

**ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN MAYALARDA BİYOFİLM VE BAZI
ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Pınar AYTÖP

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2012
ANKARA**

Pınar AYTÖP tarafından hazırlanan “ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN
MAYALARDA BİYOFİLM VE BAZI ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI”
adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Güven Uraz

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek
Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Güven Uraz

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç.Dr. Kanuni Barbaros Balabanlı

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Yrd. Doç. Dr. Ebru YILMAZ

.....

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, G.Ü.

Tarih: 19/01/2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini
onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Pınar Aytıp

**ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN MAYALARDA BİYOFİLM VE BAZI
ENZİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Pınar AYTÖP

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2012**

ÖZET

Çiğ sütün mikrobiyal kalitesi, kaliteli ve sağlıklı süt ve süt ürünlerinin üretimi için önemlidir. Süt endüstrisinde maya kontaminasyonu kaliteyi, fonksiyonelliği ve üretilen ürünlerin güvenliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Biyofilmler hem endüstriye, hem de sağlık üzerine olan etkileri nedeniyle gıda sanayinde oldukça önemlidir. Biyofilm ürüne kontamine olabilmekte ve işletmede borular korozyona uğrayabilmektedir. Aynı zamanda Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar kullanılan biyomateriyaller ile kolonize olmakta ve biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar septisemiye yol açabilmektedirler. Çalışmamızda 100 çiğ süt örneğinden 73 maya izole edildi. İzole edilen türlerin 12'si *C. kefir*, 11'i *C. lipolytica*, 5'i *C. guilliermondii*, 4'ü *C. rugosa*, 3'ü *C. intermedia*, 2'si *C. lusitaniae*, 10'u *Tri. beigeli*, 7'si *Tri. capitatum*, 8'i *S. cerevisiae*, 6'sı *Cr. neoformans*, 1'i *Cr. albidus*, 1'i *Cr. neoformans var uniguttulatus*, 3'ü de *Rho. rubra* türlerinde biyofilm varlığı, slime oluşumu ve fosfolipaz enzimi oluşumu araştırılmıştır.

Araştırmamızda, kristal viyole kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında, 48 saatlik ölçümlerde; 19 *Candida*, 9 *Trichosporon*, 7 *Saccharomyces*, 5 *Cryptococcus* ve 2 *Rhodotorula*'da; 72 saatlik ölçümlerde; 22 *Candida*, 12 *Trichosporon*, 7 *Saccharomyces*, 5 *Cryptococcus* ve 3 *Rhodotorula* izolatında

biyofilm varlığı tespit edilmiştir. Slime faktör varlığı araştırması Standart Cam Tüp Yöntemi ve Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmamızda, Standart cam tüp yöntemi ile yapılan slime faktör çalışmasında, 13 Candida, 6 Trichosporon, 3 Cryptococcus, 4 Sachharomyces'de; Kongo kırmızılı agar yöntemi ile yapılan çalışmada 15 Candida, 7 Trichosporon, 3 Cryptococcus, 5 Sachharomyces ve 1 Rhodotorula izolatında slime faktör oluşumu tespit edilmiştir. Yumurta sarılı agar yöntemi ile çalışılan 73 maya izolatının 20'sinde fosfolipaz enzimi tespit edilmiştir. Fosfolipaz aktivitesi gösteren 20 mikroorganizmanın; 4'ü Candida, 3'ü Trichosporon, 5'i Sachharomyces, 5'i Cryptococcus ve 3'ü Rhodotorula'dır. Sonuç olarak çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzerlerinde biyofilm, slime ve fosfolipaz enziminin varlığı, sütte maya kontaminasyonu işletme ve insan sağlığı açısından önemini ve işletmelerde yeterli sanitasyon işlemleri üzerinde durulması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Bilim kodu : 203.1.010
Anahtar kelimeler :Çiğ süt, maya, biyofilm, slime, fosfolipaz
Sayfa adedi :153
Tez yöneticisi :Prof.Dr.Güven Uraz

THE RESEARCH OF BIOFILM AND SOME ENZYMES IN YEASTS ISOLATED FROM RAW MILK

(M.Sc. Thesis)

Pınar AYTÖP

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

January 2012

ABSTRACT

Microbial quality of raw milk is important for the production of high quality and healthy milk and milk products. Yeast contamination in dairy adversely affects quality, functionality, and safety of the products produced. Biofilm is very important because of the effects as well as industry and on health in the food industry. Biofilm should be contamination of the product and subject to corrosion pipes in operation. At the same time biofilm forming microorganisms can be become colonized with used in the biomaterials and lead to septicemia microorganisms. In our study 73 yeasts were isolated from 100 samples of raw milk. The isolated species have been as 12 *C. kefir*, 11 *C. lipolytica*, 5 *C. guilliermondii*, 4 *C. rugosa*, 3 *C. intermedia*, 2 *C. lusitaniae*, 10 *Tri. beigeli*, 7 *Tri. capitatum*, 8 *S. cerevisiae*, 6'sı *Cr. neoformans*, 1 *Cr. albidus*, 1 *Cr. neoformans var uniguttulatus*, 3 *Rho. rubra*. This isolates have investigated the presence of biofilms, slime formation and the formation of the enzyme phospholipase. Biofilm study that used crystal violet, after 48 hours, biofilm formation was determined in 19 *Candida*, 9 *Trichosporon*, 7 *Saccharomyces*, 5 *Cryptococcus* and 2 *Rhodotorula*. After 48 hours, biofilm formation was determined in 22 *Candida*, 12 *Trichosporon*, 7 *Saccharomyces*, 5 *Cryptococcus* ve 3 *Rhodotorula*. Study of slime factor formation was in used Standart Glass Tube Method and Kongo Red Agar method. In our study, slime factor that used method of a standard glass tube method was determined in 13 *Candida*, 6 *Trichosporon*, 3 *Cryptococcus*, 4 *Sachharomyces*; in the study slime factor with method of

Kongo red agar was determined in 15 Candida, 7 Trichosporon, 3 Cryptococcus, 5 Sachharomyces ve 1 Rhodotorula. Egg yolk containing agar method of working enzyme phospholipase was identified in 20 isolates of 73 yeasts. Showing the phospholipase activity of 20 microorganisms are 4 Candida, 3 Trichosporon, 5 Sachharomyces, 5 Cryptococcus and 3 Rhodotorula. As a result, yeasts isolated from raw milk indicates that contamination of milk and milk operations. Yeast's presence of biofilm, slime and phospholipase reveals its importance in human health and operation.

Science code : 203.1.010

Key Words : Raw milk, yeast, biofilm, slime, phospolipase

Page Number : 153

Adviser : Prof. Dr. Güven URAZ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Güven Uraz'a, çalışmalarımda katkıda bulunan araştırma görevlisi hocam Yrd. Doç. Dr. Ebru Yılmaz'a, canım arkadaşım Derya Ünal'a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma, maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan annem Mukaddes Aytop'a ve babam Şükrü Aytop'a, her zaman yanımda olan Abdullah Ünvan'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xviii
RESİMLERİN LİSTESİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Biyofilm Nedir?	7
2.2. Biyofilmin Yapısı	9
2.3. Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturur?	10
2.3.1. Savunma	10
2.3.2. Adezyon ve kolonizasyon	10
2.3.3. Yaşanabilir çevre geliştirmek	11
2.3.4. Topluluk oluşturmak	11
2.4. Biyofilm Oluşum Aşamaları	11
2.5. Biyofilm Sistemleri	12
2.5.1. İn vitro sistemler	13
2.6. Süt işletmelerinde biyofilmin önemi	14
2.7. Fosfolipaz Enzimi nedir?	15

Sayfa

2.8. Slime faktör nedir?	17
2.9. Mayalar	17
2.9.1. Morfolojik ve fizyolojik özellikler	17
2.9.2. Biyokimyasal ve moleküler özellikler	22
2.9.3. Mayaların sınıflandırılması	23
2.10. Candida cinsi	25
2.11. Trichosporon cinsi	29
2.12. Saccharomyces cinsi	30
2.13. Rhodotorula cinsi	31
2.14. Cryptococcus cinsi	32
3. MATERYAL METOD	35
3.1. Materyal	35
3.2. Metod	35
3.2.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması	35
3.2.2. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların sayımı	36
3.2.3. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu	36
3.2.4. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların identifikasyonu	37
3.3. İzole edilen izolatlara uygulanan morfolojik tanı testleri	40
3.3.1. Germ tüp testi	40
3.3.2. Mısırunu Tween 80 agar testi	40
3.4. İzole edilen izolatlara uygulanan biyokimyasal tanı testleri	42
3.4.1. Karbonhidrat fermentasyon testi	42

Sayfa

3.4.2. Karbonhidrat asimilasyon testi.....	42
3.4.3. Üreaz testi	43
3.4.4. Nitrat testi.....	43
3.5. Askospor testi.....	44
3.6. Kandida'ların adlandırılması.....	44
3.7. Trichosporon'ların adlandırılması.....	46
3.8. Cryptococcus'ların adlandırılması	48
3.9. Saccharomyces'lerin adlandırılması	50
3.10. Rhodotorula'ların adlandırılması	52
3.11. Maya İzolatlarının RapID™ YEAST PLUS System Kullanılarak Tür Seviyesinde Adlandırılması	54
3.11.1. Mayaların Tür Düzeyinde Adlandırılması İçin RapID™ YEAST PLUS System Uygulanması	55
3.12. İzole edilen mayalarda biyofilm aktivitesinin belirlenmesi.....	57
3.13. İzole edilen mayalarda Slime faktör oluşumunun belirlenmesi.....	58
3.13.1. Standart cam tüp yöntemi.....	58
3.13.2. Kongo kırmızılı agar yöntemi	59
3.14. Fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi	60
3.15. Mikroorganizmaların Temini İçin Kullanılan Besiyeri ve İçeriği	62
3.16. Mikroorganizmaların adlandırılmasında kullanılan temel besiyerleri ve uygulanan testler	62
3.17. Mikroorganizmalarda Slime Varlığının Tespit Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	67
3.18. Mikroorganizmalarda Biyofilm Varlığının Tespit Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	68

Sayfa

3.19. Mikroorganizmalarda Fosfolipaz varlığının Tespit Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri	68
4. BULGULAR	70
4.1. Biyofilm çalışması	85
4.1.1. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan çalışma	86
4.2. Slime faktör çalışması	122
4.2.1. Kongo kırmızılı agar yöntemi	124
4.2.2. Standart cam tüp yöntemi	128
4.3. Fosfolipaz enzimi varlığı	132
5. TARTIŞMA SONUÇ	137
KAYNAKLAR	147
ÖZGEÇMİŞ	153

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mayaların karakterizasyonunda geleneksel olarak kullanılan özellikler	22
Çizelge 2.2. Mayaların sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve moleküler özellikler	23
Çizelge 2.3. Ascomycetes ve Basidiomycetes grupları arasındaki önemli morfolojik ve kemotaksonomik farklar.....	24
Çizelge 2.4. Günümüzde mayaların sınıflandırılmaları	25
Çizelge 3.1. Sütlerin temin edildiği yörelere göre dağılımı	36
Çizelge:3.2.Candida türlerine ait özellikler	46
Çizelge 3.3. Trichosporon türlerine ait özellikler	48
Çizelge 3.4. Cryptococcus türlerine ait özellikler	50
Çizelge 3.5.Saccharomyces türlerine ait özellikler	52
Çizelge 3.6.Rhodotorula türlerine ait özellikler	54
Çizelge 3.7. RapID™ YEAST PLUS System İdentifikasyon Testlerinin Prensipleri	56
Çizelge 4.1.100 adet çiğ süt örneğinden izole edilen mayaların dağılımı	70
Çizelge 4.2. Çalışılan toplam 100 çiğ süt örneğinde toplam canlı maya sayımı	71
Çizelge 4.3. İzole edilen Candida türlerinin dağılımı	73
Çizelge 4.4. İzole edilen Trichosporon türlerinin dağılımı	77
Çizelge 4.5. İzole edilen Saccharomyces türlerinin dağılımı.....	78
Çizelge 4.6. İzole edilen Cryptococcus türleri dağılımı.....	78
Çizelge 4.7. İzole edilen Rhodotorula türleri dağılımı.....	79

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.8. Çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örneklerinin toplandıkları yerlere göre dağılımı, izole edilen cinsleri.....	80
Çizelge 4.9. Ankara yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı.....	81
Çizelge 4.10. Burdur yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımı.....	82
Çizelge 4.11. Antalya yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı.....	83
Çizelge 4.12. Kırıkkale yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı.....	84
Çizelge 4.13. Kayseri yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı.....	85
Çizelge 4.14. Konya yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı.....	85
Çizelge 4.15. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında 48 ve 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar.....	86
Çizelge 4.16. İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerin deki biyofilm varlığının kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 48 saat sonunda, 490 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması sonucu elde edilen değerler.....	87
Çizelge 4.17. İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları.....	90
Çizelge 4.18. İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm.ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları.....	94
Çizelge 4.19. İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları.....	96
Çizelge 4.20. İzole edilen Candida türlerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı.....	100

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.21. <i>Candida</i> türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı	102
Çizelge 4.22. İzole edilen <i>Candida</i> türlerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı	104
Çizelge 4.23. <i>Candida</i> türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı	106
Çizelge 4.24. İzole edilen <i>Trichoporon</i> cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı	108
Çizelge.4.27. <i>Trichosporon</i> türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı	112
Çizelge 4.28. İzole edilen <i>Saccharomyces</i> cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı.....	113
Çizelge 4.29. <i>Saccharomyces</i> türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı	114
Çizelge 4.30. İzole edilen <i>Saccharomyces</i> cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı.....	115
Çizelge 4.31. <i>Saccharomyces</i> türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı	116
Çizelge 4.32. İzole edilen <i>Cryptococcus</i> cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı	117
Çizelge 4.33. <i>Cryptococcus</i> türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı	117
Çizelge 4.34. İzole edilen <i>Cryptococcus</i> cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı.....	119
Çizelge 4.35. <i>Cryptococcus</i> türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı.....	119

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.36. İzole edilen <i>Rhodotorula</i> cinsinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı	120
Çizelge.4.37. <i>Rhodotorula</i> ürlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı	121
Çizelge 4.38. İzole edilen <i>Rhodotorula</i> cinsinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı.....	121
Çizelge.4.39. <i>Rhodotorula</i> ürlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı	122
Çizelge 4.40. İzole edilen mayaların slime faktör dağılımı	123
Çizelge 4.41. Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı.....	124
Çizelge 4.42. Standart cam tüp yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı.....	128
Çizelge 4.43. İzole edilen mayaların fosfolipaz enzimi varlığı dağılımı	132
Çizelge 4.44. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların yumurta sarılı agar kullanılarak elde edilen değerler ve türlere göre dağılımı.....	133

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mayalarda vejetatif üreme	19
Şekil.2.2. Mayalarda seksüel üreme.....	21
Şekil 3.1. Mayaların adlandırılması	39
Şekil 3.2. Araştırmada Candida'ların adlandırılmasında uygulanan testler.....	45
Şekil 3.3.Araştırmada Trichosporon'ların adlandırılmasında uygulanan testler	47
Şekil 3.4. Araştırmada Cryptococcus'ların adlandırılmasında uygulanan testler	49
Şekil 3.5. Araştırmada Torulopsis ve Saccharomyces türlerinin adlandırılmasında uygulanan testler	51
Şekil 3.6. Araştırmada Rhodotorula'ların adlandırılmasında uygulanan testler	53
Şekil:3.7.Fosfolipaz aktivitesinin hesaplanması	61
Şekil 4.1.100 adet çiğ süt örneğinden izole edilen mayaların dağılım yüzdeleri.....	71
Şekil 4.2. İzole edilen Candida türlerinin dağılımı	74
Şekil 4.3. İzole edilen Trichosporon türlerinin dağılımı	77
Şekil 4.4. İzole edilen Cryptococcus türleri dağılımı.....	79
Şekil 4.5 İzole edilen cinslerin 48 ve 72 saate göre biyofilm varlığı.....	87
Şekil 4.6. Maya ve maya benzerlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. ve 540 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı % oranı.....	92
Şekil 4.7. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışma sında48 saatlik süre sonunda spektrofotometrik değerlendirme ile elde edilen sonuçların, cinslere göre dağılımı.....	93
Şekil 4.8. Maya ve maya benzerlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. ve 540 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı % oranı.....	99

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasının da 48 saatlik süre sonunda spektrofotometrik değerlendirme ile elde edilen sonuçların, cinslere göre dağılımı	99
Şekil 4.10. Candida cinsi mayaların biyofilm varlığının % oranı.....	101
Şekil 4.11. Candida türlerinde biyofilm dağılımı.....	102
Şekil 4.12. Candida türlerinde biyofilm varlığının % dağılımı.....	103
Şekil 4.13. Candida cinsi mayaların biyofilm varlığının % oranı.....	105
Şekil 4.14. Candida türlerinde biyofilm dağılımı.....	106
Şekil 4.15. Candida türlerinde biyofilm varlığının % dağılımı.....	107
Şekil 4.16. Trichosporon cinsi mayaların biyofilm varlığının % oranı	109
Şekil 4.17. Trichosporon türlerinde biyofilm varlığı	110
Şekil 4.18. Trichosporon türlerinde biyofilm varlığının % dağılımı	110
Şekil 4.19. Trichosporon cinsi mayaların 72 saat sonundaki biyofilm varlığının % oranı	112
Şekil 4.20. <i>Trichosporon</i> türlerinde biyofilm varlığı	113
Şekil 4.21. <i>S.cerevisiae</i> türünde biyofilm varlığı.....	114
Şekil 4.22. <i>S.cerevisiae</i> türünde biyofilm varlığı.....	115
Şekil 4.23. <i>Saccharomyces</i> türünde biyofilm varlığı	116
Şekil 4.24. <i>Cryptococcus</i> türünde biyofilm varlığı	118
Şekil 4.25. <i>Cryptococcus</i> türünde biyofilm varlığı	119
Şekil 4.26. <i>Cryptococcus</i> türünde biyofilm varlığı	120
Şekil 4.27. <i>Rhodotorula</i> türünde biyofilm varlığı.....	121
Şekil 4.28. <i>Rhodotorula</i> türünde biyofilm varlığı.....	122

Şekil	Sayfa
Şekil 4.29. Kongo kırmızılı agar yöntemi ve Standart cam tüp yöntemi kullanılarak slime varlığı tespit edilen mikroorganizmaların dağılımı	123
Şekil 4.30. Araştırmada Kongo kırmızılı agar yöntemi ile Slime faktör varlığı tespit edilen ve edilemeyen mikroorganizma oranları (%).....	124
Şekil 4.31. Slime pozitif maya ve maya benzerlerinin dağılımı	127
Şekil 4.32. Kongo Kırmızılı agar yöntemi ile slime pozitif tespit edilen maya ve maya benzerleri.....	127
Şekil 4.33. Araştırmada standart cam tüp yöntemi ile slime faktör varlığı tespit edilen ve edilemeyen mikroorganizma oranları (%)	128
Şekil 4.34. Slime varlığının cinslere göre dağılımı.....	131
Şekil 4.35. Standart cam tüp agar yöntemi ile slime pozitif tespit edilen maya ve maya benzerleri.....	131
Şekil 4.36. Fosfolipaz varlığının cinslere göre dağılımı	133
Şekil 4.37. Araştırmada yumurta sarılı agar yöntemi ile fosfolipaz enzimi varlığı tespit edilen ve edilemeyen mikroorganizma oranları (%)	136
Şekil 4.38. Fosfolipaz pozitif türlerin dağılım oranı	136

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların Sabouraud Dextrose Agar'da saf kültürün görünümü (Suş no.7)	37
Resim 3.2. Cornmeal-Tween 80 agar'da yalancı hif oluşumunun görünümü (suş no 44)	41
Resim 3.3. Cornmeal-Tween 80 agar'da yalancı hif oluşumunun görünümü (suş no 15)	41
Resim 3.5. Üreaz testi (A) Pozitif reaksiyon (B)Negatif Reaksiyon (C) Değişken reaksiyon.....	43
Resim 3.6. RapID™ YEAST PLUS System test panelinin görünümü.....	55
Resim.3.7. Kristal viyole ile boyama sonucu mikropate kuyucuklarının görünümü	58
Resim 3.8. Soldan sağa; Slime negatif (-), (+) pozitif kökenlerin tüplerdeki görüntüsü.....	59
Resim 3.9. Slime pozitif ve negatif izolatların Kongo kırmızılı agarda görünümü	60
Resim 3.10. Fosfolipaz pozitif görüntü(sağda),fosfolipaz negatif görüntü(solda)	62
Resim.4.1. <i>C.guilliermondii</i>	75
Resim 4.2. <i>C.kefyr</i>	75
Resim.4.3. <i>C.lusitaniae</i>	76
Resim 4.4. <i>C.lipolytica</i>	76
Resim 4.5. <i>Tri.capitatum</i>	77
Resim 4.6. <i>Sac.cerevisiae</i>	78
Resim 4.7. <i>Cr.neoformans</i>	79
Resim.4.8 <i>Rho.rubra</i>	80

1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri insan beslenmesinin en vazgeçilmez ürünlerinden biri olması dolayısıyla gıda tedarik zincirinin en önemli ve gerekli ürünleridir. Süt, mayaların da dahil olduğu pek çok mikroorganizma için mükemmel bir besi ortamıdır. Çiğ süt, hijyenik uygulamalara ve elde edilme şekline bağlı olarak çeşitli maya popülasyonları içerir [Deak ve Beuchat, 1996].

Süt, hijyenik koşullarda üretilmediği, saklanmadığı, işlenmediği, gerekli kontrollerinin yapılmadığı durumlarda çeşitli yollarla süte mikroorganizmalar bulaşır. Son yıllarda süt ve süt ürünlerindeki ki bozulmalarda bakteriler kadar mayaların da etkili olduğu keşfedilmiştir. Mayalar diğer gıda sanayi dallarında önemli olmakla beraber süt teknolojisinde genellikle arzu edilmeyen mikroorganizmalardır. Mayalar süt sağımından itibaren ahır ve çevresi, süt işletmelerinin çevresi ve işletme içinde bulaşırlar [Metin 1996].

Sütlere üretim aşamasından tüketiciye sunulana kadar, çeşitli yollarla bulaşan maya ve maya benzeri mikroorganizmalar süt işletmelerinde ekonomik zarara yol açmaktadır [Santoz, 2005].

Aynı zamanda mikroorganizmaların süt ve süt ürünlerine olası kontaminasyonundan dolayı dünyada pek çok kişinin bu risklere maruz kaldığı oldukça açıktır [Papademas ve Bintsis, 2010]. Bu yüzden, sütün çiftlikten çatala kadarki geçen sürecinde yeterli kalite ve gıda güvenliği uygulamaları, süt endüstrisinde gıda güvenliği için önemli olmaktadır [Payne ve ark., 1999; Khan ve ark., 2000].

Sütte mikroorganizma kontaminasyonları süt üretimi sırasındaki koşullara bağlıdır. Sütün sağım yapılan çiftliklerde uzun süre düşük sıcaklıklarda bekletilmesi veya soğutulması, işletmelere getirilen tankların temizliği ve sıcaklığı sütün bakteriyolojik özelliklerini belirler [Rowe ve ark. 1985]. İşlemeye getirilen çiğ sütler üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyolojik analizlerde tankerden alınan örneklerde toplam küf-maya miktarı 7,591 log cfu/ml, bulunmuştur. Alisharlı ve ark. [2003] çiğ sütte küf

maya sayısını 0,14 log cfu/ml, Yeniayvaz ve Oysun [2003] ise 5,43 log cfu/ml olarak belirlemiştir. Depolama süresince maya-küf sayısında önemli bir değişiklik görülmemiştir. Az sayıda da olsa bekletme esnasında maya ve küf sayısı artış göstermiştir.

Carrasco ve ark.larının yaptığı çalışmada çiğ süt ve peynir örneklerinden 116 maya izole etmişler ve peynirde en çok maya 4.5×10^5 cfu/g, sütte ise 5×10^3 and 2×10^4 cfu/mL. İzole edilen cinsler (50%), *Candida* (42.2%), *Cryptococcus* (21%) ve *Trichosporon* (36.8%) olarak tespit edilmiştir [Carrasco ve ark., 2006].

Topçu'nun yaptığı çalışmada 50 sokak sütü ve 50 peynir örneğinden 66 *Candida*, 6 *Geotrichum*, 7 *Cryptococcus*, 8 *Saccaromyces*, 4 *Trichosporon* olmak üzere 91 maya ve maya benzeri mikroorganizma izole etmişlerdir [Topçu, 2006].

İtalya' da PCR-DGGE analiz yöntemi ile çiğ sütteki maya populasyonunu belirlemişlerdir ve bu yöntemle topladıkları örneklerde *Candida catenulata*, *Candida pararugosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Candida pseudointermedia*, *Candida rugosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia guilliermondii*, *Trichosporon mucoides* ve *Cryptococcus curvatus* türlerini adlandırmışlardır [Cocolin ve ark., 2002].

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, 37 değişik süt işletmesinden alınan 160 süt örneği çalışılmış ve 45 örnekten *Candida* türleri izole edilmiştir. Bunlar *C. krusei* (44,5%), *C. rugosa* (24,5%), *C. albicans* (8,9%), *C. guilliermondii* (8,9%)' dir [Santos, 2005].

Türkyılmaz ve ark. yaptıkları çalışmada 339 çiğ süt örneğinden 41 maya ve maya benzeri mikroorganizmalar izole etmişlerdir. İzole ettikleri türler 15 (36.6%) *C. krusei*, 12 (29.4) *C. kefir*, 3 (7.3%) *C. guilliermondii*, 2 (4.9%) *C. famata*, 1 (2.4%) *C. utilis* ve *C. rugosa*, 2 (4.9%) *T. mucoides*, 1 (2.4%) *T. asahii*, 2 (4.9%) *C. laurentii*, 1 (2.4%) *Cr. neoformans*, 1 (2.4%) *S.cerevisiae* olarak tespit etmişlerdir [Türkyılmaz, 2010].

Moretti ve ark., mastitisli ineklerden aldıkları süt örneklerinin 4.9%'unda maya ve maya benzeri izole etmişlerdir. İzole ettikleri türler *Trichosporon capitatum* (31.2%), *T.beigelii* (18.72%), *Candida albicans* (12.48%), *C.guilliermondii* (12.48%), *C. tropicalis* (12.48%) olarak tespit etmişlerdir [Moretti ve ark.,2000].

Cécile ve ark.larının yaptığı çalışmada çiğ süt peynirlerinde PCR finger print yöntemi ile *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides* ve *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis*, *Candida silvae*, *Candida intermedia*, *Candida rugosa*, *Saccharomyces unisporus* ve *Pichia guilliermondii* türü maya ve maya benzerlerini izole etmişlerdir [Cecile ve ark., 2005].

Süt endüstrisinde maya kontaminasyonu kaliteyi, fonksiyonelliği ve üretilen ürünlerin güvenliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Süt ürünlerinde herhangi bir kontaminasyon meydana geldiğinde önemli sebep olarak sütün işlendiği alet ve ekipmanın yüzeyinde oluşan biyofilm öne sürülmektedir [Ölmez, 2010].

Çiftlikten çatala gıda güvenliği prensipleri uygulanırken, elde edilen sağlıklı ham maddenin gıda işletmesinde meydana gelen biyofilm mikroorganizmaları ile bulaşmasının raf ömrünü kısaltabileceği ve bunun yanı sıra içerdiği gıda patojenleri ile halk sağlığı riski oluşturacağı bildirilmektedir [Reinemann,1993; Wong, 1994].

Biyofilm bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanır. Bu jelsi tabaka bakteri hücreleri tarafından üretilen terminolojide 'hücre dışı polimerik yapı' 'ekzopolisakkarit' ya da 'ekzopolimer(EPS) adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır. Bir başka tanımlamaya göre biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matris içerisine gömülmesidir [Donlan, 2002].

Mikroorganizmalar için biyofilm içerisinde yaşamak ve varlığını sürdürmek bir avantajdır. Çünkü biyofilmin matriks yapısı hem fiziksel güçler hem de hidrojen peroksit, klorin gibi kimyasallara karşı koruyucu kalkan oluşturur. Biyofilmler

bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur.

Biyofilmler hem endüstriye, hem de sağlık üzerine olan etkileri nedeniyle gıda sanayinde oldukça önemlidir. Süt ve diğer gıda sanayilerinde boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir [Mattila, 1992]. Aynı zamanda biyofilm oluşturan mikroorganizmalar kullanılan biyomateriyaller ile kolonize olmakta ve biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar septisemiye yol açabilmektedirler. İnfeksiyonların oluşumu açısından sürekli bir kaynak oluşturan biyofilmler önemli bir virölans özellik olarak kabul edilmektedir [Jessen, 2003].

Ünal yaptığı çalışmada çeşitli klinik örneklerden 10 *Pseudomonas*, 20 *Klebsiella*, 55 *Staphylococcus* ve 15 *Candida* kökeninde biyofilm varlığı ve slime faktör oluşumu araştırılmıştır. kristal viyole kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında, 24 saatlik ölçümlerde; 7 *Pseudomonas*, 8 *Klebsiella*, 52 *Staphylococcus* ve 12 *Candida*’ da; 48 saatlik ölçümlerde; 6 *Pseudomonas*, 7 *Klebsiella*, 42 *Staphylococcus* ve 12 *Candida* izolatında biyofilm varlığı tespit edilmiştir [Ünal,2011].

Shin ve ark., kan dışındaki vücut bölgelerinden izole ettikleri 259 *Candida* cinsinde, mikropate yöntemi kullanarak biyofilm varlığını araştırmışlardır. Toplam 259 izolatın 219’unda biyofilm varlığı tespit etmişlerdir [Shin ve ark., 2002].

Tumbarello ve ark. ölüm riski taşıyan kandidemili 294 hastadan izole ettikleri 168 *C.albicans*, 64 *C.parapsilopsis*, 28 *C.tropicalis* ve 26 *C.glabrata* izolatlarında, mikropate yöntemi kullanarak biyofilm varlığını araştırmıştır. 20 *C.tropicalis*, 6

C.glabrata, 38 *C.albicans* ve 14 *C.parapsilopsis* izolatında biyofilm varlığı tespit etmişlerdir [Tumbarello, 2007]

Choi ve ark. kan örneklerinden izole ettikleri 12 *C.albicans*, 12 *C.parapsilopsis*, 10 *C. Tropicalis* ve 9 *C.glabrata* izolatında, mikropate kullanarak biyofilm varlığını araştırmışlardır. Toplam 34 izolatta biyofilm varlığı tespit etmişlerdir [Choi, 2007].

Ramage ve ark. yaptıkları çalışmada *Cr.neoformans*'ın *C.albicans*'dan sonra en yüksek biyofilm pozitifliği verdiğini ve biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarda önemli rol aldığını tespit etmişlerdir[Ramage ve ark., 2009].

Slime faktör, plastik ve metal yüzeylere yapışmayı sağlayan, bakterilere antifagositik özellik kazandıran ayrıca, antimikrobik maddelerin hücre içine girişini engelleyen enstrasellüler bir polisakkarittir [Cevahir ve ark., 2003]. Birçok literatürde “slime faktör” ve “biyofilm” kavramları aynı anlamlarda kullanılsa da aslında “slime faktör” oluşumu biyofilm oluşumunun ilk aşamalarından biridir [Koluman, 2006]. Slime faktörün *Candida* kökenlerinde ciddi enfeksiyonlara yol açtığı son yıllardaki bazı yayınlarda tartışılmaktadır [Yakopoğulları, 2004].

Türkyılmaz ve ark. süt örneklerinden izole ettikleri *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.rugosa*, *C.utulis*, *Trichosporon mucoides*, *T. asahii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cr. neoformans* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinde kongo red yöntemi ile slime faktör çalışmışlar ve bu izolatlardan 7 *C. krusei*, 4 *C. kefyr*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. famata*, 1 *T. asahii*, ve 1 *Cr.laurentii* olmak üzere 15’inde slime faktör varlığı tespit etmişlerdir [Türkyılmaz, 2010].

Sütte bulunan maya ve küflerin çoğu sıcaklıkla yok edilebilmekte ancak oluşturdıkları zararlı maddeler aktivitelerini devam ettirmektedir. Son yıllarda süt ve süt ürünlerindeki bozulmalarda bakteriler kadar mayaların da etkili olduğu keşfedilmiştir. Süt ve süt ürünlerinin maya floraları çalışılarak hangi türlerin daha baskın olduğu saptanmaya çalışılmıştır [Topçu, 2006].

Pastörizasyonun amaçlarından biri de süt kökenli ve mikrobiyal kaynaklı enzimleri kısmen veya tamamen inaktif hale getirmektir [Metin, 1998]. Psikrotrofik bakteri çoğunluğunun pastörizasyonla yok edilmesine rağmen sadece bozulmaya yol açan termodurik flora yaşamaya devam eder ve psikrotrofik bakterilerden kaynaklanan ekstraselüler proteaz, lipaz ve fosfolipaz C enzimler faaliyet gösterebilirler [Robinson, 1990]. Son yıllarda maya kökenli enzimlerin önemi üzerinde durulmaktadır. Biz de bu düşünceden yola çıkarak çalışmamızda maya ve maya benzerlerinin fosfolipaz enzim varlığını araştırdık.

Ekstrasellüler fosfolipazlar birçok mikroorganizma tarafından üretilen ve fosfolipitleri parçalayan enzimlerdir. Bu enzimlerin konak hücre membranlarında hasara yol açarak bazı bakteri ve mantarların patogeneğinde virülans faktörü olarak rol oynamaktadır [Ghannoum, 1998].

Fosfolipazların, patojenitede rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmektedir. Son zamanlarda, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.lusitaniae*, *C.krusei* türlerinin fosfolipaz salgıladığı gösterilmiştir [Schaller ve ark., 2005].

Priscilla ve ark. süttten izole ettikleri *Aureobasidium* sp., *Candidaspp.*, *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp. ve *Rhodotorula* spp. türlerinin fosfolipaz aktivitesini çalışmışlar ve 37⁰C’de fosfolipaz enzimi aktivitesi gösterdiklerini tespit etmişlerdir [Priscilla ve ark., 2011].

Bu çalışmada, sütün maya ve maya benzerleri ile kontaminasyonunun araştırılması ile süte geçen bu mikroorganizmaların biyofilm, slime ve fosfolipaz gibi işletmeye ve insan sağlığına negatif etkileri olan faktörlerin tespiti amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyofilm Nedir?

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur [Çiftçi, 2005].

Biyofilmler canlı veya cansız birçok yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları, süt işletmelerinde kullanılan borularda veya doğal akuatik sistemler yer alır. Bakteriler bir yüzeye yapıştıktan ve biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden, hafif durulama ile uzaklaştırılmazlar. Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir [Donlan, 2002]. Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, mikroorganizmaların belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur. Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkân tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler. Tam hidrate ve canlı biyofilm volümlerinin %15 hücre, % 85 matriks materyali tarafından oluşturulduğu ve hücrelerin matrikslerinin çevrelediği farklı yüksekliklerdeki 'kuleler' veya 'mantarlar' içerisinde bulundukları anlaşılmıştır [Donlan ve Casterton, 2002].

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstraselüler komponentini oluşturur. İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir [Çiftçi, 2005].

Biyofilm mikroorganizmaları çevre koşullarına, serbest bulunan planktonik mikroorganizmalardan daha dirençlidir. Biyofilm yapısı, inhibitör etkisi olan antibiyotik, dezenfektan ve ısıya karşı koruyucu özellik gösterir fakat bu direncin mekanizması ortaya konamamıştır [Çiftçi, 2005].

Donlan ve Casterton biyofilm tanımını biraz daha geliştirmiş ve biyofilmleri aşağıdaki özelliklere sahip mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımamışlardır:

- 1) Hücreler irreversibl olarak bir substrata, ara yüzeye veya birbirlerine tutunmuşlardır.
- 2) Hücreler kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddeden oluşan bir matriks içerisinde gömülüdürler.
- 3) Büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıkları vardır.

Bu tanım çok önemlidir çünkü bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan bazı mikroorganizmaların oluşturduğu her tabakaya “biyofilm” denilmemelidir. Gerçekte biyofilm olmayan bu topluluklar, bulundukları yüzeyde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam ederler. Hiçbirinde biyofilm içerisindeki bakterilerde izlenen direnç ve irreversibl yapışma gibi özellikler izlenmez. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki hücrelerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları ve dolaşıma geçtikleri unutulmamalıdır. Dolaşıma geçen bu hücreler, planktonik formda olmalarına karşın, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterilerini taşımaktadır [Çiftçi, 2005].

Biyofilmin planktonik bakterilerden üstünlükleri Donlan tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla:

- EPS, çevreden besin maddelerini konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.
- Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler, antimikrobiyal maddeler, yüzey gerilimini değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler ve oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere direnç gösterir. Bu direnç, gelişimin durdurulup

canlılığın korunmasında, genetik düzenleme ile yukarı ya da aşağıya doğru düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.

•Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanı sıra, katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyallere karşı, iç yüzeyde bulunan bakterileri korur. Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır ve planktonik bir hücrenin tutunmasında daha uygun bir yüzey oluşturur [Donlan, 2002].

1973 yılında Caracklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikrobiyal toplulukları incelemiş ve bunların sadece yüzeye kuvvetle tutunmadıklarını, aynı zamanda klor gibi dezenfektanlara karşı çok dirençli olduklarını da göstermiştir [Donlan, 2002].

2.2. Biyofilmin Yapısı

3 boyutlu perspektiften bakıldığında biyofilm, bakterinin yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarit doğasında bir matrikstir. Yapılan çalışmalarda matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Tüm biyofilmlerin büyük bölümü (%73–98) hidrate şeklindedir. Mikroskopik olarak incelendiğinde biyofilm, arasından kanalların geçtiği mercan kayalıklar üzerindeki, piramit veya mantar şekilli uzantılardan oluşan bir oluşum görünümündedir [Sakarya, 2005].

Biyofilmin mercan kayalık görünümlü yoğun ve kompleks yapısı, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstrasellüler yapısında toplanmasıyla oluşur. Biyofilmin gelişme potansiyeli yakın çevredeki besinlerin kullanımı ve hücre içine alımı, atıkların uzaklaştırılması ile yakın ilişkili olup, bunların dışında besin kısıtlanması sonucu eksprese olan Quorum-sensing moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O₂ perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite de gelişimde çok etkilidir. Son yıllarda bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküller aracılığı

ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonunda önemini artırmıştır [Sakarya, 2005].

2.3. Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturur?

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturan formları ile serbest yaşayan formları arasında ciddi farklılıklar görülmesine ve mikroorganizmanın biyofilm oluşturmalarını gerektiren durumlar ile ilgili farklı görüşler olmasına karşın, biyofilm oluşumunun nedenleri Donlan (2002) tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar:

2.3.1. Savunma

Strese cevap olarak gelişir. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi birçok fiziksel güce karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar besin yokluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı, serbest yaşayan hücrelerden daha dirençlidir [Öztürk ve ark., 2008].

2.3.2. Adezyon ve kolonizasyon

Vücudun en azından bir bölümü mikroorganizmanın yaşama ve gelişmesi için besinden zengin ve su içeriği, O₂ olanağı ve ısı gibi ortamda devamlı bulunan bir takım faktörlerle sabit bir yapı oluşturur. Tüm bunların sonucu vücudun immün sistemi ile mikroorganizma arasında, mikroorganizmanın vücudu istila etmesine karşı amansız bir yarış sürmektedir. Bazı durumlarda uzlaşma olarak belli bölgelerde büyük miktarlarda ve bu bakterilerin yaşamasına izin verilmektedir ve bu bakterilerin çoğu biyofilm oluşturmaktadır. Vücut, bilindiği gibi mikroorganizmaların yaşaması için çekici bir ortam olup, bakterilerin bu bölgede biyofilm oluşturarak yaşaması için primer bir motivasyon oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmeyi sağlaması için birtakım stratejisi vardır. Mikroorganizma yüzey proteinleri, konakçının fibronektin, fibrinojen, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine yapışır [Öztürk ve ark., 2008].

2.3.3. Yaşanabilir çevre geliştirmek

Özellikle ortamdaki glikozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının pseudomonas, vibrio cholerae, escherichia coli ve stafilokokları EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin şekilde artırdığı gösterilmiştir [Öztürk ve ark.,2008].

2.3.4. Topluluk oluşturmak

Mikroorganizmanın ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Tüm mikroorganizmaların çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olması ve fenotipik değişiklikler sergilemesi toplu halde yaşamalarının en önemli göstergesidir [Öztürk ve ark., 2008].

2.4. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir. Bu tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunabilmesi için, kendinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduğunu anlaması gerekir. Mikroorganizmalar bu çevresel stimulusları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, quorum-sensing sistemi denilen başka bir haberleşme sisteminden gelen yanıtı bağlıdır. Bu sistem ile mikroorganizmalar çevresindeki mikroorganizma popülasyonunun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her mikroorganizma, ortama “ben buradayım” mesajı veren bir molekül sağlar. Yüzeye tutunan mikroorganizma sayısı arttıkça, bir sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bir sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar intrasellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedir [Öztürk, 2008].

İkinci basamak ise mikroorganizmaları yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir. Üçüncü evrede ise mikroorganizmalar mikrokoloniler haline dönüşür. Dördüncü evrede ise mikrokoloniler büyür ve kompleks, mantar şeklinde yapılara veya kulelere dönüşür. Çeşitli yükseklikte kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır.

Biyofilm gelişiminin beşinci evresi ise kopma veya ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir mikroorganizma veya mikroorganizma kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum prosesinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipleks hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur [Öztürk, 2008].

Yapılan çalışmalar sonucu yapısal olarak planktonik hücreden köken alan biyofilmin oluşum aşamaları belirlenmiştir. Bunlar:

1. Tutunma yüzeyinin oluşumu
2. Öncü mikroorganizmanın tutunması
3. Slime (mukoz) tabakanın oluşumu
4. Sekonder kolonizasyon
5. Olgun biyofilm [Koluman, 2006].

2.5. Biyofilm Sistemleri

Mikroorganizmaların ubiquiter özellikleri gerek in vivo olarak canlıların bünyesinde, gerekse in vitro olarak cansız yüzeylerde biyofilm oluşturmaları sonucunu doğurur. İn vivo sistemlerde genellikle iatrojenik olarak bulaşma söz konusudur. İn vitro sistemler ise daha çok gıda hijyeni ve arıtma sistemleri ile ilgilidir [Boothe ve ark, 1999].

Bu nedenle biyofilm oluşumu süt işletmelerinde oldukça önemli bir kriter olmaya başlamıştır.

2.5.1. İn vitro sistemler

Gıda işletmelerinde biyofilm problemi ana uğraş kaynağı haline gelmiştir. Gıdanın çatalın ucuna gelene kadar geçirdiği tüm süreçte; üretim, depolama, işleme yüzeyleri gibi ana kontaminasyon kaynakları olarak kritik kontrol noktalarını teşkil ettikleri bildirilmiştir. Süt işletmelerinde en ideal çalışan CIP sisteminin varlığında bile alet ve ekipman yüzeylerinde mikroorganizma varlığı ortaya konmuştur. Bu mikroorganizmaların kalıntı miktarına, sıcaklığa, relatif neme bağlı olarak uzun süre kültüre edilemediği ancak canlı halde kalabildiği bildirilmiştir [Wong ve Rabotski, 1993].

Mikroorganizmaların üremeleri için belirli rutubet, sıcaklık, besin maddesi konsantrasyonu, oksijen ve diğer atmosferik gazların konsantrasyonu ile pH değerlerine ihtiyaç duydukları bilinmektedir. Mikroorganizmaların mikroskopik canlılar olduğu düşünülürse, gelişmeleri için çok büyük alanlara ihtiyaç duymadıkları açıktır. Gıda işletmelerinde, gelişme faktörleri her yerde benzer olduğu için, gelişme alanları herhangi bir yer olabilir. Gıda işletmelerinde su giderleri, üretim teknelerindeki çatlaklar ve çizikler, sisteme bağlı bir sonu olmayan borular, tezgah yüzeyleri, pastörizatörler, sulu ya da glikol ile çalışan soğutma sistemleri, fayans duvarlar, taşıma hattı, musluk yüzeyleri, salamura tankları, soğutma odalarının tavanları, soğutma ve haşlama tankları gibi sıvı ile kaplı yüzeylerin biyofilm gelişimi için uygun olduğu bildirilmiştir [Zottola, 2001].

Hastalık Kontrol Merkezi'in (Centers for Disease Control – CDC) 1998 yılına ait kayıtlarında yer alan ve 1965 yılında meydana gelmiş, pastörize süt kökenli *Salmonella* salgınında, ana kaynağın hiçbir şekilde ortaya konamadığı bildirilmektedir. Zottola, bu salgında biyofilmin rol oynadığını düşündüğünü bildirmiş ve pastörizasyon hattında *Salmonella* içeren biyofilmin, meydana gelen bir çatlaktan su sızmasına bağlı olarak, pastörizatördeki süte karışmış olduğunu bildirmiştir. Aynı salgını takiben, düzenli aralıklarla yeniden süttten *Salmonella* izole edilmesi biyofilmden kopmalara bağlı bir kontaminasyonu düşündürmüştür [Zottola, 2001].

Petran ve Zottola (1988) laboratuvar koşullarında pastörizatörlerden izole ettikleri *L. monocytogenes* ile yaptıkları çalışmada biyofilm oluşturma yeteneklerinin yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.6. Süt İşletmelerinde Biyofilmin Önemi

Süt işletmelerinde boruların bağlantısı için kullanılan plastik contaların biyofilm oluşumuna etkisini araştıran bir çalışmada Chechowski, contaların kullanım süresine bağlı olarak izole edilen bakteri sayısının arttığını, bitişi olmayan borular, ek yerleri ve vanaların olduğu noktalarda türbülansın azalmasıyla sütün durgunlaşmasına bağlı olarak biyofilm oluşumunun hızlandığını bildirmiştir [Chechowski, 1990].

Süt işletmelerinde, boru hatlarında, contalarda, pastörizasyon ve buharlaşmanın yapıldığı üretim alanlarındaki biyofilm varlığı, ürün kontaminasyonu için oldukça önemli bir kaynaktır. Süt üretim tesislerinde, biyofilm genellikle sıcak, soğuk ve pH, tuz gibi faktörlere adapte olabilen türlerde oluşmaktadır. Biyofilm oluşumu, işleme tesisleri karmaşıklığı arttıkça mikrobiyal büyüme için daha fazla olanak sağlar, üretim zamanını uzatır ve hücre büyümesine daha fazla zaman sağlayarak daha sorunlu hale gelmektedir. Yüzeyle tutunan bakterileri öldürmek serbest yaşayan bakterilerden daha zordur ve biyofilm kontaminasyonu mikrobiyal yükü arttırarak süt ürünlerinde kalite ve güveni azaltır. Biyofilm oluşumu ve artışını en aza indirmek süt ve süt ürünleri üreticileri için giderek artan bir sorundur. Mikrobiyal kontaminasyonu en aza indirmek, CIP kimyasalları, kolonizasyonu azaltabilecek bazı girişimler, mikrobiyal kolonizasyona karşı modifiye malzemeleri kullanarak ve üretim alanlarında üremeyi azaltabilecek uygun koşulları oluşturmakla mümkündür [Flint ve ark., 2011]

Ölmez'in yaptığı çalışmada 7 farklı işletmeden swap ile toplanan biyofilm örneklerinde bakteri sayımı yapmıştır. Koliform grubu, Listeria grubu ve *Satphylococcus* grubu mikroorganizmaları önemli düzeyde izole etmiştir ve temizlik işlemlerine önemin verilmesi konusuna dikkate çekmiştir [Ölmez, 2009].

2.7. Fosfolipaz Enzimi Nedir?

Mikrobiyal patojenler, konak hücrelere saldırmak ve enfeksiyona yol açmak üzere çeşitli stratejiler kullanırlar. Fosfolipaz enzimi (PL) patojenik mantarların yanı sıra bazı bakteri ve parazit enfeksiyonlarında da patojenite faktörü olarak gösterilmiştir. Fosfolipazlar, gliserofosfolipitlerdeki bir veya daha fazla ester bağına hidrolize etme yeteneğine sahip enzimler grubunu kapsamaktadır. Tüm fosfolipazlar substrat olarak fosfolipitleri hedeflese de her bir enzim, spesifik bir ester bağına parçalama yeteneğine sahiptir. Fosfolipaz A (PLA), Fosfolipaz B (PLB), fosfolipaz C (PLC) ve fosfolipaz D (PLD) olmak üzere 4 çeşit fosfolipaz enzimi, ayrıca daha ileri bir basamak olan lizofosfolipitleri de parçalayan lizofosfolipaz enzimi farklı oranlarda ve farklı işlevleri görmek üzere çeşitli hücrelerde bulunmaktadır. Tüm fosfolipaz aktivitelerinin, hücrelerin miçelyal formunda maya formuna oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir [Ghannoum, 2000].

C.albicans için en önemli virölans faktörlerinden biri olan fosfolipaz enzimi, konak hücre zarfının başlıca kimyasal bileşenleri olan fosfolipitleri hidrolize ederek konak hücreyi lizize uğratmakta ve hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek aderensi ve penetrasyonu kolaylaştırdığı ve virölansa katkı sağladığı düşünülmektedir [Ghannoum, 2000]. Fosfolipazlar ve konak hücre zarfındaki proteinleri parçalayan proteinaz enzimleri büyük olasılıkla, konak hücre invazyonu sırasında oluşan membran hasarı sürecinde rol oynamaktadırlar [Arslan, 2003; Ghannoum, 2000].

Fosfolipazların, patojenitede rol oynadığı pek çok çalışmada kanıtlanmıştır. *C.albicans*'ın ekstrasellüler fosfolipaz enzimi salgıladığı ilk kez 1968 yılında Costa ve arkadaşları tarafından yumurta sarısı içeren besiyerinde belirlenmiş, daha sonraları lesitinli ve koyun eritrositi içeren besiyerlerinde de bu aktivasyon gösterilebilmiş ancak diğer *Candida* türlerinde tespit edilememiştir. Yumurta sarılı besiyeri başlıca fosfolipaz B aktivitesini ortaya çıkarmaktadır [Ghannoum, 2000]. Son zamanlarda, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.lusitaniae*, *C.krusei* türlerinin fosfolipaz salgıladığı gösterilmiştir [Schaller, 2005].

Yumurta sarılı besiyerinde ve kolorimetrik metod kullanarak yaptıkları çalışmalarda, albicans dışı Candida türlerinde fosfolipaz aktivitesinin *C.albicans*'a oranla daha az olduğunu gözlemlemişlerdir. Fosfolipaz enziminin varlığı kadar miktarı da virülans açısından önem taşımaktadır [Ghannoum, 2000].

1985 yılında yapılan bir çalışmada, Candida hücre ekstraktlarında fosfolipaz ve lizofosfolipaz aktivitesinin varlığı saptanmıştır. Barrett ve arkadaşları sıçan modeli kullanarak, hücre dışı Candida fosfolipazının virülansdaki rolünü değerlendirmişler, fosfolipaz aktivitesi, patojenite ve yanak epitel hücrelerine adezyon arasında bir korelasyon olduğu saptamışlardır, keza en patojen tür olan ve yanak epitellerine güçlü tutunan *C.albicans* kökenlerinin, yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip olduklarını, buna karşılık aynı çalışmada düşük fosfolipaz aktivitesi gösteren ve daha az patojen olan *S.cerevisiae* ve *C.parapsilosis* türlerinin düşük aderans sergiledikleri gösterilmiştir [Barret ve ark., 1985]

Fosfolipaz ve lizofosfolipazın sitokimya bakımından yerleşimi de incelenmiş; hızlı gelişen kültürlerde enzim etkinliğinin tomurcuk oluşturma ile ilgili olduğu, daha yaşlı kültürlerde ise hücre çeperinde bulunduğu ve besiyerine salgılandığı; lizofosfolipazın da fosfolipaz ile hücrenin aynı kısmında bulunduğu gösterilmiştir. Bu etkinliğin blastokonidyumlardan gelişen hiflerde ve epitel hücrelerine giren hücrelerdeki varlığı da araştırılmış; tek tek blastokonidilerde miktar olarak çok değişiklik gösterdiği, enzim salgılanmasının hiflerin büyüme noktalarıyla sınırlı olduğu anlaşılmıştır. Hiflerin yaşlı kısımlarında fosfolipaz etkinliği hücre içine yöneliktir ve otoliz yapar. Böylece mayaların ürettiği fosfolipazın iki önemi vardır, bir taraftan mayanın gelişmesinin kontrolü ve parazit hücre zararının biçimlendirilmesi, diğer yandan kandidiyaz lezyonlarında konak dokusuna yayılma ile ilgilidir ve bu ikincinin birinciden daha önemli olduğu, ileri çalışmalar yapılmasının gerekliliği vurgulanmaktadır.

2.8. Slime Faktör Nedir?

Slime faktör; amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşmaktadır. Slime faktör plastik ve metal yüzeylere yapışmayı sağlayan, bakterilere antifagositer özellik kazandıran, ayrıca antimikrobik maddelerin bakteri hücrelerine girişini engelleyen ekstrasellüler bir polisakkarittir. Slime faktör üretimi özellikle koagülaz-negatif stafilokok infeksiyonlarında ayrıntılı biçimde incelenmiş ve mikroorganizmanın virulansını artırdığı saptanmıştır. Slime faktör, mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından korur. Bu nedenle yapışma veya slime yapımı önemli bir virulans faktör. olarak kabul edilmektedir [Christensen ve ark., 1992]. Candidalar için de slime üretiminin bir patojenite faktör olabileceği; slime faktör varlığında Candidaların konak hücrelerine, protez ve kateterlere tutunup daha kolay kolonizasyon ve infeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir [Yüce ve ark, 1996].

Gülenç ve ark. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *Trichosporon cutaneum*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lipolytica* türlerinin slime faktörü çalışmış ve 13'ü (% 48.1) zayıf pozitif ve 14'ü (% 51.8) kuvvetli pozitif olarak saptamışlardır [Gülenç ve ark., 1999].

Ünal yaptığı çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole ettiği 10 *Pseudomonas*, 20 *Klebsiella*, 55 *Staphylococcus* ve 15 *Candida* kökeninde slime varlığı çalışmış ve toplam 15 *Candida* izolatının 12'sinde Slime Faktör varlığı tespit etmiştir [Ünal, 2011].

2.9. Mayalar

2.9.1. Morfolojik ve fizyolojik özellikler

Mayalar pratikte, tomurcuklanma (budding) yoluyla aseksüel biçimde üreyen tek hücreli mantarlar olarak açıklanabilirler. Mantarlar için hazırlanmış terminolojide tomurcuklanma, bir tip konidiasyon ve tomurcuklar da blastoconidia olarak

adlandırılmıştır [Deak ve Beuchat 1996]. Bazı istisnalar ise ortadan bölünerek (fission) veya kısa saplardan tomurcuklar oluşturarak ürerler [Smith ve ark. 2000]. Tomurcuklanma, hücrenin duvarında bir yumrunun oluşması ile meydana gelir ve büyümeye başlar. Tomurcuk, anne hücreden çok küçük boyutlardayken ayrılır veya iki hücre de yaklaşık aynı boyuta gelene kadar ayrılmaz. Bazen çeşitli tomurcuklar veya tomurcuk nesilleri hücrenin diğer bir formu olan küme ya da zincirine bağlı kalırlar. Bu tomurcuklar hücrenin herhangi bir yerinde olabilirler (Şekil 2-1a) [Smith ve ark. 2000]. Mayaların çoğunda, *Saccharomyces* türlerinde görüldüğü gibi, multilateral tomurcuklanma görülür. Bu üremede tomurcukların ana hücre yüzeyinin üzerinde geniş bir alan işgal ettiği özel bir tip hücre bölünmesi görülür (Şekil 2-1b). Bipolar tomurcuklanmada ise, tomurcuklar ana hücrenin sadece kutup noktalarında oluşur (anneloconidiation) ve karakteristik limon şekilli hücreler meydana gelir (Şekil 2-1c). *Hanseniaspora* türleri bu tip üreme gösterirler [Deak ve Beuchat 1996].

Ortadan bölünme (fission), bir hücrenin bir veya daha fazla çapraz duvarla bölünmesi ve ayrı hücreler haline gelmek üzere segmentler ile parçalara ayrılması ile oluşur (Şekil 2-1d) [Smith ve ark. 2000].

Tomurcuklar bazen kısa saplar üzerinde oluşurlar (Şekil 2-1e). Bu tomurcuklar, mayanın cinsine göre değişmekle birlikte, saplar tomurcuğun ortasından veya tomurcuğa yakın kısmından koptukları zaman hücreden ayrılırlar [Samson ve ark. 2000].

Bazı maya hücreleri ise hem tomurcuklanma, hem de ortadan bölünerek üreme yeteneğine sahiplerdir. Bu mayalara örnek olarak *Trichosporon* türleri verilebilir [Deak ve Beuchat 1996].

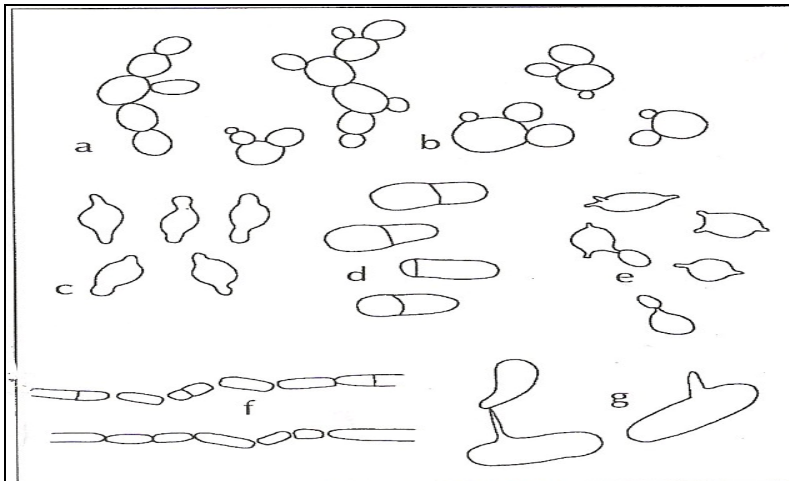
Mayalar basitçe tek hücreli olarak bilinmekle birlikte bazıları, çevre koşullarına bağlı olarak hyphae ve pseudohyphae adı verilen filamentler oluşturabilirler [Deak ve Beuchat 1996]. Bu filamentler iki tiptir:

1) Gerçek (septate) hyphae

2) Pseudohyphae

Gerçek hyphae, septum olarak da bilinen çapraz bir duvarın oluşmasını takiben bu duvardan uzayarak oluşur [Smith ve ark. 2000]. Maya hücresi gerçek hyphae ürettiğinde, tomurcuklar ondan oluşur veya bazen hyphae arthroconidialara ayrılır [Deak ve Beuchat 1996]. Arthroconidialar, bölümlerin düzgün şekilde biraraya geldiği gerçek hyphae'lerde, ilk başta gevşek zincirler halinde çeşitli açılarla birbirine eklenmiş hücreler serisidir (Şekil 2-1f).

Arthroconidia'lar *Geotrichum* ve *Trichosporon* genuslarında görülür. Pseudohyphae, ana hücreden ayrılmamış, uzamış hücrelerin tomurcuklanması ile oluşan filament formudur [Smith ve ark. 2000]. Bu filamentöz formlar, maya benzeri organizmalar olarak ifade edilirler ve hyphal küfler ile tek hücreli mayalar arasında ayırım sınırı teşkil ederler [Deak ve Beuchat 1996]. Ballistoconidia, maya hücresinden kısa bir uzantı şeklinde uzanan, neredeyse yuvarlağımsı, oval veya böbrek şeklinde, hücrelerdir (Şekil 2-1g) ve bir turgor mekanizması ile olgunlaştıklarında hücreden uzaklaştırılırlar. Ballistoconidia'lar *Sporobolomyces* ve *Bullera* türleri için spesifiktir [Samson ve ark. 2000].



Şekil 2.1. Mayalarda vejetatif üreme [Samson ve ark., 2000]

a) Tomurcuklanma, b) Multilateral tomurcuklanma c) Bipolar tomurcuklanma d) Ortadan bölünme e) Kısa saplardan tomurcuklanma f) Arthroconidia g) Ballistoconidia

Mayalar vejetatif olarak üremekle birlikte, seksüel üreme kabiliyetleri de vardır. Çoğu bunu bir ascus içerisinde ascosporlar yardımıyla yaparlar ve “ascomycetous mayalar” olarak bilinirler. Spor oluşturarak seksüel üreme gösteren ve ascospor oluşturan mayalar gerçek mayalar olarak adlandırılırlar ve taksonomide daha yüksek bir sınıfta yer alırlar. Bu mayalar fungal bölümlerde Ascomycota ve sınıf olarak da Hemiascomycetes sınıfı içinde gruplandırılmışlardır [Deak ve Beuchat 1996].

Seksüel üreme üç şekilde olur:

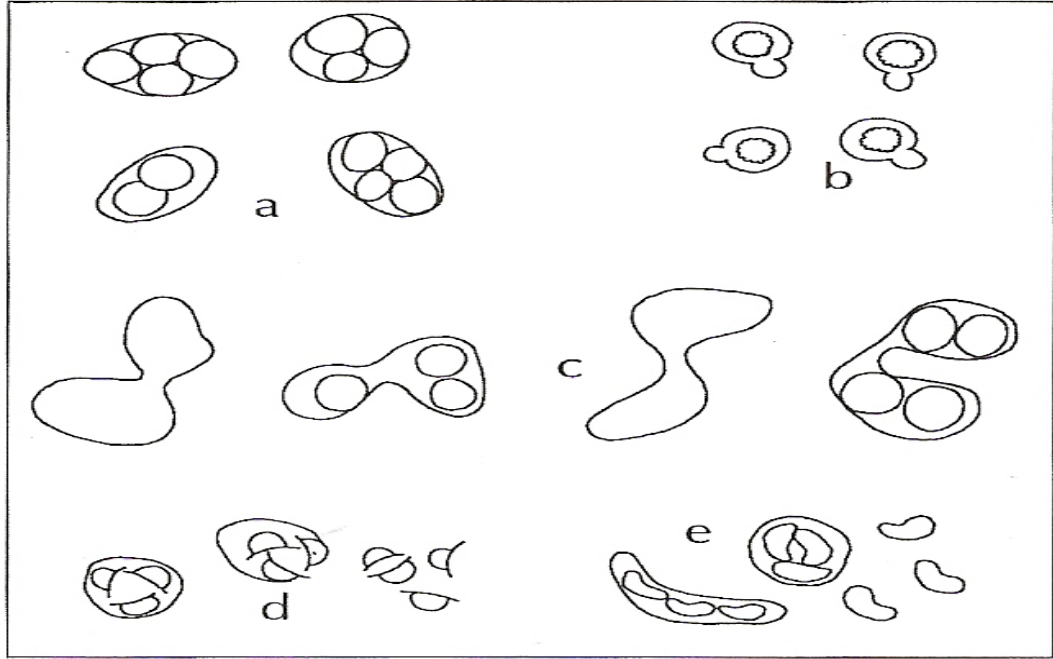
1-Vejetatif hücrenin direkt transformasyonu (konjuge olmamış ascus, (Şekil 2-2a)

2-“Anne-tomurcuk” konjugasyonu (Şekil 2-2b)

3-Bağımsız tekil hücreler arasında konjugasyon (Şekil 2-2c)

- a) Tomurcuklanma
- b) Multilateral tomurcuklanma
- c) Bipolar tomurcuklanma
- d) Ortadan bölünme
- e) Kısa saplardan tomurcuklanma
- f) Arthroconidia
- g) Ballistoconidia

Ascosporlar ascusların içinde oluşurlar. Şekil ve yapıları çeşitlidir. Düzgün veya pütürlü kenarlı duvarları; küremsi, şapka şeklinde veya böbrek biçimli olabilirler (Şekil 2-2d,e) [Smith ve ark. 2000].



Şekil 2.2. Mayalarda seksüel üreme [Samson ve ark.,2000]

a) Konjuge olmamış ascus b) Anne-tomurcuk konjugasyonu c) Tekil hücreler arasında konjugasyon d-e) Ascospor türleri

Basidiomycetous mayalar seksüel olarak teliosporlar vasıtasıyla, az bir kısmı ise basidialar ile ürerler. Bu gruba giren mayalara gıda isolatlarında nadiren rastlanır. Mayaların sınıflandırılması genellikle hücrelerin seksüel durumlarına göre yapılır. Fizyolojik testler, vejetatif hücrelerin mikroskopik olarak gözlemlenmesi ile bağlantılı olarak tür identifikasyonu için gereklidir. Türlerin tanınmasında çeşitli karbon ve nitrojen bileşenlerinde büyüme ve fermentasyon özellikleri önemlidir. Mayaların şekerleri fermente etme yeteneği, karbon dioksit üretimi ölçülerek belirlenir.

Bazı türler kuvvetli fermentasyon yeteneğine sahipken (*Saccharomyces*), bazı türler ise zayıf fermentasyon yeteneğine sahiptir veya fermentasyon yetenekleri yoktur (*Rhodotorula*). Şeker ve diğer karbon bileşenleri ayırıcı testlerde kullanılır. Diğer testler nitrate yanıt verme, vitamin yokluğunda üreme, yüksek şeker konsantrasyonuna, cycloheximide veya koruyuculara inkubasyon sıcaklığı

gereksinimlerine tolerans olarak özetlenebilir [Deak ve Beuchat 1996]. Çizelge 2-1’de mayaların karakterizasyonunda geleneksel olarak kullanılan özellikler gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Mayaların karakterizasyonunda geleneksel olarak kullanılan özellikler [Deak ve Beuchat, 1996].

Morfolojik		Fizyolojik
Biyokimyasal		
Seksüel üreme reaksiyonu	Şekerlerin fermantasyonu	Diazonium blue B
Konjugasyon şekli reaksiyonu	Karbon kaynaklarının asimilasyonu	Üreaz
Spor ve sporangio formu	Azot kaynaklarının asimilasyonu	Coenzim Q tipi
Basidiospor formu	Vitamin gereksinmesi	DNA baz
kompozisyonu		
Vejetatif üreme homolojisi	Gelişme sıcaklığı	DNA dizilim
Tomurcuklanma	Düşük su aktivitesinde gelişme	
Ortadan bölünme	Cycloheximide’e dayanıklılık	
Arthroconidia	Nişasta oluşumu	
Ballistoconidia	Asetik asit üretimi	
Mikroskobik gelişme		
Hücre şekli ve büyüklüğü		
Hyphae ve pseudohyphae		
Chlamydospor		
Makroskobik gelişme		
Katı besiyerinde koloniler		
Sıvı kültürler		

2.9.2. Biyokimyasal ve moleküler özellikler

Mayaların geleneksel karakterizasyonunda kullanılan morfolojik ve fizyolojik özelliklerin güvenilirliği sıkça sorgulanmaktadır. Biyokimyasal testler yıllardır mayaların karakterizasyonunda kullanılmaktadır [Deak ve Beuchat 1996].

Çizelge 2-2’de mayaların sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve moleküler özellikler gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Mayaların sınıflandırılmasında kullanılan biyokimyasal ve moleküler özellikler [Deak ve Beuchat, 1996]

Bileşik	Ölçüm
Karbonhidratlar	Hücre duvarı kompozisyonu
Tüm hücre karbonhidrat kompozisyonu	
Lipidler	Uzun zincirli uçucu yağ asidi modeli
Proteinler	Protein elektroforetik model
	İzoenzimler
Nükleik asitler	Guanin + Sitozin molekül oranı
	DNA-DNA homolojisi
	DNA sınırlama
fragmentleri	rRNA dizilimi
	Gen araştırması
	Kromozom karyotipleme

2.9.3. Mayaların sınıflandırılması

Mayalar fungilerin filogenetik olarak farklı bir grubudur. Seksüel durumları (teleomorph) iki ana fungal sınıfta gruplandırılabilir. Bunlar Ascomycetes ve Basidiomycetes’tir. Bununla birlikte seksüel durumları tam olarak bilinmeyen bazı cins ve türler de vardır ki bunlar da Deuteromycetes veya Fungi Imperfecti sınıfı içinde gruplandırılırlar [Deak ve Beuchat 1996]. Çizelge 2.3’te Ascomycetes ve Basidiomycetes grupları arasındaki önemli morfolojik ve kemotaksonomik farklar gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Ascomycetes ve Basidiomycetes grupları arasındaki önemli morfolojik ve kemotaksonomik farklar [Deak ve Beuchat, 1996]

Karakterler	Ascomycetous	Basidiomycetous
Morfolojik		
Muköz koloniler	- ¹	+ ²
Karotenoid pigmentler	-	+
Ballistoconidia	-	v ³
Hücre duvarı yapısı	İki katmanlı	Çok katmanlı
Tomurcuklanma	Holoblastik	Enteroblastik
Septal porlar	Yok veya basit	Mikro veya Doli
Biyokimyasal		
Hücre duvarı kompozisyonu	Glukan, mannan	Glukan, mannan, chitin
Diazonium blue B reaksiyonu	-	+
Üreaz reaksiyonu	-	+
Nişasta üretimi	-	v
Koenzim Q tipi	6, 7, 8, (9)	(8), 9, 10
G+C molekül oranı(%)	<50	>50

¹ Negatif, ² Pozitif, ³ Değişken

Mayaların geleneksel ve filogenetik sınıflandırmaları mevcut olmakla birlikte, son yıllarda moleküler biyolojinin de sınıflandırma üzerine etkileri görülmektedir [Deak ve Beuchat 1996]. Çizelge 2.4'te mayaların sınıflandırılmaları örneklerle açıklanmıştır.

Çizelge 2.4. Günümüzde mayaların sınıflandırılmaları [Deak ve Beuchat, 1996]

Sınıf, takım, aile	Cins ¹
Endomycetes	
Endomycetales	
Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>
Endomycetaceae	<i>Pichia</i>
Saccharomycopsidaceae	
<i>Saccharomycopsis</i>	
Lipomycetaceae	<i>Lipomyces</i>
Dipodascaceae	<i>Lodderomyces</i>
Metschnikowiaceae	<i>Metschnikowia</i>
Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>
Schizosaccharomycetales	
Schizosaccharomycetaceae	
<i>Schizosaccharomyces</i>	
Ustomycetes	
Ustilaginales	
Sporidiaceae	<i>Leucosporodium</i>
Basidiomycetes	
Filobasidiales	
Filobasidiaceae	<i>Filobasidium</i>
Tremellales	
Tremellaceae	<i>Tremella</i>
Deuteromycetes	
Blastomycetales	
Candidaceae	<i>Candida</i>
Cryptococcaceae	<i>Cryptococcus</i>
Sporobolomycetaceae	<i>Rhodotorula</i>

¹Türler örnek olarak verilmiştir

2.10. *Candida* Cinsi

Candida türleri insanları etkileyen en yaygın fungal patojenlerdir. İnsan deri ve mukozasında normal florada bulunur. Doğum sırasında veya doğumdan kısa bir süre sonra yenidoğana bulaşarak söz konusu flora içerisindeki yerlerini alırlar. Normal bireylerin % 30 – 50'sinin ağzında ve gastrointestinal kanalda yer alır. Bu

organizmalar, bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında invaziv olmayan yüzeyel ve /veya derin dokuları tutan enfeksiyonlara neden olur [Yıldız, 2008].

Kandidalar, Deuteromycota'da Blastomycetes sınıfının Cryptococcales takımında Cryptococcaceae familyasında sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı hif yapan ve eşeyli şekilleri Hemiascomycetes sınıfında bulunan bir grup maya formunda mantarlardır. Eşeyli ve eşeysiz sporları aracılığıyla ürer ve üreme şekilleri baz alınarak sınıflandırılır. Bugün için kabul edilmiş 200 kadar türü bulunmaktadır.

Candida cinsinin içinde bulunduğu türlerin taksonomik ilişkileri tam tanımlanmamıştır. Bu cins içerisinde en sık karşılaşılan patojen tür *C.albicans*tır. diğer en sık etkenler *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilopsis*, *C.krusei* ve *C.guilliermondii*dir. Diğer hastalık etkeni olan başlıca türler; *C.cutentula*, *C.Cifererrii*, *C.haemulonii*, *C.pelliculosa*, *C.pulcherrima*, *C.rugosa*, *C.utilis*, *C.viswanathii* ve *C.zeylanoides*tir. Bu sayı ve sıralama gün geçtikçe değişebilir. Eşeyli spor oluşturan *Candida* türlerinin bazıları *Claispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenka*, *Kuyveromyces*, *Pichia* gibi farklı türler olarak tanımlanmaktadır. *C.stellatoidea*, *C.claussenii* ve *C.langeronii* türleri *C.albicans* içinde sınıflandırılmıştır [Yıldız, 2008].

Candida türleri tek hücreli, hücre duvarında kitin ve /veya selüloz içeren ökaryotik kemoheterotrop organizmalardır. Tomucuklanma (blastospor) veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalırlar. *Candida* türleri genellikle çapları 4 – 6 µm arasında değişen yuvarlak veya yuvarlağımsı tomurcuklanan maya mantarlarıdır. *Candida* türlerinde oluşan blaktokonidyumlar ana hücreden ayrılmadan peşi sıra uzayarak yalancı hif (pseudohif), hücre duvarları birbirine paralel gerçek hif ve bir hifin ucunda veya arada bulunan tek hücreli, kalın duvarlı, oval geniş yapı olan konidiospor, germ tüp oluşumu ve askospor oluşumu tür tanımında önemlidir. Gram ile boyandıklarında tüm *Candida* türleri Gram pozitifdir. Maya elemanlarının örnekler içinde aranmasında Potasyum hidroksit – kalkofor beyazı floresan boyama kullanılır. Maya hücre duvarındaki kitin ve selülozla nonspesifik bağlan kalkoflor bayazı floresan boyası yeşilden maviye değişen renklerde floresan verir [Yıldız, 2008].

Candida türlerinin blastokonidium yapıları yuvarlak, oval veya uzamış şekildedir. Ender olarak bazı kökenler, özellikle antimikrobiyal ilaç kullanan hastalardan izole edilenler, ilk izolasyonlarında ileri derecede pleomorfik olabilir. Eşeysiz üreme multilateral tomurcuklanma yoluyla olur ve gerçek miçel de bulunabilir. Eğer eşeyli üreme olursa, mayalar teleomorfik durumlarına göre sınıflandırılır. Yalancı görünümlü ve bunlara blastokonidiumların bağlanma şekli, *Candida* türlerinin identifikasyonunda gözlenecek önemli özelliklerdir. Germ tüp ve klamidosporların görülmesi *Candida albicans* identifikasyonunda yardımcı olur [Özcan, 2007]. Bu mikroorganizmaların izolasyonu oldukça kolaydır. İçerisinde antifungal bulunmayan neredeyse her besiyerinde üreyebilir. Sabouraud Agar'da, mısır unlu agarda, patatesli nişastalı dekstroz agarda en iyi üremeyi gösterir. Mantar besiyerlerinde üreme 24 saat gibi erken bir sürede saptanabilmekle birlikte koloniler genellikle 48 – 72 saatte görünür hale gelir, ancak pasajları yapılmış ve laboratuvara adapte olmuş kökenler daha hızlı üreyebilir. Koloniler beyazdan kreme kadar değişen renklerde veya açık kahverengidir; başlangıçta krema görünümünde olup zamanla zarımsı veya girintili çıkıntılı bir hal alır. Bazen *Candida albicans* kolonileri Sabouraud Glikoz Agar'daki ilk izolasyonlarında buruşuk veya pürüzlü olabilse de daha sonraki pasajlarında düzgün kolonilere dönüşür. Bir klinik örnekte mayadan kuşkulanılan bir izolasyon olduğunda, ilk yapılacak şey koloniden bir direk preparat hazırlayıp incelemek olmalıdır. İnceleme yapılırken mayanın şekli, yalancı hif, gerçek hif veya artrokonidiumların bulunup bulunmadığı gözlenir.

İnokulumda hif/yalancı hif hücrelerinin bulunması nedeniyle bu koloniler germ tüp testinde kullanılmamalıdır. *Candida* türlerinin çoğu, aerobik koşullarda 25 – 30 °C'de iyi üreme gösterir, birçoğu da 37OC ve üstündeki sıcaklıklarda üreyebilir. Mayaların 37 °C'de üreyebilmeleri çok önemli bir özelliktir. Patojen türlerin çoğu 25 ve 37 °C'de ürerken, saprofit olanlar yüksek ısıda genelde üreyemezler. Türleri ayırt etmek için karbon asimilasyon ve ender olarak fermentasyon testlerine ihtiyaç duyulur, ancak günümüzde belirli türler için hızlı doğrulama testleri de geliştirilmiştir. Klinik örneklerden genel olarak izole edilen *Candida* türleri arasında, *Candida guilliermondi* dulsitolü (galaktitolü), *Candida kefyr* ise laktozu asimile eden tek türdür. *Candida parapsilopsis*, arabinozu kolaylıkla asimile ederken *Candida tropicalis* kükenlerinin

çoğu etmez. *Candida* türleri genellikle üreaz oluşturmaz ve KNO_3 asimilasyonu yapmazken *Candida krusei*’ in bazı türleri üreaz pozitifdir [Özcan, 2007].

Candida albicans’ ın hızlı ön identifikasyonu için kullanılan en değerli ve basit testlerden biri germ tüp testidir. Test ön identifikasyonu sağlar, çünkü tüm *Candida* kökenleri germ tüp pozitif değildir. *Candida dubliniensis* izolatlarının çoğu ticari sentetik besiyerlerinde germ tüp oluşturmamalarına karşın, *Candida dubliniensis* de germ tüp pozitifdir. Germ tüp preparatlarının mikroskopik incelemesinde, *Candida albicans*’ ın oluşturduğu kısa hiflerin baş tarafının, blastokonidyum ile germ tüpün kesiştiği yerde boğumlanma oluşmadığı görülür. Sıklıkla, çok sayıdaki *Candida albicans* blastokonidyumunun germ tüp oluşturduğu ve inkübasyonun 3 saatten fazla sürdüğü durumlarda, germ tüplerin birbirlerine dolanarak kümeler oluşturduğu görülür [Yıldız, 2008].

Candida türlerinin hepsi glikozu asimile ederken, inositolü asimile edemez. Diğer karbonhidratlarla yapılan asimilasyon testlerinin sonuçları kökenler göre değişiklik göstermektedir. Karbonhidrat asimilasyon testine benzer şekilde mayaların nitrojen kaynağı olarak nitrati kullanma yeteneklerini belirlemek için nitrat asimilasyon testi uygulanır. *Candida* türlerinin hiçbirisi KNO_3 ’ü karbon kaynağı olarak kullanmaz. Fermentatif mayalar karbondioksit ve alkol oluşturur. Gaz oluşumu ve pH’ ta değişiklik olmaması fermentasyonu gösterir. Karbonhidrat fermentasyon testi değişik *Candida* türlerini *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türlerinden ayırt etmek için kullanılır. Üreaz testi ile mantarların üreaz enzimi üretebilme yetenekleri gösterilir. Uygun substrat varlığında üre, üreazla parçalanarak amonyak oluşturulur. Oluşan amonyak pH’ ı yükseltir ve fenol red indikatörü pH artışına bağlı olarak kehribar renginden pembemsi bir renge dönüşür. *Candida krusei* ve *Candida lipolytica* türleri hariç diğer *Candida* türlerinde üreaz enzimi bulunmaz [Yıldız, 2008].

Candida türlerinin virülans faktörleri; çimlenme borusu oluşturmaları, “slime” faktörü, ekstrasellüler matriks proteinlerine adezyonu sağlayan yüzey integrin benzeri moleküller, sideoforları kullanabilme özelliği, proteaz, fosfolipaz, hyaluronidaz, kondroitin fosfataz, kitinaz, esteraz ve lipaz enzimleri, endotoksin benzeri aktivite,

morfolojik dimorfizm, antijenik çeşitlilik, fenotipik değişim ve hücre duvar bileşenleridir. Bu virülans faktörleri *Candida* enfeksiyonlarının oluşmasında önemlidir. Ancak fırsatçı mantar enfeksiyonlarında konağa ait faktörler daha ön plana çıkmaktadır [Yıldız, 2008].

Kandidaların oral ve vajinal epitel hücrelerine, fibronektine, endotele, trombosit fibrin pıhtılarına ve plastik materyale adezyonu patogeneze önemlidir. Adezyon, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir ve mukokutanöz kandidozun bu yapışma ile başladığı kabul edilmektedir. Kandidaların mukoza epitel ve endotek hücrelerine yapışması kolonizasyonun ilk aşamasıdır. Kandidalar içerisinde en sık görülen tür olan *C. albicans*'ın önemli özelliklerinin başında da mukoza yüzeylerine yapışmayı sağlayan adezyon yeteneği gelir [Yıldız, 2008].

2.11. *Trichosporon* Cinsi

Trichosporon türleri normal toprak florasının bir parçasıdır ve bazen insanda deri, tırnaklar, orofarinks ve gastro-intestinal sistemde kolonize olabilirler. Mikroorganizma önceleri yüzeysel deri ve kıllarda enfeksiyonlara neden olurken, günümüzde özellikle hematolojik maligniteler, solit organ tümörleri veya transplantasyonu yapılan immünsuprese kişilerde sıklığı giderek artan oranlarda invazif hastalıklara yol açabilmektedir [Watson ve ark., 1970]. Yine de *Trichosporon* türleriyle oluşan invazif mantar enfeksiyonları nadirdir ve literatürde genellikle olgu bildirimleri şeklinde yer almaktadırlar [Rastogi, 2007].

Trichosporon türleri çoğu besiyerinde kolayca ürerler, ancak kan kültürlerinin pozitifleşmesi zaman alır. Katı besiyerlerinde maya benzeri, hızlı büyüyen, pürüzsüz, buruşuk, zeminden kabarık, kadifemsi, kırılgan, mat, mumsu, beyaz, sarımsak beyaz veya krem rengi koloniler oluştururlar. Koloninin buruşukluğu zamanla daha da belirginleşir. Üreaz enzim üretimi bu türler için tipiktir. *Trichosporon* türleri mısır unu-Tween 80 agarda 25° C'de 72 saat inkübasyondan sonra bol miktarda psödohifa ve hifa oluştururlar. Blastokonidyumları tek hücreli ve değişken şekildedir. En tipik mikroskopik özellikleri tek hücreli ve genellikle kübik, fiçimsi veya uzun görünümlü

artrokonidiyum oluşturmalarıdır. Bu özellikleriyle kandidalardan ve blastokonidiyumlarıyla *Geotrichum* türlerinden ayırt edilirler. Pleomorfik maya benzeri veya septalı hifalar şeklinedirler ve artrokonidiyumlar nadiren görülür.

Trichosporon beigeli (sinonimi *T. cutaneum*) *Trichosporon* cinsi içinde en patojen türdür ve önceleri *T. beigeli*'nin bu cinse ait tek patojen tür olduğu sanılmaktaydı. Günümüzde türler arasında biyokimyasal ve morfolojik farklılıkların ortaya konmasıyla *T. beigeli*'nin insanda hastalık yapan en az sekiz farklı türden oluştuğu saptanmıştır: *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. mucoides*, *T. ovoides*, *T. pullulans* ve *T. loubieri*. *Trichosporon asahii* trikosporonoz olarak ta adlandırılan invazif infeksiyonların çoğundan sorumludur [Molnar ve ark., 2004]. Bu infeksiyonlar için en önemli risk faktörleri hematolojik maligniteler, kortikosteroid kullanımı, hemokromatoz, granülosit fonksiyon bozukluğu, son dönem böbrek yetmezliğidir. *Trichosporon inkin* ise beyaz piedranın etkenidir ve dermatomikoz, onikomikoz ve otomikoz gibi yüzeysel mikozlara neden olmaktadır. *Trichosporon asahii* ve *T. mucoides* gibi bazı türler Japonya gibi yaygın olarak bulunduğu ülkelerde aşırı duyarlılık pnömonilerine yol açmaktadır [Yıldız, 2008].

2.12. *Saccharomyces* Cinsi

Saccharomyces'lerin tipik özellikleri arasında nitrat kullanamamaları ve karbonhidratları fermente edebilmeleridir. Bu cinsin üyeleri gıda sanayisinde çok önemlidirler. Bir örnek, ekmek, bira ve şarap yapımında kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'dir. 30-35 kadar türü vardır. glukoz, maltoz, sükrozu fermente ederler. Grubun diğer üyeler arasında şarapçılıkta kullanılan *Saccharomyces bayanus* ve ilaç yapımında kullanılan *Saccharomyces boulardii* sayılabilir. Yakın zamanda *Saccharomyces boulardii*'nin *Saccharomyces cerevisiae*'nin bir alt türü olduğu gösterilmiştir [Barnett, 2003].

S. delbrueckii sadece glüköz ve maltozu fermente eder. Diğer *saccharomyces*'lerden ayırt edilmesini sağlar [Barnett, 2003].

S.cerevisiae Mısırunu-Tween 80 agarda 26⁰C’de 72 saat içinde birkaç yerinden tomurcuklansn değişik biçimde blastospor yapar. Bazen az sayıda ve çok kısa, güdük yalancı hifler oluşturabilir. askopor boyası veya Kinyoun yöntemi ile boyanmış preparasyonlarda her askus içinde 1-4 askospor görmek olasıdır [Barnett, 2003].

Askospor yapan bu mayalar oval, yuvarlak ve uzun hücreler oluştururlar. Çoğalmaları çok yönlü tomurcuklanma ve içinde 1 ile 4 adet spor bulunan askosporlarla olur. Bu cins endüstride büyük önem taşıyan mayaları içermektedir. Doğada başta üzüm olmak üzere meyve ve sebzeler üzerinde çok yaygındır. Şekerleri fermente ederek alkol ve CO₂ oluştururlar. *Saccharomyces cerevisiae* başta bira olmak üzere tutsülenmiş kuru salam, şarap, şampanya, ekmek ve alkol üretiminde de kullanılmaktadır. *S. bisporus* ve *S. rouxii*; *Zygosaccharomyces* cinsi, *S. rosei* ise *Torulaspora* cinsi içine aktarılmışlardır. *S. cerevisiae* gıdalarda nadiren bozulmaya neden olur. *S. bailli* mayonez, salata sosları, alkolsüz içkiler, meyve suları ve şarapta bozulma yapar. Benzoat ve sorbat gibi kimyasal koruyuculara dirençlidir *Saccharomyces cerevisiae* biyofilmin oluşumu gerçekleştirir [Barnett, 2003].

Saccharomyces fragilis laktozu fermente ettiği için süt ürünleri sanayinde çok önemlidir.

2.13. Rhodotorula Cinsi

Mısırunu-Tween 80 agarda 26⁰C’de 72 saat içinde yuvarlak veya oval, tomurcuklanan gözeler görülür. bazen güdük kalmış yalancı hiflerde saptanabilir. Askospor yapmaz. Bazen gözeler çevresinde ince bir kaplak bulunabilir [Barnett, 2003].

Üremeleri hızlı olup 4 gün içinde iyi üreme gösterir. Kolonileri pembe, koyu pembe, al, sarı veya portakal rengi koloni yaparlar. Kolonileri S biçim, mayamsı ve yumuşak kıvamdadır [Barnett, 2003].

Spor oluşturmazlar, ender olarak ilkel yalancı misel yaptıkları saptanmıştır. Çoğalmaları çok yönlü tomurcuklanmayla olur. Bir çoğu kültür ortamlarında ve gıdalar üzerinde kırmızı pigment oluştururlar. Doğada çok yaygın olarak bulunan bu mayalar hava ve toz ile bulaştıkları için laboratuvarlardaki en büyük kontaminasyon kaynağını oluştururlar. Çok yüksek oranda yağ içerdiklerinden *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa* gıdalarda bulunan en önemli iki türdür. Pembe, kırmızı, turuncu ve somon rengi pigment oluştururlar. Rhodotorula *glutinis* suşu karotenoid sentezler. Psikrotrof türleri de vardır. Taze kanatlı etleri, balık, karides ve sığır kıymasında bozulmalara neden olur. Tereyağının yüzeyinde kolaylıkla gelişirler [Barnett, 2003].

2.14. Cryptococcus Cinsi

Bu grup fungi imperfecti grubudur. Bu türler oval,yuvarlak maya benzeri mantarlardır. Tomurcuklanma ile ürerler genelde 26⁰C’de iyi ürerler. Nadiren pseudohif oluştururlar. Kolonileri krem renginde, düzgündür. Candida’lara benzer koloni oluştururlar. Üreyi parçalar üreaz pozitifdir. Şekerleri ancak asimile ederler [Kantarcıoğlu, 2003].

C.neoformans’ın virülens faktörleri; kapsül, kriptokoklara özgü ürünler, melanin üretimi, mannitol üretimi ile henüz spekülasyon sayılan potansiyel faktörler (süperoksit dismutaz, proteazlar, fosfolipaz B ve lizofosfolipaz).dir. Polisakkarit kapsül ve *C.neoformans*’ın çözülebilir hücre dışı bileşikler olan ‘kriptokoklara özgü ürünler’ genellikle dominant virülens faktörleridir [Kantarcıoğlu, 2003].

C.neoformans’ın kapsülü başlıca yüksek molekül ağırlıklı polisakkaritlerden oluşur. Bu polisakkarit glukuronoksilomannan (GKM) adını alır ve dört serotipi bulunmaktadır; *C.neoformans var.neoformans*’ın ürettiği A ve D ile *C.neoformans var.gattii*’nin ürettiği B ve C. Bu kapsülün *C.neoformans* için anahtar virülens faktörü olduğu gösterilmiştir; kapsüllü kökenler değişen derecelerde virülense sahip olup kapsülsüz mutantlar tipik olarak avirülandır [Kantarcıoğlu, 2003].

C.neoformans'ın patojen kökenlerini apatojen olanlardan ve bu cinsin diğer türlerinden ayırt edici bir karakteristik bunların (*Guizotia abyssinica* tohumu özütü veya kafeik asit içeren gibi) difenollü belirli besiyerlerinde siyaha yakın kahverengi bir pigment geliştirebilmeleridir. Bu pigment ilk kez Staib (1962) tarafından tanımlanmış olup *C.neoformans* kökenlerinin fenol oksidaz aktivitesi ile ürettiği melanine benzer bir bileşiktir. Melaninin mantar ve memelilerin çeşitli proteinlerini bağlayabildiği belirlenmiştir. Melanin protein ilişkisi, çözeltinin pH'sına, proteinin ve melaninin miktarına bağlıdır. Melanin üretiminin *C.neoformans*'ın virülensindeki önemi 1980'lerin başında gösterilmiş; fakat enfeksiyonun patogenezindeki rolü tam açıklığa kavuşturulamamıştır [Kantarcıoğlu, 2003].

Biyokimya analizleri *C.neoformans*'da melanogenez;3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) gibi dihidroksifenollerin dopakinona çevrilmesi ile gerçekleşir. Bu dönüşümü fenoloksidaz katalize eder. *C.neoformans*'ın dihidroksifenollerin endojen olarak üretimi için gerekli olan tirozinaz enziminin bulunmadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla *C.neoformans* kökenleri melanin üretmek için difenol bileşiklerini gelişme ortamından almak ve bu bileşiklerin melanine dönüşümünü katalizlemek için fenoloksidaz enzimine sahip olmak zorundadırlar [Kantarcıoğlu, 2003].

Bu mayanın kültürde üretildiğinde bir proteaz üretebildiği ve insan plazma proteinlerini sindirebileceği; kazeini sindirebilen bir proteazda ürettiği bildirilmiş ancak proteazların *in vivo* üretilip üretilmediği belirlenmemiştir. *C.neoformans* proteazlarının olasılıkla, konak dokusuna invazyonu başlatarak virülens mekanizmasına katıldığı üzerinde durulmaktadır [Kantarcıoğlu, 2003].

C.neoformans'ın yumurta sarılı agarda üretildiğinde fosfolipaz,39 lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz- transaçılaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiş; Vidotto V.'nin yaptığı çalışmaya alınan 50 kökenin 49'unun fosfolipaz pozitif olduğu bildirilmiştir [Vidotto, 2003].

Wang ve ark. insan kaynaklı 12 *C.neoformans* kökeni incelemişler, bunların tümünün gelişme sırasında besiyerinde D-mannitol üreterek salgıladığını

bildirmişler; ayrıca bir tavşan kriptokok meninjitisi modelinde de *C.neoformans*'ın *in vivo* D-mannitol üretebildiğini göstermişlerdir [Wang ve ark., 1994].

Cryptococcus neoformans üreaz enzimine sahiptir.ürel besiyerine ekildiğinde üreaz enzimini kullanarak üreyi parçalar. Besi yerinin rengi pembeden sarıya döner [Kantarcıoğlu, 2003].

Çalışmamızdan izole edilen türler,

C.kefyr

C.lipolytica

C.guilliermondii

C. Rugosa

C.intermedia

C. lusitaniae

Tri.beigelii

Tri. capitatum

Sac.cerevisiae

Cr. neoformans

Cr.albidus

Cr.neoformans var uniguttulatus

Rho.rubra

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Mataryel

Araştırmada 20.09.2009-08.06.2010 tarihleri arasında çeşitli süt işletmelerine gelen 100 adet çiğ süt örneği toplanmıştır. 100 çiğ süt örneğinden , 35'i Candida, 17'si Trichosporon, 8'i Saccharomyces, 8'i Cryptococcus, 3'ü Rhodotorula cinsine ait türler olmak üzere toplam 71 maya izole edilmiştir. Toplanan çiğ süt örneklerinden maya ve maya benzeri mikroorganizmalar morfolojik görünüşleri ve fizyolojik karakteristikleri çalışılarak ve RapID™ YEAST PLUS System (Oxoid) kullanılarak tiplendirilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Örnek alma ve örneklerin analize hazırlanması

Araştırmada çiğ süt örnekleri Türk Standartları Enstitüsünde belirtilen esaslara göre 200 ml'lik steril şişelere alınmış ve analiz için doğrudan laboratuara getirilmiştir. Sütlerin temin edildiği yörelere göre dağılımı çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Ringer çözeltisi 1/4-BR52 kullanılarak çiğ süt örneklerinin 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 'lük desimal dilüsyonları hazırlanmıştır. İlk olarak Ringer çözeltisi steril tüplere 9'ar ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Çiğ süt örneğinden steril pipetle 1ml alınarak 1 numaralı tüpe aktarılmıştır. Bu 10^{-1} desimal seyreltmedir. Bu tüpten de sırayla 10^{-2} , 10^{-3} 'lük seyreltmeleri hazırlanmıştır. 10^{-3} 'lük seyreltmeden 0,1 ml alınarak SDA(Sabouraud dextrose agar) besiyerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Sütlerin temin edildiği yörelere göre dağılımı

Sütlerin alındığı şehirler	Örnek sayısı	Toplam maya ve maya benzeri mikroorganizma izolasyonu gerçekleştirilen örnek sayısı
Burdur	34	26
Ankara	21	16
Antalya	15	11
Kızılcahamam	12	9
Kırıkkale	11	8
Kayseri	4	2
Konya	3	1
TOPLAM	100	73

3.2.2. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların sayımı

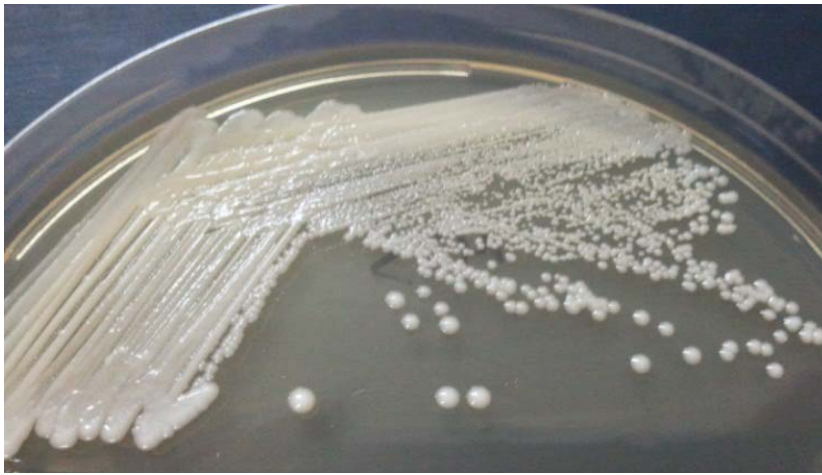
Normal koşullarda bir petride 30-300 maya kolonisi sayılabilirken, aynı petri içerisinde mayalar ile birlikte küflerin de bulunması durumunda sayım aralığı değiştirilmelidir. 10 mm'lik petrilerde 10-100, 14 mm'lik petrilerde ise 20-200 koloni sayılabilecek dilusyonlar tercih edilmelidir. [Deak ve Beuchat 1996, Clark ve ark.; 1978] İşletmelerden alınan çiğ süt örneklerinin 10^{-3} 'lük dilüsyonundan 0,1 ml alınarak SDA (Saboraud dextrose agar) besiyerine yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Petriler 37 C°'de 48 saat inkübasyona bırakılarak değerlendirilmiştir. 20-200 arasında koloni içeren besiyerinden sayım yapılmış ve seyreltme oranı dikkate alınarak 1ml örnekteki toplam maya ve maya benzeri mikroorganizma sayısı belirlenmiştir.

3.2.3. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu

Araştırmada maya ve maya benzerlerinin izolasyonu için SDA(Saboraud Dextrose Agar-Oxoid CM41) besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin kullanım sebebi, besiyeri bileşimindeki Sikloheksimid ve Kloramfenikol sayesinde kontamine materyalden maya ve benzeri mikroorganizmaların seçilmesini sağlamaktır.

Süt örneklerinin 10^{-3} dilüsyonundan SDA besiyerine ekimleri yapılarak 37 OC'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid CM0041)'da

krem rengi, beyaz, yuvarlak, düzgün kenarlı koloniler maya ve maya benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.1.). Bu kolonilere metilen mavisi ile boyama yapılarak da izolatların saflıkları kontrol edilmiştir. Saf kültürün elde edilebilmesi amacıyla üreyen maya kolonileri tekrar SDA besiyerine ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 37 °C’de 48-72 saat inkübasyona bırakılır. Bu tanı testleri yapılana dek her iki ayda bir tekrar yatık SDA’ ya ekim yapıldı [Deak ve Beuchat, 1988; Kurtzman ve Fell, 2000; Moreira ve ark, 2001; Apan, 2007].



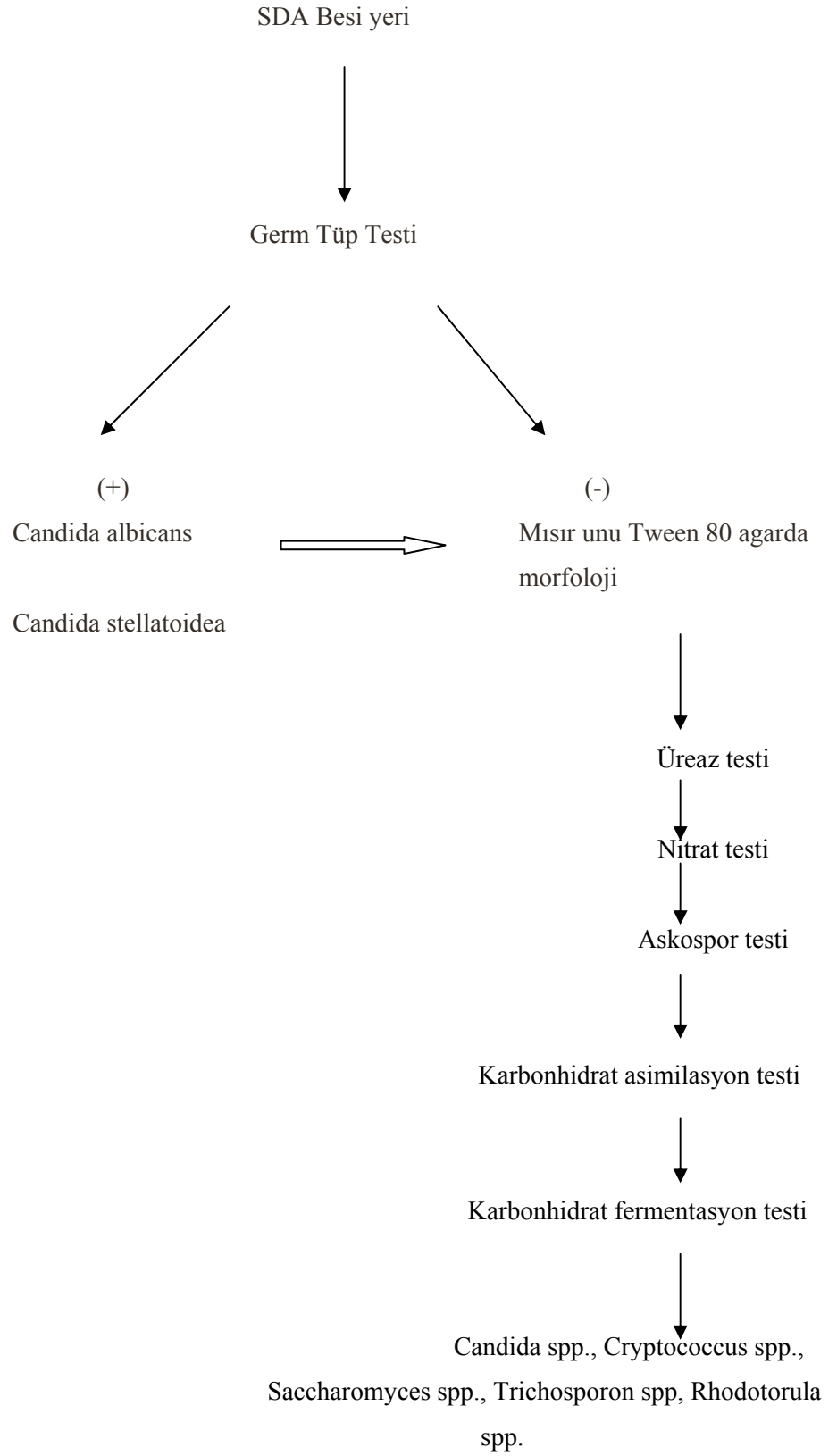
Resim 3.1. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların Sabouraud Dextrose Agar’da saf kültürün görünümü (Suş no.7)

3.2.4. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların identifikasyonu

Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerin belirlenmesinde genel yaklaşım germ tüp testi, mısır unlu agarda morfoloji, oloni morfolojisi, karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri, üreaz, nitrat ve askospor testleri gibi morfolojik karakterlerin ve biyokimyasal özelliklerin değerlendirilmesi ile yapılır. Şekil 3.1’de izlenecek yol kısaca gösterilmiştir.

İzolatların adlandırılabilmesi amacıyla ilk olarak germ tube testi yapılmıştır. Germ tüp oluşturmeyen izolatlar Mısır Unu Tween 80 agara ekilerek mikroskopta lamel kenarında oluşturdukları mikroskobik morfolojilerine bakılmıştır. Bu ortamda geliştirilen maya ve maya benzerleri hif, blastospor, klamidospore ya da artrospore

varlığı açısından incelenmiştir. Maya izolatları bu ortamda mikroskopik morfoloji temel alınarak genellikle cins seviyesine kadar sınıflandırılmıştır (Şekil 3.1.). İzolatlara karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri, üreaz, nitrat ve askospor testleri uygulanarak tür seviyesinde identifikasyonları yapılmıştır [Kurtzman ve Fell, 2000].



Şekil 3.1. Mayaların adlandırılması

3.3. İzole Edilen İzolatlar Uygulanan Morfolojik Tanı Testleri

3.3.1. Germ tüp testi

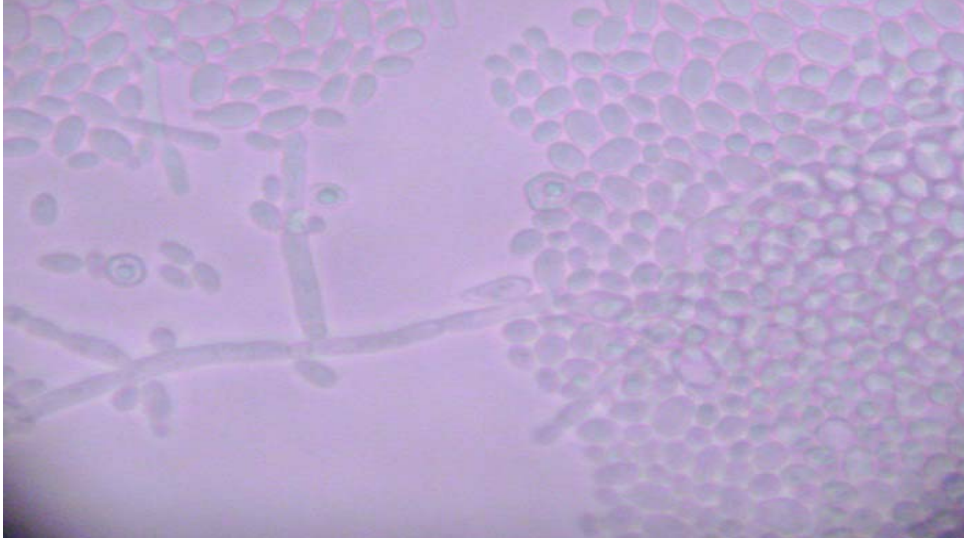
Kandidaların identifikasyonunda ilk adımdır. Hızlı sonuç veren uygulaması kolay *C.albicans*'ın diğer kandidalardan ayrılmasını sağlayan değerli bir testtir. *C.albicans* kökenlerinin %95-97'si germ tüp oluşturur. *C.albicans* dışında *C.stellaoide* da germ tüp üretir. Bu iki tür birbirinden sükröz asimilasyon testi ile ayırt edilmektedir. *C.dubliensis*'de germ tüp pozitif türdür. 1995 yılında keşfedilen bu türün *C.albicans*'dan ayırımı PCR ile yapılabilmektedir [Öncü, 2006] *C.tropicalis*, *C.kefyr* ve *C.krusei*'de de pseudo germ tüp oluşumu görülebilir [Buckley ve ark.,1989; Warren ve ark.,1995]. Germ tüp blastospordan orjin alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan bir filament olarak gözlenir.

Bu test için gerekli olan insan serumu Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından temin edilmiştir. Germ tüp testi, steril bir tüpte bulunan 1 ml insan serumu içine bir öze dolusu maya kolonisi inokule edilmiştir ve 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyondan sonra 1 damlası alınarak lam-lamel arası preparatlar 40x büyütmede mikroskopta incelenmiştir. İncelemede ana hücreden orjin alan başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan bir filament şeklinde uzantılar gösteren yapılar germ tüp olarak değerlendirildi.

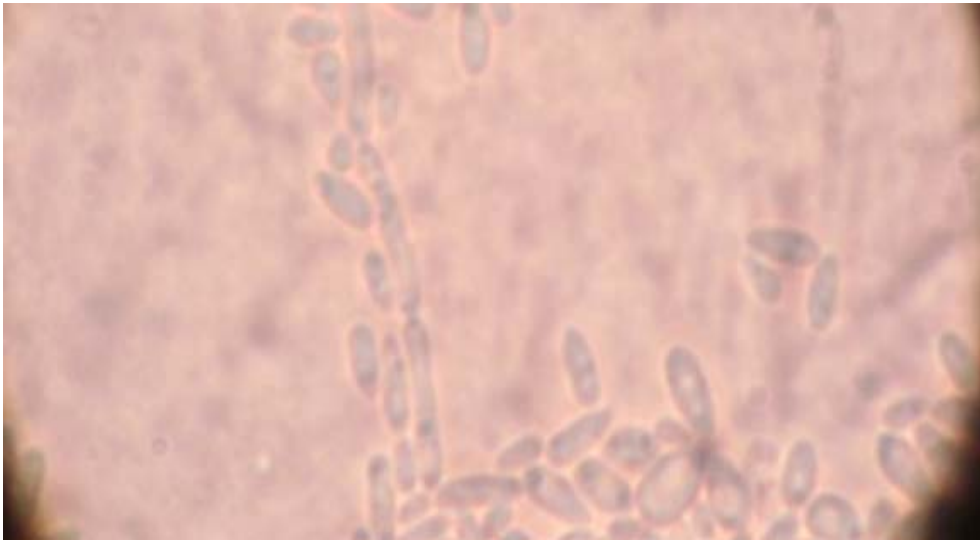
3.3.2. Mısırunu Tween 80 agar testi

İzolatların klamidospor, blastospor, artospor , hif, pseudohif üretme özellikleri mikrobik olarak değerlendirilir. bunun için araştırmamızda Mısır unu (Cornmeal)Tween 80 agar kullandık. İzolatlar Mısır Unu Tween 80 agara çizgi şeklinde ekildi, ekimler 25°C' lik etuvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üzerlerine steril lamel kapatılarak mikroskopta 40x büyütmede lamel kenarında oluşturdukları mikrobik morfolojilerine bakılmıştır. Bu ortamda geliştirilen maya ve maya benzerleri hif, blastospor, klamidospor ya da artospor

varlığı için incelenmiştir. Eğer hif varsa, bunu tomurcuklanma yoluyla oluşan hücre zincirleri olan pseudohif mi; yoksa hifin parçalanarak oluşturduğu artrosporlardan oluşan gerçek hif mi olduğu saptanmıştır (Resim 3.2) (Resim 3.3). Pseudohif oluşumu gözlenmişse bunların düzenli aralıklarla olup olmadığına da bakılmıştır.



Resim 3.2. Cornmeal-Tween 80 agar'da yalancı hif oluşumunun görünümü(suş no 44)



Resim 3.3. Cornmeal-Tween 80 agar'da yalancı hif oluşumunun görünümü(suş no 15)

3.4. İzole Edilen İzolatlara Uygulanan Biyokimyasal Tanı Testleri

3.4.1. Karbonhidrat fermentasyon testi

İzolatlar daha sonra farklı karbonhidratlardan gaz oluşturma yeteneklerinin belirlenebilmesi amacıyla karbonhidrat fermentasyon testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktoz karbonhidratları kullanılmıştır. Besiyerine inoküle edilen maya kolonileri 37⁰C'de 10-14 gün inkübe edilmişlerdir. Karbonhidrat fermentasyonu durham tüplerindeki gaz oluşumu ile belirlenmiştir. Sarı renk ise asit oluşumunu göstermiştir [Kurtzman ve Fell, 2000].

3.4.2. Karbonhidrat asimilasyon testi

İzolatlar ayrıca tek bir karbonhidrat substratında üreme yeteneklerinin test edildiği karbonhidrat asimilasyon besiyerine inoküle edilmişlerdir. 25°C'de 7 -14 gün inkübasyondan sonra mikroorganizmalar, bu ortamda gelişmeleri ve sarı renk oluşturmaları bakımından değerlendirilmişlerdir [Kurtzman ve Fell, 2000].

3.4.3. Üreaz testi

Maya izolatları üreyi parçalama yeteneğine sahip olan üreaz enziminin varlığının belirlenebilmesi amacıyla üreaz testine tabi tutulmuşlardır. Üreaz enzimine sahip mikroorganizmalar, üreyi amonyak ve karbondioksit parçalarlar. Oluşan amonyak pH'yı yükseltir ve renk değişimine neden olur.Çalışmada üreaz üretim yeteneği Christensen's metodu kullanılarak test edilmiştir. Besiyerine inoküle edilen izolatlar 25°C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sarı renkten, pembe yada kırmızıya değişim pozitif reaksiyon olarak tanımlanmıştır (Resim 3.5) [Hazen ve ark., 2003].



Resim 3.5. Üreaz testi (A) Pozitif reaksiyon (B) Negatif Reaksiyon (C) Değişken reaksiyon

3.4.4. Nitrat testi

Mayalar, nitrojen kaynağı olarak yalnızca nitrati kullanma yeteneklerinin test edilebilmesi amacıyla potasyum nitrat testine alınmışlardır. Bu amaçla nitrat besiyeri içeren iki ayrı tübe inoküle edilen izolatlar 30°C'de 3-7 gün inkübe edilmişlerdir. Tüplerden biri kontrol amacıyla kullanılmış ve ekimden sonra parafinlerek kapatılmıştır. Inkübasyon sonrası parafinlenmemiş tübe belli oranlarda α -naftalamin ve sülfanilik asit içeren asetik asit solüsyonlarından damlatılmıştır. Tüpte koyu pembe-kırmızı renk görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Maya izolatları daha sonra sıvı ortamların yüzeyindeki zar oluşumlarının belirlenebilmesi amacıyla Bacto Sabouraud Dextrose Broth (Difco)'a alınmışlardır. Sıvı besiyerine inoküle edilen koloniler 37°C'de 48-72 saat inkübe edilerek, tübün yüzeyinde oluşturdukları zarlar bakımından değerlendirilmiştir [Kurtzman ve Fell, 2000].

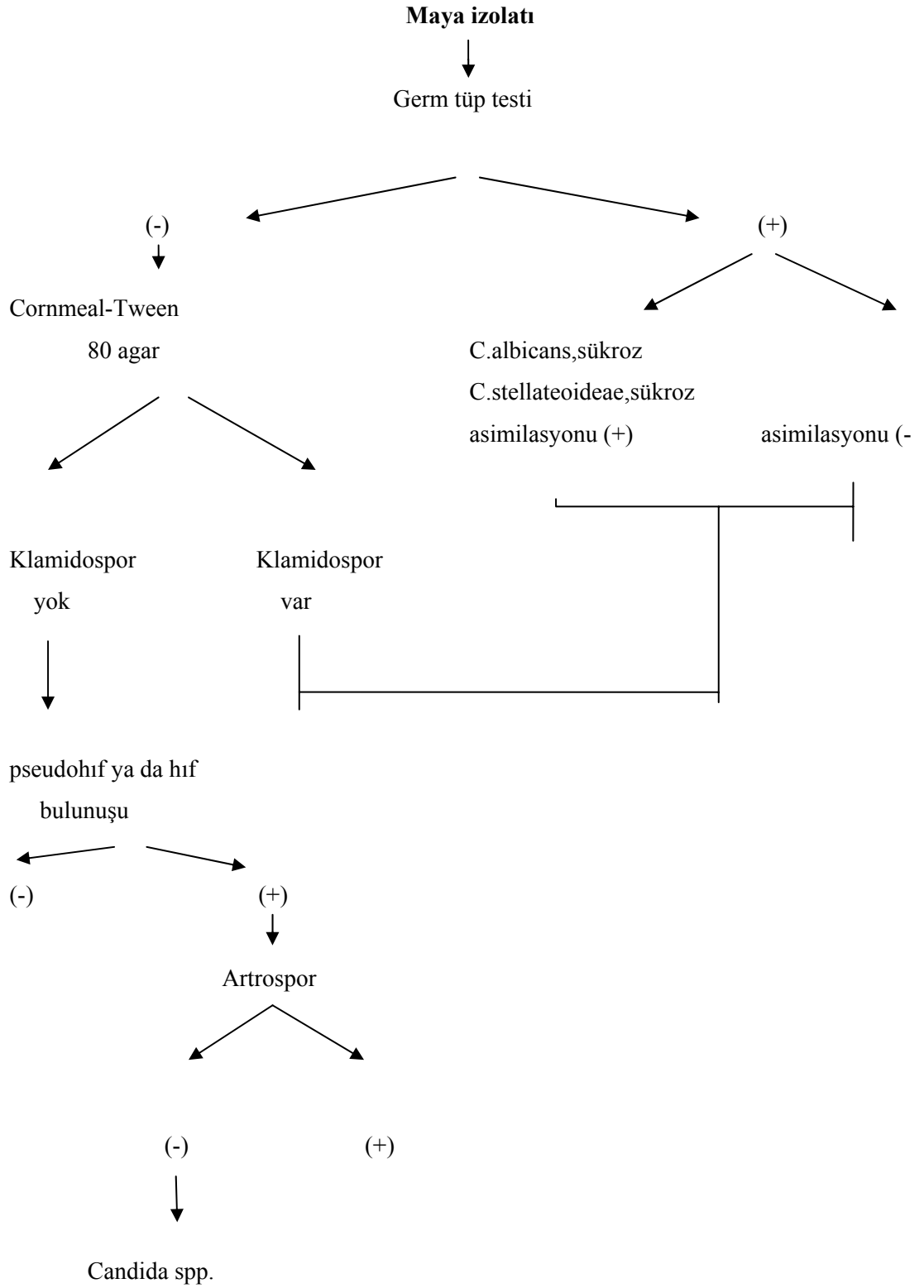
3.5. Askospor Testi

Bazı maya türlerinde bulunan askospor oluşumunun test edilmesi amacıyla izolatlar Gorodkova Medium'a alınarak, 37°C'de 7-10 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası yapılan gram boyamada askuslar içinde 1-4 askospor gözlenmiştir. Blastosporlar, gram pozitif ve askosporlar gram negatif olarak görülmüştür [Larone 1976].

3.6. Kandida'ların Adlandırılması

Araştırmada çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örnekleri SDA besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. SDA'da krem rengi, beyaz, yuvarlak, düzgün kenarlı koloniler maya ve maya benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar ilk olarak Germ tüp testine tabi tutulmuşlardır. Germ tüp oluşturan maya izolatları ya *C.albicans* yada *C.stellotaideae* veya *C.dubliensis* türlerine aittir. *C.albicans* yada *C.stellotaideae* birbirinden süktroz asimilasyon testiyle ayırt edilmişlerdir. *C.albicans* süktrozu asimile eder, *C.stellotaideae* etmez [Larone, 1976; Tümbay, 1982]. *C.albicans* oluşturdıkları tipik klamidosporlarla ve de PCR ile *C.dubliensis*'den ayırt edilir [Khan ve ark. 2004].

Maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agara alınarak, 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Mısırunu-Tween 80 agardaki üremede pseudohif ve blastospor gözlenmişse, bilinmeyen mayaların Candida cinsine ait olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca pseudohiflerin terminal uçlarında bulunan klamidospor oluşumları da *C.albicans* için ayırdedici bir kriter olarak incelenmiştir. Candida cinsine ait türlerin adlandırılabilirmeleri amacıyla karbonhidrat fermantasyonu ve asimilasyon testleri yapılmıştır. Karbonhidrat fermantasyonu testleri için glukoz, maltoz, süktroz, laktoz ve galaktoz karbonhidratları; asimilasyon testleri içinde glikoz, maltoz, süktroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca üreaz testi, nitrat ve askospor testleride yapılarak Kandida'lar adlandırılmışlardır [Lodder 1970, Kreger-Van-Rij, 1987; Barnett ve ark,1990; Kurtzman ve Fell, 2000].



Şekil 3.2. Araştırmada *Candida*'ların adlandırılmasında uygulanan testler

Çizelge:3.2.Candida türlerine ait özellikler [Kurtzman and Fell, 2000]

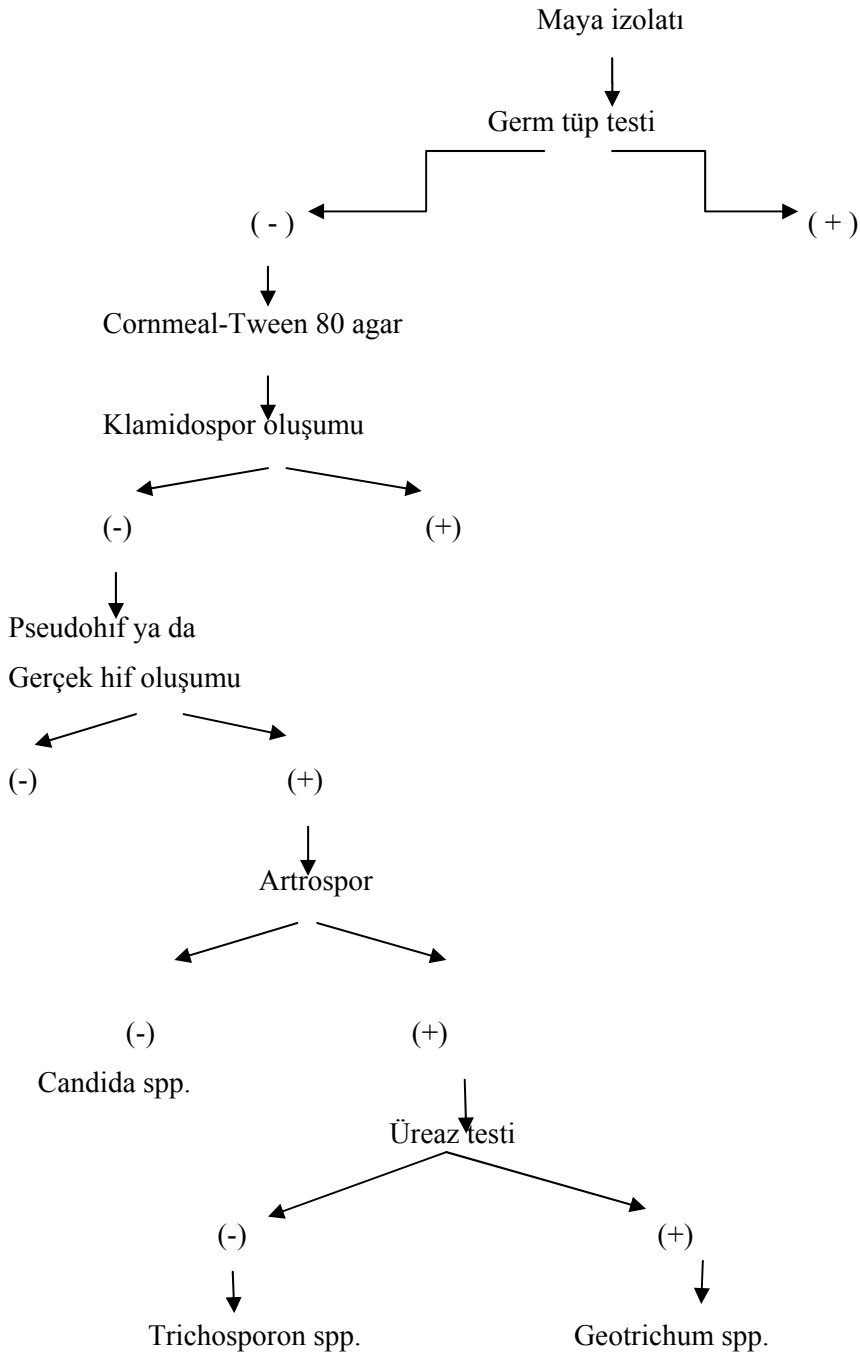
	37°C'de üreme	Pseudomycelium	Klamidospor	Germ tüp	Asimilasyon							Fermentasyon						
					Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Ksiloz	Rafinoz	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Üreaz	KNO ₃ asm.:
<i>C.kefyr</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+d	+	+	-	+	+d	+	-	-
<i>C.lipolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C.guilliermondii</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+d	+	-	-
<i>C.rugosa</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-d	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.intermedia</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-	+	-	-
<i>C.lusitanae</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-

+ =pozitif reaksiyon, - =negatif reaksiyon, d =değişken reaksiyon

3.7. Trichosporon'ların Adlandırılması

Araştırmada çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örnekleri SDA besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. SDA'da krem rengi, beyaz, yuvarlak, düzgün kenarlı koloniler maya ve maya benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar ilk olarak Germ tüp testine tabi tutulmuşlardır. Germ tüp oluşturmeyen maya izolatları, Mısır-Tween 80 agarda 25 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmış ve hif içerip içermemeleri bakımından incelenmişlerdir. Hif içeren mayaların blastospor ve artospor bakımından incelenmişlerdir. Artospor içeren mayalar ya Trichosporon yada Geotrichum cinslerine aittir. Trichosporonlar hif boyunca blastospor içermeleri ve üreaz (+) olmaları ile Geotrichum cinsinden ayırdedilmişlerdir. Karbonhidrat fermentasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz; karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları

kullanmıştır. Ayrıca nitrat ve askospor testleri de yapılarak *Trichosporon*'ların tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3) [Lodder 1970; Larone, 1976; Tümbay 1982; Kreger-Van-Rij, 1987].



Şekil 3.3.Araştırmada *Trichosporon*'ların adlandırılmasında uygulanan testler

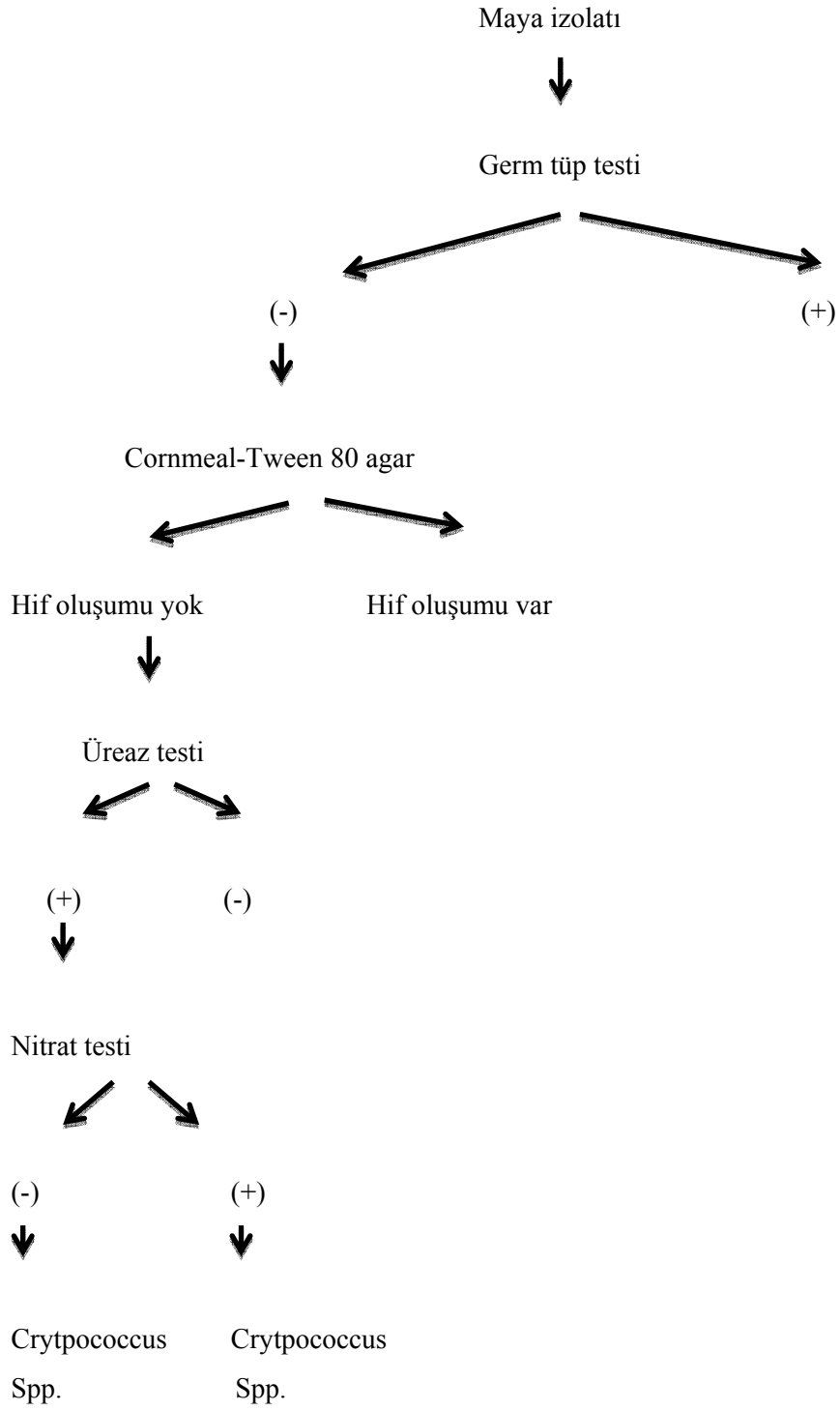
Çizelge 3.3. Trichosporon türlerine ait özellikler [Kurtzman and Fell, 2000]

	37°C'de üreme	Pseudomycelium	Klamidospor	Germ tüp	Asimilasyon										Fermentasyon							
					Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Trehaloz	Raffinoz	Sellobiyoz	Melibiyoz	İnositol	Ksiloz	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Trehaloz	Üreaz	KNO ₃ asm..
<i>T.beigelii</i>	D	-	-	-	+	+	+	+	+	d	D	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>T.capitata m</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

+ = pozitif reaksiyon, - = negatif reaksiyon, d = değişken reaksiyon

3.8. Cryptococcus'ların Adlandırılması

Araştırmada çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örnekleri SDA besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. SDA'da krem rengi, beyaz, yuvarlak, düzgün kenarlı koloniler maya ve maya benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar ilk olarak Germ tüp testine tabi tutulmuşlardır. Germ tüp oluşturmeyen maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra hif içerip içermemelerine göre değerlendirilmişlerdir. Hif içermeyen maya izolatları üreaz testine tabi tutulmuştur. Üreaz (+) maya izolatları nitrat testine alınmışlardır. Nitrat (-) ya da nitrat (+) olabilen Cryptococcus'ların karbonhidrat ve asimilasyon testleri yapılmıştır. Karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, sukroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanmıştır. Ayrıca Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, sikloheksimitli ortamda gelişim ve askospor testleri de yapılarak Cryptococcus'ların tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4) [Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990].



Şekil 3.4. Araştırmada *Cryptococcus*'ların adlandırılmasında uygulanan testler

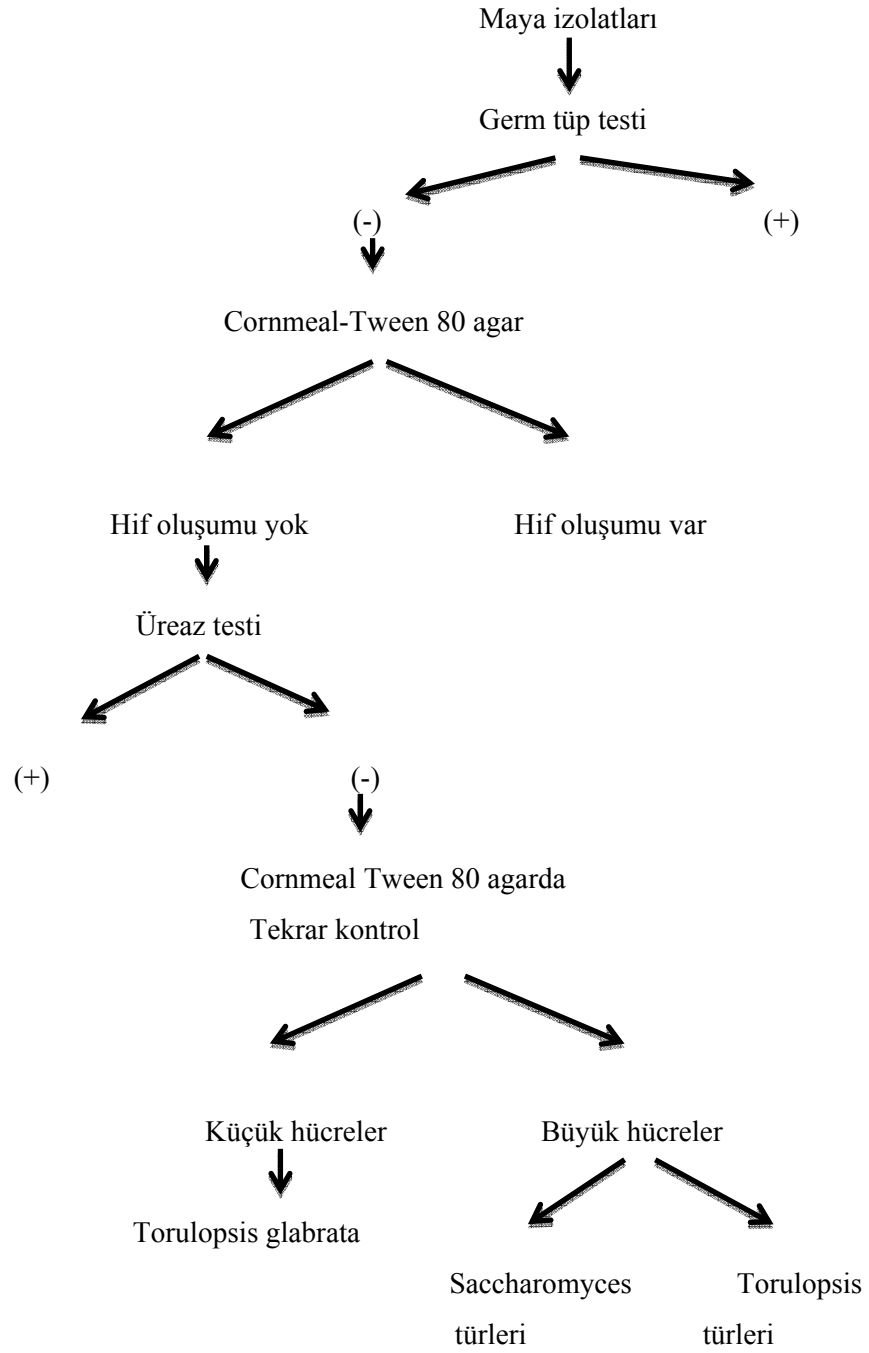
Çizelge 3.4. Cryptococcus türlerine ait özellikler [Kurtzman and Fell, 2010]

	37°C'de üreme	Pseudomycelium	Klamidospor	Germ tüp	Asimilasyon						Fermentasyon						Ureaz	KNO ₃ assm..
					Glikoz	Maltoz	Sükroz	Laktoz	Galaktoz	Ksiloz	Rafinoz	Glikoz	Maltoz	Sükroz	Laktoz	Galaktoz		
<i>Cr.neofor mans</i>	D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Cr.albidus</i>	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cr.neofor mans var unittugalus</i>	D	-	+	+	+	+	+	-	D	+	d	-	-	+	-	-	+	-

+ = pozitif reaksiyon, - = negatif reaksiyon, d = değişken reaksiyon

3.9. Saccharomyces'lerin Adlandırılması

Araştırmada çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örnekleri SDA besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. SDA'da krem rengi, beyaz, yuvarlak, düzgün kenarlı koloniler maya ve maya benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar ilk olarak Germ tüp testine tabi tutulmuşlardır. Germ tüp oluşturmayan maya izolatları Mısırunu-Tween 80 agarda 25°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Hif içermeyen izolatlar üreaz testine tabi tutulmuşlardır. Üreaz (-) maya izolatlar Saccharomyces ve Torulopsis cinslerine ait olarak bulunmuştur. İzolatlar daha sonra karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyon testine tabi tutulmuşlardır. Karbonhidrat fermentasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz ve galaktoz; karbonhidrat asimilasyon testleri için glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Ayrıca askospor testi, Sikloheksimitli ortamda gelişim testi ve Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, testleri de yapılarak Saccharomyces'lerin tür adlandırmaları gerçekleştirilmiştir [Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990] (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Araştırmada *Torulopsis* ve *Saccharomyces* türlerinin adlandırılmasında uygulanan testler

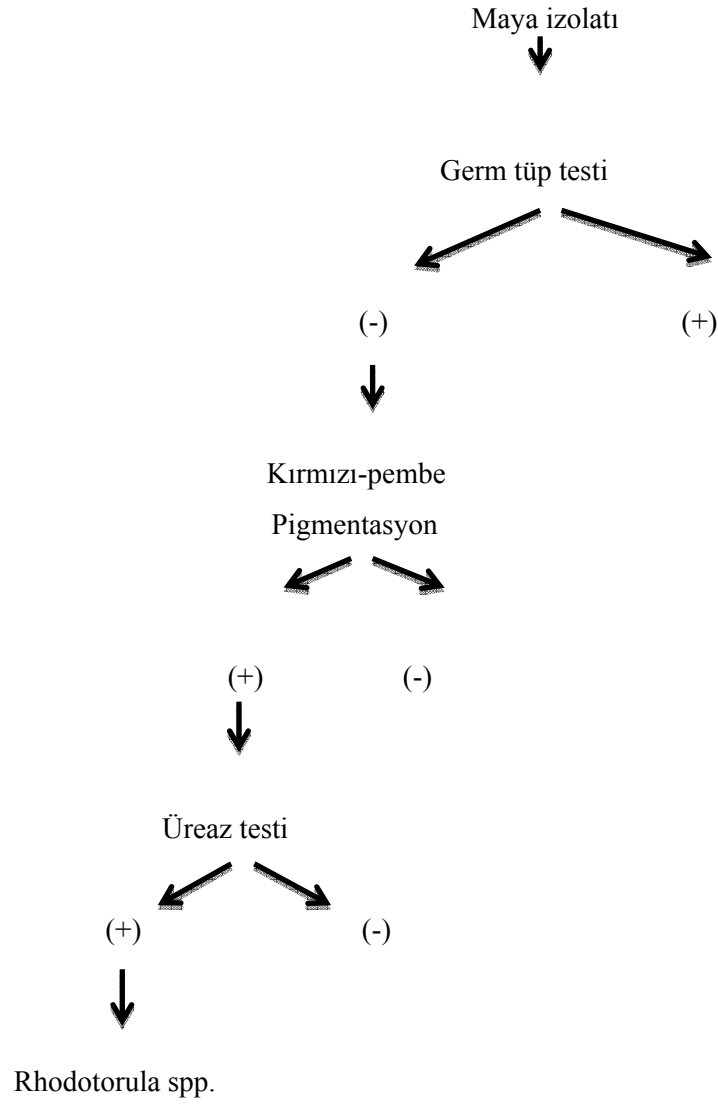
Çizelge 3.5. Saccharomyces türlerine ait özellikler [Kurtzman and Fell, 2000]

	37 ⁰ C'de üreme	Pseudomycelium	Klamidospor	Germ tüp	Asimilasyon										Fermentasyon							
					Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Trehaloz	Raffinoz	Sellobiyoz	Melibiyoz	İnositol	Ksiloz	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Trehaloz	Ureaz	KNO ₃ assm..
<i>S.cerevisiae</i>	d	-	-	-	+	+	+	-	D	+	+	-	d	-	-	+	d	+	-	-	+	-

+ = pozitif reaksiyon, - = negatif reaksiyon, d = değişken reaksiyon

3.10. Rhodotorula'ların Adlandırılması

Araştırmada çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örnekleri SDA besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. SDA'da krem rengi, beyaz, yuvarlak, düzgün kenarlı koloniler maya ve maya benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalar ilk olarak Germ tüp testine tabi tutulmuşlardır. Germ tüp testi (-) olup, kırmızı yada pembe pigmentasyona sahip maya kolonileri, üreaz testine tabi tutulmuşlardır. Üreaz pozitif maya izolatları Rhodotorula cinsine ait olarak bulunmuştur. Şekerleri fermente etmeyen Rhodotorula'lar karbonhidrat asimilasyon testi ile ayırt edilirler. Bu amaçla glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz, rafinoz ve ksiloz karbonhidratları kullanılmıştır. Sabouraud besiyerinde zar oluşumu, siklohekzimitli ortamda gelişim, nitrat ve askospor testleri de yapılarak Rhodotorula'lar adlandırılmıştır (Şekil 3.5) [Larone, 1976; Tümbay, 1982; Sandven, 1990].



Şekil 3.6. Araştırmada *Rhodotorula*'ların adlandırılmasında uygulanan testler

Çizelge 3.6.Rhodotorula türlerine ait özellikler [Kurtzman and Fell, 2000]

					Asimilasyon										Fermentasyon							
					Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Trehaloz	Raffinoz	Sellobiyoz	Melibiyoz	İnositol	Ksiloz	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz			Trehaloz
<i>R.rubra</i>	+	-	-	-	+	d	+	-	D	+	+	d	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-

+ = pozitif reaksiyon, - = negatif reaksiyon, d = değişken reaksiyon

Tüm testlerin değerlendirilmesi sonucunda izole edilen maya izolatlarının identifikasyon işlemine RapID™ YEAST PLUS System(Oxoid) ticari kiti kullanılarak devam edilmiştir.

3.11. Maya İzolatlarının RapID™ YEAST PLUS System Kullanılarak Tür Seviyesinde Adlandırılması

Biyokimyasal testlerle cins seviyesinde adlandırılması yapılan maya izolatlarının tür seviyesinde adlandırılması için RapID™ YEAST PLUS System kullanılmıştır (Resim 3.6) Bu hızlı identifikasyon sistemi, Karbonhidrat kullanımı testleri (Glukoz, Maltoz, Sükroz, Trehaloz, Raffinöz), Yağ asidi esteri hidrolizi testi, p-nitrofenil-Nasetil-β,D-galaktozamid; p-nitrofenil-α,D-glukozid; p-nitrofenil-β,D-glukozid; onitrofenil-β,D-galaktozid, p-nitrofenil-α,D-galaktozid, p-nitrofenil-β,D-fukozid, pnitrofenil fosfat, p-nitrofenil fosforilkolin, üre, prolin β-naftilamid, histidin β-naftilamid ve lösilglisil β-naftilamid kullanımı testlerini içeren 18 testten oluşan bir identifikasyon sistemidir.



Resim 3.6. RapID™ YEAST PLUS System test panelinin görünümü

3.11.1. Mayaların tür düzeyinde adlandırılması için rapID™ YEAST PLUS system uygulanması

Bu test için Sabouraud Dextrose Agar'da 30 °C'de 48 saat inkübe edilen taze maya kolonileri kullanılmıştır.

Koloniler RapID İnoculation Fluid içine McFarland No.3 bulanıklık olacak şekilde inoküle edilmiştir. Vortex yardımıyla iyice homojenize edilen süspansiyonlar panel kuyucukları üzerine boşaltılarak tüm kuyucukların süspansiyon ile dolması sağlanmıştır. Paneller, ağızları kapatılarak 30 °C'de 24 - 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda değerlendirmeye alınmıştır. 1. ile 6. Kuyucuk arasındaki kuyucuklar ile 15 nolu kuyucuk ayraç damlatmadan değerlendirilen testleri içermektedir. Glukoz (1), Maltoz (2), Sükroz (3), Trealoz (4), Rafinoz (5) ve Lipaz (6) testlerini içeren kuyucuklarda sarı renk gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. 15 nolu kuyucukta kırmızı ya da koyu kırmızı – turuncu renk oluşumunun gözlenmesi ise Üreaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. 7. ve 14. kuyucuklar arasında testlerin değerlendirmesi ise RapID Yeast Plus Reagent A ayracının damlatılmasını takip eden 30- 60 saniyelik süre içinde yapılmıştır. Bu kuyucuklarda sarı renk oluşumunun gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. 16. ve 18. kuyucuklar arasındaki testlerin değerlendirilmesi RapID Yeast Plus Reagent B ayracının damlatılmasını takip eden 30-60 saniyelik süre içinde yapılmıştır. Bu kuyucuklarda mor-kırmızı ya da koyu pembe renk oluşumunun gözlenmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.6).

Değerlendirme sonuçları bilgisayar ortamında RapID™ YEAST PLUS System değerlendirme programına aktarılarak tür tanımlaması yapılmıştır.

Çizelge 3.7. RapID™ YEAST PLUS System İdentifikasyon Testlerinin Prensipleri

Panel Konumu	Substrat	Kod	Pozitif Reaksiyon
1	Glukoz	GLU	Sarı
2	Maltoz	MAL	Sarı
3	Sükroz	SUC	Sarı
4	Trealoz	TRE	Sarı
5	Rafinoz	RAF	Sarı
6	Lipaz	LIP	Sarı
7	p-nitrofenil-N-asetil- β ,D-galaktozamid	NAGA	Sarı
8	p-nitrofenil- α ,D-glukozid	α GLU	Sarı
9	p-nitrofenil- β ,D-glukozid	β GLU	Sarı
10	o-nitrofenil- β ,D-galaktozid	ONPG	Sarı
11	p-nitrofenil- α ,D-galaktozid	α GAL	Sarı
12	p-nitrofenil- β ,D-fukozid	β FUC	Sarı
13	p-nitrofenil fosfat	PHS	Sarı
14	p-nitrofenil fosforilkolin	PCHO	Sarı
15	Üre	URE	Kırmızı-koyu kırmızı-turuncu
16	prolin β -naftilamid	PRO	mor-kırmızı-koyu pembe
17	Histidin β -naftilamid	LIST	mor-kırmızı-koyu pembe
18	lösilglisil β -naftilamid	LGY	mor-kırmızı-koyu pembe

3.12. İzole Edilen Mayalarda Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların biyofilm varlığının belirlenmesi amacıyla mikrolate yöntemi kullanılmıştır.

SDA 'da üretilen 48-72 saatlik kolonilerden % 1 Glukoz içeren Luria Bertani (Miller) Broth (BD Difco 244620), içeren tüplere McFarland 0,5 bulanıklık olacak şekilde inoküle edilmiştir.

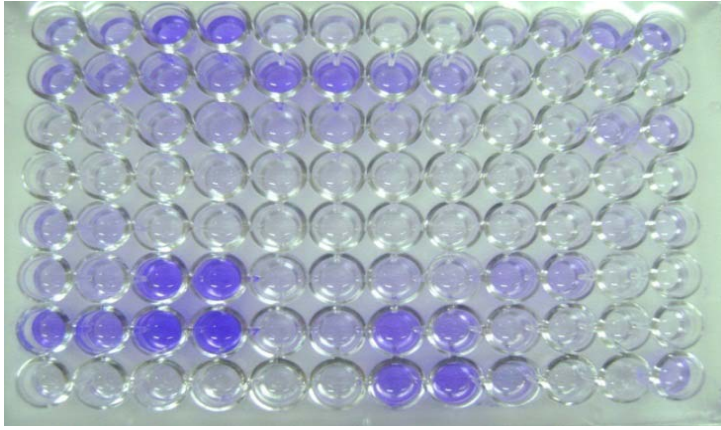
Tüplerdeki bu süspansiyonlardan, mikrolate kuyucuklarına, her bir süspansiyondan 2'şer kuyucuğa olacak şekilde 200'er ml dağıtılmıştır. Aynı işlem 4 farklı mikrolate için yapılmıştır. Mikrolatelerin 6'şar kuyucuğuna bakteri süspanse edilmemiş %1 oranında glukoz içeren steril Luria Bertani besiyerinden 200'er ml eklenmiş ve kontrol için kullanılmıştır. Plaklar buharlaşmayı engellemek için parafilmle sarıldı. Mikrolatelerden 2 tanesi 37 °C'de 48 saat, diğer 2'si 37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Mikrolateler, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Mikrolatelerin kuyucuklarına % 0,1'lik hazırlanan kristal viyole solüsyonundan 200'er mL. dağıtılmıştır. mikrolateler 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra, yeniden 3 kez distile su ile yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır.

%0,1'lik Kristal viyole solüsyonu eklenen mikrolate'in kuyucuklarına %95'lik etanol çözeltisinden 200'er ml eklenmiş ve 10 dakika bekletilmiştir (Resim3.7). Ve mikrolate'ler Mikro- elisa spektrofotometre(Versamax Tunable, Microplate Reader, Molecular Devices) cihazında 490 nm. dalga boyunda okutulmuştur.

Steril besiyeri içeren 6 kuyucuğun optik dansitelerinin ortalaması alınarak eşik değeri(cut-off) belirlendi. Her köken için 2 kuyucuğun optik dansitelerinin ortalaması alındı. Bu değer eşik değerin üzerinde ise biyofilm pozitif, altında ise biyofilm

negatif olarak değerlendirildi. Eşik değer seviyesine göre biyofilm üretimigöre biyofilm pozitifliği, zayıf pozitif (+), orta pozitif (++) ve kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildi. Çalışma her köken için üç kez tekrarlandı ve sonuçlar 9 okutmanın ortalaması alınarak değerlendirildi [Yücesoy ve ark.;2004]. Aynı işlemler 72 saat inkübe edilen plaklar için tekrar edilmiştir.



Resim 3.7.Kristal viyole ile boyama sonucu mikropate kuyucuklarının görünümü

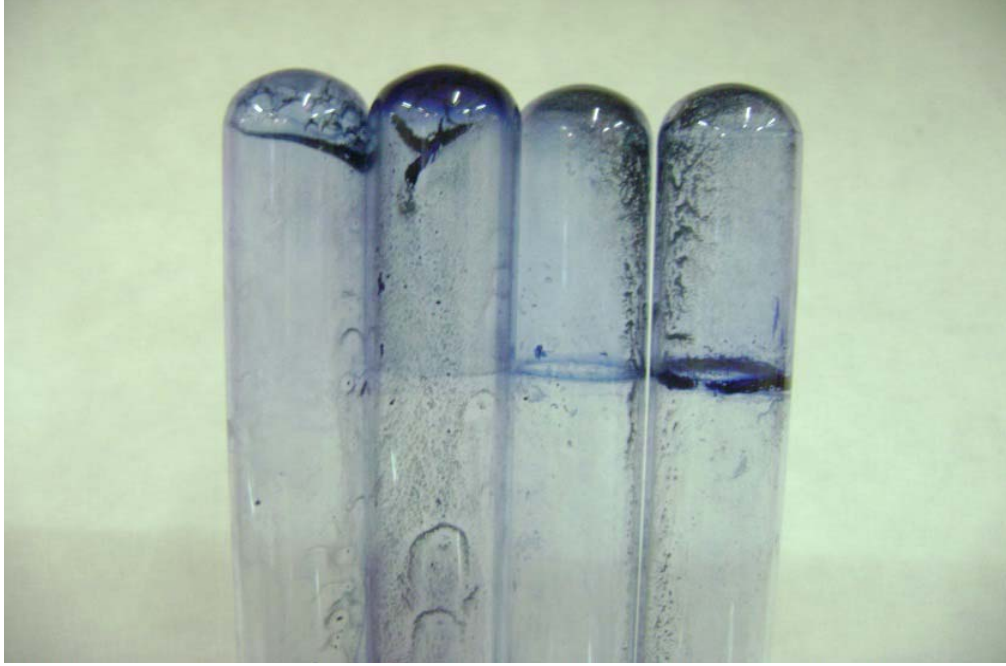
3.13. İzole Edilen Mayalarda Slime Faktör Oluşumunun Belirlenmesi

Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalarda slime faktör oluşumunu araştırmak amacıyla standart cam tüp yöntemi ve Kongo kırmızılı agar plak yöntemi kullanıldı.

3.13.1. Standart cam tüp yöntemi

SDA 'da 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan kolonilerden bir öze dolusu alınarak, son glukoz konsantrasyonu %8 olan Sabouraud buyyon(SB) içeren 10 ml' lik tüplere inoküle edildi ve 35 °C 'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplerin içerikleri boşaltılarak iki kez distile su ile yıkandı ve sonrasında %1 'lik safranin ile boyama yapıldı. Tüpler havada kurutulduktan sonra iç çeperde bulunan renkli bir film tabakasının varlığı biyofilm pozitif olarak değerlendirildi. Oluşan tabakanın

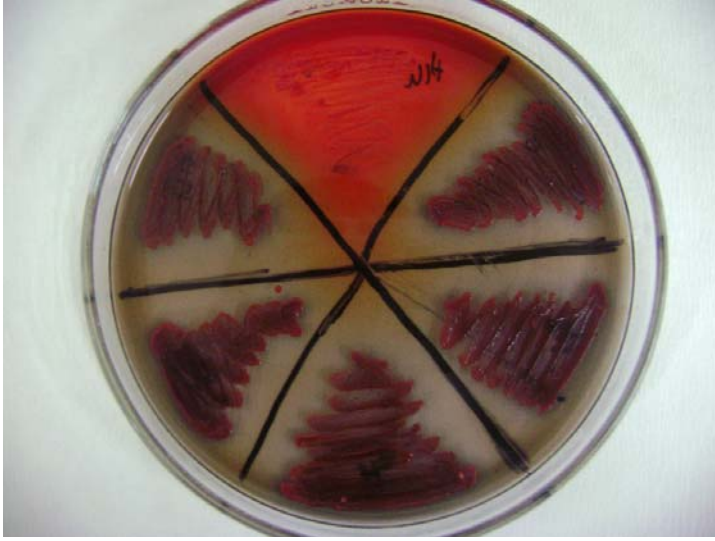
kalınlığına göre slime pozitifliği, zayıf pozitif (+), orta pozitif (++) ve kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildi (Resim 3.8)[Branchini, 1994].



Resim 3.8. Soldan sağa; Slime negatif (-), (+) pozitif kökenlerin tüplerdeki görüntüsü.

3.13.2. Kongo kırmızılı agar yöntemi

SDA 'da 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan kolonilerden 1-2 koloni alınarak %1 oranında Kongo Kırmızısı eklenerek hazırlanmış besiyerine tek koloni ekimleri yapılmıştır. 35 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Maya kolonilerinin ekimlerinin yapıldığı Kongo Kırmızılı besiyerinde koyu kırmızı kolonilerin görülmesi Slime pozitif, pembe kolonilerin görülmesi Slime negatif olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.9) [Arslan, 2003].



Resim 3.9. Slime pozitif ve negatif izolatların Kongo kırmızılı agarda görünümü

3.14. Fosfolipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Çiğ süt örneklerinden izole ettiğimiz maya ve maya benzeri mikroorganizmaların fosfolipaz aktivitelerini belirlemek amacıyla Price ve ark.larının yumurta sarılı agar plak yöntemi kullanıldı [Price ve ark.; 1982]. Besiyeri olarak 1 M NaCl, 0.005 M CaCl₂ ve % 8 steril yumurta sarısı eklenmiş Saboraud- Dekstroz- Agar(SDA) kullanıldı.

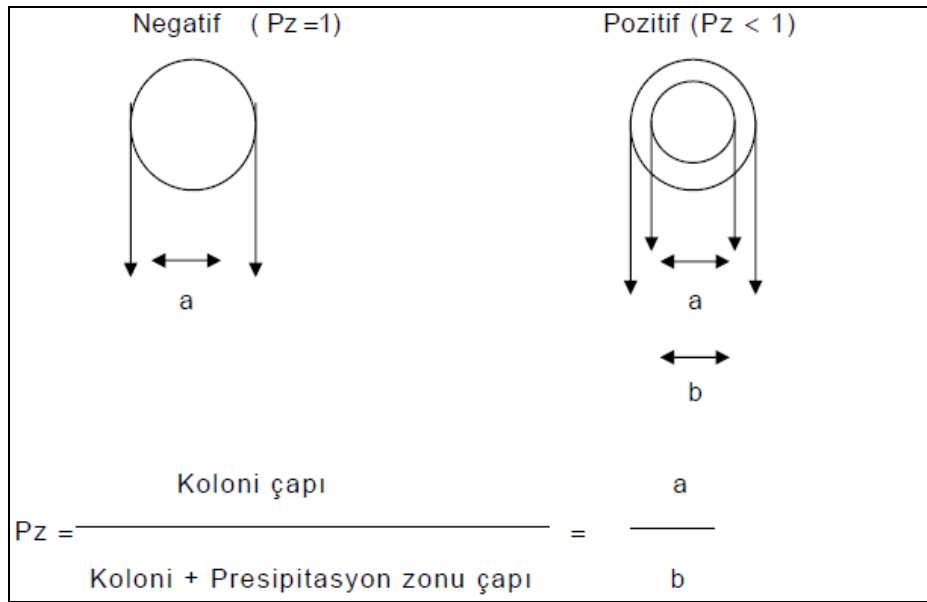
Deneyin yapılışı

Steril Yumurta sarısı 1000 g'de 15 dakika santrifuj edildi. Daha sonra supernatanta steril distile su eklenerek ilk volümüne getirildi ve steril SDA'ya eklendi. Eşit miktardaki sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat ile steril koşullarda karıştırılarak pH: 4.3'e ayarlandı.

Fosfolipaz aktivitesi saptanacak izolatların SDA'da 37C'de 48-72 saatlik inkübasyonu sonrası üreyen kolonilerden steril distile su kullanılarak Mc Farland 1'e göre süspansiyonlar hazırlandı. Her bir petri 4 eşit parçaya bölündü ve maya

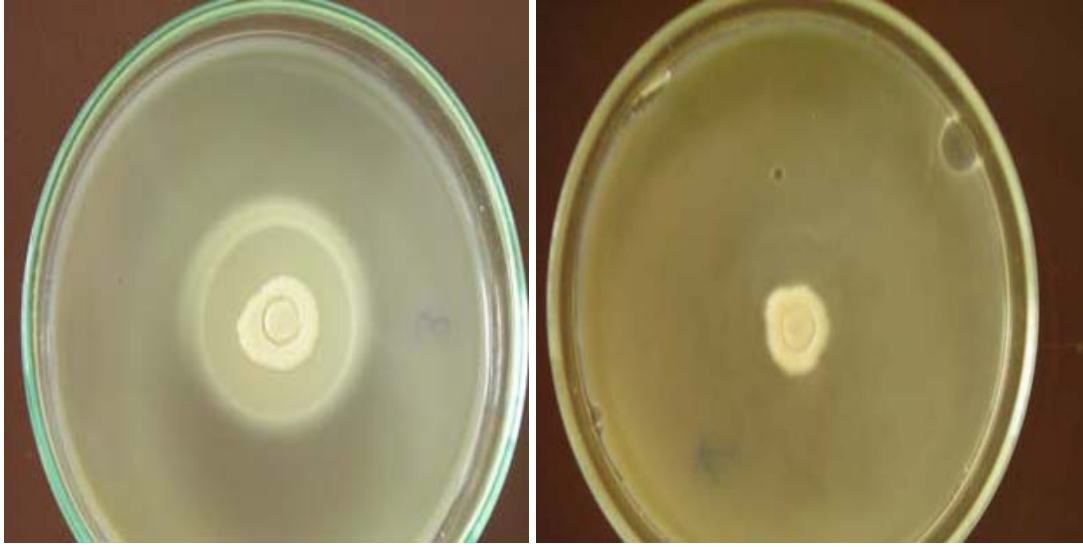
süspansiyonlarından ölçülü özeyle(0.01) besiyeri yüzeyine değdirilmek suretiyle ekim yapıldı ve 30 °C’de nemli bir ortamda 4 gün inkübe edildi.

Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu(Pz) dikkate alınmıştır(Şekil 3.7) [Dağdeviren.,2003].



Şekil 3.7. Fosfolipaz aktivitesinin hesaplanması

Fosfolipaz aktivitesi, koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplanmıştır. Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta,Pz=1.00 değeri, denenen izolatın fosfolipaz aktivitesinin negatif olduğunu gösterir. Bu durumda, Pz değeri 0,9-1.00 olanlar (+), 0,89-0.8 olanlar (++) pozitif, 0.79-0.70 olanlar (+++), <0,69 olanlar (++++) grubu oluşturmaktadır [Dağdeviren, 2003].



Resim 3.10. Fosfolipaz pozitif görüntü(sağda),fosfolipaz negatif görüntü(solda)

3.15. Mikroorganizmaların Temini İçin Kullanılan Besiyeri ve İçeriği

Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid CM0041)

Bileşimi	g/L
Mycological peptone	10,0
Glucose (Dextrose)	40,0
Agar	15,0
pH:	5,6 ±0,2

Hazırlanışı: Besiyerinden 65 g. tartılıp 1 L. Distile su içine çözdürülür. Kaynayana kadar ısıtılır. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilir.

Maya türleri, Sabouraud Dextrose Agar’da krem rengi,beyaz koloniler oluşturarak ürer.

3.16. Mikroorganizmaların Adlandırılmasında Kullanılan Temel Besiyerleri ve Uygulanan Testler

Metilen mavisi çözeltisi

125 mg. metilen mavisi 100ml alkol içinde çözündürülür. İyice çözündürüldükten sonra 250 ml 'ye kadar distile su eklenir.

Preparat hazırlanıp kurutulduktan sonra üzerine Metilen Mavisi çözeltisi damlatılıp 30-60 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda preparat distile su ile yıkanmış ve immersiyon yağı damlatılarak 100x büyütmede mikroskopta incelenmiştir.

Mısır unu Tween 80 agar (Oxoid CM103)

Bileşimi	g/L
Mısırunu extract	2 gr
Agar	15 gr
Tween 80(Polysorbate 80)	10 ml
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı: Besiyerinden 17 g. tartılarak 1 L. Distile su içinde çözündürülür. % 1 oranında Polysorbate 80 eklenir. Sık sık karıştırılır ve tamamen çözünmesi için 1 dakika kaynatılır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilir.

Karbonhidrat Asimilasyon Besiyeri (Modified Wickerham Medium Stans)

Bazal Ortam

Bileşimi	g/L
Bacto brom creasol purple (%1,6)	0,2 g
1/10 Normal Sodium hydroxide	1,0 mL

Noble Agar (BD 214230) 2,0 g

Hazırlanışı: Maddeler, 90 ml distile su ile karıştırılmış ve homojen hale gelene kadar ısıtılmıştır.

Stok Karbonhidrat Solüsyonu

Bileşimi

Carbonhydrates 1,00 g.

Yeast nitrogen base 0,67 g.

Hazırlanışı: Maddeler, 10.00 ml distile su ile karıştırılmış ve homojen hale gelmesi için ısıtılmıştır.

Karbonhidrat asimilasyon besiyerinin hazırlanışı

Stok karbonhidrat solüsyonu, erimiş agar ortamına eklenmiştir. İyice karıştırılarak pH: 7,0'ye ayarlanmıştır. Tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 10 dakika steril edilmiştir. Tüpler yatık pozisyonda katılaşmaya bırakılmış ve buzdolabında 4C'de muhafaza edilmiştir.

İnokülasyon ve inkübasyon: Bir öze dolusu saf maya kültürü, 9 ml distile suda süspanse edilmiştir. Süspansiyonun 0,2 ml'si, karbonhidrat asimilasyon besiyerine inoküle edilmiştir. Besiyeri rek değişimi yönünden değerlendirilmiştir.

Karbonhidrat fermentasyon besiyeri

Purple Broth Base (Difco)

Bileşimi	g/L
Peptose Peptone no.3	10 gr
Lab lemco powder	1 gr
Sodium Chloride	5 gr
Brom Cresol Purple	0,02 gr

Distile su 1000 ml

pH $6,8 \pm 0,2$ ayarlanıp indikatör madde ilave edildikten sonra içinde durham tüpü bulunan tüplere 9 ml miktarda pipetlenerek 121°C 'de 15 dakika steril edilmiştir.

Karbonhidrat solüsyonu

Glukoz, maltoz, sükroz, laktoz, galaktoz	(%1)
Karbonhidrat	1 gr
Distile su	10 ml

Yukarıda adı geçen seker çözeltileri membran filtre ($0,2\ \mu\text{m}$) ile steril edilmiştir.

Karbonhidrat temel besiyeri	9 ml
Karbonhidrat solüsyonu	1 ml

9 ml'lik karbonhidrat besiyerine 1 ml karbonhidrat solüsyonu ilave edilerek hazırlanmıştır.

Christensen's üre agar Oxoid CM53

Bileşimi	g/L
Peptone	1 gr
Glukoz	1 gr
Sodium Chloride	5 gr
Disodium Phosphate	1,2 gr
Potassium Dihydrogen Phosphate	0,8 gr
Phenol Red	0,012 gr
Agar	15 gr

Hazırlanışı: 2,4 gr alınmış ve 95 ml distile su ilave edilmiştir. pH $6,8 \pm 0,2$ ayarlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilmiştir. 50°C 'ye soğutulan besiyeri içine %40'lık üre solüsyonu, şırınga ucu filtreden geçilip steril edildikten sonra eklenir. Tüplere dağıtıldıktan sonra $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilebilir.

Gorodkova medium

Bileşimi	g/L
Dextrose	0,63 gr
NaCl	1,30 gr
Lablemco powder	2,50 gr
Agar	2,50 gr
Distile su	250 ml

Hazırlanışı: Hazırlanan karışım tüplere 9'ar ml dağıtılarak 121°C' de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilmiştir. Tüpler yatık pozisyonda dondurulmuştur.

Nitrat besiyeri

Bileşimi	g/L
Peptone	10 gr
Sodium Chloride	5 gr
Potasyum Nitrat	2 gr
Agar	3 gr
Distile su	1000 ml

Hazırlanışı: pH 7,0 ayarlanıp tüplere 5 ml taksim edilerek 121°C'de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilmiştir.

Solüsyon A

Sulfanilic acid	0,8 gr
Asetik asit, 5N	100 ml

Solüsyon B

α -naphthylamina	0,5 gr
Asetik asit	100 ml

Stok kültürden öze ile bir koloni alınarak 2 ayrı potasyum nitratlı besiyerine ekim yapılmıştır. Tüplerden birisi kontrol amacı ile parafinlenerek kapatılmıştır. Her iki tüpte 30°C’de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon sonunda parafinlenmemiş tüpe 1ml solüsyon A, 1 ml solüsyon B’den konulmuştur. Tüpte kırmızı renk oluşması pozitif reaksiyon olduğunu göstermektedir.

Ringer çözeltisi ¼ Code BR52

Bileşimi	g/L
Sodium chloride	2,25 gr
Potassium chloride	0,105 gr
Calcium chloride 6H ₂ O	9,12 gr
Sodium bicarbonate	0,05 gr
Distile su	500 ml

Hazırlanışı: pH 7,0 ayarlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlama yoluyla steril edilir.

3.17. Mikroorganizmalarda Slime Varlığının Tespit Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Kongo Kırmızılı Agar

Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM 1136)

Bileşimi	g/L
Brain infuion solids	12,5
Beef heart infusion solids	5,0
Proteose peptone	10,0
Sodium chloride	5,0
Glucose	2,0
Disodium phosphate	2,5
Agar	10,0
pH:	7.4 ± 0.2

Hazırlanışı: Besiyerinden 47 g tartılarak 1 litre distile su içinde çözdürülür. 80 g glukoz ve 0.8 g Kongo Kırmızısı eklenerek homojen hale gelene kadar karıştırılır. 121 OC'de otoklavda 15 dakika steril edilir.

Saboraud dextrose broth (Merck 108339)

Bileşimi	g/L
Peptone from meat	10,0
D(+) Glucose	20,0

3.18. Mikroorganizmalarda Biyofilm Varlığının Tespit Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Luria Bertani (Miller) Broth (Difco 244610)

Bileşimi	g/L
Tryptone	10,0
Yeast Extract	5,0
Sodium chloride	10,0

Hazırlanışı: Besiyerinden 25 g tartılıp 1 litre distile su içinde çözdürülür. Homojenize olması için 1 dakika süre boyunca kaynatılır. 5'er mL olacak şekilde tüplere dağıtılır ve 121 °C'de otoklavda 15 dakika steril edilir.

Kristal viyole çözeltisi

Bileşimi	g/L
Kristal viyole	2 gr
Ethyl alcohol	20 ml
Ammonium oxalate	0,8 gr
Distile su	80 ml

Hazırlanışı: 20 ml etil alkolde 2 gr kristal viyole ve 80 ml distile suda 0,8 gr amonyum oksalat çözündürülür. Sonra her iki çözeltide iyice karıştırılır. Karışım bir gece bekletildikten sonra süzülür.

3.19. Mikroorganizmalarda Fosfolipaz varlığının Tespit Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Yumurta sarılı agar

Temel besiyeri

Bileşimi	g/L
Pepton	1.25 gr
Glukoz	2.5 gr
Agar	2.5 gr
NaCl	7.3 gr
CaCl ₂ 6H ₂ O	0,14 gr
Distile su	115 ml

Hazırlanışı: Besiyeri karışımı 121 °C’de 15 dk steril edildi. Besi yeri içindeki ağarın donmaması amacıyla 50C’lik su banyosunda bekletildi. Steril Yumurta sarısı 1000 g’de 15 dakika santrifuj edildi. Daha sonra supernatanta steril distile su eklenerek ilk volümüne getirildi ve steril SDA’ya eklendi. Eşit miktardaki sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat ile steril koşullarda karıştırılarak pH: 4.3’e ayarlandı.

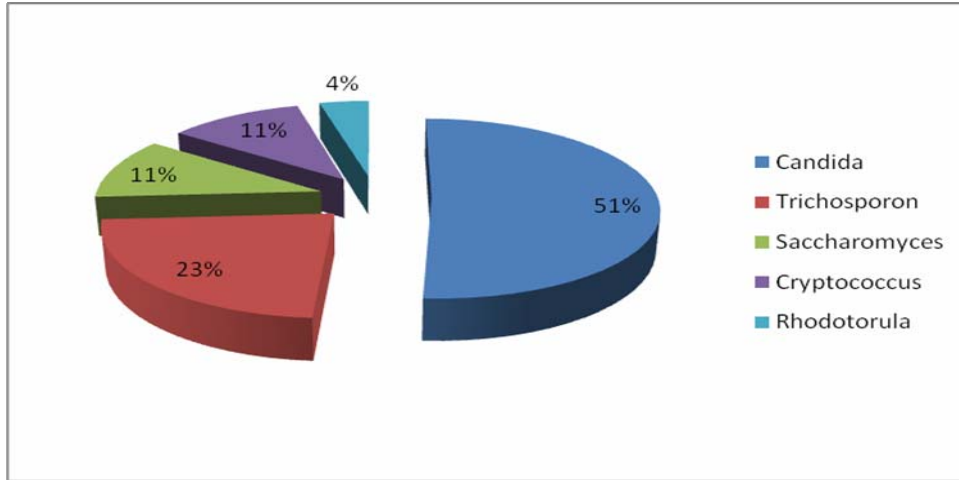
4. BULGULAR

Araştırmada çeşitli süt işletmelerine gelen 100 adet çiğ süt örneği alınarak maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu ve adlandırması yapılmıştır. Bu örneklerin 73'ünden maya ve maya benzeri mikroorganizmalar izole edilerek adlandırılmıştır. 100 örnekten geriye kalan 29 örnekte anılan mikroorganizmalara rastlanmamıştır. Araştırmada izole edilen mikroorganizmaların morfolojik görünimleri değerlendirilmiştir. Fizyolojik karakterleri çalışılmıştır. Ayrıca Remel RapID™ YEAST PLUS kullanılarak da cins ve tür adlandırmaları yapılmıştır.

100 çiğ süt örneğinin 73'ünden (%73) maya ve maya benzerleri izole edilmiştir. İzole edilen 73 örnekten, 37'si(%51) Candida, 17'si(%23) Trichosporon, 8'i(%11) Saccharomyces, 8'i(%11) Cryptococcus, 3'ü(%4) Rhodotorula cinsine ait türler olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1.).

Çizelge 4.1. 100 adet çiğ süt örneğinden izole edilen mayaların dağılımı

İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	İzolasyon sayısı
Candida	37
Trichosporon	17
Saccharomyces	8
Cryptococcus	8
Rhodotorula	3
Toplam	73



Şekil 4.1. 100 adet çiğ süt örneğinden izole edilen mayaların dağılım yüzdeleri

Araştırmada çiğ süt örneklerinden en yaygın olarak Candida% 51 türlerine rastlanmıştır. Trichosporon % 23, Saccharomyces %11, Cryptococcus %11 ve Rhodotorula %4 oranında görülmüştür.

Çalışılan toplam 100 çiğ süt örneklerinde toplam canlı maya sayımı yapılmıştır. İzole edilen 73 maya ve maya benzerlerinin toplam canlı maya sayımı Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışılan toplam 100 çiğ süt örneğinde toplam canlı maya sayımı

İzolasyon no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Toplam canlı maya sayımı
2	<i>C.kefyr</i>	$3,9 \times 10^6$
3	<i>Cr. neoformans</i>	$2,9 \times 10^6$
7	<i>Tri.capitatum</i>	$1,9 \times 10^6$
8	<i>Cr.neoformans</i>	$2,1 \times 10^6$
10	<i>C.kefyr</i>	$1,2 \times 10^6$
11	<i>C.kefyr</i>	$1,4 \times 10^6$
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	$1,5 \times 10^6$
13	<i>Tri.beigelii</i>	$2,7 \times 10^6$
14	<i>Tri.beigelii</i>	$2,5 \times 10^6$
15	<i>C.kefyr</i>	$0,8 \times 10^6$
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	$1,2 \times 10^6$
17	<i>C.guilliermondii</i>	$1,0 \times 10^6$
18	<i>Tri.capitatum</i>	$0,6 \times 10^6$
19	<i>Cr.neoformans</i>	$1,1 \times 10^6$

Çizelge 4.2.(Devam) Çalışılan toplam 100 çiğ süt örneğinde toplam canlı maya sayımı

20	<i>Cr.neoformans</i>	$1,4 \times 10^6$
21	<i>Tri.beigelii</i>	$1,8 \times 10^6$
22	<i>C.lipolytica</i>	$2,1 \times 10^6$
23	<i>Tri.capitatum</i>	$0,9 \times 10^6$
24	<i>Tri.beigelii</i>	$0,8 \times 10^6$
25	<i>C.guilliermondii</i>	$1,3 \times 10^6$
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	$2,5 \times 10^6$
27	<i>Tri.capitatum</i>	$1,5 \times 10^6$
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	$3,1 \times 10^6$
29	<i>C.intermedia</i>	$1,5 \times 10^6$
30	<i>Tri.capitatum</i>	$1,7 \times 10^6$
31	<i>Tri.beigelii</i>	$1,5 \times 10^6$
32	<i>C.lipolytica</i>	$1,8 \times 10^6$
33	<i>Cr.neoformans</i>	$2,2 \times 10^6$
34	<i>C.intermedia</i>	$1,9 \times 10^6$
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	$2,2 \times 10^6$
38	<i>Tri.capitatum</i>	$2,2 \times 10^6$
39	<i>C.rugosa</i>	$1,1 \times 10^6$
40	<i>C.kefyr</i>	$3,0 \times 10^6$
41	<i>Tri.capitatum</i>	$1,2 \times 10^6$
42	<i>C.lipolytica</i>	$2,3 \times 10^6$
43	<i>Cr.neoformans</i> var <i>uniguttulatus</i>	$0,7 \times 10^6$
44	<i>C.rugosa</i>	$1,5 \times 10^6$
46	<i>C.lipolytica</i>	$2,8 \times 10^6$
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	$3,0 \times 10^6$
48	<i>Tri.beigelii</i>	$1,2 \times 10^6$
49	<i>C.lipolytica</i>	$2,6 \times 10^6$
50	<i>C.kefyr</i>	$1,4 \times 10^6$
52	<i>C.kefyr</i>	$1,8 \times 10^6$
53	<i>C.kefyr</i>	$1,5 \times 10^6$
56	<i>C.lipolytica</i>	$2,2 \times 10^6$
57	<i>C.guilliermondii</i>	$3,1 \times 10^6$
58	<i>C.kefyr</i>	$2,0 \times 10^6$
59	<i>C.kefyr</i>	$1,5 \times 10^6$
60	<i>Rho.rubra</i>	$0,9 \times 10^6$
62	<i>Cr.albidus</i>	$0,8 \times 10^6$
63	<i>C.lipolytica</i>	$1,7 \times 10^6$
64	<i>C.guilliermondii</i>	$2,9 \times 10^6$
65	<i>Tri.beigelii</i>	$2,3 \times 10^6$
66	<i>C.kefyr</i>	$3,3 \times 10^6$
67	<i>Tri.beigelii</i>	$1,8 \times 10^6$

Çizelge 4.2. (Devam) Çalışılan toplam 100 çiğ süt örneğinde toplam canlı maya sayımı

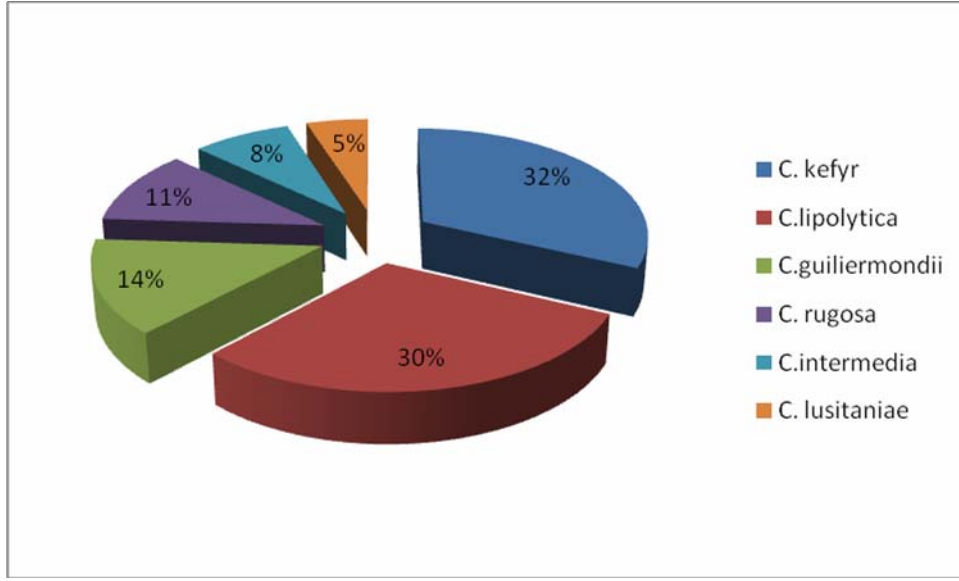
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	1,8x10 ⁶
69	<i>C.intermedia</i>	2,5x10 ⁶
71	<i>Tri.beigelii</i>	2,6x10 ⁶
72	<i>C.lipolytica</i>	3,3x10 ⁶
73	<i>C.rugosa</i>	1,2x10 ⁶
74	<i>C.rugosa</i>	0,7x10 ⁶
75	<i>C.lusitaniae</i>	0,6x10 ⁶
76	<i>C.lipolytica</i>	2,4x10 ⁶
80	<i>C.lipolytica</i>	1,5x10 ⁶
83	<i>C.kefyr</i>	2,7x10 ⁶
84	<i>Rho.rubra</i>	1,2x10 ⁶
85	<i>Tri.beigelii</i>	2,2x10 ⁶
86	<i>C.lipolytica</i>	2,1x10 ⁶
87	<i>C.lipolytica</i>	1,2x10 ⁶
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	2,1x10 ⁶
93	<i>Tri.capitatum</i>	1,6x10 ⁶
99	<i>C.kefyr</i>	3,5x10 ⁶
100	<i>Rho.rubra</i>	2,8x10 ⁶

73 çiğ süt örneğindeki toplam canlı maya ortalaması 1,91x10⁶cfu/ml olarak hesaplanmıştır. 73 süt örneğindeki en çok maya sayısı 3,5x10⁶cfu/ml, en az maya sayısı ise 0,6x10⁶cfu/ml olarak saptanmıştır.

Araştırmada izole edilen 37 Candida cinslerinden 12'si(%32) *C. kefyr*, 11'i (%30) *C. lipolytica*, 5'i (%14) *C.guilliermondii*, 4'ü (%11) *C. rugosa*, 3'ü (%8) *C.intermedia*, 2'si (%5) *C. lusitaniae* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3) (Şekil 4.2).

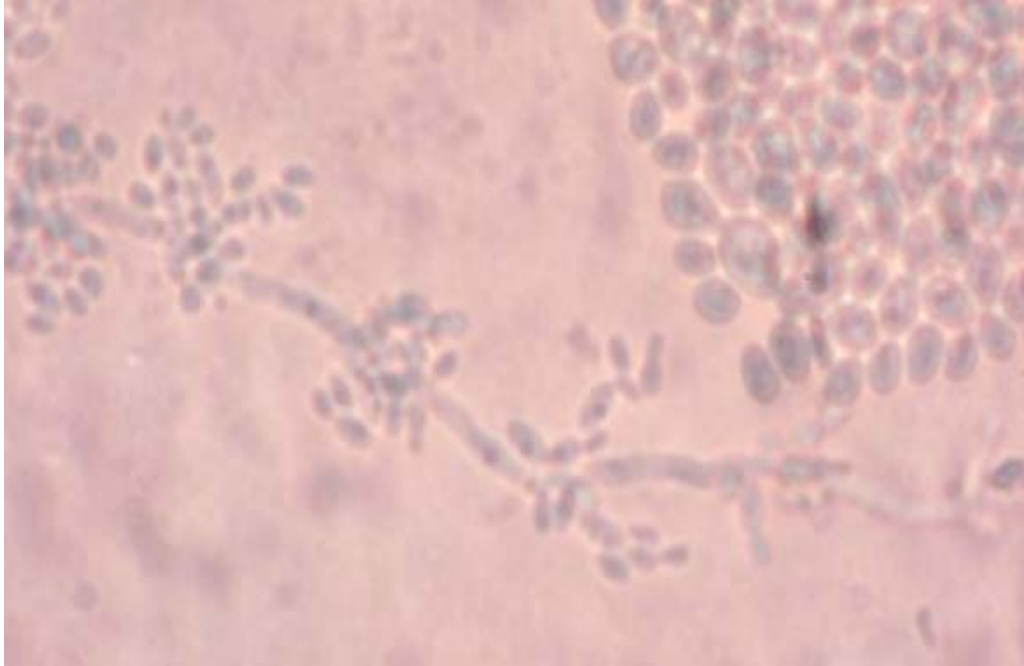
Çizelge 4.3. İzole edilen Candida türlerinin dağılımı

İzole edilen Candida türleri	İzolat sayısı
<i>C. kefyr</i>	12
<i>C.lipolytica</i>	11
<i>C.guilliermondii</i>	5
<i>C. rugosa</i>	4
<i>C.intermedia</i>	3
<i>C. lusitaniae</i>	2
Toplam.....	37

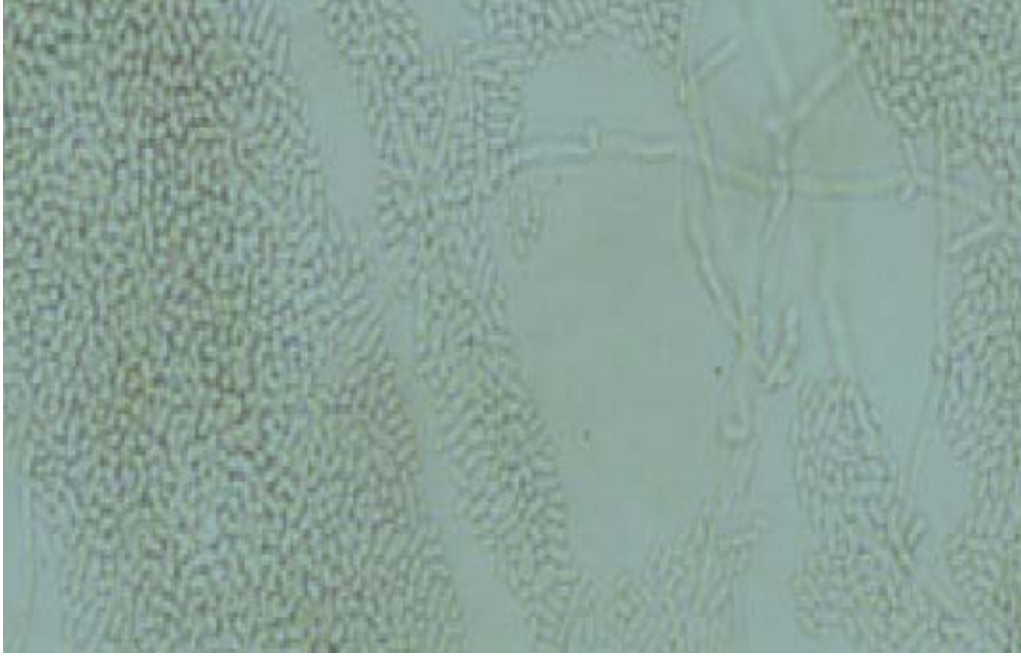


Şekil 4.2. İzole edilen *Candida* türlerinin dağılımı

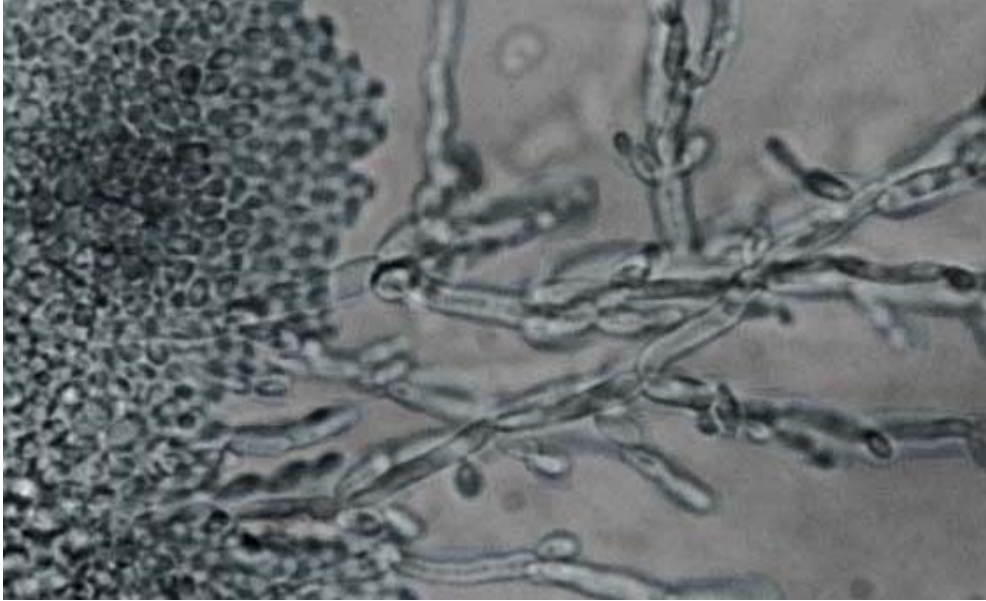
Çizelge 4.4. ve Şekil 4.2. incelendiğinde çiğ süt örneklerinde en çok *C. kefyr* % 32 izole edildiği görülmektedir. *C. kefyr*'den sonra *C. lipolytica* %30, *C. guiliermondii* %14, *C. rugosa* %11, *C. intermedia* %8, *C. lusitaniae* %5 oranında gelmektedir.



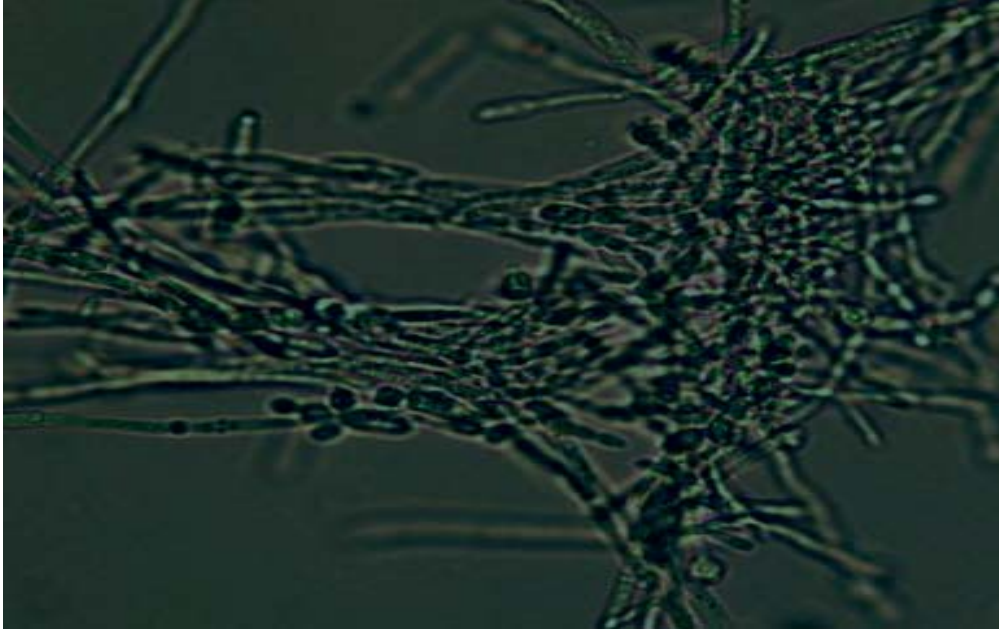
Resim.4.1. *C. guiliermondii* (suş no:11)



Resim 4.2. *C.kefir* (suş no:17)



Resim.4.3. *C.lusitaniae* (suş no:75)

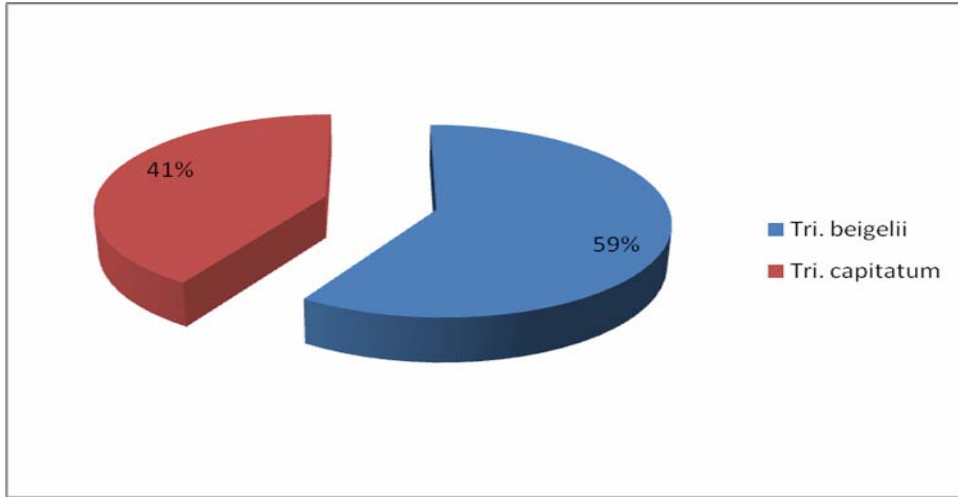


Resim 4.4. *C.lipolytica* (suş no:22)

Araştırmada izole edilen 17 Trichosporon cinslerinden 10'u(%59) *Tri. beigelii*, 7'si (%41) *Tri.capitatum* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.4.) (Şekil 4.3).

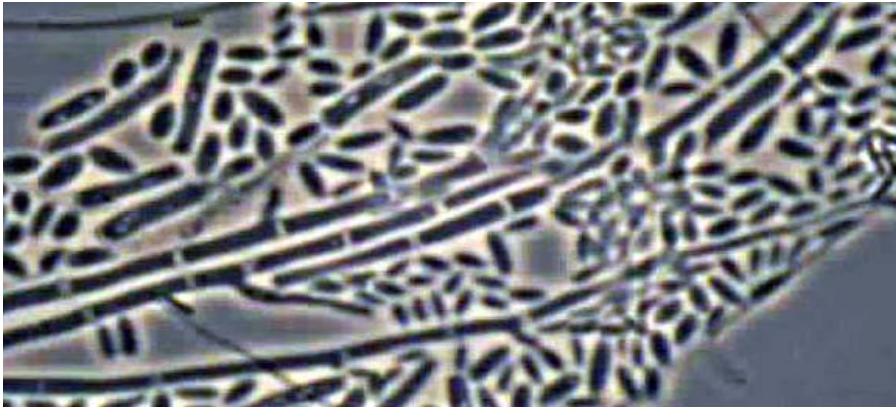
Çizelge 4.4. İzole edilen Trichosporon türlerinin dağılımı

İzole edilen Trichosporon türleri	İzolat sayısı
<i>Tri. Beigelii</i>	10
<i>Tri. capitatum</i>	7
Toplam	17



Şekil 4.3. İzole edilen Trichosporon türlerinin dağılımı

Çizelge 4.4. ve Şekil 4.3. incelendiğinde çiğ süt örneklerinde en çok %59 *Tri. beigelii* izole edildiği görülmektedir. *Tri. Beigelii*'den sonra %41 *Tri. capitatum* gelmektedir.

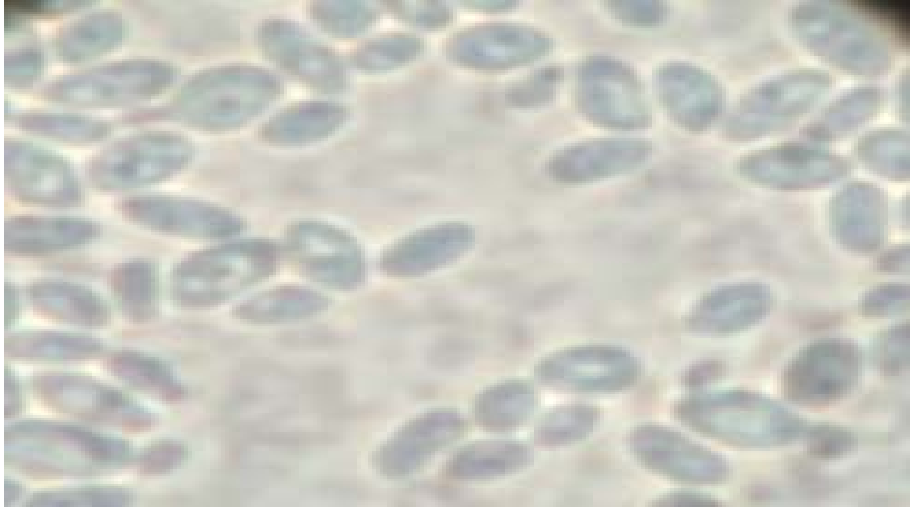


Resim 4.5. *Tri.capitatum* (suş no:38)

Araştırmada izole edilen 8 *Saccharomyces* cinslerinden 8'i (%100) de *Sac. cerevisiae* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. İzole edilen *Saccharomyces* türlerinin dağılımı

İzole edilen <i>Saccharomyces</i> türleri	İzolat sayısı
<i>S. cerevisiae</i>	8
Toplam	8

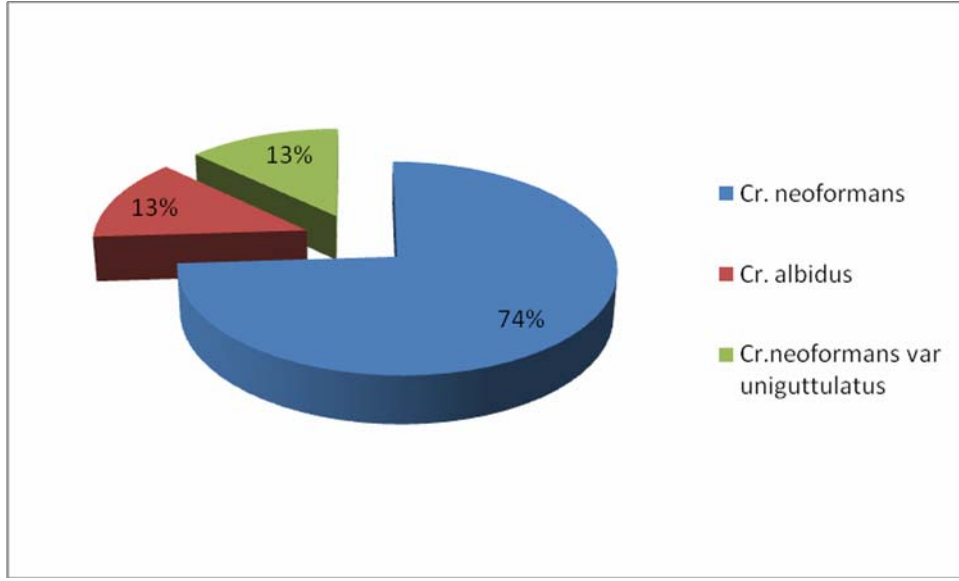


Resim 4.6. *Sac.cerevisiae* (suş no:35)

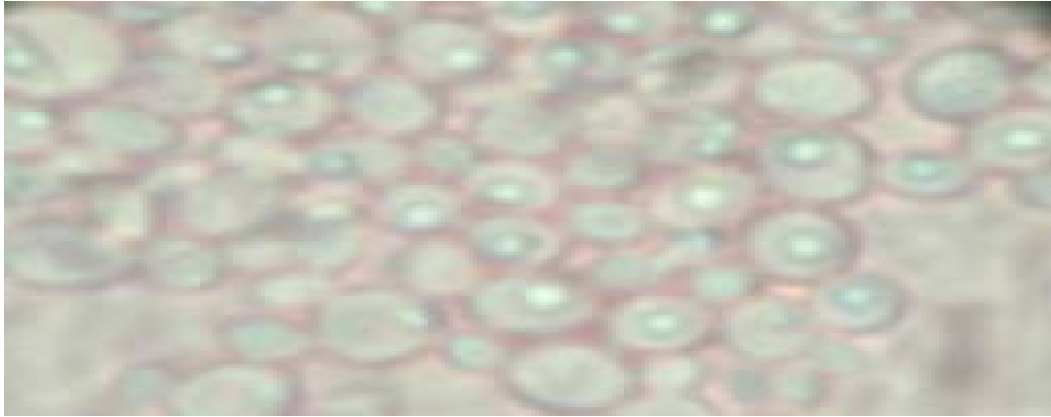
Araştırmada izole edilen 8 *Cryptococcus* cinslerinden 6'sı (%74) *Cr. neoformans*, 1'i(%13) *Cr. albidus*, 1'i(%13) de *Cr.neoformans var uniguttulatus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.6) (Şekil 4.4).

Çizelge 4.6. İzole edilen *Cryptococcus* türleri dağılımı

İzole edilen <i>Cryptococcus</i> türleri	İzolat sayısı
<i>Cr. neoformans</i>	6
<i>Cr. albidus</i>	1
<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	1
Toplam	8



Şekil 4.4. İzole edilen *Cryptococcus* türleri dağılımı

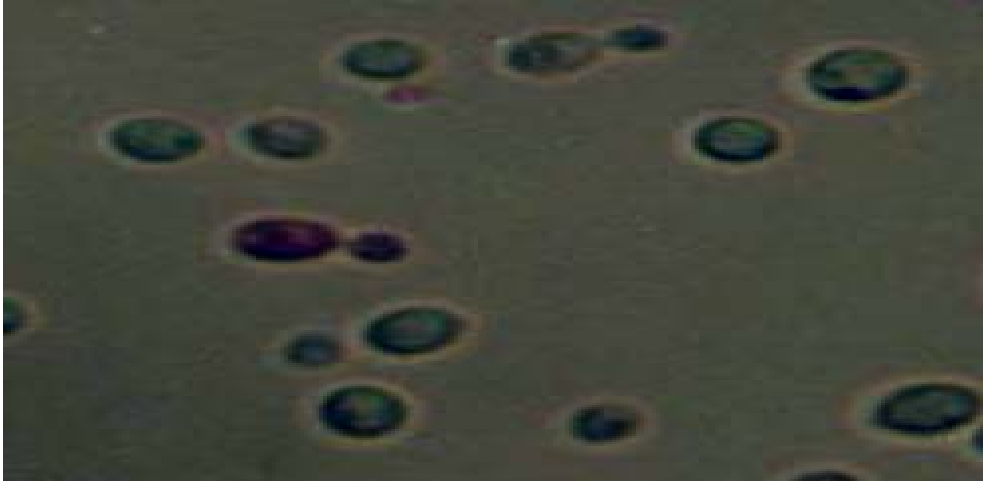


Resim 4.7. *Cr. neoformans*(suş no:33)

Araştırmada izole edilen 3 *Rhodotorula* cinslerinden 3'ü(%100) de *Rho. rubra* olarak tanımlanmıştır(Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. İzole edilen *Rhodotorula* türleri dağılımı

İzole edilen <i>Rhodotorula</i> türleri	İzolat sayısı
<i>Rho. Rubra</i>	3
Toplam	3



Resim.4.8. *Rho.rubra* (suş no:84)

Araştırmada çalışılan çiğ süt örnekleri çeşitli yörelerden süt işletmelerine gelen örneklerdir. 100 adet çiğ süt örneğinin 73'ünden maya ve maya benzeri mikroorganizma izole edilmiştir. 73 süt örneğinin toplandığı yöreler, bu yörelerden alınan örnek sayıları ve izole edilen cinsler Çizelge 4.8.' de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örneklerinin toplandıkları yerlere göre dağılımı, izole edilen cinsleri

Yöre	Cins	Örnek no	Toplam izolat sayısı
Burdur	Candida	10,11,17,20,22,42,46,50,52,57,72	11
	Trichosporon	13,14,24,27,41,48,65	7
	Cryptococcus	3,33	2
	Saccharomyces	15,28,35,68	4
	Rhodotorula	100	1
Ankara	Candida	15,25,44,53,63,76,80,83,86,87,88,99	12
	Trichosporon	18,21, 31,38,67,71,85,93	8
	Saccharomyces	26,90	2
	Cryptococcus	30	1

Çizelge 4.8. (Devam) Çeşitli işletmelerden toplanan çiğ süt örneklerinin toplandıkları yerlere göre dağılımı, izole edilen cinsleri

Yöre	Cins	Örnek no	Toplam izolat sayısı
Antalya	Candida	2,29,39,49,56,66,75	7
	Trichosporon	23	1
	Saccharomyces	47	1
Kırıkkale	Candida	32,34,40,59,64,74	6
	Trichosporon	7	1
	Cryptococcus	43	1
Kayseri	Rhodotorula	60	1
	Candida	69	1
Konya	Candida	58	1
Toplam			73

Araştırmada Ankara yöresinden 33 örnek çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Ankara yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
12	<i>Sac. cerevisia</i>
15	<i>C.kefyr</i>
18	<i>Tri.capitatum</i>
21	<i>Tri.beigelii</i>
25	<i>C.guilliermondii</i>
26	<i>Sac. Cerevisia</i>
30	<i>Cr.neoformans</i>
31	<i>Tri.beigelii</i>
38	<i>Tri.capitatum</i>
44	<i>C.rugosa</i>
53	<i>C.kefyr</i>
63	<i>C. lipolytica</i>
67	<i>Tri.beigelii</i>
71	<i>Tri.beigelii</i>

Çizelge 4.9. (Devam) Ankara yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

76	<i>C.lipolytica</i>
80	<i>C. lipolytica</i>
83	<i>C.kefyr</i>
84	<i>Rho.rubra</i>
85	<i>Tri.beigelii</i>
86	<i>C.lipolytica</i>
87	<i>C.lipolytica</i>
88	<i>C.guilliermondii</i>
90	<i>Sac.cerevisiae</i>
93	<i>Tri.capitatum</i>
99	<i>C.kefyr</i>
Toplam	25

Çizelge 4.9. incelendiğinde Ankara yöresinden çalışılan 33 örneğin 25'inden izolat elde edilmiştir. Diğer 8 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır. Araştırmada Ankara yöresinde en yaygın olarak Candida türlerine rastlanmıştır.

Araştırmada Burdur yöresinden 34 örnek çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Burdur yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
3	<i>Cr.neoformans</i>
10	<i>C.kefyr</i>
11	<i>C.kefyr</i>
13	<i>Tri.beigelii</i>
14	<i>Tri.beigelii</i>
15	<i>Sac.cerevisia</i>
17	<i>C.guilliermondii</i>
19	<i>Cr.neoformans</i>
20	<i>C.guilliermondii</i>
22	<i>C.lipolytica</i>

Çizelge 4.10. (Devam) Burdur yöresinden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
24	<i>Tri.beigelii</i>
27	<i>Tri.capitatum</i>
28	<i>Sac.cerevisia</i>
33	<i>Cr.neoformans</i>
35	<i>Sac.cerevisia</i>
41	<i>Tri.capitatum</i>
42	<i>C.lipolytica</i>
46	<i>C.lipolytica</i>
48	<i>Tri.beigelii</i>
50	<i>C.kefyr</i>
52	<i>C.kefyr</i>
57	<i>C.guilliermondii</i>
65	<i>Tri.beigelii</i>
68	<i>Sac. cerevisiae</i>
72	<i>C.lipolytica</i>
100	<i>Rho.rubra</i>
Toplam	26

Çizelge 4.10. incelendiğinde Burdur yöresinden çalışılan 34 örneğin 26'sından izolat elde edilmiştir. Diğer 8 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır. Araştırmada Burdur yöresinde en yaygın olarak *Candida* türlerine rastlanmıştır.

Araştırmada Antalya yöresinden 15 örnek çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Çizelge 4.11 verilmiştir.

Çizelge 4.11. Antalya yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
2	<i>C.kefyr</i>
8	<i>Cr. neoformans</i>
23	<i>Tri.capitatum</i>
29	<i>C.intermedia</i>
39	<i>C.rugosa</i>
47	<i>Sac.cerevisiae</i>

Çizelge 4.11. (Devam) Antalya yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

49	<i>C. lipolytica</i>
56	<i>C. lipolytica</i>
62	<i>Cr. albidus</i>
66	<i>C.kefyr</i>
75	<i>C.lusitaniae</i>
Toplam	11

Çizelge 4.11. incelendiğinde Antalya yöresinden çalışılan 15 örneğin 11'inden izolat elde edilmiştir. Diğer 4 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır. Araştırmada Antalya yöresinde en yaygın olarak *Candida* türlerine rastlanmıştır.

Araştırmada Kırıkkale yöresinden 11 örnek çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Çizelge 4.12 verilmiştir.

Çizelge 4.12. Kırıkkale yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
7	<i>Tri.capitatum</i>
40	<i>C.kefyr</i>
32	<i>C.lipolytica</i>
34	<i>C.intermedia</i>
43	<i>Cr. neoformans var uniguttulatus</i>
59	<i>C.kefyr</i>
64	<i>C.guilliermondii</i>
74	<i>C.rugosa</i>

Çizelge 4.12. incelendiğinde Kırıkkale yöresinden çalışılan 11 örneğin 8'inden izolat elde edilmiştir. Diğer 3 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır. Araştırmada Kırıkkale yöresinde en yaygın olarak *Candida* türlerine rastlanmıştır.

Araştırmada Kayseri yöresinden 4 örnek çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı çizelge 4.13 verilmiştir.

Çizelge 4.13. Kayseri yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
60	<i>R.rubra</i>
69	<i>C.intermedia</i>

Çizelge 4.13. incelendiğinde Kayseri yöresinden çalışılan 4 örneğin 2'sinden izolat elde edilmiştir. Diğer 2 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır.

Araştırmada Konya yöresinden 3 örnek çalışılmıştır. Bu örneklerden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Çizelge 4.14 verilmiştir.

Çizelge 4.14. Konya yöresinden izole edilen maya ve maya benzerleri mikroorganizmaların dağılımı

Örnek no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar
58	<i>C.kefyr</i>

Çizelge 4.14. incelendiğinde Konya yöresinden çalışılan 3 örneğin 1'inden izolat elde edilmiştir. Diğer 1 örnekte maya ve maya benzerlerine rastlanmamıştır.

4.1. Biyofilm Çalışması

Çalışmada Ankara'da çeşitli süt işletmelerine gelen 100 adet çiğ süt örneği alınarak maya ve maya benzeri mikroorganizmaların izolasyonu ve adlandırması yapılmıştır. İzole edilen *Candida*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* cinsine ait türlerde biyofilm varlığı araştırılmıştır. Mikroorganizmalarda biyofilm varlığı kristal viyole yöntemi ile çalışılmıştır.

4.1.1. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan çalışma

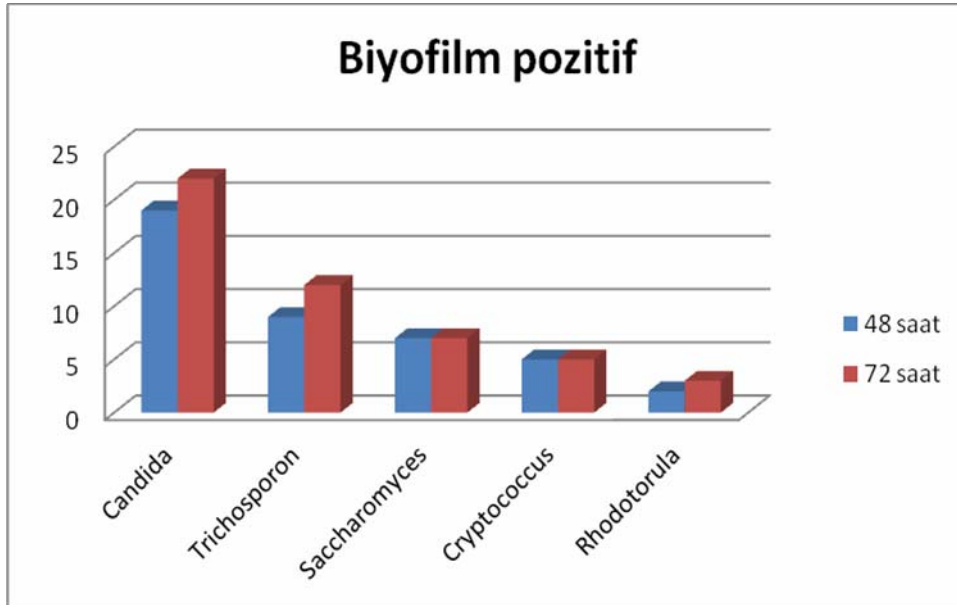
Araştırmamızda biyofilm varlığı Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 48. ve 72. Saatler sonunda 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında

okutularak değerlendirilmiştir. Maya ve maya benzeri mikroorganizmalar 48 ve 72 saat sonunda daha kuvvetli üredikleri için biyofilm çalışması da 48 ve 72 saatler sonunda değerlendirmeye alınmıştır. 37 Candida, 17 Trichosporon, 8 Saccharomyces, 8 Cryptococcus, 3 Rhodotorula izolatında kristal viyole yöntemi ile 48 ve 72 saat sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında 48 ve 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar

İZOLAT	BİYOFİLM			
	POZİTİF (48 saat)	NEGATİF (48 saat)	POZİTİF (72 saat)	NEGATİF (72 saat)
Candida	19	18	22	15
Trichosporon	9	8	12	5
Saccharomyces	7	1	7	1
Cryptococcus	5	3	5	3
Rhodotorula	2	1	3	0
Toplam	42	31	49	24

Çizelge 4.15’e göre araştırmada Candida cinsinin 48 saat sonraki değerlendirmesinde 19 biyofilm pozitif olarak bulunurken, 72 saat sonraki değerlendirmesinde 22 biyofilm pozitif bulunmuştur. Trichosporon cinsinin 48 saat değerlendirmesinde 9 biyofilm pozitif, 72 saat değerlendirmesinde 12 biyofilm pozitif tespit edilmiştir. Saccharomyces cinsinin 48 saat değerlendirmesinde 7(%) biyofilm pozitif, 72 saat değerlendirmesinde 7 biyofilm pozitif tespit edilmiştir. Cryptococcus cinsinin 48 saat değerlendirmesinde 5 biyofilm pozitif, 72 saat değerlendirmesinde 5 biyofilm pozitif tespit edilmiştir. Rhodotorula cinsinin 48 saat değerlendirmesinde 2 biyofilm pozitif, 72 saat değerlendirmesinde 3 biyofilm pozitif tespit edilmiştir(Şekil 4.5).Sonuçlara göre maya ve maya benzerlerinde 72 saatsonunda biyofilm varlığında artış olmuştur.



Şekil 4.5. İzole edilen cinslerin 48 ve 72 saate göre biyofilm varlığı

48 saatlik ve 72 saatlik değerlendirme sonuçları

İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 48 saat sonunda, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerine göre dağılımı Çizelge 4.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerindeki biyofilm varlığının kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 48 saat sonunda, 490 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması sonucu elde edilen değerler

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikrrorganizmalar	Spektrofotometre’de elde edilen ortalama değerler	
		490nm	540nm
2	<i>C.kefyr</i>	0,117	0,127
3	<i>Cr. neoformans</i>	0,140	0,128
7	<i>Tri.capitatum</i>	0,116	0,120
8	<i>Cr.neoformans</i>	0,110	0,105

Çizelge 4.16 (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerindeki biyofilm varlığının kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 48 saat sonunda, 490 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması sonucu elde edilen değerler

10	<i>C.kefyr</i>	0,082	0,094
11	<i>C.kefyr</i>	0,075	0,081
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,092	0,090
13	<i>Tri.beigelii</i>	0,093	0,127
14	<i>Tri.beigelii</i>	0,122	0,096
15	<i>C.kefyr</i>	0,086	0,091
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,123	0,133
17	<i>C.guilliermondii</i>	0,088	0,093
18	<i>Tri.capitatum</i>	0,101	0,138
19	<i>Cr.neoformans</i>	0,150	0,111
20	<i>Cr.neoformans</i>	0,086	0,092
21	<i>Tri.beigelii</i>	0,076	0,088
22	<i>C.lipolytica</i>	0,072	0,090
23	<i>Tri.capitatum</i>	0,103	0,111
24	<i>Tri.beigelii</i>	0,083	0,089
25	<i>C.guilliermondii</i>	0,154	0,122
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,122	0,101
27	<i>Tri.capitatum</i>	0,093	0,104
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,093	0,102
29	<i>C.intermedia</i>	0,094	0,116
30	<i>Cr.neoformans</i>	0,156	0,152
31	<i>Tri.beigelii</i>	0,078	0,083
32	<i>C.lipolytica</i>	0,067	0,072
33	<i>Cr.neoformans</i>	0,143	0,124
34	<i>C.intermedia</i>	0,136	0,116
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,085	0,093
38	<i>Tri.capitatum</i>	0,105	0,126
39	<i>C.rugosa</i>	0,092	0,094
40	<i>C.kefyr</i>	0,085	0,081
41	<i>Tri.capitatum</i>	0,089	0,094
42	<i>C.lipolytica</i>	0,074	0,072
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	0,080	0,086
44	<i>C.rugosa</i>	0,122	0,128
46	<i>C.lipolytica</i>	0,134	0,141
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,103	0,096
48	<i>Tri.beigelii</i>	0,125	0,110
49	<i>C.lipolytica</i>	0,072	0,081
50	<i>C.kefyr</i>	0,095	0,116
52	<i>C.kefyr</i>	0,152	0,164
53	<i>C.kefyr</i>	0,124	0,116

Çizelge 4.16 (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerindeki biyofilm varlığının kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 48 saat sonunda, 490 nm. dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması sonucu elde edilen değerler

56	<i>C.lipolytica</i>	0,097	0,110
57	<i>C.guilliermondii</i>	0,126	0,112
58	<i>C.kefyr</i>	0,072	0,094
59	<i>C.kefyr</i>	0,115	0,112
60	<i>Rho.rubra</i>	0,073	0,068
62	<i>Cr.albidus</i>	0,171	0,162
63	<i>C. lipolytica</i>	0,130	0,124
64	<i>C.guilliermondii</i>	0,117	0,113
65	<i>Tri.beigelii</i>	0,075	0,085
66	<i>C.kefyr</i>	0,065	0,070
67	<i>Tri.beigelii</i>	0,082	0,090
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,087	0,088
69	<i>C.intermedia</i>	0,079	0,092
71	<i>Tri.beigelii</i>	0,074	0,064
72	<i>C.lipolytica</i>	0,071	0,089
73	<i>C.rugosa</i>	0,052	0,061
74	<i>C.rugosa</i>	0,062	0,068
75	<i>C.lusitaniae</i>	0,086	0,089
76	<i>C.lipolytica</i>	0,132	0,139
80	<i>C.lipolytica</i>	0,115	0,126
83	<i>C.kefyr</i>	0,080	0,093
84	<i>Rho.rubra</i>	0,141	0,159
85	<i>Tri.beigelii</i>	0,082	0,076
86	<i>C.lipolytica</i>	0,116	0,098
87	<i>C.lipolytica</i>	0,101	0,099
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,100	0,121
93	<i>Tri.capitatum</i>	0,126	0,131
99	<i>C.kefyr</i>	0,167	0,171
100	<i>Rho.rubra</i>	0,223	0,310
	Eşik değeri(cut off)	0,091	0,095

Çizelge 4.16’da, spektrofotometrik okuma değerleri hem 490 nm dalga boyunda hemde 540 nm dalga boyunda 48 saat sonunda elde edilen spektrofotometrik okuma değerleri görülmektedir. 490 nm dalga boyunda yapılan çalışma sırasında, kontrol amaçlı kullanılan kuyucukların, spektrofotometre ile elde edilen sonuçlarının ortalaması olan eşik değeri(cut off) 0,091 olarak belirlenmiştir. Bu değere göre, yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar “pozitif” (++), “ zayıf pozitif” (+) ve “negatif” (-) olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma için 0,091 eşik değerinden

düşük elde edilen değerler (-), 0,091 – 0,182 aralığında elde edilen değerler (+), 0,182-0,364 aralığında elde edilen değerler(++) olarak kabul edilmiştir.

540 nm dalga boyunda yapılan çalışma sırasında, kontrol amaçlı kullanılan kuyucukların, spektrofotometre ile elde edilen sonuçlarının ortalaması olan eşik değer(cut off) 0,095 olarak belirlenmiştir. Bu değere göre, yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar “pozitif” (++), “ zayıf pozitif” (+) ve “negatif” (-) olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma için 0,095 eşik değerinden düşük elde edilen değerler (-), 0,095 – 0,190 aralığında elde edilen değerler (+),0,190-0,380 aralığında elde edilen değerler(++) olarak kabul edilmiştir.

490 nm ve 540 nm dalga boyunda elde edilen verilerin “pozitif”, “ zayıf pozitif” ve “negatif” olarak sınıflandırılmasıyla ortaya çıkan biyofilm değerlendirmesi sonuçları Çizelge 4.17’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Biyofilm varlığı	
		490nm	540nm
2	<i>C.kefyr</i>	+	+
3	<i>Cr. neoformans</i>	+	+
7	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
8	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
10	<i>C.kefyr</i>	-	-
11	<i>C.kefyr</i>	-	-
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
14	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
15	<i>C.kefyr</i>	-	-
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
17	<i>C.guilihermondii</i>	-	-
18	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
19	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
20	<i>Cr.neoformans</i>	-	-

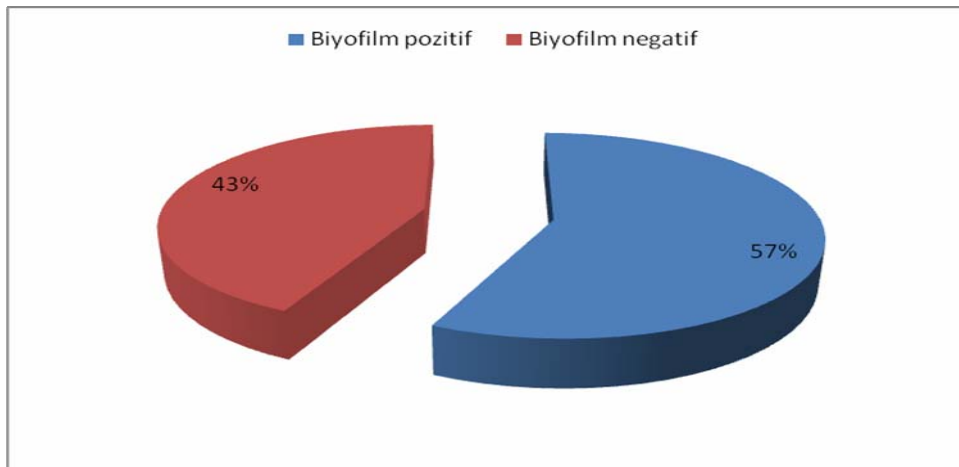
Çizelge 4.17. (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

21	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
22	<i>C.lipolytica</i>	-	-
23	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
24	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
25	<i>C.guilliermondii</i>	+	+
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
27	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
29	<i>C.intermedia</i>	+	+
30	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
31	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
32	<i>C.lipolytica</i>	-	-
33	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
34	<i>C.intermedia</i>	+	+
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	-	-
38	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
39	<i>C.rugosa</i>	+	+
40	<i>C.kefyr</i>	-	-
41	<i>Tri.capitatum</i>	-	-
42	<i>C.lipolytica</i>	-	-
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	-	-
44	<i>C.rugosa</i>	+	+
46	<i>C.lipolytica</i>	+	+
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
48	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
49	<i>C.lipolytica</i>	-	-
50	<i>C.kefyr</i>	+	+
52	<i>C.kefyr</i>	+	+
53	<i>C.kefyr</i>	+	+
56	<i>C.lipolytica</i>	+	+
57	<i>C.guilliermondii</i>	+	+
58	<i>C.kefyr</i>	-	-
59	<i>C.kefyr</i>	-	-
60	<i>Rho.rubra</i>	+	+
62	<i>Cr.albidus</i>	-	-
63	<i>C. lipolytica</i>	+	+
64	<i>C.guilliermondii</i>	+	+
65	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
66	<i>C.kefyr</i>	-	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	-	-

Çizelge 4.17. (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

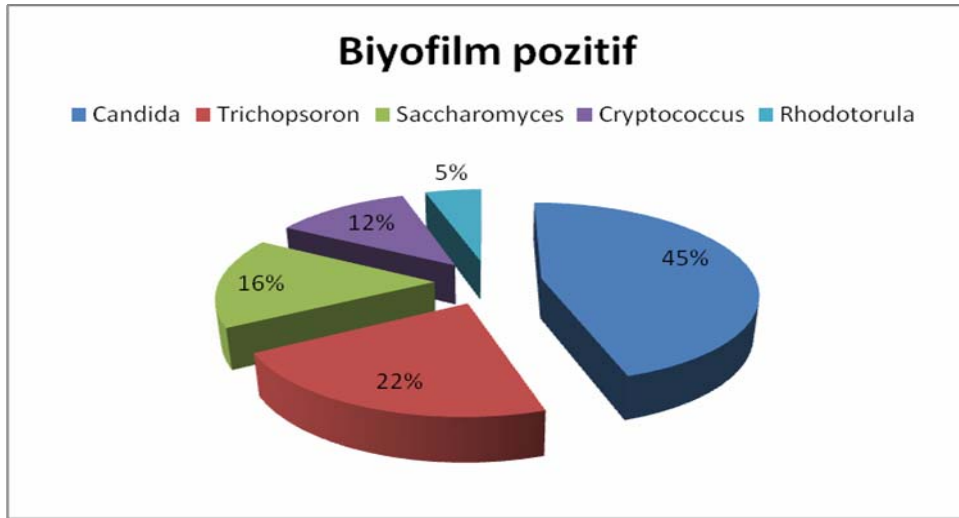
69	<i>C.intermedia</i>	-	-
71	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
72	<i>C.lipolytica</i>	-	-
73	<i>C.rugosa</i>	-	-
74	<i>C.rugosa</i>	-	-
75	<i>C.lusitaniae</i>	-	-
76	<i>C.lipolytica</i>	+	+
80	<i>C.lipolytica</i>	+	+
83	<i>C.kefyr</i>	-	-
84	<i>Rho.rubra</i>	+	+
85	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
86	<i>C.lipolytica</i>	+	+
87	<i>C.lipolytica</i>	+	+
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
93	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
99	<i>C.kefyr</i>	+	+
100	<i>Rho.rubra</i>	++	++
Toplam	71		

Bu değerlendirmeye göre 490 nm ve 540 nm dalga boyunda biyofilm pozitif olarak tespit edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların 42'si (%57) pozitif (+) ve 31'si (43%) negatif (-) olarak tespit edilmiştir. Pozitif (+) ve negatif (-) tespit edilen maya ve maya benzerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Maya ve maya benzerlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. ve 540 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı % oranı

Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında, 48 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik değerlendirmede toplam 73 izolatın 42'sinde (%57) biyofilm varlığı tespit edilmiştir. Biyofilm varlığı tespit edilen bu 42 izolatın 19'u (%45) Candida, 9'u (%22) Trichosporon, 7'si (%16) Saccharomyces, 5'i (%12) Cryptococcus ve 2'si (%5) Rhodotorula izolatıdır (Şekil4.7).



Şekil 4.7. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında 48 saatlik süre sonunda spektrofotometrik değerlendirme ile elde edilen sonuçların, cinslere göre dağılımı

İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 72 saat sonunda, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerine göre dağılımı Çizelge 4.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmalar	Spektrofotometre’de elde edilen ortalama değerler	
		490nm	540nm
2	<i>C.kefyr</i>	0,242	0,256
3	<i>Cr. neoformans</i>	0,288	0,291
7	<i>Tri.capitatum</i>	0,145	0,134
8	<i>Cr.neoformans</i>	0,112	0,134
10	<i>C.kefyr</i>	0,065	0,076
11	<i>C.kefyr</i>	0,072	0,086
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,123	0,121
13	<i>Tri.beigelii</i>	0,098	0,087
14	<i>Tri.beigelii</i>	0,111	0,139
15	<i>C.kefyr</i>	0,064	0,075
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,108	0,124
17	<i>C.guilliermondii</i>	0,072	0,055
18	<i>Tri.capitatum</i>	0,112	0,114
19	<i>Cr.neoformans</i>	0,158	0,169
20	<i>Cr.neoformans</i>	0,070	0,080
21	<i>Tri.beigelii</i>	0,062	0,052
22	<i>C.lipolytica</i>	0,081	0,086
23	<i>Tri.capitatum</i>	0,186	0,201
24	<i>Tri.beigelii</i>	0,071	0,061
25	<i>C.guilliermondii</i>	0,139	0,148
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,117	0,129
27	<i>Tri.capitatum</i>	0,104	0,093
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,110	0,123
29	<i>C.intermedia</i>	0,129	0,142
30	<i>Cr.neoformans</i>	0,172	0,187
31	<i>Tri.beigelii</i>	0,078	0,083
32	<i>C.lipolytica</i>	0,069	0,081
33	<i>Cr.neoformans</i>	0,154	0,144
34	<i>C.intermedia</i>	0,162	0,148
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,087	0,089
38	<i>Tri.capitatum</i>	0,154	0,165
39	<i>C.rugosa</i>	0,092	0,094
40	<i>C.kefyr</i>	0,071	0,088
41	<i>Tri.capitatum</i>	0,101	0,123
42	<i>C.lipolytica</i>	0,078	0,076
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	0,055	0,067

Çizelge 4.18. (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

44	<i>C.rugosa</i>	0,127	0,135
46	<i>C.lipolytica</i>	0,137	0,134
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,105	0,119
48	<i>Tri.beigelii</i>	0,134	0,132
49	<i>C.lipolytica</i>	0,065	0,067
50	<i>C.kefyr</i>	0,098	0,117
52	<i>C.kefyr</i>	0,166	0,179
53	<i>C.kefyr</i>	0,096	0,101
56	<i>C.lipolytica</i>	0,116	0,102
57	<i>C.guilliermondii</i>	0,119	0,126
58	<i>C.kefyr</i>	0,071	0,080
59	<i>C.kefyr</i>	0,129	0,139
60	<i>Rho.rubra</i>	0,086	0,092
62	<i>Cr.albidus</i>	0,077	0,082
63	<i>C. lipolytica</i>	0,155	0,177
64	<i>C.guilliermondii</i>	0,131	0,127
65	<i>Tri.beigelii</i>	0,071	0,062
66	<i>C.kefyr</i>	0,061	0,067
67	<i>Tri.beigelii</i>	0,126	0,128
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,071	0,080
69	<i>C.intermedia</i>	0,079	0,081
71	<i>Tri.beigelii</i>	0,058	0,076
72	<i>C.lipolytica</i>	0,122	0,116
73	<i>C.rugosa</i>	0,076	0,079
74	<i>C.rugosa</i>	0,055	0,071
75	<i>C.lusitaniae</i>	0,077	0,081
76	<i>C.lipolytica</i>	0,210	0,254
80	<i>C.lipolytica</i>	0,144	0,136
83	<i>C.kefyr</i>	0,074	0,087
84	<i>Rho.rubra</i>	0,134	0,142
85	<i>Tri.beigelii</i>	0,078	0,082
86	<i>C.lipolytica</i>	0,086	0,091
87	<i>C.lipolytica</i>	0,314	0,437
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,159	0,177
93	<i>Tri.capitatum</i>	0,123	0,111
99	<i>C.kefyr</i>	0,198	0,183
100	<i>Rho.rubra</i>	0,312	0,325
	<i>Eşik değeri(cut off)</i>	0,079	0,084

Çizelge 4.18’de, spektrofotometrik okuma değerleri hem 490 nm dalga boyunda hemde 540 nm dalga boyunda 72 saat sonunda elde edilen spektrofotometrik okuma değerleri görülmektedir. 490 nm dalga boyunda yapılan çalışma sırasında, kontrol amaçlı kullanılan kuyucukların, spektrofotometre ile elde edilen sonuçlarının ortalaması olan eşik değer (cut off) 0,079 olarak belirlenmiştir. Bu değere göre, yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar “pozitif” (++), “ zayıf pozitif” (+) ve “negatif” (-) olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma için 0,079 eşik değerinden düşük elde edilen değerler (-), 0,079 – 0,158 aralığında elde edilen değerler (+), 0,158-0,316 aralığında elde edilen değerler(++) olarak kabul edilmiştir.

540 nm dalga boyunda yapılan çalışma sırasında, kontrol amaçlı kullanılan kuyucukların, spektrofotometre ile elde edilen sonuçlarının ortalaması olan eşik değer(cut off) 0,095 olarak belirlenmiştir. Bu değere göre, yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar “pozitif” (++), “ zayıf pozitif” (+) ve “negatif” (-) olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma için 0,084 eşik değerinden düşük elde edilen değerler (-), 0,084 – 0,168 aralığında elde edilen değerler (+),0,168-0,336 aralığında elde edilen değerler(++) olarak kabul edilmiştir.

490 nm ve 540 nm dalga boyunda elde edilen verilerin “pozitif”, “ zayıf pozitif” ve “negatif” olarak sınıflandırılmasıyla ortaya çıkan biyofilm değerlendirmesi sonuçları Çizelge 4.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikrrorganizmalar	Biyofilm varlığı	
		490nm	540nm
2	<i>C.kefyr</i>	++	++
3	<i>Cr. neoformans</i>	++	++
7	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
8	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
10	<i>C.kefyr</i>	-	-

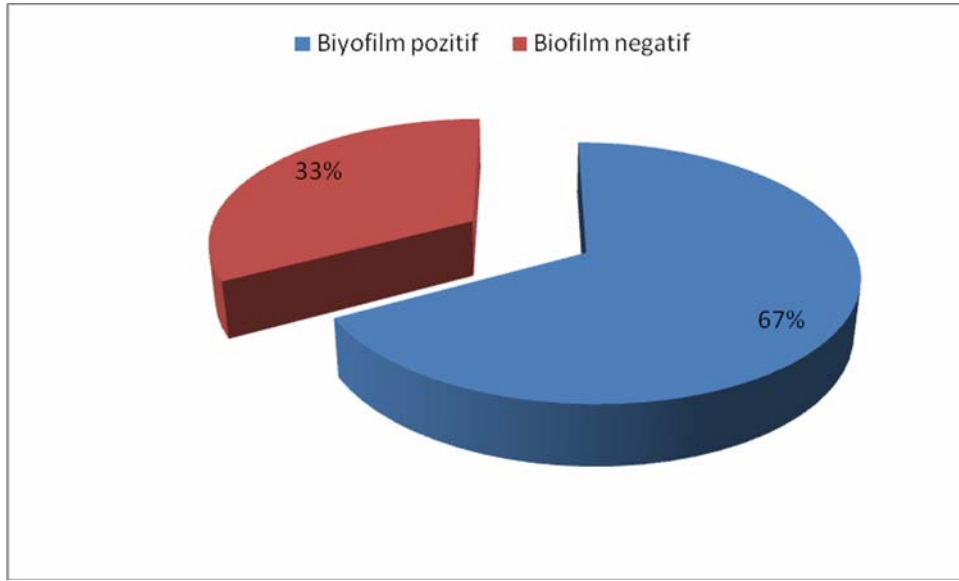
Çizelge 4.19. (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

11	<i>C.kefyr</i>	-	-
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
14	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
15	<i>C.kefyr</i>	-	-
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
17	<i>C.guiliermondii</i>	-	-
18	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
19	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
20	<i>Cr.neoformans</i>	-	-
21	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
22	<i>C.lipolytica</i>	+	+
23	<i>Tri.capitatum</i>	++	++
24	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
25	<i>C.guiliermondii</i>	+	+
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
27	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
29	<i>C.intermedia</i>	+	+
30	<i>Cr.neoformans</i>	++	++
31	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
32	<i>C.lipolytica</i>	-	-
33	<i>Cr.neoformans</i>	+	+
34	<i>C.intermedia</i>	+	+
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
38	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
39	<i>C.rugosa</i>	+	+
40	<i>C.kefyr</i>	-	-
41	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
42	<i>C.lipolytica</i>	-	-
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	-	-
44	<i>C.rugosa</i>	+	+
46	<i>C.lipolytica</i>	+	+
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
48	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
49	<i>C.lipolytica</i>	-	-
50	<i>C.kefyr</i>	+	+
52	<i>C.kefyr</i>	+	+
53	<i>C.kefyr</i>	+	+
56	<i>C.lipolytica</i>	+	+
57	<i>C.guiliermondii</i>	+	+
58	<i>C.kefyr</i>	-	-

Çizelge 4.19. (Devam) İzole edilen maya ve maya benzeri türlerde, kristal viyole kullanılarak, 490 nm. ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçları

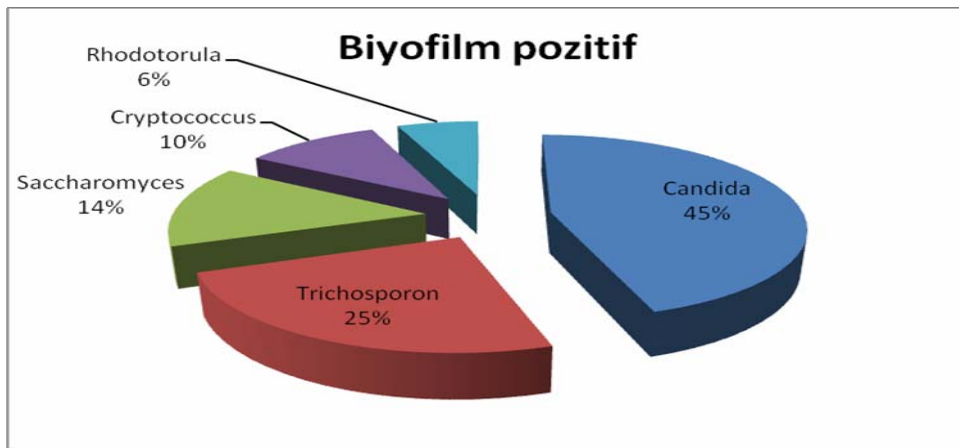
59	<i>C.kefyr</i>	+	+
60	<i>Rho.rubra</i>	+	+
62	<i>Cr.albidus</i>	-	-
63	<i>C. lipolytica</i>	+	+
64	<i>C.guiliermondii</i>	+	+
65	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
66	<i>C.kefyr</i>	-	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	+	+
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	-	-
69	<i>C.intermedia</i>	+	+
71	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
72	<i>C.lipolytica</i>	-	-
73	<i>C.rugosa</i>	-	-
74	<i>C.rugosa</i>	-	-
75	<i>C.lusitaniae</i>	-	-
76	<i>C.lipolytica</i>	++	++
80	<i>C.lipolytica</i>	+	+
83	<i>C.kefyr</i>	-	-
84	<i>Rho.rubra</i>	+	+
85	<i>Tri.beigelii</i>	-	-
86	<i>C.lipolytica</i>	+	+
87	<i>C.lipolytica</i>	++	++
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	+	+
93	<i>Tri.capitatum</i>	+	+
99	<i>C.kefyr</i>	++	++
100	<i>Rho.rubra</i>	++	++
Toplam	71		

Bu değerlendirmeye göre 490 nm ve 540 nm dalga boyunda biyofilm pozitif olarak tespit edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların 49'u (%67) pozitif (+) ve 24'ü (33%) negatif (-) olarak tespit edilmiştir. Pozitif (+) ve negatif (-) tespit edilen maya ve maya benzerleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Maya ve maya benzerlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. ve 540 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı % oranı

Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında, 72 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik değerlendirmede toplam 73 izolatın 49'unda (%67) biyofilm varlığı tespit edilmiştir. Biyofilm varlığı tespit edilen bu 49 izolatın 22'si (%45) Candida, 12'si (%22) Trichosporon, 7'si (%16) Saccharomyces, 5'i (%12) Cryptococcus ve 3'ü (%5) Rhodotorula izolatıdır(Şekil4.9).



Şekil 4.9. Kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm çalışmasında 48 saatlik süre sonunda spektrofotometrik değerlendirme ile elde edilen sonuçların, cinslere göre dağılımı

İzole edilen *Candida* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 48 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.20' de gösterilmiştir.

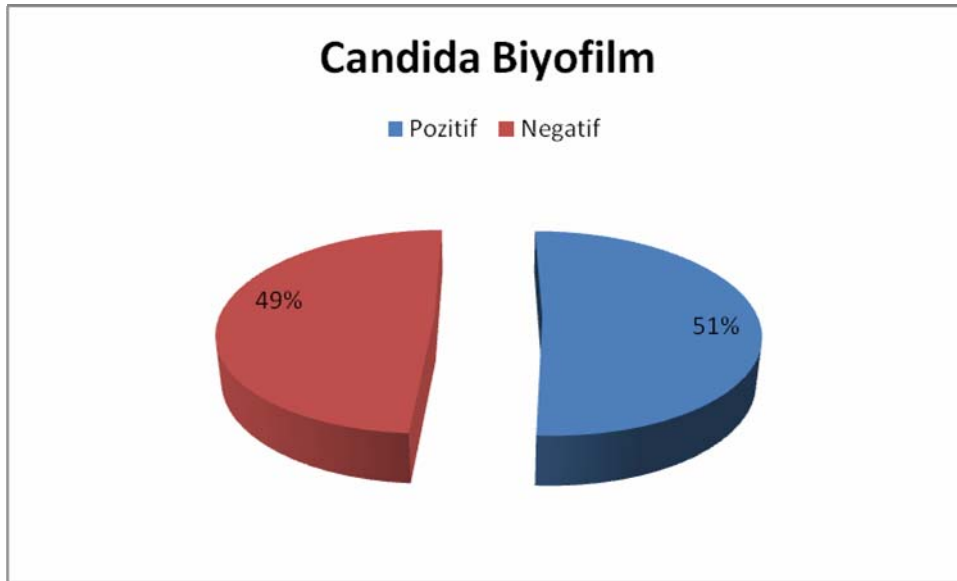
Çizelge 4.20. İzole edilen *Candida* türlerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490nm	540nm	
2	<i>C.kefyr</i>	0,117	0,127	+
10	<i>C.kefyr</i>	0,082	0,094	-
11	<i>C.kefyr</i>	0,075	0,081	-
15	<i>C.kefyr</i>	0,086	0,091	-
17	<i>C.guiliermondii</i>	0,088	0,093	-
22	<i>C.lipolytica</i>	0,072	0,090	-
25	<i>C.guiliermondii</i>	0,154	0,122	+
29	<i>C.intermedia</i>	0,094	0,116	+
32	<i>C.lipolytica</i>	0,067	0,072	-
34	<i>C.intermedia</i>	0,136	0,116	+
39	<i>C.rugosa</i>	0,092	0,094	-
40	<i>C.kefyr</i>	0,085	0,081	-
42	<i>C.lipolytica</i>	0,074	0,072	-
44	<i>C.rugosa</i>	0,122	0,128	+
46	<i>C.lipolytica</i>	0,134	0,141	+
49	<i>C.lipolytica</i>	0,072	0,081	-
50	<i>C.kefyr</i>	0,095	0,116	+
52	<i>C.kefyr</i>	0,152	0,164	+
53	<i>C.kefyr</i>	0,124	0,116	+
56	<i>C.lipolytica</i>	0,097	0,110	+
57	<i>C.guiliermondii</i>	0,126	0,112	+
58	<i>C.kefyr</i>	0,072	0,094	-
59	<i>C.kefyr</i>	0,115	0,112	+
63	<i>C.lipolytica</i>	0,130	0,124	+
64	<i>C.guiliermondii</i>	0,117	0,113	+
66	<i>C.kefyr</i>	0,065	0,070	-
69	<i>C.intermedia</i>	0,079	0,092	-
72	<i>C.lipolytica</i>	0,071	0,089	-
73	<i>C.rugosa</i>	0,052	0,061	-
74	<i>C.rugosa</i>	0,062	0,068	-
75	<i>C.lusitaniae</i>	0,086	0,089	-

Çizelge 4.20. (Devam) İzole edilen *Candida* türlerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

76	<i>C.lipolytica</i>	0,132	0,139	+
80	<i>C.lipolytica</i>	0,115	0,126	+
83	<i>C.kefyr</i>	0,080	0,093	-
86	<i>C.lipolytica</i>	0,116	0,098	+
87	<i>C.lipolytica</i>	0,101	0,099	+
99	<i>C.kefyr</i>	0,167	0,171	+
	Eşik değer	0,091	0,095	

Biyofilm varlığı araştırmasında, kristal viyole kullanılarak, 48 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik okumada izole edilen toplam 37 *Candida* cinsi mayanın 19'u (%51) Biyofilm pozitif, 18'i (%49) biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.10.).



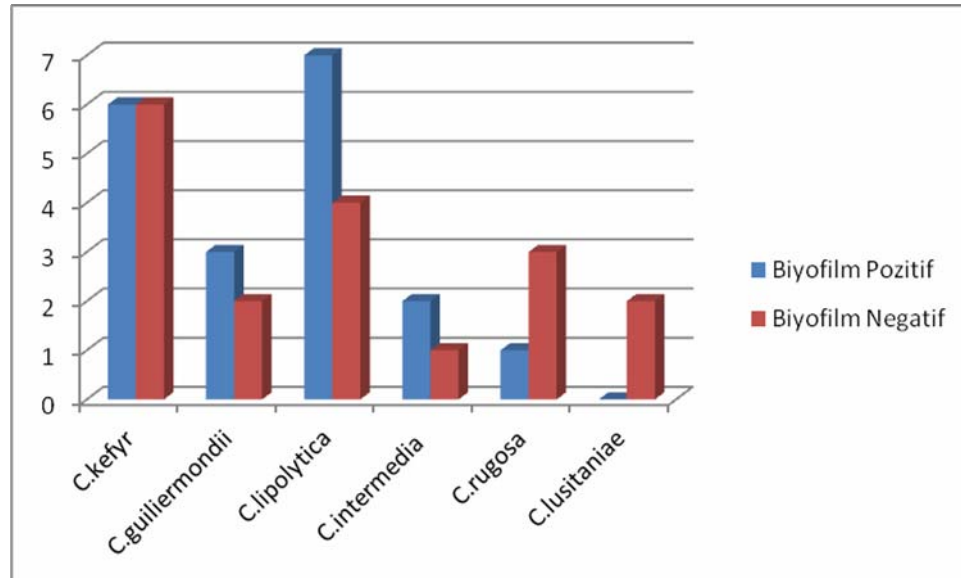
Şekil 4.10. *Candida* cinsi mayaların biyofilm varlığının % oranı

Biyofilm varlığının çalışıldığı toplam 37 *Candida* izolatının 12'sini oluşturan *C.kefyr* türünün 6'sı biyofilm pozitif, 6'sı biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 11 *C.lipolytica* türünün ise 7'si biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 4'ü biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 5 *C.guilliermondii* türünün ise 3'ü biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 2'si biyofilm negatif olarak tespit

edilmiştir. İzole edilen 4 *C.rugosa* türünün ise 1'i biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 3'ü biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 3 *C.intermedia* türünün ise 2'si biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 1'i biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 2 *C.lusitaniae* türünün ise 2'si de biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.11.).Çizelge 4.21.

Çizelge 4.21. *Candida* türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>C.kefyr</i>	6	6
<i>C.lipolytica</i>	7	4
<i>C.guilliermondii</i>	3	2
<i>C.rugosa</i>	1	3
<i>C.intermedia</i>	2	1
<i>C.lusitaniae</i>	0	2



Şekil 4.11. *Candida* türlerinde biyofilm dağılımı

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 12 *C.kefyr* türünün 6'sında (%50) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 6'sında (%50) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.12).

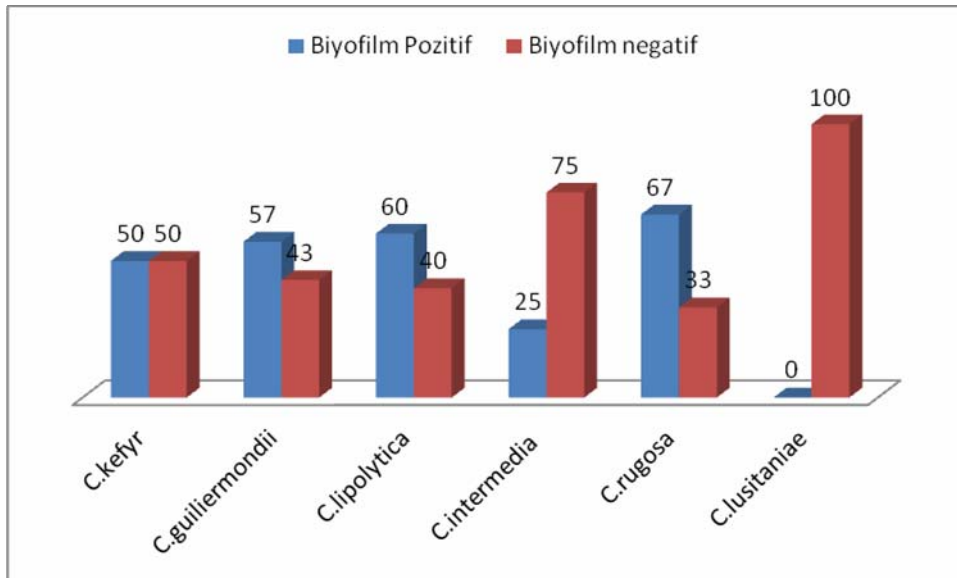
Çiğ süt örneklerinden izole edilen 11 *C.lipolytica* türünün 7'sinde (%57) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 5'inde (%43) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.12)

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 5 *C.guilliermondii* türünün 3'ünde (%60) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 2'sinde (%40) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.12).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 4 *C.rugosa* türünün 1'inde (%25) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 3'ünde (%75) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.12).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 3 *C.intermedia* türünün 2'sinde (%67) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 1'inde (%33) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.12).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 2 *C.lusitaniae* türünün 2'sinde de (%100) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Candida* türlerinde biyofilm varlığının % dağılımı

İzole edilen *Candida* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 72 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.22’ de gösterilmiştir.

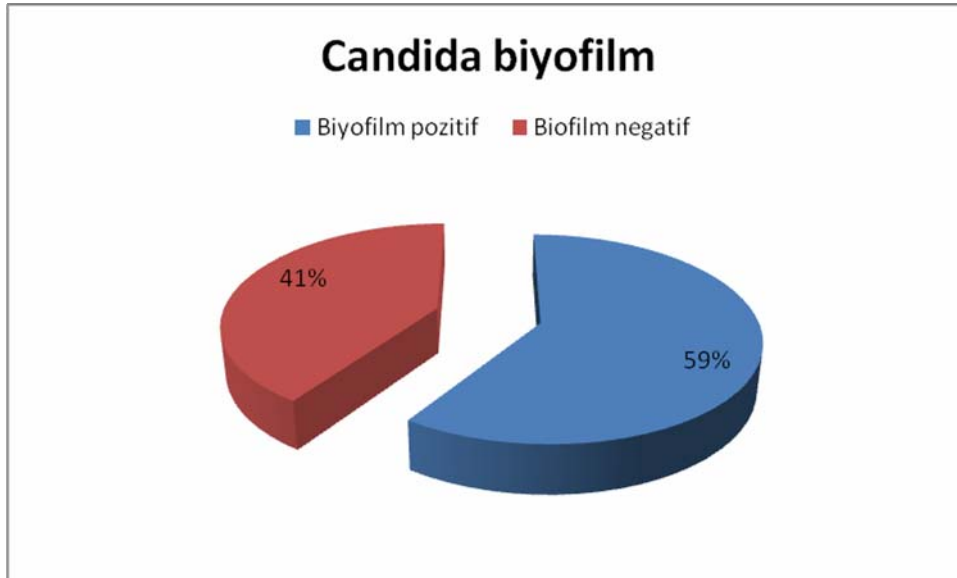
Çizelge 4.22. İzole edilen *Candida* türlerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490nm	540 nm	
2	<i>C.kefyr</i>	0,242	0,256	++
10	<i>C.kefyr</i>	0,098	0,100	-
11	<i>C.kefyr</i>	0,072	0,086	-
15	<i>C.kefyr</i>	0,064	0,075	-
17	<i>C.guiliermondii</i>	0,072	0,055	-
22	<i>C.lipolytica</i>	0,081	0,086	+
25	<i>C.guiliermondii</i>	0,139	0,148	+
29	<i>C.intermedia</i>	0,129	0,142	+
32	<i>C.lipolytica</i>	0,069	0,081	-
34	<i>C.intermedia</i>	0,162	0,148	+
39	<i>C.rugosa</i>	0,070	0,069	+
40	<i>C.kefyr</i>	0,071	0,088	-
42	<i>C.lipolytica</i>	0,078	0,076	-
44	<i>C.rugosa</i>	0,127	0,135	+
46	<i>C.lipolytica</i>	0,137	0,134	+
49	<i>C.lipolytica</i>	0,065	0,067	+
50	<i>C.kefyr</i>	0,098	0,117	+
52	<i>C.kefyr</i>	0,166	0,179	+
53	<i>C.kefyr</i>	0,096	0,101	+
56	<i>C.lipolytica</i>	0,116	0,102	+
57	<i>C.guiliermondii</i>	0,119	0,126	+
58	<i>C.kefyr</i>	0,098	0,116	-
59	<i>C.kefyr</i>	0,129	0,139	+
63	<i>C. lipolytica</i>	0,155	0,177	+
64	<i>C.guiliermondii</i>	0,131	0,127	+
66	<i>C.kefyr</i>	0,061	0,067	-
69	<i>C.intermedia</i>	0,079	0,081	+
72	<i>C.lipolytica</i>	0,122	0,116	-
73	<i>C.rugosa</i>	0,076	0,079	-
74	<i>C.rugosa</i>	0,055	0,071	-

Çizelge 4.22. (Devam) İzole edilen *Candida* türlerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

75	<i>C.lusitaniae</i>	0,077	0,081	-
76	<i>C.lipolytica</i>	0,210	0,254	++
80	<i>C.lipolytica</i>	0,144	0,136	+
83	<i>C.kefyr</i>	0,074	0,087	-
86	<i>C.lipolytica</i>	0,086	0,091	+
87	<i>C.lipolytica</i>	0,314	0,437	++
99	<i>C.kefyr</i>	0,198	0,183	++
	Eşik değeri	0,079	0,084	

Biyofilm varlığı araştırmasında, kristal viyole kullanılarak, 72 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik okumada izole edilen toplam 37 *Candida* cinsi mayanın 22'si (%51) Biyofilm pozitif, 15'i (%49) biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.13.).



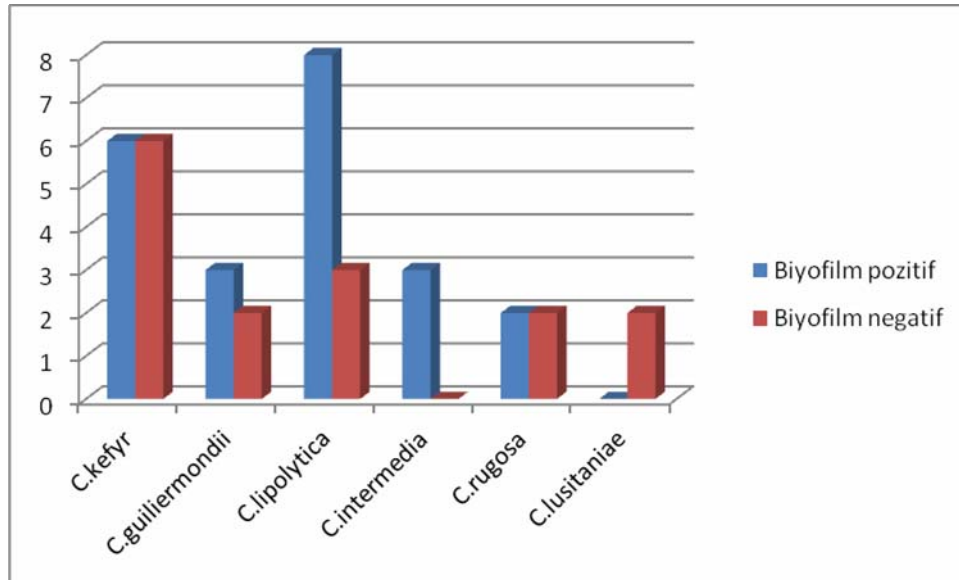
Şekil 4.13. *Candida* cinsi mayaların biyofilm varlığının % oranı

Biyofilm varlığının çalışıldığı toplam 37 *Candida* izolatının 12'sini oluşturan *C.kefyr* türünün 6'sı biyofilm pozitif, 6'sı biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 11 *C.lipolytica* türünün ise 8'i biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 3'ü biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 5 *C.guilliermondii* türünün ise 3'ü biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 2'si biyofilm negatif olarak tespit

edilmiştir. İzole edilen 4 *C.rugosa* türünün ise 2'si biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 2'si biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 3 *C.intermedia* türünün ise 3'ü de biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 2 *C.lusitaniae* türünün ise 2'si de biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14.) (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. *Candida* türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>C.kefyr</i>	6	6
<i>C.lipolytica</i>	8	3
<i>C.guilliermondii</i>	3	2
<i>C.rugosa</i>	2	2
<i>C.intermedia</i>	3	0
<i>C.lusitaniae</i>	0	2



Şekil 4.14. *Candida* türlerinde biyofilm dağılımı

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 12 *C.kefyr* türünün 6'sında (%50) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 6'sında (%50) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.15).

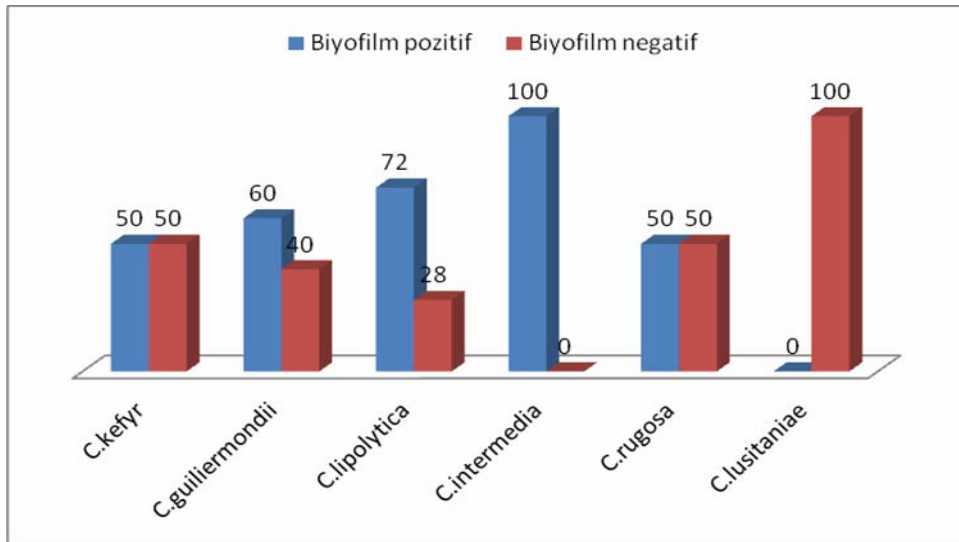
Çiğ süt örneklerinden izole edilen 11 *C.lipolytica* türünün 8'inde (%72) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 3'ünde (%28) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.15)

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 5 *C.guilliermondii* türünün 3'ünde (%60) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 2'sinde (%40) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.15).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 4 *C.rugosa* türünün 2'sinde (%50) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 2'sinde (%50) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.15).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 3 *C.intermedia* türünün 3'ü de (%100) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken biyofilm varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 2 *C.lusitaniae* türünün 2'sinde de (%100) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil 4.15).



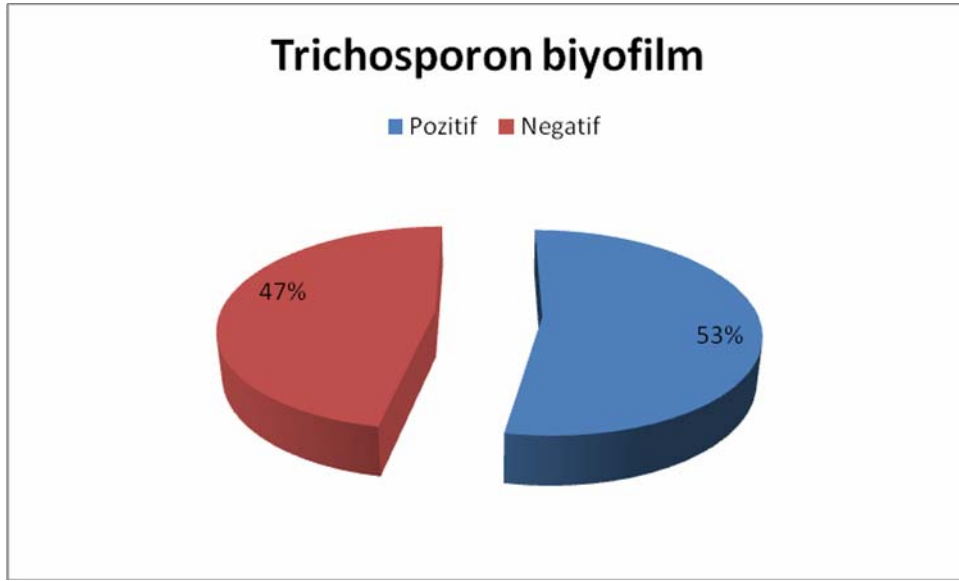
Şekil4.15. Candida türlerinde biyofilm varlığının % dağılımı

İzole edilen *Trichosporon* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 48 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.24’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.24. İzole edilen *Trichosporon* cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490nm	540nm	
7	<i>Tri.capitatum</i>	0,116	0,120	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	0,093	0,127	+
14	<i>Tri.beigelii</i>	0,122	0,096	+
18	<i>Tri.capitatum</i>	0,101	0,138	+
21	<i>Tri.beigelii</i>	0,076	0,088	-
23	<i>Tri.capitatum</i>	0,103	0,111	+
24	<i>Tri.beigelii</i>	0,083	0,089	-
27	<i>Tri.capitatum</i>	0,093	0,104	+
31	<i>Tri.beigelii</i>	0,078	0,083	-
38	<i>Tri.capitatum</i>	0,105	0,126	+
41	<i>Tri.capitatum</i>	0,089	0,094	-
48	<i>Tri.beigelii</i>	0,125	0,110	+
65	<i>Tri.beigelii</i>	0,075	0,085	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	0,082	0,090	-
71	<i>Tri.beigelii</i>	0,074	0,064	-
85	<i>Tri.beigelii</i>	0,082	0,076	-
93	<i>Tri.capitatum</i>	0,126	0,131	+
	Eşik değeri	0,091	0,095	

Biyofilm varlığı araştırmasında, kristal viyole kullanılarak, 48 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik okumada izole edilen toplam 17 *Trichosporon* cinsi mayanın 9’u (%53) biyofilm pozitif, 8’i (%47) biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.16.).

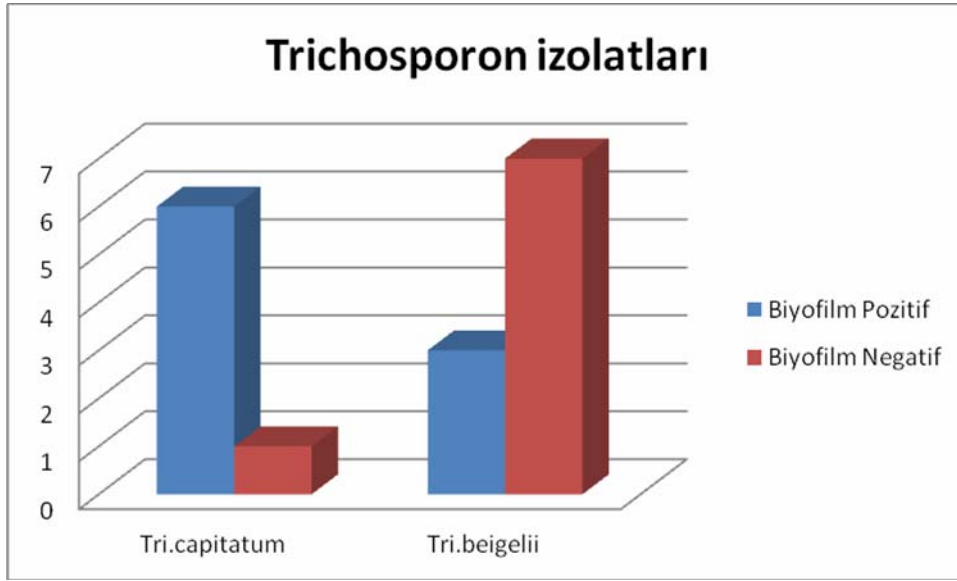


Şekil 4.16. *Trichosporon* cinsi mayaların 48 saat sonundaki biyofilm varlığının % oranı

Biyofilm varlığının çalışıldığı toplam 17 *Trichosporon* izolatının 10'unu oluşturan *Tri.beigelii* türünün 3'ü biyofilm pozitif, 7'si biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 7 *Tri.capitatum* türünün ise 6'sı biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 1'i biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17) (Çizelge 4.25).

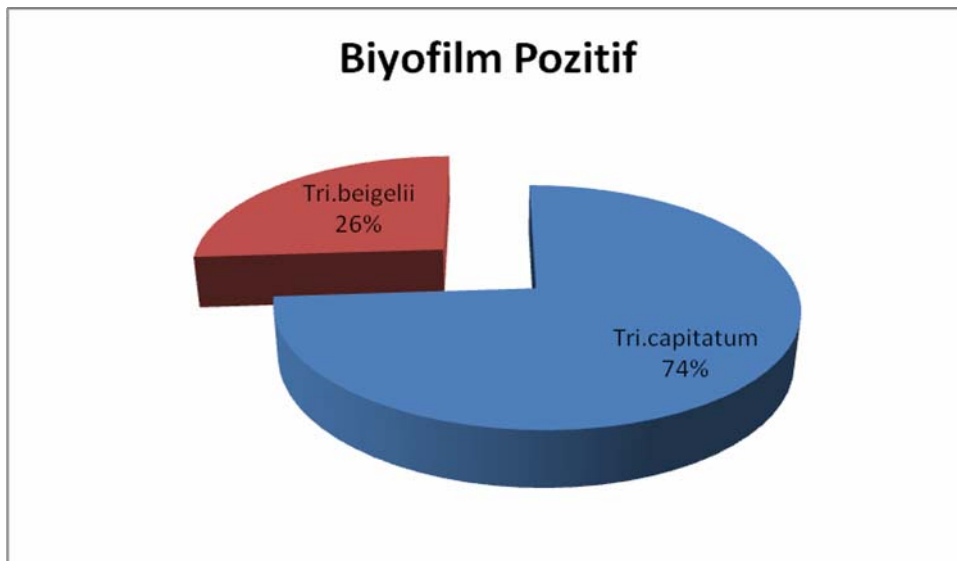
Çizelge.4.25. *Trichosporon* türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>Tri. Beigelii</i>	3	7
<i>Tri. Capitatum</i>	6	1



Şekil 4.17 Trichosporon türlerinde biyofilm varlığı

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 10 *Tri.beigelii* türünün 3'ünde (%30) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 7'sinde (%70) biyofilm varlığı tespit edilememiştir. İzole edilen 7 *Tri.capitatum* türünün ise 6'sında (%85) biyofilm pozitif olarak tespit edilirken, 1'inde (%15) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.18.).



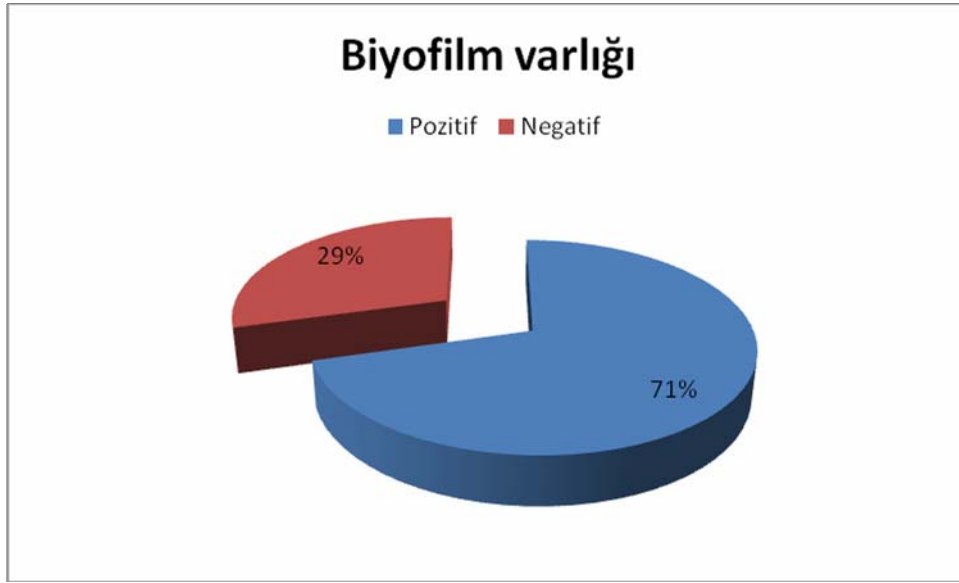
Şekil 4.18. Trichosporon türlerinde biyofilm varlığının % dağılımı

İzole edilen *Trichosporon* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 72 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.26' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. İzole edilen *Trichosporon* cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490	540	
7	<i>Tri.capitatum</i>	0,145	0,134	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	0,098	0,087	+
14	<i>Tri.beigelii</i>	0,111	0,139	+
18	<i>Tri.capitatum</i>	0,112	0,114	+
21	<i>Tri.beigelii</i>	0,062	0,052	-
23	<i>Tri.capitatum</i>	0,186	0,201	++
24	<i>Tri.beigelii</i>	0,071	0,061	-
27	<i>Tri.capitatum</i>	0,104	0,093	+
31	<i>Tri.beigelii</i>	0,078	0,083	+
38	<i>Tri.capitatum</i>	0,154	0,165	+
41	<i>Tri.capitatum</i>	0,101	0,123	+
48	<i>Tri.beigelii</i>	0,134	0,132	+
65	<i>Tri.beigelii</i>	0,071	0,062	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	0,126	0,128	+
71	<i>Tri.beigelii</i>	0,058	0,076	-
85	<i>Tri.beigelii</i>	0,078	0,082	-
93	<i>Tri.capitatum</i>	0,123	0,111	+
	Eşik değer	0,079	0,084	

Biyofilm varlığı araştırmasında, kristal viyole kullanılarak, 72 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik okumada izole edilen toplam 17 *Trichosporon* cinsi mayanın 12'si (%53) biyofilm pozitif, 5'i (%47) biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.18).

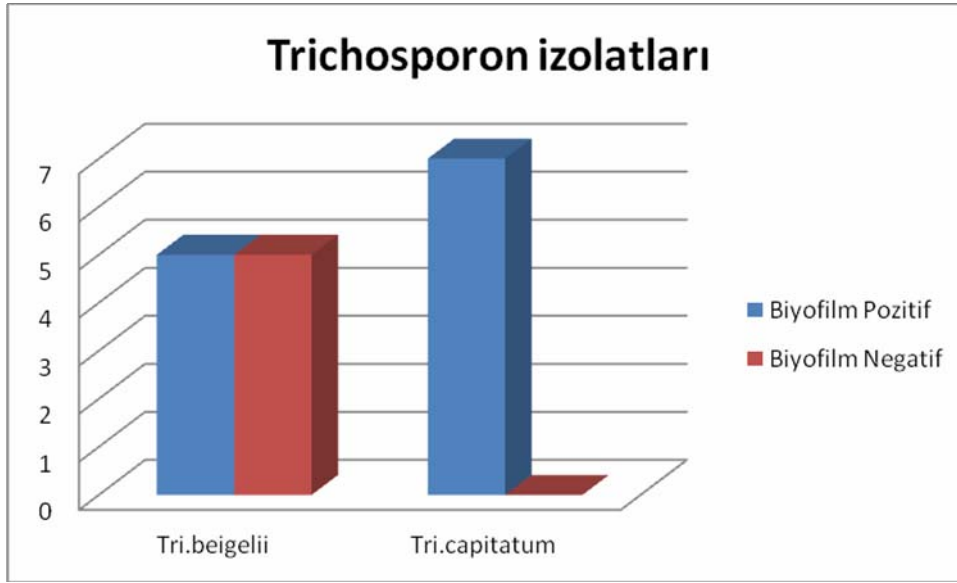


Şekil 4. 19. *Trichosporon* cinsi mayaların 72 saat sonundaki biyofilm varlığının % oranı

Biyofilm varlığının çalışıldığı toplam 17 *Trichosporon* izolatının 10'unu oluşturan *Tri.beigelii* türünün 5'i biyofilm pozitif, 3'ü biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 7 *Tri.capitatum* türünün ise 7'si de biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.19.) (Çizelge 4.27.).

Çizelge.4.27. *Trichosporon* türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>Tri. Beigelii</i>	5	5
<i>Tri. Capitatum</i>	7	0



Şekil 4.20. *Trichosporon* türlerinde biyofilm varlığı

İzole edilen *Saccharomyces* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 48 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.28’ de gösterilmiştir.

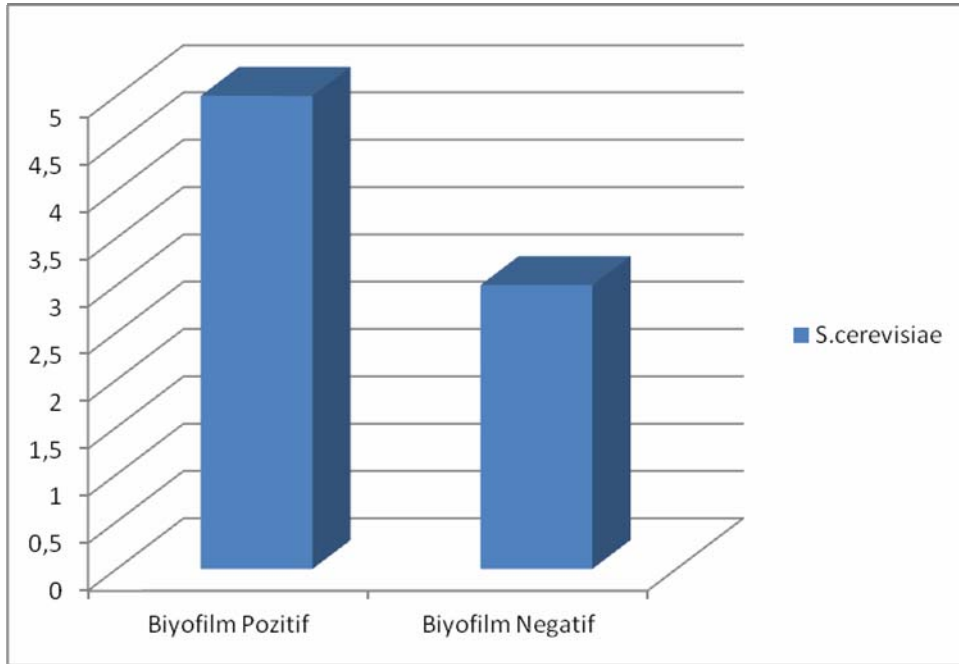
Çizelge 4.28. İzole edilen *Saccharomyces* cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490nm	540nm	
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,092	0,090	-
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,123	0,133	+
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,122	0,101	+
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,093	0,102	+
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,112	0,121	+
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,103	0,096	+
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,087	0,088	-
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,100	0,121	+
	Eşik değeri	0,091	0,095	

Biyofilm varlığının çalışıldığı toplam 8 *Saccharomyces* izolatının 8'ini de oluşturan *S. cerevisiae* türünün 5'i (%63) biyofilm pozitif, 3'si (%37) biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21.) (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.29. *Saccharomyces* türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>S. cerevisiae</i>	5	3



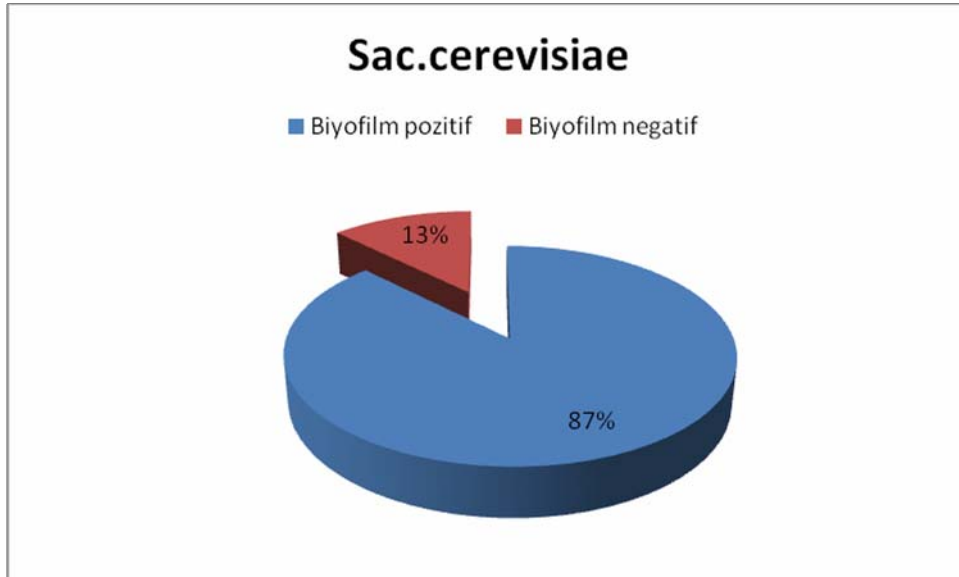
Şekil 4.21. *Sac. cerevisiae* türünde biyofilm varlığı

İzole edilen *Saccharomyces* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 72 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.30' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.30. İzole edilen *Saccharomyces* cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490	540	
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,123	0,121	+
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,108	0,124	+
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,117	0,129	+
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,110	0,123	+
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,087	0,089	+
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,105	0,119	+
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,071	0,080	-
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,159	0,177	+
	Eşik değeri	0,079	0,084	

Biyofilm varlığı araştırmasında, kristal viyole kullanılarak, 72 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik okumada izole edilen toplam 8 *Saccharomyces* cinsi mayanın 7'si (%87) biyofilm pozitif, 1'i (%13) biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.22).

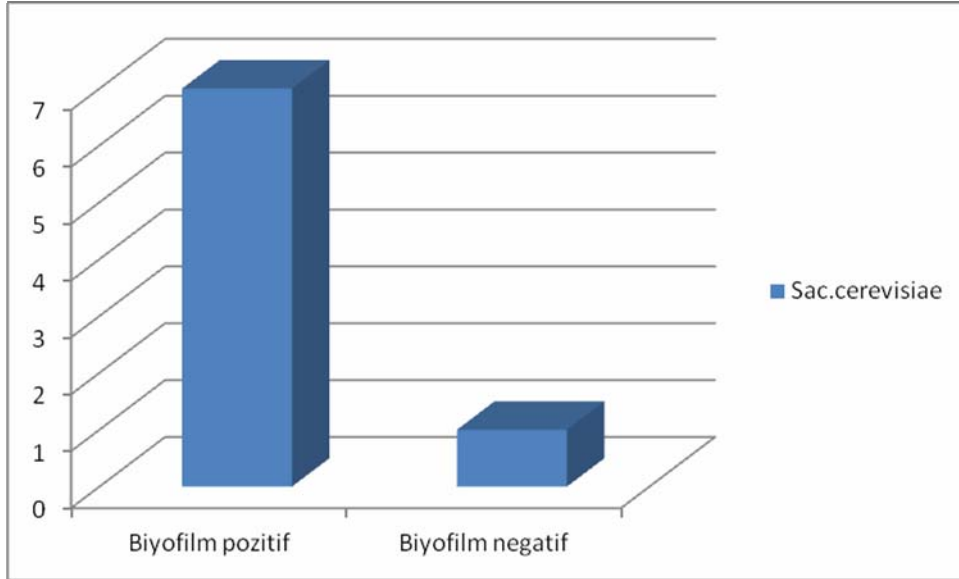


Şekil 4.22. *Sac.cerevisiae* türünde biyofilm varlığı

Biyofilm varlığının çalışıldığı toplam 8 *Saccharomyces* izolatının 8'ini de oluşturan *S. cerevisiae* türünün 7'si (%87) biyofilm pozitif, 1'i (%13)biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.23.) (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31. *Saccharomyces* türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>S. cerevisiae</i>	7	1



Şekil 4.23. *Saccharomyces* türünde biyofilm varlığı

İzole edilen *Cryptococcus* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 48 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.32' de gösterilmiştir.

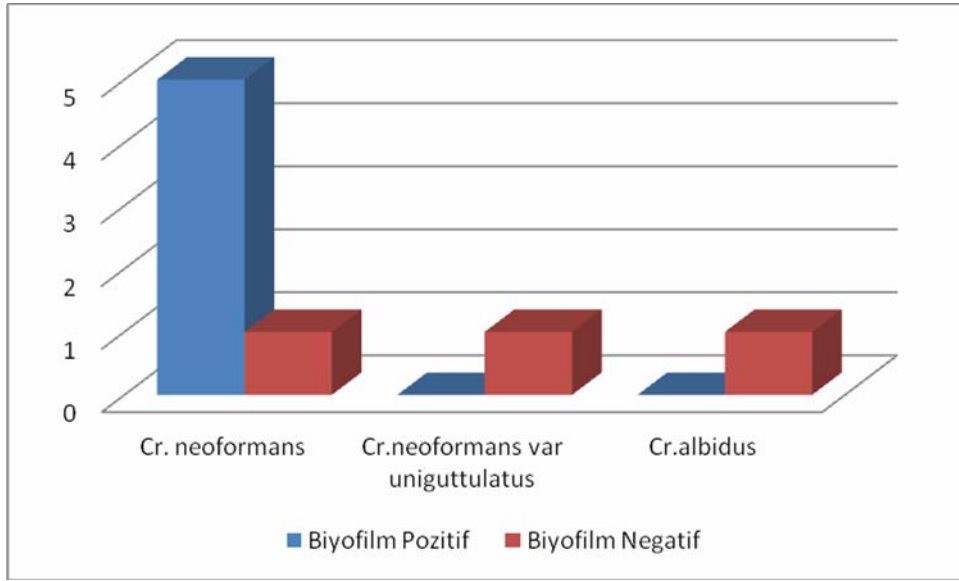
Çizelge 4.32. İzole edilen *Cryptococcus* cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490	540	
3	<i>Cr. neoformans</i>	0,140	0,128	+
8	<i>Cr. neoformans</i>	0,110	0,105	+
19	<i>Cr. neoformans</i>	0,150	0,111	+
20	<i>Cr. neoformans</i>	0,086	0,092	-
30	<i>Cr. neoformans</i>	0,156	0,152	+
33	<i>Cr. neoformans</i>	0,143	0,124	+
43	<i>Cr. neoformans var uniguttulatus</i>	0,080	0,086	-
62	<i>Cr. albidus</i>	0,171	0,162	+
	Eşik değeri	0,091	0,095	

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 6 *Cr. neoformans* türünün 5'inde (%83) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 1'ünde (27%) biyofilm varlığı tespit edilememiştir. İzole edilen 1 *Cr. neoformans var uniguttulatus* türü biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir. İzole edilen 1 *Cr. albidus* türü de biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.24.) (Çizelge 4.33).

Çizelge 4.33. *Cryptococcus* türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>Cr. neoformans</i>	5	1
<i>Cr. albidus</i>	0	1
<i>Cr. neoformans var uniguttulatus</i>	0	1



Şekil 4.24. *Cryptococcus* türünde biyofilm varlığı

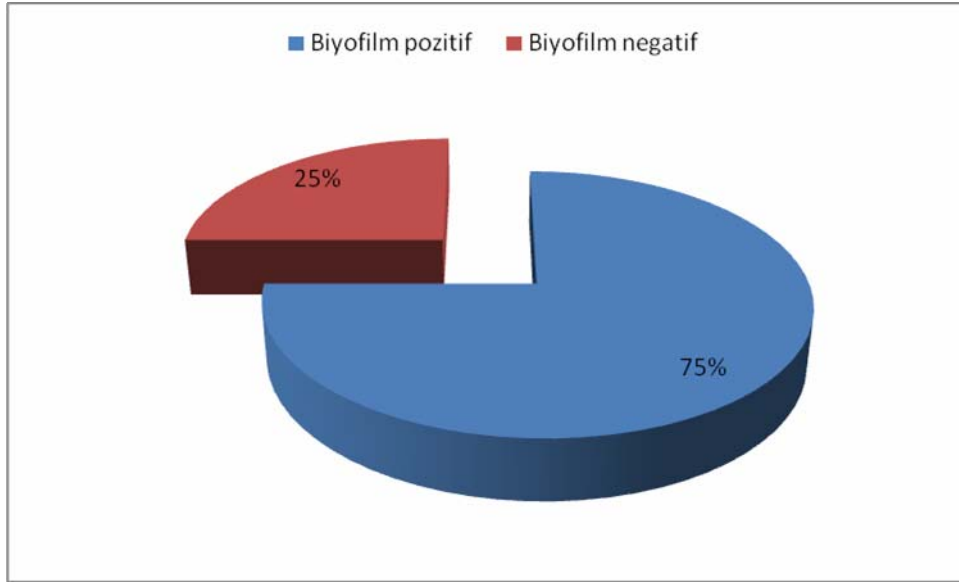
İzole edilen *Cryptococcus* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 72 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.34’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.34. İzole edilen *Cryptococcus* cinslerinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolasyon no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490nm	540nm	
3	<i>Cr. neoformans</i>	0,288	0,291	++
8	<i>Cr. neoformans</i>	0,112	0,134	+
19	<i>Cr. neoformans</i>	0,158	0,169	+
20	<i>Cr. neoformans</i>	0,108	0,112	-
30	<i>Cr. neoformans</i>	0,172	0,187	++
33	<i>Cr. neoformans</i>	0,154	0,144	+
43	<i>Cr. neoformans var uniguttulatus</i>	0,055	0,067	-
62	<i>Cr. albidus</i>	0,077	0,082	+
	Eşik değeri	0,079	0,084	

Biyofilm varlığı araştırmasında, kristal viyole kullanılarak, 72 saatlik süre sonunda yapılan spektrofotometrik okumada izole edilen toplam 8 *Cryptococcus* cinsi

mayanın 6'sı (%75) biyofilm pozitif, 2'si (%25) biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.25).

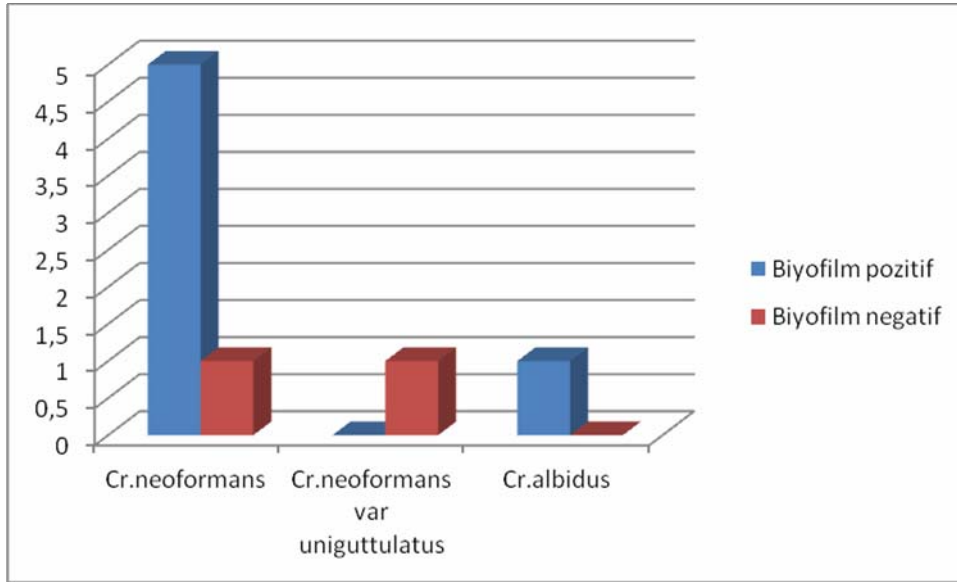


Şekil 4.25. *Cryptococcus* türünde biyofilm varlığı

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 6 *Cr.neoformans* türünün 5'inde (%83) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 1'ünde (27%) biyofilm varlığı tespit edilememiştir. İzole edilen 1 *Cr.neoformans var uniguttulatus* türü biyofilm negatif olarak tespit edilmiştir İzole edilen 1 *Cr. albidus* türü de biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.26.) (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.35. *Cryptococcus* türünde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>Cr.neoformans</i>	5	1
<i>Cr.albidus</i>	1	0
<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	0	1



Şekil 4.26. *Cryptococcus* türünde biyofilm varlığı

İzole edilen *Rhodotorula* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 48 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.36' de gösterilmiştir.

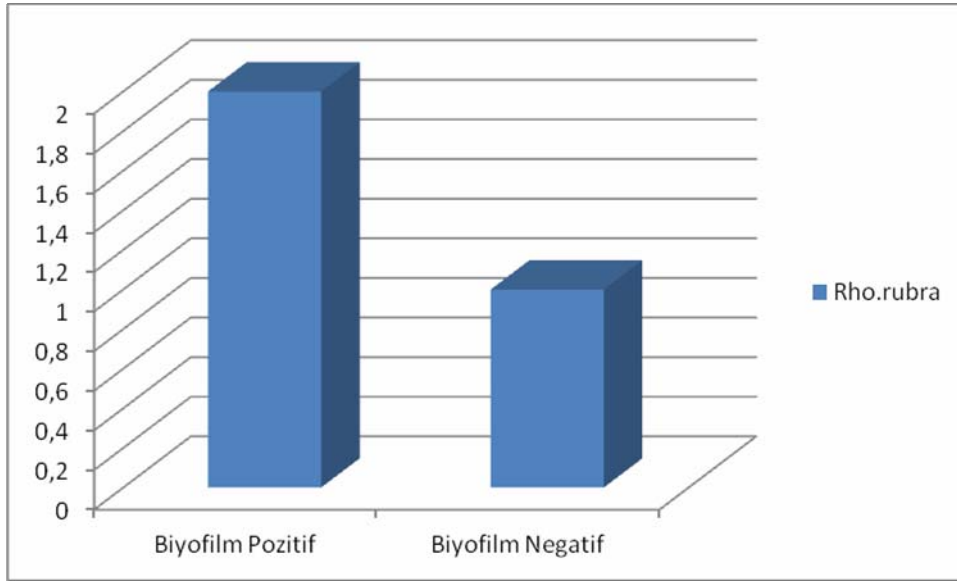
Çizelge 4.36. İzole edilen *Rhodotorula* cinsinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 48 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490 nm	540 nm	
60	<i>Rho.rubra</i>	0,073	0,068	-
84	<i>Rho.rubra</i>	0,141	0,159	+
100	<i>Rho.rubra</i>	0,223	0,31	+

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 3 *Rho.rubra* türünün 2'sinde (%67) kristal viyole kullanılarak 48 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilirken 1'inde (%33) biyofilm varlığı tespit edilememiştir (Şekil4.27) (Çizelge 4.37).

Çizelge.4.37. *Rhodotorula* türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 48 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>Rho.rubra</i>	2	1



Şekil 4.27. *Rhodotorula* türünde biyofilm varlığı

İzole edilen *Rhodotorula* cinsi mayalarda biyofilm varlığının, kristal viyole boyar maddesi kullanılarak, 72 saat sonunda, 490 nm ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında yapılan okutulması ile elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan *Candida* türlerine göre dağılımı Çizelge 4.38’ de gösterilmiştir.

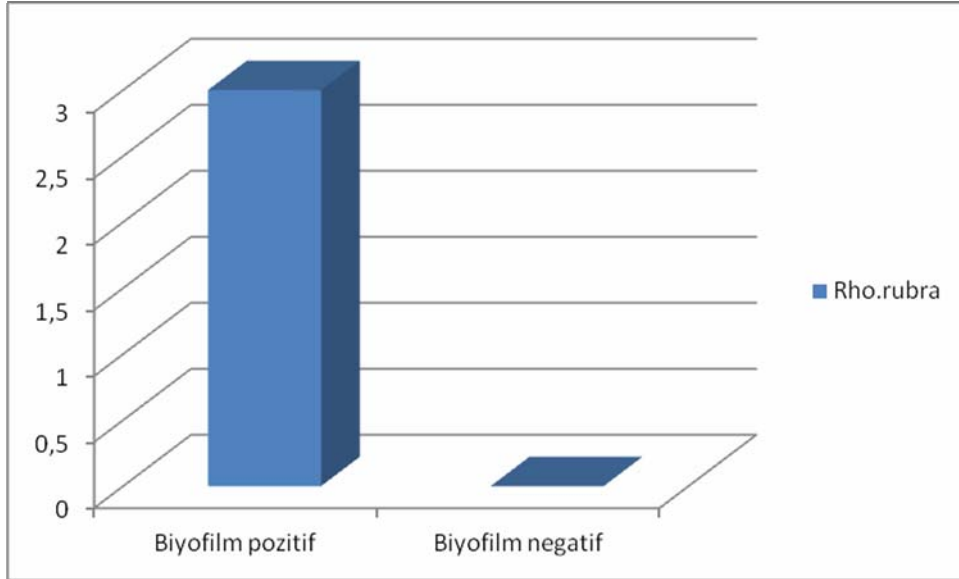
Çizelge 4.38. İzole edilen *Rhodotorula* cinsinde, kristal viyole kullanılarak, 490 ve 540 nm.dalga boyunda spektrofotometrede 72 saatlik süre sonunda elde edilen sonuçlar ve biyofilm varlığı

İzolat no	İzole edilen tür	Spektrofotometrede elde edilen değer(48 saat)		Biyofilm varlığı
		490nm	540nm	
60	<i>Rho.rubra</i>	0,074	0,079	+
84	<i>Rho.rubra</i>	0,134	0,142	+
100	<i>Rho.rubra</i>	0,312	0,325	++

Çiğ süt örneklerinden izole edilen 3 *Rho.rubra* türünün 3'ünde de (%100) kristal viyole kullanılarak 72 saat sonunda biyofilm varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.28) (Çizelge 4.39).

Çizelge.4.39. *Rhodotorula* türlerinde kristal viyole boyar maddesi kullanılarak 490 nm. dalga boyunda 72 saat sonunda biyofilm varlığı

İZOLAT	BİYOFİLM	
	POZİTİF	NEGATİF
<i>Rho.rubra</i>	3	0



Şekil 4.28. *Rhodotorula* türünde biyofilm varlığı

4.2. Slime Faktör Çalışması

Çalışmada, çiğ süttten izole edilen *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* ve *Rhodotorula* cinsi maya ve maya benzerlerinin slime faktörü çalışılmıştır. Slime faktör araştırması için 2 yöntemden yararlanılmıştır. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi ve Standart Cam Tüp Yöntemi karşılaştırılmıştır.

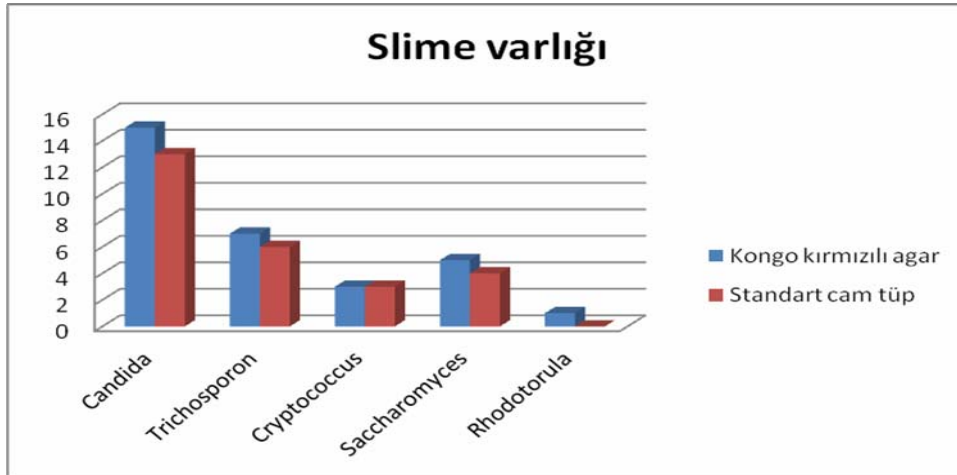
Mikroorganizmaların slime faktör varlığı çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.40'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.40. İzole edilen mayaların slime faktör dağılımı

İzolat	Kongo kırmızılı agar yöntemi		Standart cam tüp yöntemi	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<i>Candida</i>	15	22	13	24
<i>Trichosporon</i>	7	10	6	11
<i>Cryptococcus</i>	3	5	3	5
<i>Saccharomyces</i>	5	3	4	4
<i>Rhodotorula</i>	1	2	-	3
Toplam	31	42	26	47

Çizelge 4.40’da gösterilen verilere göre slime faktör çalışmasında, Kongo kırmızılı agar yöntemi ile toplam 73 adet mikroorganizmanın 31’inde (%42) slime varlığı tespit edilirken, 42’sinde (%58) slime varlığı tespit edilememiştir. Standart cam tüp yöntemi ile toplam 73 adet mikroorganizmanın 26’sında (%36) slime varlığı tespit edilirken, 47’sinde (%64) slime varlığı tespit edilememiştir. Araştırmamızda maya ve maya benzerlerinin Kongo kırmızılı agar ve Standart cam tüp yöntemi ile slime oluşturma özellikleri bakımında farklılıklar görülmüştür. Bunun nedeni mikroorganizmaların slime oluşturma yeteneklerinin cam malzemelere veya besiyeri gibi ortamlara göre değişiklik göstermesidir.

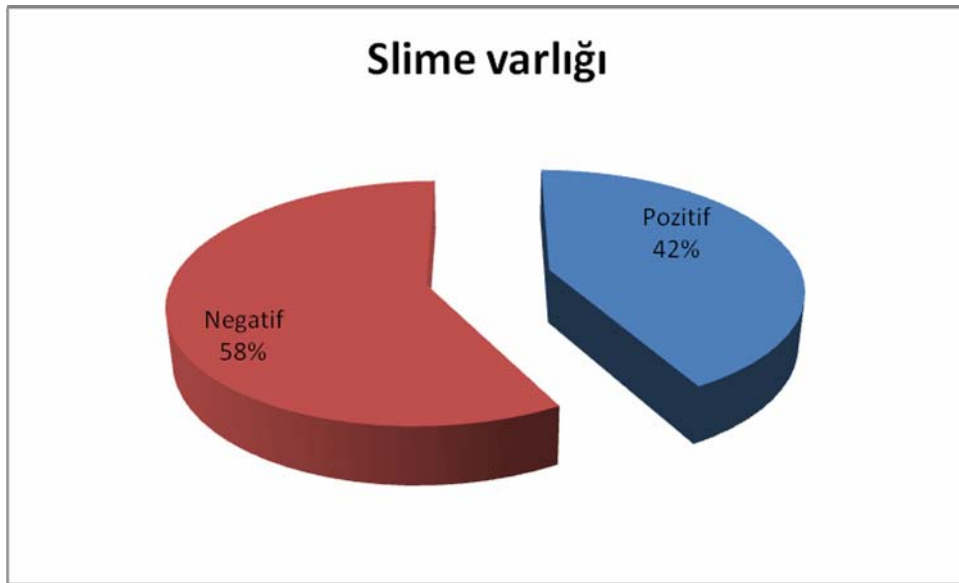
Slime varlığı tespit edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımı Şekil 4.29 ‘da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. Kongo kırmızılı agar yöntemi ve Standart cam tüp yöntemi kullanılarak slime varlığı tespit edilen mikroorganizmaların dağılımı

4.2.1. Kongo kırmızılı agar yöntemi

Araştırmada izole edilen 37 *Candida*, 17 *Trichosporon*, 8 *Saccharomyces*, 8 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula* izolatında slime faktör varlığı Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada izole edilen toplam 73 maya ve maya benzerlerinin 31'inde (%42) slime faktör oluşumu tespit edilmiş, 42'sinde (%58) tespit edilememiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Araştırmada Kongo kırmızılı agar yöntemi ile Slime faktör varlığı tespit edilen ve edilemeyen mikroorganizma oranları (%)

İzole edilen mayalarda slime varlığının, Kongo kırmızılı agar kullanılarak elde edilen sonuçların, türlere göre dağılımı Çizelge 4.41' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.41. Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikrroorganizmalar	Slime varlığı
2	<i>C.kefyr</i>	-
3	<i>Cr. neoformans</i>	-
7	<i>Tri.capitatum</i>	+

Çizelge 4.41. (Devam) Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı

8	<i>Cr.neoformans</i>	-
10	<i>C.kefyr</i>	-
11	<i>C.kefyr</i>	-
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	-
14	<i>Tri.beigelii</i>	+
15	<i>C.kefyr</i>	-
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
17	<i>C.guilliermondii</i>	-
18	<i>Tri.capitatum</i>	+
19	<i>Cr.neoformans</i>	+
20	<i>Cr.neoformans</i>	-
21	<i>Tri.beigelii</i>	-
22	<i>C.lipolytica</i>	-
23	<i>Tri.capitatum</i>	-
24	<i>Tri.beigelii</i>	-
25	<i>C.guilliermondii</i>	+
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
27	<i>Tri.capitatum</i>	+
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
29	<i>C.intermedia</i>	-
30	<i>Cr.neoformans</i>	+
31	<i>Tri.beigelii</i>	-
32	<i>C.lipolytica</i>	-
33	<i>Cr.neoformans</i>	+
34	<i>C.intermedia</i>	+
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
38	<i>Tri.capitatum</i>	+
39	<i>C.rugosa</i>	+
40	<i>C.kefyr</i>	-
41	<i>Tri.capitatum</i>	-
42	<i>C.lipolytica</i>	-
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	-
44	<i>C.rugosa</i>	+
46	<i>C.lipolytica</i>	+
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
48	<i>Tri.beigelii</i>	+
49	<i>C.lipolytica</i>	-
50	<i>C.kefyr</i>	+
52	<i>C.kefyr</i>	+
53	<i>C.kefyr</i>	-
56	<i>C.lipolytica</i>	+

Çizelge 4.41 (Devam) Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı

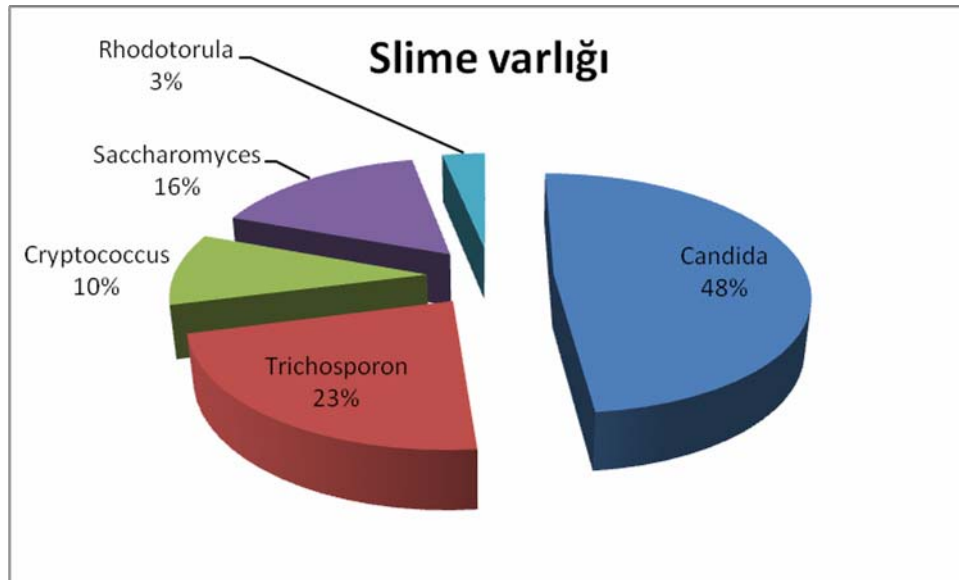
57	<i>C.guilliermondii</i>	+
58	<i>C.kefyr</i>	-
59	<i>C.kefyr</i>	-
60	<i>Rho.rubra</i>	-
62	<i>Cr.albidus</i>	-
63	<i>C.lipolytica</i>	+
64	<i>C.guilliermondii</i>	-
65	<i>Tri.beigelii</i>	-
66	<i>C.kefyr</i>	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	-
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
69	<i>C.intermedia</i>	-
71	<i>Tri.beigelii</i>	-
72	<i>C.lipolytica</i>	-
73	<i>C.rugosa</i>	-
74	<i>C.rugosa</i>	-
75	<i>C.lusitaniae</i>	-
76	<i>C.lipolytica</i>	+
80	<i>C.lipolytica</i>	+
83	<i>C.kefyr</i>	-
84	<i>Rho.rubra</i>	-
85	<i>Tri.beigelii</i>	-
86	<i>C.lipolytica</i>	+
87	<i>C.lipolytica</i>	+
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
93	<i>Tri.capitatum</i>	+
99	<i>C.kefyr</i>	+
100	<i>Rho.rubra</i>	+
Toplam	73	

Çizelge 4.41 İncelendiğinde izole edilen toplam 37 *Candida* cinsi bakterinin 15’inde kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 19 *Trichosporon* cinsinin 7’sinden kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 8 *Cryptococcus* cinsinin 3’ünde kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 8 *Saccharomyces* cinsinin 5’inde kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 3 *Rhodotorula* cinsinin 1’inde kongo kırmızılı agar yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Slime pozitif maya ve maya benzerlerinin dağılımı

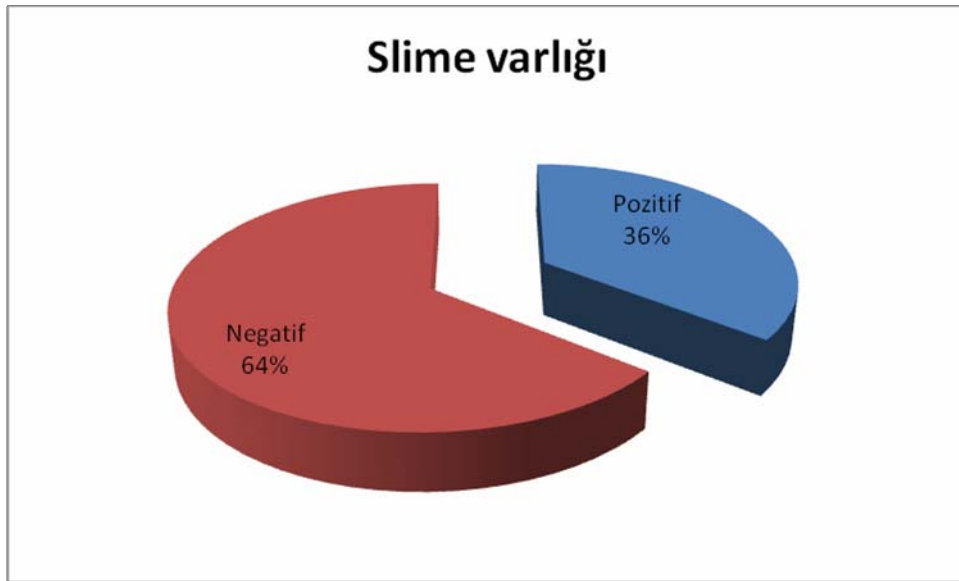
Araştırmada Kongo Kırmızılı agar yöntemi ile slime varlığı tespit edilen toplam 26 maya ve maya benzerlerinden Candida 15'i (%48), Trichosporon 7'si (%23), Sachharomyces 5'i (%16) ve Cryptococcus 3'ü(%10) ve Rhodotorula 1'i (%3)olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Kongo Kırmızılı agar yöntemi ile slime pozitif tespit edilen maya ve maya benzerleri

4.2.2. Standart cam tüp yöntemi

Araştırmada izole edilen 37 *Candida*, 17 *Trichosporon*, 8 *Saccharomyces*, 8 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula* mikroorganizmalarında slime faktör varlığı standart cam tüp yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Çalışmada izole edilen toplam 73 maya ve maya benzerinden 26'sında (%36) slime faktör oluşumu tespit edilmiş, 47'sinde (%64) tespit edilememiştir (şekil 4.33).



şekil 4.33. Araştırmada standart cam tüp yöntemi ile slime faktör varlığı tespit edilen ve edilemeyen mikroorganizma oranları (%)

İzole edilen mayalarda slime varlığının, standart cam tüp yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçların, türlere göre dağılımı  izelge 4.42' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.42. Standart cam tüp yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikrroorganizmalar	Slime varlığı
2	<i>C.kefyr</i>	-
3	<i>Cr. neoformans</i>	-
7	<i>Tri.capitatum</i>	+

Çizelge 4.42. (Devam) Standart cam tüp yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı

8	<i>Cr.neoformans</i>	-
10	<i>C.kefyr</i>	-
11	<i>C.kefyr</i>	-
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	-
14	<i>Tri.beigelii</i>	+
15	<i>C.kefyr</i>	-
16	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
17	<i>C.guilliermondii</i>	-
18	<i>Tri.capitatum</i>	+
19	<i>Cr.neoformans</i>	+
20	<i>Cr.neoformans</i>	-
21	<i>Tri.beigelii</i>	-
22	<i>C.lipolytica</i>	-
23	<i>Tri.capitatum</i>	-
24	<i>Tri.beigelii</i>	-
25	<i>C.guilliermondii</i>	+
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
27	<i>Tri.capitatum</i>	-
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
29	<i>C.intermedia</i>	-
30	<i>Cr.neoformans</i>	+
31	<i>Tri.beigelii</i>	-
32	<i>C.lipolytica</i>	-
33	<i>Cr.neoformans</i>	+
34	<i>C.intermedia</i>	+
35	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
38	<i>Tri.capitatum</i>	+
39	<i>C.rugosa</i>	+
40	<i>C.kefyr</i>	-
41	<i>Tri.capitatum</i>	-
42	<i>C.lipolytica</i>	-
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	-
44	<i>C.rugosa</i>	+
46	<i>C.lipolytica</i>	+
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	+
48	<i>Tri.beigelii</i>	+
49	<i>C.lipolytica</i>	-
50	<i>C.kefyr</i>	+
52	<i>C.kefyr</i>	+
53	<i>C.kefyr</i>	-
56	<i>C.lipolytica</i>	+

Çizelge 4.42. (Devam) Standart cam tüp yöntemi kullanılarak elde edilen slime varlığı ve türlere göre dağılımı

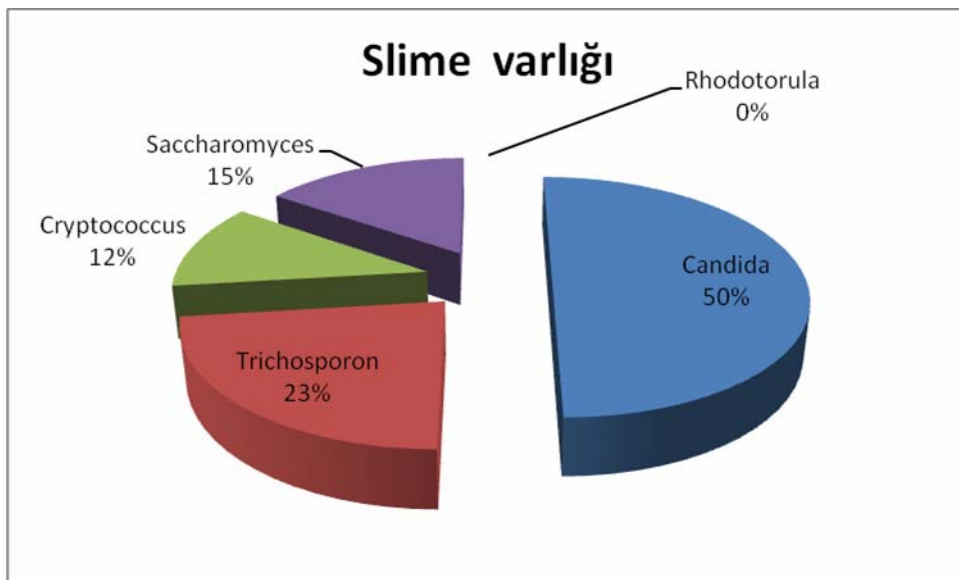
57	<i>C.guilliermondii</i>	-
58	<i>C.kefyr</i>	-
59	<i>C.kefyr</i>	-
60	<i>Rho.rubra</i>	-
62	<i>Cr.albidus</i>	-
63	<i>C.lipolytica</i>	+
64	<i>C.guilliermondii</i>	-
65	<i>Tri.beigelii</i>	-
66	<i>C.kefyr</i>	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	-
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
69	<i>C.intermedia</i>	-
71	<i>Tri.beigelii</i>	-
72	<i>C.lipolytica</i>	-
73	<i>C.rugosa</i>	-
74	<i>C.rugosa</i>	-
75	<i>C.lusitaniae</i>	-
76	<i>C.lipolytica</i>	-
80	<i>C.lipolytica</i>	+
83	<i>C.kefyr</i>	-
84	<i>Rho.rubra</i>	-
85	<i>Tri.beigelii</i>	-
86	<i>C.lipolytica</i>	+
87	<i>C.lipolytica</i>	+
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	-
93	<i>Tri.capitatum</i>	+
99	<i>C.kefyr</i>	+
100	<i>Rho.rubra</i>	-
Toplam	73	

Çizelge 4.42 incelendiğinde izole edilen toplam 37 Candida cinsi bakterinin 13'ünde standart cam tüp yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 19 Trichosporon cinsinin 6'sında standart cam tüp yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 8 Cryptococcus cinsinin 3'ünde standart cam tüp yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 8 Saccharomyces cinsinin 4'ünde standart cam tüp yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 3 Rhodotorula cinsinin tümünde standart cam tüp yöntemi ile slime oluşumu tespit edilmemiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Slime varlığının cinslere göre dağılımı

Araştırmada Standart cam tüp yöntemi ile slime varlığı tespit edilen toplam 26 maya ve maya benzerlerinden Candida 13'ü (%50), Trichosporon 6'sı (%23), Sachharomyces 4'ü (%15) ve Cryptococcus 3'ü(%12) olarak tespit edilmiştir. Rhodotroutula türünün tümü negatif olarak tespit edilmiştir(Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Standart cam tüp agar yöntemi ile slime pozitif tespit edilen maya ve maya benzerleri

4.3. Fosfolipaz Enzimi Varlığı

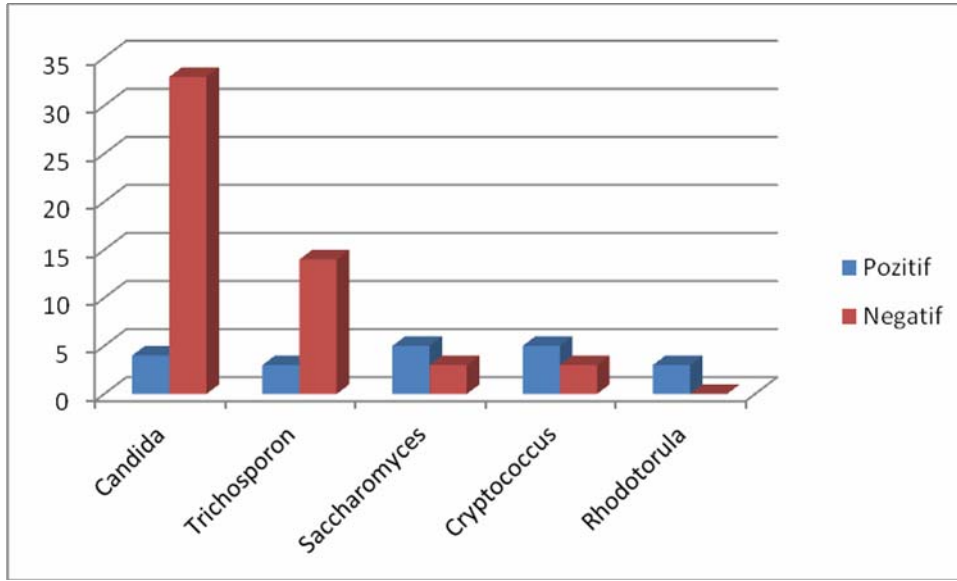
Araştırmada çiğ süt örneklerinden izole edilen 37 Candida, 17 Trichosporon, 8 Saccharomyces, 8 Cryptococcus, 3 Rhodotorula mikroorganizmalarında fosfolipaz enzimi varlığı Price ve ark.larının yumurta sarılı SDA agar yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında yumurta sarılı agarda koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alınmıştır.

Fosfolipaz varlığı tespit edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımı Çizelge4.43’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.43. İzole edilen mayaların fosfolipaz enzimi varlığı dağılımı

İZOLAT	FOSFOLİPAZ ENZİMİ	
	POZİTİF	NEGATİF
Candida	4	33
Trichosporon	3	14
Saccharomyces	5	3
Cryptococcus	5	3
Rhodotorula	3	0
Toplam	20	53

Fosfolipaz varlığı tespit edilen maya ve maya benzerlerinin dağılımı Şekil 4.36’da gösterilmiştir.



Şekil 4.36. Fosfolipaz varlığının cinslere göre dağılımı

İzole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların fosfolipaz enzimi aktivitesinin, yumurta sarılı agar kullanılarak elde edilen sonuçların, izolasyonu yapılan maya ve maya benzeri mikroorganizmaların türlerine göre dağılımı Çizelge 4.44’de gösterilmiştir

Çizelge 4.44. Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların yumurta sarılı agar kullanılarak elde edilen değerler ve türlere göre dağılımı

İzolat no	İzole edilen maya ve maya benzeri mikrroorganizmalar	Yumurta sarılı agarda elde edilen Pz değeri	Fosfolipaz varlığı
2	<i>C.kefyr</i>	0,93	+
3	<i>Cr. neoformans</i>	0,82	++
7	<i>Tri.capitatum</i>	1,24	-
8	<i>Cr.neoformans</i>	0,91	+
10	<i>C.kefyr</i>	1,34	-
11	<i>C.kefyr</i>	1,56	-
12	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,98	+
13	<i>Tri.beigelii</i>	1,36	-
14	<i>Tri.beigelii</i>	1,62	-
15	<i>C.kefyr</i>	1,12	-
17	<i>C.guiliermondii</i>	1,16	-
18	<i>Tri.capitatum</i>	1,68	-
19	<i>Cr.neoformans</i>	1,10	-

Çizelge 4.44. (Devam) Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların yumurta sarılı agar kullanılarak elde edilen değerler ve türlere göre dağılımı

20	<i>Cr.neoformans</i>	0,9	+
21	<i>Tri.beigelii</i>	1,45	-
22	<i>C.lipolytica</i>	1,62	-
23	<i>Tri.capitatum</i>	1,18	-
24	<i>Tri.beigelii</i>	1,28	-
25	<i>C.guilliermondii</i>	1,82	-
26	<i>Sac.cerevisiae</i>	1,08	-
27	<i>Tri.capitatum</i>	1,41	-
28	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,99	+
29	<i>C.intermedia</i>	2,11	-
30	<i>Tri.capitatum</i>	1,82	-
31	<i>Tri.beigelii</i>	0,92	+
32	<i>C.lipolytica</i>	1,36	-
33	<i>Cr.neoformans</i>	0,86	+
34	<i>C.intermedia</i>	1,44	-
38	<i>Tri.capitatum</i>	1,52	-
39	<i>C.rugosa</i>	1,68	-
40	<i>C.kefyr</i>	0,97	+
41	<i>Tri.capitatum</i>	1,96	-
42	<i>C.lipolytica</i>	1,12	-
43	<i>Cr.neoformans var uniguttulatus</i>	1,24	-
44	<i>C.rugosa</i>	1,61	-
46	<i>C.lipolytica</i>	1,50	-
47	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,90	+
48	<i>Tri.beigelii</i>	0,99	+
49	<i>C.lipolytica</i>	1,25	-
50	<i>C.kefyr</i>	1,68	-
52	<i>C.kefyr</i>	1,18	-
53	<i>C.kefyr</i>	0,95	+
56	<i>C.lipolytica</i>	1,36	-
57	<i>C.guilliermondii</i>	1,39	-
58	<i>C.kefyr</i>	1,19	-
59	<i>C.kefyr</i>	1,90	-
60	<i>Rho.rubra</i>	0,91	+
62	<i>Cr.albidus</i>	0,96	+
63	<i>C. lipolytica</i>	1,59	-
64	<i>C.guilliermondii</i>	1,11	-
65	<i>Tri.beigelii</i>	1,98	-
66	<i>C.kefyr</i>	2,10	-
67	<i>Tri.beigelii</i>	1,28	-
68	<i>Sac.cerevisiae</i>	0,94	+

Çizelge 4.44. (Devam) Maya ve maya benzeri mikroorganizmaların yumurta sarılı agar kullanılarak elde edilen değerler ve türlere göre dağılımı

69	<i>C.intermedia</i>	1,42	-
71	<i>Tri.beigelii</i>	1,08	-
72	<i>C.lipolytica</i>	1,61	-
73	<i>C.rugosa</i>	1,80	-
74	<i>C.rugosa</i>	1,45	-
75	<i>C.lusitaniae</i>	1,51	-
76	<i>C.lipolytica</i>	1,22	-
80	<i>C.lipolytica</i>	1,23	-
83	<i>C.kefyr</i>	1,34	-
84	<i>Rho.rubra</i>	0,89	+
85	<i>Tri.beigelii</i>	0,97	+
86	<i>C.lipolytica</i>	1,22	-
87	<i>C.lipolytica</i>	1,14	-
90	<i>Sac.cerevisiae</i>	1,00	+
93	<i>Tri.capitatum</i>	1,84	-
99	<i>C.kefyr</i>	0,99	+
100	<i>Rho.rubra</i>	0,82	+
	Pz değeri	=1	

Pz: Presipitasyon zonu

Çizelge 4.44' de gösterilen, Pz (presipitasyon) değeri 48 saat sonunda elde edilmiştir. Bu çalışmada Fosfolipaz aktivitesi, koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplanmıştır. Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri, denenen izolatın fosfolipaz aktivitesinin negatif olduğunu gösterir. Bu durumda, Pz değeri 0,9-1.00 olanlar (+), 0,89-0.8 olanlar (++) pozitif, 0.79-0.70 olanlar (+++), <0,69 olanlar (++++) olarak değerlendirilmiştir.

Yumurta sarılı agar yöntemi ile yapılan fosfolipaz enzimi çalışmasında, 48 saatlik süre sonunda yapılan Presipitasyon zonu(Pz) değerlendirmesinde toplam 73 izolatın 20'sinde (%23) fosfolipaz pozitif, 53'ü (%77) fosfolipaz negatif olarak değerlendirilmiştir(Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Araştırmada yumurta sarılı agar yöntemi ile fosfolipaz enzimi varlığı tespit edilen ve edilemeyen mikroorganizma oranları (%)

Fosfolipaz varlığı tespit edilen bu 20 izolatın 5'i (%25) *Sac.cerevisia*, 4'ü (%20) *C.kefyr*, 4'ü(%20) *Cr.neoformans*, 3'ü (%15) *Rho.rubra*, 3'ü *Tri.beigeli* (%15) ve 1'i (%5) *Cr.albidus* türleridir.(Şekil 4.38)



Şekil 4.38. Fosfolipaz pozitif türlerin dağılım oranı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan beslenmesinde çok önemli bir yere sahip olan süt, hijyenik koşullarda üretilmediği, saklanmadığı, işlenmediği, gerekli kontrollerinin yapılmadığı durumlarda insan sağlığı açısından zararlı olabilmektedir. Çiğ süt az sayıda mikroorganizma içerse bile sağımdan sonra çevreden ahırlardan, çiftlik içinde bulunan yemlerden, haşerelerden, çevredeki bitkilerden, toprak ve gübreden, iyi temizlenmemiş sağıım ekipmanından gibi çeşitli yollarla bulaşan mikroorganizmaların etkisiyle oldukça kısa sürede bozulur ve insanlarda hastalıklara yol açan bir çok patojenitenin potansiyel kaynağını oluşturur.

Süt memeden salgılandığında sterildir. Fakat daha memeyi terk etmeden mikroorganizmalarla kontamine olabilir. Süt mikroorganizma gelişmesi için mükemmel bir ortamdır [Mauropoulos ve Arvanitoyannis, 1999].

Süt içerisinde farklı mikroorganizma grupları kontamine olabilir. Süte ilk aşamada bulaşan ve sıkça rastlanan mikroorganizma türleri, Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Streptococcus, Corynebacterium, Candida'dır.. Bu yolla süte bulaşan mikroorganizma sayısı 300–4000 adet/ml arasında değişir [Metin 1996].

Mayalar diğer gıda sanayi dallarında önemli olmakla beraber süt teknolojisinde genellikle arzu edilmeyen mikroorganizmalardır. Laktik asidi metabolize ederek süt ve süt ürünlerinde istenmeyen özellikler oluşturur. Mayalar süt sağımından itibaren ahır ve çevresi, süt işletmelerinin çevresi ve işletme içinde bulaşırlar [Metin 1996].

Sağıım aletleri ve depolama tankları çiğ sütlerin mikroorganizma ile kontaminasyonu açısından önemli bir kaynaktır. Sağıım aletlerinin ve depolama tanklarının temizliğine dikkat ederek mikroorganizma kontaminasyonu ve üremesi kontrol altına alınabilir. Çiğ sütte bazı mikroorganizmaların bulunması, çevresel kaynaklı kontaminasyondan dolayı sanitasyon koşullarının uygulanması gerektiğini göstermektedir [Metin 1996].

Meme başı derisi ile ilk sağılan çiğ sütün hem mikrobiyal kontaminasyon düzeylerini hem de bunların kontaminasyondaki rollerini belirlemek amacıyla bir araştırma yapılmıştır. Bu amaçla, Van ili çevresindeki 5 farklı çiftlikten 100 adet sağmal süt ineğine ait meme başı derisi ve aynı ineklere ait çiğ süt örneği mikrobiyolojik olarak incelenmiştir. Bu kapsamda; aerob mezofil genel canlı, enterobakteri, fekal streptokok, mikrokok/stafilokok, pseudomonas ve sülfid indirgeyen anaerob bakteri ile maya-küf sayıları belirlenmiştir. İncelenen çiğ süt örneklerinde; aerob mezofil genel canlı, enterobakteri, fekal streptokok, pseudomonas, mikrokok-stafilokok ve sülfid indirgeyen anaerob bakteriler ile maya/küf sayıları aynı sıra ile ortalama olarak 3,17, 0,60, 0,65, 2,17, 0,81, 0,68 ve 0,14 log cfu/ml düzeyinde belirlenmiştir. Sonuç olarak, sağılan memenin düzenli olarak sağlık kontrolü yapılır, meme, sağım, personel ve ekipman hijyenine gerekli özen gösterilir ve sağımdan tüketim merkezlerine kadar soğuk zincir kırılmaksızın sürekli korunursa, çiğ sütün mikroorganizmalarla kontaminasyonu daha az indirgenebilir [Alisharlı ve ark. 2003].

Ankara’da Topçu’nun yaptığı bir çalışmada 50 sokak sütü örneğindeki toplam canlı maya ortalaması $1,3 \times 10^6$ cfu/ml olarak hesaplanmıştır. 50 süt örneğindeki en çok maya sayısı $3,9 \times 10^6$ cfu/ml, en az maya sayısı ise 2×10^5 cfu/ml olarak saptanmıştır [Topçu, 2006]. Bizim çalışmamızda 73 çiğ süt örneğindeki toplam canlı maya ortalaması $1,91 \times 10^6$ cfu/ml olarak hesaplanmıştır. 73 süt örneğindeki en çok maya sayısı $3,5 \times 10^6$ cfu/ml, en az maya sayısı ise $0,6 \times 10^6$ cfu/ml olarak saptanmıştır.

Belçika’da Santos toplam 436 infeksiyonsuz ve 80 mastisitli süt örneği çalışmışlar ve bu örneklerden *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*[*Torulopsis glabrata*] ve *Trichosporon asahii*, *C. kefir*, *C. catenulata* ve *C. lambica* türlerini izole etmişlerdir [Santos, 2005].

1997 yılında Ankara’ da Yıldırım’ın yaptığı bir çalışmada 90 çiğ süt örneğinden maya izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır. En sık rastlanan türler arasında *Torulopsis candida* (6), *T. Sphaerica*, (1), *Trichosporon cutaneum* (5), *T.capitatum* (1), *Candida albicans* (2), *C. krusei* (2), *C. catenulata* (1), *C. guilliermondii* (1),

Cryptococcus laurentii (2), *C.terreus* (5), *Saccharomyces cerevisiae*(1), *Sporobolomyces alborubescens*(1) olarak tespit edilmiştir [Yıldırım, 1997].

Gadaga ve ark. 30 fermente süt örneğinden maya izole etmişler, izole edilen bu türlerin 22'si *S. cerevisiae*, 11'i, *C.lusitaniae*, 7'si *C. colliculosa* ve 7'si *S. dairenensis*, *Dekera bruxillensis*, *C.lipolytica* ve *C. tropicalis*'dir [Gadaga ve ark.,2000].

Moretti ve ark., mastitisli ineklerden aldıkları süt örneklerinin 4.9%'unda maya ve maya benzeri izole etmişler ve bunlar *Trichosporon capitatum* (31.2%), *T.beigelii*(18.72%), *Candida albicans* (12.48%), *C. guillermundii* (12.48%), *C. tropicalis* (12.48%)'dir [Moretti ve ark., 1998].

Çalışmamızda 100 çiğ süt örneğinden 73 maya izole edildi. İzole edilen türlerin 12'si *C. kefir*, 11'i *C. lipolytica*, 5'i *C.guillermundii*, 4'ü *C.rugosa*, 3'ü *C.intermedia*, 2'si *C.lusitaniae*, 10'u *Tri.beigelii*, 7'si *Tri.capitatum*, 8'i *S.cerevisiae*, 6'sı *Cr.neoformans*, 1'i *Cr.albidus*, 1'i *Cr.neoformans var uniguttulatus*, 3'ü de *Rho.rubra* olarak tespit edilmiştir.

Bu araştırmada çiğ süt örneklerinden maya ve maya benzeri izolasyonu ve izole edilen türlerde biyofilm, slime faktör ve fosfolipaz enzimi varlığı çalışılmıştır.

Süt işletmelerinde, boru hatlarında, contalarda, pastörizasyon ve buharlaşmanın yapıldığı üretim alanlarındaki biyofilm varlığı, ürün kontaminasyonu için oldukça önemli bir kaynaktır [Flint ve ark., 2011].

Biyofilm oluşumu gıda endüstrisinin birçok sektöründe sorunların ortaya çıkmasına yol açar. Boruların iç cidarları üzerinde oluşan biofilm tabakası, akış sistemleri boyunca azalan bir akışa neden olur. Yüzeylerde toplanan canlı organizmaların artmasının sonucu olarak ısı iletimi azalabilir, ürüne kontaminasyon oluşabilir ve biofilm tabakasındaki mikroorganizmaların asit üretimi nedeniyle borular

aşınabilirler. Gıda işletmelerinde oluşan biyofilm tabakaları ekipmanların mikrobiyal kontaminasyonuna neden olabilir [Genige, 1995].

Mikroorganizmaların ıslak yüzeylere tutunmaları, çoğalmaları ve ürettikleri ekstraselüler polimer bileşenlerden oluşmuş matriks içerisine yerleşmeleri doğal bir durumdur. Biyofilmler özellikle gıda endüstrisinde mayalanma, süt ürünleri işleme, kanatlı etleri işleme ve kırmızı et işlemede sorun oluşturabilirler [Chen, 2007]. Gıda endüstrisi içerisinde, süt işleme ekipmanlarında biyofilm oluşumu, önem arz eden bir sorundur. Özellikle süt ürünlerinde kontaminasyon meydana geldiğinde, sorunun kaynağı biyofilmlerle ilişkilendirilir [Langsrud ve ark., 2003; Simoes ve ark.,2006]. Biofilmler, planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında antimikrobiyal maddelere çok daha fazla dirençlidir [Simoes ve ark., 2009]. Süt endüstrisi ekipmanları üzerinde biyofilm oluşumu, gıda zehirlenmesi ve ekipman bozulması yüzünden ciddi hijyen sorunlarına ve ekonomik kayıplara yol açabilmektedir [Bremer ve ark., 2006; Gram ve ark.,2007].

Çalışmamızda çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 100 mikroorganizmada; kristal viyole boyar maddesi kullanılarak yapılan biyofilm varlığı araştırmasında 48 saat sonra yapılan değerlendirmede toplam 42 izolatta biyofilm varlığı tespit edilmiştir. Biyofilm pozitif olarak tespit edilen bu 42 izolatın 19'u *Candida*, 9'u *Trichosporon*, 7'si *Saccharomyces*, 5'i *Cryptococcus* ve 2'si *Rhodotorula* olarak tespit edilmiştir.

Biyofilm varlığı araştırmasında 72 saat sonra yapılan değerlendirmede toplam 49 izolatta biyofilm varlığı tespit edilmiştir. Biyofilm pozitif bu 49 izolatın 22'si *Candida*, 12'si *Trichosporon*, 7'si *Saccharomyces*, 5'i *Cryptococcus* ve 3'ü *Rhodotorula* olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada izole edilen mayalarda biyofilm varlığı mikropate yöntemi ile kristal viyole boyar maddesi kullanarak 48 ve 72 saatte 490 ve 540 nm dalga boylarında değerlendirilmiştir

Shin ve ark., kan dışındaki vücut bölgelerinden izole ettikleri 259 *Candida* cinsinde, mikropate yöntemi kullanarak biyofilm varlığını araştırmışlardır. Toplam 259 izolatin 219'unda biyofilm varlığı tespit etmişlerdir [Shin ve ark., 2002]. Bizim çalışmamızda, çeşitli izole edilen toplam 37 *Candida* izolatinın, mikropate yöntemine göre, ortalama olarak 20'sinde biyofilm varlığı tespit edilmiştir.

Robertson, *Cryptococcus neoformans*'ın biofilm yapısını araştırmış ve *Cryptococcus neoformans*'ın kuvvetli biyofilm pozitif olduğunu tespit etmiştir [Robertson, 2009]. Luis medikal aletler üzerinde *Cr. neoformans*'ın biyofilm oluşturma yeteneğini mikropate yöntemi ile araştırmışlar ve *Cr. neoformans*'ın biyofilm pozitif olduğunu ve bulunduğu yüzeylere göre biyofilm oluşturma yeteneklerinin değişkenlik gösterdiğini tespit etmişlerdir [Luis, 2007]. Martinez mikropate yöntemi ile *Cr. neoformans*'da biyofilm varlığını araştırmış ve *Cr. neoformans*'ın medikal aletler üzerinde biyofilm oluşturduğunu tespit etmiştir [Martinez, 2007]. Bizim çalışmamızda izole edilen toplam 8 *Cr. neoformans*'ın 48 ve 72 saat sonundaki değerlendirilmesinde 5'nin biyofilm pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Reynolds 'un *Sac.cerevisiae* üzerinde biyofilm varlığı üzerine yaptığı çalışmada *Sac.cerevisiae*'nin biyofilm oluşturduğunu tespit etmiştir [Reynold, 2001]. Bizim çalışmamızda izole edilen 8 *Sac.cerevisiae*'nin 7'sinde biyofilm varlığı tespit edilmiştir.

Perunova insanlardan izole ettikleri *C.albicans* ve *Rho.rubra* türlerinde mikropate yöntemi ile biyofilm varlığını araştırmışlar ve bu iki türünde biyofilm pozitif olduğunu tespit etmişlerdir [Perunova, 2009]. Bizim çalışmamızda izole edilen 3. *Rho.rubra* izolatinın 48 saatlik değerlendirmede 2'sinin, 72 saatlik değerlendirmesinde 3'nünde biyofilm varlığı tespit edilmiştir.

Literatürlerde çoğunlukla *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *C.kefyr* gibi türlerin biyofilm varlığı üzerinde durulmuş olup, çalışmamızdaki *C.intermedia*, *Cryptococcus neoformans*, *Cr. albidus*, *Sac. Cerevisiae*, *Rho.rubra*, *Tri. Beigelii*, *Tri.capitatum* türleri ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır.

Slime faktör; amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşmaktadır [Cengiz, 1999]. Slime faktör, mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından korur. Bu nedenle yapışma veya slime yapımı önemli bir virulans faktörü olarak kabul edilmektedir [Kotilainen, 1990].

Bu çalışmada, çiğ süt örneklerden izole edilen *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* ve *Rhodotorula*'larda slime faktör varlığı iki farklı yöntemle test edilmiştir. Bu yöntemler: Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi ve Standart Cam Tüp Yöntemi'dir. Her iki yöntemle yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; çalışılan toplam 73 mikroorganizmanın standart cam tüp yönteminde 26'sında slime faktör varlığı tespit edilmiştir. Slime faktör varlığı tespit edilen bu mikroorganizmaların dağılımına bakılacak olursa; 13 *Candida*, 6 *Trichosporon*, 3 *Cryptococcus*, 4 *Sachharomyces* izolatında slime faktör oluşumu tespit edilmiştir. Slime faktör varlığı tespit edilen 13 *Candida* izolatının, 3'ü *C.kefyr*; 6'sı *C.lipolytica*, 2'si *C.rugosa*, 1'i *C.guilliermondii*, 1'i de *C.intermedia*, 6 *Trichosporon* izolatının 4'ü *Tri. Capitatum*, 2'si *Tri.beigelii*, 3 *Cryptococcus* izolatının 3'ü de *Cr.neoformans*, 4 *Sachharomyces* izolatının da 4'ü de *Sac.cerevisiae* olarak tespit edilmiştir.

Slime faktör varlığı çalışmasında Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi ile yapılan çalışmanın sonucunu göre toplam 73 mikroorganizmanın 31'inde slime faktör varlığı tespit edilmiştir. Slime faktör varlığı tespit edilen bu mikroorganizmaların dağılımına bakılacak olursa; 15 *Candida*, 7 *Trichosporon*, 3 *Cryptococcus*, 5 *Sachharomyces* ve 1 *Rhodotorula* izolatında slime faktör oluşumu tespit edilmiştir. Slime faktör varlığı tespit edilen 15 *Candida* izolatının, 3'ü *C.kefyr*; 7'si *C.lipolytica*, 2'si *C.rugosa*, 2'si *C.guilliermondii*, 1'i de *C.intermedia*, 6 *Trichosporon* izolatının 5'i *Tri.capitatum*, 1'i *Tri.beigelii*, 3 *Cryptococcus* izolatının 3'ü de *Cr.neoformans*, 5 *Sachharomyces* izolatının da 5'i de *Sac.cerevisiae* olarak tespit edilmiştir.

Karabıçak ve ark. hastaların ağız florasından izole ettikleri (%91 *C.albicans*, %5 *C. tropicalis*, %1 *C.kefyr*, %1 *C.guilliermondii*), 2 *Rhodotorula rubra* ve 2 *Geothricum candidum* türlerinde slime faktörü standart tüp yöntemiyle çalışmışlar ve bu türlerin 21'inde (%36) kuvvetli, 4'ünde (%7) zayıf (*C.albicans* için %30 kuvvetli, %7 zayıf,

diğer *Candida* türlerinin tamamı için kuvvetli), *R.rubra* ve *G.candidum* için kuvvetli bulmuşlardır [Karabıçak ve ark.,2006].

Türkyılmaz ve ark. süt örneklerinden izole ettikleri *C.krusei*, *C.kefyr*, *C.guilliermondii*, *C.famata*, *C.rugosa*, *C.utulis*. *Trichosporon mucoides*, *T. asahii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cr. neoformans* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinde kongo red yöntemi ile slime faktör çalışmışlardır. İzole ettikleri bu izolatların 7 *C.krusei*, 4 *C. kefyr*, 1 *C. guilliermondii*, 1 *C. famata*, 1 *T. asahii*, ve 1 *C. laurentii* türünde slime faktör varlığı tespit etmişlerdir [Türkyılmaz ve ark., 2010]. Bizim çalışmamızda izole edilen toplam 37 *Candida* türünde ortalama olarak 3 *C.kefyr*, 2 *C.guilliermondii*, 2 *C.rugosa*, 3 *Cr.neoformans*, 5 *Sac. Cerevisiae* türünde slime faktör varlığı tespit edilmiştir.

Dolapçı ve ark., klinik örneklerden izole ettikleri toplam 350 *Candida* izolatında slime faktör oluşumunu araştırmış ve 53 izolatta slime faktör varlığı tespit etmişlerdir [Dolapçı, 2002]. Bizim araştırmamızda, izole edilen toplam 37 *Candida* izolatının ortalama 14'ünde slime faktör varlığı tespit edilmiştir.

Yakupogulları ve ark., yaptıkları çalışmada, klinik örneklerden izole ettikleri 72 *C.albicans*, 9 *C.tropicalis*, 7 *C.kefyr*, 6 *C.krusei*, 2 *C.parapsilopsis*, 2 *C.pseudotropicalis* ve 2 *C.dublinsiensis* izolatında slime faktör varlığını araştırmıştır. Slime faktör varlığı tespit edilen 12 izolatın 6'sını *C.albicans*, 2'sini *C.tropicalis*, 2'sini *C.kefyr*, 1'ini *C.krusei* ve 1'ini *C.dublinsiensis* olarak tespit etmişlerdir [Yakupogulları, 2004]. Bizim çalışmamızda izole edilen toplam 37 *Candida* türünde ortalama olarak 3 *C.kefyr* türünde slime faktör varlığı tespit edilmiştir.

Karagöz ve ark 83 maya izolatının slime faktör özelliğini araştırmışlar ve *C. albicans* için % 83.6, *Trichosporon* için % 100, *C tropicalis* için % 90, *C.kefyr* için % 83.3, *C. glabrata* için % 100 slime pozitifliği tespit etmişlerdir [Karagöz ve ark., 1999].

Literatürlerde slime üretimi ile ilgili çalışmalar az sayıdadır [Branchini, 1994].

Gıda maddelerinin birçoğu önemli miktarlarda lipit içermektedir. Gıdalarda bulunan özellikle düşük molekül ağırlığına sahip serbest yağ asitleri lipit hidrolizinin en önemli nedenlerinden birisidir. Lipit oksidasyonu sonucu meydana gelen kısa zincirli yağ asitleri gıdaların kendine has kokusunu kaybetmesine neden olmaktadır. Lipit parçalanması genellikle mikrobiyel olmayan nedenlerden kaynaklanmakla birlikte, bakterilerin birçoğu, mayalar ve bazı küfler sahip oldukları lipaz ve fosfolipaz gibi enzimlerle gıdalarda lipolitik parçalanmaya neden olabilmektedir. Lipolitik aktivite gösteren bakteri türleri *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* ve *Staphylococcus*, küf türleri *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* ve *Penicillium* ve maya türleri ise *Candida*, *Rhodotorula* ve *Hansenula* cinsleri içinde yer almaktadır.

Maya izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesinde, mikrobiyolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılabilir. Bununla birlikte radyometrik ve kolorimetrik yöntemler de kullanılabilir. Biyokimyasal yöntemlerin zaman alıcı olması ve stabil olmayan sonuçlar verebilmesi nedeniyle, güvenilir sonuçlar veren ve kolay bir yöntem olan Price ve arkadaşları tarafından modifiye edilen ‘plak yöntemi’ önerilmiştir [Price, 2003]

Literatürlerde fosfolipaz aktivitesi en çok *C.albicans* kökenlerinde çalışılmış ve fosfolipaz üretiminin virülansta önemli olabileceği gösterilmiştir [Yücel, 2001]. Enfeksiyon sırasında *C.albicans* ‘ın fosfolipaz B salgıladığı, henüz mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmasına karşın fosfolipaz üretiminin konak hücrelerinin tahrip ederek lizise yol açtığı gösterilmiştir.

Ghannoum ve ark. yaptıkları bir çalışmada, hem yumurta sarılı besiyeri hem de kolorimetrik yöntemler kullanılarak albicans dışı *Candida* türlerinin de hücre dışı fosfolipaz ürettiğini göstermişlerdir [Ghannoum, 2000].

Bu çalışmada izole edilen maya türlerinde fosfolipaz enzimi varlığı yumurta sarılı agar yöntemiyle çalışılmıştır. İzole edilen toplam 73 maya ve maya benzerlerinin 20’sinde

fosfolipaz enzimi tespit edilmiştir. Fosfolipaz aktivitesi gösteren 20 mikroorganizmanın; 4'ü *Candida*, 3'ü *Trichosporon*, 5'i *Sachharomyces*, 5'i *Cryptococcus* ve 3'ü *Rhodotorula*'dır. Fosfolipaz varlığı tespit edilen 4 *Candida* izolatının, 4'ü de *C.kefyr*; 3 *Trichosporon* izolatının, 2'si *Tri.beigelii*, 1'i *Tri.capitatum* 5 *Cryptococcus* izolatının 4'ü de *Cr.neoformans*, 1'i *Cr. albidus*, 5 *Sachharomyces* izolatının da 5'i de *Sac.cerevisiae*, 3 *Rhodotorula* izolatının 3'ü de *Rho.rubra* olarak tespit edilmiştir

C.neoformans'ın yumurta sarılı agarda üretildiğinde fosfolipaz, lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz- transaçilaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiş; Vidotto 'nun yaptığı çalışmaya alınan 50 kökenin 49'unun fosfolipaz pozitif olduğu bildirilmiştir [Vidotto, 2003] Bizim çalışmamızda izole edilen *Cr. neoformans*'ın %50'sinde fosfolipaz varlığı tespit edilmiştir.

Vinitha 140 kan örneklerinden *C. albicans* (37), *C. glabrata* (7), *C. guilliermondii* (5), *C. kefyr* (3), *C. krusei* (45), *C. parapsilosis* (5) ve *C. tropicalis* (12) izole etmiş ve bu türlerin fosfolipaz aktivitesini yumurta sarılı agar yöntemi ile araştırmıştır. Bu mikroorganizmalardan 51 (44.73%)'inde fosfolipaz varlığı tespit etmiştir ve *C.albicans* dışı mayalarda fosfolipaz aktivitesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [Vinitha, 2006]. Öksüz ve ark.larının yaptıkları çalışmada sağlıklı insanlardan izole ettikleri *Candida* türlerinde yumurta sarılı agar yöntemi ile fosfolipaz aktivitesini araştırmışlar ve 43 *C.albicans*, 1 *C.kefyr*, 1 *C.famata*, 1 *C.parapsilosis*'de fosfolipaz tespit etmişlerdir [Öksüz, 2006]. Bizim çalışmamızda izole edilen 37 *Candida* izolatından 4'ü *C.kefyr* izolatında fosfolipaz varlığı tespit edilmiştir.

Mayser ve ark.larının yaptığı çalışmada *Rh.rubra* ve *C.albicans*'da fosfolipaz aktivitesi çalışılmış ve *Rh.rubra*'nın daha yüksek fosfolipaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir [Mayser ve ark., 1996]. Bizim çalışmamızda izole edilen 3 *Rh.rubra*'nın 3'ü(%100) de fosfolipaz aktivitesi göstermiştir.

Bütün gıda işletmelerinde olduğu gibi süt işletmelerinde de alınan hijyen önlemleri ekonomik yönden faydalı olmaktadır. Ancak, bu fayda işletme sahibinin kasasına

kazanç olarak girmemesi nedeniyle fark edilmemekte, bu nedenle de çoğunlukla benimsenmemekte veya konuya yeterli ilgi gösterilmemektedir [Şahan ve ark. 2002]. Sonuçta sağlıklı süt ve süt ürünlerinin üretilebilmesi için hammaddeden başlayarak bütün üretim aşamalarında gerekli önlemler alınmalı, mikroorganizma kontaminasyonların önüne geçilmelidir. Süte ve işletmeye giren bu mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm, fosfolipaz gibi virülans faktörlerin işletmeye ve insan sağlığına olan etkilerinin en aza indirmek için gerekli sanitasyon işlemlerinin uygulanması gerekliliğinin önemi vurgulanmalıdır.

KAYNAKLAR

Alişarlı, M., Solmaz, H., Akkaya, L., ‘‘Süt ineklerinde meme başı derilerinin bazı mikroorganizmalar ve çiğ sütlerinde mikrobiyolojik kalite yönünden incelenmesi’’, **YTÜ Vet. Fak. Dergisi**, 14 (1): 35-39 (2003).

Alişarlı, M., Solmaz, H., Akkaya, L., 2003, ‘‘Süt ineklerinde meme başı derilerinin bazı mikroorganizmalar ve çiğ sütlerinde mikrobiyolojik kalite yönünden incelenmesi’’ **YTÜ Vet. Fak. Dergisi**, 14 (1): 35-39 (2003).

Anonymous, ‘‘Türk Gıda Kodeksi, Fermente Sütler Tebliği, Tebliğ No: 2001 /21. TC **Resmi Gazete**. Sayı: 24512, (2001).

Anonymous, Türk Gıda Kodeksi, Fermente Sütler Tebliği, Tebliğ No: 2001 / 21. **TC Resmi Gazete**, Sayı: 24512 (2001).

Arvanitoyannis, I.S., Mauropoulos, A.A.,’’ Implementation of hazart analysis critical control point (HACCP) system to Kasseri/ Kafalotyri and Anevato Cheese production lines food control, 11:31-40 (2000).

Ayar, A., ‘‘Süt üretimi,tüketimi, sektörün sorunları ve çözüm önerileri’’, **Konya Ticaret Borsası Dergisi**, (11):52-55 (2002).

Barnett, JA ‘‘Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research’’ **Microbiology**, 149: 557-567 (2003).

Bilgehan, H., ‘‘Klinik Mikrobiyolojik Tanı’’, **Fakülteler Kitabevi**, 52-180 (2002).

Boothe,D.D.H.; Arnold,J.W.; Chew,V, ‘‘Utilization of substrates by bacterial communities as they develop on stored chicken meat samples’’, **Poultry Sci**, 78:1801-1809 (1999).

Bryan, F.L., ‘‘Risks associated with vehicles of fodborne pathogenes and Toxins’’ **J. Food Prot**, 51, 498 (1988).

Carrasco M. S. , Moragues L. G. , Vignatti C. I. , Scarinci H. E., Simonetta A. C., ‘‘ Characterisation and technological aspects of yeasts isolated from raw milk and different types of cheeses produced in Argentina.’’ , **Australian Journal of Dairy Technology**, 61 (1) 21–25 (2006).

Cécile Callon, Céline Delbès, Frédérique Duthoit, Marie-Christine Montel, ‘‘ Application of SSCP–PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses’’, **Systematic and Applied Microbiology**, 29 (2):172-180 (2006).

Chechowski,M.H., ‘‘Bacterial attachment to Buna-N gaskets in milk processing equipment’’, **J.Dairy Technol.**, 45:113-114 (1990).

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. "Adherence of slime producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surface", *Infect Immun.*, 2; 37: 318-26 (1982).

Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi G., "An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk", *International Dairy Journal.*, 12: (5), 407-411 (2002).

C. P Girish Kumar¹., Thangam Menon¹., "Biofilm Production by Clinical Isolates of Candida Species", *Medical Mycology Journal*, 44: 99–101 (2006).

Çiftçi, İ., Çetinkaya, Z., Aktepe, O.C., Arslan, F., Altındış, M., "Klinik Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları" *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35: 98 – 102 (2005).

Deak, T. ve Beuchat, L.L., "Handbook of Food Spoilage Yeasts", *CRC Press*, Florida, 210-315 (1996).

Donlan,R.M., "Biofilms and device associated infections", *Emerg Infect Dis.*, 7:277-281(2001).

Donlan, R.M. "Biofilms: Microbial Fife on Surfaces", *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): (2002).

Donlan, R.M., Casterton, J.W., "Biofilms: Survival Mechanisms Of ClinicallyRevelant Microorganisms", *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2): 167 – 193 (2002).

Douglas JL., "The surface layers of Candida albicans and their relevance to pathogenicity. In:Surface Structures of Microorganisms and Their Interactions with the Mammalian Host. (Eds) Schrinner E, Richmond MH, Seibert G, Schwarz U. Weinheim, *VCH Verlagsgelleschaft mbH*, 155-163 (1988).

Douglas,L.J., "Candida biofilms and their role in infection.", *Trends in Microbiol*, 11:30-36 (2003).

Edstrom A., "Biofilm", *Industry Press* 49-85 (2003).

Ghannoum MA, Abu Elteen KH., "Pathogenicity determinants of Candida", *Mycoses*, 33: 265-282 (1990).

Gokahmetoglu S, Nedret Koc A, Gunes T, Cetin N., "Case reports. Trichosporon mucoides infection in three premature newborns", *Mycoses*, 45:123-5 (2002).

Gulenc S., Karadenizli A., Kolaylı F., Bingol R.,” Çeşitli Klinik Örneklerden izole Edilen Maya Türlerinde Slime Faktörü ve Proteinaz Aktivitelerinin Araştırılması.” **Türk Mikrobiyol Cem Derg**, 32: 235-238 (1999).

Helke,D.M.; Somers,E.B.; Wong,A.L., “ Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and Buna-Nitril in the presence of milk and individual milk components”, **J.Food. Prot.** 56:479-484 (1992).

Hirakata Y, Katoh T, Ishii Y, Kitamura S, Sugiyama Y.,” Trichosporon asahii-induced asthma in a family with Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis”, **Ann Allergy Asthma Immunol**, 88: 335-338 (2002).

Hussam,M.; Wilcox,M.H.; White,P.J., “The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence.” **FEMS Microbiol**, 10:191-207 (1993).

Jenkinsonh.F.; Lapin-Scott,H.M., “ Biofilms adhere to stay”, **Trends Microbiol.**, 9:9-10 (2000).

Jessen B, Lammert L.” Biofilm and disinfection in meat processing plants. ‘**Int Biodeterioration & Biodegradation**, 51: 265–269 (2003).

Kantarcıoğlu AS, “Yücel A. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*”, **Cerrahpaşa J Med** ; 34: 42-50 (2003).

Karakaya, M., Sarıçoban, C., “Gıda endüstrisinde HACCP uygulamaları” **Konya Ticaret Borsası Dergisi**, 21(3): 79 – 86 (2002).

Koluman, A., “Biyofilmler ve Gıda Hijyeni Yönünden Önemi” Ankara Üniversitesi **Veterinerlik Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü**.

Kreger-van Rij, N. J. W., ” Classification of yeasts” **Academic Press**: London; 5-61 (1987).

Kurtzman, C.P. ve Fell, J.W.,” The Yeast, A Taxonomic Study”.Third impression, **Elsevier Science B.V**, Hollanda 1055 (2000).

Leriche,V.; Sibille,P.; Carpentier,B..” Use of ELLSA to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms.”, **Appl.Environ.Microbiol**, 66:1851-6 (2000).

Luis R. Martinez and Arturo Casade, “ Light Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV and Carbon Source and Reduces Fungal Formation Depends on Surface Support C” **Appl. Environ. Microbiol.** 73(14):4592 (2007).

Mattila-Sandholm T, Wirtanen G.” Biofilm formation in the industry: A Review.” **Food Rev Int**, 8 (4): 573-603 (1994).

Metin, M.,’’ Süt Teknolojisi 1.Bölüm:Sütün Bileşimi ve İşlenmesi’’, E.Ü.Müh. Fak Yay. No:33, s: 633. **E.Ü. Rektörlüğü Basımevi**, Bornova (1996).

Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E, Prillinger H.,’’ Trichosporon mycotoxinivorans sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins’’, **Syst Appl Microbiol**, 27: 661-671 (2004).

Moretti A, Pasquali P, Mencaroni G, Boncio L, Piergili Fioretti D., ‘’ Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria)’’, **Zentralbl Veterinarmed B**, 45(3):129-32 (1998).

Ölmez Z.,’’Süt sanayinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun önlenmesi’’ **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, 1-12 (2009).

Özcan, S.K., ‘’Tıbbi Gereçlerle İlişkili Candida Biyofilm ve Enfeksiyonlar’’, **Türkiye Klinikleri Journal of Medicine Science**, 27: 589 – 600 (2007).

Öztürk, B.Ş., Sakarya, S., Öncü, S., Ertuğrul, B.M., ‘’Biyofilmler ve Yabancı Cisim Enfeksiyonları’’, **Klinik Dergisi**, 21(3): 79 – 86 (2008).

Papademas, P. ve Binthis, ‘’Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: A review’’, **International Journal of Dairy Technology**, 63: 1-15 (2010).

Payne, M., Bruhn, C. M., Reed, B., Searce, A., O'Donnell,J., ‘’On-farm quality assurance programs:a surveyof producers and industry leader opinions’’, **Journal of Dairy Science**, 82: 2224-2230 (1999).

Perunova NB,Ivanova EV.,’’ Influence of bifidobacteria on antilysozyme activity of microorganisms and their ability to formbiofilms’’**Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.**, (4):46-9 (2009).

Petran, R.; Zottola, E.A., ‘’Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated milk cooling systems’’, **J.Food Protect**, 51:172-175 (1988).

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez Ribot J, ‘’ Our current understanding of fungal biofilms’’ **Crit Rev Microbiol.**, 35(4):340-55 (2009).

Rastogi VL, Nirwan PS.,’’ Invasive trichosporonosis due to Trichosporon asahii in a non-immunocompromised host: A rare case report’’, **Indian J Med Microbiol**, 25: 59-61(2007).

Robertson EJ, Casadevall A.,’’ Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation’’**Appl Environ Microbiol.**, 75(8):2528-33 (2009).

Rowe, M. and Gilmour, A., "The present and future importance of psychrotrophic bacteria", *Dairy industries international*, 50:14-29 (1985)

Sakarya, S., "Biyofilm Yapısı ve İnfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü", *Klimik Dergisi*, 18 (1):3-8 (2005).

Samaranayake LP, Hughes A, MacFarlane TW., "The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose", *J Med Microbiol*, 17: 13-22 (1984).

Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. ve King, A.D., "Modern Methods in Food Mycology", *Elsevier*, Amsterdam (2000).

Santos, R., Marin, J. M., "Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil", *Mycopathologia*, 159 (2): 251-265 (2005).

Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T., "Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification", *J Clin Microbiol*, 37: 1985-1993 (1999).

Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A., "Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis", *J Clin Microbiol*, 42: 5467-5471 (2004).

Sutherland, I.W., "Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework.", *Microbiology*, 147:3-9 (2001).

Şahan, N., Kaçar, A., "Farklı asitlikteki yoğurtlardan torba yoğurdu üretimi sırasında seruma geçen besin öğeleri", *Türkiye 7. Gıda Kongresi*, 17-21 (2002).

T.H Gadaga, A.N Mutukumira, J.A Narvhus., "Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk", *International Dairy Journal*, 10(7): 459-466 (2000).

Todd B. Reynolds, and Gerald R. Fink "Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation", *Science*, 291:878-881 (2001).

Topçu S. Ö., "Ankara sokak sütü ve peynir örneklerinden maya izolasyonu, sütlerden aflatoxin M1 tayini" *Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*, (2006).

Ünal D., "Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* ve *Candida* cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması", *Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*, (2011).

Vinitha M., Mamatha B., "Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase

Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India'', *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1): 4–8 (2011).

Yeniayvaz B., Oysun, G., '' Yoğurt üretiminde HACCP kapsamında kritik kontrol noktalarının belirlenmesi'', *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, Bildiri No: P46. İzmir (2003).

Yıldırım İ.,''Çiğ sütlerden izole edilen maya ve maya benzeri mikroorganizmaların dağılımları ve bu mikroorganizmaların proteinaz enzim aktiviteleri'', *Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 30-65 (1997).

Yıldız, H. İ., '' Yoğun Bakım Ünitesi'nden Gelen Hasta Örneklerinden İzole Edilen Kandida Türleri ve Antifungal Duyarlılıkları'', Uzmanlık Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.*, Van, 8-41 (2008).

Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N.,'' Detection of slime production among isolates of Candida albicans.'', *İnfeksiyon Derg.*, 10: 267-9(1996).

Zottola, E.A., ''Reflections on Salmonella and other "wee beasts" in foods'', *Food Techn.*, 55(9):60-67 (2001).

Wang I, Casadeval A. ''Susceptibility of melanized and nonmelanized Cryptococcus neoformans to nitrogen- and oxygen-derived oxidants.'', *Infect Immun*; 62: 3004-3007 (1994).

Watnick,P; Kolter,R., ''Biofilm city of microbes'', *J.Bacteriol*, 182:2675-2679 (2000).

Watson KC, Kallichurum S., ''Brain abscess due to Trichosporon cutaneum'', *J Med Microbiol*; 3: 191-193(1970).

Wong,A.L.; Rabotsk ,E.,'' Interaction of chemical, thermal and physical actions on the removal of bacteria from milk contact surfaces'', *The American Society Of Agricultural Engineers*, 11: 28-33 (1993).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı,adı :Aytop Ünvan, Pınar

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri :26.06.1985/Ankara

Medeni hali :Evli

Telefon :0554 958 75 88

e-mail :pinaraytop@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Cumhuriyet Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
10/2011-	İnterlab Lab. Ürünleri San. Tic. A.Ş.	Satış Temsilcisi
04/2010-08/2011	Roamtech Sağlık ve Ziraat Ürünler San.Tic. Ltd. Şti.	Teknik Birim Sorumlusu

Yabancı dil

İngilizce

Hobiler

Sinema, masa tenisi oynamak, yemek yapmak.