre/ml olacak şekilde 100 µl maya süspansiyonu inoküle edilmiştir.

Eğer maya, tüpteki şekeri aerobik olarak kullanıyorsa, besiyerinin üst kısmında büyüyerek o şekere adapte olur. Adapte olmuş yani indüklenmiş hücreler, tüpün oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu dip kısmına iner. Burada

maya anaerobik bir mekanizmayla şekeri katabolize edebilir ve CO₂ gazı açığa çıkar. Çıkan gaz, ters çevrili durham tüpleri içine toplanır.

Bu testte, inoküle edilen tüpler 27°C’de yaklaşık bir hafta inkübe edilmiş, mayanın dibe çökmesini kolaylaştırmak için her gün çalkalanarak tüplerde gaz oluşumu gözlenmiştir (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.4. Üreaz testi

Pratikte yeterli vitamin sağlandığı zaman bütün mayalar tek azot kaynağı olarak düşük konsantrasyonlarda üreden yaralanabilmekle beraber, pepton gibi bir organik azot kaynağı içeren ortamda yüksek konsantrasyonlardaki üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneği açısından farklılık göstermektedirler. Üreaz aktivitesi çoğunlukla nişasta oluşumuna bağlanmasına rağmen, bu kesin bir kural değildir çünkü üreaz (+) / nişasta (-) ve üreaz (-) / nişasta (+) olan mayalar da bilinmektedir.

Bu test için, maya kültürü Üre Agar’a inokule edilerek 27°C’de inkübe edilmiştir. Koyu pembe renk oluşumu reaksiyonun pozitif olduğunu göstermektedir (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.5. Diazonium Blue B (DBB) testi

Çeper yapısındaki farklılığı ortaya koyan DBB testi, basidiomisetik mayaların askomisetik mayalardan ayırt edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Van der Walt (1970), basidiomisetik mayaların DBB’nin tamponlanmış çözeltisi ile koyu kırmızı renk verdiğini göstermiştir. Bu renk reaksiyonu, askomisetik mayaların hiçbirinde gözlenmemiştir. Bu renk değişiminin hücre çeperinde gerçekleştiği bilinmekle birlikte (Kurtzman, 1990), reaksiyonun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bu reaksiyon, bazı imperfect maya türleri ile Askomisetik ve Basidiomisetik maya türlerinin ayırdedilmesi için kullanılmaktadır (Van der Walt, 1970; Wolf, 1996; Vaughan-Martini, 2003). Literatürde bu test için farklı yöntemler önerilmektedir. Bunlar ya 10 günlük kültürün birkaç saat 55°C’de tutulması (Barnett et al., 1983, 2000) ya 3 hafta

25⁰C'de inkübe edilen kültüre DBB çözeltisi eklenmesi (Van der Walt, 1970) ya da inkübasyon 5-7 güne indirilip daha sonra kültürün 16 saat boyunca 55-60⁰C'de tutularak üzerine DBB çözeltisi eklenmesi (Van der Walte, 1970) şeklinde olmaktadır (Lodder, 1970; Barnett et al., 1983, 2000).

Bu test için Malt Yeast Glukoz Pepton Agar kullanılmıştır. MYGP agar tüplerinde büyütülen en az 10 günlük kültür birkaç saat 55⁰C'de tutularak daha sonra soğuk DBB çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika içinde oluşacak renk değişimine göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Reaktif kullanılacağı zaman hazırlanmalı ve soğuk olarak tutulmalıdır. Basidiomisetik mayaların oluşturduğu koloniler, DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almakta, Askomisetik mayalarda ise herhangi bir renk değişimi olmamaktadır (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.6. Vitamin ihtiyacının belirlenmesi

Mayalar, belli vitaminleri dışarıdan sağlama gereksinimleri açısından birbirlerinden farklılık gösterirler. Diyagnostik bir özellik olarak, vitamin içermeyen bir ortamda büyüebilme yeteneğinin kullanılması, Wickerham (1951) tarafından geliştirilmiştir (Van der Walt, 1970). Bu test için Vitamin Free Agar kullanılmıştır. Bir seri petride hiçbir vitamin bulunmazken, diğer petrilerde her seferinde bir veya birkaç vitamin eksik tutulup diğerleri eklenerek testler gerçekleştirilmiştir (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.7. Hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretiminin belirlenmesi

Bu testin amacı, karakteristik olarak, iyotla mavi renk veren nişasta benzeri ekstraselüler polisakkarit oluşturan türlerin belirlenmesidir. MYGP broth bulunan tüplerde büyüyen kültürlerle bir damla Lugol iyot çözeltisi damlatılıp çalkalandıktan sonra renk değişimi olup olmadığına bakılmıştır. Mavi, mor veya yeşil renk sonucun pozitif olduğunu göstermektedir (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.8. Yüksek D-Glukoz ve NaCl konsantrasyonlarında büyümenin belirlenmesi

Maya türlerinin birçoğu, ağırlıkça %40'a kadar glukoz konsantrasyonlarında iyi büyüme göstermektedir. Bazı mayalar, yüksek şeker ve tuz konsantrasyonun bulunduğu ortamlarda büyüebilme yeteneğine sahiptir (Van der Walt, 1970). Bu test için, %50 ve %60 D-glukoz (w/v) içeren Osmofilik Yeast Extract Agar ile %10 ve %16 NaCl (w/v) içeren Yeast Ekstrakt Agar petrilere ekim yapılmış ve tüpler 27°C'de 4 haftaya kadar inkübasyona bırakılarak incelenmiştir (Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.3.9. Sikloheksimid varlığında büyümenin belirlenmesi

Sikloheksimid, 80 S ribozomlarda protein sentezini inhibe ederek ökaryotların büyümesini durduran bir antibiyotiktir. Sikloheksimide dirençli olan mayaların ribozomları modifiye edilmiş olabilmektedir (Barnett et al., 1983, 2000).

Bu test için D-glukoz içeren Yeast Nitrogen Base Agar'a %0,1 (1000 ppm) ve %0,01 (100 ppm) konsantrasyonlarında sikloheksimid (actidione) ilave edilmiştir. Petrilere maya izolatları inoküle edilerek inkübasyona bırakılmıştır (Barnett et al., 1983, 2000; Wolf, 1996).

3.2.3.10. 37°C ve diğer sıcaklıklarda büyüme

Birçok maya türü için, 20-28°C arasındaki sıcaklıklar optimaldir. Sıcaklık testleri Malt Yeast Glukoz Pepton Agar kullanılarak yapılmıştır (Van der Walt, 1970). Genç kültürler ile inoküle edilen petrilere, test edilecek sıcaklıkta 4 gün boyunca inkübe edilirler. Psikrofilik maya türleri için daha uzun bir inkübasyon periyoduna gereksinim duyulabilir (Wolf, 1996).

3.2.3.11. Asetik asit üretiminin belirlenmesi

Yatık olarak tüpte ya da petride hazırlanmış % 0.5 oranında (w/v) CaCO_3 içeren Yeast Extract Glukoz Pepton Agar üzerine az miktardaki inokulumdan çizgi ekimi yapılır. Kültür etrafında görülen şeffaf zon, asetik asit üretiminin pozitif olduğunu göstermektedir (Wolf, 1996; Boekhout et al., 2003).

3.2.4. İzolatların tanılanmasında kullanılan mikroskopik ve morfolojik testler

3.2.4.1. Askosporların mikroskopik olarak incelenmesi

Yapılan bu testin 3 tane amacı vardır. Birinci amaç, maya izolatlarının askospor oluşturup oluşturmadığını saptamaktır. İkinci amaç, eğer maya askospor oluşturuyorsa konjugasyon olmadan mı?; konjugasyondan sonra mı? ya da ana hücre ile tomurcuğun konjugasyonundan sonra mı oluşturuyor? sorularının cevabını almaktır. Son amaç ise, askospor ve askusların şekil ve boyutlarını saptamaktır.

Bu test için bir gecelik kültürden Gorodkova ve Asetat Agara inokülasyon yapılmış ve kültürler 27°C 'de 3 gün inkübe edildikten sonra mikroskop altında incelenmiştir. Askospor oluşumu gözlenmeyen kültürler 20°C 'de 6 hafta boyunca askospor oluşumu için gözlenmiştir (Van der Walt, 1970; Barnett et al., 1983, 2000).

Askosporların boyanma prosedürleri ise şu şekildedir; ısıyla fiske edilmiş preparatlar 30-60 saniye boyunca %5'lik malaşit yeşilinden geçirilerek buharlaşma olana kadar 3-4 defa ısıtılmakta ve fazla boya akan suyun altında durulandıktan sonra preparat 30 saniye boyunca %5'lik safraninle boyanmaktadır. Olgun askosporlar mikroskopta mavi-yeşil, vegetatif hücreler ise kırmızı renkte gözlenmiştir (Van der Walt, 1970).

3.2.4.2. Pseudomisel oluşturmaya vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi

Vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesinin amacı; mayanın tomurcuklanmayla mı, fizyonla mı yoksa her iki yöntemle mi çoğaldığı, tomurcuk oluşturuyorsa bunun ana hücrede ki yeri, şekli ve vejetatif hücrelerin şekil ve boyutunun belirlenmesidir. Bu inceleme için, 100 ml'lik erlenlerde bulunan 30 ml sıvı besiyerine (MYGP broth) bir günlük genç kültürden inokülasyon yapılmış ve kültürler 27⁰C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda preparat mikroskopik olarak incelenmiştir (Van der Walt, 1970; Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.4.3. Pseudomiselli büyümenin mikroskopik olarak incelenmesi

Eğer bir maya tomurcuklanma ile çoğalıyorsa, olgunlaşmış tomurcuk ya hemen ana hücreden kendini ayırır ya da ana hücreye bağlı kalarak hücre zincirleri oluşmasını sağlar. Bazı mayaların hücre zincirleri oluşturma eğilimleri, pseudohif veya pseudomisel oluşmasına neden olmaktadır (Van der Walt, 1970). Bu testin amacı, pseudomiselli büyümenin olup olmadığı, eğer varsa pseudomiselin tipi ve pseudomiselden büyüyen hücrelerin tipinin incelenmesidir (Barnett et al., 1983, 2000). Bu inceleme için slide kültür tekniği kullanılmıştır. İçinde U şeklinde cam çubuk ve lam bulunan petri ler sterilize edildikten sonra, eritilmiş Rice Extract Agar'dan lam üzerine bir damla damlatılıp üstüne steril lamel kapatılarak, lamelin dört kenarından maya kültürü iğne ile inoküle edilmiştir. Kuruma olmaması için içine bir miktar steril su eklenen petri ler 25⁰C'de inkübe edilmiş ve preparat iki hafta boyunca iki günde bir mikroskop altında incelenmiştir (Van der Walt, 1970; Barnett et al., 1983, 2000).

3.2.5. İzolatların petroldeki poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneklerinin belirlenmesi

3.2.5.1. Mikrotitre plate yöntemi

Çizelge 3.1'deki örneklerden izole edilen izolatların çeşitli hidrokarbonları kullanma kapasitelerinin belirlenmesi, mikrotitre plate yöntemi ile

gerçekleştirilmiştir (Malatova, 2005) . 2 gün 27°C’de Yeast Malt Glukoz Pepton Agar yatık ortamlarında inkübe edilen maya izolatlarından steril öze yardımı ile belirli miktarda alınan hücreler, önceden steril edilmiş fizyolojik tuzlu su içeren tüplere steril koşullarda aktarılmış ve McFarland skalasında 3 olacak şekilde (9×10^8 hücre/ml) hücre yoğunlukları ayarlanmıştır (Nnamchi, 2006). Böylece, mikrotitre plate yönteminde kullanılacak olan hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Bunun yanı sıra, maya izolatları tarafından parçalanma kapasiteleri test edilecek olan piren, phenantren ve naftalen hidrokarbonları 3.1.3.8’de belirtildiği şekilde kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Mikrotitre plate yönteminde fenantren, piren, naftalen ve petrolün parçalanma kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile her biri için ayrı bir mikroplate kullanılmıştır. Platelerdeki her bir kuyucuğa 200 µl steril Bushnell-Hass ortamı, 10 µl test edilecek hidrokarbon bileşiğinin stok solüsyonundan (5.6 µM) ilave edilmiştir. Bu işlemin ardından, asetonun uçması için plateler oda sıcaklığında 1 gün bekletilmiştir. Mikroplatelerdeki asetonun uçmasının ardından, platelerdeki her bir kuyucuğa önceden hazırlanmış hücre süspansiyonlarından 10 µl aktarılmış ve 27°C’de 21 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ham petrol içeren mikroplate’de aseton bulunmadığı için bu platelere 200 µl steril Bushnell Hass medium ortamı (BHM), 10 µl ham petrol ve daha önceden hazırlanmış hücre süspansiyonlarından 10 µl ilave edilmiş ve diğer mikroplatelerle birlikte 21 gün 27°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, platelerdeki her bir kuyucuğa 50 µl trifeniltetrazolium klorür (TTC) indikatörü ilave edilmiş ve üreme olup olmadığının gözlenmesi için plateler tekrar 27°C’de bir gün inkübasyona bırakılmıştır (Malatova, 2005) . TTC indikatörü metabolik olarak aktif ve inaktif hücreleri ayırt etmek için kullanılan bir redoks indikatörüdür. Renksiz olan TTC indikatörü enzimatik olarak çeşitli dehidrogenazların aktivitesi sonucu canlı hücrelerde kırmızı trifenilformazana (TPF) indirgenmektedir. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda oluşan kırmızı renk, hidrokarbon kullanımı için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Malatova, 2005). Tarama sonuçlarına göre, test edilen poliaromatik hidrokarbonlar ve ham petrolün birden fazlasını kullanma kapasitesine sahip izolatlar, ileriki çalışmalar için seçilmiştir.

Asetonun çalışmamızda kullanılan maya izolatları tarafından karbon kaynağı olarak kullanılıp kullanılmadığını test etmek amacıyla, çalışmamızda kontrol amaçlı diğer bir işlem de gerçekleştirilmiştir. Bu kontrol grubunda, her bir mikropate kuyucuğuna 200 µl Busnell-Hass ortamı, 10 µl aseton ve 10 µl daha önceden hazırlanmış hücre süspansiyonlarından eklenmiş ve plateler 27°C’de 21 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon ardından, TTC indikatörünün eklenmesi sonucu bu platelerde kırmızı çökeltinin oluşmaması, asetonun çalışmada kullanılan maya izolatları tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmadığını göstermiştir.

3.2.6. Poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneği olan izolatların moleküler karakterizasyonu

3.2.6.1. DNA izolasyonu

Fenotipik tanılamaları yapılan izolatlardan test edilen poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneği olanlar seçilmiştir ve bu izolatların 26S rDNA-PCR ve ITS-PCR tiplendirilmesinde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

İşlemler aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

1. Malt Yeast Glukoz Pepton Broth’da çoğalan 27°C’de 1 gün inkübe edilir.
2. Sıvı besiyerinde bir gece büyütülen kültür steril bir ependorf tüpüne aktarılır ve 7.000 g.’de 5 dakika santrifüjlenerek hücreler çöktürülür. Daha sonra süpernatant dökülür.
3. Pellet üzerine 500 µl liziz tamponu ilave edilir ve karışım homojen olana dek karıştırılır.
4. 65 °C’lik su banyosunda 10 dakika bekletildikten sonra 150 µl potasyum-asetat ilave edilir ve karışım homojen olana dek karıştırılır.
5. Karışım 12.000 g.’de, 4°C’de, 5 dakika santrifüjlenir ve süpernatant yeni, steril bir ependorf tüpüne aktarılır.
6. Yeni tüpe aktarılan sıvının üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilir ve homojen karışım sağlanana dek karıştırılır.

7. Karışım 11.000 g.'de, 4°C'de, 2 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır.
8. Daha sonra 300 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilir ve 10.000 g'de, 4°C'de, 1 dakika santrifüjlenir ve etanol uçurulur.
9. Etanol uçtukten sonra 50 µl ultra saf suda tekrar süspanse edilir (Liu et al., 2000).

3.2.6.2. DNA'ların saflık kontrolü

İzolatlardan elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometre ile yapılmıştır (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1997). Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook et al., 1989 ; Ausubel et al., 1997).

3.2.6.3. 26S rDNA-PCR

26S rDNA amplifikasyonu için NL1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGA AAAG – 3') ve NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG – 3') primerleri kullanılmıştır. Fernandez et al., (1999), Chen et al. (2000) ve Petersen et al. (2001) tarafından önerilen koşullar ve malzeme miktarlarından yararlanılarak, 26S rDNA PCR amplifikasyon koşulları ve amplifikasyonda kullanılacak malzemelerin miktarları belirlenmiştir.

DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur;

- Ultra saf su 10,65 µl
- PCR reaksiyon tamponu 2,5 µl
- MgCl₂ 3,6 µl

- dNTP karışımı 1,0 µl
- Primer ITS 1 1,0 µl
- Primer ITS 4 1,0 µl
- Taq Polimeraz 0,25 µl
- Kalıp DNA 5,0 µl (20–50 ng DNA)

Amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Palm Cycler, Corbett) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

26S rDNA amplifikasyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

— İlk denatürasyon 95°C'de 5 dakika

— 35 döngü, her döngüde;

I. 95°C'de 1 dakika

II. 70°C'de 1 dakika

III. 72°C'de 2 dakika

— PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C'de 10 dakika inkübe edilmişlerdir.

— Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C'de saklanmıştır (Petersen et al., 2001).

3.2.6.4. ITS-PCR

DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde , aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0,2 ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur.

- Ultra saf su 10,65 µl
- PCR reaksiyon tamponu 2,5 µl
- MgCl₂ 3,6 µl
- dNTP karışımı 1,0 µl
- Primer ITS 1 1,0 µl

- Primer ITS 4 1,0 µl
- Taq Polimeraz 0,25 µl
- Kalıp DNA 5,0 µl (20–50 ng DNA)

Reaksiyon karışımı buharlaşmayı engellemek için ince bir tabaka steril mineral yağ ile kaplanmış ve amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Techne) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

-İlk denatürasyon 95°C'de 5 dakika

- 40 döngü, her döngüde;

I. 95°C'de 1 dakika

II. 58°C'de 2 dakika

III. 72 °C'de 3 dakika

- PCR tüpleri son döngüden sonra 72°C'de 10 dakika inkübe edilirler.

- Tüpler reaksiyon bittikten sonra 4°C'de tutulurlar.

Her PCR denemesinde DNA kalıbı haricinde (bunun yerine steril distile su konulur) bütün bileşenleri içeren bir reaksiyon körü (negatif kontrol) de kullanılmıştır (Fernandez et al., 1999; Chen et al., 2000; Petersen et al., 2001).

3.2.6.5. ITS-PCR ve 26S rDNA PCR ürünlerinin elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezinde Consort marka 13x15 cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. Elektroforez, 90 voltta 1 saat 15 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir. Elektroforezde tampon olarak Tris-Borat-EDTA (TBE) kullanılmış ve elektroforez %1'lik agoroz jelde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 100 ml'de 5µl olacak şekilde 10000X GelRed (Biotium) nükleik asit boyası ilave edilmiştir (Fernandez et al., 1999; Petersen et al., 2001).

Elektroforez için 2 µl PCR ürünü ve 3 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işleminde örneklerle beraber DNA markerı da (100 bp DNA marker, Fermentas) jelde yürütülmüştür.

PCR ürünlerinin elektroforez ile ayrılmaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. Elektroforez cihazının tepsisi iyice temizlenerek açık uçları bir otoklav bandı ile kapatılır.
2. Cihazın tankları Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE) ile uygun seviyeye kadar doldurulur.
3. 250ml'lik temiz bir erlen içerisinde 100 ml Tris-Borat-EDTA Tamponu (TBE) konulur ve 1g agoroz TBE'de süspanse edilir.
4. Agoroz süspansiyonu tamamen berraklaşınca kadar mikrodalga fırında ısıtılarak, agorozun erimesi sağlanır.
5. Solüsyon 60°C'a kadar soğutulur ve 100 ml'de 5µl olacak şekilde 10000X GelRed (Biotium) nükleik asit boyası ilave edilmiştir.
6. Elektroforez tepsisine taraklar yerleştirilerek yükseklikleri 0,5-1mm olacak şekilde ayarlanır.
7. 60°C'a soğutulan agoroz solüsyonu jelde hava kabarcığı kalmayacak şekilde tepsiye dökülür.
8. Jel oda sıcaklığında tamamen donduktan sonra (60-90 dakika) bantlar ve taraklar dikkatlice çıkarılır.
9. Tanka jelin yüzeyini yaklaşık 1 mm kaplayacak şekilde TBE ilave edilir.
10. PCR ürünleri ve Marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılır.
12. UV translüminatörde, jelde ayrılan bantlar incelenerek poloroid bir kamerayla jel incelenerek fotoğrafı çekilir.

3.2.6.6. ITS PCR ve 26S rDNA D1/D2 domaininin sekans analizi

Amplifiye edilen 26S rDNA D1/D2 domaininin sekans analizleri ve ITS PCR sekans analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (BİYOMER) gerçekleştirilmiştir. Sekans analizlerinde, Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer cihazı kullanılmış ve elde edilen sekanslar, GenBank veri tabanında bulunan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı ile karşılaştırılmıştır. Maya suşları, en yüksek sekans benzerliği gösteren tür olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Elde Edilmesi

Bölüm 3.2.1’de belirtilen yöntemle farklı görünüşteki maya kolonileri seçilerek toplam 100 adet maya izolatu elde edilmiştir. Petrol ile kontamine olmuş toprak örneklerinin yanı sıra petrol rafinerisinden alınan aktif çamur, toprak ve atık su örnekleri de izolasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. İzolatların elde edildiği kaynaklar ve izolat numaraları Çizelge 4.1’de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Mayaların izole edildiği kaynaklar ve izolat numaraları

Örnek	Kaynak	İzolat Numaraları
1	Arıtma suyu (Tüpraş)	1, 46, 47, 49
2	Aktif çamur (Tüpraş)	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 20, 33
3	Petrol (Tüpraş)	13, 25, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 48
4	Toprak 1 (Mersin limanı)	17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 50, 51
5	Toprak 2 (Mersin limanı)	52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60
6	Toprak 3 (Mersin limanı)	61, 62, 65, 67, 69, 74, 77, 78, 79, 82, 83, 85, 88, 92, 95, 96, 100
7	Toprak 4 (Mersin limanı)	63, 64, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 80, 81, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 97, 98, 99

4.2. İzolatların Fenotipik Tanılanması

Mayaların genus düzeyinde fenotipik olarak tanılanmasında kullanılan testler DBB, üre hidrolizi testi, nitrat asimilasyonu ve glukoz fermentasyonu testidir (Barnett et al., 1983, 2000). İzolatlar üzerine yapılan ilk testlerde bunlar olmuştur.

Çeper yapısındaki farklılığı ortaya koyan DBB testi, basidiomisetik mayaların askomisetik mayalardan ayırt edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Basidiomisetik mayaların oluşturduğu koloniler, DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk alırken, Askomisetik mayalarda herhangi bir renk değişimi olmamaktadır (Kurtzman, 1990; Wolf, 1996; Barnett et al., 1983, 2000) . Askomisetik mayalar olan *Candida*, *Pichia* ve *Stephanoascus* genusları DBB çözeltileri ile renk değiştirmemekte, Basidiomisetik maya olan *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Pseudozyma* ve *Kondoa* genusu DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almaktadır. DBB testi için Malt Yeast Glukoz Pepton Agar kullanılmış, 10 günlük kültüre DBB çözeltisi eklenip test gerçekleştirilmiş ve incelenen Askomisetik mayaların negatif tepki verdiği, Basidiomisetik mayalar olan *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodospiridium diobovatum*'un ise DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk aldığı gözlenmiştir.

Mayaların üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneklerinin farklı olması, bu özelliğin mayaları ayırt etme de kullanılabilmesini sağlamaktadır (Barnett et al., 1983, 2000). Üreaz aktivitesi *Rhodotorula* ve *Rhodospiridium* genuslarında mevcut iken *Pichia* genusuna dahil olan mayalarda görülmemektedir. *Candida* ve *Cryptococcus* genuslarında ise türe bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Barnett et al., 1983, 2000). Bu nedenle incelenen suşlar arasından *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus diffluens* ve *Candida davisiana*'da üreaz aktivitesi gözlenirken, *Candida parapsilosis*, *Pichia kudriavzevii* ve *Saccharomyces cerevisiae* olarak belirlenen izolatların üreyi hidrolize edemedikleri saptanmıştır.

İzolatların genus ve tür düzeyinde tanılanması, Barnett et al. (2000) göre 1, 2 ve 8 numaralı tayin anahtarları kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 4.3'de verilen glukozu fermente eden mayaların tayin anahtarı, Çizelge 4.4'de verilen glukozu fermente edemeyen mayaların tayin anahtarı ve Çizelge 4.5'de verilen pembe koloni oluşturan mayaların tayin anahtarı kullanılmıştır. Bu tayin anahtarlarında yer alan testler Çizelge 4.2'de verilmiştir. 3, 5, 11, 12, 14, 16, 20, 22, 23, 26, 28, 31, 37, 39, 42, 60, 69 ve 71 numaralı izolatların glukoz fermentasyonu pozitif olduğundan bu izolatların tanılanmasında Çizelge 4.3'de verilen glukozu fermente

eden mayaların tayin anahtarı kullanılmış, 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 18, 21, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 74, 75, 77, 78, 79, 81, 83, 84, 91, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ve 100 numaralı izolatların glukoz fermentasyonu negatif olduğundan Çizelge 4.4'de verilen glukozu fermente edemeyen mayaların tayin anahtarı kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca 13, 15, 17, 19, 29, 32, 41, 43, 46, 48, 50, 54, 55, 73, 76, 80, 82, 85, 86, 87, 88, 89, 90 ve 93 numaralı izolatlar da pembe koloni oluşumu gözlemlendiğinden tanımlanmasında Çizelge 4.5'de verilen pembe koloni oluşturan mayaların tayin anahtarı kullanılmıştır. *Rhodotorula* genusuna ait izolat numaraları ve türler; 13, 17, 19, 29, 32, 41, 43, 46, 48, 50, 73, 76, 80, 82, 85, 86, 87, 88, 89, 90 ve 93 numaralı izolatlar *Rhodotorula aurantiaca*, 7, 18, 21, 51 ve 55 numaralı izolatlar *Rhodotorula auriculariae*, 44, 53, 64 ve 94 numaralı izolatlar *Rhodotorula javanica*, 52 numaralı izolat *Rhodotorula sonckii*, 96 numaralı izolat ise *Rhodotorula glutinis* olarak tanımlanmıştır. *Candida* genusuna ait izolat numaraları ve türler; 14, 42, 70, 78 ve 98 numaralı izolatlar *Candida ernobii*, 2, 6 ve 10 numaralı izolatlar *Candida glabrata*, 5 numaralı izolat *Candida guilliermondii*, 12 numaralı izolat *Candida kefyr*, 16 numaralı izolat *Candida lusitanae*, 22 numaralı izolat *Candida lusitanae*, 69 numaralı izolat ise *Candida lusitanae* olarak tanımlanmıştır. *Pichia* genusuna ait izolat numaraları ve türler; 1 ve 33 numaralı izolatlar *Pichia bursaria*, 4, 23, 39 ve 91 numaralı izolatlar *Pichia angustata*, 3 numaralı izolat *Pichia burtonii*, 26 numaralı izolat *Pichia heimi*, 37 numaralı izolat *Pichia holstii*, 45 numaralı izolat *Pichia petersonii*, 60 numaralı izolat *Pichia guilliermondii*, 95 numaralı izolat ise *Pichia dryadoides* olarak tanımlanmıştır. *Cryptococcus* genusuna ait izolat numaraları ve türler; 9, 34, 35, 36, 38, 58, 61, 62 ve 100 numaralı izolatlar *Cryptococcus albidus*, 15 numaralı izolat *Cryptococcus hungaricus*, 24 numaralı izolat *Cryptococcus ater*, 40 numaralı izolat ise *Cryptococcus flavus* olarak tanımlanmıştır. *Pseudozyma* genusuna ait izolatlar ve türler; 25, 27 ve 30 numaralı izolatlar *P. aphidis*, 8 numaralı izolat *P. antarctica* olarak tanımlanmıştır. 11 ve 20 numaralı izolatlar *Williopsis* genusunun *W. saturnus* türü; 54, 56, 57, 59, 65, 67, 68, 72, 79, 81, 83, 84, 92 ve 97 numaralı izolatlar *Kondoa* genusunun *K. malvinella* türü; 63, 66, 71, 74 ve 77 numaralı izolatlar *Sporobolomyces* genusunun *S. lactosus* türü; 75 ve 99 numaralı izolatlar *Rhodospiridium* genusunun *R. lusitanae* türü; 28 ve 31 numaralı izolat *Stephanoascus* genusunun *S. smithiae* türü; 47 numaralı izolat

Saccharomyces genusunun *S. cerevisiae* türü; 49 numaralı izolat *Schizosaccharomyces* genusunun *S. pombe* türü olarak tanımlanmıştır. Mayaların izole edildiği kaynaklara göre genus ve türlerin dağılımı Çizelge 4.6’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İzolatların Tanılanmasında Kullanılan Testler (Barnett et al., 2000)

F1	D-Glukoz Fermentasyonu	C10	Sükroz Asimilasyonu
F2	D-Galaktoz Fermentasyonu	C11	Maltoz Asimilasyonu
F3	Maltoz Fermentasyonu	C12	α,α -Trehaloz Asimilasyonu
F4	Me- α -D-Glukozid Fermentasyonu	C13	Me- α -D-Glukozid Asimilasyonu
F5	Sükroz Fermentasyonu	C14	Sellobioz Asimilasyonu
F6	α,α -Trehaloz Fermentasyonu	C15	Salisin Asimilasyonu
F7	D-Ksiloz Fermentasyonu	C16	Arbutin Asimilasyonu
F8	Melibioz Fermentasyonu	C17	Melibioz Asimilasyonu
F9	Laktoz Fermentasyonu	C18	Laktoz Asimilasyonu
F10	Sellobioz Fermentasyonu	C19	Rafinoz Asimilasyonu
F11	Melezitoz Fermentasyonu	C20	Melezitoz Asimilasyonu
F12	Rafinoz Fermentasyonu	C21	İnulin Asimilasyonu
F13	İnulin Fermentasyonu	C22	Nişasta Asimilasyonu
F14	Nişasta Fermentasyonu	C23	Gliserol Asimilasyonu
C1	D-Glukoz Asimilasyonu	C24	Eritritol Asimilasyonu
C2	D-Galaktoz Asimilasyonu	C25	Ribitol Asimilasyonu
C3	L-Sorboz Asimilasyonu	C26	Ksilitol Asimilasyonu
C4	D-Glukozamin Asimilasyonu	C27	L-Arabinitol Asimilasyonu
C5	D-Riboz Asimilasyonu	C28	D-Glunitol Asimilasyonu
C6	D-Ksiloz Asimilasyonu	C29	D-Mannitol Asimilasyonu
C7	L-Arabinöz Asimilasyonu	C30	Galaktitol Asimilasyonu
C8	D-Arabinöz Asimilasyonu	C31	myo-İnositol Asimilasyonu
C9	L-Ramnoz Asimilasyonu	C32	D-Glukano1,5Lactone Asimilasyonu
C33	2-Keto-D-Gluconat Asimilasyonu	V5	Tiamin’siz Büyüme
C34	5-Keto-D-Glukonat Asimilasyonu	V6	Biotin ve Tiamin’siz Büyüme
C35	D-Glukonat Asimilasyonu	V7	Pridoksin’siz Büyüme
C36	D-Glukoronat Asimilasyonu	V8	Pridoksin ve Tiamin’siz Büyüme
C37	D-Galakturnik Asit Asimilasyonu	V9	PABA’siz Büyüme
C38	DL-Laktat Asimilasyonu	V10	Niasin’siz Büyüme
C39	Süksinat Asimilasyonu	T1	25°C’de Büyüme
C40	Sitrat Asimilasyonu	T2	30°C’de Büyüme
C41	Metanol Asimilasyonu	T3	35°C’de Büyüme
C42	Etanol Asimilasyonu	T4	37°C’de Büyüme
C43	Propan 1,2-diol Asimilasyonu	T5	40°C’de Büyüme
C44	Butan 2,3-diol Asimilasyonu	T6	42°C’de Büyüme
C45	Kuinik Asit Asimilasyonu	O1	%0,01 Sikloheksimid Büyüme
N1	Nitrat Asimilasyonu	O2	%0,1 Sikloheksimid Büyüme
N2	Nitrit Asimilasyonu	O3	%1 Asetik Asit’te Büyüme
N3	Etilamin Asimilasyonu	O4	%50 D-Glukoz’da Büyüme
N4	L-Lizin Asimilasyonu	O5	%60 D-Glukoz’da Büyüme
N5	Kadaverin Asimilasyonu	O6	%10 NaCl’de Büyüme
N6	Kreatin Asimilasyonu	O7	%16 NaCl’de Büyüme
N7	Kreatinin Asimilasyonu	E1	Nişasta Oluşumu
N8	D-Glukozamin Asimilasyonu	E2	Asetik Asit Üretimi
N9	İmidazol Asimilasyonu	E3	Üre Hidrolizi
N10	D-Triptofan Asimilasyonu	E4	DBB Reaksiyonu
V1	Vitaminsiz Büyüme	M1	Pembe Koloni
V2	myo-İnositol’süz Büyüme	M2	Tomurcuklanma
V3	Pantotenat’siz Büyüme	M3	Filament Oluşumu
V4	Biotin’siz Büyüme	M4	Septat Hif

C: Karbon Kaynağı N: Azot Kaynağı M: Morfolojik Karakteristikler

T: Sıcaklık V: Vitamin O: Osmotik Basınç E: Ekstra Karakteristikler

Çizelge 4.3. Glukozu fermente eden mayaların tayin anahtarı (Barnett et al., 2000)

TESTLER	NEGATİF	POZİTİF
1 Maltoz Asimilasyonu	2	530
2 Etilamin Asimilasyonu	3	187
3 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	4	152
4 Niasin'siz Büyüme	5	38
38 D-Galaktoz Asimilasyonu	39	97
97 30°C'de Büyüme	98	105
105 Rafinoz Asimilasyonu	106	136
136 Asetik Asit Üretimi	137	<i>Dekkera anomola</i> <i>Dekkera bruxellensis</i>
137 Salicin Asimilasyonu	138	151
138 Mellibiyoz Asimilasyonu	139	150
150 L-Lisin Asimilasyonu	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
187 %0.1 Sikloheksimid'de Büyüme	188	422
188 Pridoksin'siz büyüme	189	234
234 D-Glukozamin Asimilasyonu	235	405
235 Rafinoz Asimilasyonu	236	376
376 % 10 NaCl'de Büyüme	377	388
377 Tomurcuklanma	378	379
378 D-Gluktiol Asimilasyonu	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Dipodascus magnusii</i>
530 Eritritol Asimilasyonu	531	960
531 %0.1 Sikloheksimid'de Büyüme	532	827
532 Sellobiyoz Asimilasyonu	533	656
544 Asetik asit üretimi	<i>Candida ernobii</i> <i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Dekkera anomola</i> <i>Dekkera bruxellensis</i>
656 Pridoksin'siz Büyüme	657	692
692 %10 NaCl'de Büyüme	693	735
693 Nitrit Asimilasyonu	694	718
718 Propan 1,2-diol Asimilasyonu	719	725
719 30° C'de Büyüme	720	722
722 Kuinik Asit Asimilasyonu	723	724
723 Sitrat Asimilasyonu	544	724
725 D triptofan	726	732
732 Sükroz Fermentasyonu	<i>Pichia biospora</i>	733
733 Rafinoz Fermentasyonu	734	<i>Williopsis saturnus</i>
734 Melezitoz Asimilasyonu	<i>Williopsis pratensis</i>	<i>Candida vartiovaarae</i>
735 Tiamin'siz Büyüme	736	758

Çizelge 4. 3.(Devam)

758 D triptofan	759	819
819 Kuinik asit Asimilasyonu	820	824
820 Laktoz Asimilasyonu	821	<i>Candida intermedia</i>
821 5-Keto-D-Glukanat Asimilasyonu	822	<i>Candida natalensis</i>
822 Tomurcuklanma	<i>Pichia burtonii</i>	823
827 L-Ramnoz Asimilasyonu	828	942
828 D-Galaktoz Asimilasyonu	829	854
854 Rafinoz Asimilasyonu	855	916
916 Niasin'siz Büyüme	917	919
919 Nitrat Asimilasyonu	920	940
940 D Glukitol Asimilasyonu	941	<i>Candida valdiviana</i>
941 % 50 Glukoz'da büyüme	<i>Dekkera anomala</i> <i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Candida versatilis</i>
942 D galaktoz Asimilasyonu	943	947
947 D galaktronik Asit Asimilasyonu	948	958
958 Nitrat Asimilasyonu	959	<i>Pichia holstii</i>
960 Nitrat Asimilasyonu	961	1046
961 Tiamin'siz Büyüme	962	990
990 Biotin'siz Büyüme	991	1034
1034 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	1035	1043
1035 Galaktitol Asimilasyonu	1036	1041
1041 Sükroz Fermentasyonu	<i>Candida shehatae</i>	1042
1042 L sorboz Asimilasyonu	<i>Candida gotoi</i>	<i>Pichia heimii</i>
1046 Biotin ve Tiaminsiz Büyüme	1047	1058
1047 %0,01 Sikloheksimid'de Büyüme	1048	1051
1051 Rafinoz Asimilasyonu	1052	1057
1052 Butan 2,3 diol Asimilasyonu	1053	1056
1053 Laktoz Asimilasyonu	1054	<i>Candida chilensis</i>
1054 D- Galakturonik Asit Asimilasyonu	1055	<i>Candida incommunis</i>
1055 40 °C'de Büyüme	<i>Ambrosiozyma platypodis</i>	<i>Pichia angusta</i>
1057 D-triptofan Asimilasyonu	<i>Arxula adenivorans</i>	<i>Stephanoascus smithiae</i>

Çizelge 4.4. Glukozu fermente edemeyen mayaların tayin anahtarı (Barnett et al., 2000)

TESTLER	NEGATİF	POZİTİF
1 Nitrat Asimilasyonu	2	952
2 Üre Hidrolizi	3	621
3 Sükroz Asimilasyonu	4	360
4 Eritritol Asimilasyonu	5	312
312 % 0,01 Sikloheksimid'de Büyüme	325	353
325 % 60 D-Glukoz'da Büyüme	<i>Candida ernobii</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
360 Eritritol Asimilasyonu	361	552
361 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	362	492
362 %10 NaCl'de Büyüme	363	417
363 Filamentöz	364	387
387 D-Galaktoz Asimilasyonu	388	408
408 myo-İnositol Asimilasyonu	409	415
409 Pembe koloni	410	<i>Kondoa malvinella</i>
410 L-Ramnoz Asimilasyonu	411	<i>Candida tenuis</i>
411 Mellibiyoz Asimilasyonu	412	<i>Candida glabrosa</i>
552 Pridoksin'siz-Tiamin'siz Büyüme	<i>Nadsonia fulvescens</i>	<i>Candida suecica</i>
621 Blastokonidia	622	896
622 D-Glukozamin 'de büyüme	623	861
623 Maltoz Asimilasyonu	624	714
714 Tomurcuklanma	715	845
715 D-Glukuronat Asimilasyonu	716	737
716 Nişasta oluşumu	717	729
717 PABA'SIZ Büyüme	718	721
721 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	722	728
722 Pirodoksin'siz büyüme	<i>Rhodotorula auriculariae</i>	723
737Sükroz Asimilasyonu	738	753
738 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	739	752
739 D-Galaktruronik Asit Asimilasyonu	740	749
740 D-Galaktoz Asimilasyonu	<i>Candida ernobii</i> <i>Metschnikowia bicuspidata</i>	741
741 L-Ramnoz Asimilasyonu	742	<i>Candida tenuis</i> <i>Pichia guilliermondii</i>

Çizelge 4.4. (Devam)

742 D-Glukozamin'de büyüme	743	<i>Metschnikowia lunata</i> <i>Pichia guilliermondii</i>
743 37 °C'de Büyüme	744	<i>Pichia guilliermondii</i> <i>Metschnikowia lunata</i>
749 Kuinik Asit Asimilasyonu	751	<i>Filobasidium capsuligenum</i>
751 Nitrit Asimilasyonu	<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
753 Kuinik Asit Asimilasyonu	754	820
820 Laktoz Asimilasyonu	821	831
831 5-Keto-D-Glukonat Asimilasyonu	832	836
832 L-Ramnoz Asimilasyonu	833	834
834 Nitrat Asimilasyonu	<i>Cryptococcus ater</i>	835
862 Etilamin'de büyüme	862	873
862 Sükroz Asimilasyonu	863	864
864 Tomurcuklanma	865	866
866 Buds on stalk	867	869
867 Eritriol Asimilasyonu	868	<i>Cryptococcus flavus</i>
868 Mellibiyoz Asimilasyonu	<i>Tremella indecorata</i> <i>Tremella moriformis</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Tremella indecorata</i>
952 Üre Hidrolizi	953	1020
953 D-Glukuronat Asimilasyonu	954	1004
954 %0,01 Sikloheksimid'de Büyüme	955	984
955 Propan-2,3 diol Asimilasyonu	956	971
956 DBB Reaksiyonu	957	967
957 %16 NaCl'de büyüme	958	964
958 L-Sorboz Asimilasyonu	959	963
959 Methanol Asimilasyonu	960	<i>Pichia henricii</i>
960 D-Galaktoz Asimilasyonu	961	<i>Sporobolomyces lactosus</i>
961 DL-Laktat Asimilasyonu	962	<i>Candida norvegica</i>
962 Kuinik Asit Asimilasyonu	<i>Candida ernobii</i>	<i>Bensingtonia ciliata</i>
967 Sükroz Asimilasyonu	968	970
970 25 °C'de Büyüme	<i>Mrakia frigida</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
971 DBB Reaksiyonu	972	982
972 Melezitoz Asimilasyonu	973	977
977 Pembe koloni	978	<i>Kondoa malvinella</i>
978 Rafinoz Asimilasyonu	979	<i>Pichia petersonii</i>
979 D-Triptofan'da büyüme	980	<i>Pichia bispora</i>
984 Methanol Asimilasyonu	985	999

Çizelge 4.4. (Devam)

985 Filamentöz	986	993
986 %16 NaCl'de büyüme	987	992
987 37 °C'de Büyüme	988	991
991 Eritriol Asimilasyonu	<i>Pichia dryadoides</i>	<i>Pichia angusta</i>
1004 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	1005	1014
1005 D-Triptofan'da büyüme	1006	1011
1006 %16 NaCl'de büyüme	1007	1010
1007 Tomurcuklanma	Tausonia pamirica	1008
1008 D-Mannitol Asimilasyonu	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Cryptococcus vishniacii</i>	1009
1009 Laktoz Asimilasyonu	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Cryptococcus antarcticus</i>	<i>Cryptococcus albidisimilis</i> <i>Cryptococcus albidus</i>
1011 25°C'de Büyüme	1012	1013
1013 Sükroz Asimilasyonu	<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
1020 Blastokonidia	1021	1144
1021 Sükroz Asimilasyonu	1022	1048
1022 Nişasta oluşumu	1023	1044
1023 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	1024	1041
1024 Kuinik Asit Asimilasyonu	1025	1032
1025 30°C'de Büyüme	1026	1030
1026 Buds on stalks	1027	1028
1027 α -α Trehaloz Asimilasyonu	<i>Leucosporidium antarcticum</i>	1028
1028 Propan 1,2 diol büyüme	<i>Rhodotorula sonckii</i>	<i>Kondoa malvinella</i>
1030 D-Mannitol Asimilasyonu	<i>Sporobolomyces lactosus</i>	1031
1031 D-Riboz Asimilasyonu	<i>Kondoa malvinella</i>	<i>Rhodospiridium lusitaniae</i>
1032 Pembe kolola ni	1033	1039
1033 Kreatinin'de büyüme	1034	1037
1034 Mellibiyoz Asimilasyonu	1035	<i>Rhodotorula javanica</i>
1048 Eritriol Asimilasyonu	1049	1119
1049 myo-İnositol Asimilasyonu	1050	1101
1050 D-Glukuronat Asimilasyonu	1051	1079
1051 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	1052	1074
1052 Pridoksin'siz-Tiamin'siz Büyüme	1053	1062
1062 Pembe koloni	1063	1064

Çizelge 4.4.(Devam)

1063 Ethanol Asimilasyonu	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Rhodotorula hennulea</i>	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Rhodotorula pilatii</i>
1101 25°C’de Büyüme	1102	1106
1106 2-Keto-D-Glukonat Asimilasyonu	1107	1108
1108 D-Glukozamin Asimilasyonu	1109	1118
1109 Kuinik Asit Asimilasyonu	1110	1111
1110 Pembe koloni	<i>Cryptococcus albidus</i> <i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	<i>Cystofilobasidium bispordii</i> <i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>
1118 Mellibiyoz Asimilasyonu	<i>Filobasidium floriforme</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>
1119 D-Glukozamin Asimilasyonu	1120	1136
1136 D-Glukarat Asimilasyonu	1137	1143
1143 %0,1 Sikloheksimid’de Büyüme	<i>Pseudozyma aphidis</i>	<i>Pseudozyma rugulosa</i>

Çizelge 4.5. Pembe koloni oluşturan mayaların tayin anahtarı (Barnett et al., 2000)

TESTLER	NEGATİF	POZİTİF
1 Nitrat Asimilasyonu	2	157
2 Blastokonidia	3	103
3 Eritriol Asimilasyonu	4	84
4 myo-İnositol Asimilasyonu	5	67
67 Etanol Asimilasyonu	68	76
76 Sükroz Asimilasyonu	77	78
78 L Ramnoz Asimilasyonu	79	82
79 D-Galaktoz Asimilasyonu	<i>Rhodotorula bacarum</i>	80
80 Galaktitol Asimilasyonu	81	<i>Cryptococcus hungaricus</i> <i>Cryptococcus laurentii</i>
157 D-Glukoronat Asimilasyonu	158	210
158 Blastokonidia	159	192
159 D-Glukarat Asimilasyonu	160	184
160 Pridoksin'siz-Tiamin'siz Büyüme	161	169
161 Eritritol Asimilasyonu	162	168
162 Tomurcuklanma	163	167
163 D-Riboz Asimilasyonu	164	165
164 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	<i>Kondoa malvinella</i> <i>Rhodotorula bacarum</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>
169 2-Keto-D-Glukonat Asimilasyonu	170	177
177 Sükroz Asimilasyonu	178	180
178 %0,1 Sikloheksimid'de Büyüme	179	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
179 Vitamin'siz büyüme	<i>Kondoa malvinella</i>	<i>Rhodotorula araucariae</i>
184 Melezitöz Asimilasyonu	185	186
186 myo-İnositol Asimilasyonu	187	<i>Cystofilobasidium infirmo-miniatum</i>
187 L-Ramnoz Asimilasyonu	188	191
188 Pridoksin'siz-Tiamin'siz Büyüme	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>	189
210 myo-İnositol Asimilasyonu	211	227
211 PABA'sız büyüme	212	217
217 Kuinik Asit Asimilasyonu	218	222
222 Eritritol Asimilasyonu	223	226
223 Pridoksin'siz ve Tiamin'siz büyüme	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> <i>Rhodotorula glutinis</i>	224

Çizelge 4.6. Mayaların izole edildiği kaynaklara göre genus ve türlerin dağılımı

Örnek	İzolat numaraları	İzolatın Genus ve Türü
1	1	<i>Pichia bispora</i>
1	46	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
1	47	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1	49	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
2	2, 6, 10	<i>Candida glabrosa</i>
2	3	<i>Pichia burtonii</i>
2	4	<i>Pichia angutsa</i>
2	5	<i>Candida suecica</i>
2	7	<i>Rhodotorula auriculariae</i>
2	8	<i>Pseudozyma antarctica</i>
2	9	<i>Cryptococcus albidus</i>
2	11, 20	<i>Willopsis saturnus</i>
2	12	<i>Candida vartiovaarae</i>
2	14	<i>Candida ernobii</i>
2	15	<i>Cryptococcus hungaricus</i>
2	16	<i>Candida versitalis</i>
3	13, 43	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
3	25	<i>Pseudozyma aphidis</i>
3	40	<i>Cryptococcus flavus</i>
3	41, 48	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
3	42	<i>Candida ernobii</i>
3	44	<i>Rhodotorula javanica</i>
3	45	<i>Pichia petersonii</i>
3	49	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
4	17, 19, 29, 32, 50	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
4	18, 21, 51	<i>Rhodotorula auriculariae</i>
4	22	<i>Candida chilensis</i>
4	23, 39	<i>Pichia angutsa</i>
4	24	<i>Cryptococcus ater</i>
4	26	<i>Pichia heimii</i>
4	27, 30	<i>Pseudozyma aphidis</i>
4	28, 31	<i>Stephanoascus smithiae</i>
4	34, 35, 36, 38	<i>Cryptococcus albidus</i>
4	37	<i>Pichia holstii</i>
5	52	<i>Rhodotorula sonckii</i>

Çizelge 4.6. (Devam)

Örnek	İzolat numaraları	İzolatın Genus ve Türü
5	53	<i>Rhodotorula javanica</i>
5	54, 56, 57, 59	<i>Kondoa malvinella</i>
5	55	<i>Rhodotorula auriculariae</i>
5	58	<i>Cryptococcus albidus</i>
5	60	<i>Pichia guilliermondii</i>
6	61, 62, 100	<i>Cryptococcus albidus</i>
6	65, 67, 79, 83, 92	<i>Kondoa malvinella</i>
6	69	<i>Candida natalensis</i>
6	74, 77	<i>Sporobolomyces lactosus</i>
6	78	<i>Candida ernobii</i>
6	82, 85, 88	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
6	95	<i>Pichia dryadoides</i>
6	96	<i>Rhodotorula glutinis</i>
7	63, 66, 71	<i>Sporobolomyces lactosus</i>
7	64, 94	<i>Rhodotorula javanica</i>
7	68, 72, 81, 84, 97	<i>Kondoa malvinella</i>
7	70	<i>Candida ernobii</i>
7	73, 76, 80, 86, 87, 89, 90, 93	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
7	75,99	<i>Rhodosporidium lusitaniae</i>
7	91	<i>Pichia angutsa</i>
7	98	<i>Candida ernobii</i>

4.3. İzole Edilen Mayaların Sistematik Kategorileri

Alexopoulos et al. (1996) mayaları askomisetik, basidiomisetik ve deuteromisetik mayalar adı altında üç grupta incelemiştir. Askomisetik mayalar *Saccharomycetales* ordosu ve *Saccharomycetaceae* ve *Dipodascaceae* familyası altında incelenmektedir. Barnett et al. (2000) ise askomisetik mayaları, *Archiascomycetes*, *Saccharomycetes* ve *Hemiascomycetes* sınıfları altında toplamıştır. Bu bağlam da, izole edilen türlerin sistematiği de hem Alexopoulos et al. (1996) hem de Barnett et al. (2000) göre yapılmıştır. İzolatların sistematik kategorileri Çizelge 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İzole edilen mayaların sistematik kategorileri (Barnett et al., 2000)

Kingdom : <i>Fungi</i>	
Phylum 1 : <i>Ascomycota</i>	
Classis 1 : <i>Ascomycetes</i>	
Ordo : <i>Saccharomycetales</i>	
Familya : <i>Saccharomycetaceae</i>	
Genus 1 : <i>Pichia</i>	Genus 2 : <i>Willopsis</i>
Species 1 : <i>angusta</i>	Species 1 : <i>saturnus</i>
Species 2 : <i>bispora</i>	Genus 3 : <i>Saccharomyces</i>
Species 3 : <i>burtonii</i>	Species 1 : <i>cerevisiae</i>
Species 4 : <i>dryadoides</i>	Genus 4 : <i>Stephanoascus</i>
Species 5 : <i>guilliermondii</i>	Species 1 : <i>smithiae</i>
Species 6 : <i>heimii</i>	
Species 7 : <i>holstii</i>	
Species 8 : <i>petersonii</i>	
Classis 2 : <i>Archiascomycetes</i>	
Ordo : <i>Schizosaccharomycetales</i>	
Familya : <i>Schizosaccharomycetaceae</i>	
Genus 1 : <i>Schizosaccharomyces</i>	
Species 1 : <i>pombe</i>	

Çizelge 4.8. İzole edilen mayaların sistematik kategorileri (Barnett et al., 2000)

Kingdom : <i>Fungi</i>		
Phylum 2 : <i>Basidiomycota</i>		
Classis 1 : <i>Basidiomycetes</i>	Classis 2 : <i>Urediniomycetes</i>	
Ordo : <i>Sporidiales</i>	Ordo : <i>Sporidiales</i>	
Familya : <i>Sporidiaceae</i>	Familya : <i>Sporidiobolaceae</i>	
Genus : <i>Rhodosporidium</i>	Genus : <i>Sporobolomyces</i>	
Species : <i>lusitaniae</i>	Species : <i>lactosus</i>	
Classis 3 : <i>Agaricostilbomycetes</i>	Classis 4 : <i>Ustilaginomycetes</i>	
Ordo : <i>Agaricostilbales</i>	Ordo : <i>Ustilaginales</i>	
Familya : <i>Agaricostilbaceae</i>	Familya : <i>Ustilaginaceae</i>	
Genus : <i>Kondoa</i>	Genus : <i>Pseudozyma</i>	
Species : <i>malvinella</i>	Species : <i>aphidis</i>	
Phylum 3 : <i>Deuteromycota</i>		
Classis: <i>Deuteromycetes</i>		
Ordo: <i>Cryptococcales</i>		
Familya : <i>Cryptococcaceae</i>		
Genus 1: <i>Cryptococcus</i>	Genus 2: <i>Rhodotorula</i>	Genus 3 : <i>Candida</i>
Species 1 : <i>albidus</i>	Species 1: <i>auriculariae</i>	Species 1 : <i>chilensis</i>
Species 2: <i>ater</i>	Species 2: <i>aurantiaca</i>	Species 2 : <i>ernobii</i>
Species 3: <i>flavus</i>	Species 3: <i>glutinis</i>	Species 3 : <i>glaebosa</i>
Species 4: <i>hungaricus</i>	Species 4: <i>javanica</i>	Species 4 : <i>natalensis</i>
	Species 5: <i>sonckii</i>	Species 5 : <i>suecica</i>
		Species 6 : <i>versatilis</i>

4.4. Tanılanan İzolatların Dahil Olduğu Genusların Özellikleri

4.4.1. *Candida* genusunun özellikleri

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler ovoid, silindirik, elongat şekildedir. Bazı türleri pseudomisel oluştururken bazı türlerinde misel mevcuttur. Genellikle inositol pozitif olan strainler pseudomisel oluşturur. Askus ve askospor oluşumu gözlenmemektedir. Üreaz aktivitesi, şekerlerin fermentasyonu ve nitrat asimilasyonu türlere göre değişmektedir. DBB test sonucu negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987 ; Frazier and Westhoff, 1988; Wolf,1996; Barnett et al., 1983, 2000).

5, 6, 10, 12, 14, 16, 22, 42, 70, 78, 96 ve 98 numaralı izolatlar *Candida* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.2. *Cryptococcus* genusunun özellikleri

Vejetatif hücrelerde tomurcuklanma görülür. Genellikle polisakkarit kapsül bulunur. Bazen septat hif ve pseudohif oluşturabilirler. Eşeyli üreme görülmemiştir. Karotenoid pigment üretmezler. Şekerleri fermente edemezler. Tek karbon kaynağı olarak myo-inositol'ü kullanırlar. Nitrat asimilasyonu pozitif veya negatif olabilir. Üre hidrolizi genellikle pozitif olup DBB reaksiyonu da pozitif sonuç verir. Hücre duvarının bileşenlerinden birisi de ksilozdur (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder ve Kregervan Rij, 1952; Wickerham ve Burton, 1962; Phaff et al., 1966 ; Lodder, 1970, Banwart, 1981; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987 ve Frazier ve Westhoff, 1988; Wolf, 1996; Barnett et al., 1983, 2000).

9, 24, 34, 35, 36, 38, 40, 58, 61, 62 ve 100 numaralı izolatlar *Cryptococcus* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.3. *Pichia* genusunun özellikleri

Multilateral tomurcuklanma ile çoğalan hücreler çeşitli şekillerdedir ve bazı türleri pseudomisel oluşturur. Askosporlar küresel, şapka veya satürn şeklindedir. Her askusta 1-4 (bazen daha fazla) askospor oluşur. Şekerlerin fermentasyonu türlere göre değişmektedir. Nitrat asimilasyonu, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder ve Kregervan Rij, 1952; Wickerham ve Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988; Wolf,1996; Barnett et al., 1983, 2000).

1, 3, 4, 23, 26, 33, 37, 39, 45, 60, 91 ve 95 numaralı izolatlar *Pichia* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.4. *Rhodotorula* genusunun özellikleri

Vejatatif hücreler multilateral tomurcuklanma ile çoğalır. Eşeyli üremeleri bilinmemektedir. Kırmızı, sarı ve turuncu renkte karotenoid pigment üretirler. Şekerleri fermente edemezler. Nişasta üretimi ile myo-inositol ve nitrat asimilasyonu türe bağlı olarak değişkenlik gösterir. Üre hidrolizi ve DBB reaksiyonu pozitifdir.Hücre polisakkaritlerinin bir bileşeni de ksilozdur (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987 ; Frazier and Westhoff, 1988; Wolf,1996; Barnett et al., 1983, 2000).

7, 13, 17, 18, 19, 21, 29, 32, 41, 43, 44, 46, 48, 50, 51, 52, 53, 55, 64, 73, 76, 80, 82, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 93, 94 ve 96 numaralı izolatlar *Rhodotorula* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.5. *Rhodospiridium* genusunun özellikleri

Eşeysiz üreme tomurcuklanma ile olur. Bazı türlerde pseudohif ve septat hif oluşumu gözlenir. Hayat devreleri *Leucosporidium* genusuna benzerdir. Eşeyli

üreme ile oluşturulan teliosporlar, lateral ya da terminalde sporidia taşıyan promisyumu şekillendirir. Kanca teşekkülü görülebilir. Çoğu türleri heterotalliktir. Sarı, turuncu ve kırmızı renklerinde karotenoid pigment üretirler. Şekerleri fermente etme yetenekeleri yoktur. Nitrat ve myo-inositol asimilasyonu ile nişasta üretimi türe bağlı olarak değişkenlik gösterir. Üre hidrolizi ve DBB test sonuçları pozitifdir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kregervan Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al.,1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987 ; Frazier and Westhoff, 1988; Wolf,1996; Barnett et al., 1983, 2000; Öztürk,2007).

75 ve 99 numaralı izolatlar *Rhodosporidium* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.5. Willopsiis genusunun özellikleri

Aseksüel çoğalma tomurcuklanma ile gerçekleşir. Bazı türler hif oluşturabilir. Her askusta 1-4 olan askosporlar şapka, satürn şeklindedir. Şekerlerin fermentasyonu pozitifdir. Nitrat, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988; Öztürk, 2007).

11 ve 20 numaralı izolatlar *Willopsiis* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.6. Kondoa genusunun özellikleri

Eşeysiz üreme tomurcuklanma ile olur. Bazı türlerde pseudohif ve septat hif oluşumu gözlenir. Şekerleri fermente edebilirler. Nitrat asimilasyonu, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

54, 56, 57, 59, 65, 67, 68, 72, 79, 81, 83, 84, 92 ve 97 numaralı izolatlar *Kondoa* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.7. *Stephanoascus* genusunun özellikleri

Vejatatif üreme tomurcuklanma ile gerçekleşmektedir. Üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir. Şekerleri fermente etme yetenekeleri yoktur (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

75 ve 99 numaralı izolatlar *Stephanoascus* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.8. *Saccharomyces* genusunun özellikleri

Ascomycetlerde askosporlar eşeyli çoğalma ile oluşur. Her ascusta 4 olan askosporlar düz, yuvarlak ya da oval şeklindedir. *Saccharomyces*'lerin tipik özellikleri nitrat kullanamamaları ve karbohidratları fermente edebilmeleridir. Bu cinsin üyeleri gıda sanayisinde çok önemlidirler. Üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

47 numaralı izolat *Saccharomyces* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.9. *Schizosaccharomyces* genusunun özellikleri

Schizosaccharomyces hücreleri ana hücrenin ortasında bir septum oluşumu ile iki şeit parçaya ayrılarak çoğalırlar. Şekerleri fermente edebilirler. Nitrat asimilasyonu, üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et

al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

49 numaralı izolat *Schizosaccharomyces* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.4.10. *Sporobolomyces* genusunun özellikleri

Bazen septat hif ve pseudohif oluşturabilirler. Eşeyli üreme görülmemiştir. Şekerleri fermente etme yetenekleri yoktur. Üreaz ve DBB reaksiyonları negatiftir (Wickerham, 1951,1952, 1970; Lodder and Kreger van Rij, 1952; Wickerham and Burton, 1962; Phaff et al., 1966; Lodder, 1970; Banwart, 1981; Barnett et al.,1983; Kreger van Rij, 1984; Beneke and Stevenson, 1987; Frazier and Westhoff, 1988).

63, 66, 71, 74 ve 77 numaralı izolatlar *Sporobolomyces* genusunun özelliklerini göstermiştir.

4.5. Fenotipik Olarak Tanılanan İzolatların Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Elde edilen 100 izolatın morfolojik ve fizyolojik özellikleri Çizelge 4.9, 4.10, 4.11,4.12 ve 4.13 'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. 1- 20 arası fenotipik olarak tanımlanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
FERMANTASYON	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D-Glukoz	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Me- α -D-Glukozid	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Sükroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α,α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellobioz	+	+	Z	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	-	-	+	+	-	-	-	+	Z	Z	Z	-	+	Z	+	+	+	+	+	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON																				
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	+	+	+	+	Z	Z	Z	-	+	+	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	+
L-Sorboz	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
D-Glukozamin	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
D-Riboz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
D-Ksiloz	-	-	+	+	-	-	-	+	Z	Z	Z	-	+	Z	+	+	+	+	+	-
L-Arabinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
D-Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
L-Rhamnoz	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sükroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	Z	Z	+	+	Z	Z	Z	+	+	Z	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	+
α,α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Me α -D-Glukozid	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Sellobioz	+	+	Z	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z
Salisin	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	+	-	-	-	+	+	-	-	Z	-	-	-	Z	-	-	-	+	-	-
Rafinoz	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	Z	Z	+	+	;	+	+	+	+	+
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol	+	-	+	+	Z	-	Z	Z	+	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	-	-	-	+	+	-	Z	-	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ksilitol	Z	Z	Z	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
L-Arabinitol	-	-	-	+	+	-	Z	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
D-Glusitol	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
D-Mannitol	-	-	+	+	Z	-	Z	Z	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	Z
D-Galaktilol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z
myo-Inositol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Glukano 1,5 Lakton	-	-	+	+	+	-	-	Z	Z	-	+	+	+	Z	+	Z	+	-	+	Z
2-keto-D-Glukonat	-	Z	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

Çizelge 4.10.(Devam)

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
ASİMİLASYON	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	+	z	-	z	-	-	-	-	-	z	-	-	-	-	z	z	+	-	-	z
Rafinoz	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	z	-	+	-	-	-
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niştasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol	z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z
Eritritol	-	-	z	z	z	-	z	z	z	z	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksilitol	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Arabinitol	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
D-Glucitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktitol	+	+	z	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+
myo-Inositol	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukano 1,5 Lakton	-	+	+	+	z	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
2-keto-D-Glukonat	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
5-keto-D-Glukonat	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Glukonat	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Glukronat	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
D-Galakturonik Asit	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
DL-Lactat	-	-	-	+	+	-	-	z	-	-	-	-	-	z	-	-	-	z	-	-
Suksinat	-	+	+	+	+	z	+	+	z	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	z	-	-	-	-	-	-	+	-
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Propan-1,2 diol	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Butan-2,3 diol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuinek Asit	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Nitrat	-	+	+	-	+	-	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Nitrit	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Etilamin	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
L-Lizin	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	z	z	-	+	+	+	-
Kadaverin	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	z	z	-	+	+	+	-
Kreatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukozamin	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
İmidazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Triptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BÜYÜME																				
Vitamin'siz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
myo-Inositol'süz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pantotenat'sız	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotin'siz	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Tiamin'siz	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.10. (Devam)

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
BÜYÜME	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Biotin ve Tiamin'siz	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Piridoksin'siz	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Niasin'siz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PABA'sız	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 °C'de	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 °C'de	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 °C'de	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
42 °C'de	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
45 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0,01 Sikloheksimid	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
% 0,1Sikloheksimid	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
BÜYÜME																				
%1 Asetik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%50 D–Glukoz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
%60 D–Glukoz	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
%10 NaCl	-	z	z	z	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
%16 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK KARAKTERLER																				
Nişasta Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre Hidrolizi	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
DBB Reaksiyonu	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MORFOLOJİ																				
Pembe Koloni	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Filament Oluşumu	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
Septat hif	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-

+ : Pozitif - : Negatif

z: Yavaş ve zayıf büyüme

Çizelge 4.11. 41-60 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
FERMANTASYON	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D-Glukoz	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Me- α -D-Glukozid	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α,α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Laktoz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellobioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON																				
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	+	z	+	-	+	z	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
L-Sorboz	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-Glukozamin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Riboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	z	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinoz	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
L-Rhamnoz	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Maltoz	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α,α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Me α -D-Glukozid	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sellobioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Laktoz	z	+	+	-	+	-	z	-	-	-	+	z	+	z	z	z	z	z	z	z
Rafinoz	+	z	+	z	z	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	-	-	+
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol	+	+	+		-	+	+	+	+	+	-	-	z	+	+	-	z	z	-	-
Eritritol	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ksilitol	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	z	z	+	+	z	z	z	+	-
L-Arabinitol	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	z	-	-	+	+	z	-	-	-	-
D-Glusitol	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktitol	-	-	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Çizelge 4.11.(Devam)

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
ASİMİLASYON	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D-Glukano 1,5 Lakton	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	-	z	+	+	-	-	-	-	-
2-keto-D-Glukonat	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5-keto-D-Glukonat	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
D-Glukonat	-	-	-	+	-	z	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
D-Glukronat	-	-	-	+	-	z	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
D-Galakturnik Asit	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
DL-Lactat	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	z	-	-	-	-	-	-
Suksinat	+	-	-	+	z	z	z	z	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
Sitrat	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	z	z	+	z	+	-	-
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propan-1,2 diol	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butan-2,3 diol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuiniik Asit	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Nitrit	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Etilamin	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	z	z	z	+	-
L-Lizin	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kadaverin	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Kreatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukozamin	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İmidazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Triptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BÜYÜME																				
Vitamin'siz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
myo-İnositol'süz	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pantotenat'sız	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotin'siz	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Tiamin'siz	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Biotin ve Tiamin'siz	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Piridoksin'siz	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Niasin'siz	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PABA'sız	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 °C'de	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
37 °C'de	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
40 °C'de	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
42 °C'de	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0,01 Sikloheksimid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
% 0,1Sikloheksimid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
%1 Asetik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%50 D-Glukoz	+	-	+	z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	z	z	+	-
%60 D-Glukoz	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	z	-	-	-	-

Çizelge 4.11.(Devam)

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
BÜYÜME	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
%10 NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
%16 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK KARAKTERLER																				
Nişasta Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre Hidrolizi	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	z	+	+	+	+	+	+	+
DBB Reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-
MORFOLOJİ																				
Pembe Koloni	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Filament Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Septat hif	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : Pozitif - : Negatif

z: Yavaş ve zayıf büyüme

Çizelge 4.12. 61- 80 arası fenotipik olarak tanımlanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
FERMENTASYON	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
D-Glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Me- α -D-Glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Sükroz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α , α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellobioz	+	+	+	+	+	+	+	+	z	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON																				
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	-	-	+	-	z	-	-	+	z	-	-	+	-	z	+	-	-	-	+
L-Sorboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
D-Glukozamin	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Riboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
L-Rhamnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltoz	z	z	z	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+

Çizelge 4.12. (Devam)

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																		
BÜYÜME																			
Vitamin'siz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
myo-Inositol'süz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Pantotenat'sız	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Biotin'siz	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
Tiamin'siz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Biotin ve Tiamin'siz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Piridoksin'siz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Pridoksin ve Tiamin'siz	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Niasin'siz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PABA'sız	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
25 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 °C'de	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 °C'de	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
40 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0,01 Sikloheksimid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
% 0,1Sikloheksimid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
%1 Asetik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%50 D-Glukoz	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
%60 D-Glukoz	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
%10 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
%16 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK KARAKTERLER																			
Nişasta Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre Hidrolizi	-	-	+	+	+	+	+	+	z	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
DBB Reaksiyonu	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
MORFOLOJİ																			
Pembe Koloni	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Filament Oluşumu	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Septat hif	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-

+ : Pozitif - : Negatif

z: Yavaş ve zayıf büyüme

Çizelge 4.13. 81-100 arası fenotipik olarak tanılanan izolatların morfolojik ve fizyolojik test sonuçları

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
FERMANTASYON	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
D-Glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Me- α -D-Glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α , α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellobioz	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASİMİLASYON																				
D-Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galaktoz	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	Z	-	+	-	-	Z	-	-	-	-
L-Sorboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukozamin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
D-Riboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
L-Arabinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
D-Arabinoz	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Z	Z	-	-	-	Z	Z
L-Rhamnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sükroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltoz	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	Z	-	+	+	+	Z	-	Z	-	Z
α , α -Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Me α -D-Glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sellobioz	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	Z	Z	+	+
Melibioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	Z	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	Z	+	-
Rafinoz	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	Z	Z	+	-	-	-	+	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Ribitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksilitol	Z	+	Z	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Z	-	-	-	Z
L-Arabinitol	-	+	-	-	+	+	+	Z	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D-Mannitol	Z	-	Z	Z	+	-	+	-	+	+	+	Z	+	+	-		Z	Z	+	+
D-Galaktitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Çizelge 4.13. (Devam)

TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
ASİMİLASYON	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
D-Glukano 1,5 Lakton	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2-keto-D-Glukonat	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
5-keto-D-Glukonat	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
D-Glukonat	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
D-Glukronat	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
D-Galakturonik Asit	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
DL-Lactat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Suksinat	+	+	+	-	Z	+	Z	-	-	Z	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Sitrat	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Propan-1,2 diol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butan-2,3 diol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuinik Asit	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	+	+	Z	-	+	Z	+	Z
Nitrit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Etilamin	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Z	-	Z	Z
L-Lizin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kadaverin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	-	-	-	+	+
Kreatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukozamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İmidazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Triptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
BÜYÜME																				
Vitamin'siz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
myo-İnositol'süz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pantotenat'sız	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Biotin'siz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Tiamin'siz	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Biotin ve Tiamin'siz	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Piridoksin'siz	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Pridoksin ve Tiamin'siz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
Niasin'siz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PABA'sız	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
37 °C'de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
40 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45 °C'de	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0,01 Sikloheksimid	-	+	-	-	-	+	-	-	Z	-	-	-	Z	-	-	-	-	-	-	-
% 0,1Sikloheksimid	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%1 Asetik Asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%50 D-Glukoz	Z	+	Z	-	+	+	+	+	+	+	-	Z	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
%60 D-Glukoz	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.13. (Devam)

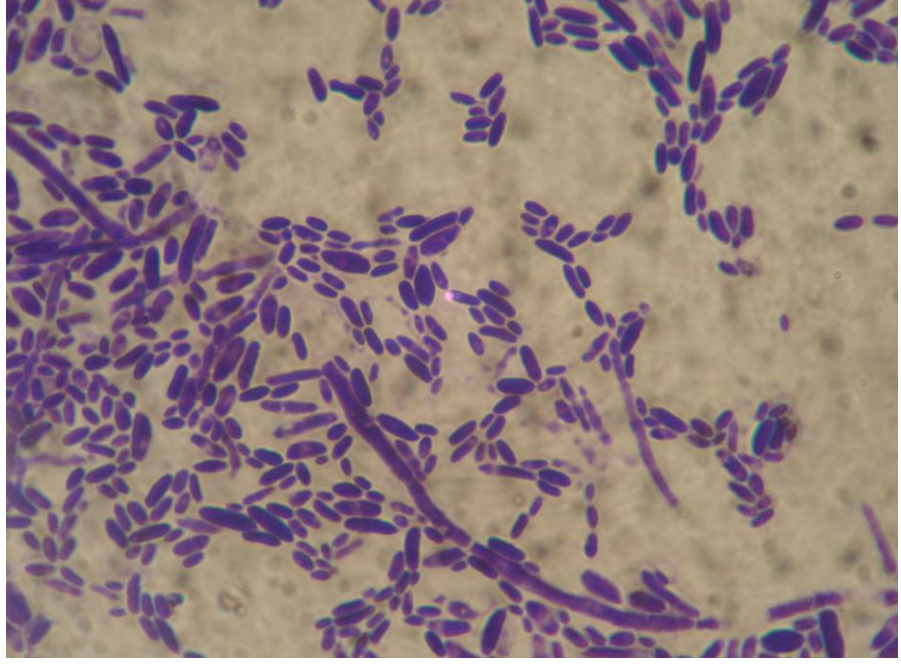
TESTLER	TANILANAN SUŞLARIN ÖZELLİKLERİ																			
BÜYÜME	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
%10 NaCl	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
%16 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EK KARAKTERLER																				
Nişasta Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asetik Asit Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	z	+	+	-	+	+	-	-	+
DBB Reaksiyonu	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
MORFOLOJİ																				
Pembe Koloni	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Tomurcuklanma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Filament Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Septat hif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-

+ : Pozitif - : Negatif

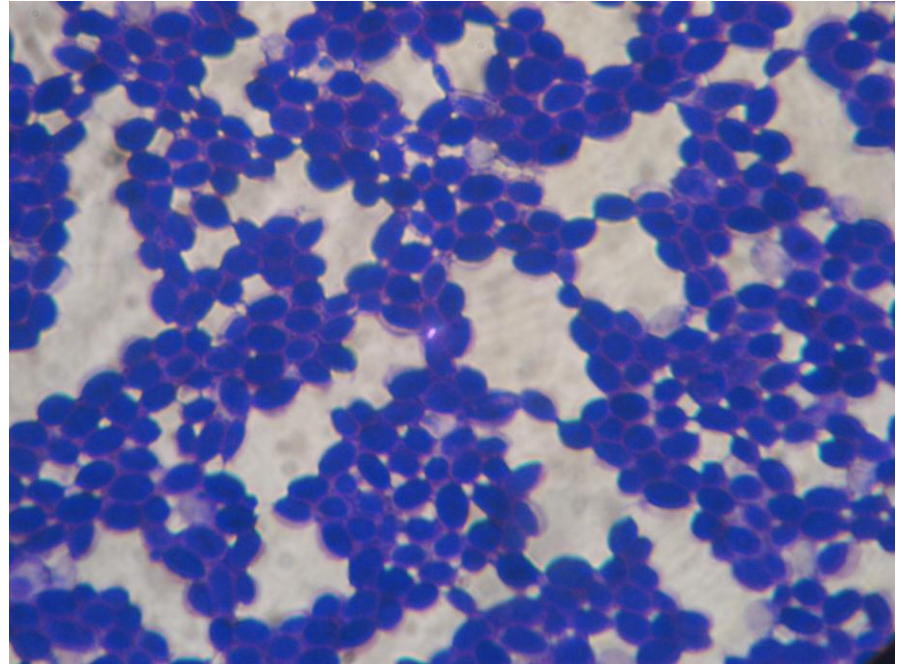
z: Yavaş ve zayıf büyüme

4.6. İzolatların Mikroskopik ve Makroskopik Fotoğrafları

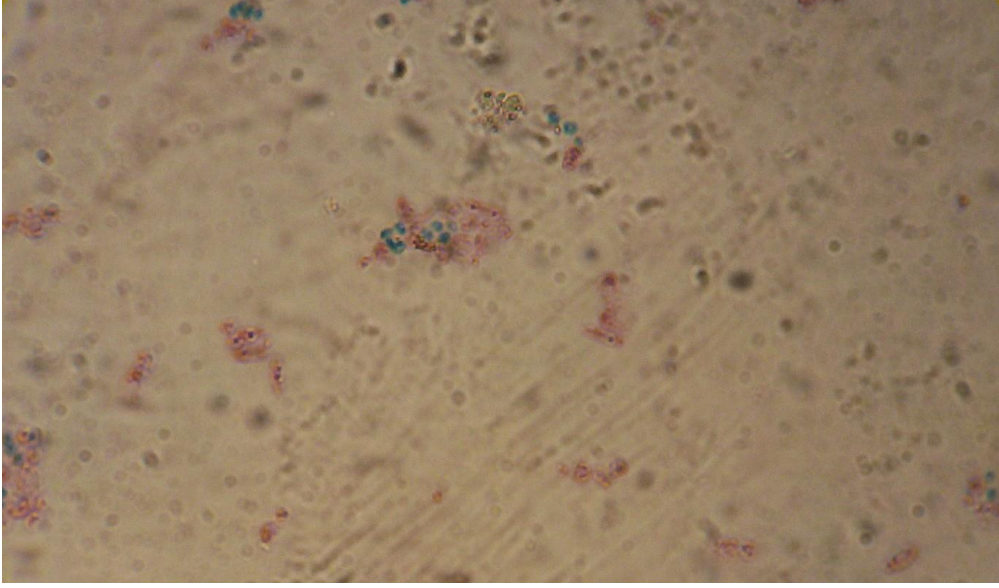
Tanımlanan 12 ve 45 numaralı izolatların vejetatif hücrelerinin görünümü, 12 numaralı izolatın askosporların genel görünümü yanı sıra 12 ve 45 numaralı izolatın genel koloni görünüşleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’de görülmektedir. İzolatların tanımlanmasında kullanılan D-glukoz fermentasyonu, DBB testi ile tanımlamada kullanılan bazı asimilasyon testlerine ait sonuçlar Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.18, 4.19 ve 4.20 ’de görülmektedir. Tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra da Şekil 4.9 ve 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 12 numaralı izolat olan *Pichia kudriavzeii*'nin MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'de 3 günlük görünümü (1000X)



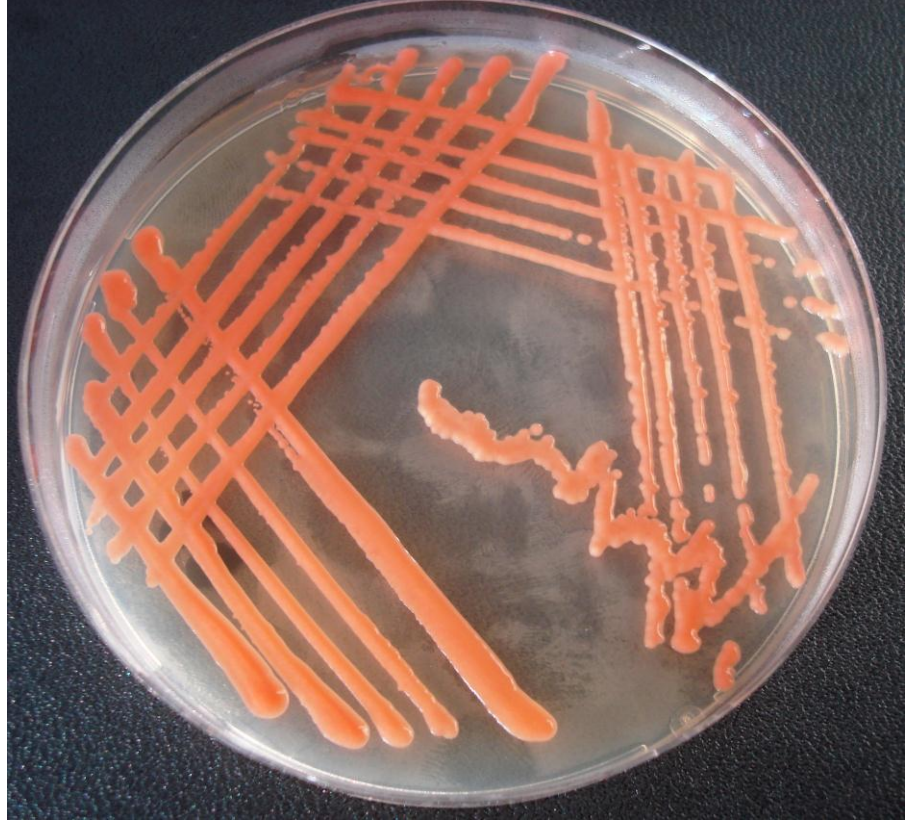
Şekil 4.2. 45 numaralı izolat olan *Rhodotorula mucilaginosa*'nın MYGP Broth'daki vejetatif hücrelerinin 27°C'de 3 günlük görünümü (1000X)



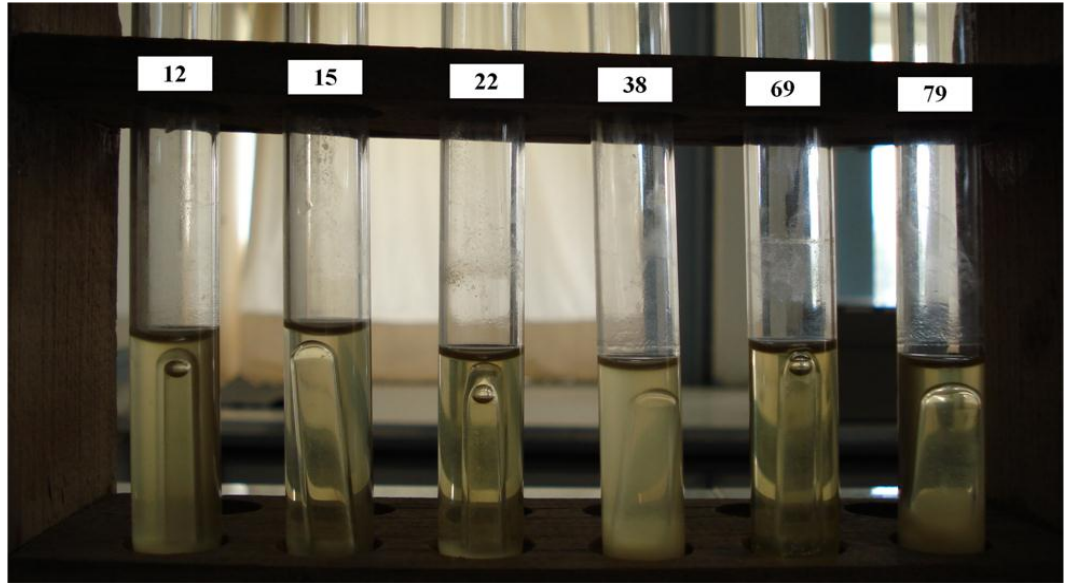
Şekil 4.3. 12 numaralı izolat olan *Pichia kudriavzeii*'nin Asetat Agar'da askosporlarının 27°C'de 15 günlük görünümü (1000X)



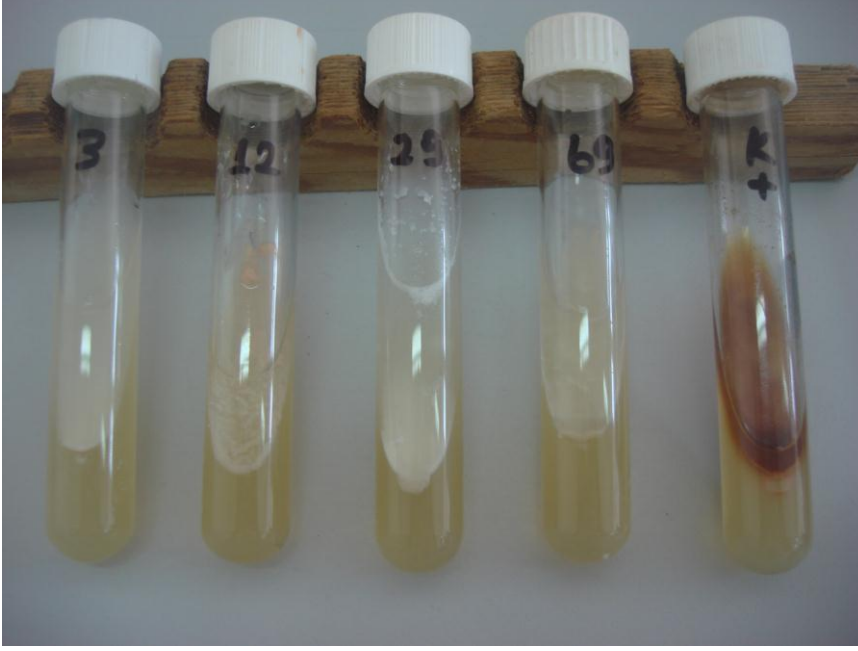
Şekil 4.4. 12 numaralı izolat olan *Pichia kudriavzeii*'nin MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü



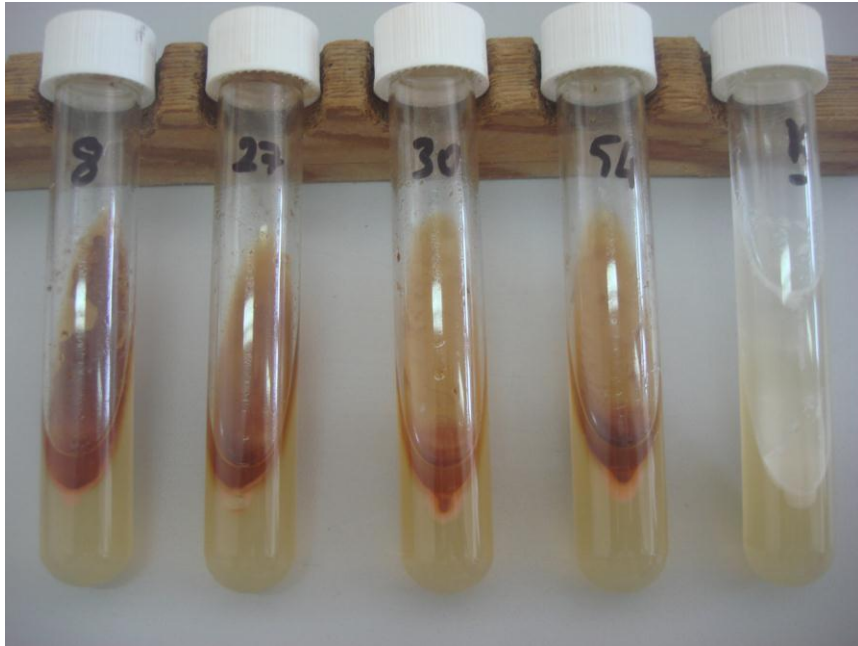
Şekil 4.5. 45 numaralı izolat olan *Rhotorula muciliginosa*'nın MYGP Agar'da 2 günlük genel koloni görünüşü



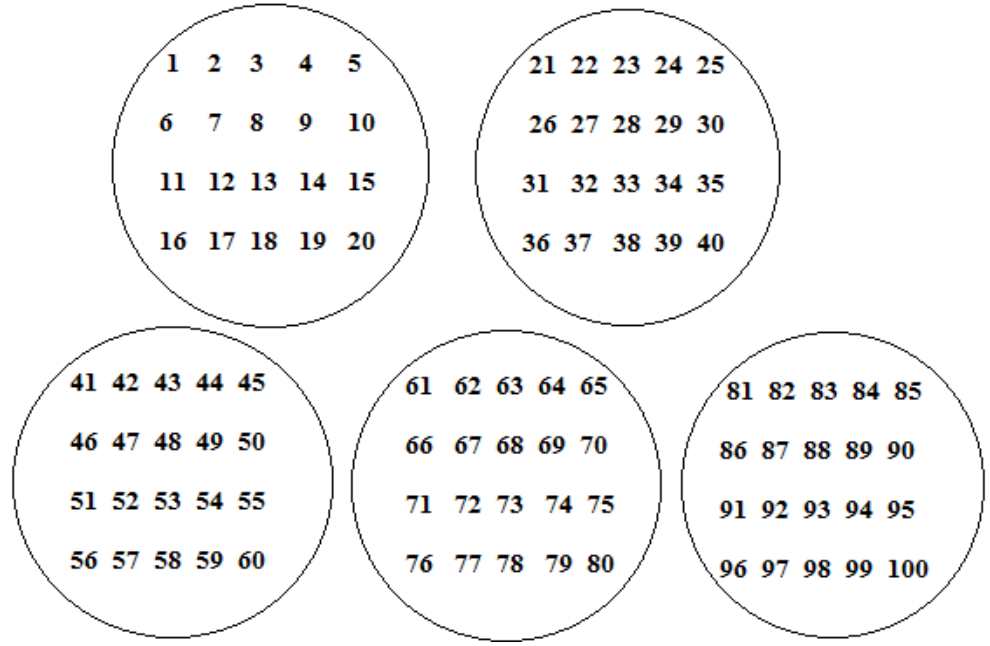
Şekil 4.6. D-Glukoz içeren Yeast Extract Broth'da 27°C'de 5 günlük fermentasyon testi



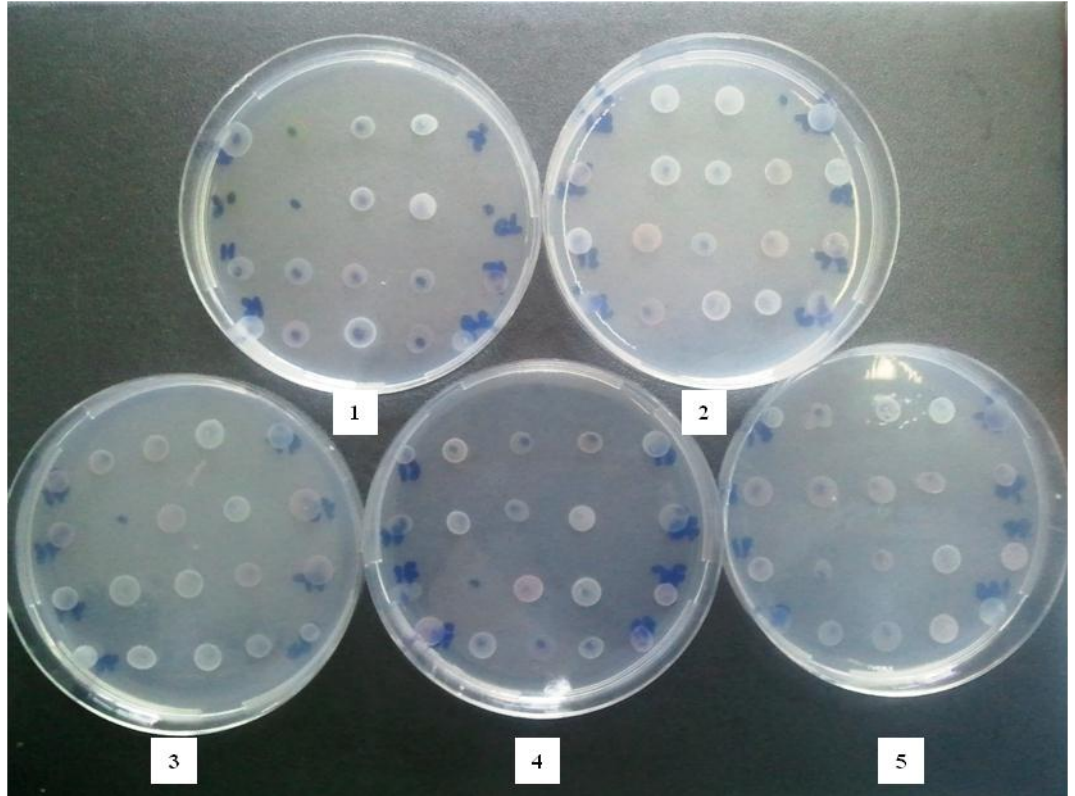
Şekil 4.7. Malt Yeast Glukoz Pepton Agar'da Askomisetik mayaların sonuçları ve pozitif kontrolün 27°C'de 10 günlük DBB testi



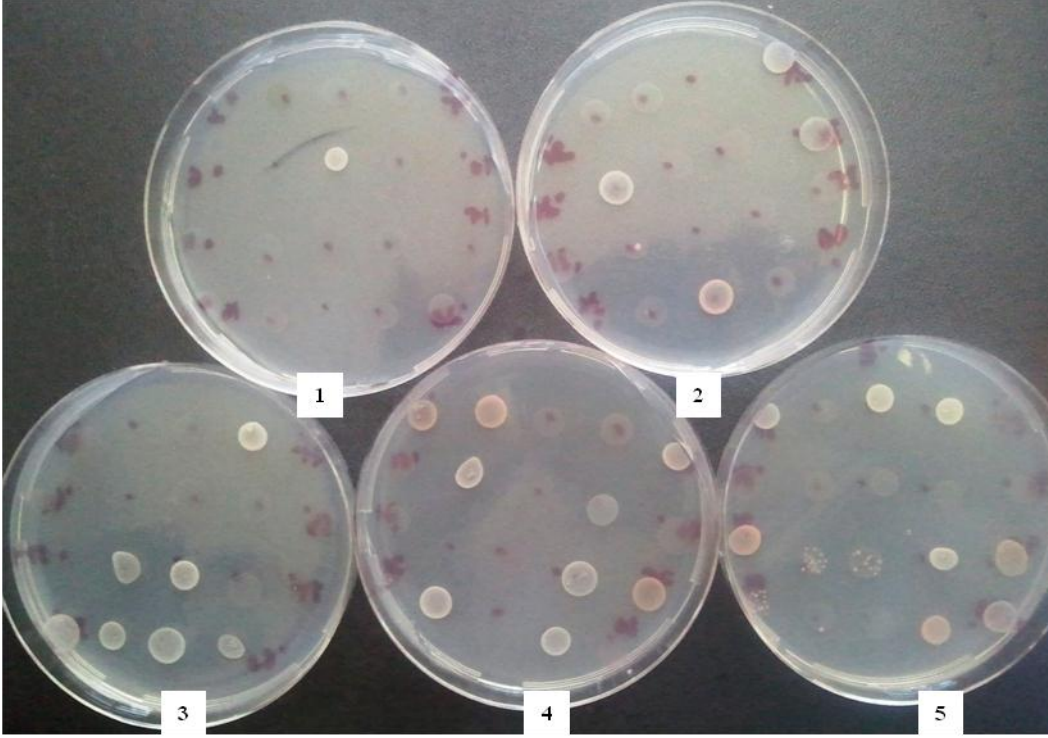
Şekil 4.8. Malt Yeast Glukoz Pepton Agar'da Basidiomisetik mayaların sonuçları ve negatif kontrolün 27°C'de 10 günlük DBB testi



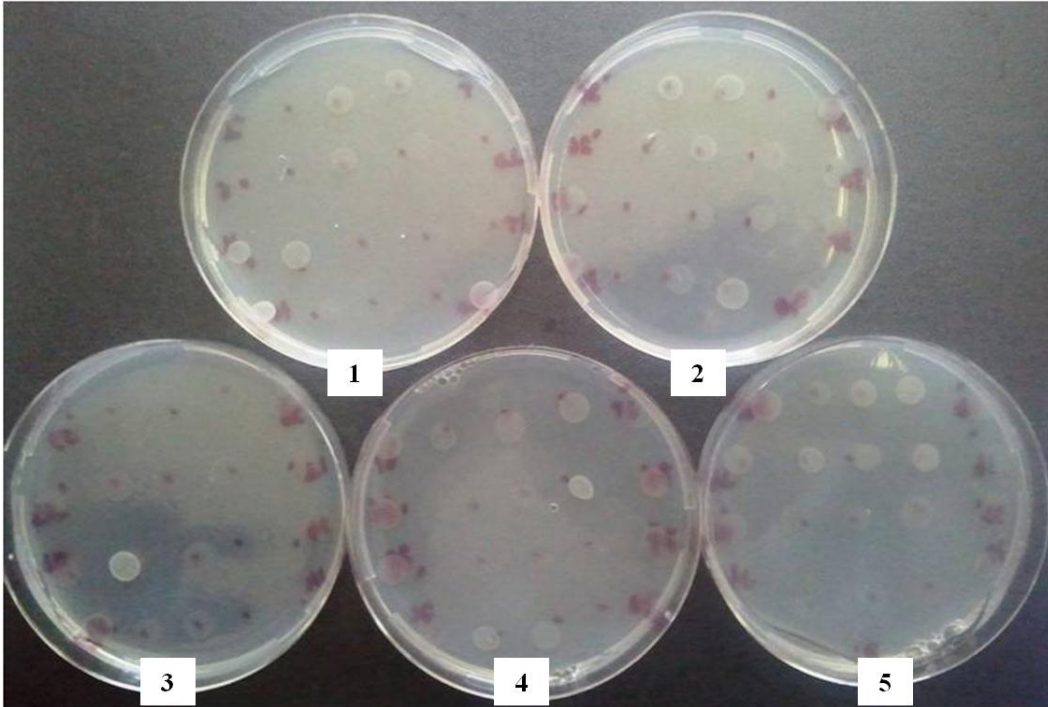
Şekil 4.9. Fenotipik tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra; 1-100 arası izolat numaraları



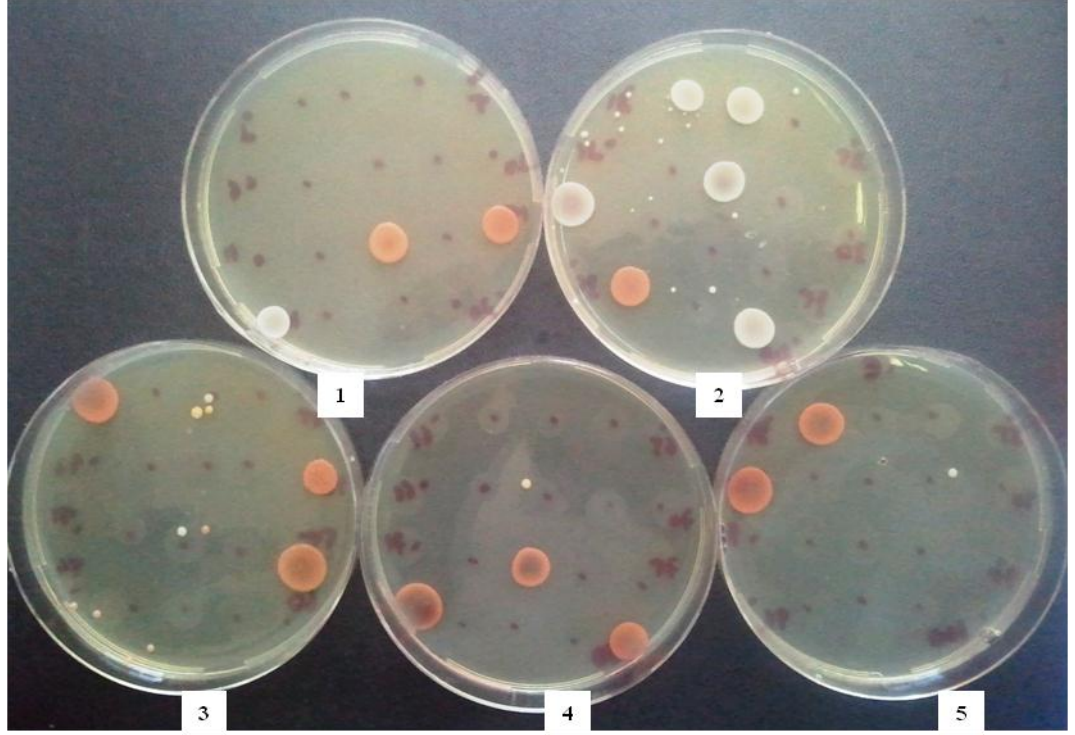
Şekil 4.10. N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü (Negatif kontrol)



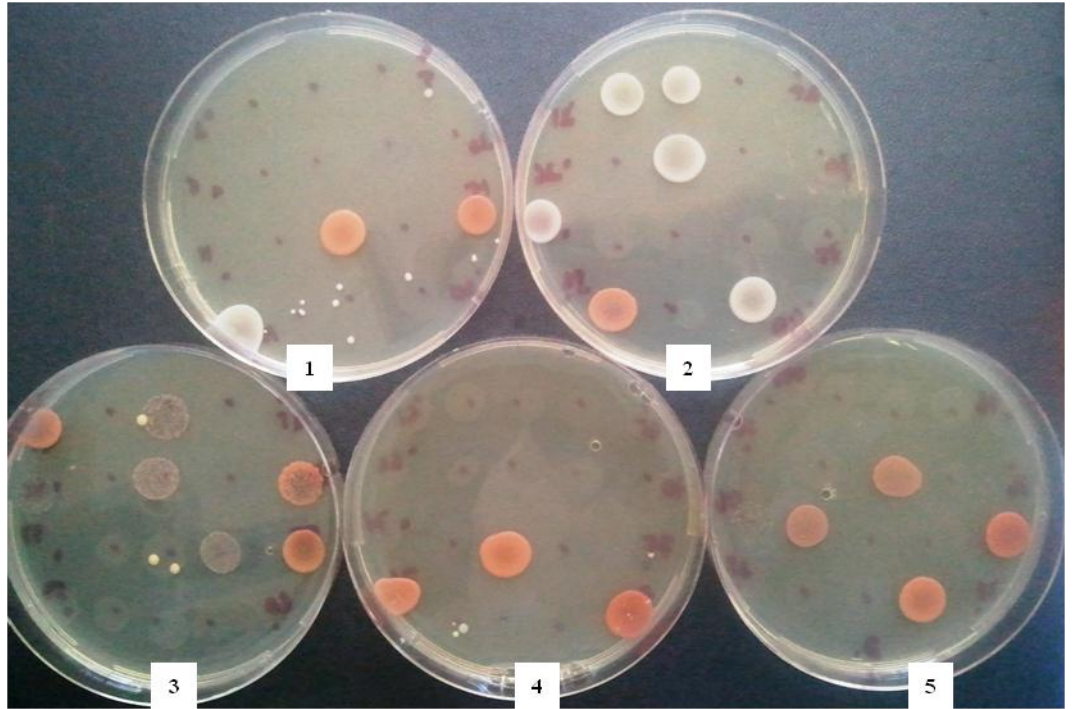
Şekil 4.11. 5-keto-D-Glukonat içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



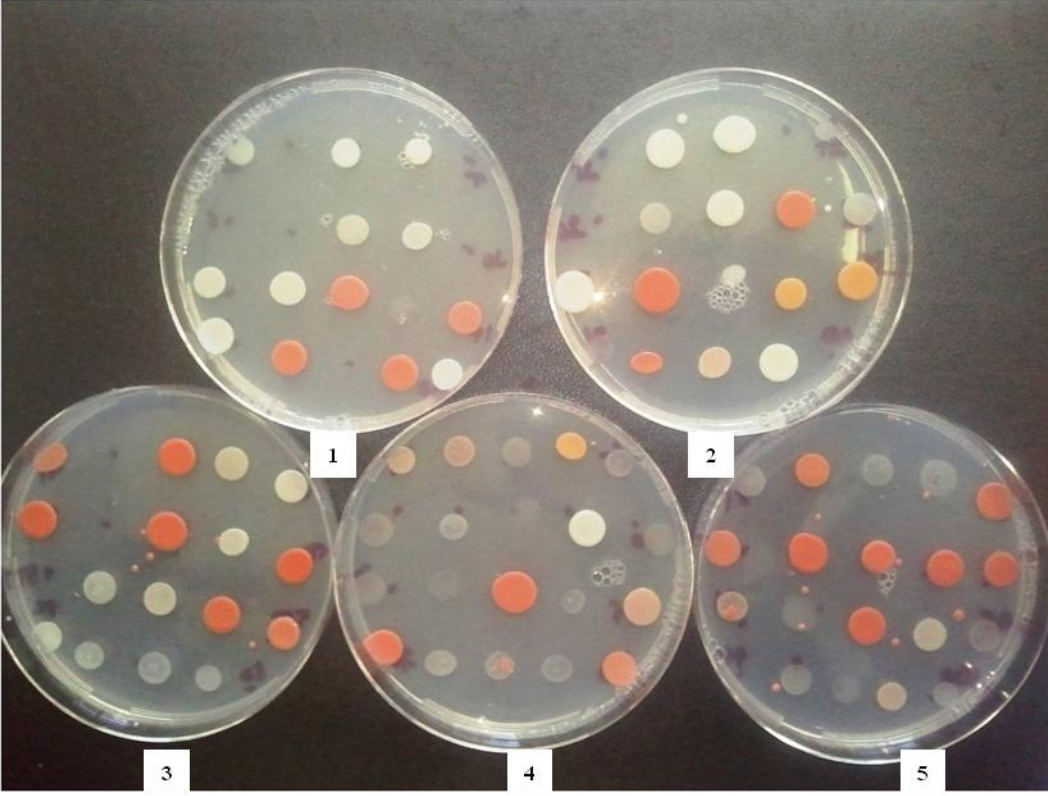
Şekil 4.12.D Glukozamin içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



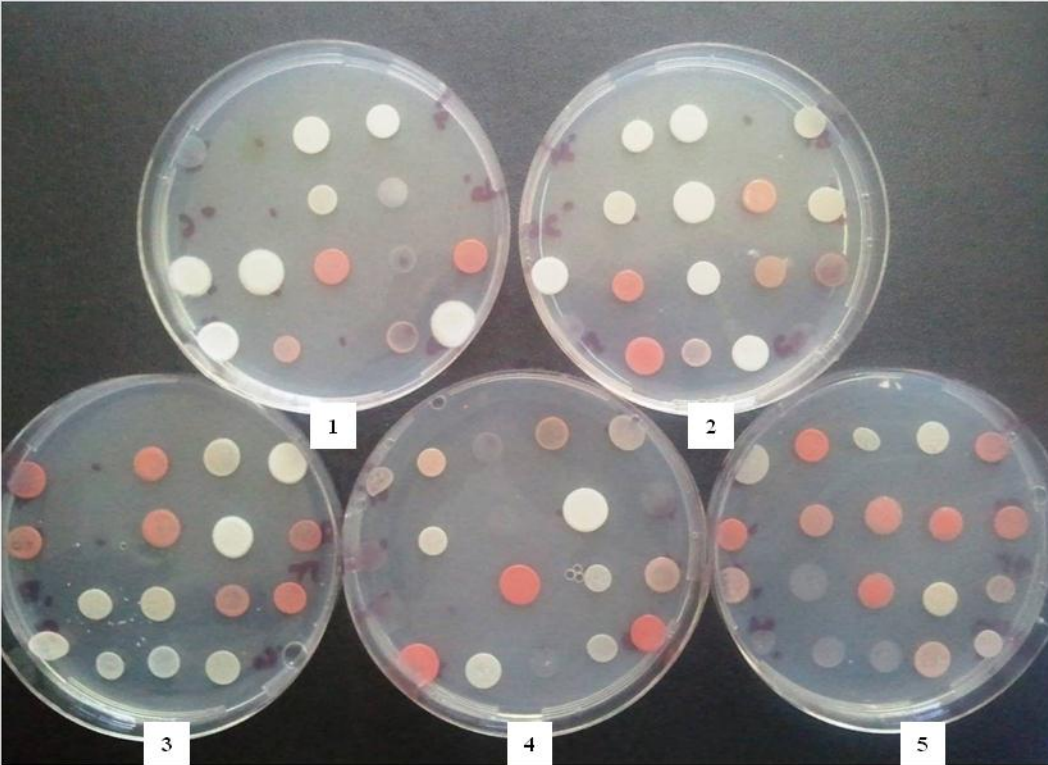
Şekil 4.13. % 0,1 Sikloheksimid içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



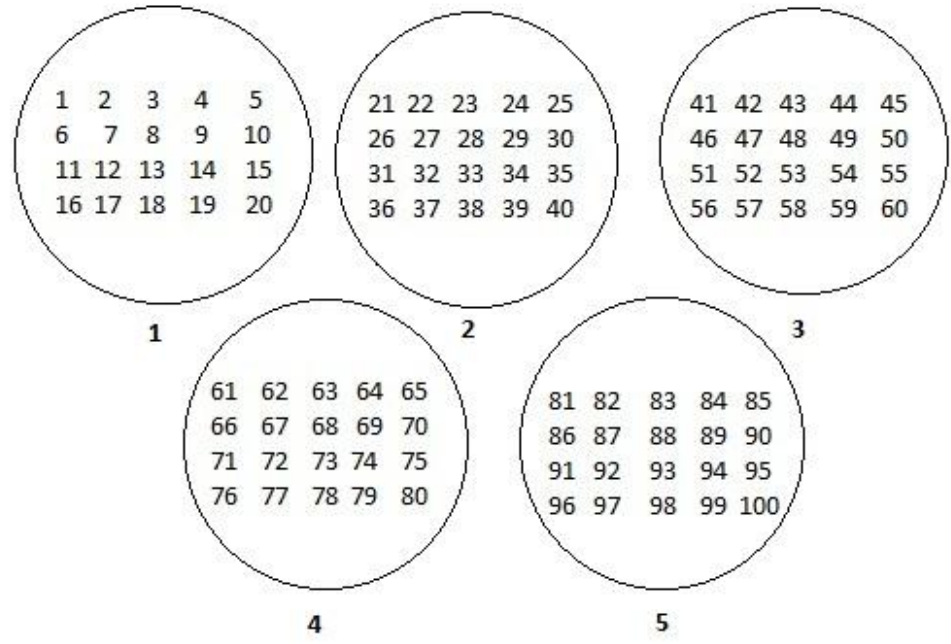
Şekil 4.14. %0,01 Sikloheksimid içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



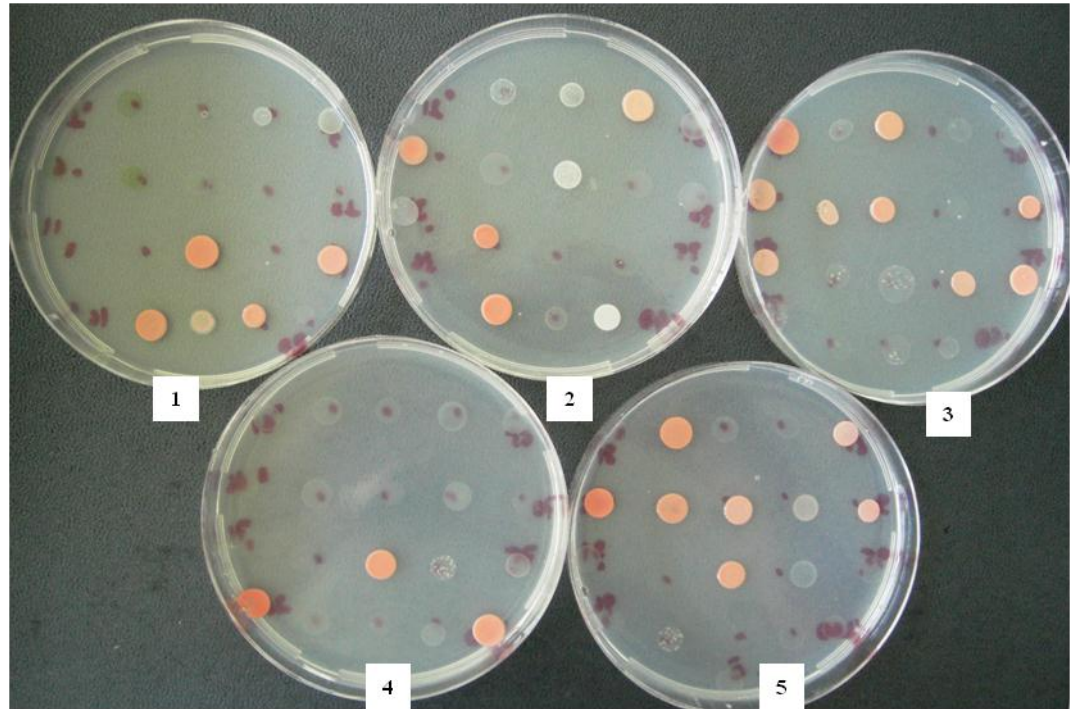
Şekil 4.15. Nitrat içeren C-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



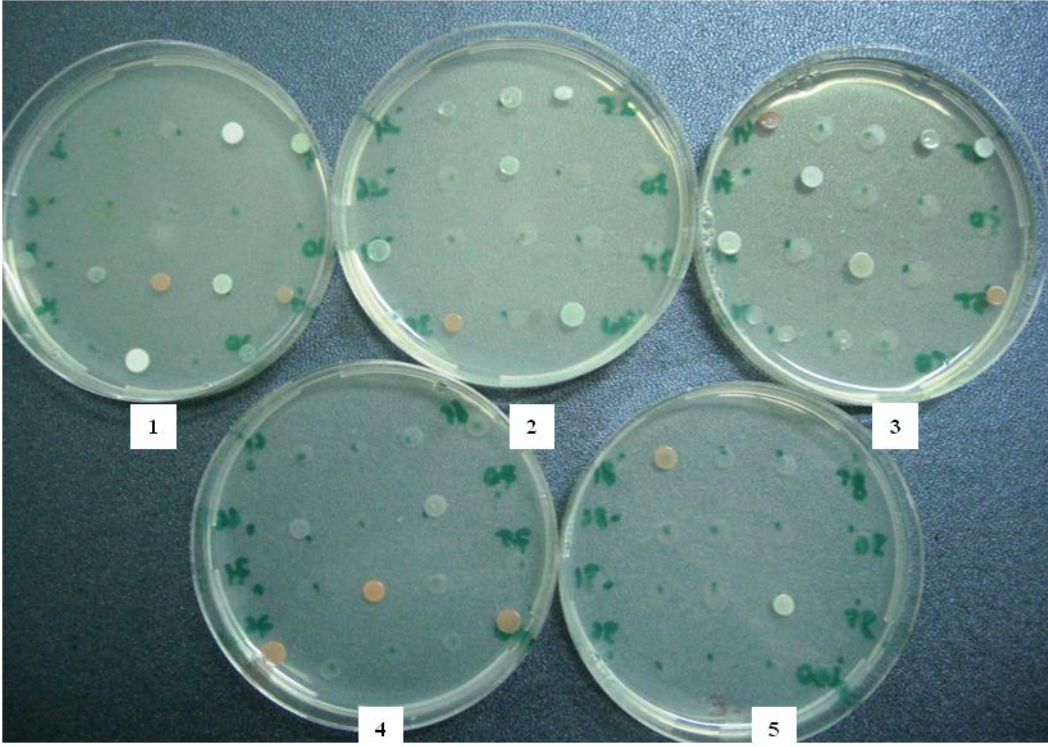
Şekil 4.16. Kadeverin içeren C-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



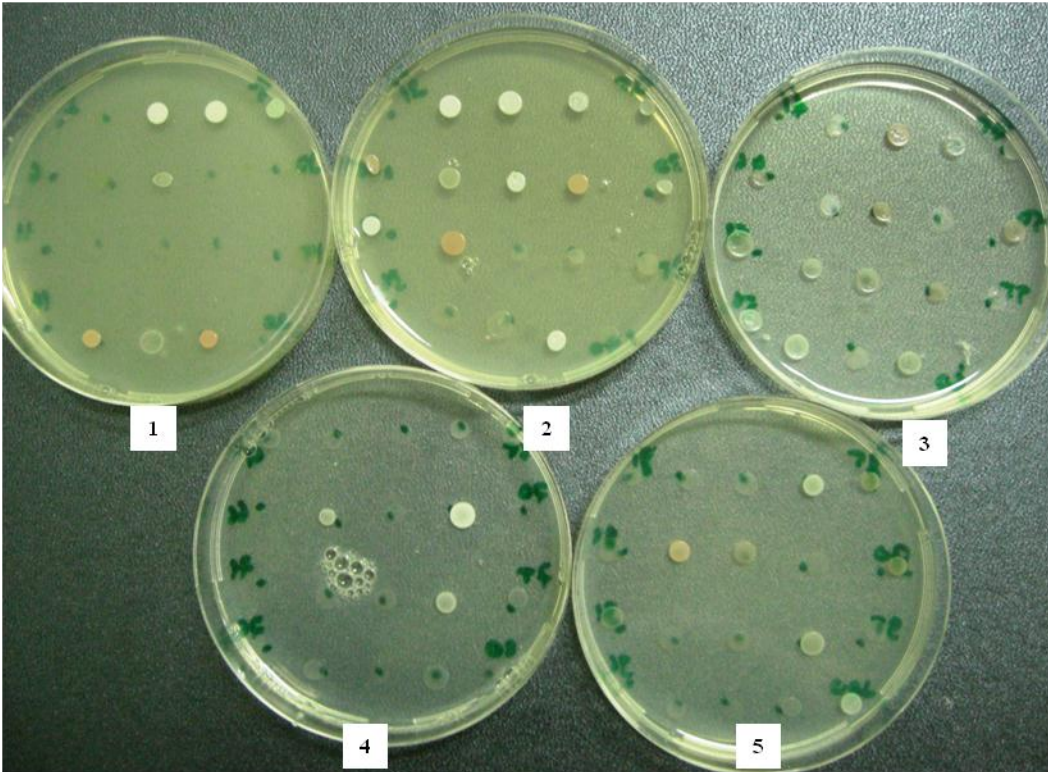
Şekil 4.17 Fenotipik tanılama testlerinde izolatların ekilmesinde izlenilen sıra; 1-100 arası izolat numaraları



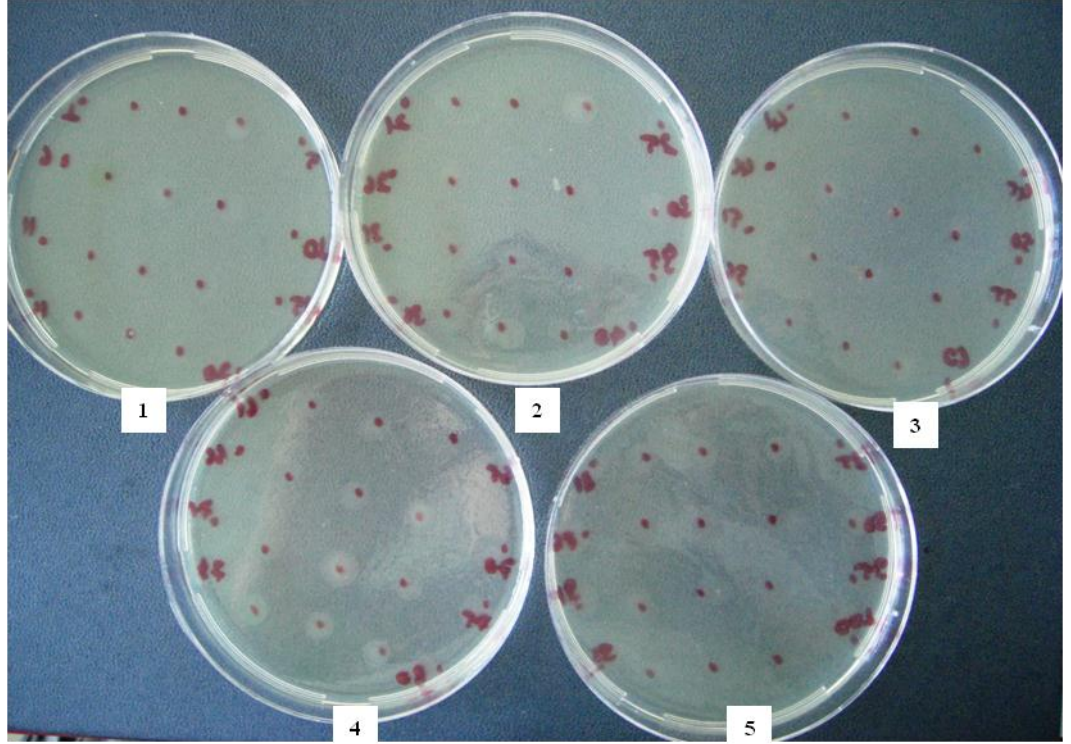
Şekil 4.18. L-arabinitol içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



Şekil 4.19. Me- α -D-Glukozid içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



Şekil 4.20. D-Glunitol içeren N-Base Agarda 27°C’de kolonilerin 2 günlük görünümü



Şekil 4.21. %16 NaCl içeren Yeast Ekstrakt Agarda 27°C’de kolonilerin 7 günlük görünümü

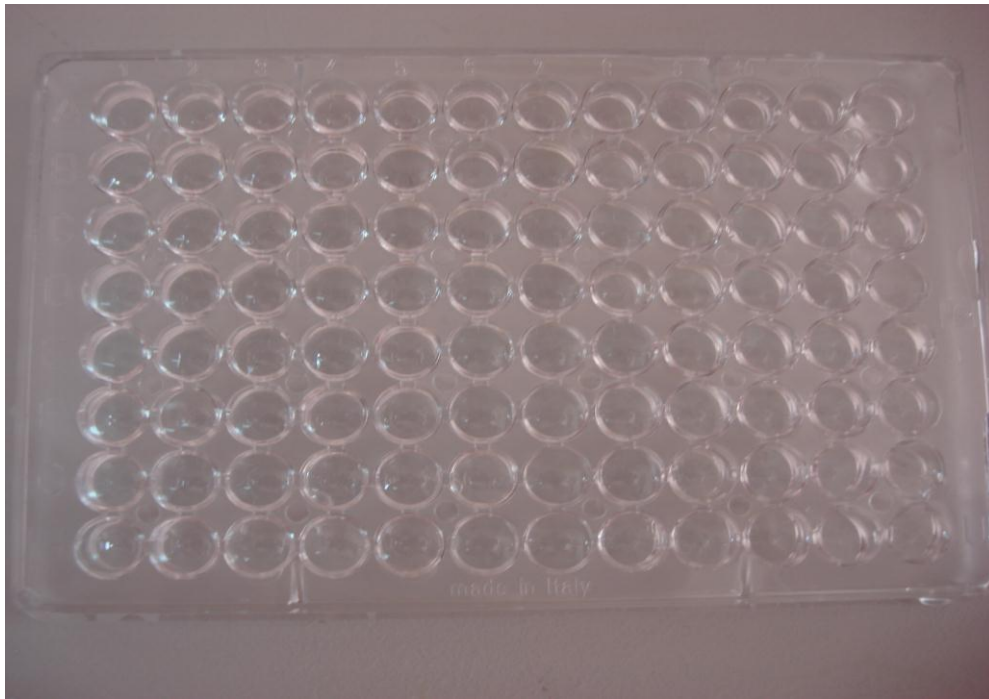
4.7. İzolatların Poliaromatik Hidrokarbonları Kullanma Kapasiteleri

Test edilen 100 izolattan 7 tanesi kontamine (5, 11, 26, 34, 37, 47ve 84) olmuştur ve bu testte alınmamıştır. 93 izolatın poliaromatik hidrokarbonları kullanma kapasiteleri 3.2.5.1’de bahsedilen yöntemle test edilmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir. Kuyucuklardaki kırmızı çökelti oluşumu organizmanın karbon kaynağı olarak hidrokarbonu kullandığını ve üremenin gerçekleştiğini göstermektedir. İzolatların poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneğini belirlemede kullanılan petrol, naftalen, piren ve fenantren asimilasyonuna yönelik sonuçların fotoğrafları Şekil 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30 ve 4.31’de gösterilmiştir. Fenotipik karakterizasyonu yapılan 93 izolattan mikroplate yöntemi sonucu petrol, naftalen, piren ve fenantren hidrokarbonlarını parçalama yeteneği test edilen izolatlardan 28 tanesi parçalama kapasitesine sahip olduğu değerlendirilmiştir ve ileriki çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen 12, 15 ve 29 numaralı izolatlar fenantren, naftalen ve piren hidrokarbonlarını, 13, 14, 67 ve 89 numaralı izolatlar fenantren, piren hidrokarbonlarını ve ham petrolü, 17, 22, 40,

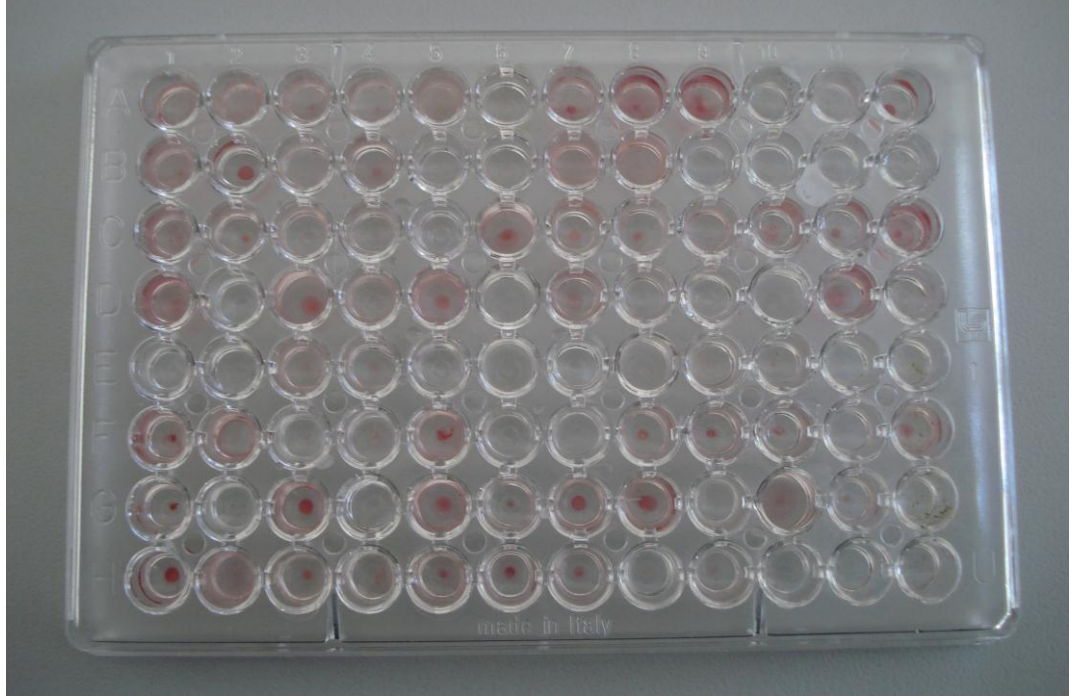
43, 45, 54, 69, 80, 82, 85, 87, 90 ve 93 numaralı izolatlar fenantren, piren, naftalen hidrokarbonlarını ve ham petrolü, 27 ve 100 numaralı izolatlar fenantren hidrokarbonunu ve ham petrolü, 39 numaralı izolat piren hidrokarbonunu ve ham petrolü, 66 numaralı izolat fenantren ve piren hidrokarbonlarını, 79 numaralı izolatlar piren, naftalen hidrokarbonlarını ve ham petrolü, 88 numaralı izolat ise fenantren, naftalen hidrokarbonlarını ve ham petrolü kullanmakta olduğu tespit edilmiştir. İzolat numaralarına göre asimilasyon test sonuçları Çizelge 4.14’de gösterilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	6	7	9	10	12	13	14	15
B	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	27	28
C	29	30	31	32	33	35	36	38	39	40	41	42
D	43	44	45	46	48	49	50	51	52	53	54	55
E	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
F	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
G	80	81	82	83	85	86	87	88	89	90	91	92
H	93	94	95	96	97	98	99	100	8			

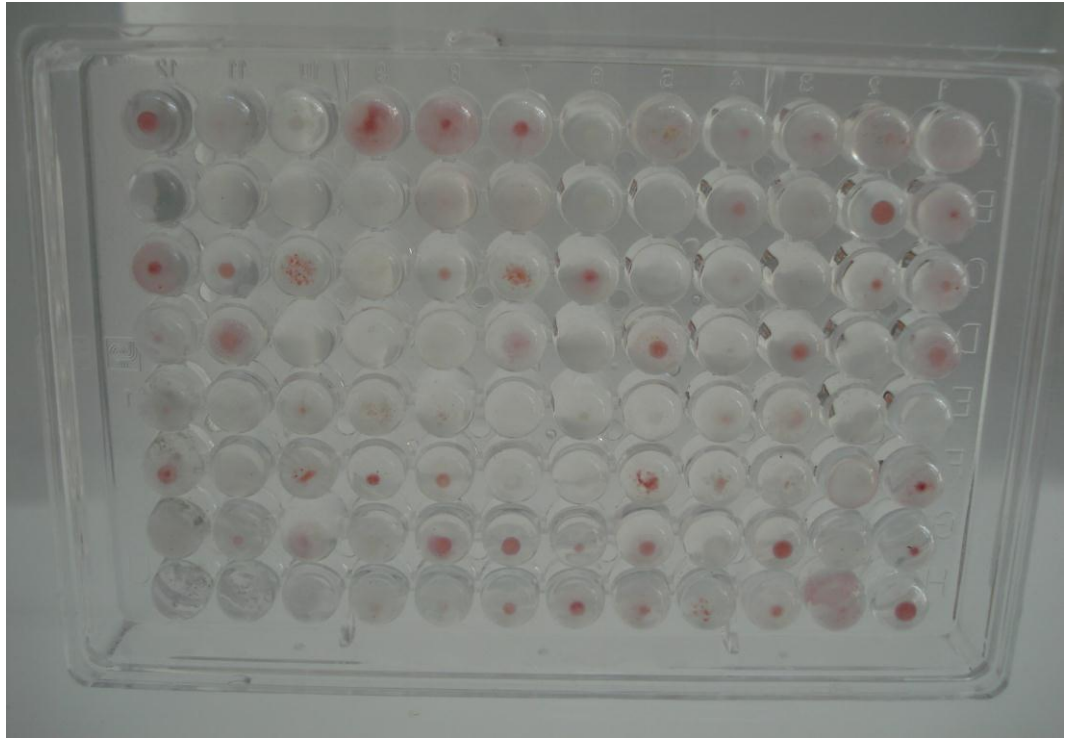
Şekil. 4.22. Mikrotitre plate yönteminde izolatların ekilmesinde izlenen sıra



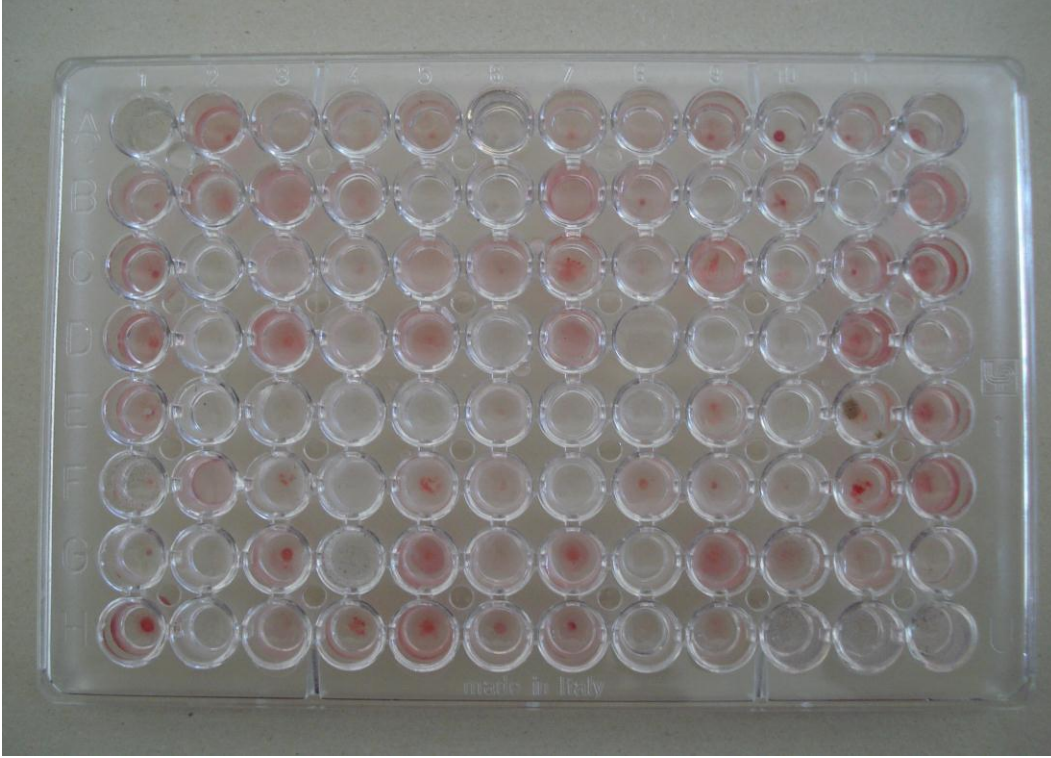
Şekil. 4.23. BHM’de mikrotitre platede 27°C’de 21 günlük görünümü (Kontrol grubu)



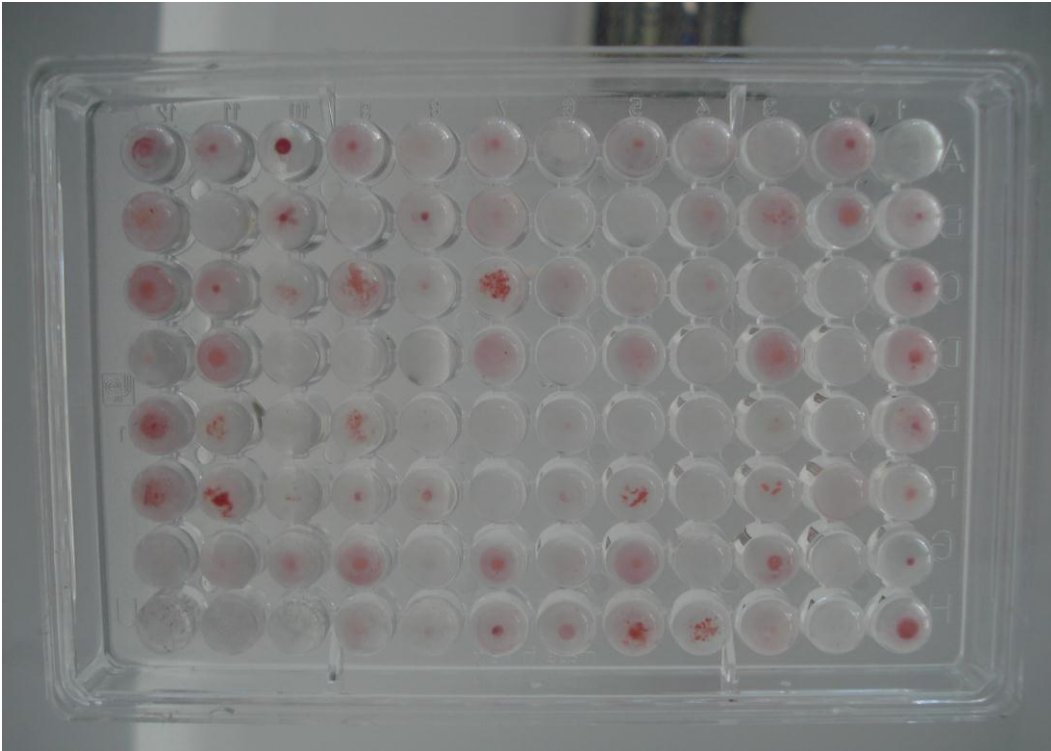
Şekil 4.24. BHM'de Naftalen hidrokarbonun mikrotitre platede düz 27°C'de 21 günlük görünümü



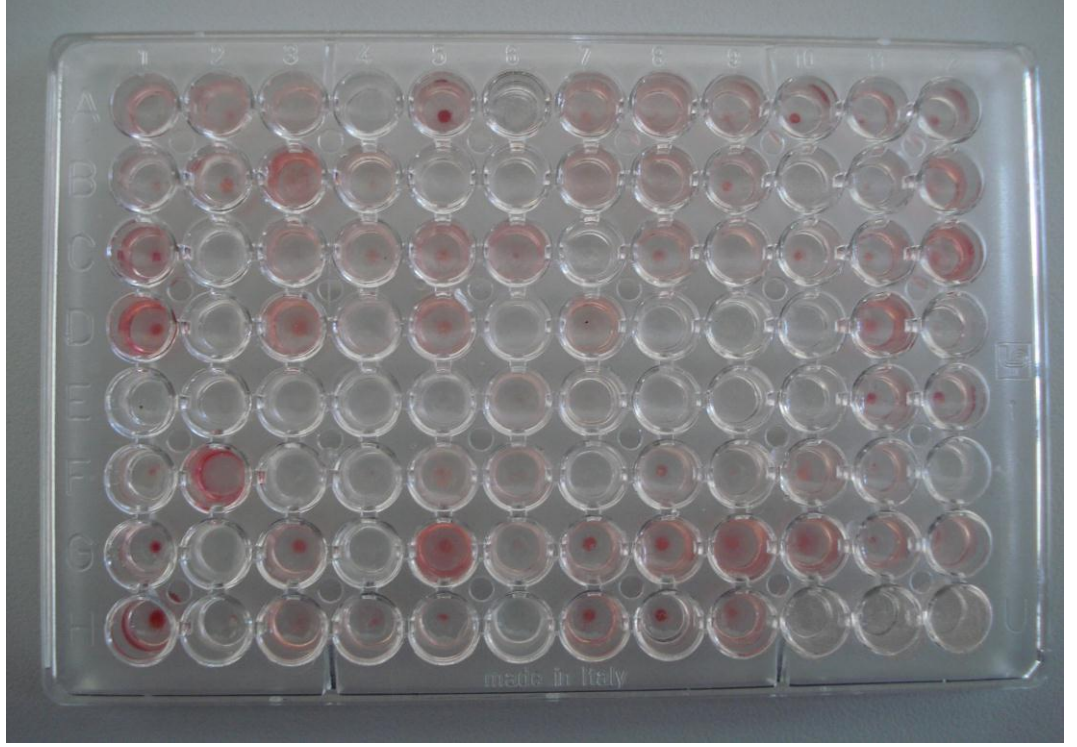
Şekil 4.25. BHM'de Naftalen hidrokarbonun mikrotitre platede tersten 27°C'de 21 günlük görünümü



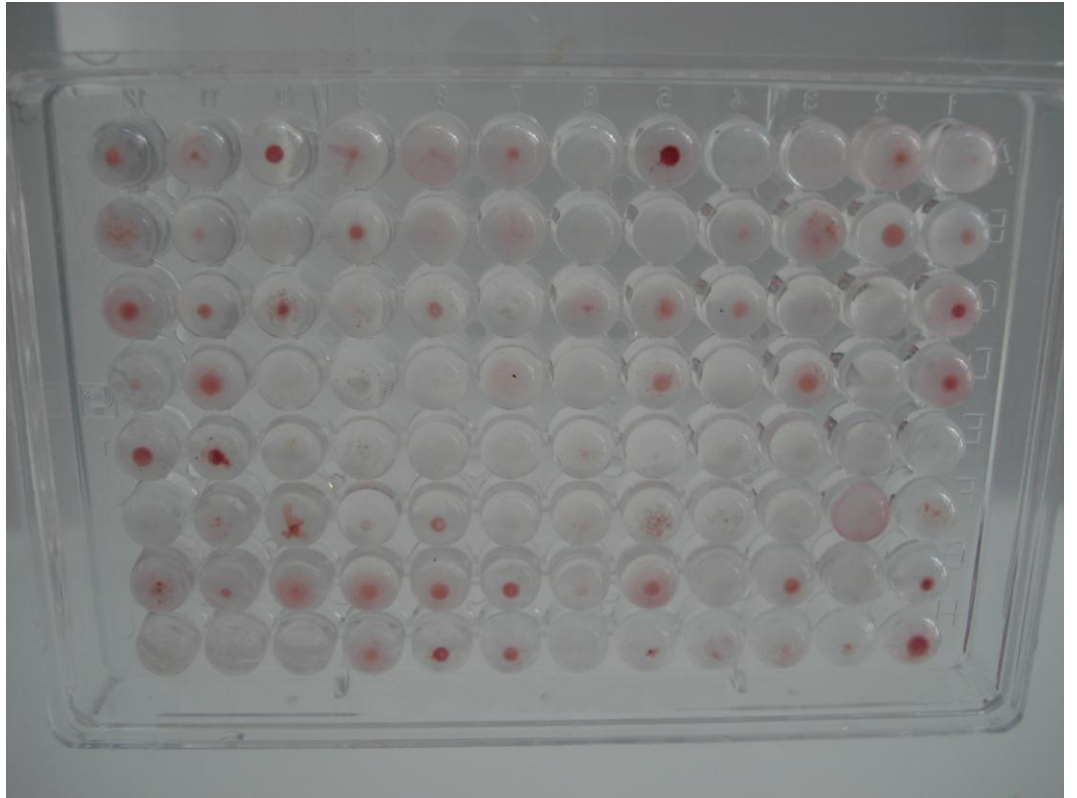
Şekil 4.26. BHM’de Piren hidrokarbonun mikrotitre platede düz 27°C’de 21 günlük görünümü



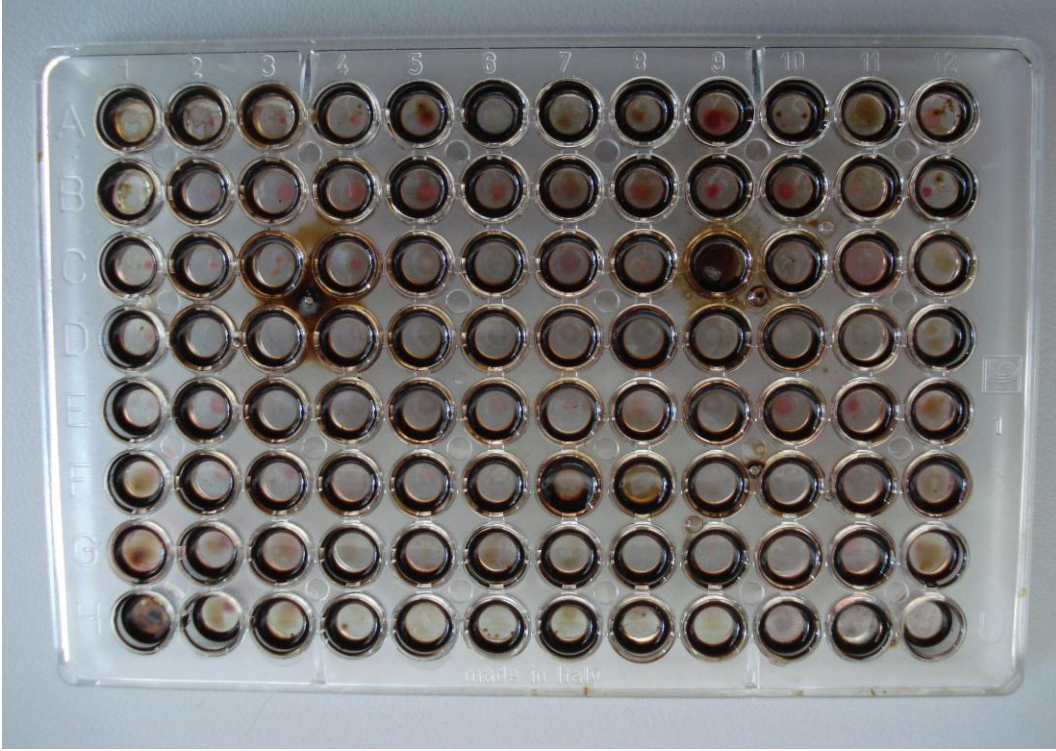
Şekil 4.27. BHM’de Piren hidrokarbonun mikrotitre platede tersten 27°C’de 21 günlük görünümü



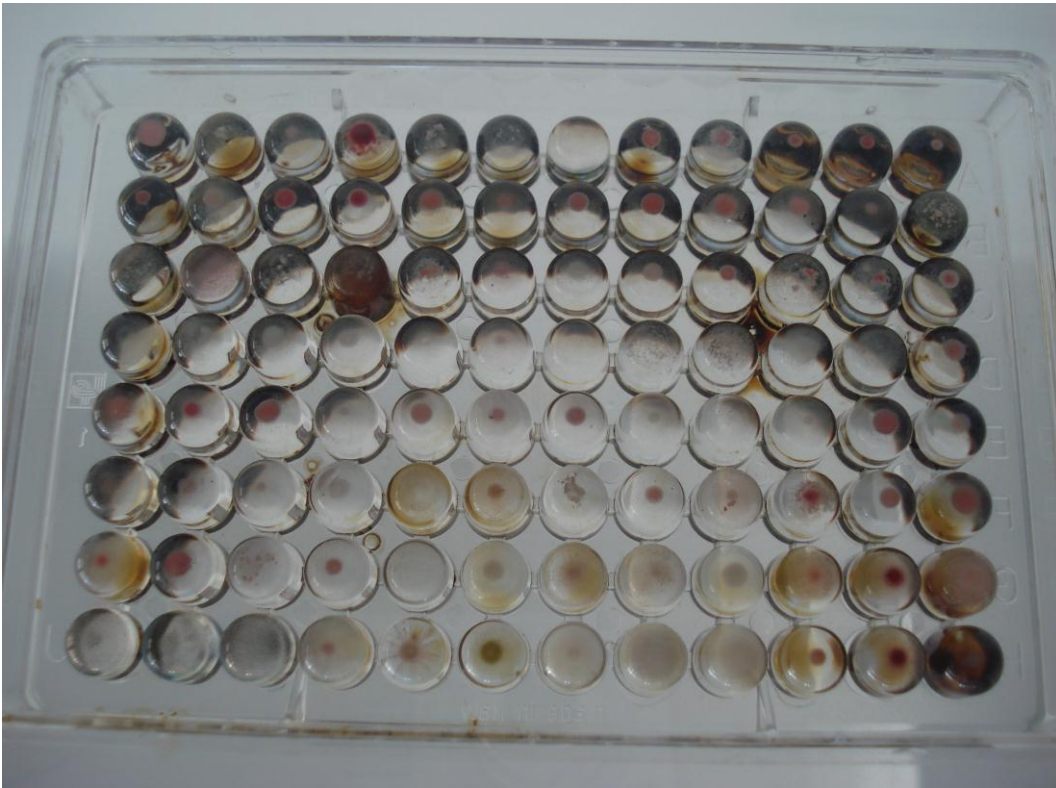
Şekil 4.28. BHM'de Fenantren hidrokarbonun mikrotitre platede düz 27°C'de 21 günlük görünümü



Şekil 4.29. BHM'de Fenantren hidrokarbonun mikrotitre platede tersten 27°C'de 21 günlük görünümü



Şekil 4.30. BHM’de Petrolün mikrotitre platede düz 27°C’de 21 günlük görünümü



Şekil 4.31. BHM’de Petrolün mikrotitre platede tersten 27°C’de 21 günlük görünümü

Çizelge 4.14. Test edilen poliaromatik hidrokarbonların ve petrolün mikrotitre plate sonuçları

	KONTROL	FENANTREN	PIREN	NAFTALEN	PETROL	İZOLAT
	GRUBU					NUMARALARI
A1	-	++	-	++	++	1
A2	-	++	++	+	-	2
A3	-	+	+	+	-	3
A4	-	-	+	+	+	4
A5	-	+++	++	-	++	6
A6	-	++	++	++	+	7
A7	-	+	+	++	-	9
A8	-	+	+	++	+	10
A9	-	+	+	++	-	12
A10	-	++	++	-	++	13
A11	-	+	+	-	++	14
A12	-	+	++	++	-	15
B1	-	+	+	+	+	16
B2	-	++	++	++	++	17
B3	-	++	++	-	+	18
B4	-	+	+	+	++	19
B5	-	-	-	-	-	20
B6	-	-	-	-	-	21
B7	-	+	+	+	+	22
B8	-	-	+	-	-	23
B9	-	+	-	-	-	24
B10	-	-	+	-	+	25
B11	-	+	-	-	++	27
B12	-	+	+	-	-	28
C1	-	++	++	+	-	29
C2	-	-	-	+	+	30
C3	-	-	-	-	-	31
C4	-	+	+	+	-	32
C5	-	+	-	-	-	33
C6	-	+	+	+	+	35

Çizelge 4.14. (Devam)

	KONTROL GRUBU	FENANTREN	PIREN	NAFTALEN	PETROL	İZOLAT NUMARALARI
C7	-	-	+	+	+	36
C8	-	+	+	+	+	38
C9	-	-	++	-	+	39
C10	-	+	+	+	++	40
C11	-	+	+	++	++	41
C12	-	+	+	++	++	42
D1	-	++	++	+	++	43
D2	-	-	-	-	++	44
D3	-	++	++	++	++	45
D4	-	-	-	-	-	46
D5	-	+	+	+	+	48
D6	-	-	-	-	+	49
D7	-	+	++	+	+	50
D8	-	-	-	-	-	51
D9	-	-	-	-	-	52
D10	-	-	-	-	-	53
D11	-	++	++	++	++	54
D12	-	+	+	+	+	55
E1	-	+	-	-	-	56
E2	-	+	-	-	-	57
E3	-	+	-	-	-	58
E4	-	+	-	-	-	59
E5	-	+	-	-	-	60
E6	-	+	-	-	-	61
E7	-	+	-	-	-	62
E8	-	+	-	-	-	63
E9	-	+	-	-	-	64
E10	-	+	-	-	-	65
E11	-	++	+	-	-	66
E12	-	++	+++	-	++	67

Çizelge 4.14. (Devam)

	KONTROL GRUBU	FENANTREN	PIREN	NAFTALEN	PETROL	İZOLAT NUMARALARI
F1	-	+	+	-	-	68
F2	-	++	+	+	++	69
F3	-	-	-	-	-	70
F4	-	-	-	-	-	71
F5	-	+	+	++	+	72
F6	-	+	+	-	+	73
F7	-	-	-	-	-	74
F8	-	+	+	+	+	75
F9	-	+	+	+	+	76
F10	-	+	+	+	+	77
F11	-	+	++	-	+	78
F12	-	-	++	+	+	79
G1	-	++	+	+	+	80
G2	-	-	-	-	-	81
G3	-	+	+	+	+	82
G4	-	-	-	-	++	83
G5	-	++	++	++	++	85
G6	-	-	-	-	-	86
G7	-	++	++	++	++	87
G8	-	++	-	++	++	88
G9	-	++	++	-	++	89
G10	-	++	+	+	++	90
G11	-	+	+	-	+	91
G12	-	+	-	-	+	92
H1	-	++	++	++	++	93
H2	-	-	-	+	-	94
H3	-	-	-	+	-	95
H4	-	+	+	+	+	96
H5	-	+	+	+	+	97
H6	-	-	+	+	-	98

Çizelge 4.14. (Devam)

	KONTROL GRUBU	FENANTREN	PIREN	NAFTALEN	PETROL	İZOLAT NUMARALARI
H7	-	+	+	+	+	99
H8	-	+	-	-	++	100
H9	-	+	+	-	+	8
H10						
H11						
H12						

*Degredasyon sonucunda seçilen izolatlar koyu renk ile belirtilmiştir.

- : negatif parçalama kapasitelerine göre pozitif değerler: +, ++, +++

4.8. Poliaromatik Hidrokarbonları Parçalama Yeteneği Olan İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

4.8.1. DNA izolasyonu

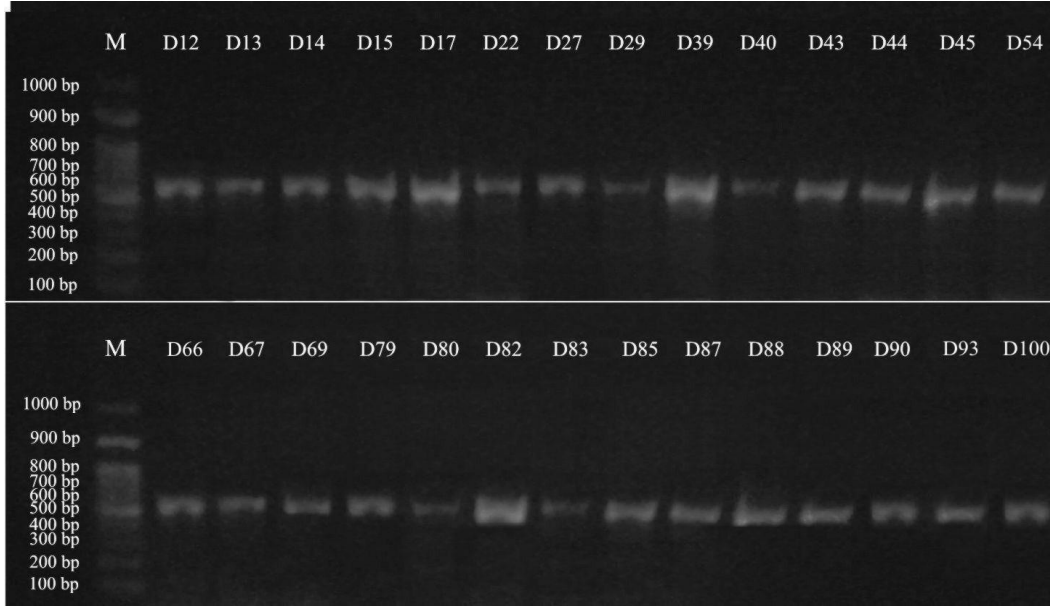
Poliaromatik hidrokarbonları parçalama yeteneği olan 28 izolatın genomik DNA izolasyonları Petersen et al. (2001) göre yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiş ve elektroforez sonucunda bütün izolatlardan yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant elde edildiği gözlenmiştir.

4.8.2. 26S rDNA-PCR

DNA'ları izole edilen izolatların 26S rDNA ile yapılan çalışmalar sonucunda 26S rDNA PCR ile amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Amplifikasyon sonucu elektroforez görüntüleri Şekil 4.32'de gösterilmektedir. PCR ürünlerinin boyutlarının 500 ile 600 bp arasında olduğu görülmüştür. PCR ile amplifiye edildikten sonra, PCR ürünlerinin sekans analizi için İzmir Yüksek Teknoloji'ye örnekler gönderilmiştir. Fenotipik olarak tanılanan 28 izolatın 26S rDNA-PCR sonuçları Çizelge 4.15'de gösterilmiştir. 12 numaralı izolat fenotipik olarak *Candida vartiovaarae* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Pichia kudriavzeii* olarak tanımlanmış, 13 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotorula aurantiaca*

olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodotorula glutinis* olarak tanımlanmış, 14 numaralı izolat fenotipik olarak *Candida ernobii* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanmış, 15 numaralı izolat fenotipik olarak *Cryptococcus hungaricus* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodospiridium diobovatum* olarak tanımlanmış, 17 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotorula aurantiaca* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodotorula muciloginosa* olarak tanımlanmış, 22 numaralı izolat fenotipik olarak *Candida chilensis* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Candida sinolaborantium* olarak tanımlanmış, 27 numaralı izolat fenotipik olarak *Pseudozyma aphidis* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Cryptococcus albidus* olarak tanımlanmış, 29, 85, 87, 88, 89, 90 ve 93 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotorula aurantiaca* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodotorula muciloginosa* olarak tanımlanmış, 39 numaralı izolat fenotipik olarak *Pseudozyma aphidis* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Candida sinolaborantium* olarak tanımlanmış, 40 numaralı izolat fenotipik olarak *Cryptococcus flavus* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Candida davisiana* olarak tanımlanmış, 43 numaralı izolat fenotipik olarak *Pichia angusta* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodotorula muciloginosa* olarak tanımlanmış, 44 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotorula javanica* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Cryptococcus diffluens* olarak tanımlanmış, 45 numaralı izolat fenotipik olarak *Pichia petersonii* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodotorula muciloginosa* olarak tanımlanmış, 54 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotrula glutinis* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Rhodotorula muciloginosa* olarak tanımlanmış, 66 numaralı izolat fenotipik olarak *Sporobolomyces lactosus* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Candida davisiana* olarak tanımlanmış, 67, 79 ve 83 numaralı izolatlar fenotipik olarak *Kondoa malvinella* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Cryptococcus uzbekistanensis* olarak tanımlanmış, 69 numaralı izolat fenotipik olarak *Candida natalensis* olarak tanımlanırken moleküler olarak *Candida parasilopsis* olarak tanımlanmış, 80 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotorula aurantiaca* olarak tanımlanırken moleküler *Rhodospiridium diobovatum* olarak tanımlanmış, 82 numaralı izolat fenotipik olarak *Rhodotorula aurantiaca* olarak tanımlanırken moleküler *Cryptococcus uzbekistanensis* olarak tanımlanmış ve son olarak 100 numaralı izolat fenotipik olarak *Cryptocoocus*

albidus olarak tanımlanırken moleküler olarak *Candida davisiana* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.32 Seçilen izolatların 26S rDNA bölgelerinin elektroforez sonucu

Çizelge 4.15. Fenotipik olarak tanımlanan maya strainlerinin 26S rDNA-PCR analiz sonuçları

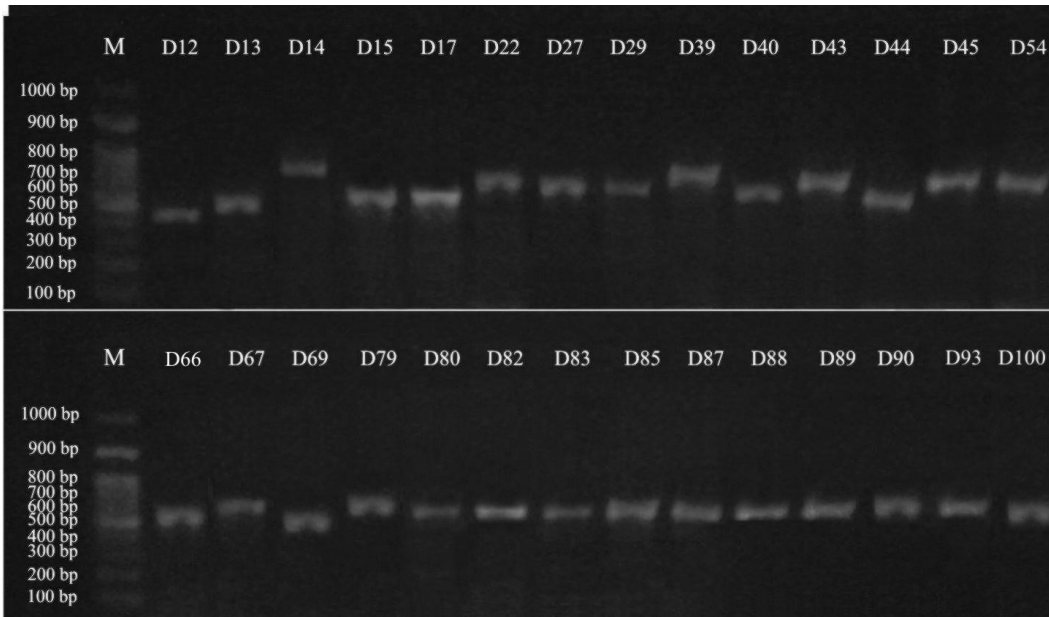
İzolat No.	Fenotipik Tanı sonucu	26S rDNA Bölgesi D1/D2 Domaininin Sekans Analizi		
		26S rDNA PCR Ürünü (bp)	Homoloji (%)	Tanı Sonucu
12	<i>Candida vartiovaarae</i>	556	99	<i>Pichia kudriavzevii</i>
13	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	582	99	<i>Rhodotorula glutinis</i>
14	<i>Candida ernobii</i>	560	99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	<i>Cryptococcus hungaricus</i>	580	97	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>
17	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	553	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
22	<i>Candida chilensis</i>	489	98	<i>Candida sinolaborantium</i>
27	<i>Pseudozyma aphidis</i>	569	99	<i>Cryptococcus albidus</i>
29	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	528	96	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

Çizelge 4.15. (Devam)

İzolat No.	Fenotipik Tanı sonucu	26S rDNA Bölgesi D1/D2 Domaininin Sekans Analizi		
		26S rDNA PCR Ürünü (bp)	Homoloji (%)	Tanı Sonucu
39	<i>Pseudozyma aphidis</i>	489	98	<i>Candida sinolaborantium</i>
40	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	552	99	<i>Candida davisiana</i>
43	<i>Pichia angutsa</i>	560	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
44	<i>Rhodotorula javanica</i>	571	99	<i>Cryptococcus diffluens</i>
45	<i>Pichia petersonii</i>	561	98	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
54	<i>Rhodotorula glutinis</i>	563	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
66	<i>Sporobolomyces lactosus</i>	527	99	<i>Candida davisiana</i>
67	<i>Kondoa malvinella</i>	572	99	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>
69	<i>Candida natalensis</i>	533	99	<i>Candida parapsilosis</i>
79	<i>Kondoa malvinella</i>	579	99	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>
80	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	568	99	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>
82	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	557	99	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>
83	<i>Kondoa malvinella</i>	576	99	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>
85	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	563	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
87	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	566	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
88	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	563	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
89	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	565	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
90	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	564	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
93	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	562	98	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
100	<i>Cryptococcus albidus</i>	565	99	<i>Candida davisiana</i>

4.8.3. ITS-PCR

28 izolatın 26S rDNA-PCR ile gerçekleştirilen tanı sonuçlarını desteklemek amacı ile bazı maya strainlerinin ITS-PCR ile tanısına da gidilmiştir. ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak, ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi (yaklaşık 550 baz çiftlik) PCR ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonucu elektroforez görüntüleri Şekil 4.33’de gösterilmektedir. PCR ürünlerinin boyutlarının 500 ile 600 bp arasında olduğu görülmüştür. PCR ile amplifiye edildikten sonra, PCR ürünlerinin sekans analizi için İzmir Yüksek Teknoloji’ye sekans analizi için örnekler gönderilmiştir. 12 numaralı izolat *Pichia kudriavzeii*, 13 numaralı izolat *Rhodotorula glutinis*, 14 numaralı izolat *Saccharomyces cerevisiae*, 15 numaralı izolat *Rhodospiridium diobovatum*, 17 numaralı izolat *Rhodotorula muciliginosa*, 22 ve 39 numaralı izolatlar *Candida sinolaborantium*, 27 numaralı izolat *Cryptococcus albidus*, 44 numaralı izolat *Cryptococcus diffluens*, 69 numaralı izolat *Candida parasilopsis* ve 79 numaralı izolat *Cryptococcus uzbekistanensis* olarak tanılanmıştır. Bunların yanı sıra, 40, 66 ve 100 numaralı maya suşlarının sonuçlarında farklılık tespit edilmiştir. 26S rDNA dizi analizi ile *Candida davisiana* olarak tanılanan bu maya suşları, ITS bölgesinin dizi analizine göre ise *Sporobolomyces lactosus* olarak tanılanmıştır. 26S rDNA ile tanımlanan 14 izolatın ITS-PCR sekans analizi sonuçları Çizelge 4.16’de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. İzolatların ITS-PCR elektroforez sonucu

Çizelge 4.16. 26S rDNA-PCR ile tanılanan 14 maya strainlerinin ITS-PCR sonuçları

İzolat No.	26S rDNA- PCR Tanı sonucu	ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesinin Sekans Analizi		
		ITS1-5.8S-ITS2 Rdna PCR Ürünü (bp)	Homoloji (%)	Tanı Sonucu
12	<i>Pichia kudriavzevii</i>	424	100	<i>Pichia kudriavzevii</i>
13	<i>Rhodotorula glutinis</i>	474	99	<i>Rhodotorula glutinis</i>
14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	719	99	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	528	100	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>
17	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	520	98	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
22	<i>Candida sinolaborantium</i>	588	99	<i>Candida sinolaborantium</i>
27	<i>Cryptococcus albidus</i>	560	99	<i>Cryptococcus albidus</i>
29	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	562	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
39	<i>Candida sinolaborantium</i>	597	99	<i>Candida sinolaborantium</i>
40	<i>Candida davisiana</i>	476	99	<i>Sporobolomyces lactosus</i>
44	<i>Cryptococcus diffluens</i>	470	99	<i>Cryptococcus diffluens</i>
45	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
54	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
66	<i>Candida davisiana</i>	526	99	<i>Sporobolomyces lactosus</i>
67	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	-	-	-
69	<i>Candida parapsilosis</i>	475	99	<i>Candida parapsilosis</i>
79	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	574	99	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>

Çizelge 4.16 (Devam)

İzolot No.	26S rDNA- PCR Tanı sonucu	ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesinin Sekans Analizi		
		ITS1-5.8S-ITS2 Rdna PCR Ürünü (bp)	Homoloji (%)	Tanı Sonucu
80	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	-	-	-
82	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	-	-	-
83	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	-	-	-
85	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
87	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
88	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
89	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
90	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
93	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-
100	<i>Candida davisiana</i>	-	-	-
-ITS denemesine alınmamıştır.				

4.9. Moleküler Karakterizasyonu sonucu saptanan izolatların sistematik kategorileri

İzolatların sistematik kategorileri Çizelge 4. 17’da verilmiştir.

Çizelge 4.17. Mayaların sistematik kategorileri

Kingdom : <i>Fungi</i>		
Phylum 1 : <i>Ascomycota</i>		
Classis 1 : <i>Ascomycetes</i>		
Ordo : <i>Saccharomycetales</i>		
Familya : <i>Saccharomycetaceae</i>		
Genus 1 : <i>Pichia</i>	Genus 2 : <i>Saccharomyces</i>	
Species 1 : <i>kudriavzevii</i>	Species 1 : <i>cerevisiae</i>	
Kingdom : <i>Fungi</i>		
Phylum 2 : <i>Basidiomycota</i>		
Classis 1 : <i>Basidiomycetes</i>	Classis 2 : <i>Urediniomycetes</i>	
Ordo : <i>Sporidiales</i>	Ordo : <i>Sporidiales</i>	
Familya : <i>Sporidiaceae</i>	Familya : <i>Sporidiobolaceae</i>	
Genus : <i>Rhodospodium</i>	Genus : <i>Sporobolomyces</i>	
Species : <i>diobovatum</i>	Species : <i>lactosus</i>	
Phylum 3 : <i>Deuteromycota</i> (Aseksuel Ascomycota)		
Classis: <i>Deuteromycetes</i>		
Ordo: <i>Cryptococcales</i>		
Familya : <i>Cryptococcaceae</i>		
Genus 1: <i>Cryptococcus</i>	Genus 2: <i>Rhodotorula</i>	Genus 3 : <i>Candida</i>
Species 1 : <i>albidus</i>	Species 1: <i>glutinis</i>	Species 1 : <i>sinolaborantium</i>
Species 2 : <i>diffluens</i>	Species 2: <i>muciloginosa</i>	Species 2 : <i>davisiana</i>
Species 3 : <i>uzbekistanensis</i>		Species 3 : <i>parapsilosis</i>

5. TARTIŞMA

Son zamanlarda insan aktivitesinin artan etkisi sonucu ekosistemde birçok değişiklik oluşmaktadır. Dolayısıyla insanlık son yıllarda ekosistemin korunmasının gerekliliğinin farkına varmış ve özellikle petrol kirliliğinin risk etmeni olması nedeniyle konuyla ilgili pek çok araştırma yapılmıştır (Malatova, 2005).

Petrol hidrokarbonları ve onların olumsuz etkilerinin neden olduğu çevre kirliliği bugün dünyanın konuştuğu önemli problemler arasındadır. 20'yy da kimya ve petrol endüstrisinin çarpıcı şekilde gelişimi çok fazla sayıda kimyasal bileşiklerin ve materyallerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu oluşumlar direkt olarak insan yaşamının bir parçası haline gelmiş ve birçok tehlikeli durumların ortaya çıkmasını da neden olmuştur (Türkoğlu, 2006). Bu bileşiklerden biri olan poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) endüstriyel aktivitelerle ilgili olarak yüksek oranda global kirleticilerdir. Toksikolojik potansiyelleri ve ayrışmaya dirençlerinden dolayı PAH'lar çevre ve insan sağlığı açısından ciddi risk unsurudur (Hesham, 2006)

PAH'lar, sayıları yaklaşık 100'e yakın olan ve yaygın çevre kirleticisi olarak tanımlanan içerdikleri karbon bileşiklerinin eksik yanmasından oluşan bir bileşik grubudur. PAH'lar hem doğal hem de antropojenik kaynaklı olmak üzere iki ya da daha çok benzen halkasından oluşmuş aromatik hidrokarbonlardır. Dış ortam havasında yaygın olarak bulunan birçok PAH bileşiğinin kanıtlanmış mutajenik ve/veya kanserojenik etkileri bulunmaktadır (Lodovici et al., 2003; Haritash and Kaushik, 2009). PAH'ların ortamdan uzaklaştırılması üzerine yapılan çalışmalar çeşitli tipte fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemleri içermektedir. Fiziksel ve kimyasal arıtım teknolojileri topraklardaki petrolü hidrokarbonların ortadan kaldırılması için geliştirilmekte ve test edilmektedir (Stegmann et al., 2001). Önceleri bu iki yöntem yoğun olarak kullanılsa da günümüzde biyolojik yöntemlere doğru ciddi bir geçiş söz konusudur. Bunun en önemli nedenleri ise; bazı zorlu çevrelerde fiziksel ve kimyasal yöntemlerin etkili bir şekilde uygulanamaması, fiziksel ve kimyasal yöntemlerin uygulanması sırasında yapılan işlemler ile kullanılan kimyasalların ekosisteme zarar vermesi, çeşitli kimyasal

maddelere ve ekipmana ihtiyaç duyulması sebebiyle maliyetin yüksek olması şeklinde sıralanabilir (Yanık vd., 1994; Del'Arco and França, 1999; Vidali, 2001). Bunun yanı sıra mikroorganizmaların petrol hidrokarbonlarıyla kirlenmiş ortamlara eklenmesiyle harekete geçen biyolojik parçalama mekanizması ise hem ekosisteme zarar vermemesi, hem de diğerk yöntemlere kıyasla düşük maliyetli olması nedeniyle PAH ile kontamine olan bölgelerin temizlenmesi için giderek daha yaygın bir seçenek haline gelmektedir (Hesham, 2006).

PAH'ların degradasyonu çevresel duruma, mikroorganizmaların sayısına ve tipine, pH'a, sıcaklığa, oksijen oranına, mikrobiyal populusyona, organizmaların ortama alışabilme derecesine, besin erişimine, bileşimin kimyasal yapısına ve hücresel taşıma özelliğine bağılı olarak değişmektedir. Degredasyon sonucu PAH'ların daha az karmaşık metabolitlere dönüştüğü bilinmektedir. PAH'ların biyolojik parçalanmasında genellikle bakteriler kullanılmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomons fluoresens*, *Mycobacterium sp.*, *Haemophilus sp.*, *Rhodococcus sp.* ve *Paenibacillus spp.* yaygın olarak çalışılmış PAH parçalayıcı bazı bakterilerdir (Walter et al., 1991; Trzesicka-Mlynarz and Ward, 1995; Haritash and Kaushik, 2009). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarla da çok sayıda maya türünün alifatik ve aromatik hidrokarbonları ayrıştırdıkları saptanmıştır (Haritash and Kaushik, 2009). Maya ve filamentöz funguslar su sedimentlerinde ve karasal habitatlarda, asidik petrol sızıntılarının olduğı habitatlarda büyüebilmeleri ve çevresel koşullarda ki değişimlere daha toleranslı olmaları ve filamentli fungusların fungal hifleri ile poliaromatik hidrokarbonla kontamine olmuş topraklara daha rahat girebilmeleri nedeniyle bakterilere nazaran daha avantajlı duruma geçmiştir (Haritash and Kaushik, 2009). Yapılan araştırmalarda petrolle kontamine olan örneklerde bulunan maya genus ve türleri; *Yarrowia lipolytica*, *Candida palmioleophila*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida intermedia* ve *Candida guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida lipolytica*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Candida krusei*, *Cryptococcus albidus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula glutinis* ve *Rhodotorula minuta*'dır (Romero et al., 1998; Garon D.,1999; Arie et al., 2000; Zinjarde and Pant, 2002; Chaillan et al., 2004; Pan, et al., 2004; Haritash and Kaushik, 2009). Lignolitik funguslar da PAH parçalama özelliğine

sahiptir. Örneğin *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, and *Pleurotus ostreatus* PAH parçalanmasında yaygın olan funguslardır (Hammel et al.,1992; Haritash and Kaushik, 2009). Özellikle son yıllarda substrat olarak hidrokarbon kullanan mayaların tek hücre proteininin üretiminde kullanımı poliaromtaik hidrokarbonların parçalanmasında bu organizmalardan mikrobiyal inokulum olarak yararlanılabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Ekundayo ve Obuekwe, 2000). Karasal ve sucul çevrelerde hidrokarbon parçalayıcı mayaların yaygın bir şekilde bulunması, bu organizma grubu üzerine olan ilginin daha da artmasına neden olmuştur (Ahearn ve Crow, 1980).

Poliaromatik hidrokarbonların parçalanmasında rol oynayan mayaların izolasyonu ve identifikasyonu strain geliştirmek açısından son derece önemlidir. Dolayısıyla en çok sayıda PAH parçalayan strainlerin taranması önem kazanmaktadır. Araştırmacılar mayaların izolasyonunda tripton glukoz yeast ekstrakt kloramfenikol agar (TGYCA) kullanmışlardır (Deak et al., 1998; Beuchat et al.,2001;). Bizim araştırmamızda da petrol ile kontamine olan örneklerden mayaların izolasyonu için TGYCA, pH 4,8 olan Wort agar, Ph 3,5 olan asidik potato dekstroz agar (APDA) ve kloramfenikol içeren plate count agar (PCA) kullanılmış ancak TGYCA ve Wort Agar dışındaki besiyerlerinde mayalarla birlikte küflerde ürediği için daha sonraki çalışmalarda izolasyon besiyeri olarak düşük Ph'ı olan TGYCA ve Wort Agar kullanılmıştır. Ayrıca, bu besiyeri bileşimlerine ilave olarak 100 mg/lt kloramfenikol olası bakteri kolonizasyonunun önlenmesi için ilave edilmiştir (Deak et al., 1998). İzolasyon sırasında küflerin elimine edilmesi için %0,01 oranında sikloheksimid kullanımı önerilmiştir (Martin, 1950; Beech and Davenport, 1971; Jarvis and Williams, 1987). Ancak bütün maya türlerinin izolasyonunda sikloheksimidin etkili olmadığı, bazı mayaların ise sikloheksimid varlığında büyümediği bilinmektedir (Barnett et al., 2000). *Rhodotorula auriculariae*, *Cryptococcus ater*, *Pichia heimii* ve *Pseudozyma aphidis* gibi izolatların bu antibiotiğin %0,01 ve %0,1 konsantrasyonlarına direnç gösteremediği, *Candida chilensis*, *Stephanoascus smithiae* ve *Pichia angutsa* ise bu konsantrasyonlara dirençli olduğu belirtilmiştir (Barnett et al., 2000).Bu nedenle mayaları tanılama tayin anahtarlarında, bu antibiyotiğin %0,01 ve %0,1 konsantrasyonlarında mayaların büyüüp büyümediğini saptayan identifikasyon testleri içerilmektedir (Barnett

et al., 1983, 2000). Çalışmamızda fazla sayıda maya izolatu elde edilmesi amaçlandığından izolasyon besiyeri içeriğine sikloheksimid eklenmemiştir. Keza mayaların genel olarak üremesi için gereken inkübasyon süresi 24-48 saat iken filamentli funguslar 48. saatten itibaren üremeye başlamaktadır (Bille et al.,1983; Barnett et al., 2000; Öztürk, 2007). Belirtilen nedenle ortama antibiyotik eklenmesine gerek kalmamakta ve mayalar ile filamentli fungusların ayrımında TGYCA ve Wort Agar besiyeleri kullanılması problem yaratmamaktadır.

Çeşitli petrole kontamine olmuş örneklerden izole edilen mayaların tanılanmasında biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik karakterleri kapsayan konvensiyonel ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Maya izolatlarının fenotipik olarak genus ve tür düzeyinde tanılanması için kullanılabilecek çeşitli referanslar bulunmaktadır. Raper and Thom (1949), Raper and Fennell (1965), Wickerham (1951, 1952), Lodder and Kreger-van Rij (1952), Wickerham and Burton (1962), Alexopoulos (1962, 1979, 1996), Paff et al. (1966), Lodder (1970), Barnett et al. (1983, 2000), Kreger-van Rij (1984) ve Pitt and Hocking (1985), genel olarak mikoloji alanında çalışmalar yapmış olan ve maya taksonomisiyle de ilgilenen araştırmacılarıdır. Alexopoulos (1962, 1979, 1996), özellikle fungus taksonomisi ile ilgili çalışmaları olan en önemli mikologlardan birisidir. Araştırmacı, “Introductory Mycology” adlı en son kitabında mayaları askomisetik, aseksüel askomisetik ve basidiomisetik mayalar olarak sınıflandırmıştır. Phaff et al. (1966) mayaları askosporogenik, ballistosporogenik, asporogenik ve maya benzeri organizmalar olmak üzere dört grupta incelerken, Beneke and Stevenson (1987), *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* olarak iki grupta, Frazier and Westhoff (1988), *Askosporogenous*, *Ballistosporogeneous* ve *Fungi Imperfecti* olarak üç grupta incelemişlerdir. Bazı araştırmacılar fungusları izolasyon kaynağına göre değerlendirerek tanılama yollarına gitmişlerdir. Örneğin Jarvis and Williams (1987), Beneke and Stevenson (1987) ve Frazier and Westhoff (1988), daha çok gıda maddeleri ve içeceklerden izole edilen funguslar için çok kapsamlı olmayan bir tanılama anahtarı da vermiştir. Barnett et al. (1983, 2000) tarafından izolasyon kaynağına göre tanılama anahtarlarının bulunduğu kitap, maya taksonomisi ile ilgili çalışmalar yapan araştırmacıların en çok başvurduğu referans haline gelmiştir.

Bu araştırmamızda, izole edilen mayaların genus ve tür düzeyinde fenotipik olarak tanımlanmasında Barnett et al. (2000) tarafından önerilen tayin anahtarlarından yararlanılmıştır. Zira mayaların identifikasyonu konusunda en geniş ve detaylı tayin anahtarları bu araştırmacılar tarafından verilmiştir. Kreger-van Rij (1984) tarafından yazılmış olan “The Yeasts: A Taxonomic Study” adlı kitapta mayaların izolasyonu, sınıflandırılması ve identifikasyonu ile ilgili bilgiler verilmiş olmasına rağmen bu sınıflandırmada genus ve türlerinin özellikleri ayrı ayrı tayin anahtarları ile verilmiştir. Araştırmamızda bazı genus ve türlerin tanımlanmasında bu kaynağın yanı sıra Alexopoulos et al. (1996) tarafından hazırlanan sistematik kategorilerden faydalanılmıştır (Alexopoulos et al, 1996; Barnett et al., 2000, 2004)

Barnett et al. (2000) izole edilen mayaların genus ve tür düzeyinde tanımlanmasında 9 farklı tayin anahtarı oluşturmuşlardır. İzolasyon kaynağına göre mayaları; glukozu fermente edebilen mayalar, glukozu fermente edemeyen mayalar, oval, silindirik, konik veya reniform askosporlara sahip askosporogenik mayalar, satürn, şapka şeklinde askosporlara sahip askosporogenik mayalar, iğne veya kamçı şeklinde askosporlara sahip askosporogenik mayalar, ballistokonidia oluşturan mayalar, basidiomisetik mayalar, pembe renkli koloni oluşturan mayalar ve metanolü kullanan mayalar olarak gruplandırmışlardır. Barnett et al. (2000)’nın çalışmasında hidrokarbon parçalayan mayalara yönelik belli bir tayin anahtarı olmadığı için glukozu fermente eden, glukozu fermente edemeyen ve pembe koloni oluşturan mayaların tayin anahtarı kullanılarak ham petrol ile kontamine olmuş toprak, arıtma suyu ve aktif çamur örneklerinden izole edilen 100 maya izolatu tanımlanmıştır (Barnett et al., 2000). Tanımlanan izolatlar sıklıkla *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula* ve *Candida* genusuna dahil edilmiştir.

Ökaryotlarda moleküler biyolojik yöntemler geliştikçe taksonların sistematik kategoriler değişmektedir. Bu nedenle, araştırmamızda izolatların sistematik olarak sınıflandırılmasında, Barnett et al. (2000) ile Alexopoulos et al. (1996)’ın hazırladığı sistematik kategorilerden faydalanılmıştır. Buna göre; Barnett et al. (2000) *Candida* genusunu *Saccharomycetales* ordosunun *Candidaceae* familyası altında incelerken, Alexopoulos et al. (1996) ise *Saccharomycetales* ordosu altındaki *Saccharomycetaceae* familyası içerisinde incelemiştir. Barnett et al.

Cryptococcus genusunu *Hymenomyces* sınıfı altındaki *Tremellaceae* familyası içerisinde incelerken, *Rhodotorula* ve *Rhodosporidium* genuslarını *Urediniomyces* sınıfı altındaki *Sporidiobolaceae* familyasına dahil etmiştir. Alexopoulos et al.(1996) ise, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* genuslarını *Deuteromyces* sınıfındaki *Cryptococcaceae* familyası altında incelerken, *Rhodosporidium* genusu ise, *Basidiomyces* sınıfının *Sporidiaceae* familyası içerisine dahil etmiştir (Alexopoulos et al., 1996; Barnett et al., 2000).

İzolatların fenotipik olarak tanımlanmasındaki ilk adım mayaların morfolojik özelliklerinin incelenmesidir. Wickerham (1951, 1970), Wickerham and Burton (1962) ve Banwart (1981) tarafından yapılan çalışmalarda *Candida*, *Saccharomyces*, *Willopsis*, *Schizosaccharomyces* ve *Pichia* türlerinin Malt Extract ve MYGP agar üzerinde krem rengi koloniler, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus* ve *Rhodotorula* türlerinin ise pembe ve turuncu renginde koloniler oluşturduğu belirtilmektedir (Barnett et al., 2000; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008). Hücrelerin tomurcuklanma özelliğinin, boyutlarının ve şekillerinin belirlenmesi için Van der Walt (1970), Barnett et al. (2000) ve Kreger-van Rij (1984) benzer yöntemler vermiştir. Wickerham (1970), Banwart (1981), Barnett et al. (1983, 2000) , Kreger-van Rij (1984) ve Beneke and Stevenson (1987) tarafından *Sporidiobolus*, *Rhodosporidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Willopsis* ve *Pichia* genuslarının eşeysiz üremesi tomurcuklanma ile olmakta, hücreler küresel, elips, ovoid ve silindirik şekilde tek, çift veya gruplar halinde bulunmaktadır (Barnett et al., 2000; Öztürk, 2007; Çorbacı, 2008). Çalışmamız da izole edilen maya izolatları yukarıda belirtilen özelliklere uygunluk göstermiştir.

Wickerham and Burton (1962), Van der Walt (1970), Barnett et al.(1983, 2000), Kreger van Rij (1984), Beneke and Stevenson (1987), Kurtzman (1990) ve Kurtzman and Fell (1998) tarafından *Willopsis*, *Pichia*, *Yarrowia* ve *Hansenula* oval, satürn şapka şeklinde 1-4 askospor, *Saccharomyces cerevisiae* ise küresel 1-12 kadar askospor oluşturulduğu rapor edilmiştir. Askospor oluşumunun gözlenebilmesi için iki tip besiyeri tavsiye edilmektedir. Bu besiyerleri Gorodkova Agar ve Asetat Agar'dır (Barnett et al., 1983, 2000). Araştırmamızda elde edilen izolatlarda askospor oluşumunun gözlenebilmesi için tavsiye edilen

besiyerlerinden her ikisi de denenmiştir ve izolatların askosporları en iyi Asetat Agarda gözlenebilmiştir.

Mayaların tanılanmasında morfolojik testlerden sonraki basamak, hücrelerin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin test edilmesidir. Karbon ve azot kaynaklarının asimilasyonunu belirleme de kullanılan en yaygın yöntemler; tüplerde sıvı besiyeri kullanımı, agarlı besiyerinde oksonogram ve replika plate yöntemidir (Verachtert and De Mot 1990; Barnett et al., 2000). İncelenen strainlerin fermentasyon özelliğinin ve karbon kaynaklarının asimilasyonu testlerinin sonuçları literatürde belirtilen (Barnett et al., 1983, 2000) sonuçlarla uyumluluk göstermiştir.

Literatürde, *Sporidiobolus*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Willopsis* ve *Pichia* *genuslarına* ait türlerin azot kaynaklarının asimilasyon tiplerine göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir. *Sporidiobolus salmanicolor*, *Candida berthetii*, *C. boidinii*, *Hansenula anomola*, *Willopsis saturnus* nitrat, etil amin ve L-lisin asimile ederken, *Kluveromyces marxianus*, *Candida maltosa*, *C. ernobii*, *C.zeylanoides*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia farnosa* nitratı kullanmaktadır (Wickerham, 1970; Barnett et al., 2000; Kreger-van Rij, 1984). Araştırmamızda, izole edilen izolatların azot kaynaklarının asimilasyon test sonuçları, literatürde belirtilen (Barnett et al., 1983, 2000) sonuçlarla uyumluluk göstermiştir.

Tanılama testleri arasında bulunan sikloheksimid'de büyüme testinde kullanılan antibiyotik konsantrasyonları %0,01 ve %0,1 olmasının nedeni, mayaların çok düşük sikloheksimid konsantrasyonlarına adapte olabilmeleridir. Bu antibiyotiğe dirençli olan mayaların modifiye edilmiş 80 S ribozomlara sahip olduğu, dolayısıyla bu bölgelerde protein sentezini engelleyen bu antibiyotikten etkilenmedikleri düşünülmektedir (Barnett et al., 1983, 2000). Araştırmamızda *Rhodotorula auriculariae*, *Cryptococcus ater*, *Pichia heimii* ve *Pseudozyma aphidis* gibi izolatların bu antibiotiğin %0,01 ve %0,1 konsantrasyonlarına direnç gösteremediği, *Candida chilensis*, *Stephanoascus smithiae* ve *Pichia angutsa* ise bu konsantrasyonlara dirençli olduğu saptanmıştır.

Çeper yapısındaki farklılığı ortaya koyan DBB testi, basidiomisetik mayaların askomisetik mayalardan ayırt edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Basidiomisetik mayaların oluşturduğu koloniler, DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk alırken, Askomisetik mayalarda herhangi bir renk değişimi olmamaktadır (Kurtzman, 1990; Wolf, 1996; Barnett et al., 1983, 2000) . Askomisetik mayalar olan *Candida*, *Pichia* ve *Stephanoascus* genusları DBB çözeltileri ile renk değiştirmemekte, Basidiomisetik maya olan *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Pseudozyma* ve *Kondoa* genusu DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk almaktadır. Araştırmamızda DBB testi için Malt Yeast Glukoz Pepton Agar kullanılmış, 10 günlük kültüre DBB çözeltisi eklenip test gerçekleştirilmiş ve incelenen Askomisetik mayaların negatif tepki verdiği, Basidiomisetik mayalar olan *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodospiridium diobovatum*'un ise DBB çözeltisi ile koyu kırmızı renk aldığı gözlenmiştir.

Mayaların üreyi amonyağa hidroliz etme yeteneklerinin farklı olması, bu özelliğin mayaları ayırt etme de kullanılabilmesini sağlamaktadır (Barnett et al., 1983, 2000). Üreaz aktivitesi *Rhodotorula* ve *Rhodospiridium* genuslarında mevcut iken *Pichia* genusuna dahil olan mayalarda görülmemektedir. *Candida* ve *Cryptococcus* genuslarında ise türe bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Barnett et al., 1983, 2000). Örneğin araştırmamızda izole edilen *Candida davisiana* türü üreyi hidrolize ederken *Candida parasilopsis* türü üreyi hidrolize etmediği görülmüştür. Tanılanan strainler arasından *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus diffluens* ve *Candida davisiana*'da üreaz aktivitesi gözlenirken, *Candida parapsilosis*, *Pichia kudriavzevii* ve *Saccharomyces cerevisiae* olarak belirlenen izolatların üreyi hidrolize edemedikleri saptanmıştır.

İzolatların tanılanmasında kullanılan testlerden; vitamin ihtiyacının belirlenmesi testi, hücre dışı nişasta benzeri bileşiklerin üretiminin belirlenmesi testi ve asetik asit üretiminin belirlenmesi testinin sonuçları da literatüre uygunluk göstermiştir.

Araştırma sonucunda, fenotipik tanılamaya göre, izole edilen 100 maya strainin 21 tanesi *Rhodotorula aurantiaca*, 14 tanesi *Kondoa malvinella*, 9 tanesi *Cryptococcus albidus*, 5 tanesi *Candida ernobii*, 5 tanesi *Sporobolomyces lactosus*, 5 tanesi *Rhodotorula auriculariae*, 4 tanesi *Rhodotorula javanica*, 4 tanesi *Pichia angutsa*, 3 tanesi *Pseudozyma aphidis*, 3 tanesi *Candida glabrosa*, 2 tanesi *Willopsis saturnus*, 2 tanesi *Pichia bispora*, 2 tanesi *Rhodospordium lusitaniae*, 2 tanesi *Stephanoascus smithiae*, 1 tanesi *Rhodotorula sonckii*, 1 tanesi *Rhodotorula glutinis*, 1 tanesi *Candida suecica*, 1 tanesi *Candida vartiovaarae*, 1 tanesi *Candida versitalis*, 1 tanesi *Candida chilensis*, 1 tanesi *Candida natalensis*, 1 tanesi *Pichia burtonii*, 1 tanesi *Pichia heimii*, 1 tanesi *Pichia holstii*, 1 tanesi *Pichia petersonii*, 1 tanesi *Pichia guilliermondii*, 1 tanesi *Pichia dryadoides*, 1 tanesi *Cryptococcus ater*, 1 tanesi *Cryptococcus hungaricus*, 1 tanesi *Cryptococcus flavus*, 1 tanesi *Pseudozyma antarctica*, 1 tanesi *Saccharomyces cerevisiae*, 1 tanesi ise *Schizosaccharomyces pombe* türü olarak tanımlanmıştır.

Ökaryotik mikroorganizmalar üzerindeki detaylı moleküler biyolojik ve genetik yöntemlerle identifikasyon çalışmaları 90'lı yıllarda henüz yeni başladığı ve bütün türler için tam bir veri tabanları oluşturulmadığı için Barnett et al. (1983,2000) tarafından türlerin tanınmasında adı geçen moleküler biyolojik yöntemler hakkında detaylı bilgiler verilmemiş ve klasik yöntemlerin moleküler biyolojik yöntemlerle desteklenmesi gerektiği belirtilmiştir (Verachtert and De Mot, 1990, Kurtzman, 1990; Barnett et al., 2000; Boekhout et al.,2003). Ayrıca mayaların tanımlanmalarında kullanılan kültürel yöntemlerin, zaman alıcı olduğu ve bazen yanlış tanımlamalara yol açabildiği bilindiğinden, günümüzde maya tanımlamada moleküler yöntemlerin kullanılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Maya tanımlama ile ilgili yöntemler, temel biyolojik bilgilerin hızla artması, mayaların endüstriyel olarak kullanılmaları ve biyolojik yayılımlarına olan ilginin artması ve hızlı teknolojik gelişmelere bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. Bu amaçla sıklıkla başvuru alan, hızlı ve daha doğru sonuçlar veren PCR esaslı yöntemlerin kullanıldığı çalışmaların son yıllarda giderek yoğunlaştığı görülmektedir (Jancy and Barbier, 2008).

Taksonomide kullanılan geleneksel yöntemlerin, mikroorganizmaların morfoloji, fizyoloji ve üreme gibi fenotipik özelliklerini belirlemeye dayandığı

bilinmektedir. Fakat bu teknikler kullanılarak elde edilen sonuçların yorumlanması son 30 yılda hızlı bir değişime uğramıştır. Bu değişime neden olarak; DNA ve RNA'nın yapı ve fonksiyonlarının daha da iyi anlaşılmasıyla, fenotipik farklılıkların her zaman genotipik çeşitliliğe işaret etmediğinin açıklık kazanması gösterilmektedir. Moleküler taksonomi alanında yapılan ilk çalışmaların ardından tanımlamada; ribozomal RNA (rRNA) veya tamamlayıcı molekülü olan ribozomal DNA (rDNA)'daki belirli bölgelerin hedeflendiği çeşitli tekniklerin geliştirildikleri ve günümüzde de sıklıkla kullanıldıkları bilinmektedir (Martini, 2003; Yalçın vd., 2010). rDNA gen kümesinin, hem çekirdek, hem de mitokondride bulunduğu ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana geldiği bilinmektedir. Ribosomal DNA'nın avantajı, bütün yaşayan organizmalarda bulunması ve çoklu kopyalar halinde ortak bir evrimsel orijine sahip olmasıdır. Yüksek derecede korunmuş olan rDNA, bir türe ait olan bütün strainler arasında hem farklılıkları göstermek hem de daha yüksek taksonları betimlemek için kullanılmaktadır (Kurtzman, 2006). Hem taksonomik amaç hem de filogenetik ilişkileri oluşturmak için rDNA bölgesini hedef alan yöntemler tercih edilmektedir. Bu bölgelerden biri ribozomun büyük alt biriminin yaklaşık 600 nükleotid uzunluğunda olan D1/D2 domainidir. Kurtzman and Robnett (1995, 1998 ve 2003), bütün bilinen askomisetik mayaların D1/D2 domaininin sekansını saptamışlar ve neredeyse bütün askomisetik mayaların ayrımı için bu domainin yeterli olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Sadece birkaç çok yakın ilişki içerisinde olan türün ayrımında D1/D2 domainin yeterli olmadığını belirtilmiştirler ancak %1'den daha fazla sekans farklılığı gösteren strainlerin farklı türler olabileceği ortaya koymuşlardır. Fell et al. (2000) ise bütün bilinen basidiyomisetik mayalar için bu domaininin sekans analizini gerçekleştirmişler ve basidiyomisetik mayaların ayrımında bu domainin kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Fell et al., 2000). Son on yılda, büyük alt birim (26S) rRNA'nın nükleotid bilgisi kullanılarak, mayaların identifikasyonu için pek çok PCR primeri dizayn edilmiştir ve bu yöntem, hem tanılama hem de filogeni çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Kurtzman and Robnett 1995, 1998 ve 2003, Fell et al., 2000; Hesham et al., 2006; Hesham et al., 2012). Ayrıca rRNA genleri oldukça korunmuş olmasına rağmen ITS bölgeleri türler arasında dengeli bir çeşitlilik göstermektedir. ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanılmasıyla fungusların 5,8S rDNA bölgesi ile ITS1 ve ITS2 bölgeleri amplifiye olmaktadır (Fujita et al.,

2001). ITS bölgeleri en hızlı evrim geçiren bölgeler oldukları ve bir tür içerisindeki strainlerin veya bir cins içerisindeki fungal türlerin karşılaştırılmalarında daha faydalı oldukları belirtilmektedir (White et al., 1990).

Araştırmamızda tanılama da tek bir moleküler biyolojik yöntemin yeterli olmaması nedeniyle tanılama için birden fazla moleküler biyolojik yöntem kullanılmıştır. Öncelikle fenotipik olarak tanılanan ve hidrokarbonların parçalama kapasitesi sonucu seçilen 28 izolatın moleküler identifikasyonu için 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analizi yapılmıştır. Ancak Barnett et al. (2000)' e göre yapılan fenotipik tanılama ile 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analiz sonuçları birbiriyle uyumluluk göstermemiştir. Örneğin, araştırmamızda 12 numaralı izolat fenotipik olarak *Candida vartiovaarae* olarak tanımlanırken 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analiz sonucu *Pichia kudriavzeii* olarak tanımlanmıştır. Bunun nedenlerinden biri fenotipik tanılamada kullanılan kriterlerinin güncelliğini yitirmiş olmasıdır. Örneğin, 26S rDNA bölgesinin D1/D2 domaininin sekans analiz sonucu *Cryptococcus uzbekistanensis* olarak tanımlanan 79 numaralı maya türü, Barnett et al. (2000) tarafından yayınlanan kitapta bulunmamaktadır. Bu sebeple, 2000'li yıllarda bulunan yeni maya türlerinin fenotipik tanılması bu referans kitaplar kullanılarak yapılması mümkün olmamaktadır.

Diğer bir aşamada ise 26S rDNA-PCR ile gerçekleştirilen tanı sonuçlarını desteklemek amacı ile bazı maya strainlerinin ITS-PCR ile tanısına da gidilmiştir. 26S rDNA dizi analizi sonucunda aynı tür olarak tanımlanan maya strainleri arasından birer tanesi seçilmiş ve ITS bölgelerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Her iki dizi analizi sonucunda, toplam 14 adet strain arasından 11 tanesinin 26S rDNA tanısı, ITS bölgelerinin dizi analizi ile doğrulanmış ve birbirleri ile aynı olduğu görülmüştür. Bunların yanı sıra, 40, 66 ve 100 numaralı maya strainlerinin sonuçlarında farklılık tespit edilmiştir. 26S rDNA sekans analizi ile *Candida davisiana* olarak tanımlanan bu maya straini, ITS bölgesinin sekans analizine göre ise *Sporobolomyces lactosus* olarak tanımlanmıştır. Olası hatalara mahal vermemek için her iki rDNA bölgesinin dizisi birkaç kez sekans analizine tabii tutulmuş ancak sonuç değişmemiştir. Bu uyuşmazlığın sebebi, sekans analizinin tarafımızdan yapılmaması nedeniyle irdelenememiştir. Bu sonuçlar ışığında,

sadece fenotipik testlerin veya sadece genotipik testlerin ya da sadece sekans analizinin tanılamada tek başına yeterli olmadığını ve bütün bu testlerin kombine kullanılması sonucunda tanılamaya gidilmesinin en doğru yöntem olduğu yapılan araştırmada kanıtlanmıştır. Dolayısıyla bu testlerin son derece dikkatli, profesyonel kişiler tarafından tekrarlamalı şekilde ve doğru olarak yapılmasının önemi de ortaya çıkmıştır.

Hesham et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada yüksek molekül ağırlıklı PAH'lar için elde edilen yüksek giderme verimi; karışık maya strainlerinin petrol ile kontamine olmuş alanların temizlenmesi için önemli bir rol oynayabileceği göstermişlerdir. *Candida maltosa* ve *Pichia guilliermondii*'nin 6 haftalık uygulama süresince predominant mayalar olduğu gösterilmiştir. Hesham et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak naftalen yerine fenantren veya diğer aromatik hidrokarbonlar seçilerek yüksek molekül ağırlığına sahip PAH'ları kullanabilen güçlü strainler elde edilmiştir. *Candida viswanathii straini* diğerlerinden daha hızlı bir büyüme sergilemiş ve düşük molekül ağırlıklı ve yüksek molekül ağırlıklı PAH karışımlarından yararlanabilmiştir. Sood and Lal (2009) tarafından yapılan çalışmada Digboi rafinerisindeki kontamine toprağın zenginleştirilmesi *Candida digboiensis* olarak tanımlanan yeni bir maya izolatının elde edilmesini sağlamış ve bu maya straini pH 3'te petrol çamurunda bulunan hidrokarbonları kullanabilmektedir. Song et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada *Rhodococcus* sp. alifatik hidrokarbonların yanı sıra yüksek molekül ağırlıklı PAH'ları da degrade edebilmekte ve petrol ile desteklenmiş sıvı ortamda sıvı yüzeyinde durma eğilimi göstermektedir. Bu bulgular, P14 suşunun doğadaki petrol sızıntılarının biyoremediyasyonunun gelecek uygulamaları için kullanışlı olabileceğine işaret etmişlerdir. Hassanshahian et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise *Y. lipolytica* PG-20 ve PG-32 strainleri Basra Körfezi'nde biyoremediyasyon prosesinde ve deniz ekosistemindeki petrol kirliliğinin azaltılmasında yararlı olabileceğini tespit etmişlerdir.

Yukarıda söz edilen araştırmalardan anlaşıldığı üzere mayalar poliaromatik hidrokarbonları parçalamada kapasitelerinde ilgi çekici olduğu görülmektedir. Araştırmamızda da izolasyonu yapılan ve fenotipik olarak tanımlanan maya izolatlarının iki halkalı naftalen, üç halkalı fenantren, dört halkalı piren olarak

seçilen poliaromatik hidrokarbonları ve ham petrolü parçalama kapasiteleri mikrotitre plate yöntemi ile belirlenmiştir (Malatova, 2005).

Margesin et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada 61 bakteri ve 28 maya izolatının poliaromatik hidrokarbonları parçalama kapasitelerini belirlemek için mikrotitre plate yöntemi kullanmıştır. Her bir 200 µl BHM içeren mikroplate kuyucuğuna final konsantrasyonu 5.6 µM olacak şekilde asetonda (%99.9 saflıkta) özündürülmüştür. Asetonun uçması için 1 gün oda sıcaklığında bekletmiş. Asetonun uçmasının ardından 10 µl hücre süspansiyonu ilave etmiş ve 10⁰C'de 14 gün inkübasyona bırakmış ve inkübasyonun ardından büyümeleri mikrotitre plate okuyucusunda belirlemiştir (Margesin et al., 2003). Malatova (2005) tarafından yapılan çalışmada Batı Newyork'daki üç habitattan hidrokarbon degradasyonunda rol oynayan mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirilmiş ve 29 farklı tür bulmuştur. Tüm strainler tek karbon ve enerji kaynağı olarak ham petrol ile sıvı ortamda kültive etmiştir. Hidrokarbon degradasyonunda rol oynayan mikroorganizmaların parçalama kapasitelerinin belirlemesi için mikrotitre plate yöntemi kullanmıştır. Mikrotitre plate kuyucuklarına 300 µl BHM, 50 µl hücre süspansiyonu ve 7 µl hidrokarbon içerecek şekilde hazırlanmış ve 27⁰C de 27 gün inkübasyonun ardından 50 µl p-iodonitrotetrazolium violet (INT) indikatörü her bir kuyucuğā ilave edilmiş ve 1 gün 27⁰C'de inkübasyona bırakmıştır. İnkübasyonun ardından kırmızı çökelti oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirmiştir (Malatova, 2005). Bu alışmalar ışığında önceden izolasyonu ve fenotipik tanısı yapılan izolatların piren, fenantren, naftalen ve ham petrolü parçalama yeteneklerinin belirlenmesi için mikrotitre plate yöntemi kullanılmıştır. Farklı kaynaklarda mikroorganizmaların hidrokarbonları parçalama kapasitesini test etmek için Busshnell Hass Medium (BHM) ve Mineral Salt Medium (MSM) kullanıldığını görölmektedir (Margesin et al., 2003; Malatova, 2005). Araştırmamızda da benzer içerikleri göz önüne alınan ortamlardan Busshnell Hass Medium tercih edilmiş ve 96 tane mikroplate kuyucuklara aktarılmıştır.

Naftalen, piren ve fenantren gibi poliaromatik hidrokarbonlar ethanol, methanol (MeOH), dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO) diklorometan, ve aseton gibi organik solventlerde rahatlıkla çözünebilmektedir (Dong et al., 2002; Margesin et al., 2003; Türkmen, 2005; Leyton, 2005;

Alderman, 2007; Llado, 2009). Ancak test edilen hidrokarbonların suda çözünürlüklerinin düşük olması, asetonda çözünürlük seviyelerinin yüksek olması ve asetonun uçucu özelliği nedenleriyle hidrokarbonların asetonda çözündürülmesi tercih edilmiştir (Margesin et al., 2003; Leyton et al., 2005; Alderman et al., 2007). Mikrotitre plate yönteminde fenantren, piren, naftalen çözünmesinin ardından asetonun uçması için plateler oda sıcaklığında 1 gün bekletilmiştir (Margesin et al., 2003).

Mikrotitre plate yöntemi sonucu ve üreme olup olmadığının gözlenmesi için Trifeniltetrazolium klorür (TTC) indikatörü ilave edilmiş plateler tekrar 27°C’de bir gün inkübasyona bırakılmıştır (Malatova, 2005) . TTC indikatörü metabolik olarak aktif ve inaktif hücreleri ayırt etmek için kullanılan bir redoks indikatörüdür. Renksiz olan TTC indikatörü enzimatik olarak çeşitli dehidrogenazların aktivitesi sonucu canlı hücrelerde kırmızı trifenilformazana (TPF) indirgenmektedir. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda oluşan kırmızı renk, hidrokarbon kullanımı için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Malatova, 2005). Tarama sonuçlarına göre, test edilen poliaromatik hidrokarbonların birden fazlasını ve ham petrolü kullanma kapasitesine sahip izolatlar seçilmiştir. Seçilen 12, 15 ve 29 numaralı izolatlar fenantren, naftalen ve piren hidrokarbonlarını, 13, 14, 67 ve 89 numaralı izolatlar fenantren, piren hidrokarbonlarını ve ham petrolü, 17, 22, 40, 43, 45, 54, 69, 80, 82, 85, 87, 90 ve 93 numaralı izolatlar fenantren, piren, naftalen hidrokarbonlarını ve ham petrolü, 27 ve 100 numaralı izolatlar fenantren hidrokarbonunu ve ham petrolü, 39 numaralı izolat piren hidrokarbonunu ve ham petrolü, 66 numaralı izolat fenentren ve piren hidrokarbonlarını, 79 numaralı izolatlar piren, naftalen hidrokarbonlarını ve ham petrolü, 88 numaralı izolat ise fenantren, naftalen hidrokarbonlarını ve ham petrolü kullanmakta olduğu tespit edilmiştir. Denemeye alınan her üç PAH’ı da parçalama kapasitesinde olan strainlerin konuyla ilgili olan girişimcilere kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda genetik mühendisliğindeki gelişmeler neticesinde dizayn edilen yeni ve etkili organizma gruplarının kontaminantların uzaklaştırılmasında gösterdikleri performans sonucunda doğaya en uyumlu olan biyolojik yöntemler tercih edilmeye başlanmıştır. Elde edilen strainlerin parçalama kapasitesine sahip

olan enzim genleri rekombinant DNA yöntemleri ile tek bir strainde toplanarak daha fazla oranda PAH parçalama kapasitesine sahip strain elde edilebilecektir. Bu nedenle bu çalışmada, PAH parçalanmasında etkili olan maya strainlerinin izolasyonu ve doğru şekilde identifikasyonu yapılması gereği aynı zamanda screening yöntemleri de önem kazanmaktadır. Belirtilen nedenlerle bu çalışma planlanmış ve sonuçta PAH parçalayan strainler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmış ve ilerdeki yapılacak rekombinant çalışmalarına temel oluşturacağı düşünülmektedir. Farkında olduğu kadarıyla bu amaca hizmet eden ticari maya straini bulunmamaktadır. Dolayısıyla, yüksek parçalama aktivitesine sahip bir strain bulunabilirse, ülkemize katma değer kazandırılabilir ve tanker kazaları sonucunda oluşan kirliliklere çare olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acheamong, E.A.A.**, 2000, Some aspects of the taxonom, genetics, carotenogenesis and chemical composition of a red yeast *Rhodotorula rubra*, TPI, MSc Thesis, Memorial Universty of Newfoundland, 175p.
- Ahearn, D.G. and Crow, S.A.**, 1980, Yeast in the North Sea end Amoco Cadiz, Bot. Mar., 23:125p.
- Alderman, S., N'Guessan, N.L. and Nyman**, 2007, Effective treatment of PAH contaminated Superfund site soil with the peroxy-acid process. Journal of Hazardous Materials, 146: 652–660.
- Aleksieva, Z., Ivanova, D., Godjevargova, T. and Atanasov, B.**, 2000, Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57, Process Biochemistry, 37:1215-1219 p.
- Alexander, M.**, 1999, Biodegradation and Bioremediation, 2nd Ed., Academic Pres, New York, 453p.
- Alexopoulos, C.J.**, 1962, Introductory Mycology, 2nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 220p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M.**, 1996, Introductory Mycology, 4nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 867p.
- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W.**, 1979, Introductory Mycology, 3rd Ed., John Wiley and Sans, New York, 307p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M.**, 1996, Introductory Mycology, 4nd Ed., John Wiley and Sans, New York, 867p.
- Alloway, B. J. and Ayres, D. C.**, 1997, Chemical Principles of Environmental Pollution, 2. baskı, Chapman& Hall, 381p.
- Altınbaş, U., Dökmeci, S. ve Barıştıran, A.**, 1995, *Environmental Technology*, 16, 389.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. and Lombardi, A.,** 2000, Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products, *Letter in Applied Microbiology*, 30: 5-9.
- Anon,** 1991, U. S. Congress, Office of Technology Assessment, *Bioemediation for Marine Oil Spills*, OTA-BP-O-70 Washington, DC: U. S. Government Printing Office.
- Arda M.,** 2000, “Temel Mikrobiyoloji” Medisan Yayın Serisi, Genişletilmiş İkinci Baskı No:46, Ankara.
- Arı A.,** 2008, Eskişehir atmosferindeki polisiklik aromatik hidrokarbonların derişimlerinin ve kaynaklarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 110 s.
- Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M. and Parish, M.E.,** 2002, Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods, *Applied and Environmental Microbiology*, 1955-1961.
- Arie, M., Matsuda, H., Furuhashi, K. and Takagi, M.,** 2000, Phylogenetic identification of n-alkane assimilating *Candida* yeasts based on nucleotide divergence in the 59 end of LSU rDNA gene, *J Gen Appl Microbiol*, 46: 257-262.
- Arlorio, M., Coisson, J.D. and Martelli, A.,** 1999, Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA, *Eur Food Res Technol*, 209 :185–191.
- Atlas, R.M.,** 1981, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective, Vol: 45 (1), p. 180-209.
- Atlas, R.M.,** 2004, *Handbook of Microbiological Media*, 3th Ed., CRC Press, Boca Raton, 2051p.
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R.E.,** 1997, *Short Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, 3rd ed., New York.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Awobajo, A.O.**, 1981, An analysis of oil spill incidents in Nigeria. Proceedings of National Seminar on Petroleum Industries and Nigerian Environment. Warri API publication #4424. Washington DC, 57-63 pp.
- Baker K.H. and Herson D.S.**, 1994, Bioremediation. McGraw – Hill, New York.
- Banwart, G. J.**, 1981, Basic Food Microbiology, AVI Publishing Co. Inc, Westport, 519p.
- Barathi, S. and Vasudevan, N.**, 2001, Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil, Environ Int, 26(5-6): 413–416.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D.**, 1983, Yeasts: Characteristics and Identification, 1th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 811p.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D.**, 2000, Yeasts: Characteristics and Identification, 3th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1139p.
- Barnett, J.A.**, 2004, A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast* 21: 1141–1193.
- Beech, F.W. and Davenport, R.R.**, 1971, Methods in Microbiology, Academic Press, London, 4:153-188p.
- Beneke, E.S. and Stevenson, K.E.**, 1987, Food and Beverage Mycology, 2nd Ed., Van Nostrand Reinhold Publishers, New York, p. 1-17.
- Beuchat, L.R., Fraandberg, E., Deak, T., Alzamora, S. M., Chen, J., Guerro, S., Lopez, M. A., Ohisson, J., Olsen, M., Peinado, J. M., Schnurer, J., Silaniz, M. T. and Lehoezki, J. T.**, 2001, Performance of mycological media in enumerating desicated food spoilage yeast: an interlaborotary study, Int. Journal of Food Microbiol., 70: 89-96p.
- Bille,J., Stockman, L., Roberts, G.D., Horstmeier, C.D. and Ilstrup,D.M.**, 1983, Evaluation of a Lysis-Centrifugation System for Recovery of Yeasts and Filamentous Fungi from Blood, *Journal Of Clinical Microbiology*, Sept. 1983, P. 469-471

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bjorseth, A. and Ramdahl, T.**, 1985, Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Marcel Dekker, New York.
- Boekhout, T., Robert, V. and Phaff, H.**, 2003, Yeast in Food: Beneficial and Detrimental Aspects, CRC Pres, Boca Raton, 69-121 p.
- Boehm, P.D., Page, D.S., Gilfillan, E.S., Bence, A.E., Burns, W.A. and Mankiewicz, P.J.**, 1998, “Study of the fates and effects of the Exxon Valdez oil spill on benthic sediments in two bays in PrinceWilliam Sound, Alaska—I. Study design, chemistry, and source fingerprinting”, *Environmental Science and Technology*, 32: 567–576.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I. and Siezen, R.J.**, 2009, Hydrocarbon degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew, *Microbial Biotechnology*, 2(6): 587–594.
- Brown, K.W., Donnelly, K.C. and Dewel, L.E.**, 1983, Effects of Mineral Nutrients, Sludge Application rate, and application frequency on biodegradation of two oily sludges, *Microbial Ecology* 9 : 363– 373.
- Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A. and Giudici, P.**, 2001, Identification of *Pichia anamola* isolated from yoghurt by RFLP of ITS region, 71:71-73.
- Capone, D.G. and Bauer, J.E.**, 1992., *Environmental Microbiology*, John Wiley & Sons Inc, New York, 411p.
- Cappa, F. and Cocconelli , P.S.**, 2001, Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis, *Food Microbiology*, 69: 157-160.
- Castellano, A.V., Cancio, J.L., Aleman, P.S. and Rodriguez, J.S.**, 2003, “Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air particles in the city of Las Palmas de Gran Canaria”, *Environment International*, 29: 475-480.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. and Van Baalen, C.**, 1980, Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and migroalgae, *J. Gen. Microbiol.*, 116: 495-500.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chaillan, F., Le Fleche, A. and Bury, E.,** 2004, Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms, *Res Microbiol*, 155(7): 587–595.
- Charles Darwin Foundation, 2001.** Galapagos oil spill, [http:// www.darwinfoundation.org /oilspill](http://www.darwinfoundation.org/oilspill) (Erişim tarihi:14 Eylül 2012).
- Chen, Y.C., Eisner, J.D., Katar, M.M., Rassoulia-Barrett, S.L., Lofe, K., Yarfitz, S.L., Limaye, A.P. and Cookson, B.T.,** 2000, Identification of medically important yeasts using PCR- based detection of DNA sequence polymorphisms in the rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2302-2310.
- Chen, S.C. and Liao, C.M.,** 2006, “Health risk assesment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources”, *Science of the Total Environment*, 366: 112-123.
- Cohen, Y.,** 2002, Bioremediation of Oil by Marine Microbial Mats, *International Microbiology.*, 5:189-193.
- Cookson, J.T.,** 1995, Bioremediation engineering: design and applications. Mc – Graw – Hill, New York.
- Couto, B.M.M., Van der Vossen, J.M.B.M., Hofstra, H. and Huis in’t Veld, J.H.J.,** 1994, RAPD analysis : a rapid technigue for differentiation of spoilage yeasts, *International Journal of Food Microbiology*, 24:249-260.
- Couto, B.M.M., Vogels, J.T.W.E., Hofstra, H., Huis in’t Veld, J.H.J. and Van der Vossen, J.M.B.M.,** 1995, Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy two identification techniques for foof-borne yeasts, *Journal Applied Bacteriology*, 79: 525-535.
- Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F. and Palmas, F.,** 2001, Yeasts associated with Sardinian ewe’s dairy products, *International Journal of Food Microbiology*, 69:53-58.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çıtak D.**, 2006, Zeytinyağı ve pirina yağındaki bap kirliliğinin HPLC ile tespiti, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 68s.
- Çorbacı, C.**, 2008, Yüksek sıcaklık ve ekstrem pH'da *Debaryomyces hansenii* strainlerinin büyümesi üzerine sodyumun etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 207s.
- Das, N. And Chandran, P.**, 2011, Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview, SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International, Article ID 941810, 13 pages doi:10.4061/2011/941810.
- Daugulis, A.J. and McCracken, C.M.**, 2003, Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp., Biotechnol Lett, 25(17): 1441–1444.
- Deak, T.**, 1995, Methods for the rapid detection and identification of yeast in food, *Trends in Food Science Technology*, 6 :287-292p.
- Deak, T.**, 2006, Safety and Quality of Fermented Foods: New Developments in Biopreservation, 195s.
- Deak, T.**, 2007, Handbook of food spoilage yeasts, New York, USA, CRC Pres, 325 pp.
- Deak, T. and Beuchat, L.R.**, 1996, Handbook of food spoilage yeasts, New York, USA, CRC Pres, 315p.
- Deak, T., Beuchat, L.R., Guerzoni, M.E., Lillie, A., Peter, G., Rohm, M., Schnürer, F., Tabajdi, P.V. and Westphal, S.**, 1998, A collaborative study on media for the enumeration of yeast in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 43: 91-95.
- Deak, T., Chen, J. and Beuchat, L.R.**, 2000, Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from Poultry, *Applied and Environmental Microbiology*, 4340-4344.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Del'Arco, J.P. and de França, F.P.**, 1999, Biodegradation of crude oil in sandy sediment, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44: 87-92.
- Del'Arco J. P. and de França F.P.**, 2001, "Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment" *Environmental Pollution* 110: 515-519.
- Demir, İ. ve Demirbağ, Z.**, 1999, Polisiklik aromatik hidrokarbonların biyolojik olarak Parçalanması, *Turkish Journal of Biology*, 23: 293-302.
- Dibble, J.T. and Bartha, R.**, 1979, Effect of Environmental parameters on the biodegradation of oil sludge, *Applied and Environmental Microbiology* 37: 729 – 739.
- Dong, S., Wang, S., Stewart, G., Hwang, H.M., Fu, P.P. and Yu, H.**, 2002, Effect of Organic Solvents and Biologically Relevant Ions on the Light-Induced DNA Cleavage by Pyrene and Its Amino and Hydroxy Derivatives, *International Journal of Molecular Sciences*, 3: 937-947.
- Eisler, R.**, 2000, "Polycyclic aromatic hydrocarbons", *Handbook of Chemical Risk Assessment*, *Lewis Publishers, Boca Raton, FL*, Chap. 25.
- Ekundayo, E.O. and Obuekwe, C.O.**, 2000, Hydrocarbon utilization in yeast isolates found to grow in association with petroleum in a polluted ultisol of Midwestern Nigeria, *Environmental Monitoring and Assessment*, 63: 381-387p.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A.**, 1999, Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337p.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Statzell-Tallman, A.**, 2000, Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit r D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Environ Microbiol*, 50: 1351-1371p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feriello, D.A., Mylroie, J.R., Gibson, D.T., Rogers, J.E. and Chakrabarty, AM.,** 1976, J. Bacterial., 127,1217.
- Fernandez, M.T., Ubedo, J.F. and Briones, A.I,** 1999, Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation by physiological and molecular methods. FEMS Microbiology Letters ,173: 223-229.
- Fernandez-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B , Querol, A. and Barrio, E.,** 2000, RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5,8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts, Antonie van Leeuwenhoek, :78: 87-97.
- Fleet, G.H.,** 2006, The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production: In: Querol, A., Fleet, G.H., (Eds.): Yeasts in Food and Beverages.Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-12 pp.
- Frankenberger, W.T.,** 1992, The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: Calabrese EJ, Kostecki PT (eds) Hydrocarbon contaminated soils and ground water, Vol2, Lewispublishers, Boca Raton, 237 – 293 pp.
- Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.,** 1988, Food Microbiology, Mc Grow Hill Book Co., New York, 516p.
- Fujita, S., Senda, Y., Nakaguchi, S. and Hashimota, T.,** 2001, Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains, Journal of Clinical Microbiology, 3617-3622.
- Garon, D., Krivobok, S. and Seigle-Murandi, F.,** 2000, Fungal degradation of fluorene, Chemosphere 40: 91-97.
- Gibson, D.T.,** 1984, Microbial degradation of organic compounds, Marcel and Dekker Inc., New York, (*Microbiology Series*) 13: 535p.
- Gomes, L.H., Duarte, K.M.R., Argueso, J.L., Echevergaray, S. and Tavares, F.C.A.,** 2000, Methods for yeast characterization from industrial products, Food Microbiology, 17: 217-223.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Greenberg, B.M., Huang, X.-D., Gerhardt, K., Glick, B.R., Gurska, J., Wang, W., Lampi, M., Khalid, A., Isherwood, D., Chang, P., Wang, H., Wu, S.S., YU, X.-M., Dixon, D.G. and Gerwing, P.,** 2007, Field and laboratory tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils, In: Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Remediation Symposium. Gavaskar, A.R. and Silver C.F., eds., Batelle Press, Columbus, OH.
- Guillamon, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J. and Querol, A.,** 1998, Rapid identification of wine yeast species based on RFLP Analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region, *Arch. Microbiol.*, 169: 387-392.
- Gutnick, D.L. and Rosenberg, E,** 1977, Oil Tankers and Pollution: A microbiological Approach, *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 379-396.
- Hammel K.E., Gai, W.Z., Green, B. and Moe, M.A.,** 1992, Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied And Environmental Microbiology*, 1832-1838 p.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. and Shutsubo, K.,** 1999, Petroleum biodegradation in marine environments, *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 63-70.
- Haritash, A.K. and Kaushik C.P.,** 2009, Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Journal of Hazardous Materials*, 169:1-15.
- Harold, H., Hart, D. J. and Craine, L.E.,** 1998, Organik chemistry, Ninth Ed, Palmer Publishing, New Jersey, Çeviri Ed. Tahsin Uyar, Ankara.
- Hassanshahian, M., Tebyanian H. and Capello, S.,** 2012, Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf, *Marine Pollution Bulletin* 64 (2012) 1386-1391.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hesham, A.E.L., Khan, S., Zhang,Y., Wang, Z. and Yang, M.,** 2006, Application of PCR–DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil, *Wiley InterScience*, 23: 879–887.
- Hesham, A.E.L., Alamri, S.A., Khan, S., Mahmoud, M.E. and Mahmoud H.M.,** 2009, Isolation and molecular genetic characterization of a yeast strain able to degrade petroleum polycyclic aromatic hydrocarbons *African Journal of Biotechnology* ,8 (10): 2218-2223pp.
- Hesham, A. and Yang, M.,** 2010, Biodegradation of petroleum compounds and environmental meta-genomics, Academic Publishing, Lexington, 172 pp.
- Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A. and Guillamon, J.M.,** 2004, New PCR-based methods for yeast identification, *Journal of Applied Microbiology*, 97: 792-801.
- Huddleston, R.L., Bleckmann, C.A. and Wolfe, J.R.,** 1984, Land treatment biological degradation processes. In: Loehr RC, Maliha JF (eds) Land treatment: a hazardous waste management alternative. Water Resources Symposium Number 13, University of Texas at Austin, 41 – 61 pp.
- Huesemann, M.H. and Truex, M.J.,** 1996, The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminated soils. *J hazard mater* 51: 93 –113.
- Hupe, K., Heerenklage, J. and Stegmann, R.,** 1999, Influence of oxygen on the degradation of TPH contaminated soils. In: Allemann BC, Leeson A (eds) Bioreactor and ex situ biological treatment technologies. Battelle Press, Columbus, OH, 31 – 36pp.
- Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J.L., Sorensen, D.L. and Mcleon, J.E.,** 1997, Soil gaz oxygen tension and pentachlorophenol biodegradation, *Journal of Environmental Engineering*, 364 – 370.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ijah, U.J.J.**, 1998, Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil, *Waste Management*, 18:293-299 p.
- Environmental Health Criteria**, 1998,
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm> (Erişim tarihi:19 Ağustos 2012).
- Jakobsen, M. and Narvhus, J.**, 1996, Yeast and their possible beneficial and p. negative effects on the quality of dairy products, *Int. Dairy Journal*, 6:755-768.
- Jancy, J. and Barbier, G.**, 2008, Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol*, 25: 839-848.
- Jarvis, B. and Williams, A.P.**, 1987, *Food and Beverage Mycology*, 2nd Ed., Van Nostrand Reinhold Int. Co., New York, 612p.
- Jobson, A., Cook, F.D., and Westlake, D.W.S.**, 1972, Microbial utilization of crude oil, *Appl Microbiol*, 23: 1082-1089.
- Jussila, M. M.**, 2006, Molecular biomonitoring during rhizoremediation of oil contaminated soil, Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki, Finland.
- Kanemitsu, H., Fukuda, M. and Yano, K.**, 1980, *Journal of Fermentation Technology*, 58: 175.
- Karakaya A.**, 2003, Polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalan bir grup işçide hücresel immün fonksiyonların incelenmesi. T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu.
- Kerr, R., Kintisch, E. and Stokstad, E.**, 2010, Will Deepwater Horizon Set a New Standard for Catastrophe, *Science*, 328 (5979): 674 – 675, Abstract.
- Kirsop, B.E.**, 1984, *A Manual of Laboratory Methods*, Academic Press Inc., London, 109-127 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kirsop, B.E. and Kurtzman, C.P.**, 1988, Living Resources for Biotechnology: Yeasts, Cambridge University Press, Cambridge, 222p.
- Kim, T.H., Lee, J.H., Bae, K.S. and Kim, S.J.**, 1999, Identification and characterization of an oil-degrading yeast *Yarrowia lipolytica* 180, J Microbiol, 37: 128–135.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A. and Santas, R.**, 1997, Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 677-686.
- Kösesakal, T.**, 2011, Tatlı su eğreltisi *Azolla filiculoides* lam. kullanılarak petrol hidrokarbonlarının fitoremediasyonu. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kreger-van Rij, N.J.W.**, 1984, The Yeast a Taxonomic Study, Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 1082p.
- Kurtzman, C.P.**, 1990, Classification of general properties of yeasts, Marcel Decker Inc., New York, 1-34 p.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J.**, 1995, Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeast like taxa. Can J Bot 73: 824-830.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.**, 1998, Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek 73: 331-371.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J.**, 2003, Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses, FEMS Yeast Res, 3: 417-432.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W.**, 2006, Yeast systematics and phylogeny-implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (Rosa, C., Peter, G., eds). Springer, Berlin, 11–30pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kutty, S.N. and Philip, R.**, 2008, Marine yeasts ,a review, *Yeast*; 25: 465–483.
- Latouche, G.N., Daniel, H.M., Lee, O.K., Mitchell, T.G., Sorrell, T.C. and Meyer, W.**, 1997, Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species, *Journal of Clinical Microbiology*, 3171-3180.
- Lawrence, J.F. and Weber D.F.**, 1984, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some canadian commercial fish, shelfish, and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatograpy-mass spectrometry, 32, No. 4.
- Leahy, J.G. and Colwell. R.R.**, 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiol Rev*, 54 (3): 305–315.
- Lee, S.C., Ho, K.F., Chan,L.Y., Zielinska, B. and Chow, J.C.**, 2001, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and carbonyl compounds in urban atmosphere of Hong Kong, *Atmospheric Environment*, 35: 5949-5960.
- Lee, W.J., Wang, Y.F., Lin T.C. and Chen, Y.Y**, 1995, PAH characteristics in the ambient air of traffic- source. the science of the total environment, 159: 185- 200.
- Leeson, A. and Hinchee, R.E.**, 1997, *Soil bioventing: Princibles and Practice*. Lewis publishers, Boca Raton.
- Leyton, P., Sanchez-Cortes, S., Campos-Vallette, M., Domingo, C., Garcia-Ramos, J.V. and Saitz, C.**, 2005, *Applhed Spectroscopy*, Volume 59, Number 8: 1009-1015.
- Levinton, J.S.**, 1995, *Marine Biology, Function, Biodiversity, Ecology*, Oxford Univ. Press, New York, 420p.
- Li, A., Jang, J.K. and Scheff, P.A.**, 2003, Application of EPA CMB8.2 Model for Source Apportionment of Sediment PAHs in Lake Calumet, Chicago. *Environmental Science & Technology*, 37: 2958–2965.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pedersen, J.,** 2000, Rapid Mini- Preparation of Fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 0095-1137/00/04.0010.
- Llado', S., Jimé'nez., N., Vin'as, M. and Solanas, A.M.,** 2009, Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil, *Biodegradation*, 20:593–601.
- Lodder, J.,** 1970, *The Yeasts a Taxonomic Study*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Lodder, J. and Kreger-van Rij, N.J.W.,** 1952, *The Yeasts a Taxonomic Study*, North Holland Publishin Co., Amsterdam, 840p.
- Lodovici, M., Venturini, M., Marini, E., Grechi, D. and Dolara, P.,** 2003, "Polycyclic aromatic hydrocarbons air levels in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants", *Chemosphere*, 50: 377-382.
- Lopes, M.B., Soden, A., Henschke, P. and Langridge, P.,** 1996, PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers, *Applied and Environmental Microbiology*, 4514-4520.
- Lopez,V., Querol,A., Ramon,D. and Fernandez-Espinar,T.,** 2001, A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts, *International Journal of Food Microbiology*, 68,75-81.
- Loureiro, V. and Querol, A.,** 1999, The prevalence an control of spoilage yeasts in foods and beverages, *Trends in Food Science & Technology*, 10: 356-365p.
- Loureiro, V.,** 2000, Spoilage yeasts in foods and beverages : characterisation and ecology for improved diagnosis and control, *Food Research International*, 33: 247-256p.
- MacGillivray, A.R. and Shiaris, M.P.,** 1993, Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Yeasts Isolated from Coastal Sediments, *Applied and Environmental Microbiology* , 59 (5): 1613-1618p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malatova K.**, 2005, Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in Western New York State.
- Margesin,R., Gander, S., Zacke, G., Gounot, A.M. and Schinner, F.**, 2003, Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts, 7:451–458, DOI 10.1007/s00792-003-0347-2.
- Martin, J.P.**, 1950, Use of acid, rosebengal and streptomisin in the plate method for estimating soil fungi, *Soil Sci.*, 69: 215-233p.
- Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S. and Barcelo, D.**, 2004, Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels, *Journal of Chromatography A*, 1047: 181–188.
- Martini, A.V.**, 2003, Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine, *International Microbiology*, 6: 175-182.
- Martorel, P., Fernandez-Espinar, T. and Querol, A.**, 2005, Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces*, 5: 1157-1165.
- Memon, A., Altuğ, G., Ünlü, S., Ertekin, E., Yıldızhan, Y., Onarıcı, S., Erol, Ç., Kösesakal, T., Gürün, S., Pelitli, V. and Kurtoğlu, H.**, 2008, Bitki, alg ve mikroorganizmalar kullanılarak hidrokarbonlarla kirlenmiş alanların iyileştirilmesinin araştırılması TÜBİTAK Kamu Kurumları Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı (1007) 105G079 (5063302-MAM No) numaralı projenin 4. dönem ara raporu.
- Molobela, I.P.**, 2005, Development of rhizoremediation as a treatment technology in the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from the environment, Thesis (M.Sc), University of Pretoria.
- Moret, S. and Conte, L.S.**, 2000, Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical method, *A*, 882: 245-253.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Neff, J.M.**, 1985, "Polycyclic aromatic hydrocarbons", Fundamentals of Aquatic Toxicology, Rand, G., M., and Petrocilli, S., R., Eds., *Hemisphere*, New York, Chap. 14.
- Ness, F., Lavellee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. and Dulau, L.**, 1993, Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62: 89-94.
- Nnamchi, C.I., Obeta, J.A.N. and Ezeogu, L.I.**, 2006, Isolation and characterization of some polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from Nsukka soils in Nigeria, *International Journal of Enviornmental Science and Technology*, 3, No. 2, 181-190 pp.
- Olivera N.L., Esteves J.L. and Commendatore M.G.**, 1997, "Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina" *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 40, No. 1: 75-79.
- Öztürk Y., H.T.**, 2007, Beyaz Peynirlerde Bozulmaya Neden Olan *Yarrowia lipolytica* ve *Debaryomyces hansenii*'nin Fenotipik ve Genotipik İdentifikasyonu, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 206s.
- Paffetti, D., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Fani, R., Fia, G., Mori, E. and Polsinelli, M.**, 1995, DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction length polymorphism is useful for east typing, *Research in Microbiology*, 146: 587-594.
- Pan, F., Yang, Q., Zhang, Y., Zhang, S. and Yang, M.**, 2004, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pichia anomala*, *Biotechnology Letters*, 26: 803-806.
- Petersen, K.M., Moller, P.L. and Jespensen, L.**, 2001, DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* straina and other yeasts related to surface ripened cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 11-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perez, M.A., Gallego, F.J. and Hidalgo, P.,** 2001, Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains, *FEMS Microbial Letters*, 205: 375-378.
- Phaff, H.J., Miller, M.W. and Mrak, E.M.,** 1966, *The Live of Yeasts*, Harward University Press, Cambridge, 186p.
- Pierre, B., Sabahudin, H., Keith, B.M. and John, H.T.L.,** 2006, Analysis of the 16 environmental protection agency priority polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography-oxidized diamond film electrodes, *Journal of Chromatography A*, 1103: 248-256.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D.,** 1985, *Fungi and Food Spoilage*, Academic Press, London, 685p.
- Pizzul, L.,** 2006, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Actinomycetes, Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Prabhukumar, G. and Pagilla, K.,** 2010, “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Runoff – Sources, Sinks and Treatment: A Review, DuPage River Salt Creek Workgroup”, *Naperville, IL*.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D.,** 1992, A comparative study of different methods of yeast strain characterization, 15: 439-446.
- Randhir, S.M. and Rockne, K.J.,** 2003, Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 10: 2280-2292.
- Raper, K.B. and Fennell, D.I.,** 1965, *The Genus Aspergillus*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 545p.
- Raper, K.B. and Thom, C.,** 1949, *A Manual of the Penicillia*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 320p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rathore, H.S. and Sherma, J.**, 1993, Handbook of Chromatography: Liquid Chromatography of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. CRC Pres, United States of America.
- Rechcigl, M.**, 1978, CRC Handbook Series in Nutrition and Food. Sect. G. Diets, Culture Media, Food Supplements. Vol. 3. Culture Media for Microorganisms and Plants, CRC Press, Cleveland, 647 p.
- Restrepo, B., Verbel, J.O., Lu, S., Fernandez, J.G., Avila, R.B., Hoyos, I.O., Aldous, K.M., Addink, R. and Kannan, K.**, 2008, Polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in fish bile and sediments from coastal waters of Colombia, *Environmental Pollution*, 151, 3, 452-459.
- Riser-Roberts, E.**, 1998, Remediation of petroleum contaminated sites: biological, Physical and Chemical Processes, CRC Press, USA, 542p.
- Romero, M.C., Cazau, M.C., Giorgieri, S., and Arambarri, A.M.**, 1998, Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream, *Environ Pollut*, 101:355-359.
- Romero, M.C., Salvioli, M.L., Cazau, M.C. and Arambarri, A.M.**, 2002., Pyrene degradation by yeast and filamentous fungi, *Environmental Pollution*, 117:159-163, p.
- Rose, A.H.**, 1971, Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms, *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, London, 5: 1-43p.
- Salanitro, J.P.**, 2001, Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. *Adv. Agron*, 72: 53-105.
- Salicis, F., Krivonok, S., Jack, M. and Benoit-Guyod, J.L.**, 1999, Biodegradation of Fluoranthene by Soil Fungi, *Chemosphere*, 38, No. 13, 3031-3039p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salminen, J.M., Tuomi, P.M., Suortti, A.M. and Jorgensen, K.S.,** 2004, Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface, *Biodegradation*, 15: 29-39p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Shuman, H.A.,** 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2 nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandven, P.,** 1990, Laboratory identification and sensitivity testing of yeasts isolates, *National Institute of Public Health* , 48: 27-36p.
- Santos, E.C., Jacques, R.J.S., Bento, M.F., Maria doCarmo R. Peralba, Selbach P.A. Enilson L.S. Sa'a, Fla'vio A.O. Camargo,** 2008, Anthracene biodegradation and surface activity by an ironstimulated *Pseudomonas sp.*, *Bioresource Technology*, 99, 7, 2644-2649.
- Smith, M.R.,** 1990, The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacterial, *Biodegradation*, 1: 191-206.
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T. and Hu, Z.,** 2011, Isolation, characterization of *Rhodococcus sp.* P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons, *Marine Pollution Bulletin* 62: 2122–2128.
- Sood, N. and Lal, B.,** 2009, Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions, *Journal of Environmental Management* 90: 1728–1736.
- Stegman, R., Brunner, G., Calmano, W. and Matz, G.,** 2001, Treatment of Contaminated Soil: Fundamentals, Analysis, Applications, 63-83.
- Şafak, S., Mercan, N., Aşım, B., Beyath, Y.,** 2002. A Study on the Production of Poly-Beta-Hydroxybutyrate by Some Eucaryotic Microorganisms , *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 11-17 p.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R.,** 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, 3.Baskı, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teks. Ser., No:55, İzmir, 260s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

The Mariner Group, 2001, Oil Spill History.

[http:// www.marinergroup.com /oil-spill-history.htm](http://www.marinergroup.com/oil-spill-history.htm) (Erişim tarihi: 19.08.2012)

The Mariner Group, 2004, Oil Spill History.

<http://www.marinergroup.com/oil-spill-history.htm> (Erişim tarihi: 19.08.2012).

Telli-Karakoç, F., Tolun, L., Henkelmann, B., Klimm, C., Okay, O. and Schramm K.W., 2002, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) distributions in the Bay of Marmara sea: Izmit Bay. *Environmental Pollution*, 119: 383–397.

Terzi, M., 2011, İzmit Körfezi biyota ve sediment örneklerinde PAH ve PCB düzeylerinin mevsimsel değişimlerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Timur, H. ve Altınbaş, U., 1997, *Environmental Technology*, 18, 339.

Türkmen, E., 2005, Ham petrol ile yapısındaki aromatik hidrokarbonların parçalanmasında rol alan mayaların izolasyonu ve identifikasyonu Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir,

Türkoğlu, B., 2006, Toprak Kirlenmesi ve Kirlenmiş Toprakların Islahı, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Trzesicka-Mlynarz, D. and Ward, O.P., 1995, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil, *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 470–476.

Umbreit, W.W., 1961, Oxidation of Aromatic Compounds by Bacteria, *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, London, 3: 193-221.

Vaughan-Martini, A., 2003, Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine, *Int. Microbiol.*, 6, 175-182..

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vasudevan, N. and Rajaram, P.**, 2001, “Bioremediation of oil sludge-contaminated soil”, *Environment International*, 26: 409-411.
- Van der Vassen, J.M.B.M. and Hofstra, H.**, 1996, DNA based typing identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementetion, *International Journal of Food Microbiology*, 33: 35-49.
- Van der Walt, J.P.**, 1970, Criteria and Methods Used in Classification, North Hollad Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Van Hamme, J.D., Singh, J. and Ward, O.P.**, 2003, Recent Advances in Petroleum Microbiology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 503-549p.
- Venosa, A.D. and Zhu, X.**, 2003, Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and fresh wetlands, *Spill Science & Technology Bulletin*, 8: 163-178p.
- Verachtert, H. and De Mot, R.**, 1990, Biotechnology and Biocatalysis, Marcel Dekker. Inc., New York, 536p.
- Vidali, M.**, 2001, Bioremediation: An overwiev, *Pure Appl. Chem.*, 73(7): 1163-1172p.
- Wade, T.L., Sweet, S.T. and Klein, G.A.**, 2007, Assessment of sediment contamination in Casco Bay, Maine, USA, *Environmental Pollution*, 1-17.
- Walter, U., Beyer, M., Klein, J. and Rehm, H.J.**, 1991, Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 671–676.
- Ward, D. and Brock, T.D.**, 1978, Applied and Environmental Microbiology, 35, 353.
- Ward, O., Singh, A. and Van Hamme, J.**, 2003, Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30: 260–270.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wickerham, L.J.**, 1951, Taxonomy of Yeasts, *US Department of Agriculture Technical Bulletin*, 1029: 1-56p.
- Wickerham, L.J.**, 1952, Recend advances in the taxonomy of yeasts, *Annual Review of Microbiology*, 6: 317-332p.
- Wickerham, L.J.**, 1970, The Yeasts a Taxonomic Study, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385p.
- Wickerham, L.J. and Burton, K.A.**, 1962, Philogeny and biochemistry of the genus *Hansenula*, *Bacteriological Reviews*, 26, p. 382-397.
- Widdel, F. and Rabus R.**, 2001, “Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons” *Current Opinion in Biotechnology*, Issue 3, 259-276.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.**, 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols, a guide to methods and applications, Innis MA, Gelfond DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), Academic Press Inc., USA, pp. 315-322.
- Wolf, K.**, 1996, Nonconventional Yeast in Biotechnology, Springer Verlag, Berlin, 607p.
- Yalçın, S.D., Ergül, Ş.Ş. ve Özbaş, Z.Y.**, 2010, Moleküler esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı mayaların tanımlanmalarında kullanılmaları, *GIDA*, 35 (5): 379-386.
- Yanık, J., Sağlam, M., Yüksel, M., Kabay, N. ve Ballice, L.**, 1994, Kıyı Sorunları ve Çevre Sempozyumu, Belediye Yayınları, No:7, İzmir, 222-236p.
- Yıldız, D.**, 2010, Kasknak meşesi (*Quercus Vulcanica* Boiss. and Heldr. Ex Kotschy)’nin bazı tohum özellikleri, Doktora Tezi, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Yu, M.H.**, 2005, Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants, Chapter 11: Volatile Organic Compounds, 2nd edn., CRC Press Inc., Washington, USA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yunker, M.B. and Macdonald, R.W.,** 2003, Petroleum biomarker sources in suspended particulate matter and sediments from the Fraser River Basin and Strait of Georgia, Canada, *Organic Geochemistry*, 34:1525– 1541.
- Zinjarde, S. and Pant, A.,** 2002, Hydrocarbon degraders from tropical marine environments, *Marine Pollution Bulletin* , 44: 118-121.
- Zobell, C.E.,** 1946, Action of microorganisms on hydrocarbons, *Bacteriological Reviews* ,10: 1-49.

ÖZGEÇMİŞ

Diğdem TUNALI 10.12.1984 tarihinde Mersin’de doğdu. İlkokulu Barbaros İlköğretim Okulu’nda, ortaokul ve liseyi Yusuf Kalkavan Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2004 yılında girdiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2009 yılında mezun oldu. 2009-2010 öğretim yılında başladığı Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsün’de Yüksek Lisans öğrenimini sürdürmektedir.