

TUZCUL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN
FUNGUSLAR ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mine AYDIN

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Doç. Dr. S. Elif KORCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2009

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUZCUL ORTAMLARDAN İZOLE EDİLEN FUNGUSLAR
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Mine AYDIN

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Doç. Dr. S. Elif KORCAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2009

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Kıymet GÜVEN ve Doç. Dr. S. Elif KORCAN danışmanlığında,
Mine AYDIN tarafından hazırlanan
“Tuzcul Ortamlardan İzole Edilen Funguslar Üzerinde Araştırmalar”
başlıklı bu çalışma lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri
uyarınca

.29../.08../2023. tarihinde

aşağıdaki jüri tarafından

Biyoloji Anabilim Dalında

Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı, SOYADI

İmza

Başkan Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Üye Prof. Dr. Muhsin KONUK

Üye Doç. Dr. S. Elif KORCAN

Üye Yard. Doç. Dr. M. Burçin MUTLU

Üye Yard. Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Kurulu' nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Rıdvan ÜNAL
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Ağır Metaller.....	3
2.1.1 Ağır Metaller ve Çevre Kirliliğindeki Önemi.....	3
2.1.2 Ağır Metallerin Canlı Organizmalara Etkileri.....	5
2.1.3 Mikroorganizmaların Gösterdikleri Ağır Metal Rezistans ve Tolerans Mekanizmaları.....	7
2.2 Adsorpsiyon, Özellikleri, Sınıflandırılması ve Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler.....	8
2.2.1 Ağır Metal Biyoremediasyonunda Mikroorganizmaların Önemi ve Biyosorpsiyon Mekanizması.....	10
2.2.2 Mikroorganizmalarla Yapılan Bazı Ağır Metal Çalışmaları.....	14
2.3 Ağır Metal Biyosorpsiyon Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.....	19
2.3.1 İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES).....	19
2.3.2 Fourier Transform İnfrared Spektrometre (FT-IR).....	20
2.4 Tuz ve Önemi.....	21
2.4.1 Tuzlu Ortamlar (Habitatlar).....	21
2.4.2 Araştırma Bölgelerinin Genel Özellikleri.....	24
2.4.2.1 İzmir Çamaltı Tuzlası.....	24
2.4.2.2 Iğdır / Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı.....	26
2.5 Ekstremofilik Mikroorganizmalar.....	28
2.6 Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemi.....	31

2.7 Fungusların İdentifikasyonu	32
2.7.1 Geleneksel İdentifikasyon.....	32
2.7.2 Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi.....	33
2.7.3 Moleküler Yöntemle İdentifikasyon.....	34
2.7.3.1 Funguslarda rDNA Bölgesi	35
2.7.3.2 ITS (Transkripsiyonu Yapılmayan Bölgeler) Bölgesi	36
2.7.3.3 β -tubulin ve Kalmodulin Genleri.....	37
3. MATERYAL ve METOD	39
3.1 Materyal.....	39
3.1.1 Geliştirme İçin Kullanılan Besiyerleri.....	39
3.1.1.1 Medyum D	39
3.1.1.2 Malt Ekstrakt Agar (MEA).....	39
3.1.1.3 Rose Bengal Kloramfenikol Agar (RBCA).....	39
3.1.1.4 Czapek Dox Agar (CZ)	40
3.1.1.5 YMS Besiyeri	40
3.1.2 Yağ Asidi Analizi İçin Kullanılan Besiyerleri	40
3.1.2.1 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	40
3.1.2.2 Sabouraud Dextrose Broth (SDB)	41
3.1.3 Geleneksel Yöntemle İdentifikasyonda Kullanılan Besiyerleri.....	41
3.1.3.1 Czapek Konsantresi.....	41
3.1.3.2 Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37)	41
3.1.3.3 Malt Ekstrakt Agar (MEA).....	42
3.1.3.4 %25 Gliserol Nitrat Agar (G25N).....	42
3.1.3.5 Czapek Yeast Agar (%20 Sucrose CY20S).....	42
3.1.3.6 Czapek Dox Agar (CZ)	43
3.1.4 Yağ Asidi Analizi Çözeltileri.....	43
3.1.4.1 Reagent I (Saponifikasyon ayıracı).....	43
3.1.4.2 Reagent II (Metilasyon ayıracı)	43
3.1.4.3 Reagent III (Ekstraksiyon ayıracı)	43
3.1.4.4 Reagent IV (Yıkama)	44
3.1.5 DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	44

3.1.5.1 Lysis-Buffer Hazırlanışı	44
3.1.5.2 T ₁₀ E ₁ (TE için) Hazırlanışı	44
3.1.5.3 0.3 M'lık Sodyum Asetat (Na-asetat) Hazırlanışı.....	44
3.1.5.4 3 M'lık Sodyum Asetat(Na-asetat) Hazırlanışı	45
3.1.6 Moleküler Yöntemle İdentifikasyonda Kullanılan Çözeltiler.....	45
3.1.6.1 3 M'lık Sodyum Asetat (Na-asetat) Hazırlanışı	45
3.1.6.2 100 mM'lık Disodyum EDTA(Na ₂ -EDTA)	45
3.1.6.3 Durma Solüsyonu.....	45
3.1.6.4 % 85'lik Etanol Hazırlanışı	46
3.1.7 Elektroforez Yürütme Tamponu (TAE 50X).....	46
3.1.8 Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.2 Metod.....	48
3.2.1 Fungus İzolasyonu	48
3.2.1.1 Fungusların Tek Spor İzolasyonu	49
3.2.2 İdentifikasyon.....	50
3.2.2.1 Geleneksel Yöntemle İdentifikasyon	50
3.2.2.2 Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi.....	51
3.2.2.3 Moleküler Yöntemle İdentifikasyon.....	52
3.2.3 Ağır Metal Çalışması.....	57
3.2.3.1 Ağır Metal Toleransının Belirlenmesi	57
3.2.3.2 Ağır Metal Biyosorpsiyonu	57
3.2.3.3 Ağır Metal Biyosorpsiyon Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	58
3.2.3.4 Verilerin Değerlendirilmesi.....	59
4. BULGULAR.....	60
4.1 İzolatlar	60
4.2 İdentifikasyon	60
4.2.1 Geleneksel İdentifikasyonla Tanımlanan Türler	60
4.2.1.1 <i>Penicillium citrinum</i> Thom, 1910	60
4.2.1.2 <i>Eurotium amstelodami</i> Mangin, 1909	63
4.2.1.3. <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare, 1912	65
4.2.1.4 <i>Aspergillus niger</i> Tiegh., 1867	68

4.2.1.5 <i>Sagenomella sp.</i> W. Gams, 1978	71
4.2.2 Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Sonuçları	74
4.2.3 Moleküler Yöntemle İdentifikasyon.....	75
4.2.3.1 DNA İzolasyonu	75
4.2.3.2 ITS Bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin Genlerinin PCR Sonuçları	76
4.2.4 ITS Bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin Genlerinin Dizi Analizleri	80
4.2.5 Ağır Metal Çalışması.....	83
4.2.5.1 Ağır Metal Toleransını Belirleme Sonuçları	83
4.2.5.2 Ağır Metal Biyosorpsiyon Çalışması	85
4.2.5.3 Biyosorpsiyon İzotermi	90
4.2.5.4 FT-IR Spektrometre Sonuçları	97
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	100
6. KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	xv

EKLER

EK 1: M1 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xvi
EK 2: M2 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xvii
EK 3: M3 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xviii
EK 4: M4 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xix
EK 5: M5 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xx
EK 6: M6 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xxi
EK 7: M7 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xxii
EK 8: M8 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	xxiii
EK 9: M1 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxiv
EK 10: M2 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxv
EK 11: M3 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxvi
EK 12: M4 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxvii
EK 13: M5 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxviii
EK 14: M6 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxix

EK 15: M7 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxx
EK 16: M8 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxi
EK 17: M2 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxii
EK 18: M3 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxiii
EK 19: M5 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxiv
EK 20: M8 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxv
EK 21: M1 İzolatının Kalmodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxvi
EK 22: M2 İzolatının Kalmodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxvii
EK 23: M3 İzolatının Kalmodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxviii
EK 24: M5 İzolatının Kalmodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	xxxix
EK 25: M8 İzolatının Kalmodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu.....	x1

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tuzcul Ortamlardan İzole Edilen Funguslar Üzerinde Araştırmalar

Mine AYDIN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Doç. Dr. S. Elif KORCAN

Çalışmamızda; İzmir Çamaltı Tuzlası ve Iğdır/Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı'ndan, 7 halotolerant ve 1 halofilik fungus izole edilmiştir. İzolatların geleneksel ve moleküler yöntemle identifikasyonları yapılmıştır. Moleküler yöntemle identifikasyonda DNA dizi analizi kullanılmıştır. DNA dizi analizinde; ITS bölgesi, β -tubulin ve Kalmodulin genleri dizilenmiştir. Ayrıca yağ asidi metil esterleri (FAME) analizi ile funguslardaki yağ asitleri belirlenmiştir. Pb, Ni, Cr, Zn, Cd, Cu ve Co metalleri için ağır metal toleransı belirlenmiştir. Ağır metal toleransı sonucu, metal biyosorpsiyonunda Pb için halotolerant *Penicillium chrysogenum*, Cd ve Zn için *Sagenomella* sp. izolatları ile çalışılmıştır. Biyosorpsiyon deneylerinde, 145, 644, 1388 mg/lt Pb (pH 5), 95, 226, 310, 486 mg/lt Cd (pH 5) and 61.9, 132.6 mg/lt Zn (pH 6) kullanılmıştır. Element analizleri için induktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES) kullanılmıştır. Maksimum biyosorpsiyon; *Penicillium chrysogenum* 145 mg/lt Pb için %95.24 (120. saat), *Sagenomella* sp. 95 mg/lt Cd için %78.63 (96. saat) ve 61,9 mg/lt Zn için %54.1 (96. saat) olarak belirlenmiştir. Biyosorpsiyon datalarının, Freundlich izotermine (R^2 :0,939, 0,969, 0,970) uygun olduğu gözlemlenmiştir. Hücre ile metal iyonlarının etkileşimi fourier transform infrared spektrometre (FT-IR) ile değerlendirilmiştir. FT-IR analizi; kurşun, kadmiyum ve çinko biyosorpsiyonunda hücredeki aktif fonksiyonel grubun amid ($1595-1700\text{ cm}^{-1}$) olduğunu göstermiştir.

2009, 133 sayfa

Anahtar kelimeler: Halofilik ve halotolerant funguslar, identifikasyon, FAME, ağır metal biyosorpsiyonu, ICP-OES, FT-IR.

ABSTRACT

MSc Thesis

Investigation of Fungi Isolated from Saltern Areas

Mine AYDIN

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisors: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Assoc. Prof. S. Elif KORCAN

In the present study, seven halotolerant and one halophilic fungi isolates gained from İzmir Çamaltı Saline and Iğdır/Tuzluca Rock Salt Bed. Isolates were identified by using conventional and molecular methods. DNA sequence analysis were used molecular identification methods. In DNA sequence analysis; ITS region, β -tubulin and Calmodulin gene were aligned. The fatty acids in fungi were determined by using fatty acid methyl ester (FAME) method. The heavy metal tolerance for Pb, Ni, Cr, Zn, Cd, Cu and Co were also determined. As a result of heavy metal tolerance; halotolerant *Penicillium chrysogenum* isolate for Pb and halophilic *Sagenomella* sp. isolate Cd and Zn was found active for using heavy metal biosorption. Biosorption experiments were carried out with concentrations of the heavy metal; 145, 644, 1388 mg/lt Pb (pH 5), 95, 226, 310, 486 mg/lt Cd (pH 5) and 61.9, 132.6 mg/lt Zn (pH 6). Elemental analyses were carried out by using coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). The maximum biosorption were determined at *Penicillium chrysogenum* %95.24 (120. hour) of 145 mg/lt Pb, *Sagenomella* sp. %78.63 (96. hour) of 95 mg/lt Cd and %54.1 (96. hour) of 61.9 mg/lt Zn. The biosorption data fungi were fitted Freundlich isotherm (R^2 :0.939, 0.969, 0.970). The possible cell-metal ions interactions was evaluated by fourier transform infrared spectrometer (FT-IR). FT-IR analysis showed that amide (1595-1700 cm^{-1}) was the active compound in the cells to biosorb lead, cadmium, zinc.

2009, 133 pages

Key words: Halophilic and halotolerant fungi, identification, FAME, heavy metal biosorption, ICP-OES, FT-IR.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam esnasında beni yönlendiren, bilgisini, yardımlarını ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danıőman hocalarım Prof. Dr. Kıymet GÜVEN ve Doç. Dr. S. Elif KORCAN' a, çalıőmalarımın her aőamasında deneyimlerinden faydalandığım Yrd. Doç. Dr. M. Burçin MUTLU ve Arő. Grv. Rasime DEMİREL'e, deneysel çalıőmalarımın analizleri sırasında yardımlarından dolayı Prof. Dr. Alaettin GÜVEN ve Yrd. Doç. Dr. Semra MALKOÇ' a, tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölüm Başkanına ve diğer hocalarıma, yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Muhsin KONUK ve Yrd. Doç. Dr. İ. Hakkı CİĞERCİ' ye teőekkürü bir borç bilirim.

Bu aőamaya gelirken her zaman yanımda yer alan, bana maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan değerli aileme, arkadaşlarım Ali DEMİR, Çağatay KARAGÖZ ve Armağan DEMİRCİ' ye tüm kalbimle teőekkürlerimi sunarım.

Mine AYDIN

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

%	Yüzde
‰	Binde
°	Derece
β	Beta
°C	Santigrad derece
'	Dakika
"	Saniye
g	Gram
g/cm ³	Gram/Santimetreküp
h	Saat
km	Kilometre
lt	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
m ²	Metrekare
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
N	Güney
E	Kuzey
pH	Asitlik Derecesi
S	Svedberg Ünitesi
R ²	Korelasyon Katsayısı

2. Kısaltmalar

AFLP	Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi
ALA	Aminolaevulinikasit
ATPase	Adenozintrifosfataz
BLASTN	Basic Local Aligment Search Tool
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FAME	Yağ Asidi Metil Esterleri
FT-IR	Fourier Transform İnfrared Spektrometre
GC	Gaz Kromotoğrafisi
ICP-OES	İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi
IGS	Genler Arası Bölge
ITS	Transkripsiyonu yapılmayan bölgeler
LSU	Büyük Alt Birim
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBG	Porfobilinojen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFLA	Fosfolipid Yağ Asitleri
RAPD	Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA
rcf	Relatif Santrifüj Kuvveti
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
rpm	Revolutions Per Minute
SSU	Küçük Alt Birim
UV	Ultra Viole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayılımları	5
Şekil 2.2 Vücut sıvısındaki konsantrasyona bağlı olarak ağır metallerin etkileri	6
Şekil 2.3 Ağır metallerin insan vücudunda etki mekanizması	7
Şekil 2.4 Çamaltı Tuzlası	24
Şekil 2.5 Funguslarda rDNA bölgesi	36
Şekil 3.1 İzmir Çamaltı Tuzlası	48
Şekil 3.2 Iğdır/ Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı.....	49
Şekil 4.1 İzolatların DNA izolasyonuna ait jel görüntüsü	76
Şekil 4.2 İzolatların ITS bölgesinin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü.....	77
Şekil 4.3 İzolatların ITS bölgesi amplifikasyon ürünlerinin jelden saflaştırmasına ait jel görüntüsü	77
Şekil 4.4 İzolatların β -tubulin geninin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü.....	78
Şekil 4.5 İzolatların β -tubulin geninin amplifikasyon ürünlerinin jelden saflaştırmasına ait jel görüntüsü	78
Şekil 4.6 İzolatların Kalmodulin geninin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü ...	79
Şekil 4.7 İzolatların Kalmodulin geninin amplifikasyon ürünlerinin jelden saflaştırmasına ait jel görüntüsü	79
Şekil 4.8 <i>Sagenomella</i> sp. izolatının metal toleransının belirlenmesi	84
Şekil 4.9 <i>Penicillium chrysogenum</i> izolatlarının metal toleransının belirlenmesi	84
Şekil 4.10 <i>Penicillium chrysogenum</i> izolatının Pb' nin farklı konsantrasyonundaki yüzde (%) biyosorpsiyon grafiği	86
Şekil 4.11 <i>Sagenomella</i> sp.' nin Cd' un farklı konsantrasyonlarındaki yüzde (%) biyosorpsiyon grafiği	87
Şekil 4.12 <i>Sagenomella</i> sp.' nin Zn' nun farklı konsantrasyonlarındaki yüzde (%) biyosorpsiyon grafiği	90
Şekil 4.13 Kurşunun (145 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	91
Şekil 4.14 Kurşunun (644 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	91

Şekil 4.15 Kurşunun (644 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	92
Şekil 4.16 Kadmiyumun (95 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	93
Şekil 4.17 Kadmiyumun (226 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	93
Şekil 4.18 Kadmiyumun (310 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	94
Şekil 4.19 Kadmiyumun (486 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	94
Şekil 4.20 Çinkonun (61.9 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	95
Şekil 4.21 Çinkonun (132.6 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri	96
Şekil 4.22 <i>Penicillum chrysogenum</i> ' um Pb biyosorpsiyonu FT-IR spektrometresi.....	97
Şekil 4.23 <i>Sagenomella</i> sp.' nin Cd biyosorpsiyonu FT-IR spektrometresi	98
Şekil 4.24 <i>Sagenomella</i> sp.' nin Zn biyosorpsiyonu FT-IR spektrometresi	98

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1 Iğdır/ Tuzluca tuz mağaraları.....	28
Resim 4.1 <i>Penicillium citrinum</i> petri görüntüsü.....	62
Resim 4.2 <i>Penicillium citrinum</i> ' un mikroskopik görüntüsü	62
Resim 4.3 <i>Eurotium amstelodami</i> petri görüntüsü	64
Resim 4.4 <i>Eurotium amstelodami</i> ' nin mikroskopik görüntüsü.....	65
Resim 4.5 <i>Aspergillus parasiticus</i> petri görüntüsü.....	67
Resim 4.6 <i>Aspergillus parasiticus</i> ' un mikroskopik görüntüsü	68
Resim 4.7 <i>Aspergillus niger</i> petri görüntüsü.....	70
Resim 4.8 <i>Aspergillus niger</i> ' in mikroskopik görüntüsü	71
Resim 4.9 <i>Sagenomella sp.</i> ' nin NaCl içeren Malt Ekstrakt Agar' daki görüntüsü	73
Resim 4.10 <i>Sagenomella sp.</i> ' nin mikroskopik görüntüsü.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Temel endüstrilerden atılan metal türleri.....	4
Çizelge 2.2 Metal adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan funguslar	18
Çizelge 2.2 (Devamı) Metal adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan funguslar	19
Çizelge 3.1 Fungal izolasyon örneklerinin özellikleri	48
Çizelge 3.2 Kullanılan primerler ve dizileri.....	53
Çizelge 4.1 FAME analizi sonuçları.....	75
Çizelge 4.2 Geleneksel ve Moleküler Yöntemle İdentifikasyon Sonuçları	81
Çizelge 4.2 (Devamı) Geleneksel ve Moleküler Yöntemle İdentifikasyon Sonuçları....	82
Çizelge 4.3 Ağır metal toleransının belirlendiği değerler	83
Çizelge 4.4 Kurşun konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları.....	85
Çizelge 4.5 Kadmiyum konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları....	88
Çizelge 4.6 Çinko konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları.....	89
Çizelge 4.7 Kurşunun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri.....	90
Çizelge 4.8 Kadmiyumun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri	92
Çizelge 4.9 Çinkonun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri.....	95

1. GİRİŞ

Endüstriyel atık suların ve kirlenmiş çevresel su kaynaklarından ağır metallerin uzaklaştırılmasında çeşitli kimyasal ve fiziksel süreçler kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerin ekonomik olmaması ve elde edilen arıtım düzeyinin yetersiz olması nedeniyle biyoremediasyon çalışmalarında önemli bir potansiyele sahip mikroorganizmaların etkin bir şekilde kullanımının tercih edildiği görülmektedir (Matheickal and Yu 1997). Bu amaçla çeşitli bakterilerin, fungusların ve alglerin kullanıldığı bilinmektedir (Kapoor and Viraraghavan 1998).

Ağır metal gideriminde kullanılacak olan mikroorganizmanın iyi bir biyosorbent olmasının yanı sıra ekonomik olarak üretilebilmesi de önemlidir. Günümüzde metal içeren atık suların arıtılması, hem bu tip akımların çok çeşitli kaynaklarının olması, hem de deşarj edildikleri alıcı ortamlarda meydana getirdikleri kirlilik nedeniyle dikkatle değerlendirilmesi gereken bir konu olarak gündeme gelmektedir. Çünkü metal içeren bazı atık suların arıtılmasında çeşitli problemlerle karşılaşmaktadır. Söz konusu problemler özellikle kompleks olarak bağlı metal içeren atık suların arıtımında kendini göstermektedir. Bu tip atık sular, bünyelerinde organik kompleks yapıcılarının (organik ligandların) bulunduğu atık sular olarak tanımlanmakta ve kirlenme bazındaki kategorizasyonda metal son işlemleri endüstrisinin “*kompleks olarak bağlı metal içeren atıksular*” olarak isimlendirilen bir alt kategorisini oluşturmaktadır (USEPA 1990).

Halofilik mikroorganizmalar diğer ekstremofilik mikroorganizmalarla karşılaştıklarında basit besiyerlerinde kolay üretilebilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler. Ancak ekstremofilik mikroorganizmalarla ilgili alınan patent uygulamalarının sadece %20’si halofilik mikroorganizmalara aittir (Horiskoshi and Grant 1998). Bu uygulamalardan bakteriyorodopsin, halorodopsin, biyopolimerler bazılarıdır. Bunların dışında, fermente gıdaların ve gıda katkı maddelerinin hazırlanmasında, biyosülfektanlar petrol kontamineli toprak ve suların temizlenmesinde kullanılmaktadır (Margejin and Schinner 2001).

Halofilik prokaryotlar arasında bu güne kadar özellikle gram negatif bakteri ile çalışılmıştır (Ventosa et al.1998). Gram pozitifler bu alanda henüz yeni araştırılmaya

başlanmıştır. Halofil mikroorganizmalar arasında *Halobacillus halophilus* (Spring et al. 1996), *Marinococcus halophilus* (Marquez et al. 1992), *Bacillus halophilus* (Ventosa et al. 1998) en fazla bilinen organizmalardır.

Tuz, Türkiye’de başta Tuz Gölü’nden (Ankara/Ş.Koçhisar “Kaldırım ve Kayacık Tuzları”ve Konya/Cihanbeyli “Yavşan Tuzlası”) olmak üzere, deniz (Çamaltı tuzlası) ve kaya tuzlarından (Iğdır/Tuzluca) elde edilmektedir (Kılıç ve Uyanık 2001). Bu ortamların önemi göz önünde tutulduğunda Türkiye’deki tuzcul ortamların ağır metallere kirlendiğine dair yapılan çalışmalar gittikçe önem kazanmaktadır (Minareci vd. 2004). Ekstrem koşullardaki kirlilik bu bölgelerde yaşayan eşsiz mikrobiyal habitat üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Oysa ekstrem mikroorganizmalar özellikle biyoteknolojik çalışmalarda gittikçe önem kazanmakta olan yeni bir konudur. Bu nedenle bu tür ortamların korunması ve iyileştirme çalışmalarının yapılması gereklidir.

Tuzcul fungusları ağır metal gideriminde kullanılması ile ilgili Marbniang ve Nazareth (2007) çalışmalarında; tuzcul bölgelerde yetişen bitkilerden (Mangroves) ve tuzlalardan izole ettikleri halotolerant *Penicillium* türlerinde ağır metal dirençliliğini araştırmışlardır. Pb, Cu ve Cd metallerinin sulu çözeltilerinde farklı konsantrasyonlarını çalışmışlar, 7,5 mM Pb konsantrasyonuna izole ettikleri tüm *Penicillium* türlerinin dirençli olduğunu, Cu ve Cd’ un sülfat ve nitrat tuzlarına da fungal izolatların dirençli olduğunu göstermişlerdir. Pek çok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan funguslar ekonomik olarak üretilebilmeleri, kolay elde edilebilir olmaları, çevresel değişimlere karşı hassas olmamaları gibi nedenlerle ağır metal giderim amacıyla kullanılabilir olacak önemli bir kaynaktır. Ancak tuzcul fungusların ağır metal gideriminde etkin olarak kullanılabilmesi konusunda yapılmış herhangi bir çalışma yoktur.

Bu nedenle, çalışmamızda İzmir Çamaltı Tuzlası ile Iğdır/Tuzluca bölgelerinden fungus izolasyonu ve identifikasyonu yapıldıktan sonra izolatların ağır metal gideriminde etkin bir şekilde kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ağır Metaller

2.1.1 Ağır Metaller ve Çevre Kirliliğindeki Önemi

Metaller bazı özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Fizikokimyasal özelliklerine ve yer kabuğu katmanlarında yerleşmelerine göre; hafif metaller, zor eriyen metaller, nadir toprak metalleri, radyoaktif metaller ve ağır metaller olarak gruplandırılmaktadırlar (Paşayev 2005).

Ağır metaller, fiziksel özellik açısından yoğunluğu 7 g/cm^3 ten daha yüksek olan metallerdir. Bu gruba kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), krom (Cr), demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni), cıva (Hg) ve çinko (Zn) olmak üzere 60' tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlarla birlikte bulunurlar (Alloway and Ayres 1993). Her ne kadar metallerin yoğunluk değeri üzerinden hareketle ekolojik sistem üzerindeki etkileri tanımlanmaya çalışılıyorsa da gerçekte metallerin yoğunluk değerleri onların biyolojik etkilerini tanımlamaktan çok uzaktır.

Ağır metaller; su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı, dolayısı ile bileşimde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sulara taşınan ağır metaller aşırı derecede seyrelirler ve kısmen karbonat, sülfat, sülfür olarak katı bileşik oluşturarak su tabanına çöker ve bu bölgede zenginleşirler. Sediment tabakasının absorpsiyon kapasitesi sınırlı olduğundan suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselir. İnsanın neden olduğu etkilerden dolayıda çevreye ağır metal yayılımı söz konusudur. Sürekli ve kullanıma bağlı kirlenmenin yanı sıra kazalar sonucu da ağır metallerin çevreye yayılımı önemli miktarlara ulaşabilmektedir. Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton Cd, 18800 ton arsenik, 3600 ton cıva 332000 ton kurşun atmosfere atılmakta iken insan faaliyetleri sonucu deşarj edilen miktarlar dikkate alındığında ise selenyum (19

kat), kadmiyum (8 kat), cıva, kurşun, kalay (6 kat), arsenik, nikel ve krom (3 kat) daha fazladır (Rether 2002).

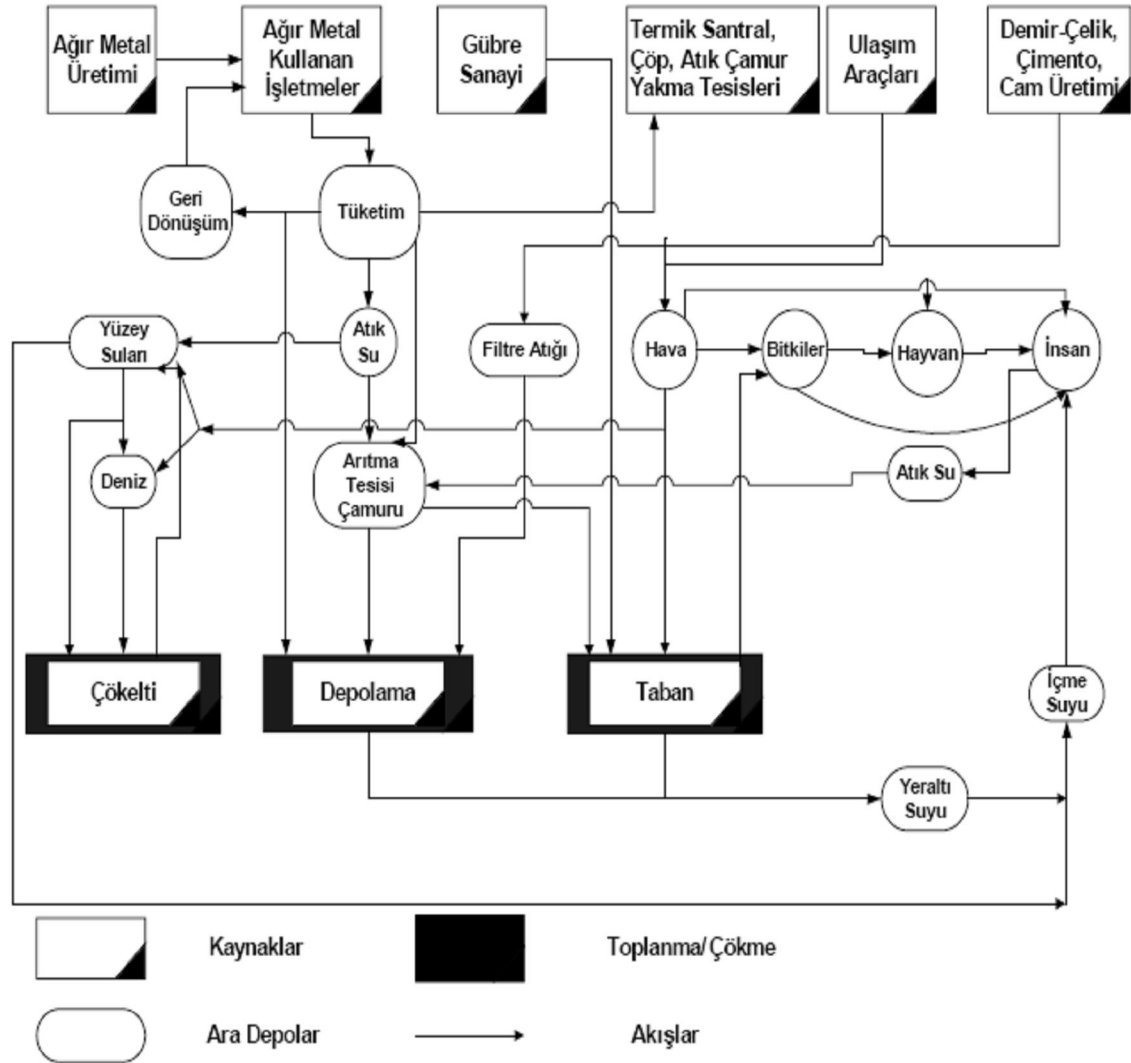
Çevre kirliliğinin artmasında en önemli etken, endüstri kuruluşlarının atık sularında ağır metal bulunmasından dolayı kaynaklanmaktadır. Endüstri kuruluşları; işlemleri gereği ağır metalleri kullanırlar ve atıklarında cıva, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonlarını bulundurmaktadırlar. Metal kirliliği içeren atık suları; metal endüstrileri (demir-çelik, bakır, çinko, krom vb), maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum eldesine yönelik süreçler sonucunda), kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik-elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrileri oluşturmaktadır (Çizelge 2.1) (Sağlam ve Cihangir 1995).

Çizelge 2.1 Temel endüstrilerden atılan metal türleri (1)

Endüstri	Cd	Cr	Cu	Hg	Pb	Ni	Sn	Zn
Kağıt Endüstrisi	-	+	+	+	+	+	-	-
Petrokimya	+	+	-	+	+	-	+	+
Klor-alkali Üretimi	+	+	-	+	+	-	+	+
Gübre Sanayi	+	+	+	+	+	+	-	+
Demir-Çelik San	+	+	+	+	+	+	+	+
Enerji Üretimi (Termik)	+	+	+	+	+	+	+	+

Bu metaller arıtılmadığı sürece kalıcı etkiler yaratmaktadırlar. Bunun sonucu olarak canlı sistemleri ve çevre sağlığı yönünden belirli bir sınırı geçince toksik etki göstermektedirler (Wong and Kwok 1992).

Havada bulunan ağır metaller, karaya buradan bitkilere ve besin zinciri yoluyla hayvanlara sonuçta insanlara ulaşırlar. Aynı zamanda hayvan ve insanlar tarafından havadan aerosol olarak veya toz halinde solunurlar. Ağır metaller endüstriyel atık suların içme sularına karışması yoluyla veya ağır metallerle kirlenmiş partiküllerin tozlaşması yoluyla da hayvan ve insanlar üzerinde etkili olurlar (Şekil 2.1).



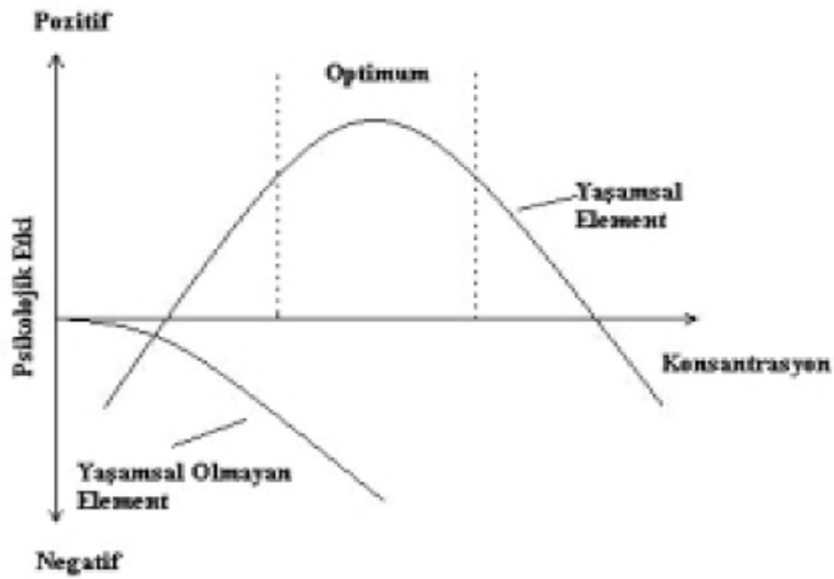
Şekil 2.1 Şematik olarak ağır metallerin doğaya yayılımları (Rether 2002)

2.1.2 Ağır Metallerin Canlı Organizmalara Etkileri

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananları; organizmalar bazı biyolojik reaksiyonlarında kullandıklarından dolayı, yapısında bu metallerin belirli bir konsantrasyonda tutmak için besinler yoluyla alırlar. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır (Bigersson 1988). Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller

çok düşük konsantrasyonda dahi sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan civadır (John 1996). Bir metalin yaşamsal olup olmadığı organizmaya göre de değişmektedir (şekil 2.2 ve 2.3).

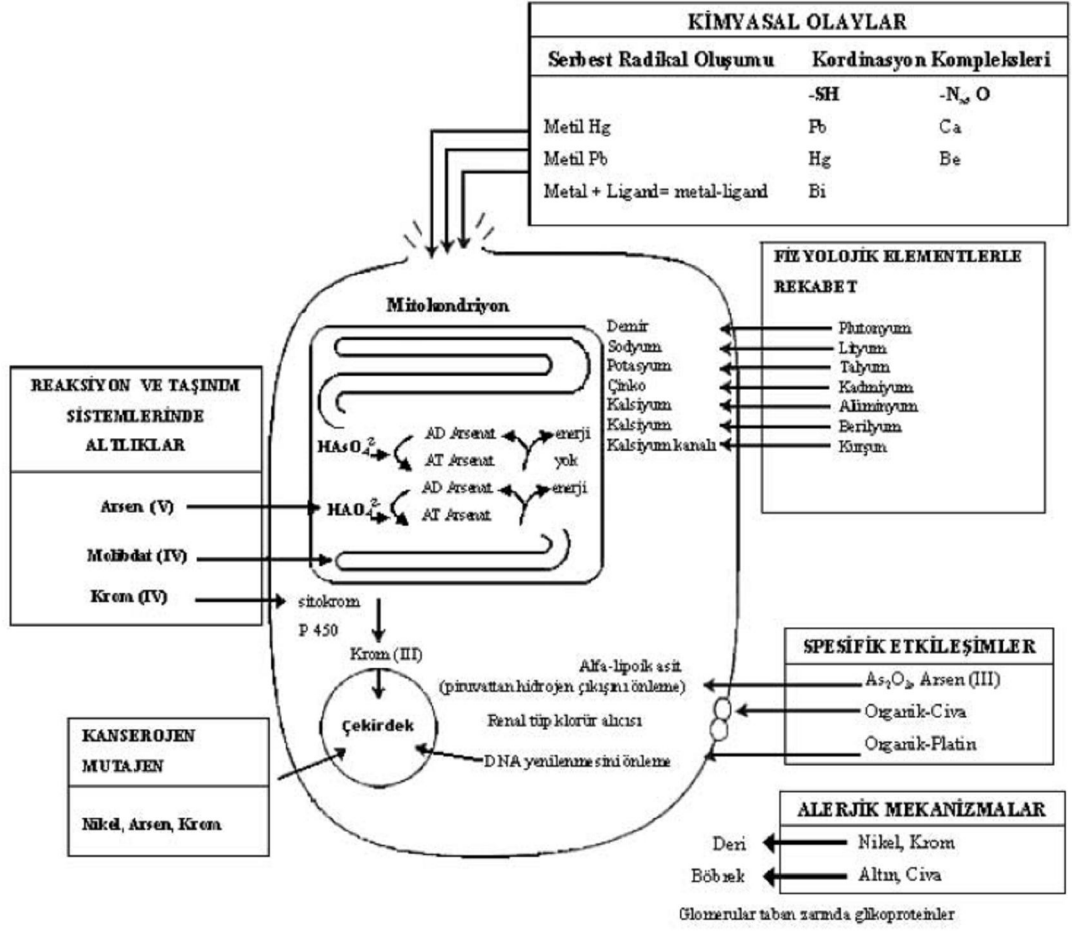
Ağır metaller canlı bünyelerde sadece konsantrasyonlarına bağlı olarak etki göstermezler, etki canlı türüne ve metal iyonunun çözünürlük değerine, kimyasal yapısına, redoks ve kompleks oluşturma yeteneğine, vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına ve lokal pH değerine de bağlıdırlar.



şekil 2.2 Vücut sıvısındaki konsantrasyona bağlı olarak ağır metallerin etkileri

Ağır metallerin insan metabolizmasında oluşturdukları etki ve etkin oldukları aşamaları ana sistemler açasından şöyle sınıflandırılabilirler (şekil 2.3) ;

- Kimyasal reaksiyonlara etki edenler,
- Fizyolojik ve Taşınım sistemlerine etki edenler,
- Kanserojen ve mutajen olarak yapı taşlarına etki edenler,
- Alerjen olarak etki edenler,
- Spesifik etki edenler, olarak sıralamak mümkündür.



Şekil 2.3 Ağır metallerin insan vücudunda etki mekanizması (PBG: Porfobilinojen; ATPase = Adenozintrifosfat; ALA = Aminolaevulinik asit)

2.1.3 Mikroorganizmaların Gösterdikleri Ağır Metal Rezistans ve Tolerans Mekanizmaları

Organizmalar bu direnç mekanizmalarını; biyokimyasal ve yapısal özellikler, fizyolojik veya genetik adaptasyonlar, çevresel modifikasyonlar ve morfolojik değişimler geçirerek geliştirmişlerdir.

Rezistans: Organizmanın metal ortamında hayatta kalmak için bu metal iyonlarına direkt cevap olarak geliştirdikleri mekanizmalar ile açıklanır. Örneğin; Metallothionin veya glutamil peptid sentezi gibi.

Tolerans: Organizmaların toksik metal ortamlarında hayatta kalma durumunu içsel özellikler veya çevresel modifikasyonlar ile sağlaması durumudur.

Mekanizmaları;

- Geçirgen olmayan pigmentli hücre çeperleri
- Ekstrasellüler polisakkaritlere bağlama
- Metabolitler şeklinde uzaklaştırma
- Hücre dışı prespitasyon
- Kompleks ve şelat oluşturma
- Kristalizasyon
- Transformasyon ve Hücre dışına sızdırma
- Hücre içi bölümlendirme
- Oksidasyon – Redüksiyon
- Metilasyon
- Biyosorpsiyon (Çeperde ve Hücre dışı Polisakkaritlerde) şeklinde olmaktadır.

2.2 Adsorpsiyon, Özellikleri, Sınıflandırılması ve Adsorpsiyonu Etkileyen Faktörler

Adsorpsiyon, akışkan fazda çözülmüş haldeki belirli bileşenlerin bir katı yüzeye adsorblanmasına dayanan ve faz yüzeyinde görülen yüzeye tutunma olayıdır. Katı örgüsü içinde bulunan iyonlar çekim kuvvetlerince dengelenmiştir. Ancak katı yüzeyindeki atomların dengelenmemiş kuvvetleri, çözültideki maddeleri katı yüzeyine çekerler ve yüzey kuvvetleri dengelenmiş olur. Bu şekilde çözültideki maddelerin katı yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir.

Adsorpsiyon günümüzde, birçok doğal fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemlerde önem taşımaktadır. Ayrıca bu prosesi, atık sularındaki gerek organik gerekse kimyasal kirleticilerin uygun bir katı yüzeye tutunarak giderilmesinde kullanılmaktadır. Adsorplayan ile adsorplanan kimyasal arasındaki çekim kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen başlıca üç tür adsorpsiyon işlemi vardır. Bunlar;

i. Fiziksel Adsorpsiyon: Fiziksel adsorpsiyonda zayıf Van der Waals kuvvetleri etkindir ve işlem tersinirdir. Adsorpsiyon sonucu yoğunlaşma enerjisinden biraz fazla ısı açığa çıkar. Katı yüzey ile adsorplanan madde molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri sonucu oluşan adsorpsiyon olayıdır.

ii. Kimyasal Adsorpsiyon: Adsorpsiyon tersinmezdir ve tek tabakalıdır. Adsorpsiyon sırasında açığa çıkan ısı, reaksiyon ısısından daha büyüktür. Adsorplanan madde ile katı yüzey arasındaki fonksiyonel grupların kimyasal etkileşimi ile oluşan adsorpsiyondur şeklidir.

iii. İyonik Adsorpsiyon: İyonik adsorpsiyonda, adsorplayan ile adsorplananın iyonik güçleri önem taşır. İyonlar eş yüklü ise daha küçük olan tercihli olarak yüzeye tutulur. Elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisi ile iyonlar yüzeydeki yüklü bölgelere tutunmaktadır. Çoğu adsorpsiyon olayında bu üçü birlikte veya ardı ardına görülür.

Adsorpsiyonu etkileyen faktörler;

i. pH: Hidrojen ve hidroksil iyonları kuvvetle adsorbe olduklarından, diğer iyonların adsorpsiyonu çözelti pH'ından etkilenir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonizasyon derecesi de adsorpsiyonu etkiler.

ii. Sıcaklık: Adsorpsiyon işlemi genellikle ısıveren bir tepkimedir. Bu nedenle azalan sıcaklık ile adsorpsiyon miktarı artar. Yani ısı ile adsorpsiyon arasında ters bir orantı vardır. Açığa çıkan ısının genellikle fiziksel adsorpsiyonda yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları mertebesinde, kimyasal adsorpsiyonda ise kimyasal reaksiyon ısısı mertebesinde olduğu bilinmektedir.

iii. Yüzey alanı: Adsorpsiyon bir yüzey işlemi olduğu için adsorpsiyon büyüklüğü spesifik yüzey alanı ile ilişkilidir. Adsorplayıcının partikül boyutunun küçük, yüzey alanının geniş ve gözenekli yapıda olması adsorpsiyonu artırır (Aksu 1988).

2.2.1 Ağır Metal Biyoremediasyonunda Mikroorganizmaların Önemi ve Biyosorpsiyon Mekanizması

Dünyada, endüstriyel gelişmeye bağlı olarak toksik ağır metallerle çevre kirlenmesi artmaktadır. Ağır metallerin eser miktarları enzimatik reaksiyonların kofaktörü olarak önemlidir. Ama bunların yüksek miktarları, canlı organizmalar için aşırı derecede toksik etki gösterir ve metabolik reaksiyonları yavaşlatabilir. Mikroorganizmaların kullanılarak ağır metallerin biyoremediasyonu (biyolojik iyileştirme); sadece bilimsel bir yenilik olması açısından değil, aynı zamanda son yıllarda endüstrideki potansiyel uygulanırlığı açısından da ilgi görmektedir. Konvansiyonel metotlarla endüstriyel atık sularından ağır metal giderimi (çökeltme ve çamur ayırma, kimyasal oksidasyon, iyon değişimi, ters ozmoz, elektro kimyasal uygulama ve buharlaşma vb.) genelde ekonomik değildir (Elmacı vd. 2005). Bu yüzden atık sularındaki ağır metal iyonlarının ekonomik olarak giderimi ve geri kazanımında mikroorganizmaların kullanılması mümkündür (Tsezos et al. 1988). Bu amaçla; çeşitli bakterilerin, mayaların, fungusların ve alglerin kullanıldığı bilinmektedir. Mikroorganizmalara örnek olarak; bakterilerden *Arthrobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas*; mayalardan *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Candida*; funguslardan *Neurospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Pleurotus*; alglerden *Chlorella*, *Microcystis*, *Scenedesmus*, *Anabeana*, *Ascophyllum* türleri verilebilir (Sağlam ve Cihangir 1995).

Ağır metal giderimi ve metal birikimi yetenekleriyle ilgili yapılan çalışmalarda en fazla verimli olan mikroorganizmaların maya ve funguslar olduğu bulunmuştur. Bunun nedenleri; fungal kitlelerin fermantasyon endüstrilerinden büyük miktarda elde edilebilmesi, genetik ve morfolojik manipulasyon çalışmalarının kolaylıkla yapılabilmesi ve toksik metallerinin yüksek derişimlerine karşı farklı dirençlilik yeteneklerinin olması gibi etkenlerdir. Bunun yanı sıra saprofit özellikteki mantarların metal çalışmalarında metal bağlama yeteneklerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu konu üzerinde yapılan son çalışmalar odun parçalayıcı özelliğine sahip Basidiomycetes sınıfı fungus türlerinin bu amaç için oldukça etkin olduğunu göstermektedir (Favero et al. 1991).

Yapılan çalışmalarda ilk olarak radyoaktif elementlerin sulu ortamda mikroorganizmalar tarafından doğrudan adsorplanabildiğine ve bu özelliğin mikroorganizmaların yaşam fonksiyonlarından bağımsız olduğu belirtilmiştir. Birçok çalışmada; ölü veya canlı hücrelerin metal alabilme kapasiteleri karşılaştırılmış ve çoğu kez ölü durumdaki mikroorganizmaların daha yüksek tutunma kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak hücre yüzeyinin yapısındaki değişiklikler gösterilmiştir. Bir çözülden mikrobiyal biyokütle ile metalin geri kazanımı biyosorpsiyon olarak adlandırılmaktadır (Tzesoz ve Volesky 1981).

Biyosorpsiyon yöntemi; ağır metal giderimi için uygun bir alternatiftir. Biyosorpsiyon biyolojik materyallerin, sulu çözeltilerdeki atık maddelerin hücre yüzeyi veya içinde akümüle edilmesidir (Keskinkan vd. 2004). Yapılan çalışmalarda; kullanılan mikroorganizmaların hücre tipi ve içerdiği temel bileşenlerinin adsorpsiyon mekanizmasını etkilediği belirtilmiştir. Mikroorganizmalar ağır metallerle; hücre membranından karşılıklı taşınım, hücre duvarlarında biyosorpsiyon, hücre dışı kapsüllerle tutulma, çökeltme, kompleks oluşumu ve oksidasyon-redüksiyon mekanizmalarında içerisinde bulunduğu bir dizi mekanizmayla reaksiyon verir (Dönmez ve Aksu 2001).

Isısal veya kimyasal yöntemlerle öldürülmüş mikroorganizmalarla yapılan, adsorpsiyon işlemi "biyosorpsiyon" olarak tanımlanmaktadır. Biyosorpsiyon aslında fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, koordinasyon, kompleksleşme, mikroçökeltme vb. gibi birçok pasif giderim proseslerini adlandırmakta kullanılan ortak bir terimdir. Öte yandan bazı öldürme tekniklerinin biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesini arttırdığı da kanıtlanmıştır (Keskinkan vd. 2004).

Mikroorganizmaların ağır metal adsorpsiyonun/biyosorpsiyon mekanizması incelendiğinde, kullanılan mikroorganizmanın hücre yapısına bağlı olarak değişik mekanizmaların etkili olduğu sonucu elde edilmiştir.

Temelde ağır metallerin mikroorganizmalar tarafından biyosorpsiyonu iki aşamada gerçekleşir. Birinci aşamada; mikroorganizma ile metal arasında çok kısa sürede

denge kurulduğu fiziksel adsorpsiyon (pasif adsorpsiyon) veya iyon değişimidir. Bu basamağa genellikle pasif giderim denir. Bu basamak çok hızlıdır ve mikroorganizma metal ile etkileştikten kısa bir süre sonra denge oluşur. Hızlı giderme genellikle yüzey adsorpsiyonu sonucudur. Metal iyonları hücre yüzeyine değer değmez, yüzey adsorpsiyonu ile mikroorganizmaların hücre yüzeyine bağlanmaktadır. Fungusların hücre duvarında çeşitli ligandların bulunduğu ve bunların metal tutunması ile ilgili oldukları bilinmektedir. Yüzey adsorpsiyonu sırasında birçok biyolojik molekülün, örneğin hücre duvarı bileşenleri olan polisakkaritlerin, proteinlerin ve lipidlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ile gerçekleştiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Bu fonksiyonel gruplar amino, karboksilik, sülfidril, fosfat ve tiol gruplarıdır. Fonksiyonel gruplar metalleri bağlamada farklı affinite ve özgüllüğe sahip olduklarından, bu özellikleri sayesinde hücre yüzeyine bağlı olan metallerin tayinleri yapılabilmektedir. (Ting et al.1991, Holan et al. 1993). Metal çalışmalarında, metal iyonların hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks yaparak adsorplanabildiği gösterilmiştir. Ayrıca hücre duvarındaki proteinler iyonları bağlamak için peptid bağlarını tercih edebilmektedirler. Mikrobiyal hücre duvarı; glukon, kitin, mannan ve fosfo-mannan gibi polisakkarit ve glikoproteinler bakımından zengin olmakla beraber, bu polimerler metal bağlanma ligandlarının kaynakları bakımında zengindir. Fungusların hücre duvarları çift katlı yapıdadır ve kuru ağırlıklarında bile %90 oranında amino veya amino olmayan polisakkaritleri içermektedirler. Genelde; fungus hücre duvarının kitin iskelet çatısı amorf polisakkarit matriks içine gömülmüş iki aşamalı sistem olarak kabul edilebilir (Farkas 1980). *Aspergillus niger* biyoması %30' a varan kitin ve glukon ilişkisinden oluşmaktadır (Muzzarelli and Tanfari 1982). Hücre duvarı bileşimi olan kitin ve kitosanın metal alımı için önemli olabileceği düşünülmektedir (Ahluwalia and Goyal 2007).

Yukarıda bahsedilen çalışmaların sonucunda; mikroorganizmanın, sulu ortamdan hücre yüzeyine metal adsorblamasını açıklamaya çalışan çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür.

Bunlardan ilki;

i. Metal iyonları hücre yüzeyindeki negatif yüklü reaksiyon alanları ile kompleks oluşturarak veya pozitif yüklü reaksiyon alanları ile yer değiştirerek adsorblanabilir. Bu

olaya iyonik adsorbsiyon adı da verilir. Hücre duvarındaki polisakkaritler, sülfat, amino ve karboksil gruplarını içerir. Algal polisakkaridlerin çoğu, örneğin kahverengi ve kırmızı deniz alglerinin yapısal bileşeni sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi metal katyonlarının tuzlarından oluşmaktadır. Çift değerlikli metal iyonları, polisakkaritlerin aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirir (Tsezos and Volesky 1981).

ii. Bazı mikroorganizmaların hücrelerinin dış zarlarından uzanan polimerler sentezleyebildikleri, bu polimerlerin çözüldükten metal iyonlarını bağlayabilme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (Tsezos and Volesky 1981).

iii. Hücre duvarındaki proteinler metali bağlamak üzere aktif bölgeler oluştururlar. Ağır metallerin proteinlere karşı kuvvetli ilgisi vardır. Proteinlerin peptid bağlarının azot ve oksijeni, hidroksil, amino, fosfat gibi grupları, iyonların metal iyonları ile yer değiştirmesi için uygundur (Tsezos and Volesky 1981). Amfolit karakterde olan proteinlerinde, molekülün türüne göre belirli bir izoelektrik pH' ı vardır. Pozitif yüklü metal iyonlarının izoelektrik noktanın altında katyonik bir karakter taşıyan protein moleküllerinin içerdiği grupların aynı yüklü iyonlarıyla yer değiştirdikleri, izoelektrik noktanın üstündeki pH'larda ise negatif yüklü reaksiyon alanlarıyla kompleksler oluşturarak adsorblandıkları düşünülebilir (Sağ and Kutsal, 1995). Dolayısıyla ortam pH'ının ağır metal adsorbsiyonunda etkin bir parametre olması öngörülebilir.

iv. Bazı mikroorganizmaların yüzeylerinde yüksek molekül ağırlıklı polifosfatlar veya kimyasal olarak bunlara benzeyen gruplar, metali kompleksleri şeklinde kendilerine bağlarlar. Örneğin *Citrobacter* sp. hücrelerinde bulunan organik fosfattan, inorganik fosfatı serbest bırakan fosfataz enzimi ağır metali, hücreye bağlı metal fosfat olarak çökmesini sağlar (Macaskie and Dean 1989).

Metal alımında ikinci basamak, metal iyonlarının hücre zarından içeri taşınımını da içeren, metabolik aktiviteye bağlı, daha yavaş, hücre içi giderim basamağıdır. Bu basamağa aktif giderim denir. Bu aşamada metal bağlama aşaması gerçekleşmektedir. Burada metaller hücre membranının transport özelliğine göre sitoplazmaya geçmektedirler. Yavaş gerçekleşen bu aşamada, sitoplazmadaki metaller çözünmez

formda (mikrodepositler) tutulmaktadır. Sonuçta metaller; inter ve intrafibriller, parakristalin bölgeler, proteinler, RNA ve polifosfatlar, vakuoller gibi formlarda ve hücre yapılarında tutunuma uğramaktadır. Hücre duvarlarında metal bağlanması yüksek verimlilik gösterirken, hücrenin sitoplazmasındaki bölgelerde düşük verimliliktedir (Holan et al. 1993).

Metallerin sorbsiyon verimliliğinde; ortamda bulunan metal çeşidine, sayısına ve bu metallerin kendine has özelliklerine bağlı olarak sinerjik ve antagonistik etki görülmektedir. Örneğin; bazı alg türlerinde Cd ve Zn' nin antagonistik etkisi veya metallerin membran transportunda Ni⁺² ve Cu⁺², nin sinerjik etkisi gibi (Artola and Rigola 1992).

Sonuç olarak; metallerin biyolojik yöntemlerle uzaklaştırımı ve geri kazanımı kullanılan klasik yöntemlere göre oldukça ekonomiktir. Ayrıca pratik bir şekilde yapılabilmesi ve yüksek verimlilik içermeleri nedeniyle ilgili biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadır.

2.2.2 Mikroorganizmalarla Yapılan Bazı Ağır Metal Çalışmaları

Polikarpov yaptığı çalışmada ilk olarak, radyoaktif elementlerin sulu ortamda mikroorganizmalar tarafından doğrudan adsorplanabildiğini ve bu özelliğin mikroorganizmaların yaşam fonksiyonlarından bağımsız olduğunu göstermiştir (Tsezos and Volesky 1981).

Tezuka, aktif çamur bakterisinin tersinir flokulasyonunun negatif yüklü hücre yüzeyleri ile çözeltideki iki değerlikli katyonlar arasında (Ca⁺², Mg⁺²) kurulan iyonik bağ köprülerinin bir sonucu olduğunu bildirmiştir. Bu konuda Chiu, uranyum giderebilen bir fungal kültürünü atıktan izole etmeyi başarmıştır (Tsezos and Volesky, 1981).

Bacillus subtilis'in saf hücre duvarının yüksek atom numaralı elementleri adsorpladığını ve daha sonra bu elementlerin geri kazanılabileceğini göstermiştir (Beveridge ve Murray 1980).

Shumate ve arkadaşları, *Saccharomyces cerevisiae*'nin uranyum adsorpsiyonu üzerine pH, sıcaklık ve ortamda bulunan diğer anyon ve katyonların etkisini incelemişlerdir (Tsezos and Volesky, 1981). Doğal polisakkaritlerin iyon değiştirici özellikleri üzerinde ilk çalışmalar Tsezos and Volesky (1981) tarafından yapılmıştır.

Benzer çalışmalar devam etmiş ve Tsezos ve Volesky (1981), uranyum ve toryum adsorpsiyonunda değişik türde mikroorganizmalar kullanarak, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde adsorpsiyon izotermlerini çıkarmış, sonuçları aktif karbon ve iyon değiştirici reçineler ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarıyla karşılaştırmış ve mikroorganizmaların daha etkin adsorptif özelliklere sahip olduklarını göstermişlerdir.

Bu konuda ülkemizde ilk defa Aksu ve Kutsal (1986) tarafından yapılan çalışmalarda, yeşil alglerden *Chlorella vulgaris* ile Cu^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cr^{+6} ve Fe^{+2} nin tek bileşenli adsorpsiyonu kesikli karıştırmalı kapta ve akışkan yatak reaktörde incelenmiş, sonuçların adsorpsiyon izotermlerine uygunluğu gösterilerek, alglerin yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip biyosorbentler olduğu kanıtlanmıştır.

Aynı konudaki çalışmalara Sağ ve Kutsal (1993) tarafından devam edilmiş ve bu araştırmacılar daha farklı türdeki mikroorganizmalarla Cr^{+6} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} ve Fe^{+3} adsorpsiyonunu kesikli karıştırmalı kapta, akışkan yatak reaktörde ve tutuklanmış mikroorganizma ile dolgulu kolon reaktörde incelemişler, sürekli sistemde en uygun reaktörün dolgulu kolon olduğunu belirtmişlerdir.

Çoklu metal iyonu karışımlarıyla ilgili çalışmalar Ting ve arkadaşları (1991) tarafından başlatılmış ve bu araştırmacılar ışık varlığında ve yokluğunda *C. vulgaris* ile kadmiyum(II) ve çinko(II) iyonlarının, metabolizmaya bağlı ve yarışmalı giderimini araştırmışlardır. Sürekli sabit ışık altında, hücrel metabolizma için temel bir element olan, çinko(II) gideriminin, kadmiyum(II) iyonları tarafından açıkça inhibe edildiğini gözlemişler; aynı deneysel koşullarda hücrel metabolizma için temel bir element olmayan kadmiyum(II) gideriminin ise, çinko(II) varlığından etkilenmediğini belirtmişlerdir.

Muraleedharan ve Venkobachar (1990)' in ağaç köklerinde yaşayan bir fungus olan *Ganoderma lucidum* ölü biyomasiyla bakır(II) metali kullanarak yaptıkları biosorpsiyon çalışmasında; protein etkileşiminin metal alımında önemli bir rolü oynamadığını bildirmişlerdir. Niu ve arkadaşlarının *P. chrysogenum*' la yaptıkları kurşun biosorpsiyon çalışmasında (1993); fungusun metal alma kapasitesinin pH 4-5 aralığında daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Ölü veya yaşayan hücrelerin metal alabilme kapasiteleri karşılaştırılmış, çoğu kez ölü durumdaki mikroorganizmanın daha yüksek adsorplama kapasitesine sahip olduğu gözlenmiş ve buna neden olarak ölü hücre yüzeyinin yapısındaki değişiklikler gösterilmiştir. (Tsezos and Volesky 1981).

Alkali ile muamele edilmiş *A.niger*' in Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Co^{+2} metallerinin ayrı ayrı uygulanarak yapılan biosorpsiyon çalışmasında; biyomas ağırlığının metal bağlamada %10 kadar etkili olduğunu ve metal bağlama kapasitesi açısından *Neurospora*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleri ile karşılaştırılması ortaya koyulmuştur (Akthar et al. 1996).

Zafar ve arkadaşlarının yaptıkları metal toleransı ve biosorpsiyon çalışmasında (2007); metalle kontamine olmuş tarım toprağından izole ettikleri *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia* ve *Trichoderma* cinslerine ait funguslara Cd, Ni, Cr, Cu ve Co metalleri kullanılarak minimum inhibe konsantrasyon testi uygulanmıştır. Bu testte yüksek direnç gösteren *Rhizopus* sp., *Aspergillus* spp. türleri $CdCl_2$ ve $K_2Cr_7O_7$ metallerinin 2, 4, 6, 8 mM' lık sulu çözeltileri ilk pH'ı 5 olacak şekilde 25°C' de 4 saat çalkalamalı etüvde muamele edilmiştir. Ağır metal konsantrasyonları atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazı ile analiz edilerek SPSS istatistik testi uygulanarak karşılaştırma yapılmıştır. Cd ve Cr' un biyosorpsiyon için *Rhizopus* sp. ve *Aspergillus* spp. türlerinin kullanılabilceğini göstermişlerdir.

Melgar ve arkadaşları (2007); bir fungus türü olan *Agaricus macroporus* ile toksik metallerin sulu çözeltilerinde metal giderimini çalışmışlardır. Ölü ve canlı biyomas kullanılan çalışmada; Cd^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} metallerinin her birinden 100

mg/lt' lik çözeltileri farklı pH' larda hazırlanmıştır. pH 4.5' luk çözeltilerinde NH₃ ve KH₂PO₄, pH 9.0' da ise NaOH çözeltisi eklenerek 3 farklı uygulama kullanmışlardır. Farklı zamanlarda metallerin çözelti örnekleri alınarak anodik sıyırma voltametrisi (ASV) tekniği ile analiz edilmişlerdir. Bu teknik kullanılarak ölü ve canlı biomasın biosorpsiyon kinetikleri karşılaştırılmıştır.

Marbnianh ve Nazareth (2007) çalışmalarında; tuzcul bölgelerde yetişen bitkilerden (Mangroves) ve tuzlalardan izole ettikleri halotolerant *Penicillium* türlerinde ağır metal dirençliliğini araştırmışlardır. Pb, Cu ve Cd metallerinin sulu çözeltilerinde farklı konsantrasyonlarını çalışmışlardır.

Ağır metal çalışmalarında; adsorpsiyon terimi hem canlı hemde cansız materyallerle ağır metal gideriminde kullanılır. Çalışmamızda canlı biyolojik materyal kullandığımız için tezin bundan sonraki bölümlerinde biyosorpsiyon terimi kullanılmıştır.

Çizelge 2.2 Metal adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan funguslar (Ahluwalia and Goyal 2007)

Biosorbent	Metals	Adsorption capacity (mg g ⁻¹)	References
<i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus niger</i>	Cr(VI)	2	Prasanjit and Sumathi (2005)
	Cu	5	Townsley and Ross (1986)
	-	-	Modak et al. (1996)
	Co	95	Kuyucak and Volesky (1989)
	Au	200	Kuyucak and Volesky (1989)
	Co	2.4	Sakaguchi and Nakajima (1991)
	Cr, Fe	-	Goyal et al. (2003)
	Pb	30	Kim et al. (1995)
	Th	22	Tsezos and Volesky (1981)
	-	162	Gadd (1988)
	U	29	Sakaguchi and Nakajima (1991)
	-	27	Kuyucak and Volesky (1989)
	Zn	-	Luef et al. (1991), Modak et al. (1996), Muter et al. (2002)
<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>	Th, U	60, 10	Tsezos and Volesky (1981)
	Cu	6	Gadd and Mowll (1995)
	Pb	56.9	Suh et al. (1998)
<i>Cladosporium resinae</i>	-	-	Ahluwalia and Goyal (2003)
	Cu	18	Gadd (1988)
<i>Candida utilis</i> <i>Ganoderma lucidum</i>	Pb	-	de Rome and Gadd (1987)
	Cr, Cu, Pb	-	Ahluwalia and Goyal (2003)
<i>Mucor meihi</i> <i>Mucor rouxii</i>	Cu	24	Muraleedharan and Venkobachar (1990)
	Cr	-	Tobin and Roux (1998)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pb, Zn, Cd, Ni	17, 4.89, 6.94, 5.24	Yan and Viraraghavan (2003)
	Pb	769	Lo et al. (1999)
	Cd, Cu, Pb	11, 9, 116	Niu et al. (1993)
	Cd	56	Holan and Volesky (1995)
	-	39	Fourest et al. (1994)
	Th	142	Tsezos and Volesky (1981)
	-	-	Gadd and White (1992)
	U	70	Tsezos and Volesky (1981)
	Zn	6.5	Niu et al. (1993)
	-	-	Luef et al. (1991)
<i>Pleurotus sapidus</i> <i>Streptocorticillium cinnamomeum</i> <i>Penicillium italicum</i>	Cd, Zn, Cu, Pb	-	Skowroński et al. (2001)
	Cd, Hg	127, 287	Yalcinkaya et al. (2002)
	Pb, Zn	57.7, 21.3	Puranik and Paknikar (1997)
	Cu	-	de Rome and Gadd (1987)
<i>Penicillium spinulosum</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Th	-	Gadd and White (1989)
	Cu, Zn	0.4-2, 0.2	Townsley and Ross (1985)
	Cd	84.5	Gabriel et al. (1996)
<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Rhizopus nigricans</i>	Pb	2	Say et al. (2001)
	Cu	-	Yetis et al. (2000)
	Pb	73.5	Cho and Kim (2003)
	Cr, Pb	47	Bai and Abraham (2001)
	Zn	14	Zhang et al. (1998)
<i>R. oligosporus</i> <i>R. arrhizus</i>	Cd, Ni, Pb	19, 5, 166	Fourest and Roux (1992)
	-	-	Holan and Volesky (1995)
	Cr	126	Ariff et al. (1999)
	Cd	17.09	Aloysius et al. (1999)
	Ni, Cd, Zn, Pb, Cu	18, 27, 14, 56, 9.5	Fourest and Roux (1992)
	Cd	30	Holan and Volesky (1995)
	Cr	11	Bai and Abraham (1998)
	-	36	Nourbakhsh et al. (1994)
	Co	2.9	Sakaguchi and Nakajima (1991)
	-	-	Niyogi et al. (1998)
-	-	Sag and Kutsal (1998)	
-	-	Prakasham et al. (1999)	
Cu	10	Gadd (1988)	
-	-	de Rome and Gadd (1987), Sag and Kutsal (1998), Zhou and Kiff (1991)	

Çizelge 2.2 (Devamı) Metal adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan funguslar (Ahluwalia and Goyal 2007)

Biosorbent	Metals	Adsorption capacity (mg g ⁻¹)	References
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Th	185	Tsezos and Volesky (1981)
	-	97	Gadd et al. (1988)
	-	Gadd and White (1992)	
	U	220	Tsezos and Volesky (1981)
	-	Tsezos et al. (1989)	
	-	Tsezos and Deutschmann (1990)	
	Cd	-	Volesky et al. (1993)
	Cr	-	Nourbakhsh et al. (1994)
	-	11.4	Omar et al. (1996)
	Co	5.8	Sakaguchi and Nakajima (1991)
<i>Trametes versicolor</i>	Pb	-	Suh et al. (1998)
	Th	119	Gadd (1988)
	Cu	17-40	Volesky and May-Phillips (1995)
	U	55-140	
	Cu	10	Mattuschka et al. (1993)
	-	0.4	Huang et al. (1990)
	Zn	14-40	Volesky and May-Phillips (1995)
	Cr	-	Bayramoglu et al. (2003)
	Cd	109	Gabriel et al. (1996)

2.3 Ağır Metal Biyosorpsiyon Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

2.3.1 İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES)

ICP-OES, birçok elementin aynı anda nicel tayininde kullanılan analitik metotlardan birisidir (Skoog et al. 1998). Düşük derişim seviyelerinin tayininde başarılı bir analitik yöntem olarak kullanılır. B, S, N gibi zor ölçülebilen, geniş bir lineer aralıkta düşük tespit sınırları olan elementlerin ölçümleri bu cihaz ile mümkündür. Bor tayinleri için bilinen diğer yöntemlere göre daha iyidir. Yöntem, katı, sıvı ya da gaz örneğin plazma içine verilmesi ve atomik emisyonun ölçülmesine dayanır.

ICP kaynağı, argon gibi inert gazlardan yüksek enerjili ve yüksek frekanslı iyonlaşmış bir plazmayı üretir. Bir numune plazmanın merkezine enjekte edildiğinde, 10000 K sıcaklıktaki plazma, numunedeki elementlerin ayrışma, atomlaşma ve uyarılma işlemlerinin gerçekleşmesini sağlar. Bu olaylar, çalışılan elementlerin kendilerine özgü frekansta ışığı yayması ile sonuçlanır. Bu ışık şiddeti, numune içerisindeki elementlerin derişimi ile doğru orantılıdır ve bir emisyon spektrometresi ile ölçülür. Spektrometre özgün frekansları farklı dalga boylarına ayırabilme ve nicel sonuç alabilmeyi sağlar (Aslantaş 2007).

ICP-OES cihazının; geniş çalışma aralığına sahip olması, kimyasal girişimin olmaması, elementler arası en düşük etkinin gözlenebilmesi, sonuçları oldukça iyi kesinlik ve doğrulukla verebilmesi kullanımında bazı avantajlar sağlamaktadır (Aslantaş 2007).

Bakır, nikel, altın ve platin ile yapılan fungal biyobirikim çalışmasında; ağır metale toleranslı funguslar kullanılmıştır. Sıvı gelişme ortamında 10, 25, 40 mg/lt bulunan ağır metaller, biomasla birlikte 28°C' de 72 saat çalkalamalı etüvde muamele edilmişlerdir. Belirli zamanlarda alınan her bir süpernatant örneğinin element analizi için İndüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES) cihazı kullanılmıştır. Sonuç olarak; nikel ve altının funguslar için gelişmede toksik etki oluştuklarını, en düşük toksik etkinin ise platinde gerçekleştiğini saptamışlardır (Moore et al. 2007).

2.3.2 Fourier Transform İnfrared Spektrometre (FT-IR)

Son on yıldan beri FT-IR; biyolojik makromoleküllerin (Siebert 1995) ve doku, hücreler gibi kompleks biyolojik sistemlerin (Jackson et al. 1997) çalışılmasında güçlü bir teknik olarak gösterilmektedir. Çok sayıda kimyasal fonksiyonel grupların karboksil, hidroksil ve amid gibi; fungusların metal bağlayan bölgelerinin identifiye etmek için kullanılmaktadır. Fungusların metal tutma kapasitesi, metal ve adsorpsiyon bölgesi arasındaki kimyasal durum ve affiniteye gibi faktörlere bağlıdır.

FT-IR cihazı; elektromanyetik ışınım molekül ile etkileşimini inceler ve molekül yapısı hakkında bilgi verir. Moleküllerin titreşim frekanslarından molekül yapısı hakkında bilgi edinmek mümkündür ve moleküllerin titreşim frekansları infrared spektroskopik yöntem ile incelenebilmektedir.

Vankar ve Bajpai' nin (2008) tabakhane atık suyunda çok miktarda bulunan Cr (VI) metalinin, bir fungus türü olan *Trichoderma* ile biyoremediasyon çalışması yapmışlardır. FT-IR analizi ile fungusun hücre yüzeyinde Cr tutma bölgelerinin büyük olasılıkla karboksil ve amin grupları olduğunu saptamışlardır.

2.4 Tuz ve Önemi

Tuz, insanlar tarafından günlük yaşamında kullanılan önemli bir mineraldir. İnsanın tuzu ne zaman kullanmaya başladığı tam olarak bilinmemekle beraber, bu sürenin MÖ 1000 yılına kadar gittiği düşünülmektedir (Koday 1999). Yaşamımızda hem tad verici hemde gıda olarak kullanılan bu madde muhafaza maddesi olarakta kullanılmaktadır.

Kristal yapılu bir sodyum klorür (NaCl) bileşiği olan tuz, kübik sisteme göre kristalleşen Na ve Cl iyonlarından oluşur. Tuz saf halde iken yaklaşık %40 Na, %60 Cl' den meydana gelir (Yalçın ve Ertem 1997). İçerdiği maddelere bağlı olarak tuz, renksiz saydam ya da yarı saydam; doğadan üretildiği şekli ile rengi gri, sarı, kırmızı hatta mavi ve yeşilde olabilmektedir. Tuz saf halde iken renksizdir. Yüksek basınç altında plastik özellik gösteren tuzun sertliği 2,5 olup, yoğunluğu 2,1-2,55 gr/cm³ arasında değişir. Erime noktası 800,8 °C, kaynama noktası ise 1,412 °C' dir (Akdik 1980). Eski çağlardan beri besinlerde katkı maddesi olarak kullanılan tuz, günümüzde kimya sanayinin en önemli ham maddelerinden biri haline gelmiştir.

2.4.1 Tuzlu Ortamlar (Habitatlar)

Tuz; denizlerde, göllerde, yeraltı sularında erimiş halde ve yeraltında kaya tuzu şeklinde bulunur (Oren et al. 1997).

Tuzlu ortamların sınıflandırılmasında iki ana faktör rol oynamaktadır. Birincisi tuzun orijini ve yapısıdır. Aşırı tuzlu ortamların çoğu deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşur ve 'Thalassohaline Ortamlar' olarak adlandırılırlar. Deniz suyundan oluşan tuz bileşiminde sodyum ve klorid iyonları baskındır. Bu bileşimin pH' ı nötral veya birazda alkalidir. Buharlaşma sırasında, kalsiyum sülfatın çökmesinden dolayı ve diğer minerallerin çözünürlüğünün artmasıyla iyonik bileşenler içinde bazı değişimler oluşur. NaCl' ye doymuş thalassohaline tuzlu su, çok sayıda pigmentli mikroorganizmalar barındırdığından sıklıkla parlak kırmızı renkte görünür. Diğer tuzlu ortamlar ise kıtasal orjinli tuzların çözünmesinden oluşmaktadır. 'Athalassohaline Ortamlar' olarak adlandırılan bu ortamların iyonik bileşenleri deniz suyundan oldukça farklıdır. İsrail'

deki Ölü Deniz athalassohaline bir göldür. Dünyada çok sayıda athalassohaline göl bulunmaktadır (Oren 2002).

Tuzlu ortamların sınıflandırmasında ikinci faktör tuz konsantrasyonlarıdır. Araştırmacılara göre; aşırı tuzluluğun alt sınırı %3-12 oranları arasında değişmektedir. Tuzluluk oranı %10-12 olan ortamlar orta dereceli tuzluluk olarak adlandırılmakta ve bu ortamlara 'Mesosaline Ortamlar' denilmiştir (Javor 1984).

Aşırı tuzlu göllerdeki iyonlar çevrenin topoğrafisine, jeolojisine ve genel iklim durumuna göre değişebilir. ABD Utah' taki Büyük Tuz Gölü' nde çeşitli iyonların nispi oranları deniz suyununkine benzemektedir. Ortamda sodyum ve kloridin yanı sıra, pH'ı alkali olduğundan sülfatta önemli miktarda bulunmaktadır. Bunun aksine İsrail' deki Ölü Deniz' de sodyum oranı düşük olmasına rağmen çevresinde bulunan kayalardaki magnezyum miktarından dolayı magnezyum miktarı yüksektir. Soda göllerinin kimyasal içeriğinde ise soda göllerini çevreleyen kayalardan dolayı yüksek seviyede karbonat minerali bulunur ve pH' ı 10-12 arasındadır (Valera 1993).

Ekonomik değere sahip tuz kaynakları katı ve sıvı olarak ikiye ayrılmaktadır. Tuz sıvı halde denizlerde, tuzlu göllerde, tuzlu su kaynaklarında ve katı halde de kaya tuzu şeklinde bulunmaktadır. Denizler dünyamızın en büyük tuz rezervlerini oluşturmaktadır. Denizlerdeki tuzluluk derecesi; denizlerin tatlı su alıp almadıklarına, coğrafi durumlarına ve iklim koşullarına göre değişik miktardadır. Kapalı denizlerde tuzluluk derecesi fazla olmasına karşın, okyanuslarla açık denizlerde hemen hemen aynıdır.

Tuz; deniz, göl ve diğer doğal tuzlu suların güneş altında buharlaştırma yöntemi ile kristalleşmesi sonucu elde edilir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için o bölgenin iklim koşullarının uygun olması gerekir. Avrupa' nın Akdeniz ve Atlantik' teki deniz tuzlarında deniz suyundan çıkan tuz genellikle %77-78 NaCl, biraz KCl ve MgSO₄, çok miktarda da MgCl₂ içermektedir. Saf tuz elde edebilmek için bu yabancı maddelerin ayrılması gerekir. Bunun için deniz suyunun güneş ve rüzgâr etkisiyle buharlaştırılarak bu çeşitli bileşikleri çökecekleri bir konsantrasyona getirilmesi gerekir. Bu işlem suyun

düşük bir seviyede bulunduğu seri haldeki havuzlarda sağlanır. Türkiye’ de deniz suyundan tuz üretimi İzmir Çamaltı ve Ayvalık’ ta olmak üzere iki adet olan deniz tuzlarında üretim Mart ve Ağustos ayları arasında yapılır. Çamaltı deniz tuzlası Tekel’ in en büyük tuzlası olup 450.000 ton/yıl kapasiteye sahiptir. Burada üretim açısından optimum verimi sağlayacak koşullar vardır. Tuzla nemi az olan kuzey rüzgarlarına açıktır. Genel olarak bütün yıl boyunca yağmur hariç evaporasyon son derece olumludur (Ergin 1988).

Göl tuzlarında tuz üretimi, yaz aylarında yoğun su buharlaşması nedeniyle çöken tuzun toplanması şeklinde gerçekleştirilir. Tuz göllerinin bir kısmı eski deniz yatakları olabileceği gibi bazıları da geniş yer çöküntülerinde, civar bölgelerdeki kaya tuzlarından geçerek bu çukurlarda toplanan tuzlu suların oluşurlar. Bu göllerden bir çoğu yalnızca kış aylarında göl manzarası verirler. Yaz aylarında buharlaşma sonucu toplama havuzları tuz tavaşı haline gelirler. Ülkemizde göl sularından tuz üretimi Tuz Gölü çevresindeki Tavşan, Kaldırım ve Kayacık tuzlarında rüzgâr ve sıcaklığın etkisiyle göl yüzeyindeki sular azalmakta ve tuz tabanda kristalleşmeye başlamaktadır. Bu kristalleşme ya önceden oluşan yada doğrudan toprak üzerinde oluşmakta ve iklim koşullarına göre 6-10 cm arasında bir kalınlığa erişmektedir (Ergin 1988).

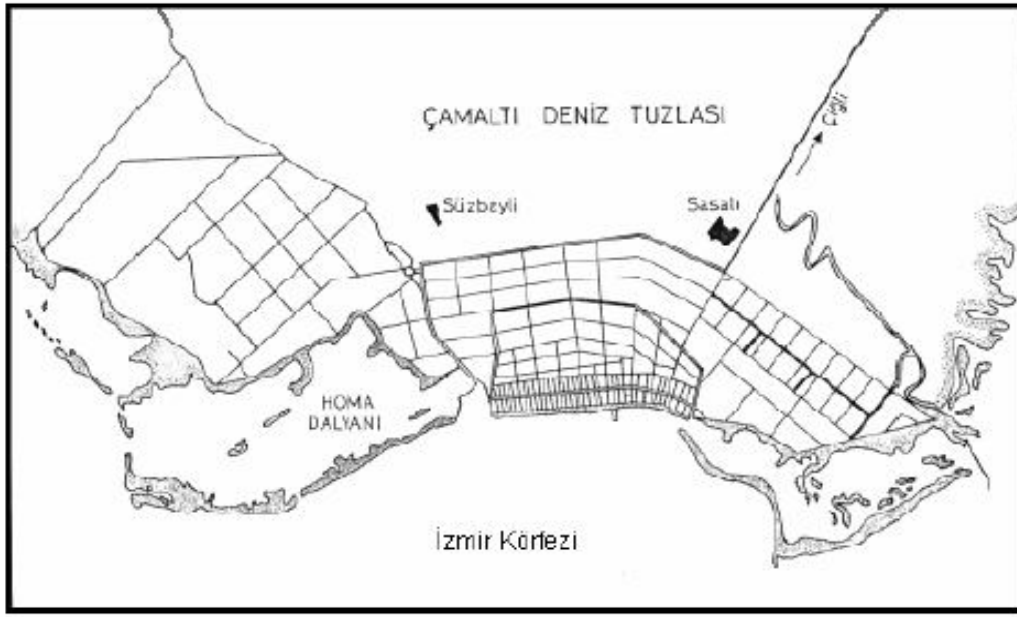
Yeraltında az veya çok derinlerden katı halde elde edilen tuzlar kaya tuzu olarak tanımlanır. Denizlerdeki eriyik tuz rezervlerinden sonra ikinci büyük tuz kaynağını oluşturan kaya tuzu yatakları ince veya kalın tabakalı olabilmektedir. Altan yukarıya doğru şişerek genişleyen, yüzlerce metre yükseklikte ve genişlik gösteren tuz tepeleri veya tuz domları şeklinde oluşmuşlardır (DPT 2001).

Sibirya, Avrupa’ nın kuzeyi ve içleri, Güneydoğu Avrupa (Alpler ve Karpatlar) ve Kuzey Amerika’ nın orta kıta sahası tuz yataklarına sahiplik etmektedir (Stan-Lotter et al. 2006)

2.4.2 Araştırma Bölgelerinin Genel Özellikleri

2.4.2.1 İzmir Çamaltı Tuzlası

Tuzlalar, güneş ışınları vasıtasıyla deniz suyunun buharlaştırılması ile tuz üretimini sağlamak amacıyla kurulan, birbirine bağlı veya bağlı olmayan, değişik boyutlardaki havuzlardan oluşmuş sistemlerdir. %3,5-%30,0 tuzluluğa kadar olan bu havuzlar, kendilerine özgü canlı topluluklarını içerirler (Koru 2004).



Şekil 2.4 Çamaltı Tuzlası (Koru 2004)

Ülkemizdeki önemli tuz üretim yerlerinden biri olan Çamaltı Tuzlası, İzmir iline 28 km uzaklıkta, Gediz nehri havzasına kurulmuş, Türkiye' nin deniz kaynaklı en büyük tuzlasıdır. Çamaltı Tuzlası 24.161.000 m² alana yayılmış buharlaştırma havuzları ve 3.158.000 m² alanı kaplayan kristalizasyon havuzlarıyla önemli bir sulak alandır. Genel olarak I. ve II. tuzla, su depolama alanları, kristalizasyon havuzları olarak 4 ana kısma ayrılır. Su depolama havuzları %35-50, buharlaştırma havuzları %50-150, kristalizasyon havuzları %150-300 tuzluluktur. Tuz üretim parsellerinin ortalama derinliği 0,5-1,0 m olmakla beraber, 1,5 m derinlikteki tuz havuzlarıyla, su iletim kanalları da mevcuttur. Tuz parsellerinin zemini sıkıştırılmış olup, topraktır. Tuzlanın denizle bağlantısını, ana kanal üzerine kurulmuş olan pompalar sağlamaktadır. Böylece

değişik boyutlardaki havuzlara verilen deniz suyu, kademeli olarak tuz kristalizasyon havuzlarına ve tüm alana dağıtılabilmektedir (Koru 2004).

Çamaltı tuzlasının temelleri, ilk kez 1863 tarihinde İtalyanlar tarafından atılmış ve 1912 yılında Maliye Bakanlığına devredilerek devletleştirilmiştir. 1913-1932 yılları arasında Tütün İşleri Müdürlüğü adı altında çalışmış, 1933 yılından itibaren Tekel (Tekel, Tütün Mamulleri, Tuz ve Alkol İşletmeleri A.Ş) Bakanlığına bağlı Tekel Genel Müdürlüğüne devredilerek şimdiki Çamaltı Tuzlası kurulmuştur. Muhtelif yıllarda birkaç kez yenilenip bugünkü halini almıştır.

Çamaltı Tuzlası' nda tuz üretimi güneş ısısı yardımıyla deniz suyunun buharlaşması esasına dayanır. Tuz üretimi için gerekli iklim koşulları tuzlada mevcuttur. Tuzla nemi az olan kuzey rüzgârlarına açıktır. Mayıs ve Ağustos aylarında batı ve güneybatıdan, Nisan ve Eylül aylarında ise kuzey ve kuzeybatıdan rüzgâr esmesi tuz üretimi için elverişli bir ortam hazırlamaktadır. Çamaltı Tuzlası çok büyük sahaya sahip olduğundan sevk ve idarenin kolaylaştırılmasını açısından Üretim Şubesi bünyesinde 1. ve 2. Tuz Üretim Merkezi olmak üzere iki ana merkez oluşturulmuştur.

Yurdumuzun tuz gereksiniminin %60' nı karşılayan tuzlada üretim Mayıs ayında başlar. Deniz seviyesinden 2 m yükseklikte olan ham su havuzları, "Tımpana" adı verilen ve emme basma tulumba işlevini gören su depoları aracılığıyla doldurulur. Havuza alınan su yüksekliği 35–40 cm' dir. Tuz kristallerinin ayrılması 3 ay sürer. İlk kristallerin ayrılması Haziran' da başlar, Ağustos ayının son günlerinde bitirilerek tuzu ayrılmış olan ana çözeltilerin denize verilmesi sağlanır. Eylül ayının ilk günlerinde çözeltileri ayrılmış olan tuz kristalleri, bir süre kendi halinde bırakılarak kısmen kurumaları ve kısmen de billurların aralarında kalmış olan fazla suyun süzülmesi sağlanır. Bundan sonra ayrılma işlemlerine başlanarak tuzlar kümelenir. Yığılma işlemi için tuz kümeleri etrafına vagon rayları döşenerek vagonlar aracılığı ile tuz yığınlanır. Yığınlanmış tuz kristalleri içlerinde bir miktar daha ana çözelti tuttuklarından hafif pembe renkli görünürler. Zamanla ana çözeltilerin giderilmesiyle tuz beyaz rengini alır. Bu şekilde alınan tuz ortalama %97-98 NaCl' dir (Ergin 1988).

Çamaltı Tuzlası' nda, düşük tuzlulukta %35-50, orta tuzlulukta %50-150 ve yüksek tuzlulukta %150-300 biyotopların kendine has canlıları vardır. %35-50 tuzlulukta algler, protozoa, bakteri, bazı mollusk türleri, su bitkileri ve balıklar bulunur. Bu alanlarda organik materyal miktarı düşüktür. %50-150 tuzlulukta, yüksek miktarda çözülmüş organik materyal ve birkaç canlı türü vardır. Temel canlı türleri bazı *Cyanobacteria* ve *Artemia* spp.' dir. %150-300 tuzlulukta organik materyal miktarı fazla, organik materyalin organizmalar tarafından tüketimi yüksek olup, canlı topluluğu 3-4 türü kapsar. Bu biyotopta *Halobacterium* cinsinden kırmızı bakteri yaygın olarak bulunur (Koru 2004). Bu tuz bakterileri, uygun koşullarda çoğaldıklarında suyun rengini açık kırmızı-turuncu renge dönüştürürler. Bu durum sudaki güneş ışınlarının tutunmasını arttırdığından, buharlaşma da artmakta ve daha hızlı tuz oluşumu gerçekleşmektedir. Buharlaştırma havuzlarında yapılan gözlemlerde, özellikle ilkbahar aylarında siyanotoksin bir aktivitenin olduğu ancak, hücre yoğunluklarının hiçbir zaman suyun rengini değiştirecek düzeye ulaşmadığı saptanmıştır.

2.4.2.2 Iğdır / Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı

Kaya tuzu; uzun jeolojik dönemler boyunca doğal olarak tuzlu suların buharlaşması sonucu yeraltında sedimentler halinde oluşmuştur. Dünya' da yer alan kaya tuzu yatakları Permian ve Triyas döneminden gelmektedir (Stan-Lotter et al. 2006).

Ülkemiz jeolojik yapısı nedeniyle büyük tuz yataklarına sahiptir. İç Anadolu' da Çankırı' dan başlayarak Çorum, Yozgat, Sivas, Erzincan, Erzurum ve Kars üzerinden İran' a bağlanan tuz yataklarında 30' u aşkın kaya ve kaynak tuzları yer almaktadır.

Ayrıca Adana havzası ve Siirt yöresinde de geniş yeraltı tuz oluşumları mevcuttur. Ülkemizde beş kaya tuzlasında kapalı madencilik yöntemiyle tuz üretimi yapılmakta olup 7 adet ana kaya tuzu yatağımız bulunmaktadır.

Türkiye' de kaya tuzu rezervlerinin tam olarak belirlenmesi amacıyla Tekel ve M.T.A. arasında protokol imzalanarak 1977 yılında çalışmalar başlanılmıştır. Bu çalışmalar Çankırı, Sekili, Gülşehir, Tuzluca yeraltı kaya tuzu sahalarında yapılmıştır. Tuzun

yayılımı tespit edilerek, rezervini ortaya çıkaran bu çalışmalarda yörede jeolojik haritalama, jeofizik ve sondaj çalışmaları yürütülmüş, kaya tuzu rezervinin jeokimyası ve kalitesi de yorumlanmıştır (DPT 2001).

Doğu Anadolu Bölgesi' nin Erzurum-Kars bölümünde yer alan Iğdır ilinin kuzey ve kuzeydoğu sınırını Aras Nehri ve bu nehrin yatağı boyunca geçen Ermenistan sınırını teşkil eder. Iğdır ovası, 39° 52' 12" enleminde ve 44° 31' 12" boylamında yer alır. Yüzölçümü 3539 km²' yi bulan ilin, Ermenistan ile hududunu boydan boya Aras Nehri teşkil etmektedir. Bölgenin, yaklaşık %74' ü dağlık, %26' sı da ovalık araziden oluşmakta olup, il genelindeki en önemli yükseltiler Büyük ve Küçük Ağrı, Zor, Durak ve Pamuk Dağları' dır. İlçeleri ise Aralık, Karakoyunlu ve Tuzluca' dır. Tuzluca ilçesi, İl merkezine 39 km uzaklıkta olup, yüzölçümü 1254 km²' dir .

Tuzluca ilçesinde bulunan tuz yataklarının rezervi yaklaşık 800 milyon ton olup, %98 oranında NaCl içermektedir. Tuzluca ilçesine 1923' te kurulan kaya tuzu tesisi, Ermenistan sınırına yaklaşık 2 km kadar uzaklıktadır. İşletmenin bulunduğu alanın yükseltisi 1.075 metre ve tuz dağlarının bulunduğu alanın yükseltisi 1.150 metredir. Tesisin günlük tuz üretimi 90 ton, aylık tuz üretimi 25.000 ton dolayındadır. Tuz yatakları bakımından zengin olan ilçede, bu yataklar; Tekel idaresince işletilmekteydi ancak şuan özel bir şirket tarafından işletilmektedir.



Resim 2.1 Iğdır/ Tuzluca tuz mağaraları (2)

Tuzluca kaya tuzu tesislerinde madencilik yöntemi ile tuz üretimi yapılmaktadır. Üretim yöntemi oda-topuk olup kullanılan teknoloji çok eskidir. Bu yöntemde ilk önce deliciler yardımıyla yuvalar açılır. İçine doldurulan madde sıkıştırılır. Fitolin ateşlenmesi ile patlama işlemi gerçekleştirilir. Patlama sonucu ortaya çıkan tuz, nakil araçlarına iş makineleriyle yüklenerek sevkiyatı yapılır.

Kaya tuzları saf tuz halde bulunmayıp eski jeolojik devirlerden bu yana üzerinde taşıdığı ekstrem koşullara dayanıklı halofilik mikroorganizmalarla, organizmaların evrimi hakkında önemli bilgi vermektedir. Bu mikroorganizmalar biyoteknolojik anlamda da oldukça önemlidir (Stan-Lotter et al. 2006).

2.5 Ekstremofilik Mikroorganizmalar

Ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan üyeleri olan halofiller, filogenetik ağacın üç domaininde de (Bacteria, Archaea, Eukarya) yer almaktadır (Horikoshi and Grant, 1998). Halofiller Kushner'e göre (1985); halofilik olmayanlar (%1' in altında NaCl' ye ihtiyaç duyanlar), az halofiller (%1-3 arasında NaCl'ye ihtiyaç duyanlar), orta derecede halofiller (%3-15 arasında NaCl' ye ihtiyaç duyanlar) ve aşırı halofiller (%15' ten daha fazla NaCl'ye ihtiyaç duyanlar) olarak sınıflandırılmıştır.

Bunların dışında halotolerant olan bir grup daha vardır. Bunlar hem tuz varlığında hemde yokluğunda gelişen organizmalardır.

Halofilik mikroorganizmalar tuzla, hipersalin sular gibi bölgelerde bulunurlar. Bu ortamlarda; ökaryotlar içerisinde yeşil alg olan *Dunaliella* (%10 tuz konsantrasyonu), *Artemia salina*, *Ephydra* gibi organizmalar yer alır. Bakterilerden ise; *Salinibacter ruber* (%20 tuz konsantrasyonu) en ekstrem halofilik bakteri olan özel bir türdür. *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* gibi genuslarsa Archaea domaininde yer alır ve bu mikroorganizmalar tuzun doygunluk noktasına yakın konsantrasyonlarda yaşayabilir (%35) (Horikoshi and Grant, 1998).

Ekstrem olarak adlandırılan birçok mikroorganizma adaptasyon gösterdikleri ortam koşullarına bağlı olarak çeşitli özelliklere sahiptirler. Bu nedenle bu organizmaların biyoteknolojik ve ticari önemleri oldukça yüksektir. Halofilik organizmalar arasında bu güne kadar özellikle gram negatif organizmalarla çalışılmıştır. Gram pozitif organizmalar ve funguslar bu alanda henüz yeni araştırılmaya başlanmış organizmalardır.

Bu organizmalar ekstrasellüler nükleazlar başta olmak üzere birçok enzim ve ürünü sentezleme yeteneğine sahiptirler (Ventosa et al.1998). Bu ürünler arasında bakteriorodopsin, pektin, amilaz, lipaz, selüloz, proteaz, biosümfaktanlar, lektinler ve bioplastikler sayılabilir (Banat et al. 2000).

Ökaryo domainindeki ekstremofillerde, metabolizmaları için gerekli olan kaynaklar yeterli olduğu sürece ekstrem koşullarda yaşayabilmektedirler. Ökaryotik ekstremofillere ait algal ve fungal organizmalara; kırmızı termofilik bir alg olan *Cyanidium caldarium*, psikrofilik yeşil bir alg olan *Chlamydomonas nivalis* ve asidofilik bir fungus olan *Trichosporum cerebriae* örnek olarak gösterilebilir. Bu gruplar hipersalin ortamlarda baskın olarak bulunan halofilik yeşil bir alg olan *Dunaliella salina*' yı da içermektedir (Schleper et al. 1995).

Ekstrem hipersalin ortamlar çeşitli koşullara (pH, sıcaklık, oksijen gibi) sahip olduklarından dolayı farklı toplulukların çalışmasına izin vermektedirler (Gunde-Cimerman et al. 2000, Pedros-Alio 2004). Tuzlalardaki mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarının çoğu halofilik *Archaea* bakterilerinden *Halobacteriales* familyası üzerine odaklanmıştır. Çünkü bu ortamların ana bileşenini oluşturmaktadır (Oren 2002). Alg, protozoa, eubakteria gibi diğer organizmalar ve hatta funguslarda ekstrem tuz koşulları altında yaşamlarını sürdürmesi zor olmasına rağmen tuzcul bölgelerde bulunmaktadırlar (Gunde-Cimerman et al.2004).

Funguslar çoğu ekosistemlerde çeşitli olarak koloni halinde bulunmaktadırlar. Fungusların çok çeşitli olarak buldukları ortamlar tropikal bölgeler özellikle tropikal ormanlardır (Hawksworth 1991). Puerto Rico' da fungal çalışmalar orman ve

kıyı ekosistemleri üzerine yoğunlaşmıştır (Acevedo 2001, Lodge et al. 2002, Cantrell et al. 2004, Nieves-Rivera 2005). Birçok fungus; su, sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi ekstrem çevre koşullarına adapte olabilmektedir (Griffith 1994). Mağaralar, tuzlu topraklar, deniz sedimentleri, deniz suları, tuzlalar, kumsallarda gibi ekstrem çevrelerde tam olarak tanımlanmamış Ascomycota sınıfına ait funguslar bulunmuştur (Moubasher et al. 1990, Kohlmeyer and Volkmann-Kohlmeyer 1991, Domsch et al. 1993, Newell 1996, Hyde and Pointing et al. 2000;). Son zamanlarda hipersalin çevrelerden funguslar izole edilmiş olmasına rağmen fonksiyonları hala belirlenememiştir (Gunde-Cimerman et al. 2004). Ekstrem ortamlardaki fungus çalışmaları genellikle Ölü Deniz, Rusya ve kuzey bölgelerde gerçekleştirilmiştir (Buchalo et al. 1998, Kis-Papo et al. 2001,2003, Gunde-Cimerman et al. 2004). Butinar ve arkadaşları (2005a,b); Fransa, Güneybatı Afrika, Portekiz, Slovenya, İspanya ve Dominik Cumhuriyeti' nde bulunan birkaç yapay ve doğal hipersalin çevrelerden izole ettiği fungusları tanımlamıştır.

Halofilik ve halotolerant funguslar düşük su aktiviteli yiyeceklerin kontaminantları olarak bilinmektedirler. Mayalar şekerli, ballı ve tuzlu sıvı ürünler içinde baskın halde bulunmaktadır. Halotolerant yiyecek mayaları; *Candida* (*C. lambica*), *Debaryomyces* (*D. hansenii*), *Pichia* (*P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. ohmeri*), *Rhodotorula* (*R. glutinis*) ve *Zygosaccharomyces* (*Z. rouxii*, *Z. bisporus*) genuslarını kapsamaktadır (Samson et al. 2000). Bazı mayaların yüksek şeker konsantrasyonuna tolerans gösterirken, bazıları da yüksek tuz konsantrasyonuna tolerans göstermektedir. *Torulopsis famata*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia etchelsii*, *Candida parapsilosis* ve *Debaryomyces hansenii* türleri %10-15' in üstünde NaCl' de gelişebilmektedirler (Lages et al. 1999). Kimisi yüksek pH değerlerine toleranslıyken, kimisi de asidik koşullara karşı daha iyi toleranslıdır (Praphailong and Fleet 1997).

Maya populasyonları; deniz sularında tatlı sulara göre daha seyrek bulunmaktadır ve derinlik arttıkça ve karadan uzaklaştıkça azalmaktadır (Van Uden and Fell 1968). Doğal hipersalin sularda mayaların çeşitliliği ve oluşumuyla ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır. Lahav ve arkadaşları (2002) hipersalin kimyasal atık su buharlaşan göllerden iki maya türü keşfetmiştir. Genellikle güneşin ısıttığı hipersalin sularda

herhangi maya popülasyonunu barındıramayacağı düşünülmektedir (Hernandez-Saavedra et al. 1995).

2.6 Mikroorganizmaların Biyoteknolojik Önemi

Endüstride kullanılan maddelerin büyük çoğunluğu filamentli funguslar tarafından üretilmektedir. Bunlar arasında özellikle biyoremediasyon çalışmalarında fungusların kullanılmasının önemi gittikçe artmaktadır.

Biyoteknolojide yiyecek ve içecek proseslerin de mikroorganizmaların kullanımı eskiden beri bilinen değerli bir uygulamadır. Peynir olgunlaştırma sürecinde mikroorganizmalar peynirdeki yağları ve proteinleri parçalayarak çeşitli fermentasyon ürünlerini oluştururlar. Bu ürünlerin çeşidine göre peynirin kendine özel yapısı, görünümü ve tat oluşur. Brie, Roquefort ve Camembert peynirlerinin olgunlaştırılmasında funguslar kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra Çin’de yüzyıllardan beri soya sosu bilinmektedir. Pişirilmiş soya fasülyesi ve ezilmiş buğday önce *Aspergillus oryzae* ile aşılanır. Bu küf ortamdaki nişastayı fermente ederek şekere dönüştürür. *Saccharomyces cerevisiae* hamurun mayalanması için ve şarap yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadır.

Fermentasyon prosesleriyle filamentli funguslar tarafından üretilen nitrik asit ve penisilin üretimi modern biyoteknolojide hala antibiyotik üretimine modeldir. *Saccharomyces cerevisiae*’den elde edilen invertaz enzimi, şekerin kristalize olmasını önlemede kullanılmaktadır, yine funguslardan elde edilen pektinaz enzimi, pektin çözücü olarak meyve sularının berraklaştırılmasında ve katılaşmaksızın konsantre edilmelerinde kullanılmaktadır. Yine funguslardan elde edilen rennin enzimleri sütün pıhtılaşmasında ve peynir üretiminde kullanılırlar.

Son on yıldır filamentli fungusların ticari değeri oldukça artmıştır. Enfeksiyon ve metabolik hastalıklarda tedavi için kullanılan farmosötik ajanların kaynağı olması açısından önem taşımaktadır. Spesifik biyotransformasyon çalışmalarında, kağıt yapımında, deterjanların güçlendirilmesinde, hayvan beslenmesinde ve yiyecek

proseslerinde enzimlerinin kullanımı oldukça yaygındır. Bugün endüstride, fungusların yiyecek üretimi için kullanımı ticari açıdan çok değerlidir (Tkacz and Lange 2004).

Halofilik mikroorganizmalar diğer ekstremofilik mikroorganizmalarla karşılaştıklarında basit besiyerlerinde kolay üretilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler. Ancak ekstremofilik mikroorganizmalarla ilgili alınan patent uygulamalarının sadece %20'si halofilik mikroorganizmalara aittir (Horikoshi and Grant 1998). Bu uygulamalardan bazıları bakteriyorodopsin (biyosensör yapımı, bilgilerin holografik olarak depolanması, elektronik sanayi), halorodopsin (deniz suyunun desalinizasyonu), biyopolimerler (polihidroksialkonatlar, parçalanabilir plastik üretimi) 84 kda'luk bir protein (myconkogenin saptanması). Bunların dışında, fermente gıdaların ve gıda katkı maddelerinin hazırlanmasında, biyosürefektanlar petrol kontamine toprak ve suların temizlenmesinde (Margejin and Schinner 2001).

Ülkemizde halofilik mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalar izolasyon ve sayım, enzim aktivitelerinin nitel olarak ortaya konması (Birbir et al. 2004) üzerine olup enzim üretim parametrelerini içermemektedirler. Yapılan diğer çalışmalar ise ılımlı halofillerle ilgilidir. Örneğin; yapılan bazı çalışmalarda ılımlı halofilik tip türlerin hücre dışı enzim üretim kapasitelerini nitel olarak incelenmiştir ve yaklaşık türlerin %20'sinde proteaz aktivitesi olduğunu görmüştür.

2.7 Fungusların İdentifikasyonu

2.7.1 Geleneksel İdentifikasyon

Fungusların yaşam döngülerinde hem eşeyli hemde eşeysiz üreme safhaları vardır. Eşeysiz safhasında oluşturdukları üreme yapıları fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterdir (Moore-Landecker 1996). Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında oluşturulduğu için bazı fungusların eşeyli safhası tam olarak belirlenememiştir.

Funguslar günümüzde iki şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Fungusların yaşam döngülerinde eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kullanılarak yapılan sınıflandırmaya telemorfik sınıflandırma denir. Eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için, funguslar tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak yapılan anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılmaktadır (Sneh et al. 1991). Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olmasıdır. Funguslar belli bir inkübasyon süresi sonunda makroskobik ve mikroskobik özelliklerinden yararlanılarak anahtarlar yardımıyla identifikasyonu yapılmaktadır.

2.7.2 Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

Mikroorganizmaları tanımlamak ve doğada bulunan mikrobiyal toplulukları karakterize etmek için mikrobiyal lipidlerin kullanımı giderek popüler olmaktadır. Fosfolipid yağ asitleri (PFLA); mikrobiyal biomass ve sedimentler içindeki mikrobiyal canlıları tahmin etmek için uzun zamandan beri kullanılmaktadır (Rajendran et al. 1992). PFLA metodları; bakteriyal izolatlar üzerindeki stres etkilerini, kök yüzeyinde bulunan mikroorganizmaların ve arbuscular kök fungusları üzerindeki kök salgılarını belirlemek için uygulanmaktadır. Tarım topraklarından ağır metallerle, asit yağmurlarıyla, alkalın tozlarıyla kontamine olmuş topraklardan ve diğer çeşitli habitatlardan elde edilen mikrobiyal canlıların karakterize edilmesine imkan vermektedir (Schutter and Dick 2000).

Mikrobiyal PFLA profillerinin analizi oldukça kullanışlı olmasına rağmen zaman alıcıdır. Lipidler organik fazla birleşmiş nötr, gliko- ve fosfolipid yapısında bulunur. Kalan kısmı ise lipopolisakkarit, taykoik ve muramik asite ayrılır. En sonunda karboksilik grupların metilasyonu yağ asitlerinin metil esterlerini (FAME) üretir ve bunlar gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilir (Schutter and Dick 2000).

Yağ asitleri; fungal membrandaki lipidlerin yapısında bulunan önemli bileşendir. Yağ asitleriyle yapılan çalışmalar; funguslardaki gelişim, spor oluşumu, germinasyon ve onların içerdiği çeşitli psikolojik işlemlerde yağ asitlerinin önemli bir bileşen olduğu

gösterilmiştir (Weete 1981). Genellikle funguslardaki yağ asitleri homolog seriler halinde C₁₀' dan C₂₅' e kadar olan karbon zincirlerinden oluşur . Bazı yağ asitleri belli mikroorganizmalarda bulunmaktadır ve bunlar kemotaksonomi çalışmalarında biomarker olarak kullanılmaktadır (Devi et al. 2006). Cantrell ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada hipersalin çevrelerden elde edilen ve farklı koşullarda her tabakada bulunan fungusların yağ asitlerini tanımlayıp karşılaştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre; fungal hücre membranındaki fosfolipid yağ asitlerinin bileşimi içindeki değişimi bu hipersalin bölgede başka bir adaptasyon şekli olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.7.3 Moleküler Yöntemle İdentifikasyon

Moleküler yöntemlerde ağırlıklı olarak kullanılan molekül DNA' dır. Evrimsel değişikliğin ilk olarak yansıdığı moleküller olan DNA ile yapılan araştırmalara daha güvenilir sonuçlara varmamızı sağlayabilirler (Taylor et al. 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile organizmaların genlerinin klonlanması ve birbirleriyle karşılaştırılması sistematik alanda büyük bir kolaylık sağlamıştır. PCR temelli yöntemler fungusların teşhisi için kullanışlı olmakta ve fungal suşların, türlerin yada daha üst takson gruplarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir (Dieffenbach et al. 1993).

PCR üç aşamadan oluşmaktadır: DNA sarmallarının ısıyla ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotidlerin homolog DNA veya RNA dizilerine bağlanması (primer bağlanması) ve DNA' nın in vitro enzimatik olarak sentezlenmesi.

Çoğaltılması istenen DNA bölgesinde her iki ucunda belli sayıda diziyi tanıyan primer çifti zıt ve birbiriyle çakışan yönlerde ilerleyen DNA sentezinin çok sayıda döngüde gerçekleşmesini sağlar. Her döngüde çift sarmallı DNA, iki yeni çift sarmallı molekülün yapılmasını sağlar. Böylelikle DNA kopyalarının sayısı her döngüde eksponensiyel olarak artar.

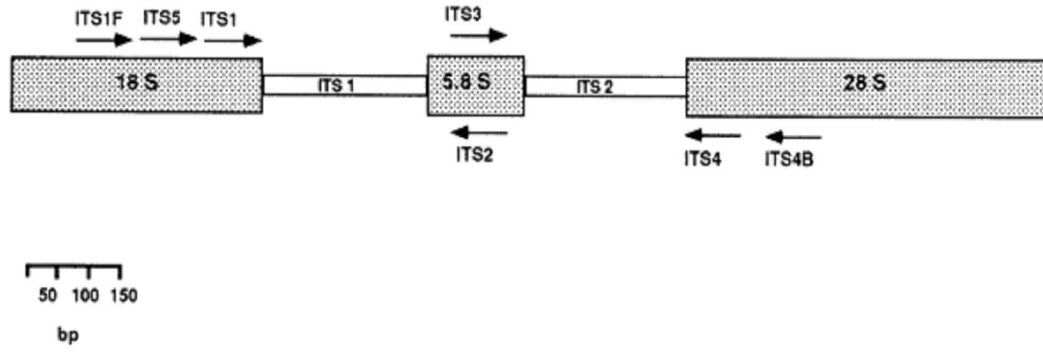
Fungusların karakterizasyonunda PCR temelli birçok yöntem vardır. Bunlar; Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA (RAPD), Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) ve DNA dizi analizi yöntemleridir.

Çalışmamızda kullandığımız, DNA dizi analizi organizmalar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için çok kullanışlı bir yöntemdir. Bruns ve arkadaşları (1990), DNA dizilerinin karşılaştırılan çok sayıda karakterin teşhisi için kullanılmasının yararlı olacağını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca bu yöntemle dizideki varyasyon şekli gözlenebilmektedir. Yani bir değişimin transversiyon ya da transisyon olup olmadığı, sessiz ya da seçilmiş olup olmadığı konularında bilgi elde etmemizi sağlamaktadır. Diğer bir yararı ise farklı laboratuvar çalışmalarındaki dizilerin yayınlanması ve elektronik veri tabanlarında (GenBank, EMBL ve NCBI) sonuçlarının direk olarak karşılaştırılmasını sağlamaktır. Filogenetik çalışmalarda dizi analizi için kullanışlı olduğu ispatlanmış DNA bölgeleri; çekirdek ve mitokondriyal rDNA ve protein kodlayan genlerdir (Bridge et al. 1998).

2.7.3.1 Funguslarda rDNA Bölgesi

PCR amplifikasyonu için seçilecek ideal bölgenin özellikleri (Bruns and Gardes 1993) dikkate alındığında, ribozomal RNA' ların kodlandığı genler (rRNA) bu kriterlerin çoğunu içerir ve kapsamlı bir şekilde analiz edilebilirler. rDNA bölgelerinin çoğaltılması için primerlerin dizayn edilmesi, fungusların taksonomik çalışmalarını oldukça kolaylaştırmıştır (White et al. 1990).

Protein sentezi tüm organizmalarda ortak olduğundan organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA' lar üstün moleküllerdir. rRNA dizi analizlerinin sonuçları ve moleküler genetik çalışmalar doğru filogenetik ağaçların elde edilmesini sağlamıştır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).



Şekil 2.5 Funguslarda rDNA bölgesi (Boysen et al. 1996)

Funguslarda çekirdek rDNA (rRNA gen bölgesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur. rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondrilerde bulunur ve oldukça korunmuş, değişken bölgelerden meydana gelir (White et al.1990). Her bir birimde üç rRNA geni bulunmaktadır: Küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.). gen kümesinin sonunda yer alan 5S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir veya olmayabilir. 5.8S rRNA geni ise funguslarda mitokondriyal genomda bulunmaz. Korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunur. LSU ve SSU genleri funguslarda birçok çalışmada kullanılmıştır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2007). Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeleri, transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (internal transcribed spacer-ITS) ve genler arası bölge (intergenic spacer-IGS) olarak adlandırılır. Bunlar alt birim dizilerinden daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki yada tür içi (intraspesifik) populasyonlar arasındaki çalışmalarda geniş oranda kullanılmaktadır. Funguslarda 18S rDNA bölgesi yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında kullanışlıdır. Kodlanmayan bölge (ITS ve IGS) hızlı bir evrim geçirir ve bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırması için kullanışlıdır. 28S rDNA' nın bazı bölgeleride türler arasında değişkendir (Lee and Taylor 1992).

2.7.3.2 ITS (Transkripsiyonu Yapılmayan Bölgeler) Bölgesi

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, SSU ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de LSU rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2 bölgesi) yer almaktadır. ITS bölgesi bazı özelliklerinden dolayı moleküler karakterizasyon çalışmaları için kullanışlıdır (White et al. 1990, Lee and Taylor 1992):

- ITS bölgesi küçüktür(500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir.

- rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik yada oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir.

- ITS bölgesi morfolojik açıdan farklı türler arasında değişken olabilir ve ITS-RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir.

- ITS türe özgü problemleri, hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı birçok araştırmacı türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir.

White ve arkadaşlarının (1990) dizayn ettikleri ITS primerleri, farklı funguslara ait birçok ITS dizisinin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Böylelikle, bazı cinslerin (örneğin *Colletotrichum*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Fusarium*) türleri arasındaki filogenetik ve taksonomik ilişkiler belirlenebilmiştir.

2.7.3.3 β -tubulin ve Kalmodulin Genleri

Mikrotubulinler α ve β -tubulin ailesinden olup, heterodimer yapıdadırlar. Bu gen ürünleri morfolojik değişikliklere sebep olduklarından türlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır. Bu nedenle fungusların identifikasyonunda, bu gen bölgelerindeki farklılıklar önem taşımaktadır. İlk defa Morris ve arkadaşları tarafından bu gen üzerinde yapılacak mutasyonların, mikrotubulin iskeleti çalışmalarında faydalı olabileceği bildirilmiştir. Elektroforez çalışmalarında özellikle izoelektrik noktaları farklı α ve β -tubulin' ler olduğu saptanmıştır. Çalışmalar β tubulin'in $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ olmak üzere 3 farklı biçimde olduğunu göstermiştir. $\beta 1$ ve $\beta 2$ tubulinin *benA* geni tarafından, $\beta 3$ ' ün ise *tubC* geni tarafından kodlandığı bildirilmiştir (Oakley 2004).

Hu ve arkadaşları (2007), β -tubulin genlerinin *Pestalotiopsis* türlerinde 450 bp olduğunu bulmuşlardır. Çalışmacılar ITS ve β -tubulin kombinasyonunun ise 1049 bp olduğunu saptamışlar ve strainler arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemede yararlı

olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışma, ITS genlerine göre β -tubulin genlerinin filogenetik çalışmalarda daha güvenilir olduğunu, ancak bu genlerin birlikte çalışılmasının filogenetik çalışmalarda bazı sorulara cevap olabileceğini göstermiştir.

Kalmodulin korunmuş asidik monimerik yapıda bir polipeptiddir. Molekül ağırlığı 16.700 dalton bu protein, ökaryotik hücrelerde bulunur ve memelilerdeki kadar farklılık gösterir. Bu protein yeşil bitkilerde, funguslarda, insanlarda, tavuklarda, ratlarda ve mayalar vb. canlılarda çalışılmıştır. Tavuklarda kalmodulin genleri 5 intron içerirken *Drosophila*' da 3 intron bölgesi içerdiği saptanmıştır. *Trypanosome*' da kalmodulin genlerinin 3 tekrarlayan sekanslarının bulunduğu ve intronlarının olmadığı görülmüştür. DNA hibridizasyon deneylerinde *Xenopus* ve *Dictyostelium*' un kalmodulin genlerinin intronsuz olduğunu bildirmişlerdir. Bu genin kodladığı protein; büyümede, enerji gerektiren aminoasit, şeker ve nükleosid transportunda, sporulasyon proseslerinde kalsiyuma bağımlı olarak çalışır. Bu nedenle *Achlya*' larda hücrel homeostasiste çok önemli rol oynadığı düşünülmektedir (LeJohn 1989). Serra ve arkadaşları (2006), *A. ibericus*' u diğer *Nigri* üyeleri ile karşılaştırmışlardır. Kalmodulin genlerinin; *A. ibericus* ve *A. carbonarius* strainleriyle diğer siyah *Aspergillus* türlerine göre yüksek homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Diğer yandan *Fusarium* ve *Giberella fujikuroi* kompleks türlerinin filogenetik analizler içinde kalmodulin genleri ile yapılan analizlerin oldukça güvenilir olduğu (O' Donnell et al. 2000) ve populasyon genetik çalışmalarında bu gen bölgesi kullanımının faydalı olabileceği bildirmişlerdir (Serra et al. 2006).

O' Donnell ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (2000); filogenetik analizlerde coğrafik tür farklılıklarının ortaya konmasında, birden fazla gen bölgesinin analiz edilmesini önermişlerdir. Böylece özellikle patojen türlerin hem coğrafik bölgelere göre dağılımındaki farklılıklar ortaya konabilecek hemde türler arasındaki strain farklılıklarının açığa çıkarılacaktır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Geliştirme İçin Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1 Medyum D

NaCl.....	206 g
KCl.....	0,37 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	36 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
MnCl ₂	0,013 g
Yeast Ekstrakt.....	5 g
Distile Su.....	1 lt

pH 7' ye ayarlanarak 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Oren 1999).

3.1.1.2 Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Malt Ekstrakt Agar.....	65 g
Distile Su.....	1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M8 izolatı için besiyeri içine 206 g NaCl katılarak pH 7' e ayarlanıp steril edilmiştir (Harrigan et al. 1966).

3.1.1.3 Rose Bengal Kloramfenikol Agar (RBCA)

RBCA.....	32,15 g
Distile Su.....	1 lt

Çeşitli NaCl konsantrasyonları hazırlanıp, distile suda çözülüp pH 7 'ye ayarlanıp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Pitt and Hocking 1985).

3.1.1.4 Czapek Dox Agar (CZ)

CZ.....65 g
Distile Su.....1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M8 izolatu için besiyeri içine 206 g NaCl katılarak pH 7' e ayarlanıp steril edilmiştir (Harrigan et al. 1966).

3.1.1.5 YMS Besiyeri

Yeast Ekstrakt.....10 g
Malt Ekstrakt10 g
Sükroz.....10 g
Distile Su.....1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M8 izolatu için besiyeri içine 206 g /lt NaCl katılmıştır (Zafar et al. 2007).

3.1.2 Yağ Asidi Analizi İçin Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

SDA.....65 g
Distile Su.....1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M8 izolatu için besiyeri içine 206 g NaCl katılarak pH 7' e ayarlanıp steril edilmiştir.

3.1.2.2 Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

SDB.....	30 g
Distile Su.....	1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M8 izolatı için besiyeri içine 206 g NaCl katılarak pH 7’ e ayarlanıp steril edilmiştir.

3.1.3 Geleneksel Yöntemle İdentifikasyonda Kullanılan Besiyerleri

3.1.3.1 Czapek Konsantresi (*Penicillium* ve *Aspergillus sp.* için)

NaNO ₃	30 g
KCl.....	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,1 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,1 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O.....	0,05 g
Distile Su.....	100 ml

Distile su ile iyice karıştırılıp, steril edilmeden besiyerlerine eklenmiştir (Pitt 2000, Klich 2002).

3.1.3.2 Czapek Yeast Agar (CYA25, CYA37) (*Penicillium* ve *Aspergillus sp.* için)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek Konsantresi.....	10 ml
Yeast Ekstrakt.....	5 g
Sükroz.....	30 g
Agar.....	15 g
Distile Su.....	1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Pitt 2000, Klich 2002).

3.1.3.3 Malt Ekstrakt Agar (MEA) (*Penicillium* ve *Aspergillus sp.* için)

Malt Ekstrakt.....	20 g
Pepton.....	1 g
Glukoz.....	20 g
Agar.....	20 g
Distile Su.....	1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Pitt 2000, Klich 2002).

3.1.3.4 %25 Glycerol Nitrat Agar (G25N) (*Penicillium sp.* için)

K ₂ HPO ₄	0,75 g
Czapek Konsantresi.....	7,5 ml
Yeast Ekstrakt.....	3,7 g
Gliserol.....	250 g
Agar.....	12 g
Distile su.....	750 ml

Distile suda çözülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Pitt 2000).

3.1.3.5 Czapek Yeast Agar (%20 Sükroz CY20S) (*Aspergillus sp.* için)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek Konsantresi.....	10 ml
Yeast Ekstrakt.....	5 g
Sükroz.....	200 g
Agar.....	15 g

Distile Su.....1 lt

Distile suda çözülüp 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Klich 2002).

3.1.3.6 Czapek Dox Agar (CZ) (*Aspergillus sp.* için)

Czapek Konsantresi.....10 ml

K₂HPO₄.....1 g

Sükroz.....30 g

Agar.....17,5 g

Distile Su.....1 lt

Distile suda çözülüp 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Klich 2002).

3.1.4 Yağ Asidi Analizi Çözeltileri

3.1.4.1 Reagent I (Saponifikasyon ayıracı)

Sodyum Hidroksit (ACS).....45 g

Metanol (HPLC saflıkta).....150 ml

Deionize Distile Su.....150 ml

3.1.4.2 Reagent II (Metilasyon ayıracı)

6.00 N Hidroklorik Asit.....325 ml

Metanol (HPLC saflıkta).....275 ml

3.1.4.3 Reagent III (Ekstraksiyon ayıracı)

Heksan (HPLC saflıkta).....200 ml

Metilert-butyl eter (HPLC saflıkta).....200 ml

3.1.4.4 Reagent IV (Yıkama)

Sodyum Hidroksit (ACS).....10,8 g
Metanol (HPLC saflıkta).....900 ml

NaCl:40 g ACS NaCl 100 ml deionize suda çözülmüş, yeterli çökeltme olamayan durumlarda damlatılır (Telefoncu 2003).

3.1.5 DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

3.1.5.1 Lysis-Buffer Hazırlanışı

TritonX-100.....2 ml
SDS.....1 g
NaCl (100mM).....0,5844 g
Trisma Base(10mM) pH:8.....0,121 g
EDTA (1mM).....0,0292 g

Distile suyla 100 ml' ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır (Van Burik et al. 1998, Janso et al. 2005).

3.1.5.2 T₁₀E₁ (TE için) Hazırlanışı

Tris-HCl (10 mM).....0,1576 g
EDTA (1mM).....0,029224 g

Distile suyla 100 ml' ye tamamlanır. pH 8' e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Janso et al. 2005).

3.1.5.3 0.3 M'lık Sodyum Asetat (Na-asetat) Hazırlanışı

Na-asetat2,4609 g

Distile Su.....100 ml

Distile suyla çözülür ve oda sıcaklığında saklanır (Janso et al. 2005).

3.1.5.4 3 M'lık Sodyum Asetat(Na-asetat) Hazırlanışı

Na-asetat24,609g

Distile Su.....100 ml

Distile suyla çözülür ve oda sıcaklığında saklanır (Janso et al. 2005).

3.1.6 Moleküler Yöntemle İdentifikasyonda Kullanılan Çözeltiler

3.1.6.1 3 M'lık Sodyum Asetat (Na-asetat) Hazırlanışı

Na-asetat24,609 g

Distile Su.....100 ml

pH 5.2 ye ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır.

3.1.6.2 100 mM'lık Disodyum EDTA (Na₂-EDTA)

Na₂-EDTA.....3,3621 g

Distile Su.....100 ml

pH 8.0' e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır.

3.1.6.3 Durma Solüsyonu (Genome Lab™ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit 608120)

3 M Na-asetat pH:5.2.....20 µl

100 mM Na₂-EDTA pH:8.0.....20 µl

20 mg/ml Glikojen (in DTCS kit).....10 µl
Distile Su.....50 µl

Durma solüsyonu taze olarak hazırlanıp kullanılır.

3.1.6.4 % 85'lik Etanol Hazırlanışı

Etanol.. Absolute.....85 ml
Distile Su.....15 ml

3.1.7 Elektroforez Yürütme Tamponu (TAE 50X)

Trisma Base.....242 g
Asetik asit.....57,1 ml
EDTA (0.5 M pH 8).....100 ml
Distile Su.....1 lt

pH 8' e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook et al. 1989).

3.1.8 Kullanılan Kimyasal Maddeler

NaCl (Merck 1.06404.5000)
KCl (Carlo Erba 360107)
MgSO₄.7H₂O (Merck 1.05886.1000)
FeSO₄. 7H₂O (Fluka 44970)
ZnSO₄. 7H₂O (Fluka 96500)
CuSO₄. 5H₂O (Riedel-de Haën 12849)
CaCl₂. 2H₂O (Merck 1.02382.0500)
MnCl₂ (Aldrich 450995)
K₂HPO₄ (Merck 1.05101.1000)
NaNO₃ (Fluka 71757)
Agar (Fluka 05039)

Agaroz (Sigma A-2929)
Yeast Ekstrakt (Fluka 09182)
Czapek Dox Agar (Merck 1.05460.0500)
Sabouraud Dextrose Agar (BBL B11584)
Sabouraud Dextrose Broth (DIFCO DF0382-17-9)
Malt Ekstrakt (Fluka 70167)
Malt Ekstrakt Agar (Fluka 70145)
Rose Bengal Kloramfenikol Agar (Fluka 17211)
Sükroz (Merck 1.07653.1000)
Glukoz (Fluka 49150)
Pepton (Ambresco J636)
Trisma Base (Sigma T-1503)
EDTA (Fluka 03620)
Tris-HCl (AppliChem A3452,0250)
Na-asetat (Fluka 71181)
Na₂-asetat (Biomol 51302)
Gliserol (Ambresco 65516)
Triton X-100 (Sigma X-100)
Etanol (Carlo Erba 414608002)
Asetik Asit (Sigma A-9967)
SDS (AppliChem A2263,1000)
Sodyum Hidroksit (AppliChem A1551,1000)
Metanol (Riedel-de Haën 34860)
Hidroklorik Asit (6.00 N) (Carlo Erba 403872)
Heksan (Merck 1.04391.2500)
Metiltert-butyl Eter (Riedel-de Haën 34875)
Lactophenol Blue Solution (Fluka 61335)
Kurşun Nitrat (Sigma L-6258)
Nikel Klorür (Aldirich 451193)
Potasyum Kromat (Fluka 60141)
Çinko Klorür (Fluka 96470)
Kadmiyum Klorür Monohidrat (Riedel-de Haën 11709)

Kobalt Klorür Hexahidrat (Fluka 60820)

Bakır sülfat (Fluka 61230)

3.2 Metod

3.2.1 Fungus İzolasyonu

Tuzcul fungusların izolasyonu İzmir Çamaltı Tuzlası ve Iğdır/Tuzluca ilçesi kaya tuzu yatağı olmak üzere 2 istasyondan yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Fungal izolasyon örneklerinin özellikleri.

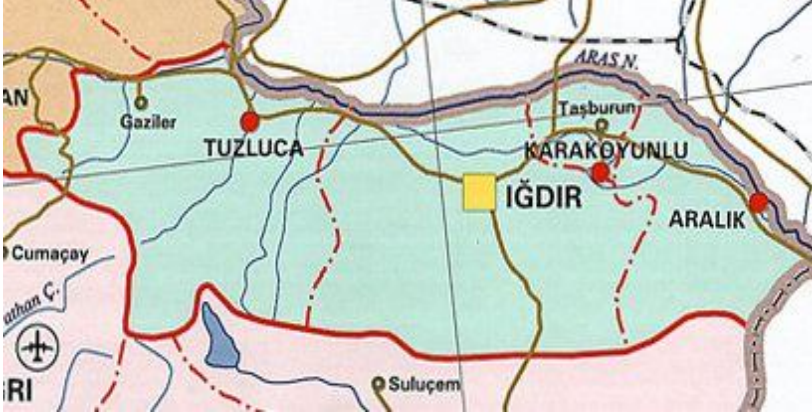
Örnek No	Alındığı Yer	Koordinatları
1	2. Kısım R-5 Yanı	38.28.48.N 26.55.44 E
2	R-1 Havuz Yanı	38.28.42 N 26.55.44 E
3	1. Kısım 14-d Sıcak Su Havuzu Yanı	38.10.09 N 26.53.52 E
4	2. Kısım 3-B Yanı	38.28.49 N 26.56.09 E
5	41. Kristalize Havuzu Kenarı	38.29.24 N 26.54.16 E
6	Iğdır/ Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı	-

İzmir Çamaltı Tuzlası' ndan Ekim 2005 tarihinde toprak örnekleri steril koşullarda alınarak en kısa süre içerisinde soğuk zincirde laboratuara getirilmiş ve analizlerine başlanmıştır.



Şekil 3.1 İzmir Çamaltı Tuzlası (3)

Kaya tuzundan fungus izolasyonu için Iğdır/Tuzluca ilçesi kaya tuzu yatağından Ocak 2005 tarihinde örnek alınmıştır.



Şekil 3.2 Iğdır/ Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı (4)

İzolasyon için alınan her bir toprak örneği veya kaya tuzu örneği; 1 g örnek 9 ml distile su içerisinde vortekslenerek 10^{-4} e kadar dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Dilüsyon serileri %10-15-20- 25 NaCl bulunan Rose Bengal Chloramfenicol Agara (RBCA) 0.1 ml örnek yayma ekim yöntemi ile ekilmiştir. Ekimi yapılan petri ler 28 °C’de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Tüm ekimler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen saf koloniler uygun geliştirme ortamlarına ekilmiştir (Martin 1949).

Çalışma sırasında elde edilen saf kültürler %15’lik gliserol içerisinde stoklanarak -85 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.1 Fungusların Tek Spor İzolasyonu

Funguslarda tek spor izolasyonunun yapılmasının genetik çalışmalar için gerekli olduğu bazı çalışmalarda vurgulanmıştır. Bunun için çalışmamızda; izole ettiğimiz fungusların CZ agara çizgi ekimleri yapılmıştır. Birkaç günlük inkübasyondan sonra tek spor düşen kısımlardan iğne özeye küçük bir kısım agarla birlikte kesilerek geliştirmek için malt ekstrat agara ekimleri yapılmıştır (Goh 1999, Choi et al. 1999).

3.2.2 İdentifikasyon

3.2.2.1 Geleneksel Yöntemle İdentifikasyon

Geleneksel yöntemle identifikasyonda tüm izolatlar için Fungi Imperfect (Barnett and Hunter 1998) ve her genus için yayınlanmış olan identifikasyon kılavuzları kullanılarak makroskobik ve mikroskobik incelemelerle tanımlama yapılmıştır. Ayrıca fungusların mikroskobik incelemesi Lacto-cotton blue mounting çözeltisindeki preparatlarla yapılmıştır (Sime et al. 2002).

Penicillium cinsine ait türlerin teşhisinde “A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species” (Pitt 2000) ve “Toprak Mikrofungusları” (Hasenekoğlu 1991) eserlerinden yararlanılmıştır. Her bir tür; üç ayrı CYA besiyerinde 5, 25 ve 37 °C’ lerde, MEA, G25N ve CZ besiyerinde 25 °C’ de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plaklardaki kolonilerin makroskobik olarak büyüklüğü (mm cinsinden), şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı incelenmiştir. Işık mikroskopi ile konidiaforun uzunluğu, genişliği, çeper özelliği, fiyalidlerin uzunluğu ve genişliği, konidinin şekli, büyüklüğü ve çeper özelliklerine bakılarak izolatlar teşhis edilmiştir.

Aspergillus cinsine ait türlerin teşhisi “Identification of Common *Aspergillus* Species” (Klich 2002) anahtarı kullanılarak yapılmıştır. Her bir tür; iki ayrı CYA besiyerinde 25 ve 37 °C’ de, CY20S, MEA ve CZ besiyerlerinde 25 °C’ de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plaklardaki kolonilerin makroskobik olarak büyüklüğü (mm cinsinden), şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı incelenmiştir. Işık mikroskopi ile konidiaforun uzunluğu, genişliği, çeper özelliği, vesikülün şekli, genişliği, fiyalidlerin uzunluğu ve genişliği, konidinin şekli, büyüklüğü, çeper özelliğine bakılarak teşhis edilmiştir.

Işık mikroskobunda izolatların mikroskobik görüntüleri fotoğraf makinesi (OLYMPUS 7.1 MP) ile çekilmiştir.

3.2.2.2 Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

Bütün izolatlar yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizi için işleme alınmıştır. Analiz edilecek funguslar Sabouraud Dextrose Agar (SDA)' da 5 gün 28 °C'de inkübe edilmiştir. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) 250 ml'lik flasklara 100 ml konularak, gelişen funguslar inoküle edilmiştir. SDB' de 150 rpm' de 28 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir.

Sıvı fungus kültürleri; steril selüloz filtreler (0.45 µm) ve vakum yardımıyla süzülmüştür. Her bir izolat yaklaşık 100 mg olacak şekilde steril kapaklı cam tüplere tartılmıştır. Tartılan izolatlara saponifikasyon, metilasyon ve ekstraksiyon basamaklarından sonra yağ asitleri elde edilerek standart suşlar ile kıyaslanarak identifikasyonları yapılmıştır. Bu işlemlerin yapılışı aşağıda verilmiştir:

1. Saponifikasyon: 1 ml Reagent I' den aktarılıp 5-10 saniye vortekslenip 5 dakika 100 °C' de bekletilmiş tekrar 5-10 saniye vortekslenerek 100 °C' de 25 dakika bekletilerek hemen soğuk suya konularak soğutulmuştur.

2. Metilasyon: 2 ml Reagent II ilave edilerek 5-10 saniye vortekslenip 80 °C' de 10 dakika bekletilmiş ve hemen soğutulmuştur.

3. Ekstraksiyon: 1.25 ml Reagent III ilave edilerek 5 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılarak üst faz yeni bir tüpe alınmıştır.

4. Yıkama: 3 ml Reagent IV ilave edilerek yatay karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmış ve üst faz viallere alınmıştır (Shutter and Dick 2000).

Yağ asidi identifikasyonları, Sherlock Mikrobial İdentifikasyon Sistemi ile cihaz şartlarına uygun olarak yapılmıştır. Sonuçlar FUNGI kütüphanesinde değerlendirilmiştir.

3.2.2.3 Moleküler Yöntemle İdentifikasyon

DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için malt extract agardaki 7 günlük kültürler kullanılmıştır. 400 µl Lizis-buffer bulunan steril 1,5ml' lik ependorfa bir miktar kültürlerden alınmış, üzerine 400 µl Fenol: Kloroform: İsoamilalkol (PCI) 25:24:1 konularak, ependorfun 0,5 ml çizgisine kadar 0,4-0,6 mm büyüklüğündeki asitle yıkanmış cam boncuklar eklenip parçalama işlemi için 30 dakika vortekslenmiştir (Van Burik ve ark. 1998). Üstteki fazın iyi ayrılması için 13.000 rpm (revolutions per minute)' de 5 dk santrifüjlenip üstteki sıvı faz yeni ependorfa alınmıştır. Üzerine alınan miktar kadar eşit hacimde PCI ilavesi (400 µl) yapıp 5 dakika yavaşça karıştırılmıştır. Tekrar 13.000 rpm de 5 dakika santrifüjlenip, üstteki sıvı faz yeni ependorfa alınmıştır. Bu işlem (PCI ekstraksiyonu) sıvı berrak olana kadar tekrar edilmiştir (2-3 kere). Yeni ependorfa alınan sıvı faz örneğinin, üzerine örneğin 0,1 hacmi kadar 3 M'lık Na-asetat ve 2 hacim soğuk saf etanol (-20°C) ilave edilip, elimizde yavaşça karıştırılarak çöktürme için -20°C' de 30 dakika birinci bekletmeye alınmıştır (istenilen sürede bekletilebilir). Birinci bekletmeden çıkarılan örnekler 10 dakika 13000 rpm de santrifüjlenerek, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Dipteki pellet 200 µl dH₂O'da yavaşça çözdürülüp, üzerine 0,3 M'lık Na-asetat ve 2 hacim soğuk saf etanol ilave edilmiş ve yavaşça karıştırılarak -20°C'de 30 dakika ikinci bekletmeye alınmıştır. İkinci bekletmeden sonra 13000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenip, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pellet beklenen DNA konsantrasyonuna göre 30-50 µl T₁₀E₁ tamponunda çözülmüştür ve -20 °C' de saklanmıştır (Janse et al. 2005).

DNA izolasyonu olup olmadığını görmek için agarose jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için %1'lik jel 1X-TAE tamponuyla hazırlanıp TAE tamponunda 90 V 'ta 50 dakika yürütülmüştür.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Fungus izolatlarının; ribozomal transkripsiyonu yapılmayan bölgelerin (ITS bölgesi) amplifikasyonu ITS1 (Forward-IDT) ve ITS4 (Reverse-IDT) evrensel primerleri kullanılarak yapılmıştır (White ve ark. 1990). Bu amaçla, 25 µl hacimde 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 200 µM deoksiniükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 µM'lık Forward ve Reverse primerleri, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi ve 0,5-2 µl kalıp DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur.

β-tubulin geninin; fungus izolatlarından amplifikasyonunu yapmak için BT2A (Forward-ATQ Oligo) ve BT2B (Reverse- ATQ Oligo) primerleri kullanılmıştır (Glass and Donaldson 1995, O' Donnell and Cigelnik 1997). Bu amaçla, 25 µl hacimde 10X'lik PCR Buffer (MgCl₂ içermeyen- Fisher), 25 mM MgCl₂ (Fisher), 2,5µM dNTPs, 10 µM'lık primerler, 2,5 unite Taq DNA polimeraz enzimi (Fermantas) ve 0,5-2 µl kalıp DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur. Kalmodulin geninin amplifikasyonu için ise, CL1 (Forward- ATQ Oligo) ve CL2A (Reverse- ATQ Oligo) primerleri kullanılmıştır (O' Donnell et al. 2000). β-tubulin geninin amplifikasyon reaksiyonundan farklı olarak 2,5 µM'lık primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Kullanılan primerler ve dizileri (R:G yada A, W:A yada T)

Kullanılan Primerler	Primerlerin Dizileri
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
BT2A	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'
BT2B	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'
CL1	5'-GARTWCAAGGAGGCCTTCTC-3'
CL2A	5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGAC-3'

Reaksiyonlar için Bio-Rad PTC-100 Peltier Thermal Cycler kullanılmıştır.

ITS bölgesinin amplifikasyonları için reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir ;

95 °C 2 dakika (Denatürasyon)

95 °C 1 dakika

53 °C 45 saniye 35 Döngü

72 °C 5 dakika

72 °C 5 dakika

4 °C Süresiz

β -tubulin geninin amplifikasyonları için reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

95 °C 3 dakika (Denatürasyon)

95 °C 1 dakika

55 °C 55 saniye 30 Döngü

72 °C 1 dakika

72 °C 10 dakika

4 °C Süresiz

Kalmodulin geninin amplifikasyonları için reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir;

94 °C 10 dakika (Denatürasyon)

94 °C 50 saniye

56 °C 50 saniye 35 Döngü

72 °C 1 dakika

72 °C 1 dakika

4 °C Süresiz

Elde edilen PCR ürünleri %1' lik agaroz jelde yürütülerek UV transilluminator (Biolab UV DBT. 2000V) üzerinde gözlenip, istenilen bantlar jelden kesilip temiz bir ependorfa konulmuştur.

PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Jelden kesilen PCR ürünlerinin saflaştırılmasında, saflaştırma kiti (Promega Wizard SV and PCR Clean-Up System A9280, A9281, A9282) kullanılmıştır. Jelden kesilen bandların her 10 mg' ı için üzerine 10 µl membran bağlayıcı solüsyon eklenmiş ve vorteksenerek jelin erimesi için 55°C' lik su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Eritilen örnek; toplama tüpü üzerine konulmuş minikolona aktarılmıştır. Bir dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 16.000 rcf (relatif santrifüj kuvveti)' de bir dakika santrifüj edilmiştir. Minikolon başka bir toplama tüpünün üzerine konularak, 700 µl membran yıkama solüsyonu eklenmiştir. Tekrar bir dakika 16.000 rcf' de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde bulunan sıvı dökülüp, minicolum üzerine tekrar 500 µl membran yıkama solüsyonu konulmuştur ve 16.000 rcf' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı dökülüp tekrar bir dakika 16.000 rcf' de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü üzerinden alınan minikolona temiz bir ependorfa konulup, minikolon 50 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübe edilmiş örnek 16.000 rcf' de 1 dakika santrifüj edilip jelden saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri %1' lik agaroz jelde yürütülerek UV transilluminator altında gözlenmiştir. Bu bandların parlaklığına göre dizi analizi öncesi PCR kurulumunda kullanılacak kalıp DNA miktarına karar verilmiştir.

ITS Bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin Genlerinin Dizi Analizi

ITS bölgesinin dizi analizleri için; ITS1 (Forward) ve ITS4 (Reverse) evrensel primerleri kullanılarak ITS bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sırasında her bir örnek için toplam hacim 10 µl olarak ayarlanmıştır. Dizi analizi yapılacak DNA örneğinden 2-2,5 µl, 0,65 µl primer, 6 µl mix (DTCS Quick Start

Master Mix) ve 1,40 µl steril su ile hazırlanan reaksiyonların her biri için PCR şartları aşağıda verilmiştir:

96 °C 20 saniye
50 °C 20 saniye 30 Döngü
60 °C 4 dakika

4 °C Süresiz

Amplifikasyonu gerçekleşmiş örneklerin DNA dizi analizi öncesi saflaştırılması için saflaştırma kiti (DYNAL BIOTECH Dynabeads Sequencing Clean Up 661.01) kullanılmıştır. PCR' dan çıkan tüm örnekler steril ependorfa aktararak reaksiyonun sonlanması için taze hazırlanmış durdurma solüsyonundan 5,5 µl eklenmiştir. Üzerine 20 µl Dynabeads Solüsyonu konulmuş, yavaşça pipetle karıştırılıp 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ependorflar manyetik alana yerleştirilip bir dakika bırakılmıştır. Şeffaf kısım tüpten çekilerek uzaklaştırılmıştır. Bu işlem DNA' nın saf olarak elde edilmesi için birkaç kez tekrar edilmiştir. Üzerine 30 µl %85'lik etil alkol konulmuş ve pipetle karıştırıldıktan sonra manyetik alana yerleştirilip bir dakika bekletilmiştir. Konulan alkol pipetle çekilmiş ve alkolün uçması için 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerine 30 µl örnek yükleme solüsyonu (SLS) konulmuş ve oda sıcaklığında iki dakika inkübe edilmiştir. Tekrar manyetik alana konulup bir dakika sonra şeffaf sıvı çekilip cihaza yerleştirilen örnek plate sırayla aktarılmıştır. Öneklerin buharlaşmaması için örnek plate'lerin üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır. Seperation Plate' de buffer konularak BECKMAN COULTER CEQ 8000 DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiştir.

ITS Bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin Genlerinin Dizi Bilgilerinin Değerlendirilmesi

İzolatların dizi analizi bilgileri NCBI "National Center for Biotechnology Information", (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasındaki verilerle BLASTN (Basic Local Aligment

Search Tool) programıyla dizilerin benzerleri elde edilmiştir. Ayrıca Clustal X 1.8 programıyla benzer dizilerle karşılaştırılmıştır (Thompson et al. 1997).

3.2.3 Ağır Metal Çalışması

3.2.3.1 Ağır Metal Toleransının Belirlenmesi

Çalışmamızda spor süspansiyonu elde etmek için, bütün izolatların önce MEA'a ekimleri yapılmıştır. Yaklaşık 7 gün inkübasyondan sonra, gelişen fungusların üzerine %1' lik Tween 80 çözeltisinden 1 ml konularak spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Thoma lamında, spor süspansiyonlarının dilüsyonlarında spor sayımı yapılmıştır. Spor miktarının 10^6 adet/ml olduğu dilüsyon ağır metal çalışmalarında kullanılmıştır.

Ağır metal miktarı 0,05-10 mg/ml olacak şekilde SDA besiyeri hazırlanmıştır. Ağır metallere; $Pb(NO_3)_2$, $NiCl_2$, K_2CrO_4 , $ZnSO_4$, $Cd(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$ ve $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 'ın funguslar üzerine ağır metal toleransı değerleri belirlenmiştir. SDA besiyerlerine fungusların spot ekimleri yapıldıktan sonra (Zafar et al. 2007) 26 ± 2 °C'de 2-5 gün (M8 izolatı için 10 gün) inkübasyona bırakılmıştır. Fungusların gelişmedikleri en son metal konsantrasyonu metal toleransı olarak saptanmıştır. Bütün ekimler 2 paralel halinde yapılmıştır.

3.2.3.2 Ağır Metal Biyosorpsiyonu

Biyosorpsiyon çalışması için kullanılacak bütün cam malzemeler %5' lik nitrik asitle en az 5 saat bekletilmiş ve malzemelerin yıkanması için distile suda ile bir gece boyunca bekletilmiştir. Kullanmadan önce etüvde kurutulmuştur (Moore 2007).

İzolatlar biyosorpsiyon çalışmasında kullanılmadan önce 100 ml YMS (pH 4.5) besiyeri içeren 250 ml' lik erlenlere ekimleri yapılmış ve gelişmeleri için 25 °C' de 3 gün 125 rpm' de çalkalamalı etüvde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra biyomasın elde edilmesi için 150 µm' lik steril filtre kağıtlarından vakumla süzölmüşlerdir. Süzölen biyomas steril distile suyla besiyeri kalıntısı olmaması için yıkanmıştır.

İzolatların ağır metal direnci belirlenmiştir. Ağır metallere dirençli bulunan izolatlar; *Penicillium chrysogenum* (M1 ve M4) ve *Sagenomella* sp. (M8)' dir. Bu izolatların dirençli buldukları ağır metaller; Pb, Cd ve Zn' dir. Belirlenen ağır metallere Pb'nin 145, 644, 1388 mg/lt konsantrasyonunda pH' ı 5 olacak şekilde, Cd' un; 95, 226, 310 ve 486 mg/lt' lik çözeltileri pH 5 olacak şekilde, Zn' nun ise; 61,9 ve 132,6 mg/lt' deki çözeltileri pH'ı 6 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bütün ağır metallerin stok solüsyonu hazırlanarak steril edilip, steril erlenlere 50 ml konulmuştur. Vakumla süzülen biyomaslar 2,5 g tartılarak erlenlere konulmuştur. Biyomas ve belirli konsantrasyonda ağır metal bulunan erlenler 25 °C' de 125 rpm' de çalkalamalı etüde biyosorpsiyon için bırakılmışlardır. Belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56, 72, 96 ve 120 saat) analiz için ağır metal solüsyonları alınmıştır. Metal solüsyonunun biyomastan ayrılması için 50 ml falkonlara erlenler boşaltılıp 8000 rpm' de 30 dakika santrifüj edilmişlerdir. Ayrılan ağır metal kısmı (sıvı kısım) falkonlara konularak ICP-OES cihazında analiz edilmişlerdir. Ayrılan biyomaslar sıvı azotla parçalanarak biyosorpsiyonun yapıldığı fonksiyonel grupları öğrenmek için FT-IR cihazı kullanılmıştır.

3.2.3.3 Ağır Metal Biyosorpsiyon Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES)

Ağır metal biyosorpsiyon çalışmasında çözeltideki ağır metal miktarının analizi, Anadolu Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi' de ICP-OES (VARIAN 720 ES) cihazı kullanılarak Yrd. Doç. Dr. Semra MALKOÇ tarafından yapılmıştır.

Fourier Transform İnfrared Spektrometre (FT-IR)

Biyosorpsiyon çalışmasında, biyomasın sorpsiyonu yaptığı fonksiyonel gruplarını belirlemek için Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü' de FT-IR (Perkin Elmer Spektrum 100) cihazı kullanılarak Prof. Dr. Alaettin GÜVEN tarafından yapılmıştır.

3.2.3.4 Verilerin Değerlendirilmesi

Ağır metal konsantrasyon verilerine göre (ICP analizi sonuçları) yüzde (%) olarak biyosorpsiyon hesaplanmıştır. Formülü;

$$R = \frac{P_0 - P_e}{P_0} \times 100$$

R = Yüzde (%) biyosorpsiyon

P_0 = Metal iyonları başlangıç konsantrasyonu (mg/lt)

P_e = Metal iyonlarının kalan konsantrasyonu (mg/lt) (Amini et al. 2008)

Langmuir İzoterm Denklemi; aynı enerjiye sahip, biyosorban yüzey üzerinde bulunabilen sabit sayıda alanın biyosorpsiyonla tersinir olduğu varsayımına dayanır.

Ağır metal konsantrasyonları göre denklemdeki veriler hesaplanmıştır. Denklemi;

$$C_e / q_e = 1 / Q_b + C_e / Q$$

Q = Biyosorsiyon kapasitesi (mg/g)

b = Yüzey bağlanma enerjisiyle ilgili sabit (lt/ mg) (Küçükgül ve Kutlu 2006)

Freundlich İzoterm Denklemi; sınırlı bir konsantrasyon aralığında adsorplanmış madde miktarı ile konsantrasyon arasındaki ilişkiyi ifade eden bir adsorpsiyon izotermidir.

Denklemi;

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad \log q_e = \log K_f + 1/n \log C_e$$

n = Yüzey bağlanma enerjisiyle ilgili sabit

K_f = Biyosorsiyon kapasitesi (mg/lt)

q_e = Birim biyosorban ağırlığı başına adsorplanan madde miktarı (mg/g)

C_e = Biyosorpsiyondan sonra çözültide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/lt)

(Küçükgül ve Kutlu 2006)

4. BULGULAR

4.1 İzolatlar

Çalışılan İzmir Çamaltı Tuzlası ve Iğdır/Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı'ndan 8 izolat elde edilmiştir. Bunlar; M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 ve M8 olarak adlandırılmıştır. M8'in izolasyonu Iğdır/ Tuzluca' dan, diğer izolatlar ise Çamaltı Tuzlası'ndan (Örnek 2, 3 ve 4 istasyonlarından) izole edilmiştir. M8 izolatı ancak NaCl (%10-25) içeren ortamlarda gelişebilmektedir.

4.2 İdentifikasyon

4.2.1 Geleneksel İdentifikasyonla Tanımlanan Türler

4.2.1.1 *Penicillium citrinum* Thom, 1910 (M1 ve M4)

Sinonimleri:

P. aurifluum Biourge 1923

P. subtile (Bain. & Sartory) Biourge 1923

P. steckii Zaleski 1927

P. baradicum Baghdadi 1968

Subgenus: *Furcatum*

Section: *Furcatum*

25°C' de 7 günlük inkübasyon sonrasında **Koloni Çapları** (mm): **CYA25** 25–30; **MEA** 14–18; **G25N** 13–18; **CYA37** 0–10; **CYA5** büyüme yok.

CYA25' de koloniler ışımsal sulkat; tekstür kenarlarda kadifemsi merkezde yünümsü; miselyum koloni çevresinde beyaz renkli, merkezi kısımda ise beyaz ya da grimsi turuncu renklidir. Konidia grimsi turkuaz; eksuda renksiz, soluk sarı, soluk kahverengi ya da kırmızımsı kahverengidir. İzolatların büyük çoğunluğu parlak sarı çözünür

pigment üretir; ters yüzey sarı, sarı-kahverengi, kırmızımsı kahverengi ya da zeytin rengidir.

MEA' da koloniler düzgün ya da ışınal sulkat; miselyum beyaz ya da grimsi turuncudur. Konidia kenarlarda grimsi mavi, diğer bölgelerde soluk yeşildir. Ters yüzey soluk kahverengi ya da yoğun sarımsı kahverengi olabilir.

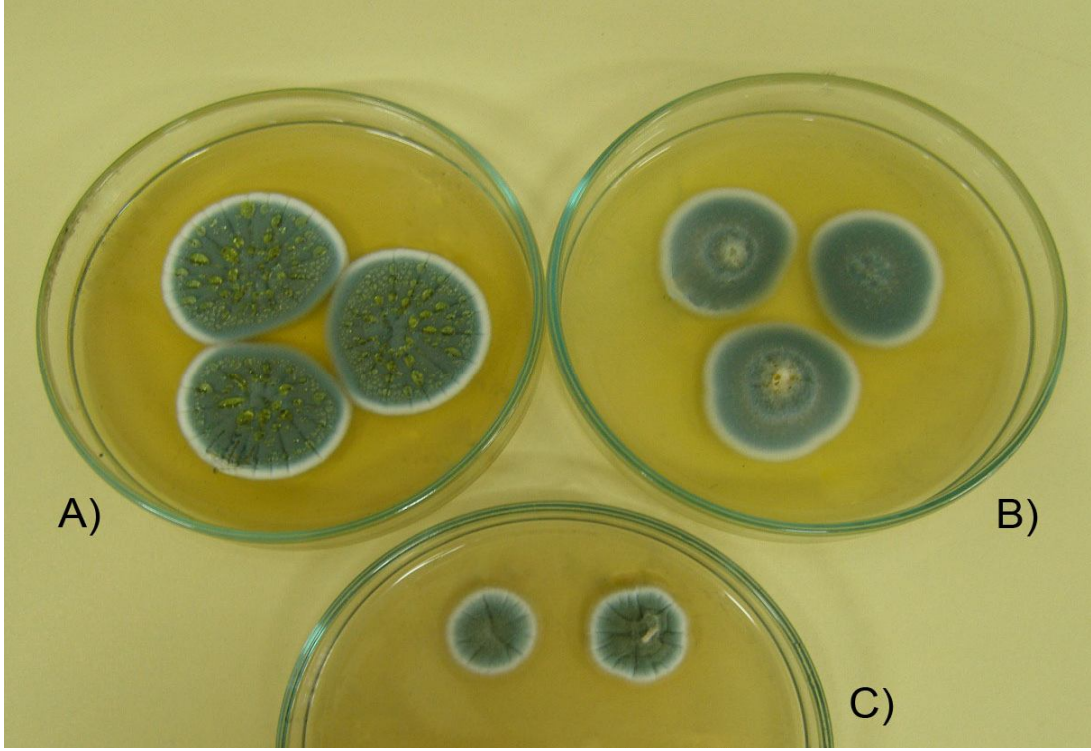
G25N' de koloniler ışınal sulkat, kadifemsi ya da merkezi kısımda yünümsüdür. Konidia soluk yeşil; miselyum beyaz; ters yüzey soluk, soluk kahverengi, sarı ya da zeytin rengidir.

CYA37' de boyutları 10mm' yi bulabilen kırışık beyaz miselyuma sahip koloniler oluşur. Nadir de olsa büyümenin görülmediği de olur.

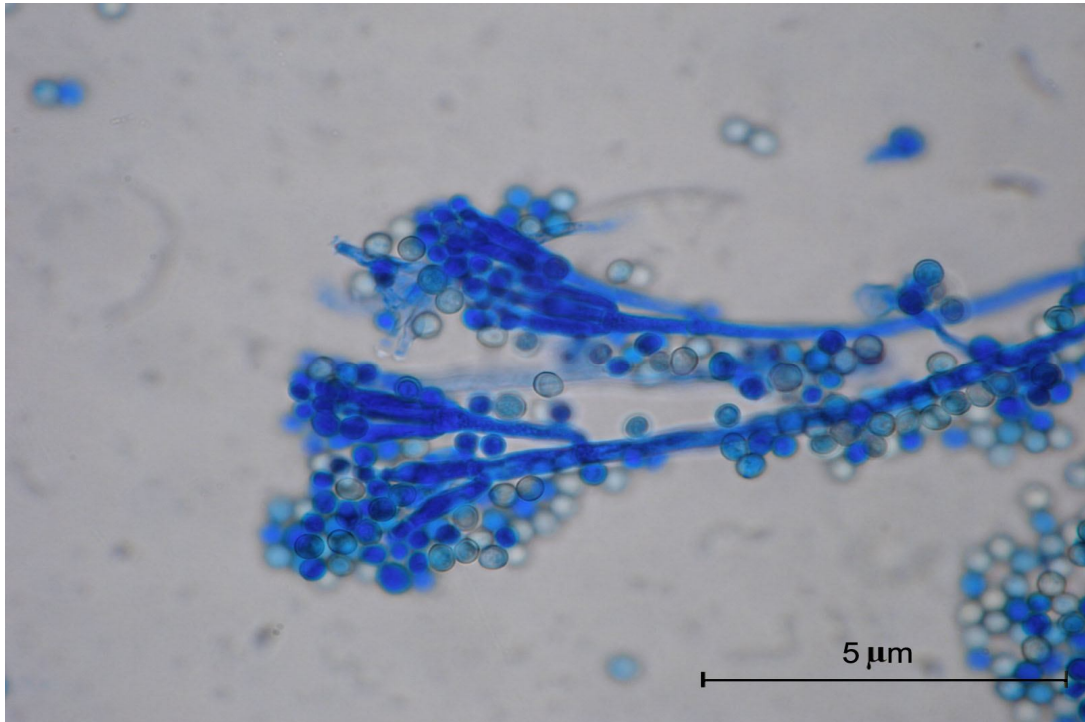
CYA5' de büyüme yoktur.

Mikroskobik karakter özellikleri; konidioforlar alt-yüzey hifleri ya da yüzey hiflerinden çıkar; 100–300 µm uzunluğunda ve düz çeperlidir ve karakteristik olarak 3–5 divergent metula vertisiliyle sonlanır, nadir de olsa bir divergent ramus ya da subterminal ya da interkalar metula ile sonlanabilir. Metula genellikle boy bakımından eşit; 12–15 x 5 µm boyutlarında; genelde spatulat ya da terminal olarak vesikulattır. Phialidler ampulliform; 7–8 (-12) µm uzunluğundadır. Konidia küresel ya da subsferik, 2.2–3.0 µm çapında, düz çeperli ya da hafif pürüzlü çeperlidir ve uzun belirgin kolonlar halinde oluşturulur.

Penicillium citrinum 3-5 divergent metulası ile kolaylıkla ayırt edilebilir. CYA25'deki koloniler bazen merkez kısmında yoğun eksudaya sahip olabilir; MEA'da büyüme daha yavaştır ve yoğun bir sporulasyon mevcuttur.



Resim 4.1 *Penicillium citrinum* petri görüntüsü A) Czapek Yeast Agar' da B) Malt Ekstrakt Agar' da C) %25 Gliserol Nitrat Agar' da görüntüleri



Resim 4.2 *Penicillium citrinum*' um mikroskopik görüntüsü (penicilli ve konidia) (100X)

4.2.1.2 *Eurotium amstelodami* Mangin, 1909 (M2)

Sinonimleri:

A. amstelodami (Mangin) Thom & Raper 1926

E. repens var. *amstelodami* Vuill. 1920

Subgenus: *Aspergillus*

Section: *Aspergillus*

25°C’ de 7 günlük inkübasyon sonrasında **Koloni Çapları** (mm): **CYA25** 14–20; **MEA** 18–22; **CYA20S** 34–59; **CYA37** 2–13; **CZ** 7–19.

CYA25’ de koloniler yeşil, gri yeşil, grimsi turkuaz veya koyu gri renktedir. Miselyum beyaz, sarı veya sarı yeşildir. Kleistotesyumlar sarı; alt yüzeyi renksiz, yeşil veya kahverengi olabilir. Eksuda eğer varsa, renksiz veya kahverengidir. Çözünabilir pigmenti eğer mevcutsa, kahverengidir. Koloniler; alçak, düz veya sulkattır.

MEA’ da koloniler koyu yeşil, fark edilemeyecek beyaz veya sarı miselyumları vardır. Kleistotesyumlar eğer mevcutsa sarı; alt yüzeyi renksiz veya ortaları sarımsıdır. Koloniler yoğun değil, alçak ve granüldür.

CYA20S’ de, soluk veya koyu yeşil renge sahip koloniler olabilir. Miselyum ve kleistotesyumlar CYA25’ deki gibi, genellikle sarı veya yeşildir.

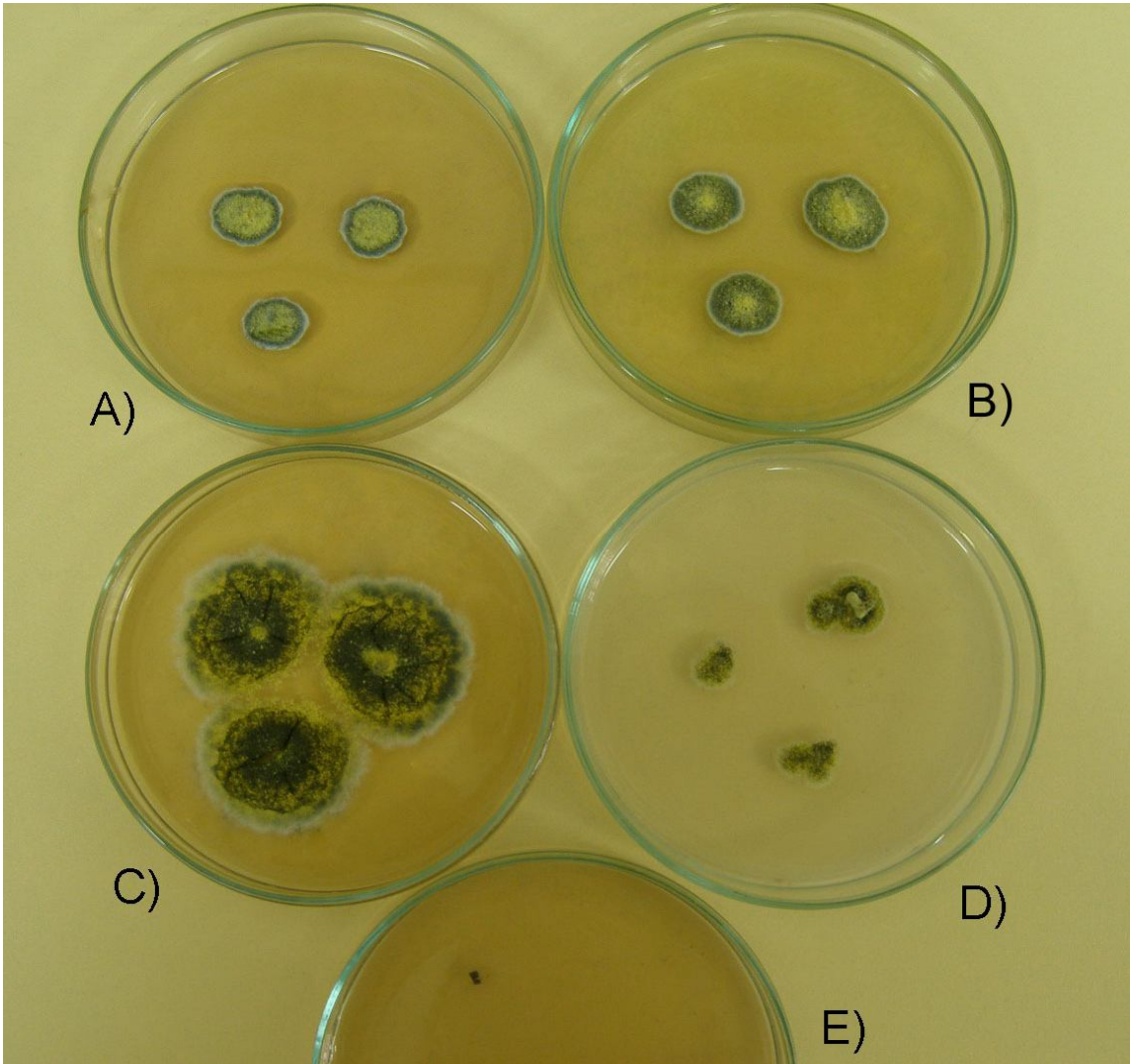
CYA37’ de kolonilerin renkleri genellikle yoğun beyaz, renksiz, yeşil kahverengidir.

CZ’ de koloniler seyrek olmakla beraber, parlak sarı kleistotesyumlar görülebilmektedir. Alt yüzeyinde; velütinoz koloniler sarı veya yeşil renktedirler.

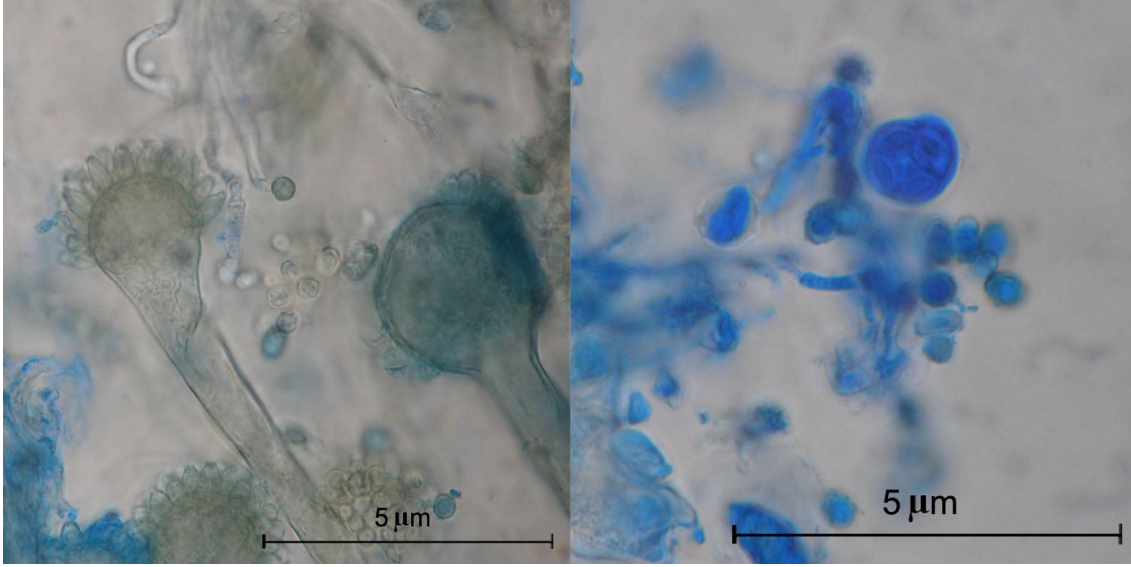
Mikroskopik karakter özellikleri; konidial başlar radyat veya kolumnar genelde 110-300 x 7-12 µm çapında, stipeler düz duvarlı, renksiz veya hafif kahverengindedir. Veziküller globoz 17-30 µm çapında bazen daha büyük, uniseriattır, phialidler 5-8 x 3-

4.5 µm boyutlarındadır ve vezikülün sadece üst üçte ikisini kaplar. Konidia şekil bakımından çeşitlidir; globoz, subgloboz veya elipsoidaldir. Çeperleri genellikle püzlüzdür. Boyutları ise 4-5 µm' dir. Kleistotesyumlar sarı, globoz ile subgloboz, 75-150 µm çapındadır. Askosporlar lentikular 4.5-6 x 3.5-4 µm ölçülerinde, çeperi bütün yüzey boyunca püzlüzdür.

E. amstelodami; CYA20S veya CYA25' de koloni büyüklüğüyle ayırt edilebilirler. Sarı kleistotesyumlara sahiptir ve askosporların her birinin çeperleri pürüzlüdür.



Resim 4.3 *Eurotium amstelodami* petri görüntüsü A) Czapek Yeast Agar (25°C)' da B)Malt Ekstrakt Agar' da C) Czapek Yeast Agar (%20 Sükroz)' da D)Czapek Dox Agar' da E) Czapek Yeast Agar (37°C)' da görüntüleri



Resim 4.4 *Eurotium amstelodami*' nin mikroskopik görüntüsü (konidial baş yapısı, konidia ve kleistotesyum) (100X)

4.2.1.3. *Aspergillus parasiticus* Speare, 1912 (M3 ve M7)

Sinonimleri:

A. parasiticus var. *globosus* Murak. 1966

A. parasiticus var. *sojae* Sakag. & K. Yamada ex Kozak. 1989

A. parasiticus var. *parasiticus* Speare 1912

Subgenus: *Circumdati*

Section: *Flavi*

25°C'de 7 günlük inkübasyon sonrasında **Koloni Çapları** (mm): **CYA25** 60–70; **MEA** 60–70; **CY20S** 60–70; **CYA37** 50–70; **CZ** 45–65.

CYA25' de konidia koyu zeytin rengi ya da koyu yeşil; miselyum beyaz ve genelde gösterişsizdir. Sklerotia nadiren oluşturulur ve kahverengi siyah renklindedir. Eksuda eğer mevcutsa renksizdir. Ters yüzey renksiz, soluk pembemsi kırmızı, soluk sarı ya da kahverengi olabilir; koloniler genelde kadifemsi bazen de yünümsüdür.

MEA' da konidial alanlar zeytin rengi ya da koyu yeşildir; miselyum genelde gösterişsizdir fakat bazen yünümsü öbekler bulunabilir. Ara sıra kahverengi, siyah sklerotia oluşumu gözlenir. Ters yüzey renksiz ya da soluk sarı-soluk yeşil tonlarındadır; koloniler yünümsü ve az yoğundur.

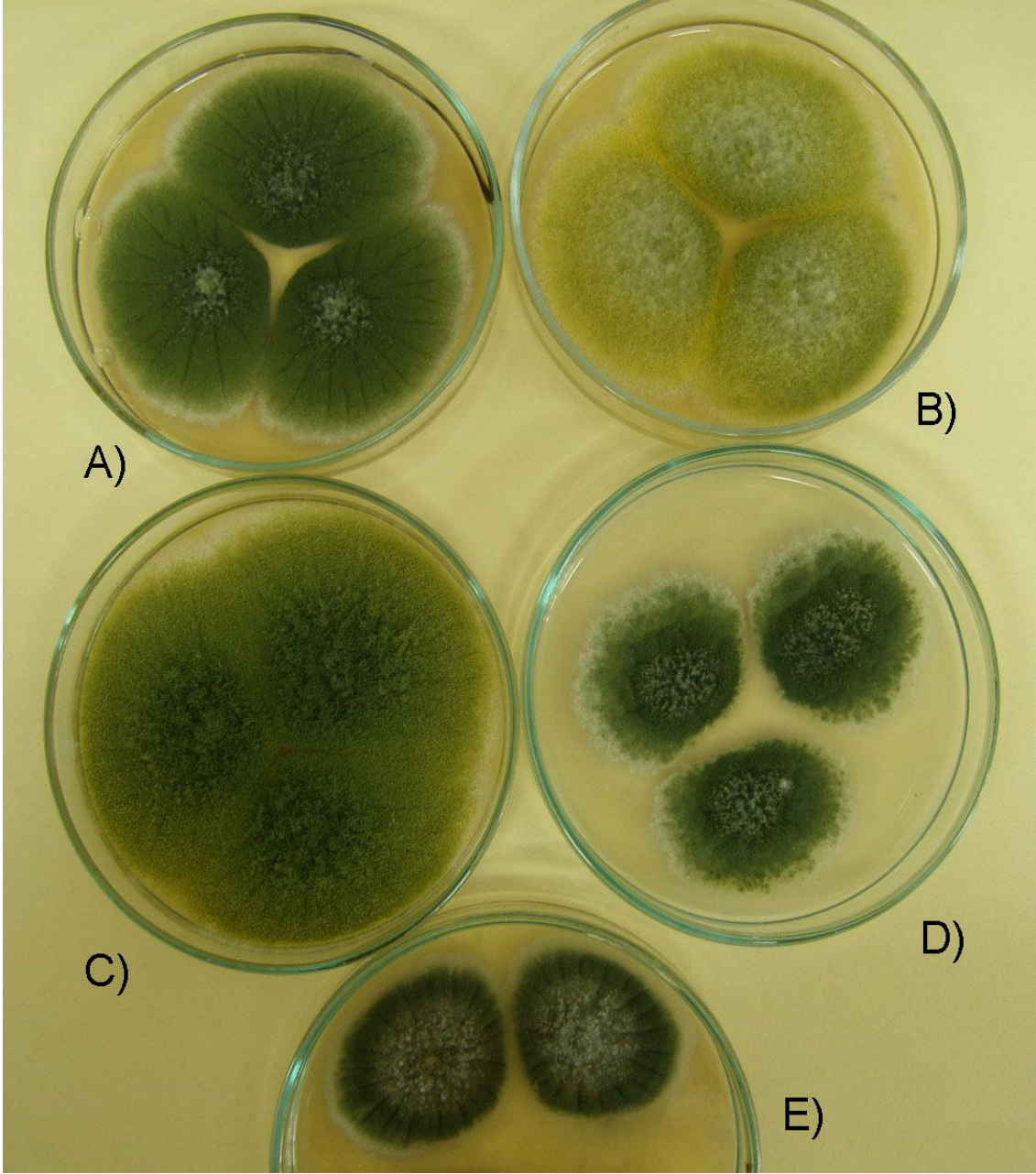
CY20S' de koloniler CYA25' e benzer fakat genelde CYA25' e göre daha sarımsı yeşildir ve ters yüzey sarı, turuncu ve hatta yeşil tonlarındadır.

CYA37'de eksuda görülmez; bazen kahverengi çözünür pigment oluşturulur. Diğer karakteristikler CYA25'e benzer.

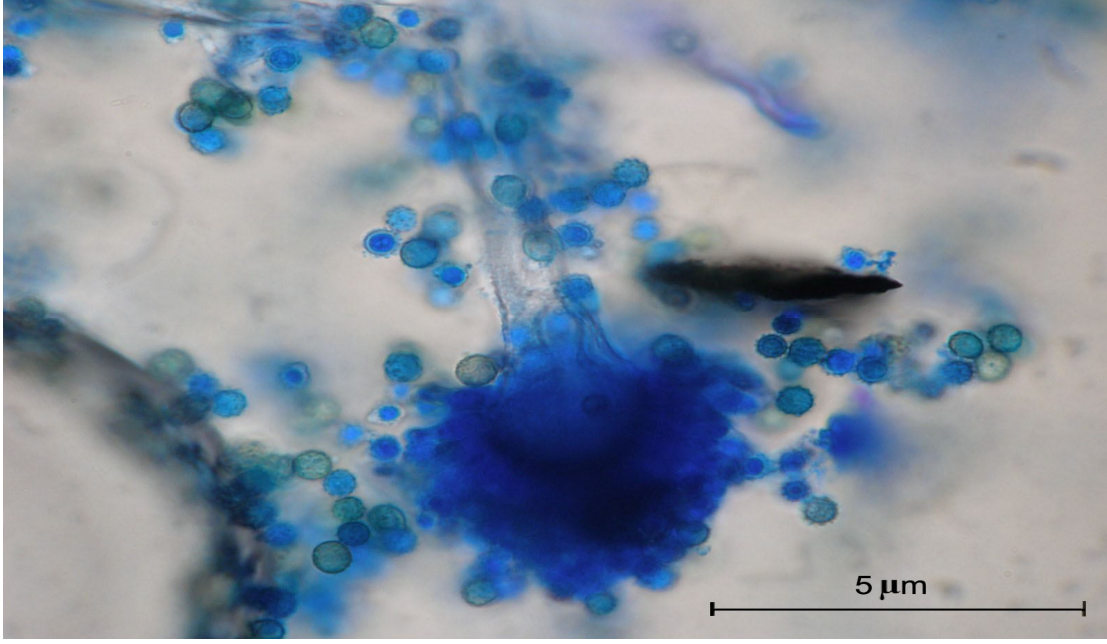
CZ'de koloniler CYA25'e göre daha kadifemsidir, diğer karakteristikler CYA25'e benzer.

Mikroskobik karakter özellikleri; konidial başlar genellikle ışımsaldır. Konidioforlar (100) 250–500 (1100) µm; konidiofor çeperi çok pürüzlü ya da az pürüzlü ve renksizdir. Veziküller (10) 20–435 (40) µm çapında, küresel ya da hafif elongattır. Genelde uniseriattır fakat bazı izolatlarda %20'ye varan biserial baş yapıları görülmüştür. Metula eğer mevcutsa 7–10 (14) x 3–7 µm; phialidler (7) 8–11 x 3–5 (7) µm'dir, metula ve phialidler vezikülün en az yarısını kaplar. Konidia globoz, 3,5– 6 (7) µm çapında ve karakteristik olarak pürüzlü çeperlidir.

Koyu sarımsı yeşil konidial alanlar, belirgin derecede pürüzlü sporlar üreten küresele yakın şekilli olan ve baskın olarak uniseriat olan konidial başlar bu türü diğerlerinden ayırır. *A. parasiticus* *A. sojae*'den daha küçük boyutlu sporları ve koyu yeşil rengi ile ayrılır. *A. flavus*'tan ise sporlarının pürüzlü olması ile ayrılır.



Resim 4.5 *Aspergillus parasiticus* petri görüntüsü A) Czapek Yeast Agar (25°C)' da B)Malt Ekstrakt Agar' da C) Czapek Yeast Agar (%20 Sükroz)' da D)Czapek Dox Agar' da E) Czapek Yeast Agar (37°C)' da görüntüleri



Resim 4.6 *Aspergillus parasiticus*' un mikroskobik görüntüsü (konidial baş yapısı ve konidia) (100X)

4.2.1.4 *Aspergillus niger* Tiegh., 1867 (M5 ve M6)

Sinonimleri:

A. niger var. *niger* Tiegh. 1867

Sterigmatocystis nigra Tiegh. 1877

Subgenus: *Circumdati*

Section: *Nigri*

25°C'de 7 günlük inkübasyon sonrasında **Koloni Çapları** (mm): **CYA25** 55–70; **MEA** 50–70; **CY20S** 68–70; **CYA37** 50–70; **CZ** 40–62.

CYA25'de konidia siyah ya da çok koyu kahverengidir ve yoğundur; hifler genelde gösterişsiz, beyaz ya da soluk sarı renkli; sklerotia, eğer mevcutsa, krem, sarımsı bej, soluk pembe renklidir; eksuda eğer mevcutsa renksizdir. Ters yüzey renksiz ya da sarı renkli olabilir; çözünür pigment bulunmaz ve koloni tekstürü granüler, yünümsü ya da bazen ışınal sulkattır.

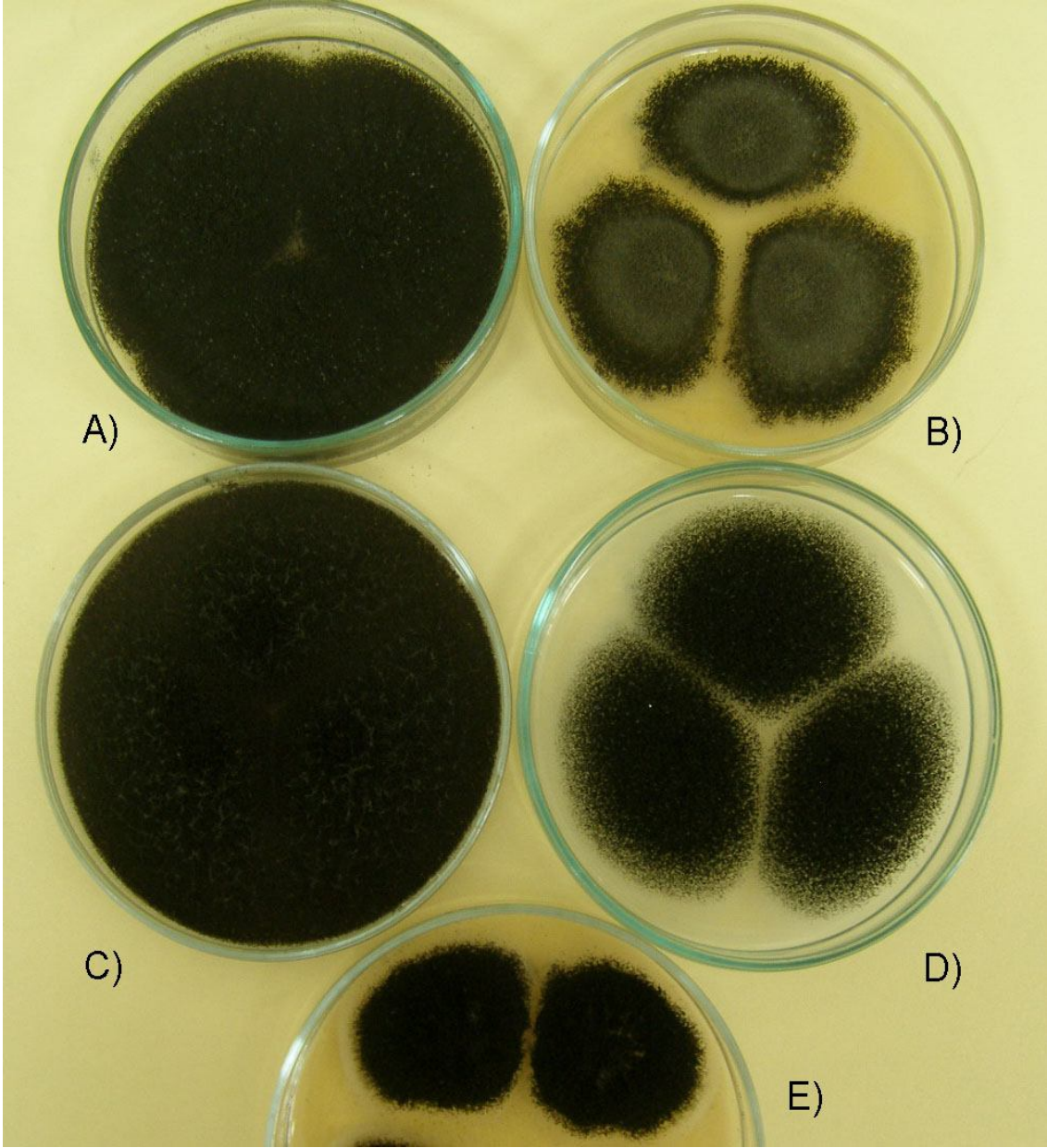
MEA'da konidial alanlar siyah; miselyum beyaz ve gösterişsiz; ters yüzey renksiz; koloniler granüler ya da yünümsüdür.

CY20S'de koloni görünümü CYA25'e benzer fakat ters yüzey rengi genelde daha yoğundur.

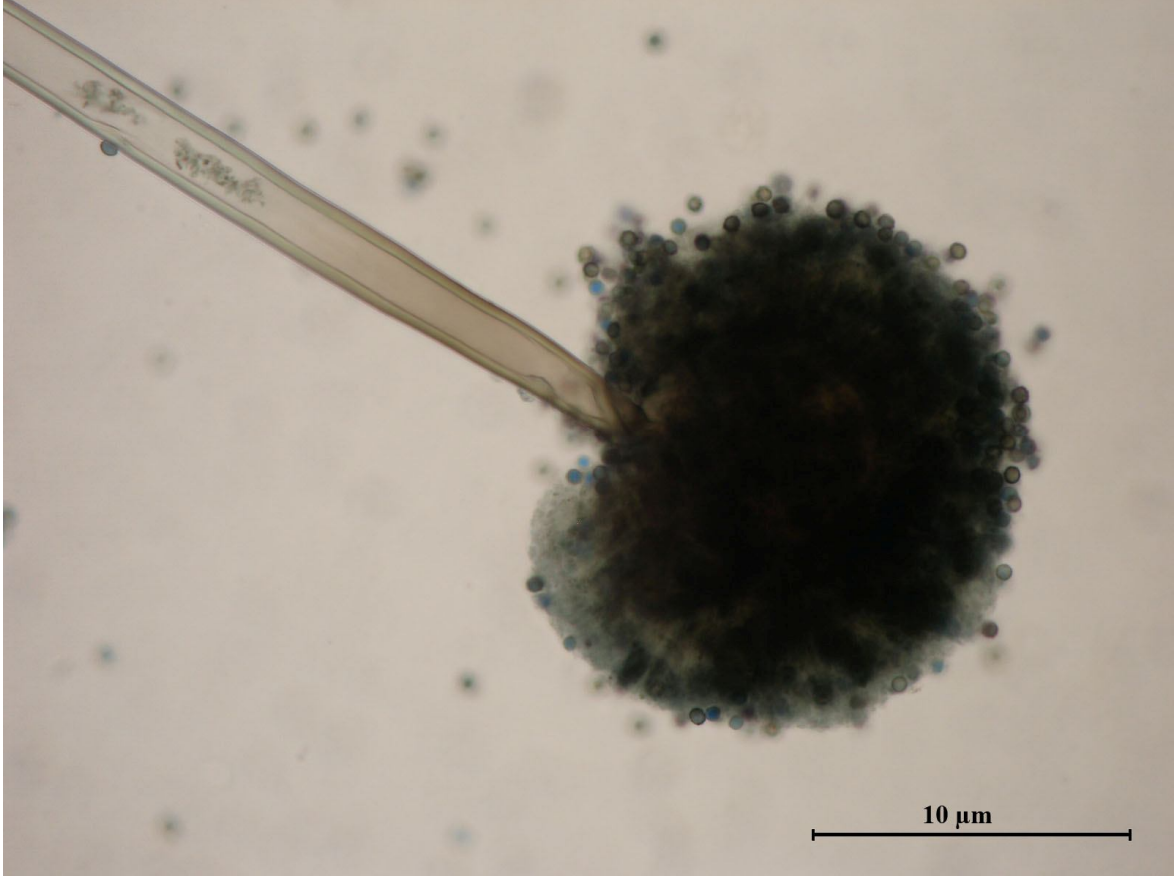
CYA37 ve CZ'de koloniler görünüm olarak CYA25'dekilere benzerler.

Mikroskopik karakter özellikleri; Konidial başlar ışısaldır; konidioforlar (300) 400-3000 x (7) 12-17 (20) μm , konidiofor çeperi düz, hyalin ya da özellikle apikale yakın kısımlarda hafif kahverengidir; veziküller (20) 30-75 (85) μm genişliğinde, küresele yakın; biseriattır (çok nadiren uniseriat). Metula vezikülün tüm yüzeyini kaplar, 12-20 (40) x 3-6 μm boyutlarındadır; phialidler 7-10 x 3-4 μm 'dir. Konidia globoz (3) 3,5-4,5 (5) μm çapındadır; çeperi genelde çok pürüzlü, nadiren az pürüzlüdür.

Yaygın görülen bu tür çok koyu kahverengi ve siyah koloniler, büyük vezikülü ve biseriatt konidial baş, uzun metula ve düzensiz olarak pürüzlenmiş konidiası ile ayırt edilir.



Resim 4.7 *Aspergillus niger* petri görüntüsü A) Czapek Yeast Agar (25°C)' da B) Malt Ekstrat Agar' da C) Czapek Yeast Agar (%20 Sükröz)' da D) Czapek Dox Agar' da E) Czapek Yeast Agar (37°C)' da görüntüleri



Resim 4.8 *Aspergillus niger*' in mikroskopik görüntüsü (konidial baş yapısı ve konidia) (40X)

4.2.1.5 *Sagenomella* sp. W. Gams, 1978 (M8)

Teleomorf: *Sagenoma* Stolk & Orr 1974

Sagenomella türleri daha önce *Acremonium striatisporum* içerisinde gösterilmiştir. Ancak daha sonra W. Gams (1978) tarafından ayrı bir cins olarak tanımlanmıştır (Hasnekoğlu 1991).

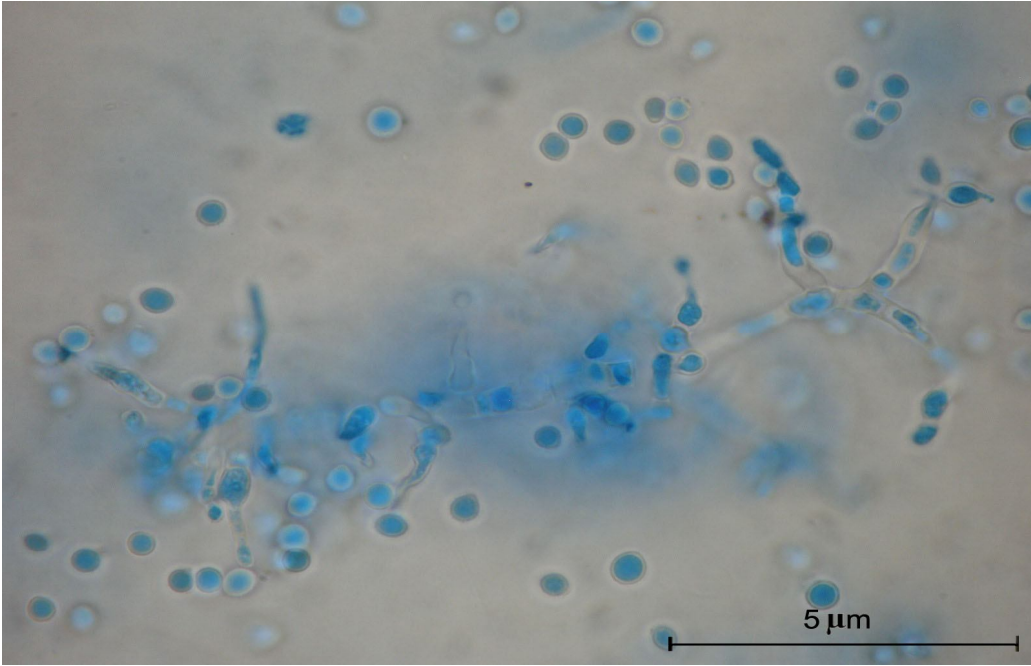
Büyüme oranları ve koloni morfolojisi 25°C' de oldukça azdır. 7 gün inkübasyondan sonra koloniler 11 ile 13 mm boyutlarındadır. Koloniler beyaz veya krem renkli, merkezleri pamuksu ve kenarlara doğru membranözdür. Alt yüzeyi renksiz, ama olgunlaşmayla beraber merkezi soluk kahverengimsi renkte olabilir. Vejetatif hüfler hyalin, 1-2 µm genişliğinde ve duvarları pürüzsüzdür. Fialidler düzensiz şekilde şişkin,

3-15 µm uzunluğunda ve 1-2.5 µm genişliğinde, duvarları pürüzsüz, genellikle simpodiyal olarak proliferasyon göstermekte, fiyalokonidiler zincir şeklinde her iki uçlarında bağlantı kalıntıları (konnektif) bulunmaktadır. Klamidosporlar dikey halde gül şeklindedir. Konidia hiyalin, çeperi pürüzsüz veya hafif pürüzlü, piriform, fusiform veya elipsoidal, 2.5-6.5 µm uzunluğunda, 1.5-4 µm genişliğindedir. Klamidosporlar çok miktardadır, konidiadan daha fazla olarak bulunur ve bu türün tipik bir özelliğidir (Gene et al. 2003).

Hyphomycetes genusu üyelerinden *Sagenomella*'nın; MEA' daki yavaş büyüme hızı başlıca karakteristik özelliğidir. *Sagenomella* türlerinin bazıları, Subramanian tarafından fiyalokonidilerin zincirlerinin birbiriyle bağlantılı olmasından dolayı *Sagrahamala* genusuna dahil edilmişlerdir. Ancak hyphomycetesin farklı türlerinin konidial zincirleriyle yapılan çalışmalar sonucunda, Gams *Sagrahamala*'yı *Acremonium*'un sinonimi olarak düşünmüştür. *Sagenomella* içinde şu anda 12 tür tanımlanmıştır. *Sagenoma ryukyuensi*'in anamorfu, *Talaromyces ocotl* ve Trichocomaceae (Eurotiales) familyasına ait 2 askomycetes bu grupta bulunmaktadır. Ancak *Sagenomella* türlerinin hiçbirinin, strainlerindeki gözlenen morfolojik özelliklerinin bağlantısı tanımlanamamıştır ve bu yüzden yeni bir tür olarak tanımlanması oldukça azdır. Klamidospor üretimlerinin çok olmasından dolayı isimlendirilmektedirler (Gene et al. 2003).



Resim 4.9 *Sagenomella* sp.' nin NaCl içeren Malt Ekstrakt Agar' daki görüntüsü



Resim 4.10 *Sagenomella* sp.' nin mikroskopik görüntüsü (konidia ve konidiyojen yapılar) (100X)

4.2.2 Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Sonuçları

FAME analiz sonucuna göre; 16:0, 18:2 CIS 9,12/18:0 a ve Sum In Feature 8 (18:1 CIS 9 (w9)) yağ asitlerine tüm izolatlarda rastlanmıştır. 18:0 yağ asidi M6 hariç, 15:0 ISO M2 ve M4 hariç, 15:0 ANTESIO M4 ve M7 hariç diğer tüm izolatlarda görülmüştür. 16:1 Cis 7 (w 9), 17:0 CYCLO, C14 Dicarbox/18:1 DMA, 19:1 (w 11), Sum In Feature 5 (16:1 Trans 9 (w7)) yağ asitlerinin varlığı sadece M1 izolatında belirlenmiştir. C10 Primary alcohol, ISO 17:1 at 5 (w 12) ve 17:0 ISO ise sadece M8 izolatında görülmüştür.

M1 ve M4 izolatları aynı olarak tanımlanmalarına rağmen yağ asitlerinde farklılık olduğu belirlenmiştir. Her iki izolattada 14:0, 15:0, 16:1 Cis 9 (w 7), 16:0, 17:0 ANTESIO, 17:1 Cis 9 (w 8) , 17:0, 18:2 CIS 9 12/18:0 a, 18:0 ve Sum In Feature 8 yağ asitleri bulunmaktadır. 15:0 ISO, 15:0 ANTESIO, 16:0 ISO, 16:1 Cis 7 (w 9), 17:0 CYCLO, C14 Dicarbox 18:1 DMA, 19:1 (w 11) ve Sum In Feature 5 yağ asitleri ise sadece M1 izolatında belirlenmiştir. M3 ve M7 izolatları da identifikasyonda aynı tanımlanmalarına rağmen bazı yağ asitlerinde farklılık görülmüştür. 15:0 ISO, 16:0 ISO, 16:0, 18:2 CIS 9 12/18:0 a ve Sum In Feature 8 yağ asitleri iki izolattada belirlenmiştir. Sadece M3 izolatında, 15:0 ANTESIO ve 17:0 ANTESIO yağ asitleri tanımlanmıştır. Aynı şekilde M5 ve M6 izolatlarında;15:0 ISO, 15:0 ANTESIO, 16:0, 18:2 CIS 9 12/18:0 a ve Sum InFeature 8 ortak olmasına rağmen; 14:0, 15:0, 16:1 Cis 9 (w 7), 17:1 Cis 9 (w 8) ve 18:0 yağ asitleri sadece M5 izolatında; 16:0 ISO yağ asidi ise sadece M6 izolatında belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, aynı tanımlanan izolatlarda ortak olmayan yağ asitlerinin belirlenmesinin strain farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

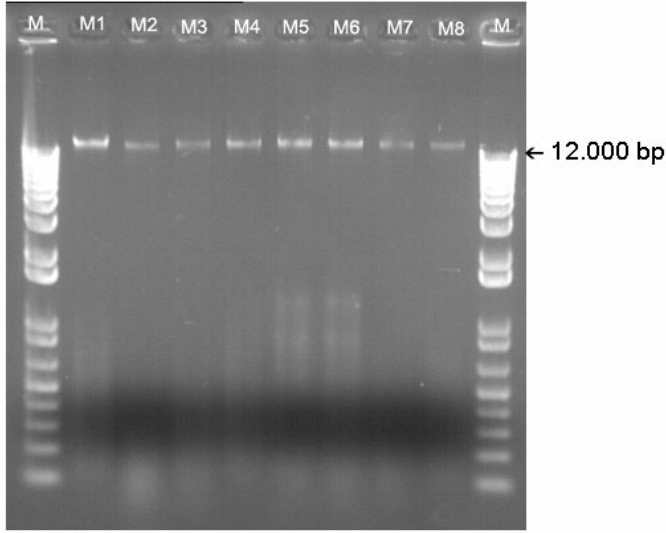
Çizelge 4.1 FAME analizi sonuçları (Sum In Feature 5: 16:1 Trans 9 (w7), Sum In Feature 8: 18:1 CIS 9 (w9))

İZOLATLAR										
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	ORT.	STD. SAPMA
FAME										
14:0	0,51			0,76	0,56				0,61	0,132
15:0 ISO	0,43		2,15		0,52	4,31	4,05	0,43	1,98	1,826
15:0 ANTESIO	1,17	0,93	4,30		0,50	5,14		0,80	2,14	2,364
15:0	2,69			3,15	1,06			0,41	1,82	1,303
16:0 ISO	0,27		4,59			9,21	3,38	0,82	3,65	3,581
16:1 Cis 7 (w 9)	0,16								0,16	-
16:1 Cis 9 (w 7)	0,81			1,86	1,40			1,26	1,58	0,332
16:0	10,15	14,89	14,62	10,57	13,00	15,20	17,65	11,52	13,45	2,957
17:0 ANTESIO	0,49	0,74	2,39	0,81				0,80	1,04	0,865
17:1 Cis 9 (w 8)	15,63	1,63		17,00	0,86			2,04	7,43	7,967
17:0 CYCLO	0,33								0,33	-
17:0	3,06	1,09		2,70				0,77	1,90	1,240
C14 Dicarbox 18:1 DMA	0,31								0,31	-
18:2 CIS 9 12/18:0 a	42,89	71,85	59,53	48,76	50,59	37,63	60,93	48,54	52,64	11,811
18:0	0,65	1,52	2,42	0,69	0,67		4,43	1,46	1,69	1,369
19:1 (w 11)	0,44								0,44	-
Sum In Feature 5	0,27								0,27	-
Sum In Feature 8	18,73	7,34	10,00	13,70	30,43	28,52	9,54	29,38	18,45	10,373
C10 Primary Alcohol								0,26	0,26	-
Iso 17:1 at 5 (w 12)								0,93	0,93	-
17:0 ISO								0,56	0,56	-

4.2.3 Moleküler Yöntemle İdentifikasyon

4.2.3.1 DNA İzolasyonu

İzmir Çamaltı Tuzla' sı ve Iğdır/Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı'ndan toplam 8 fungus izole edilmiştir. İzolatların DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların agaroz jelde varlığını gözlemek için; 3 µl DNA örneği ve 1 µl örnek yükleme boyası karıştırılıp %1'lik agaroz jelde 90 voltta yürütülmüştür. Jel UV transilluminatörde incelenmiş ve görüntülenmiştir.



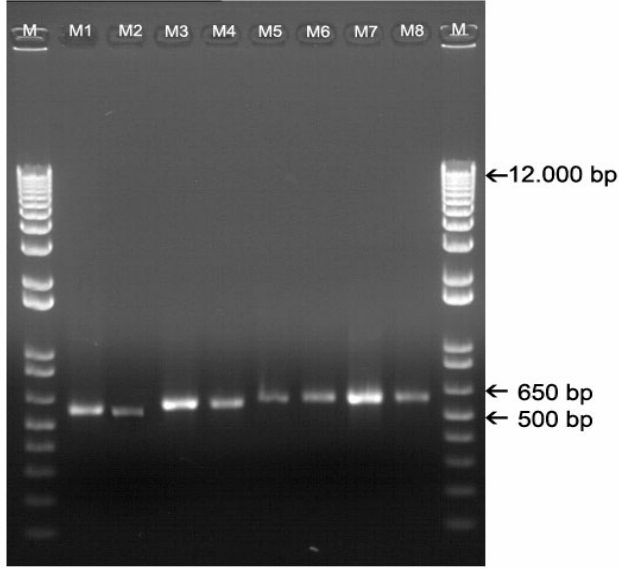
Şekil 4.1 İzolatların DNA izolasyonuna ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker (İnvitrogen 10787-018) ve İzolatlar:M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8)

4.2.3.2 ITS Bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin Genlerinin PCR Sonuçları

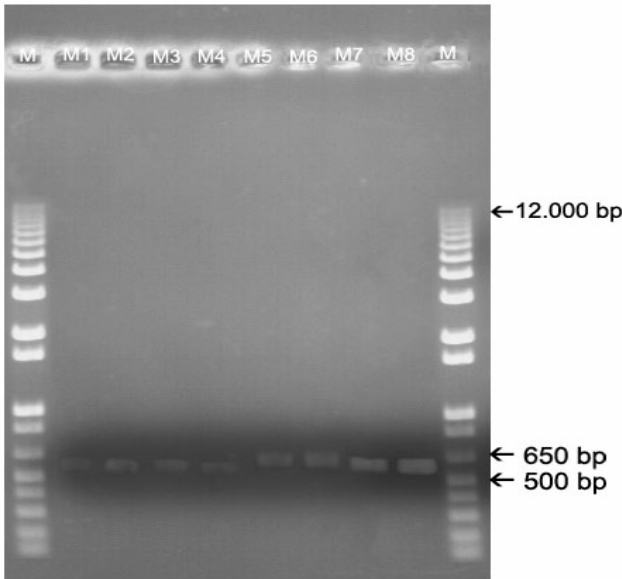
İzole edilen DNA'ların ITS bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. PCR'dan sonra PCR ürünlerinin varlığını gözlemek için her bir örnek tüpünden 5 µl alınmış ve 1µl örnek yükleme boyası ile karıştırılıp, %1'lik agaroz jelde 90 voltta yürütülmüştür. Jel UV transilluminatörde incelenmiş ve görüntülenmiştir.

DNA dizi analizinde kullanmak için; görüntülenen her bir PCR ürünü jelden kesilerek tüpte toplanıp, kit yardımıyla saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma ürünlerinin varlığını

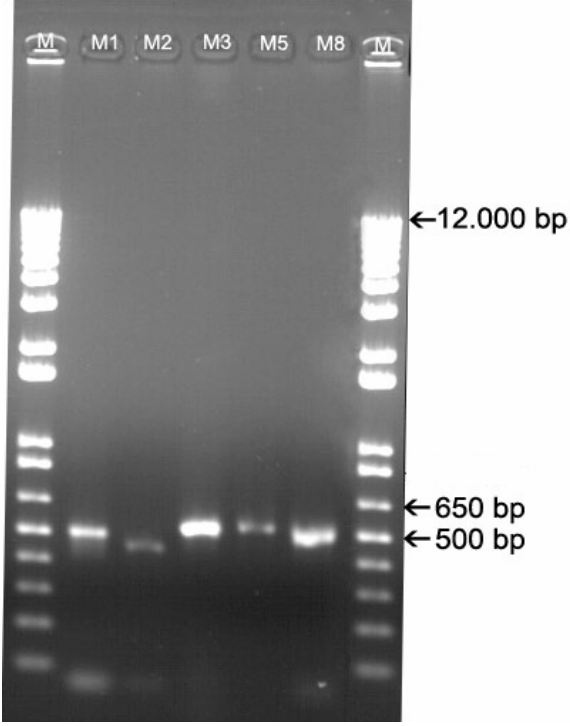
gözlemek için her bir örnek tüpünden 2 µl alınmış ve 1µl örnek yükleme boyası ile karıştırılıp, %1'lik agaroz jelde 90 voltta yürüterek, jel UV transilluminatörde incelenmiş ve görüntülenmiştir. Bantların parlaklığına bakılarak dizi analizi için kurulan PCR' a konulacak kalıp DNA'nın miktarı belirlenmiştir (Çalışmamızda ITS1-5.8-ITS2 bölgesi, ITS primerleri ile çoğaltılmıştır. Tezin bütün bölümlerinde bu bölge, ITS bölgesi olarak verilmiştir).



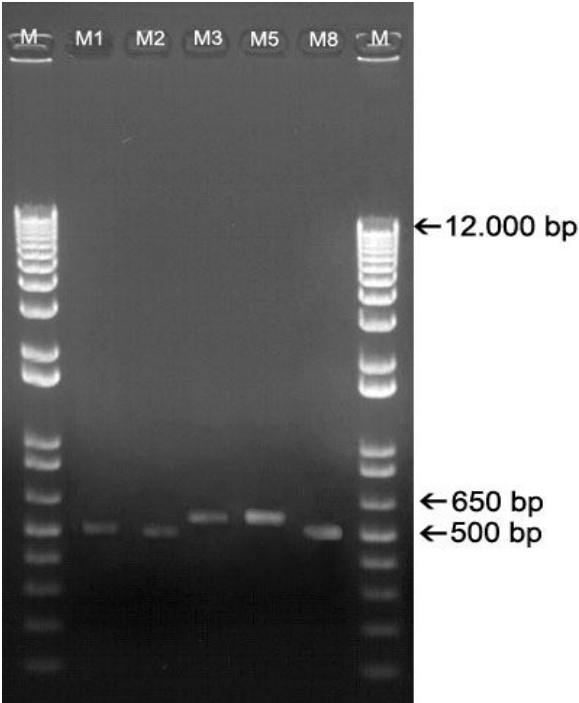
Şekil 4.2 İzolatların ITS bölgesinin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker ve İzolatlar:M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8)



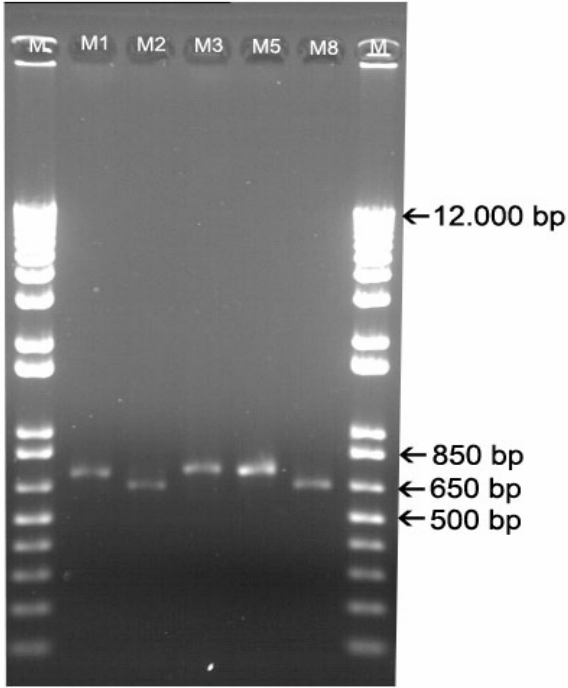
Şekil 4.3 İzolatların ITS bölgesi amplifikasyon ürünlerinin jelden saflaştırmasına ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker ve İzolatlar:M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8)



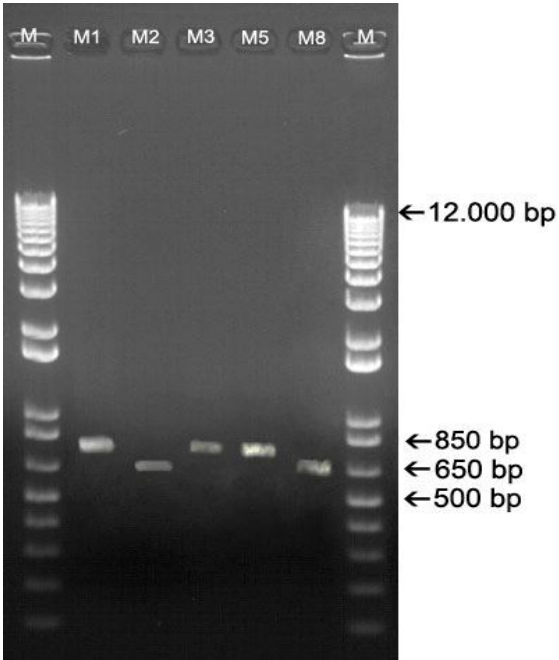
Şekil 4.4 İzolatların β -tubulin geninin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker ve İzolatlar:M1, M2, M3, M5, M8)



Şekil 4.5 İzolatların β -tubulin geninin amplifikasyon ürünlerinin jelden saflaştırmasına ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker ve İzolatlar:M1, M2, M3, M5, M8)



Şekil 4.6 İzolatların Kalmodulin geninin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü (M:1kb Marker ve İzolatlar:M1, M2, M3, M5, M8)



Şekil 4.7 İzolatların Kalmodulin geninin amplifikasyon ürünlerinin jelden saflaştırmasına ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker ve İzolatlar:M1, M2, M3, M5, M8)

4.2.4 ITS Bölgesinin, β -tubulin ve Kalmodulin Genlerinin Dizi Analizleri

İzole edilen 8 izolattan DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA' ların dizi analizleri için; ITS bölgesi, β -tubulin ve Kalmodulin genleri PCR ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye sonucu oluşan ürünlerin dizi analizleri BECKMAN COULTER CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kullanılarak yapılmıştır.

İzolatların dizi analizi bilgileri NCBI gen bankasındaki verilerle BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) programıyla dizilerin benzerleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 Geleneksel ve Moleküler Yöntemle İdentifikasyon (% olarak benzer dizilerle karşılıkları) Sonuçları

Geleneksel Yöntemle İdentifikasyon		Moleküler Yöntemle İdentifikasyon		
İzolatlar		ITS Bölgesi	Kalmodulin Geni	β -tubulin Geni
M1	<i>Penicillium citrinum</i>	%94 <i>Penicillium</i> sp. %94 <i>Penicillium</i> sp. %94 <i>P. chrysogenum</i> %94 <i>P. chrysogenum</i>	%99 <i>P. chrysogenum</i> %97 <i>P. chrysogenum</i> %99 <i>P. chrysogenum</i> %99 <i>P. chrysogenum</i>	İdentifiye edilemedi.*
M2	<i>Eurotium amstelodami</i>	%99 <i>E. amstelodami</i> %99 <i>E. amstelodami</i> %99 <i>A. hollandicus</i> %99 <i>E. amstelodami</i>	%99 <i>A. ambiguus</i> %82 <i>A. clavatoflavus</i> %81 <i>A. microcysticus</i> %81 <i>A. heteromorphus</i>	%100 <i>E. amstelodami</i> %100 <i>E. amstelodami</i> %100 <i>A. hollandicus</i> %100 <i>E. amstelodami</i>
M3	<i>Aspergillus parasiticus</i>	%98 <i>A. sojae</i> %98 <i>A. parasiticus</i> %98 <i>A. toxicarius</i> %98 <i>A. sojae</i>	%98 <i>A. parasiticus</i> %98 <i>A. parasiticus</i> %98 <i>A. parasiticus</i> %98 <i>A. parasiticus</i>	%99 <i>A. parasiticus</i> %99 <i>A. parasiticus</i> %100 <i>A. parasiticus</i> %99 <i>A. oryzae</i>
M4	<i>Penicillium citrinum</i>	%97 <i>Penicillium</i> sp. %97 <i>Penicillium</i> sp. %97 <i>P. chrysogenum</i> %97 <i>P. chrysogenum</i>	**	*
M5	<i>Aspergillus niger</i>	%94 <i>A. niger</i> %94 <i>A. awamori</i> %94 <i>A. niger</i> %94 <i>A. tubingensis</i>	%99 <i>A. tubingensis</i> %99 <i>A. tubingensis</i> %99 <i>A. tubingensis</i> %99 <i>A. tubingensis</i>	%99 <i>A. tubingensis</i> %98 <i>A. tubingensis</i> %99 <i>A. tubingensis</i> %98 <i>A. tubingensis</i>

Çizelge 4.2 (Devamı) Geleneksel ve Moleküler Yöntemle İdentifikasyon (% olarak benzer dizilerle karşılıkları) Sonuçları

M6	<i>Aspergillus niger</i>	%97 <i>A. tubingensis</i> %97 <i>A. niger</i> %97 <i>A. awamori</i> %97 <i>A. niger</i>	**	**
M7	<i>Aspergillus parasiticus</i>	%91 <i>A. parasiticus</i> %91 <i>A. parasiticus</i> %91 <i>A. parasiticus</i> %91 <i>A. parasiticus</i>	**	**
M8	<i>Sagenomella</i> sp.	%94 <i>Penicillium</i> sp. %94 <i>Penicillium</i> sp. %94 <i>P. chrysogenum</i> %94 <i>P. chrysogenum</i>	%100 <i>A. ambiguus</i> %91 <i>A. microcysticus</i> %83 <i>A. clavatoflavus</i> %83 <i>P. griseolum</i>	%81 <i>Sagenomella</i> sp. %78 <i>A. bombycis</i> %78 <i>A. bombycis</i> %78 <i>A. bombycis</i>

* *Penicillium* sp.' de β -tubulin geni henüz identifiye edilememiştir.

**M1 ile M4 ve M3 ile M7 izolatlarının ITS bölgesi dizi analizi sonucu aynı olduğundan Kalmodulin ve β -tubulin genlerinin dizi analizleri yapılmamıştır.

Geleneksel ve moleküler yöntemle identifikasyon sonucu izolatlar; *Penicillium chrysogenum* (M1 ve M4), *Eurotium amstelodami* (M2), *Aspergillus parasiticus* (M3 ve M7), *Aspergillus tubingensis* (M5 ve M6) ve *Sagenonella* sp. (M8) olarak adlandırılmıştır.

4.2.5 Ağır Metal Çalışması

4.2.5.1 Ağır Metal Toleransını Belirleme Sonuçları

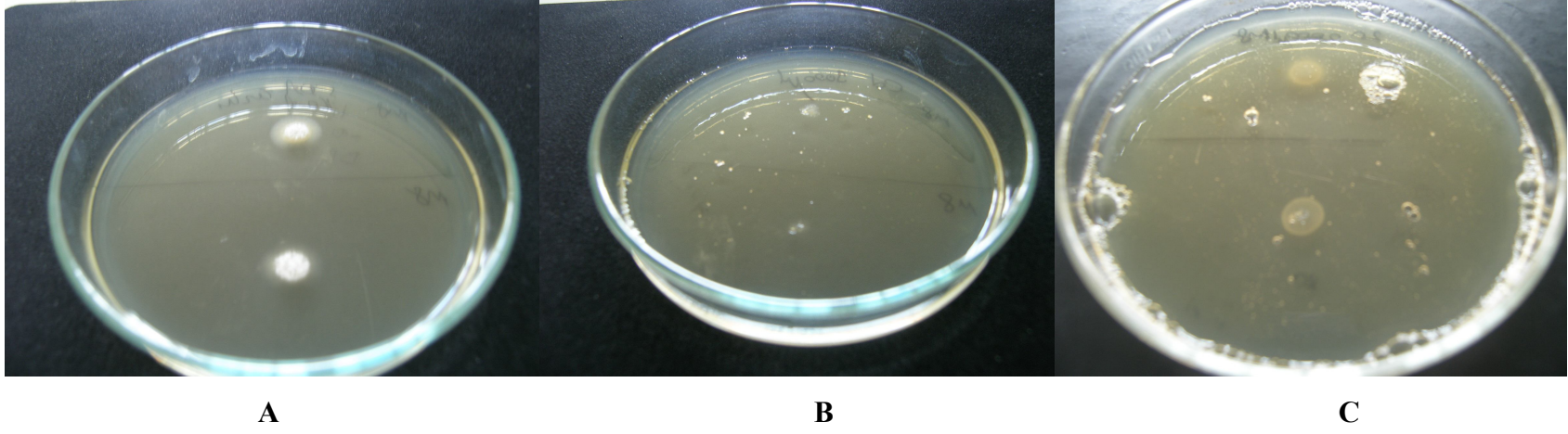
Çizelge 4.3 Ağır metal toleransının belirlendiği değerler

İZOLATLAR								
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Ağır Metaller(μl)								
Cd	300	10	60	300	40	40	60	3000
Co	20	20	70	20	30	30	70	30
Cr	200	40	80	200	40	40	80	40
Cu	90	70	90	90	100	100	90	40
Ni	60	40	100	60	30	30	100	40
Pb	7000	500	900	7000	500	500	900	700
Zn	50	10	800	50	30	30	800	2600

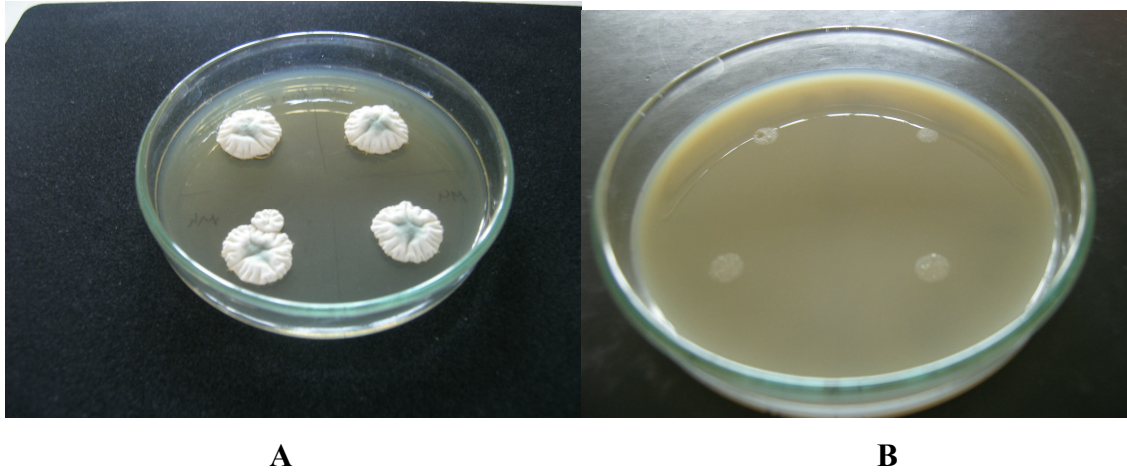
Çizelge 4.3’ de hazırlanan stok çözeltilerden besiyerine eklenen ağır metal miktarları verilmiştir.

Penicillium chrysogenum olarak tayin edilen M1 ve M4 izolatlarının kurşun ağır metal toleransı değeri 7000 μl, *Seganomella* sp. (M8) izolatında kadmiyumun 3000 μl ve çinkonun 2600 μl olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle M1 izolatu kurşunun, M8 izolatu çinko ve kadmiyumun biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Aspergillus parasiticus (M3 ve M7)’ un ağır metal toleransı değerleri; çinko için 800 μl ve kurşun için 900 μl olduğu saptanmıştır. *Eurotium amstelodami* (M2)’nin ağır metallere karşı ağır metal toleransı değerlerinin tüm izolatlar içerisinde en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bunu *Aspergillus tubingensis* (M5 ve M6) takip etmiştir.



Şekil 4.8 *Sagenomella* sp. izolatının metal toleransının belirlenmesi A) Kontrol B) 3000 µl Cd' a spot ekim C) 2000 µl Zn' ye spot ekim



Şekil 4.9 *Penicillium chrysogenum* izolatlarının metal toleransının belirlenmesi A) Kontrol B) 2500 µl Cd' a spot ekim

4.2.5.2 Ağır Metal Biyosorpsiyon Çalışması

Kurşun Biyosorpsiyonu

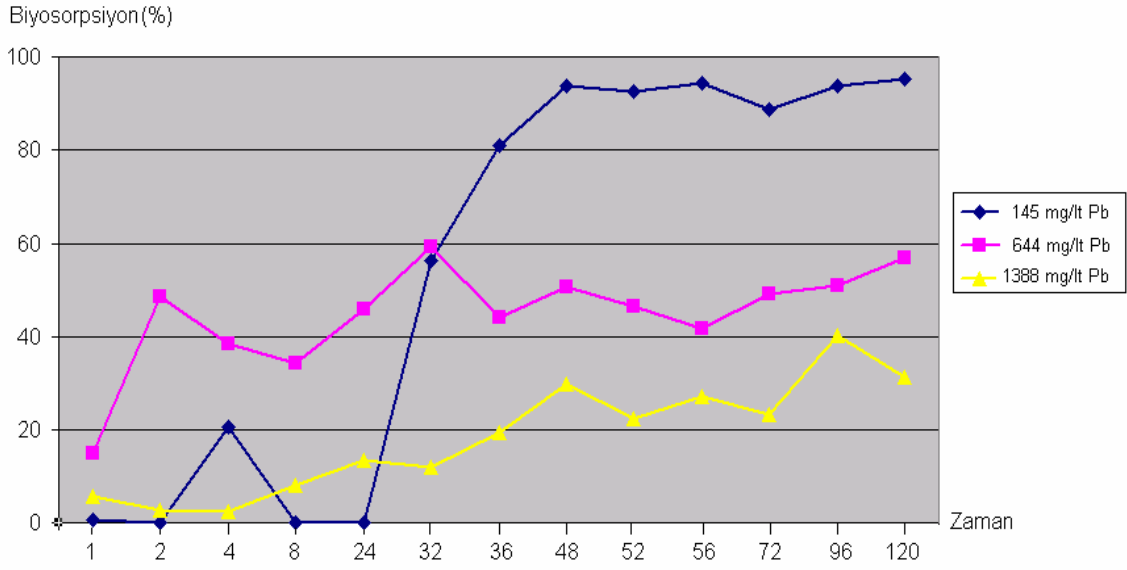
Çizelge 4.4 Kurşun konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları

ZAMAN (SAAT)	145 mg/ lt Pb		644 mg/lt Pb		1388 mg/ lt Pb	
	ICP SONUÇLARI	% BIYOSORPSİYON	ICP SONUÇLARI	% BIYOSORPSİYON	ICP SONUÇLARI	% BIYOSORPSİYON
1	144	0,68	548	14,90	1308	5,76
2	145	0	332	48,44	1352	2,59
4	115	20,68	396	38,50	1356	2,30
8	145	0	424	34,16	1276	8,06
24	145	0	348	45,96	1200	13,54
28	63,4	56,27	262	59,31	1224	11,81
32	27,4	81,10	360	44,09	1120	19,30
48	9,1	93,72	318	50,62	976	29,68
52	10,6	92,68	344	46,58	1076	22,47
56	8,1	94,41	376	41,61	1012	27,08
72	16,2	88,82	328	49,06	1064	23,34
96	9	93,73	316	50,93	828	40,34
120	6,9	95,24	278	56,83	952	31,41

145 mg/lt Pb ortamında maruz bırakılan *Penicillium chrysogenum*' un 28. saatte %56,27 oranında biyosorpsiyon gerçekleştiği saptanmıştır. 120. saatte (%95,24) maksimum sorpsiyon gerçekleşmiş olup, 48. saatten itibaren yapılan tüm ölçümlerde (72. saat hariç %88,82) biyosorpsiyonun %90' dan fazla olduğu belirlenmiştir.

644 mg/lt Pb ortamında maruz bırakılan *Penicillium chrysogenum*' un 28. saatte %59,31 oranında biyosorpsiyon gerçekleştiği saptanmıştır. 28. saatte maksimum sorpsiyon gerçekleşmiştir. 644 mg/lt Pb' nun biyosorpsiyon çalışmasında sorpsiyonun %60' tan daha az olduğu belirlenmiştir.

1388 mg/lt Pb ortamında maruz bırakılan *Penicillium chrysogenum*' da maksimum sorpsiyon 96. (%40,30) saatte gerçekleşmiştir.



Şekil 4.10 M1 izolatının Pb' nin farklı konsantrasyonundaki yüzde (%) biyosorpsiyon grafiği

Yapılan kurşun biyosorpsiyon çalışması sonucunda, ağır metal miktarı arttıkça yüzde biyosorpsiyonun azaldığı gözlemlenmiştir.

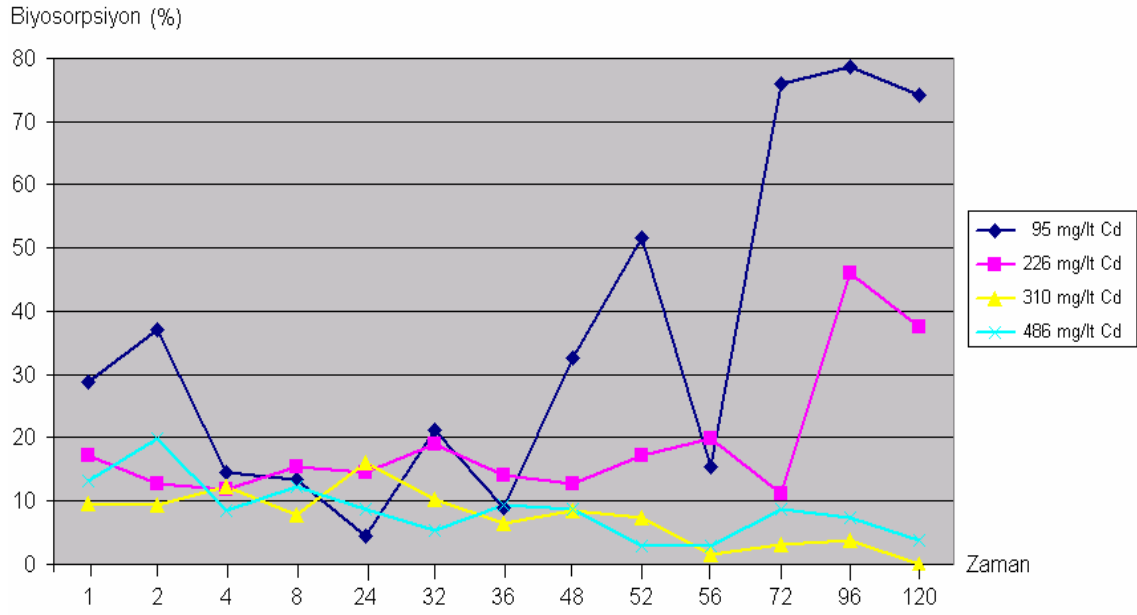
Kadmiyum Biyosorpsiyonu

95 mg/lt Cd (pH 5) ortamında maruz bırakılan *Sagenomella sp.*' de 52. saatte %51,57 oranında sorpsiyon gerçekleştirdiği saptanmıştır. 96. saatte maksimum biyosorpsiyonun %78,63 olduğu gözlemlenmiştir. 95 mg/lt Cd' la yapılan çalışmada sorpsiyon %80' den az olduğu belirlenmiştir.

Sagenomella sp. ile 226 mg/ml Cd' la yapılan çalışmada maksimum biyosorpsiyonun 96. saatte olduğu ve %46,01 oranında gerçekleştiği saptanmıştır.

310 mg/lt Cd ortamında maruz bırakılan *Sagenomella sp.*' nin 24. (%16,12) saatte yaptığı sorpsiyonun en fazla olduğu belirlenmiştir.

Sagenomella sp.' de 486 mg/ml Cd ile en fazla sorpsiyonun 2. saatte %19,95 olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.11 *Sagenomella* sp.' nin Cd' un farklı konsantrasyonlarındaki yüzde (%) biyosorpsiyon grafiği

Kadmiyum ile yapılan ağır metal biyosorpsiyon çalışmasında metal miktarı arttıkça sorpsiyonun azaldığı gözlenmiş olup bu oranın %20' nin altına düştüğü saptanmıştır.

Çizelge 4.5 Kadmiyum konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları

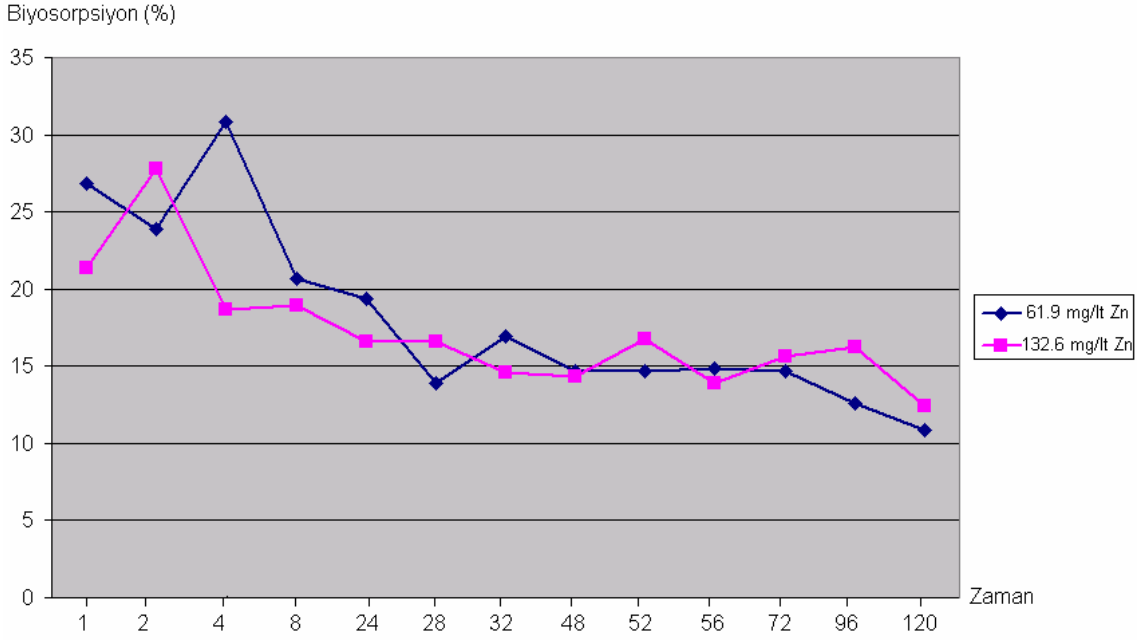
ZAMAN (SAAT)	95 mg/ lt Cd		226 mg/lt Cd		310 mg/ lt Cd		486 mg/lt Cd	
	ICP SONUÇLARI	% BİYOSORPSİYON	ICP SONUÇLARI	% BİYOSORPSİYON	ICP SONUÇLARI	% BİYOSORPSİYON	ICP SONUÇLARI	% BİYOSORPSİYON
1	67,7	28,73	187	17,25	280	9,67	422	13,16
2	59,7	37,15	197	12,83	281	9,35	389	19,95
4	81,2	14,52	199	11,94	272	12,25	445	8,43
8	82,2	13,47	191	15,48	286	7,74	426	12,34
24	90,8	4,42	193	14,60	260	16,12	444	8,64
28	74,9	21,15	183	19,02	278	10,32	460	5,34
32	86,6	8,84	194	14,15	290	6,45	440	9,46
48	64	32,63	197	12,83	284	8,83	444	8,64
52	46	51,57	187	17,25	287	7,41	472	2,88
56	80,7	15,50	181	19,91	305	1,61	472	2,88
72	22,8	76	201	11,06	300	3,22	444	8,64
96	20,3	78,63	122	46,01	298	3,87	450	7,40
120	24,6	74,10	141	37,61	310	0	468	3,70

Çinko Biyosorpsiyonu

Çizelge 4.6 Çinko konsantrasyonlarının ICP sonuçları ve % biyosorpsiyonları

ZAMAN (SAAT)	61.9 mg/ lt Zn		132.6 mg/lt Zn	
	ICP SONUÇLARI	% BİYOSORPSİYON	ICP SONUÇLARI	% BİYOSORPSİYON
1	45,3	26,81	104,25	21,38
2	47,1	23,90	95,70	27,82
4	42,8	30,85	107,85	18,66
8	49,1	20,67	107,55	18,89
24	49,9	19,38	110,55	16,62
28	53,3	13,89	110,70	16,55
32	51,4	16,96	113,25	14,59
48	52,8	14,70	113,55	14,36
52	52,8	14,70	110,40	16,74
56	52,7	14,86	114,15	13,91
72	52,8	14,70	111,90	15,61
96	54,1	12,60	111	16,28
120	55,2	10,82	116,10	12,44

Sagenomella sp. (M8) ile çinko (pH 6) biyosorpsiyon çalışmasında, 62 mg/lt ve 133 mg/ lt' lik Zn kullanılmıştır. 62 mg/lt' de en fazla sorpsiyonun 4. saatte (%30,85), 133 mg/lt' de ise 2. saatte (%27,82) olduğu gözlemlenmiştir. Diğer biyosorpsiyon çalışmalarına göre en az sorpsiyonun Zn' de ve ilk saatlerde gerçekleştiği saptanmıştır.



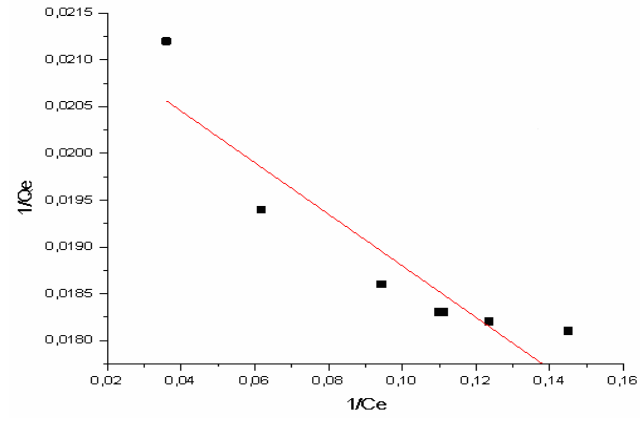
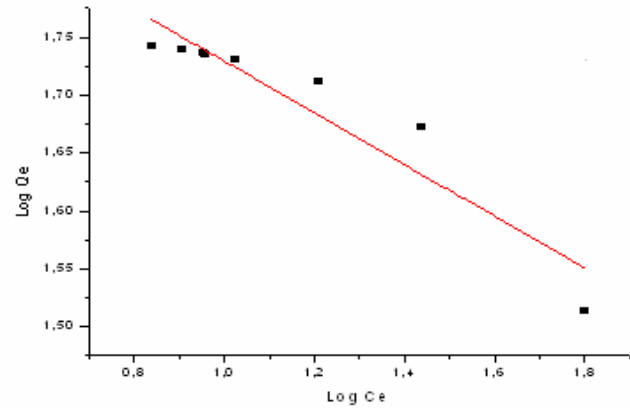
Şekil 4.12 *Sagenomella* sp.' nin Zn' nun farklı konsantrasyonlarındaki yüzde (%) biyosorpsiyon grafiği

4.2.5.3 Biyosorpsiyon İzotermeleri

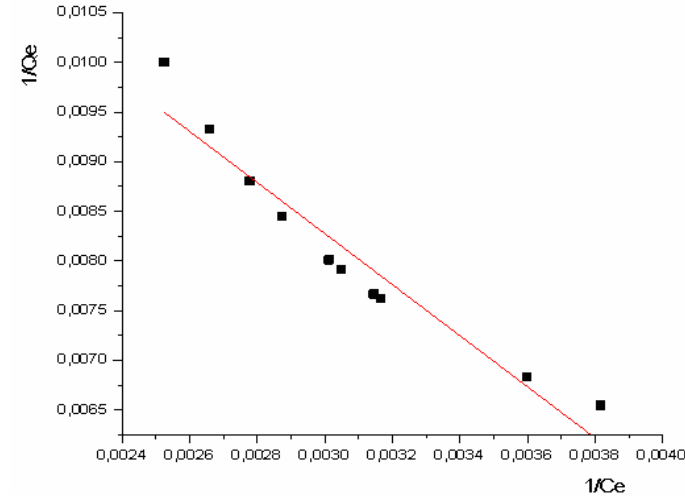
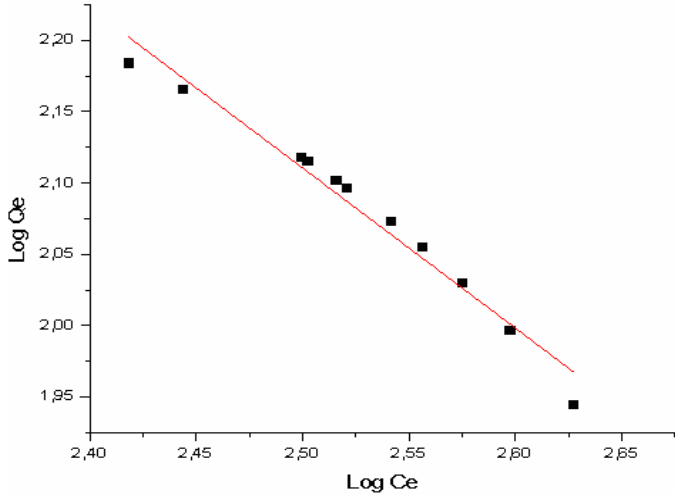
Çalışmamızda; kurşun, kadmiyum ve çinko biyosorpsiyonuna ait izotermeleri tanımlamak için Freundlich ve Langmuir denklemlerinden yararlanılmıştır. Çizelge 4.7, 4.8 ve 4.9' da kullanılan ağır metallerin biyosorpsiyonunun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri ve izoterm eğrilerine ait korelasyon katsayıları bulunmaktadır (K_f : Freundlich sabiti, n : Freundlich sabiti, R^2 : Korelasyon katsayısı, b : Langmuir sabiti, Q : Langmuir sabiti) (Freundlich ve Langmuir izotermeleri çizilirken çalışılan bazı saatler çıkarılmıştır).

Çizelge 4.7 Kurşunun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri

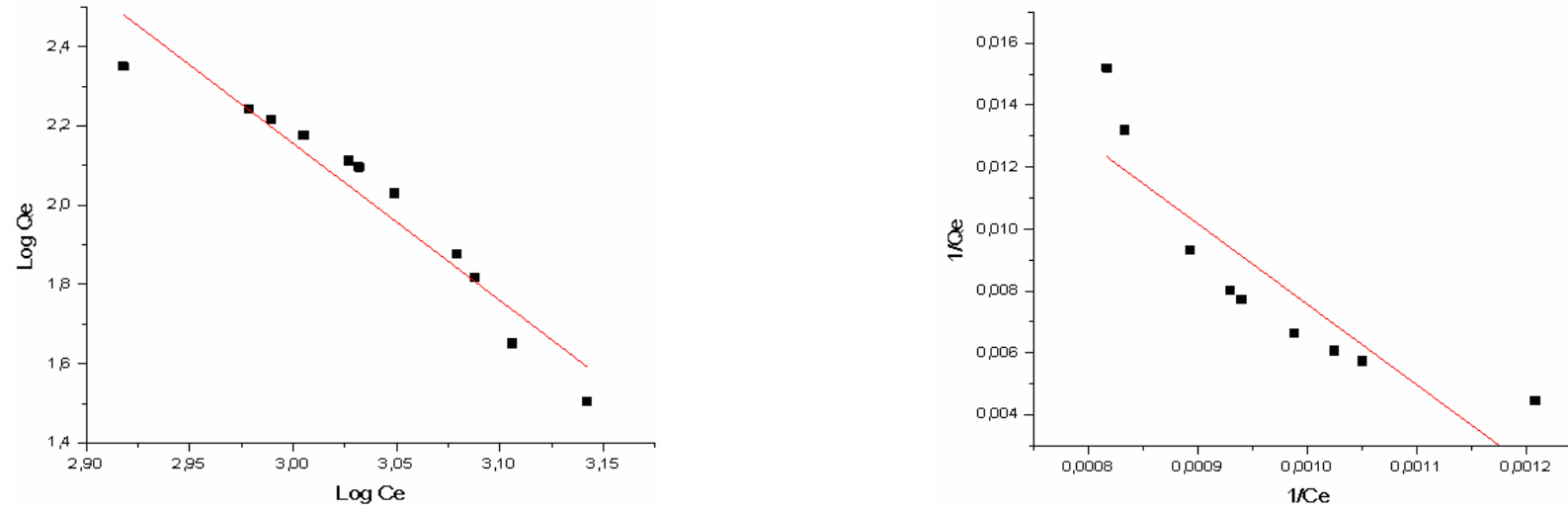
Ağır Metal	Freundlich İzotermi			Langmuir İzotermi		
	n	K_f	R^2	Q	b	R^2
145 mg/lt Pb	-4,4830	89,571	0,872	46,3821	-0,7805	0,820
644 mg/lt Pb	-0,8911	82,444.179	0,969	62,5390	-6,21x10 ⁻³	0,925
1388 mg/lt Pb	-0,2522	1,11x10 ¹⁴	0,922	29,7530	-1,29x10 ⁻³	0,744



Şekil 4.13 Kurşunun (145 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri



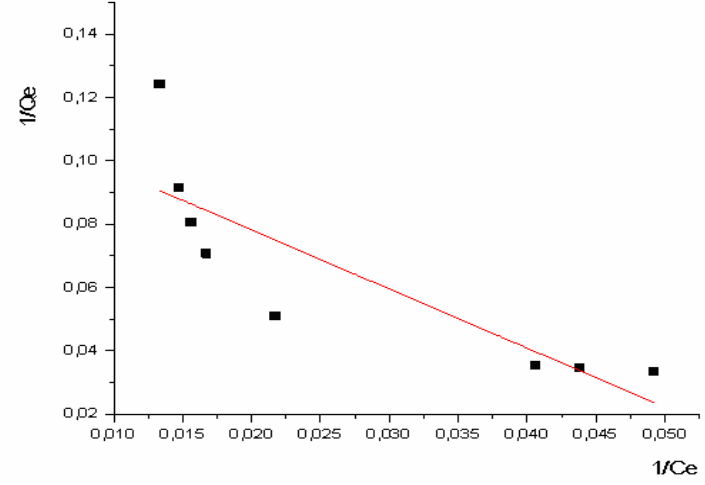
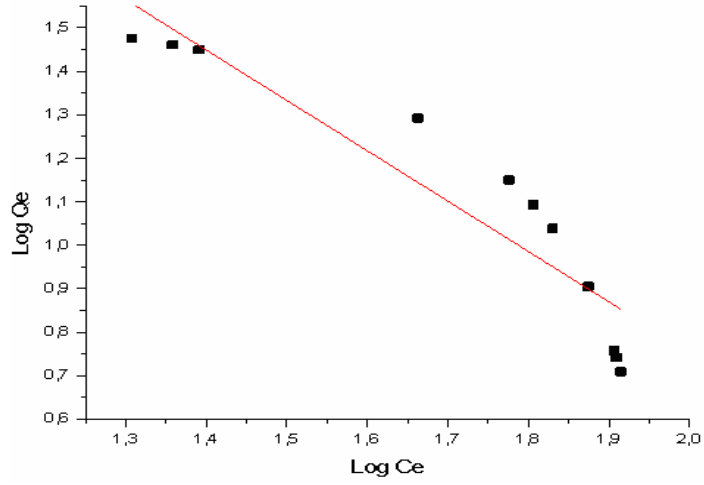
Şekil 4.14 Kurşunun (644 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri



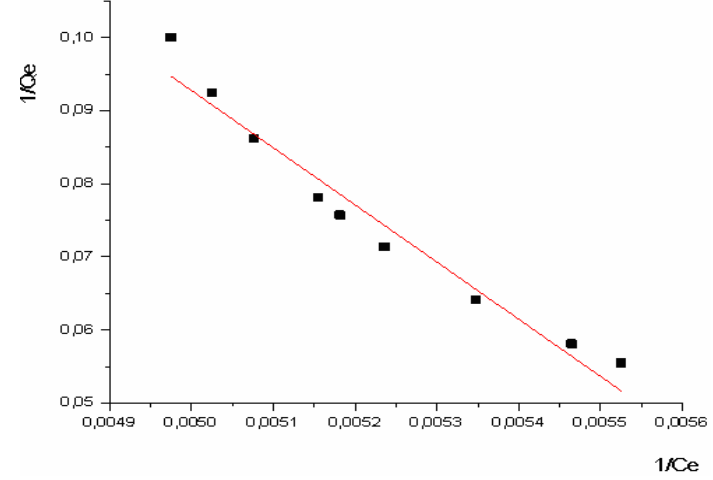
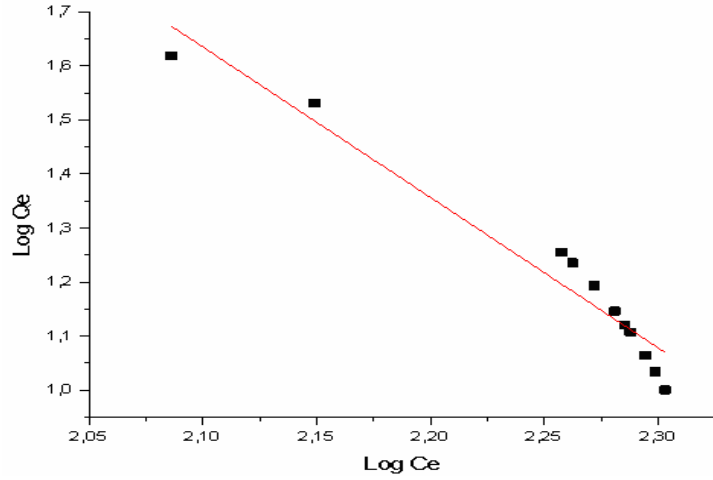
Şekil 4.15 Kurşunun (644 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri

Çizelge 4.8 Kadmiyumun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri

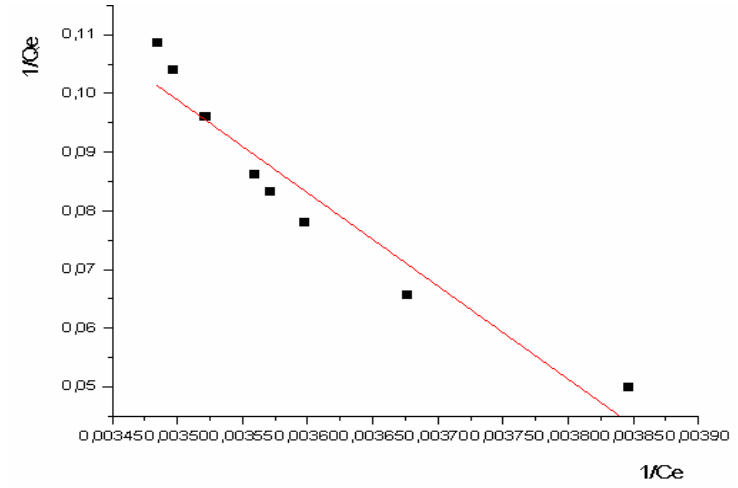
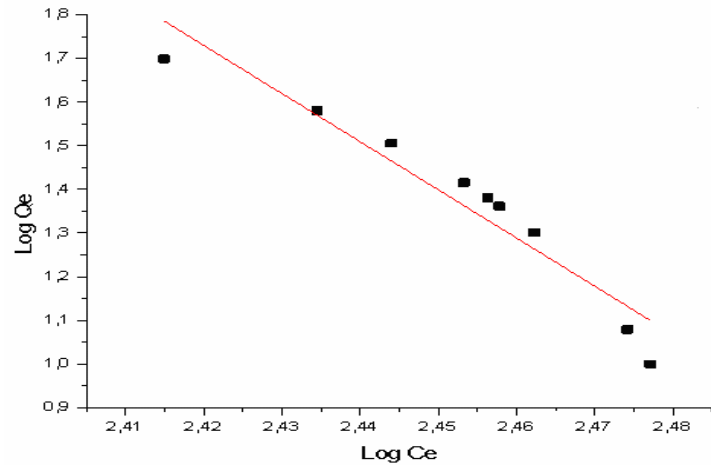
Ağır Metal	Freundlich İzotermi			Langmuir İzotermi		
	n	K_f	R^2	Q	b	R^2
95 mg/lt Cd	-0,8634	1,175.357	0,854	8,6602	-0,0619	0,680
226 mg/lt Cd	-0,3589	30,647,849.05	0,941	2,0644	-6,18x10 ⁻³	0,959
310 mg/lt Cd	-0,0907	2,57 x10 ²⁸	0,910	1,5288	-4,12x10 ⁻³	0,914
486 mg/lt Cd	-0,0717	1,15x10 ³⁸	0,939	2,4965	-2,67x10 ⁻³	0,745



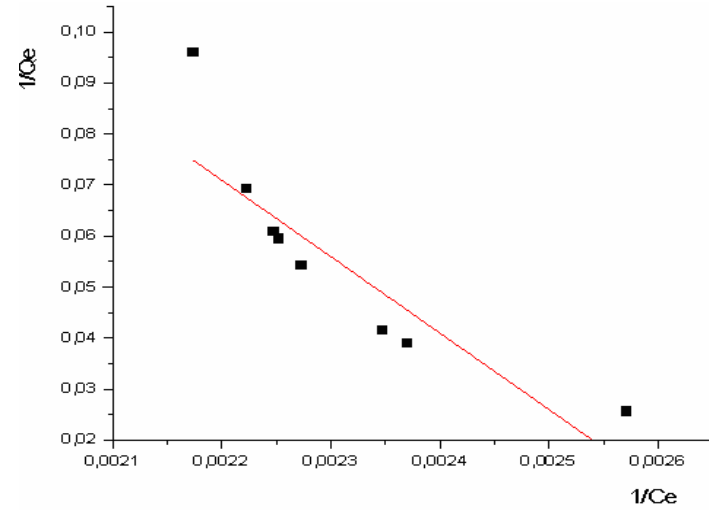
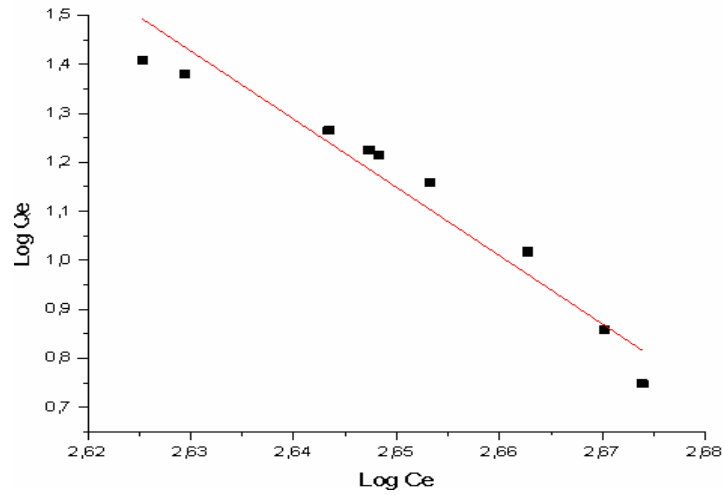
Şekil 4.16 Kadmiyumun (95 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri



Şekil 4.17 Kadmiyumun (226 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri



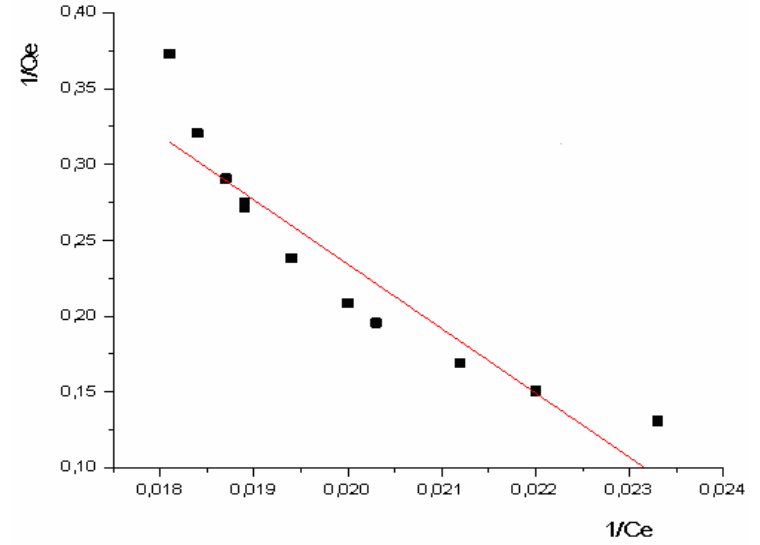
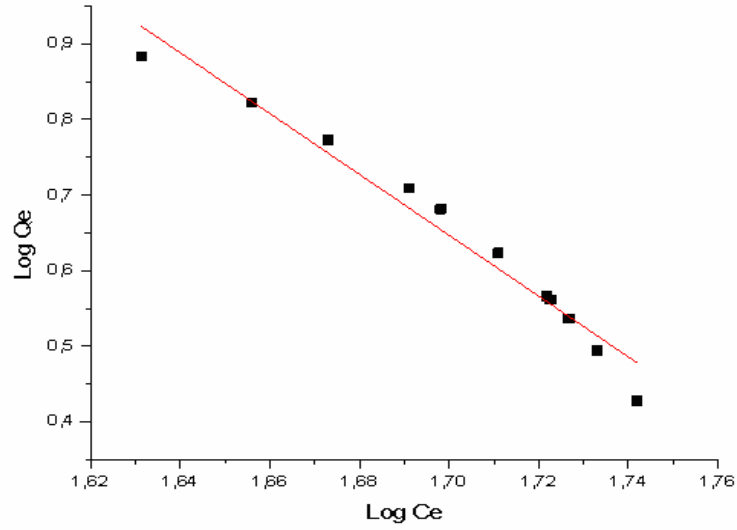
Şekil 4.18 Kadmiyumun (310 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri



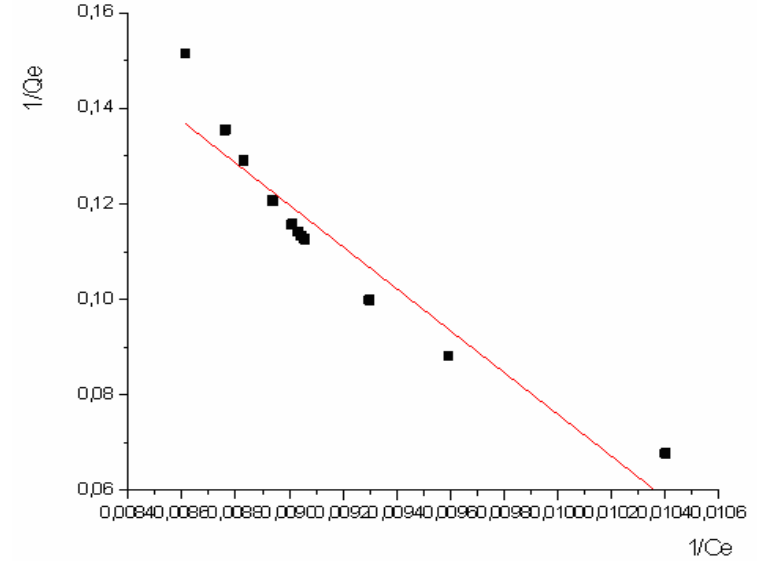
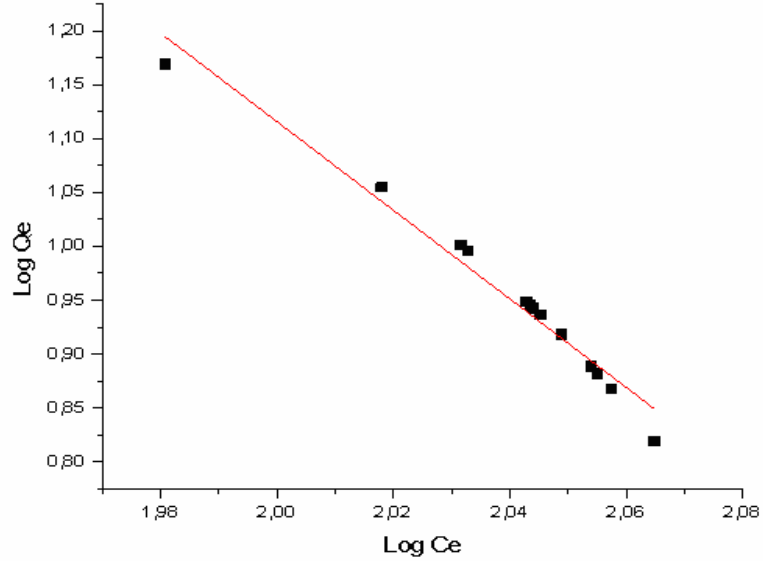
Şekil 4.19 Kadmiyumun (486 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri

Çizelge 4.9 Çinkonun Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm sabitleri

Ağır Metal	Freundlich İzotermi			Langmuir İzotermi		
	n	K_f	R^2	Q	b	R^2
61.9 mg/lt Zn	-0,2484	30,935,703.74	0,966	0,9234	-0,0255	0,865
132.6 mg/lt Zn	-0,2432	2,169,751	0,970	1,9417	-0,0117	0,744



Şekil 4.20 Çinkonun (61,9 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri



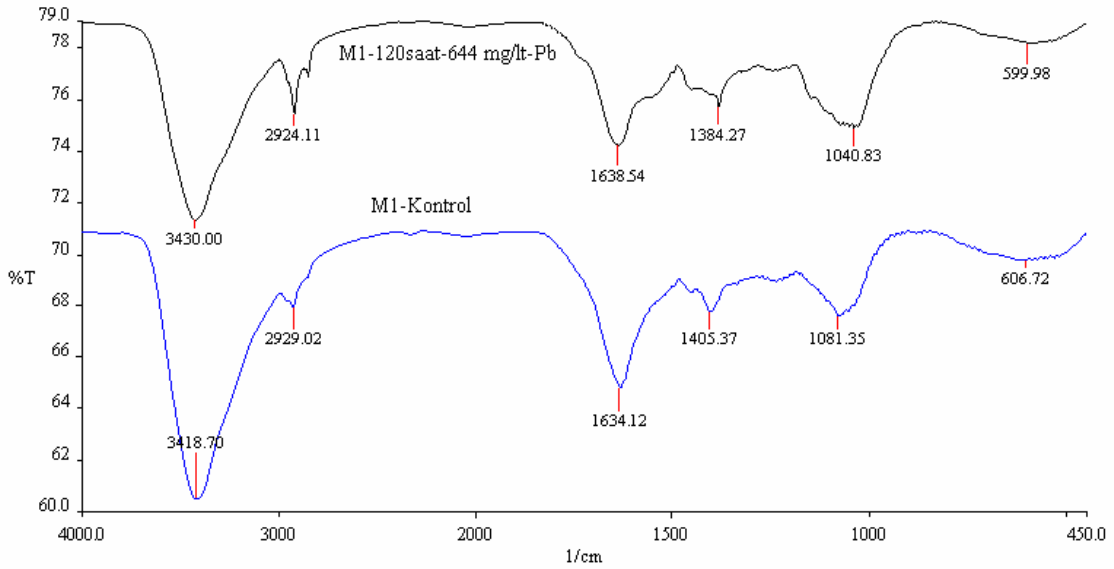
Şekil 4.21 Çinkonun (132,6 mg/lt) Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izoterm grafikleri

Çizelge 4.7’ de görüldüğü gibi her iki izoterm korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında, kurşun biyosorpsiyonunun Freundlich izotermine ($R^2:0,969$) daha uygun olduğu görülmüştür.

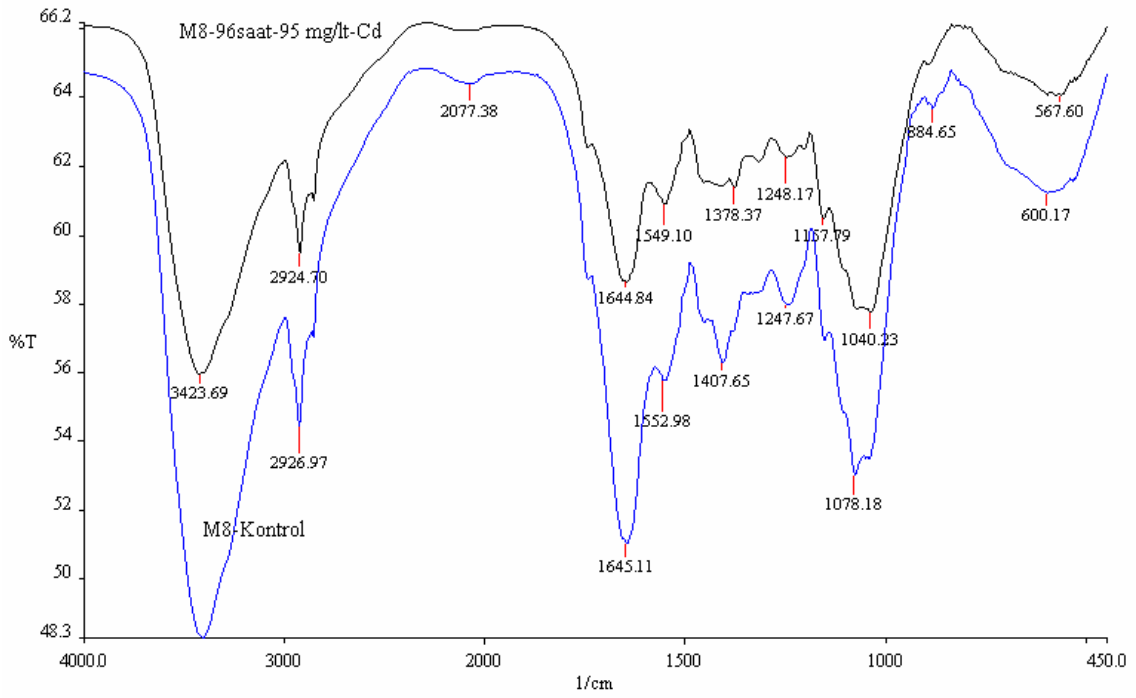
Kadmiyum biyosorpsiyonunda Freundlich ve Langmuir izotermelerinin korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.8), izotermelerin ortlamasına göre Freundlich izoterminin ($R^2:0,939$) daha uygun olduğu gözlemlenmiştir.

Freundlich ve Langmuir izotermelerinin çinko biyosorpsiyonunun için korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında, Freundlich izoterminin ($R^2:0,970$) çinko biyosorpsiyonu için daha uygunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 4.9).

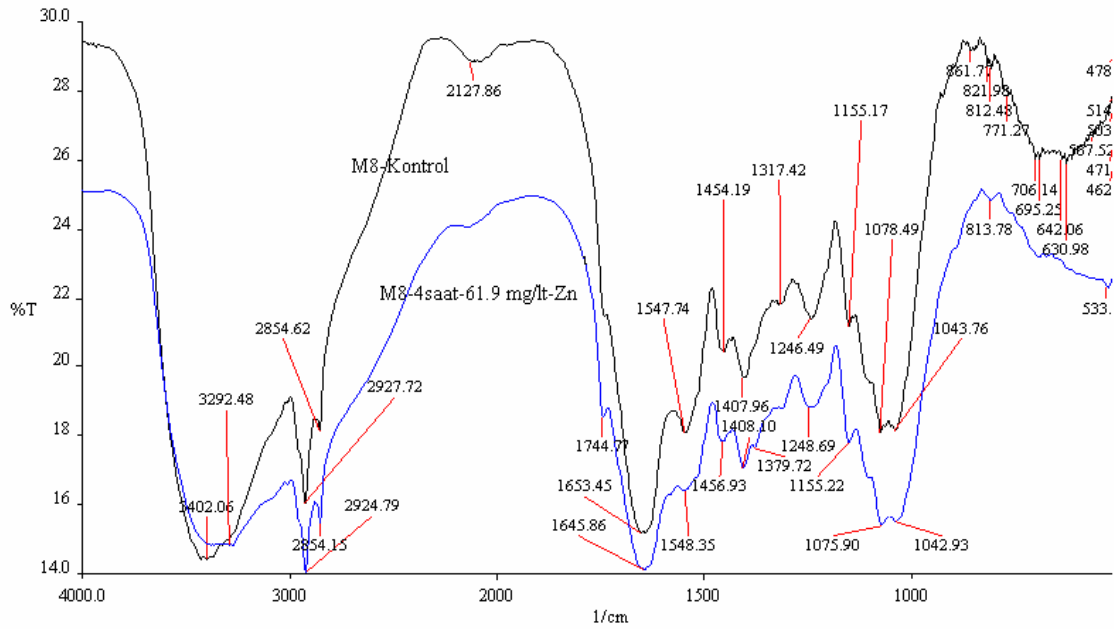
4.2.5.4 FT-IR Spektrometre Sonuçları



Şekil 4.22 *Penicillium chrysogenum*' um Pb biyosorpsiyonu FT-IR spektrometresi



Şekil 4.23 *Sagenomella* sp.' nin Cd biyosorpsiyonu FT-IR spektrometresi



Şekil 4.24 *Sagenomella* sp.' nin Zn biyosorpsiyonu FT-IR spektrometresi

Çalışmamızda; ağır metal biyosorpsiyonda FT-IR spektrometresi sonuçlarına göre, fungusların hücre yüzeyinde ağır metal tutma bölgelerinin büyük olasılıkla amid (1595-

1700 cm^{-1}) grupları olduğu saptanmıştır. Alınan piklere göre fonksiyonel amid gruplarının; N-imonosubstituted amide (1650-1700 cm^{-1}), N,N-disubstituted amide (1640-1680 cm^{-1}), N-unsubstituted amide (1650-1700 cm^{-1}), N-alkyl aromatic amide (1595-1670 cm^{-1}) ve N-unsubstituted aromatic amide (1595-1670 cm^{-1}) olabileceği düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ekstrem habitatlardaki biyolojik çeşitlilik araştırmacılar arasında dikkat çekmektedir. Çünkü bu sistemlerin araştırılmasıyla; ekstrem koşullara adapte olma mekanizmaları, organizmalar ve onların çevreleri arasındaki ilişki anlaşılmaya çalışılmaktadır (Horikoshi ve Grant 1998, Oren 1999).

Sodyum doğada bol bulunan bir katyondur, ancak çok az konsantrasyonları bile yaşayan hücreler için toksiktir. Doğal salin sistemlerde yaşayan canlı hücrelerde, aşırı tuz miktarları yüksek ozmotik basınca neden olmaktadır. Bu nedenle; hücre içindeki sodyum iyonlarının konsantrasyonu yükselir, düşük su konsantrasyonunda hücreler canlı kalabilir ve çoğalabilirler. Halofilik mikroorganizmalar ozmotik basıncı dengelemek için farklı yöntemler geliştirmişlerdir. Extrem halofilik Archaealar, çevrelerinde yüksek tuzluluğa maruz kaldıkları zaman molar düzeyine kadar potasyumu akümüle ederler. Bunun aksine, ökaryotik mikroorganizmaların çoğu yüksek hücre içi iyon konsantrasyonlarını tolere etmezler (Kogej et al. 2005).

Ökaryotik model mikroorganizmaların tuz toleransı mekanizmaları, çoğunlukla tuza duyarlı *Aspergillus nidulans* gibi filamentli halotolerant funguslar, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* (Almagro et al. 2000), *Candida versatilis* (Silva-Graça and Lucas 2003), *Rhodotorula mucilaginosa* ve *Pichia guilliermondii* (Lahav et al. 2002) gibi mayalar çalışılmıştır. Funguslar üzerindeki çalışmalar, yüksek tuzlulukta pozitif turgor basıncın sürdürüldüğünü göstermiştir. Tuzlu çevrelerde; gliserol, trehaloz ve diğer organik eriyebilen maddelerin birikimi ve üretimi artar. Ancak tuza toleranslı *D. hansenii* gibi belli fungusların, osmotik strese cevap için hücre içinde bulunan majör katyonlarla osmotik ayarlamalar yapar. *D. hansenii* gibi birkaç maya grubunun, tuz stresi altında geliştikleri zaman hücre içinde oldukça yüksek miktarda sodyum bulundurduğu rapor edilmiştir. Bu mayalar Na^+ içeren organizmalar olarak tanımlanmışlardır (Kogej et al. 2005).

Son zamanlarda siyah pigmentli mayaların farklı türleri solar tuzlulardaki hipersalin sülardan izole edilmişlerdir. Bu mayalar ökaryotik halofillerin yeni grubu olarak tanımlanır ve bu grupta *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma*

salinum, and halotolerant *Aureobasidium pullulans* (Gunde-Cimerman 2000) türleri yer alır. aynı zamanda, *H. werneckii* ökaryotik halofil grubunun üyesi olmaktadır (Gunde-Cimerman 2005). Tuzlalardan alınan hipersalin suların bütün örneklerinde, siyah pigmentli mayalar %20' den fazladır. *H. werneckii* tuzlulukta büyüme aralığı in vitro olarak belirlenmiş, %0 NaCl satürasyonundan %32' ye kadar değiştiği ve optimum aralığın %6-10 arasında olduğu saptanmıştır.

A. pullulans' da, tuzlu bataklıklar ve düşük tuzlulukta solar tuzlalardan izole edilen halotolerant siyah pigmentli bir maya türüdür. *A. pullulans*, NaCl olmadan da gelişebilir, ama %17' ye kadar NaCl' u tolere edebilmektedir. Yapılan çalışmalar, *H. werneckii* (Petrovic et al. 2002) ve *A. pullulans* (Hernandez-Saavedra et al. 1995) salin çevrelerde geliştikleri zaman gliserol akümüle ettiğini göstermiştir. Günümüzde yapılan çalışmalarla halofilik *H. werneckii* ve halotolerant *A. pullulans*' in sodyum ve potasyum miktarının ayarlamasını osmotik strese cevap olarak mı oluşturdukları araştırılmaktadır. Kojec ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2005); halofilik *H. werneckii* ve halotolerant *A. pullulans*' ı kendi doğal ekolojik çevrelerindeki gibi geniş tuzluluk aralıklarına maruz bırakmışlar, tuza veya tuzsuzluğa adapte olurken hücre içinde oluşan katyonları ve gelişmelerini araştırmışlardır.

Abdel-Hafez yaptığı çalışmada (1981), Suudi Arabistan' daki çöl topraklarından halofilik fungus izole edip tanımlamıştır. 25 cins, 68 tür ve *A. chevalieri*, *A. flavus*, *A. nidulans*' a ait varyeteleri, çöllerden aldığı 40 toprak örneğinden %5' lik NaCl içeren Czapek Dox Agar' da izolasyonlarını yapmıştır. En çok bulunan cinsler *Aspergillus* (20 tür + 3 varyete), *Penicillium* (14 tür), *Drechslera* (2 tür) ve *Ulocladium* (3 tür)' olarak belirlenmiş. Bunu; *Stemphylium* (1 tür), *Scopulariopsis* (2 tür), *Trichoderma* (1 tür) *Botryotrichum* (2 tür), *Cladosporium* (3 tür), *Myrothecium* (1 tür) ve *Alternaria* (1 tür) takip etmiştir. Çalışmanın sonuçlarıyla, Suudi Arabistan topraklarındaki halofilik fungus florası belirlenmiştir.

Grishkan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2003); Ölü Deniz (Dead Sea)' in batı kıyılarında bir yıl boyunca (1999-2000) toprak mikrofunguslarını araştırmışlardır. 40 cinsten toplam 78 tür izole edilmiş ve anahtarlara göre tanımlarken çalışılan bölgenin

belirgin özelliklerine göre ayırmışlardır. Tanımlanan 9 türün (*Alternaria alternata*, *A. raphani*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Ch. murorum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium aurantiogriseum* ve *Stachybotrys chartarum*) bu çevrede izole edilen türlerin geçici ve kalıcı oluşları kıyı bölgesinin karakteristik bir özelliği olarak düşünülmüştür. Bu araştırmayla; Ölü Deniz' in kıyı bölgesinin geçici ve kalıcı çeşitliliği ile aşırı stres altında yaşayan mikrobiotasını ortaya koymuşlardır.

Butinar ve arkadaşları (2005c); Slovenya' da bulunan tuzlaların hipersalin sularından çevreye özgü fungal topluluğun *Eurotium* cinsine ait üyelerini izole etmişlerdir. *E. amstelodami*, *E. herbarium* ve *E. repens*' in adapte olma yetenekleriyle hipersalin (%25 NaCl) koşullarda canlılıklarını sürdürdüklerini, *E. rubrum*, *E. chevalieri* ve *E. halotolerans*' in düşük tuzluluğa sahip sularda (%5-15) yaşabildiklerini ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızda; Çamaltı Tuzlası ve Iğdır/Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı' ndan alınan örneklerle yaptığımız izolasyon sonucunda, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium* cinslerine ait halotolerant 7 izolat ve *Sagenomella* cinsine ait halofil 1 izolat tanımlanmıştır.

Bilimsel yöntemler kullanılarak, canlıların bireysel benzerlik ve farklılıklarının geniş bir bakış açısı ile incelenmesi ve sınıflandırılması, asırlar önce başlamış olan ve günümüzde de devam eden bir süreçtir. Hayatın çeşitliliği ve yayılımıyla ilgili olayların modelini ortaya çıkaran ve ilgili filogenetik ağacın yeniden yapılandırılmasını içine alan biyoloji sahası sistematik olarak adlandırılır. Sistematik amacı, organizmalar arasındaki evrimsel geçmişin ve birbirleriyle olan ilişkilerin belirlenmesi (filogeni) ve daha sonra organizmaların sınıflandırılmasında bu bilgilerin kullanılmasıdır. Sistematik alanında yapılan çalışmalarla, tüm yaşam formlarının filogenetik bir ağaçla bağlantısının kurulması, son dönemlerin en önemli keşiflerinden birini oluşturmaktadır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Filogenetik sistematik özünü de türemiş (apomorfik) karakterler kullanarak ortak ata ilişkisini yeniden düzenlemek ve taksonları ortak ata temelinde gruplamaktır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008). Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik alanında yaşanan baş döndürücü gelişmeler sistematik alanında yeni tekniklerin ortaya çıkışını kaçınılmaz hale getirmiş ve bu gelişmeler fungal sistematikte de etkisini göstermiştir.

Geleneksel olarak fungusların sınıflandırılmasında temel kriter eşeysiz üreme yapılarıdır. Moleküler karakterlerin kullanımının avantajı da, aseksüel fungusların sınıflandırılmasındaki belirsizliği ortadan kaldırıp onların en yakın akrabaları içinde sınıflandırılmalarını sağlamasıdır (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Moleküler verilerdeki mevcut sınırlamalara rağmen, fungal sistematik anlamamızı kolaylaştırdığı ve bu konuyla ilgili verilerdeki artışa bağlı olarak gelecekte sistematik uygulamalarda daha açıklayıcı olabileceği düşünülmektedir (Bridge et al. 2005).

Fungusların identifikasyonunda geleneksel yöntemler (morfolojik, biyokimyasal vb.) ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Fungal sistematikteki çalışmaların daha güvenilir ve yeterli olması için her iki yöntemde kullanılmaktadır. Böylelikle geleneksel yöntemle identifiye edilen organizmaların moleküler olarak da incelenmeye alındığında kişisel hataların ve hatalardan doğacak sonuçların en aza indirebileceği düşünülmektedir.

Kis-Papo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2000); hipersalin Ölü Denizi' de mevsimsel olarak filamentli fungusların değişimini incelediği çalışmasında izolatlarını geleneksel yöntemlerle identifiye etmiştir ve *Aspergillus* sp.' de, *Eurotium herbarium*, *Penicillium westlingii*, *Cladosporium* sp. türlerinin stabil olduğunu saptamıştır.

İsrail' de yapılan başka bir çalışmada ise (Grishkan et al. 2003); identifikasyonda yine geleneksel yöntemler kullanılarak tuzcul ortamlardan izole edilen funguslar identifiye edilmiş, *Aspergillus* türlerinin dominant olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda yaptığımız geleneksel yöntemle identifikasyona göre izolatlar; *Penicillium citrinum* (M1 ve M4), *Eurotium amstelodami* (M2), *Aspergillus parasiticus* (M3 ve M7), *Aspergillus niger* (M5 ve M6) ve *Sagenomella* sp. (M8) olarak tanımlanmıştır. Grishkan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer olarak *Aspergillus* cinsine ait türlerinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Yağ asitleri; fungal membrandaki lipidlerin yapısında bulunan önemli bir bileşendir. Yağ asitleriyle yapılan çalışmalar; funguslardaki gelişim, spor oluşumu, germinasyon ve onların içerdiği çeşitli psikolojik işlemlerde yağ asidlerinin önemli bir bileşen olduğu gösterilmiştir (Weete 1981). Genellikle funguslardaki yağ asitleri homolog seriler halinde C₁₀' dan C₂₅' e kadar olan karbon zincirlerinden oluşur. Bazı yağ asitleri belli mikroorganizmalarda bulunmaktadır ve bunlar kemotaksonomi çalışmalarında biomarker olarak kullanılmaktadır (Devi et al. 2006).

Cantrell ve ark.(2006) yaptıkları çalışmada hipersalin çevrelerden elde edilen ve farklı koşullarda her tabakada bulunan fungusların yağ asitlerini identifiye edip karşılaştırmışlardır. Yağ asit profillerine göre; fungal hücre membranındaki fosfolipid yağ asidlerinin bileşimi içindeki değişimi bu hipersalin bölgede başka bir adaptasyon şekli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Devi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2006); 4 farklı fungal kültür izole etmişlerdir. Bu türler; *Trichoderma pseudokoningi*, *Curvularia lunata*, *Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus niveus* olarak belirlenmiştir. Bu organizmaların yağ asit analizleri her bir yağ asidi için 12 C ile 24 C arası değiştiğini göstermişlerdir. Tüm kültürlerde parçalanmamış yağ asitleri ortalaması %57,86-85,23 arasında değiştiği, parçalanmış yağ asitleri oranının ise %14,12-41,26 arasında olduğu saptamışlardır. *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri en az laurik asit (12:0)' in %0,019 ile 0,029 arasında değişen en az rastlanan yağ asidi olduğu ve, *Curvularia lunata*, *Penicillium chrysogenum* türlerinde bu yağ asidinin bulunmadığını saptamışlardır. 4 izolattada bulunan yağ asitleri ise miristik (14:0), palmitik (16:0), stearik (18:0), oleik (18:1 n-9), linoleik (18:2 n-6), linolenik (18:3 n-3), arakhidik (20:0), behenik (22:0), lignoserik (20:0) olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda FAME analiz sonucuna göre; 16:0, 18:2 CIS 9,12/18:0 a ve Sum In Feature 8 (18:1 CIS 9 (w9)) yağ asitlerine tüm izolatlarda rastlanmıştır. En fazla bulunan yağ asiti 18:2 CIS 9, 12/18:0 a (%52,64) olup, bunu Sum In Feature 8 (%18,45) ile 16:0 (%13,45) takip etmiştir. En az görülen yağ asiti 16:1 Cis 7 (w 9) (%0,16)' dir. Benzer şekilde de Cantrell ve arkadaşları (2006) hipersalin funguslarda en çok rastlanan yağ asitinin 18:2 w6 olduğunu bildirmişlerdir. Ancak mevsimsel olarak yağ asitlerinin profillerinin değişebileceğini saptamışlardır.

Lopes da Silva et al.(1998) yaptığı çalışmada; *Penicillium* türlerinde total yağ asitlerinin %7' sini linolenik asidin oluşturduğunu bildirmiştir. Konjuge olmuş linolenik asit (CLA) kansere ve ateroskleroz' e karşı oldukça koruyucu olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda; *Pencillium* sp.' de 18:0 (stearik), 18:2 CIS 9, 12/18:0 a ve Sum In Feature 8 (18:1 CIS 9 (w9)) yağ asitlerine rastlanmıştır.

Eras ve arkadaşları (2008) *Aspergillus niger* ile yaptıkları FAME çalışmasında; en fazla C16, bunu takiben C18 1b, C18 2b yağ asitlerine rastlamışlardır. Bizde çalışmamızda *Aspergillus* sp. izolatlarımız da (M3, M5, M6, M7) en çok rastlanan yağ asiti 18:0, 18:2 ve 18:1 olarak görülmüştür.

Stahl ve Klug (1996) yağ asitleri kompozisyonuna göre filamentli fungusların farklılıklarını ortaya koymuşlardır. Yaptıkları çalışmada; *Aspergillus alliaceus* türünde 16:0 (15,74), 18:0 (5,32), 18:1 (20,28) ve 18:2 (58,39) yağ asitlerinin bulunduğunu belirlemiştir. *Penicillium paraherquei*' de 14:0 (0,29), 15:0 (0,80), 16:0 (13,73), 16:1 (0,46), 17:0 (2,42), 17:1 (2,67), 18:0 (3,30), 18:1 (25,41) ve 18:2 (40,46) yağ asitlerinin olduğunu, *Penicillium simplicissimum*' da ise bulunan yağ asitlerinin 14:0 (0,49), 15:0 (0,61), 16:0 (16,93), 16:1 (0,39), 17:0 (0,77), 17:1 (0,48), 18:0 (5,90), 18:1 (25,98) ve 18:2 (46,81) olduğunu saptamışlardır. Yağ asidi profillerinin farklılığını P<0.001 göre istatistik olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da *Penicillium* olarak saptadığımız 2 izolatımızda (M1 ve M4) yağ asidi profillerinin farklı olduğu görülmüştür. Sum In Feature 5 (16:1 Trans 9 (w7)) yağ asitlerinin varlığı sadece M1 izolatında belirlenmiştir. M1 izolatında en fazla görülen yağ asidi 18:2 CIS 9,12/18:0 a

(42,89) olup, bunu Sum In Feature 8 (18:1 CIS 9 (w9)) (18,73) ve 17:1 Cis 9 (w 8) (15,63) takip etmiştir. M4' te en fazla bulunan yağ asitleri 18:2 CIS 9,12/18:0 a (48,76), 17:1 Cis 9 (w 8) (17,00) ve Sum In Feature 8 (13,70) olarak saptanmıştır.

Moleküler veriler Fungi alemindeki yüksek seviyeli taksonomik grupların ve büyük evrimsel soyların belirlenmesinde, düşük taksonomik seviyelerde ise türlerin, kısmi popülasyonların ve bireylerin teşhisinde kullanılmaktadır. Ancak moleküler verilerin yaygın kullanımında bazı sınırlandırmalar da mevcuttur. Bunlardan bazıları, farklı fungal gruplar arasında yöntemlerin karşılaştırılabilirliği ve uyumluluğuyla ilişkiliyken bazıları fungusun adapte olduğu hayat döngüsünün çeşitliliğiyle ilişkilidir. Moleküler verilerdeki mevcut sınırlandırmalara rağmen, fungal sistematigi anlamamızı kolaylaştırdığı ve bu konuyla ilgili verilerdeki artışa bağlı olarak gelecekte sistematik uygulamalarda daha açıklayıcı olabileceği düşünülmektedir (Bridge et al. 2005).

Fungusların sistematigi oldukça değişkendir. Fungi alemi içindeki grupların belirlenmesi ve sınıflandırılma çabaları oldukça eski olmakla birlikte, 2004 yılında başlatılan ve şu anda da devam eden AFTOL adı verilen ortak bir çalışma ile (yeni moleküler filogenetik yöntemler kullanılarak) fungusların tüm gruplarının en yüksek seviyede moleküler (filogenetik) sınıflandırılması hedeflenmiştir (Kılıçoğlu ve Özkoç 2008).

Fungusların moleküler olarak sınıflandırılmasında PCR temelli birçok yöntem vardır. Bunlar; RAPD, RFLP, AFLP ve DNA dizi analizidir. Dizi analizi yöntemi ile funguslardaki rDNA' nın çoğaltılıp, nükleotid dizileri belirlenebilmektedir. Bu diziler hem değişken hemde korunmuş bölgeleri içerdiği için, farklı taksonomik seviyelerdeki organizmaların karşılaştırılmasına ve ayrılmasına olanak sağlamaktadır.

DNA dizi analizi yönteminde; PCR amplifikasyonu için seçilecek ideal bölgenin özellikleri (Bruns ve Gardes 1993) dikkate alındığında, ribozomal RNA'ların kodlandığı genler (rRNA) bu kriterlerin çoğunu içerir ve kapsamlı bir şekilde analiz edilebilirler. rDNA bölgelerinin çoğaltılması için primerlerin dizayn edilmesi, fungusların taksonomik çalışmalarını oldukça kolaylaştırmıştır (White et al. 1990).

Hu ve arkadaşları (2007) ; ribozomal DNA (ITS ve 5.8S) ve β -tubulin gen bölgeleriyle yaptıkları identifikasyon çalışmasında ITS genlerinin β -tubulin gen bölgesine göre daha az bilgi verici olduğunu saptamışlardır. Yine de taksonomik çalışmalarda en az farklı 2 gen bölgesinin kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda moleküler identifikasyonda DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. DNA dizi analizinde; ITS bölgesi, Kalmodulin ve β -tubulin geni dizilenmiştir. Sadece M1 ve M4 izolatlarının β -tubulin gen bölgesine ait dizi bilgisi elde edilememiştir. Diğer identifikasyon teknikleri ile *Penicillium* cinsine ait olduğu belirlenen bu izolatlara ait β -tubulin gen bölgesi ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

İzolatların geleneksel ve moleküler identifikasyonları yapılarak tanımlanan türler karşılaştırılmıştır. M1 ve M4 izolatının dizi analizi verileri sonucunda *Penicillium chrysogenum* olarak tanımlanmıştır. Ancak geleneksel yöntemde *Penicillium citrinum* olarak adlandırılmıştır. Pitt (2000)' in anahtarına göre *Penicillium chrysogenum*; *Furcatum* subgenusu içindeki *Penicillium citrinum* türü ile benzerdir. Bu benzerlik özelliklede 37°C' deki zayıf gelişme ile kendini göstermektedir. Ancak *Penicillium chrysogenum* türü diğer tüm özellikleri ile *Penicillium* bölümündeki türlere birincil derecede benzerlik göstermektedir ve bu nedenle *Penicillium* bölümü altında incelenmektedir. Geleneksel yöntemlerle identifikasyon araştırmacının tecrübe, bireysel görüş ve becerisine dayanmaktadır. Bu nedenle identifikasyon sürecinde yanlışlıkların yapılması oldukça muhtemeldir. Gelişmiş moleküler teknikler ise bu tip yanlışlıklara olanak tanımamaktadır. M1 ve M4 izolatlarında karşılaşılan çelişki kullanılan moleküler teknikler ile çözümlenip, bahsi geçen izolatlar *Penicillium chrysogenum* olarak tanımlanmıştır.

M2 izolatı; geleneksel identifikasyon, ITS bölgesi ve β -tubulin gen bölgesine ait dizi bilgilerinin incelenmesi sonucu *Eurotium amstelodami* olarak identifiye edilmiştir (Çizelge 4.2). İlaveten Kalmodulin gen bölgesi de incelenmiş olup bu izolat için verimli sonuçlar elde edilememiştir. Ancak uygulanan identifikasyon yöntemlerine göre M2 izolatı *Eurotium amstelodami* olarak belirlenmiştir.

M3 ve M7 izolatları ITS bölgesi, Kalmodulin ve β -tubulin gen bölgelerine ait dizi analizlerine göre *Aspergillus parasiticus* (Çizelge 4.2) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca geleneksel sınıflandırmada *Aspergillus parasiticus*' a ait temel özellikler gözlemlenmiş olup, M3 ve M7 izolatları *Aspergillus parasiticus* olarak tanımlanmıştır.

Aspergillus türleri biyoteknolojik proseslerde önemlidir. Serra ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada *Aspergillus* türlerini ITS-5.8S rDNA ve Kalmodulin gen bölgelerinin sekans analizini kullanarak tanımlanmıştır ve yeni taksonların olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda *Nigri* bölümünde bulunan *A. carbonarius* ve *A. niger* türlerinden farklı olan yeni bir türü *A. ibericus* olarak adlandırmışlardır.

ITS bölgesi, Kalmodulin ve β -tubulin genlerinin dizi analizlerine göre; M5 ve M6 izolatları *Aspergillus tubingensis* (Çizelge 4.2) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca geleneksel tanımlama yöntemlerine göre incelendiğinde de *Aspergillus niger* olarak tanımlanmıştır. Klich (2002)' in anahtarına göre; Al-Musallam (1980) *A. tubingensis*' i, *A. niger*' in sinonimleri arasında göstermiştir. Moleküler veriler *A. tubingensis* türünü ayrı bir sınıf (takson) olarak belirlemiştir. Elimizdeki verilerle bu izolatlar; *Aspergillus tubingensis* olarak tanımlanmıştır.

M8 izolatının ITS bölgesi, Kalmodulin ve β -tubulin genlerinin dizi bilgileri gen bankasında yer alan dizilerle karşılaştırıldığında çok farklı tür listesiyle karşılaşılmıştır (Çizelge 4.2). Ancak geleneksel tanımlamada *Sagenomella* sp. olarak adlandırılmıştır. Yapılan son çalışmalara göre *Sagenomella* cinsine ait 12 tür tanımlanabilmiştir (Gene et al. 2003). β -tubulin gen bölgesine ait dizi bölgesi ile de *Sagenomella* sp. elde edilmiştir ve geleneksel tanımlama sonucu desteklenmiştir.

Akuatik çevrelerde ağır metallerin uzaklaştırılmasında biyosorpsiyon kullanımı son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Funguslar kobalt, nikel, altın vb. gibi metallerin ve ağır metallerin biyosorpsiyonunda kullanılan potansiyel organizmaların başında yer alır. Fungusların ağır metal biyoakümüülasyonu fiziksel (pH, tuz konsantrasyonu vb.) şartlara bağlı olarak değişir. Bazı funguslar metale karşı direnç gösterebilirler (Moore et al. 2007). Biyoremediasyon çalışmalarında ağır metal direnci gösteren funguslar

Neurospora, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Pleurotus* bu amaç için kullanılmaktadır (Sağlam ve Cihangir 1995).

Zafar ve arkadaşlarının yaptıkları metal toleransı ve biosorpsiyon çalışmasında (2007); metalle kontamine olmuş tarım toprağından izole ettikleri *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia* ve *Trichoderma* genuslarına ait funguslara Cd, Ni, Cr, Cu ve Co metalleri kullanılarak minimum inhibe konsantrasyon testi uygulanmıştır. Bu testte yüksek direnç gösteren *Rhizopus sp.*, *Aspergillus spp.* türleri CdCl₂ ve K₂Cr₇O₇ metallerinin 2, 4, 6, 8 mM'lık sulu çözeltileri ilk pH'ı 5 olacak şekilde 25°C' de 4 saat çalkalamalı etüvde muamele edilmiştir. Ağır metal konsantrasyonları atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazı ile analiz edilerek SPSS istatistik testi uygulanarak karşılaştırma yapılmıştır. Cd ve Cr' un biosorpsiyon için *Rhizopus sp.* ve *Aspergillus spp.* türlerinin kullanılabilceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda da; izolatların ağır metal toleransı belirlenmiştir. *Penicillium citrinum* olarak tayin edilen M1 ve M4 izolatlarının kurşun ağır metal toleransı değerinin 7000 µl, *Sagenomella sp.* (M8) izolatında kadminyumun 3000 µl ve çinkonun 2600 µl olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle M1 izolatu kurşunun, M8 izolatu çinko ve kadminyumun biyoremediasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Niu ve arkadaşlarının *P. chrysogenum*' la yaptıkları kurşun biosorpsiyon çalışmasında (1993); fungusun metal alma kapasitesinin pH 4-5 aralığında daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda kurşun biosorpsiyon deneyleri pH 5' te yapılmıştır.

Alkali ile muamele edilmiş *A. niger*' in Cd⁺², Cu⁺², Zn⁺², Ni⁺² ve Co⁺² metallerinin ayrı ayrı uygulanarak yapılan biosorpsiyon çalışmasında; biyomas ağırlığının metal bağlamada %10 kadar etkili olduğunu ve metal bağlama kapasitesi açısından *Neurospora*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleri ile karşılaştırılması ortaya koyulmuştur (Akthar et al. 1996).

Çalışmamızda da; *Aspergillus parasiticus* (M3 ve M7)' un metal toleransı değerlerinin; çinko için 800 µl ve kurşun için 900 µl olduğu saptanmıştır. *Eurotiorum amstelodami* (M2)'nin ağır metallere karşı ağır metal toleransının tüm izolatlar içerisinde en düşük

olduğu gözlemlenmiştir. Bunu *Aspergillus niger* (M5 ve M6) takip etmiştir. Bu iki izolat ağır metal çalışmalarında kullanılmamıştır. Akar ve arkadaşları (2006), *Aspergillus parasiticus*' un kurşun biyosorpsiyon kapasitesinin pH 5' te 20°C sıcaklıkta $4,02 \times 10^{-4}$ mol olarak belirlemişlerdir.

Zafar ve arkadaşları (2006) yaptıkları metal kontamine olmuş tarım topraklarından izole edilmiş funguslarla yaptıkları biyosorpsiyon çalışmasında *Aspergillus* sp.1' in kromun 1,20 mg (1 gram biyomasla) ve kadmiyumu 2,72 mg biyosorbe ettiğini belirlemişlerdir. İzole ettikleri başka bir *Aspergillus* türünün krom ve kadmiyumu *Aspergillus* sp. 1' e göre daha az akümüle ettiği saptanmıştır. Çalışmamızda da; *Aspergillus* sp.' ler ağır metallere karşı diğer izolatlarımıza göre daha toleranslı olmaları nedeniyle biyosorpsiyonda kullanılmamıştır.

Biyosorpsiyon çalışmamızda; 145 mg/lt Pb ortamında (pH 5) maruz bırakılan *Penicillium citrinum* (M1)' un 28. saatte %56,27 oranında biyosorpsiyon gerçekleştiiği saptanmıştır. 120. saatte (%95,24) maksimum sorpsiyon gerçekleştiiği olup, 48. saatten itibaren yapılan tüm ölçümlerde (72. saat hariç %88,82) biyosorpsiyonun %90' dan fazla olduğu belirlenmiştir.

644 mg/lt Pb ortamında maruz bırakılan *Penicillium citrinum* (M1)' un 28. saatte %59,31 oranında biyosorpsiyon gerçekleştiiği saptanmıştır. 28. saatte maksimum sorpsiyon gerçekleştiiğiştir. 644 mg/lt Pb' nun biyosorpsiyon çalışmasında sorpsiyonun %60' tan daha az olduğu belirlenmiştir.

1388 mg/lt Pb ortamında maruz bırakılan *Penicillium citrinum* (M1)' da maksimum sorpsiyon 96. (%40,30) saatte gerçekleştiiğiştir. Bu nedenle çalışmamızda diğer türlerden daha toleranslı olan M1 suşu biyosorpsiyon çalışmaları için seçilmiştir.

Yapılan kurşun biyosorpsiyon çalışması sonucunda, ağır metal miktarı arttıkça yüzde biyosorpsiyonun azaldığı gözlemlenmiştir.

Tunalı ve Akar (2006)' ın yaptıkları biyosorpsiyon çalışmasında ölü *Botrytis cinerea* bioması ile Zn (II) ağır metalini kullanmışlardır. Zn (II)' nun pH 5-6' da başlangıçta 100 mg/ lt bulunan iyon konsantrasyonunda %98' lik bir iyileşme gerçekleştiğini saptamışlardır. FT-IR spektrometresini kullanarak yaptıkları analizde hücre-metal etkileşimlerinin azot (N) içeren biyoligandlarda olduğunu belirlemişlerdir.

Bizde çalışmamızda; *Sagenomella* sp. (M8) ile çinko (pH 6) biyosorpsiyon çalışmasında, 62 mg/lt ve 133 mg/lt' lik Zn kullanılmıştır. 62 mg/lt' de en fazla sorpsiyonun 4. saatte (%30,85), 133 mg/lt' de ise 2. saatte (%27,82) olduğu gözlemlenmiştir. Diğer biyosorpsiyon çalışmalarına göre en az sorpsiyonun Zn' de ve ilk saatlerde gerçekleştiği saptanmıştır.

Rostami ve Joodaki (2002) yaptığı *Aspergillus niger* ve *Penicillium austurianum* funguslarıyla kadmiyum ağır metalini kullandıkları adsorpsiyon çalışmasında pH 4 ve 5' te 22° C' de aktif fungusların ağır metal giderimi için uygun olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda; 95 mg/lt Cd (pH 5) ortamında maruz bırakılan *Sagenomella* sp. (M8)' nin 52. saatte %51,57 oranında sorpsiyon gerçekleştirdiği saptanmıştır. 96. saatte maksimum biyosorpsiyonun %78,63 olduğu gözlemlenmiştir. 95 mg/lt Cd' la yapılan çalışmada sorpsiyon %80' den az olduğu belirlenmiştir.

Sagenomella sp. (M8)' nin 226 mg/ml Cd' la yapılan çalışmada maksimum biyosorpsiyonun 96. saatte olduğu ve %46,01 oranında gerçekleştiği saptanmıştır.

310 mg/lt Cd ortamında maruz bırakılan *Sagenomella* sp. (M8)' nin 24. (%16,12) saatte yaptığı sorpsiyonun en fazla olduğu belirlenmiştir.

Sagenomella sp. (M8)' nin 486 mg/ml Cd ile en fazla sorpsiyonun 2. saatte %19,95 olduğu saptanmıştır.

Kadmiyum ile yapılan ağır metal biyosorpsiyon çalışmasında metal miktarı arttıkça sorpsiyonun azaldığı gözlenmiş olup bu oranın %20' nin altına düştüğü saptanmıştır.

Çalışmamıza benzer olarak Pasifik sedimentlerinden izole edilen kurşun dirençli *Penicillium* türlerinin 24 mM Pb (NO₃)₂ konsantrasyonunda gelişebildiği 4 mM' lık konsantrasyonda kurşunu granüller halinde hücre duvarında adsorbe edebildiği elektron mikroskobu ile belirlenmiştir. Araştırmacılar Pasifik Okyanusu' ndan izole ettikleri kurşuna dirençli Psf-2 izolatının kurşunu hem hücre duvarında biyosorbe ettiği, hemde hücre içinde (protoplazma ve vakuollerde) düzensiz granüller (15-100 nm) halinde akümüle ettiği gözlemlenmiştir (Sun and Shao 2007). Mergeay ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada *Ralstonia metallidurans* CH34' te metal direncinden hücreye kurşun transportundan sorumlu olan P tip ATPaz' ın rol oynadığını bildirmişlerdir. *Arthobacter* sp. (Trajanovska et al. 1997), *Pseudomonas marginalis*, *Bacillus megaterium* (Roane 1999), *Staphylococcus aureus* ve *Citrobacter freundii* (Levinson and Mahler 1998) türlerinin kurşuna dirençliliği saptanmasına rağmen direncin neden kaynaklandığı *Ralstonia metallidurans* CH34' teki gibi belirlenememiştir.

Sanyal ve arkadaşlarının (2005) yaptıkları çalışmada; patojenik bir fungus olan *Fusarium oxysporium*' u kurşun ve kadmiyum ağır metalleriyle muamele ettikten sonra FT-IR ölçümlerine göre ağır metal kristallerinin spesifik proteinlerle etkileşime girdiğini, bunda amin (I ve II bantları) grubunda gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Bu spesifik proteinler ekstraselüler proteinler olup biyoremediasyon çalışmasında bu organizmanın kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bayramoğlu ve arkadaşları (2006) *Lentinus sajör-caju* fungusuyla yaptıkları uranyum (VI) akümüasyonu çalışmasında FT-IR spektrometresi ile uranyumu hücre duvarındaki kitin ve kitosanın akümüle ettiği fonksiyon gruplar olduğu belirlenmiştir.

Liu ve arkadaşlarının (2007) bir fungus türü olan *Mucor racemosus* ile Cr (VI) ağır metal giderimini çalışmışlardır. FT-IR spektrometresi ile dönüşümsüz ağır metal bağlayıcı grupların amido grubu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Rostami ve Joodaki (2002) *Aspergillus niger* ve *Penicillium austurianum* fungusları ile kadmiyum adsorpsiyonu çalışmalarında; Langmuir ve Freundlich izoterminin korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında, Langmuir izoterminin (R^2 : 0,99) uygunluğunun daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tunalı ve Akar' ın *Botrytis cinera* biyoması ile çinko biyosorpsiyonu çalışmalarında (2006); Langmuir ve Freundlich izotermlerini kullanmışlardır. Langmuir izoterminin korelasyon katsayısı (R^2 : 0,948) daha yüksek olduğundan, bu izotermin çalışmalarında daha uygun olduğunu gözlemişlerdir.

İleri (2006)' nin bakır iyonlarının sıvı ortamdan biyosorpsiyonla giderimi çalışmasında; BET, Langmuir ve Freundlich izotermlerinin determinasyon sayılarını karşılaştırdığında, Freundlich izoterm (R^2 : 0,970) modelinin kullanılmasının daha uygun olduğunu görmüşlerdir.

Çalışmamızda da; kurşun, kadmiyum ve çinko biyosorpsiyonunda Langmuir ve Freundlich izotermlerinin korelasyon katsayılarının karşılaştırılması yapılmıştır. Bu metallerin biyosorpsiyon çalışmasında Freundlich izoterminin (R^2 : 0,939, 0,969, 0,970) uygun olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda; ağır metal biyosorpsiyonda FT-IR spektrometresi sonuçlarına göre, fungusların hücre yüzeyinde ağır metal tutma bölgelerinin büyük olasılıkla amid ($1595-1700\text{ cm}^{-1}$) grupları olduğu saptanmıştır. Alınan piklere göre fonksiyonel amid gruplarının; N-imonosubstituted amide ($1650-1700\text{ cm}^{-1}$), N,N-disubstituted amide ($1640-1680\text{ cm}^{-1}$), N-unsubstituted amide ($1650-1700\text{ cm}^{-1}$), N-alkyl aromatic amide ($1595-1670\text{ cm}^{-1}$) ve N-unsubstituted aromatic amide ($1595-1670\text{ cm}^{-1}$) olabileceği düşünülmektedir.

Ekstrem koşullarda yaşayan mikroorganizmaların remediasyon çalışmalarında kullanılmaları son yıllarda dikkat çeken konuların başında gelmektedir. Özellikle kirleticiler ile kontamine olmuş ortamlarda, remediasyon çalışmalarında kullanılan birçok organizmanın bu koşullarda yaşama şansı bulamamakta ve biyoremediasyon

çalışmaları başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. bu nedenle kirleticilerin bulunduğu ve ekstrem koşulların olduğu ortamlarda dayanıklı organizmaların kullanımı daha etkin olacaktır.

Ağır metal giderimi ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen tuzcul funguslarla yapılmış ancak birkaç çalışma vardır. Çalışmamızda;

1- İzmir Çamaltı Tuzlası ve Iğdır/Tuzluca Kaya Tuzu Yatağı' dan alınan örneklerle 7 halotolerant ve 1 halofil fungus (Kaya tuzu örneğinden) olmak üzere toplam 8 tane fungus izolasyonu yapılmıştır.

2- İzole edilen fungusların geleneksel ve moleküler yöntemle identifikasyonu yapılmıştır. Ayrıca yağ asidi metil esterleri analizi (FAME) ile funguslarda bulunan yağ asitleri belirlenmiştir.

3- Yapılan ağır metal çalışmasında halotolerant *Penicillium chrysogenum* türünün kurşun, halofil *Sagenomella* sp. türünün ise kadmiyum ve çinko gideriminde etkin oldukları saptanmıştır.

4- Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma *Sagenomella* sp. ile yapılan ilk ağır metal giderimi çalışmasıdır. Bu türün ağır metal gideriminde kadmiyum (%78,63) ve çinko (%55,2) metallerini biyosorbe ettiği göz önüne alındığında remediasyon çalışmalarında kullanılabileceği görülmektedir.

5- Ağır metal biyosorpsiyon çalışmasına ait Freundlich ve Langmuir biyosorpsiyon izotermi çizilmiştir. İzotermilerin korelasyon katsayılarının karşılaştırılmasıyla Freundlich izotermi bu çalışma için daha uygun olduğu gözlemlenmiştir.

6- FT-IR spektrometre analizi ile biyosorpsiyon çalışmasında kullanılan biyomasların ağır metali büyük olasılıkla hücre yüzeyinde bulunan fonksiyonel amid grupları tarafından gerçekleştiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, endüstrileşmeye paralel kirliliğın gittikçe arttığı dünyamızda bu çalışmada tuzcul ortamlardan izole ettiğimiz funguslar ağır metal giderimi çalışmalarında kullanılabilir. Farklı fiziksel ve besinsel koşullardan izole edilen bu funguslar diğerk biyoremediasyon çalışmalarında da denenebilir. Ancak, optimum deneysel şartların belirlenmesi ve iyileştirme mekanizmalarının açığa çıkarılması da faydalı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abdel, S.I.I., 1981, "Hafez Halophilic Fungi of Desert Soils in Saudi Arabia", *Mycopathologia*, Vol. 75, pp. 75-80.
- Acevedo, C., 2001, "Marine Fungi in Puerto Rico: Endophytism and Biodegradation", Ph. D. Thesis, University of Puerto Rico at Rio Piedras.
- Ahluwalia S.S. and Goyal D., 2007, "Microbial and Plant Derived Biomass for Removal of Heavy Metals From Wastewater", *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 2243-2257.
- Akar, T., Tunalı, S. ve Çabuk, 2007, "Study on the Characterization of Lead (II) Biosorption by Fungus *Aspergillus parasiticus*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 136(3), pp. 389-405.
- Akdik, M., 1980, "Türkiye'de Tuz Durumu ve Tuzun İç Pazar Etüdü", Tekel Genel Müdürlüğü, Yayın No: 154 Eag/ A.
- Aksu, Z. ve Kutsal T., 1986, "Atık Sulardaki Ağır Metaliyonların Giderilmesinde Mikroorganizmaların Kullanılması", *Çevre*, Vol. 2, pp. 5-10.
- Akthar, M., Sastry, K., Mohan, P., 1996, "Mechanism of Metal Ion Biosorption By Fungal Biomass", *Biometals* Vol. 9, pp. 21-28.
- Alloway, B.J. and Ayres, D.C., 1993, "Chemical Principles of Environmental Pollution", Chapman & Hall, U.K., pp. 291.
- Almagro, A., C. Prista, C. Quintas, A. Madeira Lopes, J. Ramos, and M. C. Loureiro-Dias, 2000, "Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions.", *Int. J. Food Microbiol.*, Vol 56, pp. 191–197.

- Amini M., Younesi H., Bahramifar N., Lorestani A.A.Z., Ghorbani F., Daneshi A., Sharifzadeh M., 2008, "Application of Response Surface Methodology for Optimization of Lead Biosorption in An Aqueous Solution by *Aspergillus niger*", Journal of Hazardous Materials, Vol. 154, pp. 694-702.
- Artola, A. and Rigola M., 1992, "Selection of Optimum Biological Sludge for Zinc Removal from Wastewater By A Biosorption Process", Biotechnol. Lett., Vol. 14, pp. 1199-1204.
- Aslantaş, N., 2007, "Demir, Bakır, Krom, Nikel ve Stronsiyumun Sulu Çözeltilerde Aktif Karbonla Kompleksleştiriciler Varlığında Zenginleştirilmesi, Giderilmesi ve ICP-OES ile Tayini", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., and Cameotra, S.S., 2000, "Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants" Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 53, pp. 495-508.
- Barnett, H.L. and Hunter B.B., 1998, "Illustrated Genera of Imperfect Fungi", APS Pres (The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota), 218 p.
- Bayramoğlu, G., Çelik, G., ve Arica, M.Y., 2006, "Studies on Accumulation of Uranium by Fungus *Lentinus sajor-caju*", Journal of Hazardous Materials, Vol. 136 (2), pp. 345-353.
- Beveridge T.J. and Murray R.G.E., 1980, "Sites of Metal Deposition in The Cell Walls of *Bacillus subtilis*", Journal of Biotechnology, Vol.141, pp. 876-887.
- Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., Chemie and Gesundheit, 1988, "Eine Verstärkliche Einführung in Die Toxikologie", Vchverlagsgesellschaft, ISBN 3-527-26455-8.

- Birbir, M., Ogan, A., Calli, B., Mertoğlu, B., 2004, "Enzyme Characteristics of Extremely Halophilic Archaeal Community in Tuzkoy Salt Mine", Turkey World Journal of Microbiology & Biotechnology, Vol. 20, pp. 613-621.
- Boysen, M., Bojra, M., del Moral, C., Salzar, O., Rubio, V., 1996, "Identification at Strain Level of *Rhizoctonia solani* AG4 Isolates by Direct Sequence of Asymmetric PCR Product of the ITS regions", Current Genetics, Vol. 29, pp. 174-181.
- Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C. A., Elander, R. P., 1998, "Appliation of PCR in Mycology", Cab International, New York, 357 p.
- Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J., 2005, "The Impact of Molecular Data in Fungal Systematics", Advances in Botanical Research, Vol. 42, pp. 33-67.
- Bruns, T.D. and Gardes, M., 1993, "Molecular Tools for the Identification of Ectomycorrhizal Fungi-Taxon-Specific Oligonucleotide Probes for Suilloid Fungi", Molecular Ecology , Vol. 2, pp. 233-242.
- Buchalo A.S., Nevo E., Wasser S.P, Oren A., Molitoris H.P., 1998, "Fungal Life in The Extremely Hypersaline Water of The Dead Sea: First Records", Proceedings Royal Society London Biological Science Vol. 265, pp. 1461-1465.
- Butinar. L., Santos S., Spencer- Martins I, Oren A, Gunde- Cimerman N., 2005a, "Yearst Diversity in Hypersaline Habitats", FEMS Microbiology Letters Vol. 244, pp 229-234.
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitas A., Gunde-Cimerman N., 2005b, "Melenized Halophilic Fungi are Eukaryotic Members of Microbial Communities in Hypersaline Waters of Solar Salterns", Botonica Marina Vol. 48, pp 73-79.

- Butinar, L., Zalar, P., Frisvad, J.C., Gunde-Cimerman N., 2005c, "The Genus *Eurotium* Members of Indigenous Fungal Community in Hypersaline Waters of Salterns", FEMS Microbiology Ecology, Vol. 51, pp. 155-156.
- Cantrell, S.A., Casillaz-Martinez, L. and Molina M., 2006, "Characterization of Fungi from Hypersaline Environments of Solar Salterns Using Morphological and Molecular Techniques", Mycological Research, Vol. 110, pp. 962-970.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H., 1999, "Single Spore Isolation of Fungi", Fungal Diversity, Vol. 3, pp. 29-38.
- Devi, P., Divya Shridhar, M.P, D' Souza, L. and Naik, C.G., 2006, "Cellular Fatty Acid Composition of Marine-Derived Fungi", Indian Journal of Marine Sciences, Vol. 35(4), pp. 359-363.
- Devlet Planlama Teşkilatı Yayını, 2001, "Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı", Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Cilt II.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S., 1993, "General Concepts for PCR Primer Design", PCR Methods and Applications, Vol. 3, pp. 30-37.
- Domsch KH., Gams W., Anderson T-H, 1993, "Compendium Of Soil Fungi", Vol. 1, IHW, Verlang, Eching.
- Elmacı, A., Yonar, T., Özenin, N., Türkoğlu, H., 2005, "Zn(II), Cd(II), Co(II) ve Remazol Turkish Blue-G Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerinde Kurutulmuş *Chara* sp., *Cladophora* sp. ve *Chlorella* sp. Türleri ile Biyosorpsiyonun Araştırılması", Ekoloji Dergisi, Vol. 14 (55), pp. 24-31.
- Eras, J., Oro, R., Torres, M. and Canela, R., 2008, "Direct Quantitation of Fatty Acids Present in Bacteria and Fungi: Stability of the Cyclopropane Ring to Chlorotrimethylsilane", J. Agric. Food Chem., Vol. 56, pp. 4923–4927.

- Ergin, Z., 1988, "Tuzun Üretim Teknolojisi ve İnsan Sağlığındaki Yeri", Madencilik Dergisi, Vol. 27(1), pp. 9-20.
- Farkas, V., 1980, "Biosynthesis of Cell Wall of Fungi", Microbiological Reviews, Vol. 44, pp. 117-141.
- Favero, N., Costa P. , Massimino M.L., 1991, "In vitro Uptake of Cadmium by Basidiomycetes (*Pleurotus Cl5 treatus*)" , Biotechnol. Lett., Vol. 13, pp. 701-704 .
- Gene, J., Blanco, J.L., Cano, J., Garcia, M.E. and Guarro, J., 2003, "New Filamentous Fungus *Sagenomella chlamydospora* Responsible for a Disseminated Infection in a Dog", Vol. 41, pp. 1722-1725.
- Glass, N.L. and Donaldson, G., 1995, "Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amply Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes", Applied & Environmental Microbiology, Vol. 61, pp. 1323-1330.
- Goh, T.K., 1999, "Single-spore Isolation Using a Hand-Made Glass Needle", Fungal Diversity, Vol. 2, pp. 47-63.
- Griffith DH., 1994, "Fungal Phsiology", John Wilwy and Sons, New York.
- Grishkan, I., Nevo, E., Wasser, P.S., 2003, "Soil Micromycete Diversity in the Hypersaline Dead Sea Coastal Area, Israel", Mycological Progress, Vol. 2(1), pp. 19-28.
- Guckert, J.B., Antworth, C.P., Nichols, P.D. and White, D.C., 1985, "Phospholipid, Ester-Linked Fatty Acid Profiles as Reproducible Assays for Changes in Procaryotic Community Structure of Estuarine Sediments", Fems Microbiol. Ecol., Vol. 31, pp. 147-158.

- Gunde-Cimerman, N., Frisvad, J. C., Zalar, P. and Plemenitas, A., 2005, "Halotolerant and Halophilic Fungi", pp. 69–127. In S. K. Deshmukh and M. K. Rai (ed.), "The biodiversity of fungi: their role in human life", Science Publishers, Inc., New Delhi, India.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar P., De Hoog G. S., and Plemenitas A., 2000, "Hypersaline Waters in Salterns: Natural Ecological Niches for Halophilic Black Yeasts", FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 32, pp. 235–240.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P. Petrović U., Turk M., Kogej T., De Hoog GS, Plemenitas A., 2004, " Fungi in The Salterns in: Ventosa A(Ed).", Halophilic Microorganisms, Springer- Verlag, Heidelberg, pp. 103-113.
- Gupta,R., Ahuja. P., Khan S., Saxena, R.K., Mohapatra, M., 2000, "Microbial Biosorbents: Meetings Challenges of Heavy Metals Pollution in Aqueous Solution", Current Science, Vol. 78, pp. 967-973.
- Harrigan, W.F., Mc Cance, M.C., Margaret E., 1966, "Laboratory Methods in Microbiology", Academic Press. London and New York.
- Hasenekoğlu, İ., 1991, "Toprak Mikrofungusları", Atatürk Üniv. Yayınları, Erzurum, 1., 7. Cilt.
- Hernandez-Saavedra, N.Y., Ochoa, J.L. and Vazquez-Dulhalt, R., 1995, "Osmotic Adjustment in Marine Yeast", J. Plankton Res., Vol. 17, pp. 59-69.
- Holan, Z.R, B.Volesky and Prasetyo I., 1993, "Biosorption of Cadmium by Biomass of Marine Algae", Biotechnol. Bioeng., Vol. 41, pp. 819-825.
- Horikoshi, K. and Grant, W.D., 1998, "Extremophiles", pp. 93-133.
- Hu, H., Jeewon, R., Zhou, D., Zhou, T. and Hyde, K.D., 2007, "Phylogenetic Diversity

of Endophytic *Pestalotiopsis* Species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: Evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies”, *Fungal Diversity*, Vol. 24, pp. 1-22.

Hyde KD. and Pointing SB., 2000, “Marine Mycology”, A. Practical Approach, Fungan Diversity Pres, Hong Kong.

İleri, R., 2006, “Bakır İyonlarının (Cu^{+2}) Sıvı Ortamdan Biyosorpsiyonla Gideriminin İzoterm Sabitlerinin Matlab Programı ile Belirlenmesi”, *Ekoloji Dergisi*, Vol. 15, pp.8 17.

Javor, B., 1984, “Growth Potential of Halophilic Bacteria Isolated from Solar Salt Environments: Carbon Sources and Salt Requirement”, *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 48, pp. 352-360.

Jackson, M., Sowa, M.G., Mantsch, H.H., 1997, “Infrared Spectroscopy: A New Frontier in Medicine”, *Biophys. Chem.*, Vol. 68, pp. 109–125.

Janso, J.E., Bernan, V.S., Greenstein, M., Bugni, T.S., Ireland, C.M. 2005, “*Penicillium dravuni*, A New Marine-Derived Species From an Alga in Fiji”, *Mycologia*, Vol. 97(2), pp. 444-453.

John, H., Duffus, Howard, G.J., Worth, 1996, “Fundamental Toxicology For Chemists”.

Kapoor, A. and Viraraghavan, T., 1998, “Biosorption of Heavy Metals on *Aspergillus niger*: Effect of Pretreatment”, *Bioresour. Technol.*, Vol. 63, pp. 109-113.

Keskinkan, O., Göksu, M.Z.L., Başbüyük, M., Foster, C.F., 2004, “Heavy Metal Adsorption Properties of A Submerged Aquatic Plant (*Ceratophyllum demersum*)”, *Bioresour Technol.*, Vol. 92, pp. 197-200.

- Kılıç, A.M. ve Uyanık E., 2001, “Tuz Gölü’nde Oluşan Kirlenmenin Göl Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, 4. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu Bildiriler Kitabı, İzmir, pp. 135-145.
- Kılıçoğlu , Ç.M. ve Özkoç, İ., 2008, “Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler”, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, Vol. 23(1), pp. 65-72.
- Kis-Papo, T., Grishkan, I., Oran, A., Wasser, S.P. and Nevo, E., 2001, “Spatiotemporal Diversity of Filamentous Fungi in the Hypersaline Dead Sea”, Mycol. Res., Vol 105(6), pp. 749-756.
- Kis Papo T., Oren A., Wasser SP., Nevo E., 2003, “Survial Flamentaus Fungi in Hypersaline Dead Sea Water”, FEMS Microbiology Ecology, Vol. 45, pp. 183-190.
- Klich, M.A., 2002, “Identification of Common *Aspergillus* Species, Central Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 116 p.
- Koday, S., 1999, “Tuz Gölü Tuzlaları”, Marmara Coğrafya Dergisi, Vol. 2, pp.128-149.
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A. and Gunde-Cimerman, N., 2005, “The Halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pullulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments”, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, pp. 6600–6605.
- Kohlmeyer J. and Volkmann-Kohlmeyer B., 1991, “ İllustrated Key to Filamentaus Higler Marine Fungi”, Botonica Marina, Vol. 34, pp. 1-61.
- Koru, E., 2004, “Çamaltı Tuzlası (İzmir, Türkiye) Ekosisteminde Artemia ve Önemi”, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Vol.21(1-2), pp.187-189.

- Kushner, D., 1985, "The Halobacteriaceae"., "En C. Woese and Wolfe, S (Ed.), The Bacteria", Academic Press, London. Vol 8, pp. 171-214.
- Küçükgül, E.Y. ve Kutlu, S., 2006, " Çinko ve Bakırın Sulu Çözeltide Aktif Karbonla Tekli Adsorpsiyonu", DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, Vol. 2, pp. 21-30.
- Lages, F., Silva-Graça, M. And Lucas, A., 1999, "Active Glycerol Uptake is A Mechanism Underlying Halotolerance in Yeasts: A Study of 42 Species", Microbiology, Vol. 145, pp. 2577-2585.
- Lahav, R., Fareleira, P., Nejidat, A. and Abeliovich, A., 2002, "The Identification and Characterisation Of Osmotolerant Yeasts Isolates From Chemical Wastewater Evaporation Ponds.", Microb. Ecol., Vol. 43, pp. 338-396.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W., 1992, "Phylogeny of Five Funguslike Protoctistan *Phytophthora* species, Inferred from The Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA", Molecular Biology and Evolution, Vol. 9, pp. 636-653.
- LeJohn, H.B., 1989, "Structure and Expression of Fungal Calmodulin Gen", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, pp. 19366-19372.
- Levinson, H.S. and Mahler, I., 1998, "Phosphatase Activity and Lead Resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*", FEMS Microbiol Lett, Vol. 161, pp.135-138.
- Liu, T., Li, H., Li, Z., Xiao, X., Chen, L., Deng, L., 2007, "Removal of Hexavalent Chromium by Fungal Biomass of *Mucor racemosus*: Influencing Factors and Removal Mechanism", World J Microbiol Biotechnol., Vol. 23, pp. 1685-1693.
- Lodge Dj., Baroni TJ., Cantrell SA., 2002, " Basidiomycetes of The Greater Antilles Project", In: Watling R., Frankland JD., Ainsworth AM., Isaac S., Robinson

C.(Eds), Tropical Mycology, Vol. 1, Macromycetes, pp. 45-60, CABI Publishing, Egham.

Lopes da Silva, T., De Sousa, E., Pereira, P.T., Ferrao, A.M. and Roseiro, J.C., 1998, "Cellular Fatty Acid Profiles for the Differentiation of *Penicillium* species", FEMS Microbiol Lett, Vol. 164, pp. 303-310.

Macaskie L.E. and Dean, A.C.R., 1989, "Biological Waste Treatment", Alan A. and Liss R New York, pp. 159-201.

Marbaniang, T. and Nazareth, S., 2007, "Isolation of Halotolerant *Penicillium* Species From Mangroves and Salterns and Their Resistance to Heavy Metals", Current Science Vol. 92(7), pp. 895-897.

Margejin, R. and Schinner, F., 2001, "Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology", Extremophiles, Vol. 5, pp. 73-80.

Marquez, M.C., Ventosa, A., and Cormenzana, R., 1992, "Phenotypic and Chemotaxonomic Characterization of *Marinococcus Halophilus*", Syst. Appl. Microbiol, Vol. 15, pp. 63-69.

Martin, J.P., 1949, "Use of Acid, Rose Bengal and Streptomycin in Plate Method for Estimating Soil Fungi", Soil Science, Vol. 69, pp. 215-232.

Matheickal, J.T. and Yu, Q., 1997, "Biosorption of Lead (II) from Aqueous Solutions By *Phellinus badius*", Miner. Eng., Vol. 10(9), pp. 947-957.

Melgar, M. J., Alonso, J., Garcia M.A., 2007, "Removal of Toxic Metals from Aqueous Solutions By Fungal Biomass of *Agaricus macrosporus*", Science of The Total Environment, Vol. 385, pp.12-19.

- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Leie, D., Wattiez, R., 2003, "Ralstonia metallidurans, A Bacterium Specially Adapted to Toxic Metals: Towards A Catalogue of Metal-Responsive Genes", FEMS Microbiol Rev., Vol. 27, pp. 385-410.
- Minareci O., Öztürk M., Minareci E., 2004, "Manisa Belediyesi Evsel Atık Su Arıtma Tesisinin, Gediz Nehrinin Ağır Metal Kirliliğine Olan Etkilerinin Belirlenmesi", Trakya Univ. J. Sci, Vol. 5(2), pp. 135-139.
- Moore B.A., Duncan J.R., Burgess J.E., 2007, "Fungal Bioaccumulation of Copper, Nickel, Gold and Platinum", Minerals Engineering, pp. 1-6.
- Moore-Landecker, E., 1996, "Fundamentals of the Fungi, Prentice Hall, Upper Saddle River", New Jersey., pp.574.
- Moubasher, A.H., Abdel-Hafez, S.I.I., Bagy, M.M.K., Abdel-Satar, M.A., 1990, "Halophilic and Halotolerant Fungi from Cultivated Desert and Salt Marsh Soils from Egypt", Acta Mycologica, Vol. 26, pp. 65-81.
- Muraleedharan, T.R. and Venkobachar, C., 1990, "Mechanism of Biosorption of Copper (II) by *Ganoderma lucidium*", Biotechnology & Bioengineering Vol. 35, pp. 320-325.
- Muzzarelli, R.A., Tanfari, F., 1982, "The Chelating Ability of Chitinous Material from *Aspergillus niger*, *Streptomyces*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakeseanus* and *Choamephra curcurnitium* in Chitin and Chitiosan", S. Mirano, S. Tokura (Eds.), Japanese Society of Chitin and Chitiosan, pp. 183-186.
- Nieves-Rivera, A.M., 2005, "Coastal Mycology of Puerto Rico: A Survey and Biological Aspects of Marine, Estuarine and Mangrove Fungi", Ph. D. Thesis, University of Puerto Rico At Mayagüez.

- Niu, H., X.S. and Wang, J.H., 1993, "Removal of Lead From Aqueous Solutions by Penicilin Biomass", *Biotechnology & Bioengineering*, Vol. 42, pp. 785-787.
- Oakley, B.R., 2004, "Tubulins in *Aspergillus nidulans*", *Fungal Genetics and Biology*, Vol. 41(4), pp. 420-427.
- O' Donnell, K. and Cigelnik, E., 1997, "Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types Within A Monophyletic Lineage of The Fungus *Fusarium* are Nonorthologous", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 7, pp. 103-116.
- O' Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki T., and Cigelnik, E., 2000, "Multigene Phylogeny of The *Gibberella fujikuroi* Species Complex: Detection of Additional Phylogenetically Distinct Species", *Mycoscience*, Vol. 41, pp. 61-78.
- Oren, A., 2002, "Diversity Of Halophilic Microorganisms: Environments, Phylogeny, Physiology and Applications", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*", Vol. 28, pp. 56-63.
- Oren, A. and Litchfield, C.D., 1999, "A Procedure for the Enrichment and Isolation of *Halobacterium*", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 173, pp. 353-358.
- Oren, A., Ventosa, A., Grant, W.D., 1997," Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in The Order Halobacteriales", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 47, pp. 233-238.
- Paşayev, A., 2005, "Ağır Metal İyonlarının Etkisiyle Bitkilerde Serbest Radikalli Lipoperoksidasyonun İncelenmesi", *Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.*
- Pedros- Alio C., 2004, "Trophic Ecology of Solar Salterns, in: Vertosa A(Ed), *Halophilic Microorganisms*", Springer- Verlag Heidelberg, pp. 33-48.

- Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N. and Plemenitas, A., 2002, "Cellular Responses to Environmental Salinity in The Halophilic Black Yeast *Hortaea werneckii*", Mol. Microbiol. Vol. 45, pp. 665–672.
- Pitt, J.I., 2000, "A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species", Food Science Australia, 197 p.
- Pitt, J.I. and Hocking, D., 1985, "Fungi and Food Spoilage", Academic Pres, Sydney, 413 p.
- Praphailong, W. And Fleet, G.H., 1997, "The Effect Of Ph, Sodium Chloride, Sucrose, Sorbate and Benzoate on The Growth of Food Spoilage Yeasts", Food Microbiol., Vol. 14, pp. 459-468.
- Rajendran, N., O. Matsuda, N. Imamura, and Y. Urushigawa, 1992, "Variation in Microbial Biomass and Community Structure in Sediments Eutrophic Bays as Determined By Phospholipid Ester-Linked Fatty Acids", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 58, pp. 562–571.
- Rether, A., 2002, "Entwicklung Und Charakterisierung Wasserlöslicher Benzoylthioharnstofffunktionalisierter Polymere Zur Selektiven Abtrennung Von Schwermetallionen Aus Abwässern Und Prozesslösungen", Doktora Tezi, Münih Teknik Üniversitesi.
- Roane, T.M., 1999, "Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal-Contaminated Soils", Microb. Ecol., Vol. 37, pp. 218-224.
- Rostami K.H. and Joodaki M.R., 2002, "Some Studies of Cadmium Adsorption Using *Aspergillus niger*, *Penicillium austurianum*, Employing An Airlift Fermenter", Chemical Engineering Journal, Vol. 89, pp. 239-252.

- Sağlam, N. and Cihangir N., 1995, Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, Vol. 11, pp. 157-161.
- Sağ, Y. ve Kutsal, T., 1993, “Biosorption of Heavy Metals by *Zoogloea ramigera*: Use of Adsorption Isotherms and A Comparison of Biosorption Characteristics”, Chem. Eng. J. Bioch. Eng., Vol. 60, pp. 181-188.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis T., 1989, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. And Filtenborg, O., 2000, “Introduction to Food and Airborne Fungi”, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, 389 p.
- Sanyal, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A. and Sastry, M., 2005., “Heavy-Metal Remediation by a Fungus as a Means of Production of Lead and Cadmium Carbonate Crystals”, Vol. 21, pp. 7220-7224.
- Schleper C., Pühler G., Kühlmorgen B., Zillig W., 1995, “Life At Extremely Low Ph”, Nature, Vol. 375, pp 741-742.
- Schutter, M.E. and Dick, R.P., 2000, “Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities”, Published in Soil Sci. Soc. Am. J., Vol. 64, pp.1659-1668.
- Serra, R., Cabanes, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G., Kozakiewicz, 2006, “*Aspergillus ibericus*: A New Species of Section *Nigri* Isolated from Grapes”, Mycologia, Vol. 98(2), pp. 295-306.

- Siebert, F., 1995, "Infrared Spectroscopy Applied to Biochemical and Biological Problems", In: Sauer, K. (Ed.), Biochemicals pectroscopy, Methods in Enzymology, Vol. 246, pp. 501-526.
- Silva-Graça, M. and Lucas, C., 2003, "Physiological Studies on Long-Term Adaptation to Salt Stress in The Extremely Halotolerant Yeast *Candida versatilis* CBS 4019 (Syn. *C. halophila*)", FEMS Yeast Res., Vol. 3, pp. 247-260.
- Sime, A.D., Abbott, L.L. and About, S.P., 2002, "A Mounting Medium for Use in Indoor Air Quality Spore-Trap Analyses", Mycologia, Vol. 94(6), pp. 1087-1088.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. "Enstrümental Analiz ilkeleri", Çeviri Editörleri, Kılıç, E., Köseoglu, F., Yılmaz, H., Bilim Yayıncılık, Ankara, pp. 230-251.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991, "Identification of *Rhizoctonia* species", APS PRESS, The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, USA., 133 p.
- Spring, S., Ludwig, W., Marquez, M.C., Ventosa, A., and Schleifer, K.H., 1996, "Halobacillus Gen. Nov., With Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. Nov. and *Halobacillus trueperi* sp. Nov., and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* Comb.", Nov. Int. J. Syst. Bacteriol, Vol. 46, pp. 492-496.
- Stahl, P.D. and Klug, M.J., 1996, "Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, pp. 4136-4146.
- Standberg, G.W., Shumate, S.E., Parrott, J.R., 1981, " Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals: Accumulation of Uranium By *Saccharomyces Cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*", Applied Environmental Microbiology, Vol. 41, pp. 237-245.

- Stan-Lotter, H., Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhüemer, M., Gruber, C., Weidler, G., Gerbl, F., 2006, "Extremely Halophilic Archea and The Issue of Long Term Microbial Survive", *Rev. Environmental Science Biotechnology*, Vol. 5, pp. 203-218.
- Sun, F. and Shao, Z., 2007, Biosorption and Bioaccumulation of Lead by *Penicillium* sp. Psf-2 Isolated from the Deep Sea Sediment of the Pasific Ocean", *Extremophiles*, Vol. 11, pp. 853-858.
- Taylor, J. W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C., 2000, "Phylogenetic Species Recognition and Species Concept in Fungi", *Fungal Genetic and Biology*, Vol. 31, pp. 21-32.
- Telefoncu, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Pazarlıoğlu, N., 2003, "Biyoinformatik I, Yağ Asit Profillerine Göre Mikroorganizmaların Tanısı ve Karakterizasyonu", İzmir.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997, "The Clustal X Windows İnterface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided By Quality Analysis Tools", *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, pp. 4876-4882.
- Ting, Y.P., Lawson, F. and Prince, L.G., 1991, " Uptake of Cadmium and Zinc By The Alga *Chlorella vulgaris*: II Multi-İon Stiation", *Biotechnol. Bioeng*, Vol. 37, pp. 445-455.
- Tkacz, J.S. and Lange, L., 2004, "Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine", 445 p. ISBN 0-306-47866-8.
- Trajanovska, S., Britz, M.L., Bhave, M., 1997, "Detection of Heavy Metal Ion Resistance Genes in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Isolated From A Lead-Contaminated Site", *Biodegradation*, Vol. 8, pp. 113-124.

- Tsezos, M. and Volesky, B., 1981, "Bioengineering of Uranium and Thorium", *Biotechnology & Bioengineering*, Vol. 23, pp. 583-604.
- Tunali S. and Akar T., 2006, "Zn(II) Biosorption Properties of *Botrytis cinerea* Biomass", *Journal Of Hazardous Materials*, pp.137-145.
- Tzesos, M., Noh, S.H., Baird, M.H.I., 1988, "A Batch Reactor Mass Transfer Kinetic Model for Immobilized-Biomass Biosorption", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 32, pp. 545-553.
- USEPA, 1990, "Guides to Pollution Prevention, The Fabricated Metal Products Industry", Epa/625/7- 90/006.
- Valera, F.R., Vreeland, R.H., Hocchstein, L.I, 1993, "Introduction to Salina Environments, in *The Biology of Halophilic Bacteria*", Eds. Fr: Crs Pres, Baco Raton, pp. 1-24.
- Van Burik, J.A.H, Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A., Myerson, D., 1998, "Comparison of Six Extraction Techniques for Isolation of DNA from Filamentous Fungi", *Medical Mycology*, Vol. 36, pp. 299-303.
- Vankar, P.S. and Bajpai, D., 2008, "Phyto-Remediation of Chrome-VI of Tannery Effluent by *Trichoderma* Species", *Desalination*, Vol. 222, pp. 255-262.
- Van Uden, N. and Fell, J.W., 1968, "Marine Yeasts", *Adv. Microbial. Sea*, Vol.1, pp. 167-201.
- Ventosa, A., Marquez, M.C., Garabito, M.J., and Arahal, D.R., 1998, "Moderately Halophilic Gram-Positive Bacterial Diversity in Hyper Saline Environments", *Extremophiles*, Vol. 2, pp. 297-304.

- Weete, J.D., 1981, "Lipids in Fungal Growth and Reproduction. in the Fungal Spore: Morphogenic Controls, Edited by G. Turian and H.R. Hohl", Academic Press, New York, pp. 463-485.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels J.S., King, J.D. and Bobbie, R.J., 1979, "Determination of Sedimentary Microbial Biomass By Extractible Lipid Phosphate", *Oecologia*, Vol. 40, pp. 51-62.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor. J., 1990, "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics", Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Wong, P.K. and Kwok, S.C., 1992, "Accumulation of Nickel Ion (Ni²⁺) by Immobilized Cells of *Enterobacter* Species", *Biotechnol Lett.*, Vol. 14(7), pp. 629-634.
- Yalçın, E. and Ertem, M.E., 1997, "Deniz Tuzlarının Türkiye Tuz Potansiyelindeki Yeri", *Türkiye 2. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, İzmir, pp. 208-215.
- Zafar S., Aqil F., Ahmad L., 2007, "Metal Tolerance and Biosorption Potential of Filamentous Fungi Isolated from Metal Contaminated Agricultural Soil", *Bioresource Technology*, Vol. 98, pp. 2557-2561.
- Zhou, L. and Kiff, R.J., 1991, "The Uptake of Copper From Aqueous Solution by Immobilized Fungal Biomass", *Chem.Tech. Biotechnol.*, Vol. 52, pp. 317-330.
- 1- www.umweltbundesamt.de/ubainfo-daten-t/daten/umweltkatastrophen.htm
 - 2- [http://tr.wikipedia.org/wiki/I%C4%9Fd%C4%B1r_\(il\)](http://tr.wikipedia.org/wiki/I%C4%9Fd%C4%B1r_(il))
 - 3- http://www.cografya.biz/forum/fotoethrafharita/izmir_camaltı_tuzlası_resimleri-t14078.0.html
 - 4- www.cografya.gen.tr

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mine AYDIN

Doğum Yeri: Eskişehir

Doğum Tarihi: 26.01.1986

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise: Yunus Emre Lisesi

Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi

Yüksek Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi

Bilimsel Etkinlikler:

Balkar, N., Şahin, T., Aydın, M., Şen, S. Afyonkarahisar İlinden izole edilen Actinomyces suşlarından antimikrobiyal madde üretiminin araştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, Sözlü Sunum 8-11 Eylül 2007.

Ciğerci İ.H., Korcan S.E., Sağlam N., Konuk M., Demirci A., Aydın M., Demir A. Farklı Pleurotus türleri gelişimi üzerine ağır metallerin etkisinin belirlenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster Sunumu 23-27 Haziran 2008.

EK 1: M1 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E085023.76A [1374] M1

Volume: DATA File: E085023.76A Seq Counter: 3 ID Number: 1374
 Type: Samp Bottle: 2 Method: FUNGI
 Created: 5/2/2008 9:49:18 AM
 Sample ID: M1 2. TEKRAR

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.536	5.086E+8	0.022	----	7.095	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.626	20014	0.021	----	7.292		----	< min rt	
1.757	592	0.028	----	7.579		----	< min rt	
1.812	245	0.022	----	7.700		----	< min rt	
1.852	1050	0.026	----	7.787		----	< min rt	
1.903	1943	0.022	----	7.898		----	< min rt	
1.958	906	0.027	----	8.019		----	< min rt	
2.052	659	0.028	----	8.223		----	< min rt	
6.800	3663	0.037	0.978	13.999	14:0	0.51	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
7.739	3108	0.043	0.964	14.621	15:0 ISO	0.43	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
7.874	8571	0.038	0.962	14.711	15:0 ANTEISO	1.17	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
8.311	19766	0.039	0.956	15.001	15:0	2.69	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
9.336	1982	0.038	0.946	15.626	16:0 ISO	0.27	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
9.575	1189	0.039	0.944	15.772	16:1 Cis 7 (w 9)	0.16	ECL deviates -0.002	
9.642	13496	0.042	0.944	15.812	16:1 Cis 9 (w 7)	1.81	ECL deviates -0.005	
9.711	1991	0.037	0.943	15.854	Sum In Feature 5	0.27	ECL deviates -0.002	16:1 Cis 10/15:2OH
9.951	75776	0.040	0.942	16.001	16:0	10.15	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
11.179	3681	0.040	0.934	16.719	17:0 ANTEISO	0.49	ECL deviates -0.003	Reference -0.007
11.295	117623	0.045	0.934	16.787	17:1 Cis 9 (w 8)	15.63	ECL deviates -0.005	
11.466	2506	0.042	0.933	16.887	17:0 CYCLO	0.33	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
11.663	23087	0.045	0.932	17.002	17:0	3.06	ECL deviates 0.002	Reference -0.002
12.092	2358	0.051	0.930	17.248	C14 Dicarbox/18:1DMA	0.31	ECL deviates -0.008	
12.916	324917	0.046	0.928	17.721	18:2 CIS 9, 12/18:0a	42.89	ECL deviates 0.001	
12.999	141938	0.049	0.928	17.768	Sum In Feature 8	18.73	ECL deviates -0.005	18:1 CIS 9 (w 9)
13.403	4924	0.044	0.926	18.000	18:0	0.65	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
14.704	3328	0.039	0.923	18.750	19:1 (w 11)	0.44	ECL deviates -0.004	
----	1991	---	----	----	Summed Feature 5	0.27	16:1 Trans 9 (w 7)	15:0 ISO 2OH/16:1t9
----	----	----	----	----	----	----	16:1 Cis 10/15:2OH	
----	141938	---	----	----	Summed Feature 8	18.73	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.004 Number Reference Peaks: 10
 Total Response: 753905 Total Named: 753905
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 702777

*** No Matches found in FUNGI

EK 2: M2 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E08C227.18A [1389] M2

Volume: DATA File: E08C227.18A Seq Counter: 4 ID Number: 1389
 Type: Samp Bottle: 3 Method: FUNGI
 Created: 12/22/2008 6:26:24 PM
 Sample ID: 6 HAZIRAN M2

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.536	4.942E+8	0.023	----	7.101	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
7.869	1818	0.038	0.931	14.711	15:0 ANTEISO	0.93	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
9.945	29271	0.040	0.923	16.000	16:0	14.89	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
11.177	1460	0.044	0.923	16.721	17:0 ANTEISO	0.74	ECL deviates -0.001	Reference -0.005
11.283	3199	0.047	0.923	16.782	17:1 Cis 9 (w 8)	1.63	ECL deviates -0.010	
11.658	2147	0.045	0.924	17.001	17:0	1.09	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
12.904	141305	0.042	0.923	17.715	18:2 CIS 9,12/18:0a	71.85	ECL deviates -0.005	
12.987	14442	0.045	0.923	17.763	Sum In Feature 8	7.34	ECL deviates -0.010	18:1 CIS 9 (w 9)
13.402	2994	0.044	0.921	18.000	18:0	1.52	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
17.807	764	0.113	----	20.554		----	> max rt	
----	14442	---	----	----	Summed Feature 8	7.34	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.005 Reference ECL Shift: 0.004 Number Reference Peaks: 5
 Total Response: 196637 Total Named: 196637
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 181475

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
FUNGI 3.80	0.711	Aspergillus-glaucus*
	0.645	Trichophyton-mentagrophytes*
	0.632	Trichophyton-rubrum*
	0.551	Microsporum-canis
	0.432	Epidermophyton floccosum
	0.428	Phoma spp.
	0.417	Penicillium-notatum*
	0.386	Microsporum-gypseum
	0.376	Chaetomium spp.*

EK 3: M3 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E08C227.18A [1390] M3

Volume: DATA File: E08C227.18A Seq Counter: 5 ID Number: 1390
 Type: Samp Bottle: 4 Method: FUNGI
 Created: 12/22/2008 6:51:13 PM
 Sample ID: 6 HAZIRAN M3

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.537	4.966E+8	0.022	----	7.093	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
7.735	1389	0.038	0.932	14.621	15:0 ISO	2.15	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
7.870	2778	0.037	0.931	14.711	15:0 ANTEISO	4.30	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
9.331	2991	0.042	0.924	15.627	16:0 ISO	4.59	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
9.943	9522	0.040	0.923	16.000	16:0	14.62	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
11.176	1555	0.042	0.923	16.721	17:0 ANTEISO	2.39	ECL deviates -0.001	Reference -0.006
12.900	38797	0.044	0.923	17.714	18:2 CIS 9,12/18:0a	59.53	ECL deviates -0.006	
12.989	6518	0.046	0.923	17.765	Sum In Feature 8	10.00	ECL deviates -0.008	18:1 CIS 9 (w 9)
13.399	1582	0.042	0.921	18.000	18:0	2.42	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
16.019	6734	0.131	0.896	19.517	Unknown 19.521	----	> max ar/ht	
----	6518	----	----	----	Summed Feature 8	10.00		18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.003 Reference ECL Shift: 0.004 Number Reference Peaks: 6
 Total Response: 71865 Total Named: 65132
 Percent Named: 90.63% Total Amount: 66176
 Profile Comment: Review report comments.

*** No Matches found in FUNGI

EK 4: M4 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E08C227.18A [1391] M4

Volume: DATA File: E08C227.18A Seq Counter: 6 ID Number: 1391
 Type: Samp Bottle: 5 Method: FUNGI
 Created: 12/22/2008 7:16:00 PM
 Sample ID: 6 HAZIRAN M4

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.536	4.952E+8	0.023	----	7.094	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.626	9386	0.018	----	7.289		----	< min rt	
1.904	807	0.019	----	7.898		----	< min rt	
6.797	2091	0.038	0.944	13.999	14:0	0.76	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
8.306	8834	0.037	0.928	15.001	15:0	3.15	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
9.636	5250	0.042	0.923	15.813	16:1 Cis 9 (w.7)	1.86	ECL deviates -0.004	
9.945	29819	0.040	0.923	16.001	16:0	10.57	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
11.171	2289	0.043	0.923	16.718	17:0 ANTEISO	0.81	ECL deviates -0.004	Reference -0.009
11.286	47948	0.047	0.923	16.786	17:1 Cis 9 (w 8)	17.00	ECL deviates -0.006	
11.656	7611	0.045	0.924	17.002	17:0	2.70	ECL deviates 0.002	Reference -0.004
12.904	137634	0.044	0.923	17.717	18:2 CIS 9,12/18:0a	48.76	ECL deviates -0.003	
12.991	38688	0.052	0.923	17.767	Sum In Feature 8	13.70	ECL deviates -0.006	18:1 CIS 9 (w 9)
13.399	1960	0.042	0.921	18.000	18:0	0.69	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
15.999	5420	0.146	----	19.506		----	> max ar/ht	
----	38688	----	----	----	Summed Feature 8	13.70	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.004
 Total Response: 287543
 Percent Named: 98.12%

Reference ECL Shift: 0.005 Number Reference Peaks: 6
 Total Named: 282124
 Total Amount: 260470

*** No Matches found in FUNGI

EK 5: M5 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E085013.99A [1365] M5

Volume: DATA File: E085013.99A Seq Counter: 7 ID Number: 1365
 Type: Samp Bottle: 6 Method: FUNGI
 Created: 5/1/2008 12:01:38 PM
 Sample ID: M5 TEKRAR

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.538	4.957E+8	0.023	----	7.098	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.855	2179	0.028	----	7.790		----	< min rt	
1.905	991	0.021	----	7.899		----	< min rt	
2.098	619	0.022	----	8.320		----	< min rt	
2.162	2193	0.026	----	8.459		----	< min rt	
4.852	6152	0.030	----	12.429		----	< min rt	
6.810	2072	0.040	0.979	14.000	14:0	0.56	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
7.749	1950	0.044	0.964	14.622	15:0 ISO	0.52	ECL deviates 0.001	Reference 0.001
7.884	1856	0.039	0.962	14.711	15:0 ANTEISO	0.50	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
8.319	3981	0.040	0.956	15.000	15:0	1.06	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
9.652	5354	0.041	0.942	15.811	16:1 Cis 9 (w 7)	1.40	ECL deviates -0.006	
9.961	49746	0.040	0.940	16.000	16:0	13.00	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
11.303	3304	0.046	0.931	16.785	17:1 Cis 9 (w 8)	0.86	ECL deviates -0.007	
12.924	198288	0.045	0.924	17.718	18:2 CIS 9,12/18:0a	50.99	ECL deviates -0.002	
13.013	118391	0.062	0.924	17.769	Sum In Feature 8	30.43	ECL deviates -0.004	18:1 CIS 9 (w 9)
13.417	2628	0.043	0.923	18.000	18:0	0.67	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
----	118391	----	----	----	Summed Feature 8	30.43	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.003
 Total Response: 393722
 Percent Named: 98.44%

Reference ECL Shift: 0.001 Number Reference Peaks: 6
 Total Named: 387570
 Total Amount: 359522

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
FUNGI 3.80	0.841	Geotrichum-candidum*
	0.749	Phoma spp.
	0.702	Botrytis spp.
	0.699	Aspergillus-niger*
	0.628	Nigrospora spp.*
	0.572	Aspergillus-terreus*
	0.532	Acremonium spp.
	0.514	Fusarium-species*
	0.498	Penicillium-notatum*
	0.482	Pithomyces spp.*

EK 6: M6 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E085013.99A [1366] M6

Volume: DATA File: E085013.99A Seq Counter: 8 ID Number: 1366
 Type: Samp Bottle: 7 Method: FUNGI
 Created: 5/1/2008 12:26:22 PM
 Sample ID: M6 TEKRAR

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.538	4.84E+8	0.024	----	7.101	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.855	1224	0.021	----	7.793		----	< min rt	
2.162	2857	0.024	----	8.463		----	< min rt	
4.852	2900	0.031	----	12.431		----		
7.748	1607	0.038	0.964	14.621	15:0 ISO	4.31	ECL deviates 0.000	Reference 0.001
7.883	1920	0.037	0.962	14.711	15:0 ANTEISO	5.14	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
9.346	3503	0.039	0.945	15.626	16:0 ISO	9.21	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
9.959	5813	0.042	0.940	16.000	16:0	15.20	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
12.918	14631	0.044	0.924	17.715	18:2 CIS 9,12/18:0a	37.63	ECL deviates -0.005	
13.006	11094	0.062	0.924	17.765	Sum In Feature 8	28.52	ECL deviates -0.008	18:1 CIS 9 (w 9)
17.632	945	0.154	----	20.445		----	> max rt	
----	11094	----	----	----	Summed Feature 8	28.52	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.004
 Total Response: 41469
 Percent Named: 93.01%

Reference ECL Shift: 0.001 Number Reference Peaks: 4
 Total Named: 38569
 Total Amount: 35949

*** No Matches found in FUNGI

EK 7: M7 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E08C227.18A [1394] M7

Volume: DATA File: E08C227.18A Seq Counter: 9 ID Number: 1394
Type: Samp Bottle: 8 Method: FUNGI
Created: 12/22/2008 8:30:22 PM
Sample ID: 6 HAZIRAN M7

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.537	4.917E+8	0.024	----	7.103	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
7.867	1504	0.038	0.931	14.711	15:0 ANTEISO	4.05	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
9.331	1264	0.032	0.924	15.627	16:0 ISO	3.38	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
9.943	6604	0.041	0.923	16.000	16:0	17.65	ECL deviates 0.000	Reference -0.005
12.898	22802	0.045	0.923	17.714	18:2 CIS 9,12/18:0a	60.93	ECL deviates -0.006	
12.987	3571	0.048	0.923	17.765	Sum In Feature 8	9.54	ECL deviates -0.008	18:1 CIS 9 (w 9)
13.397	1662	0.040	0.921	18.000	18:0	4.43	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
----	3571	---	----	----	Summed Feature 8	9.54	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.004 Reference ECL Shift: 0.005 Number Reference Peaks: 4
Total Response: 37407 Total Named: 37407
Percent Named: 100.00% Total Amount: 34531

*** No Matches found in FUNGI

EK 8: M8 İzolatının Yağ Asidi Analizi Sonucu

E08C233.94A [1409] M8

Volume: DATA File: E08C233.94A Seq Counter: 5 ID Number: 1409
 Type: Samp Bottle: 4 Method: FUNGI
 Created: 12/23/2008 11:05:15 AM
 Sample ID: M8-2

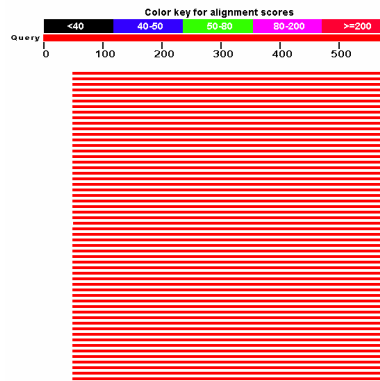
RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.538	4.878E+8	0.024	----	7.100	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.824	1704	0.023	----	7.727		----	< min rt	
1.904	1661	0.022	----	7.902		----	< min rt	
2.619	586	0.019	1.384	9.466	C10 Primary alcohol	0.26	ECL deviates -0.002	
7.732	1425	0.042	0.933	14.622	15:0 ISO	0.43	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
7.867	2622	0.037	0.931	14.711	15:0 ANTEISO	0.80	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
8.304	1347	0.037	0.928	15.000	15:0	0.41	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
9.330	2705	0.043	0.924	15.623	16:0 ISO	0.82	ECL deviates -0.003	Reference -0.003
9.635	4167	0.042	0.923	15.809	16:1 Cis 9 (w 7)	1.26	ECL deviates -0.008	
9.944	38217	0.040	0.923	15.997	16:0	11.52	ECL deviates -0.003	Reference -0.003
10.738	3092	0.058	0.923	16.461	Iso 17:1 at 5 (w 12)	0.93	ECL deviates 0.001	
11.047	1870	0.050	0.923	16.642	17:0 ISO	0.56	ECL deviates 0.013	Reference 0.012
11.176	2666	0.042	0.923	16.717	17:0 ANTEISO	0.80	ECL deviates -0.005	Reference -0.005
11.287	6770	0.047	0.923	16.782	17:1 Cis 9 (w 8)	2.04	ECL deviates -0.010	
11.655	2570	0.046	0.923	16.997	17:0	0.77	ECL deviates -0.003	Reference -0.003
12.904	161187	0.044	0.922	17.716	18:2 CIS 9,12/18:0a	48.54	ECL deviates -0.004	
12.989	97567	0.043	0.921	17.765	Sum In Feature 8	29.38	ECL deviates -0.008	18:1 CIS 9 (w 9)
13.396	4872	0.045	0.920	17.999	18:0	1.46	ECL deviates -0.001	Reference -0.006
15.993	6350	0.125	----	19.499		----	> max ar/ht	
18.217	944	0.058	----	20.793		----	> max rt	
18.444	595	0.061	----	20.925		----	> max rt	
----	97567	---	----	----	Summed Feature 8	29.38	18:1 CIS 9 (w 9)	18:1 (w 8)

ECL Deviation: 0.006 Reference ECL Shift: 0.005 Number Reference Peaks: 9
 Total Response: 338012 Total Named: 331662
 Percent Named: 98.12% Total Amount: 306036

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
FUNGI 3.80	0.620	Geotrichum-candidum*
	0.544	Aspergillus-fumigatus
	0.503	Botrytis spp.
	0.430	Penicillium-chrysogenum*
	0.416	Penicillium-notatum*
	0.413	Pithomyces spp.*
	0.382	Aspergillus-terreus*
	0.357	Phoma spp.

EK 9: M1 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU497955.1	Penicillium sp. F23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; intern	785	785	91%	0.0	94%
EU497943.1	Penicillium sp. 36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	785	785	91%	0.0	94%
EF200090.1	Penicillium chrysogenum isolate NRRL 35635 internal transcribed spac	785	785	91%	0.0	94%
EU128598.1	Penicillium chrysogenum strain 32P 18S ribosomal RNA gene, partial :	785	785	91%	0.0	94%
EU128591.1	Penicillium chrysogenum strain 16P 18S ribosomal RNA gene, partial :	785	785	91%	0.0	94%

[gb|EU497955.1](#) Penicillium sp. F23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=609 Score = 785 bits (870), Identities = 507/536 (94%), Gaps = 23/536 (4%)

[gb|EU497943.1](#) Penicillium sp. 36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=609 Score = 785 bits (870), Identities = 507/536 (94%), Gaps = 23/536 (4%)

[gb|EF200090.1](#) Penicillium chrysogenum isolate NRRL 35635 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1132 Score = 785 bits (870), Identities = 507/536 (94%), Gaps = 23/536 (4%)

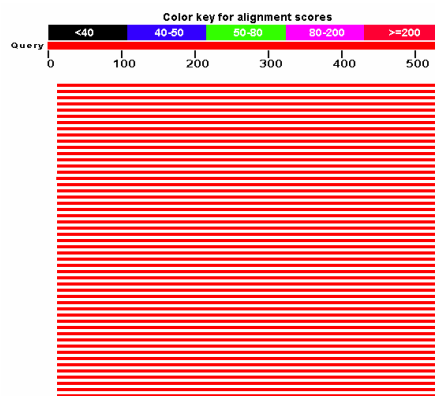
[gb|EU128598.1](#) Penicillium chrysogenum strain 32P 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=580 Score = 785 bits (870), Identities = 507/536 (94%), Gaps = 23/536 (4%)

[gb|EU128591.1](#) Penicillium chrysogenum strain 16P 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=565 Score = 785 bits (870), Identities = 507/536 (94%), Gaps = 23/536 (4%)

M1 Reverse

```
CCTGGTGC GGCCATGTATGTTACCTTTGTTGTTACGGGATTCAATTACCCCGAGTGAGGGG
GCCCTCTTGGGGTTCCAACCTTCCCCACCCCGTGTTTATTTAACCCTTGTTGCTTCGGCG
GGCCCCGCCTTAAC TGCCGCCGGGGGCTTACGCCCCGGCCCCGCGCCCGCCGAGACA
CCCTCGAACCTCTGTCTGAAGATTTGTAGTCTGAGTGAAACTATAAATTATTTTAAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGTTTCGGGCATCGATGAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA CTGT
GAATTGCAATT CAGTAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCC
GATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCCGCGTCCGGTCGTCGAGCGTATGG
GGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTCTATCCA
GGTTGACCGTCCGATCAGGTAGG
```


EK 10: M2 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF652084.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 35697 18S ribosomal RNA ge	917	917	97%	0.0	99%
EF652083.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 35696 18S ribosomal RNA ge	917	917	97%	0.0	99%
EF652082.1	Aspergillus hollandicus isolate NRRL 25850 18S ribosomal RNA ge	917	917	97%	0.0	99%
EF652079.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 4716 18S ribosomal RNA qer	917	917	97%	0.0	99%
EF652078.1	Eurotium cristatum isolate NRRL 4222 18S ribosomal RNA gene, i	917	917	97%	0.0	99%

[gb|EF652084.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 35697 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1111 Score = 917 bits (1016), Identities = 518/522 (99%), Gaps = 2/522 (0%)

[gb|EF652083.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 35696 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1111 Score = 917 bits (1016), Identities = 518/522 (99%), Gaps = 2/522 (0%)

[gb|EF652082.1](#) Aspergillus hollandicus isolate NRRL 25850 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1111 Score = 917 bits (1016), Identities = 518/522 (99%), Gaps = 2/522 (0%)

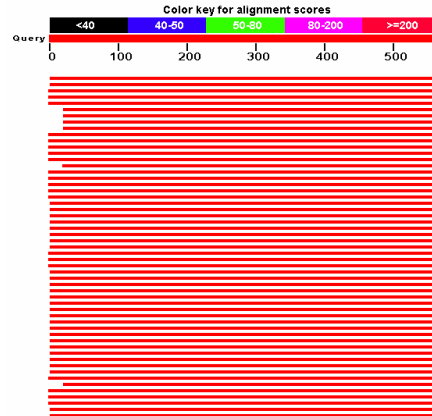
[gb|EF652079.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 4716 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1111 Score = 917 bits (1016), Identities = 518/522 (99%), Gaps = 2/522 (0%)

[gb|EF652078.1](#) Eurotium cristatum isolate NRRL 4222 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1111 Score = 917 bits (1016), Identities = 518/522 (99%), Gaps = 2/522 (0%)

M2 Forward

```
CTATATCTCAGAGATGCGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCATCCGTGTCTATCTGTACCCTGT
TGCTTCGGCGTGGCCACGGCCCGCCGGAGACTAACATTTAGAACGCTGTCTGAGTTTGCAGT
CTGAGTTTTTAGTTAAACAATCGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGT
CTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT
GCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTGGGCTTCCGTCCCTGGCAACGGGGACGGGGCCAAAAGG
CAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCCCGTAGGTC
CAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTTAAACCAGGTTGACCTCGGATCAAGTAGGGA
TACCCGCTGAACCTAAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAA
```

EK 11: M3 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY373867.1	Aspergillus sojae strain ATCC 14895 18S ribosomal RNA gene, partial	978	978	99%	0.0	98%
AY373859.1	Aspergillus parasiticus strain NRRL 502 18S ribosomal RNA gene, part	978	978	99%	0.0	98%
AB008421.1	Aspergillus toxicarius gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, p	978	978	100%	0.0	98%
AB008419.1	Aspergillus sojae gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, partia	978	978	100%	0.0	98%
AB008418.1	Aspergillus parasiticus gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, i	978	978	100%	0.0	98%

[gb|AY373867.1](#) Aspergillus sojae strain ATCC 14895 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=619 Score = 978 bits (1084), Identities = 557/564 (98%), Gaps = 2/564 (0%)

[gb|AY373859.1](#) Aspergillus parasiticus strain NRRL 502 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=619 Score = 978 bits (1084), Identities = 557/564 (98%), Gaps = 2/564 (0%)

[dbj|AB008421.1](#) Aspergillus toxicarius gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, partial and complete cds Length=576 Score = 978 bits (1084), Identities = 559/566 (98%), Gaps = 3/566 (0%)

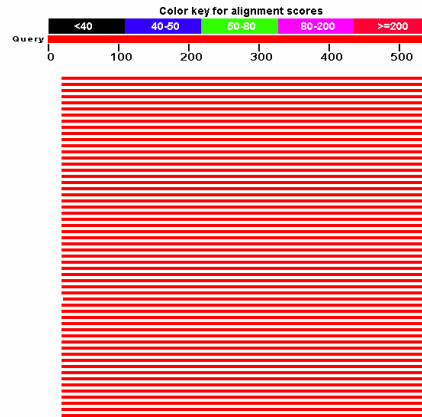
[dbj|AB008419.1](#) Aspergillus sojae gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, partial and complete sequence Length=576 Score = 978 bits (1084), Identities = 559/566 (98%), Gaps = 3/566 (0%)

[dbj|AB008418.1](#) Aspergillus parasiticus gene for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, partial and complete cds Length=576 Score = 978 bits (1084), Identities = 559/566 (98%), Gaps = 3/566 (0%)

M3 Reverse

```
TTTCCGTAGGATCACCTGCTGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACT
CCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTCATGGCCGCCGGGGGA
GCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTT
GATTGTATCGCAATCAGTTAAAGACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCATGAAA
CGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCA
AGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCTTCCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCG
GCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCG
GCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTCCAGGTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
```

EK 12: M4 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU497955.1	Penicillium sp. F23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; in	904	904	96%	0.0	98%
EU497943.1	Penicillium sp. 36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	904	904	96%	0.0	98%
EU128598.1	Penicillium chrysogenum strain 32P 18S ribosomal RNA gene, pa	904	904	96%	0.0	98%
EU128591.1	Penicillium chrysogenum strain 16P 18S ribosomal RNA gene, pa	904	904	96%	0.0	98%
EU139860.1	Penicillium sp. M1100 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	904	904	96%	0.0	98%

[gb|EU497955.1](#) Penicillium sp. F23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; partial sequence Length=609 Score = 904 bits (1002), Identities = 516/522 (98%), Gaps = 3/522 (0%)

[gb|EU497943.1](#) Penicillium sp. 36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=609 Score = 904 bits (1002), Identities = 516/522 (98%), Gaps = 3/522 (0%)

[gb|EU128598.1](#) Penicillium chrysogenum strain 32P 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=580 Score = 904 bits (1002) Identities = 516/522 (98%), Gaps = 3/522 (0%)

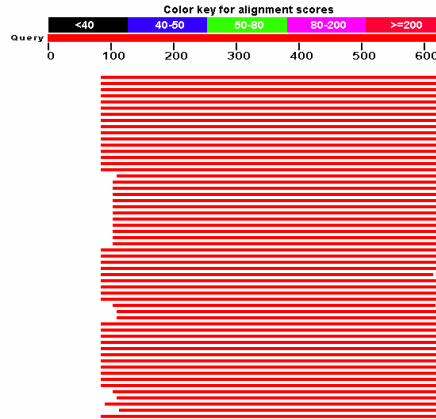
[gb|EU128591.1](#) Penicillium chrysogenum strain 16P 18S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=565 Score = 904 bits (1002), Identities = 516/522 (98%), Gaps = 3/522 (0%)

[gb|EU139860.1](#) Penicillium sp. M1100 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=551 Score = 904 bits (1002), Identities = 516/522 (98%), Gaps = 3/522 (0%)

M4 Reverse

```
TTCTCCGAGCGACTGCGAATCTCATTACTGAGTGAGGCCCTCTGGTCCAACCTCCCACCCGT
GTTTATTTTACCTTGTGTGCTTCGGCGTGCCTGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGCTTACGCCCC
CGGGCCCGCGCCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAA
TATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGG
CTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCAC
CGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTG
CCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTGACCTCGGATCAGGTAG
```

EK 13: M5 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB369898.1	Aspergillus niger genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, strain: IFM 54309	820	820	86%	0.0	94%
EF151436.1	Aspergillus awamori isolate F11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; internal	820	820	86%	0.0	94%
EF136365.1	Aspergillus niger 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	820	820	86%	0.0	94%
DQ778910.1	Aspergillus tubingensis IBL 03117 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	820	820	86%	0.0	94%
EF621571.1	Aspergillus tubingensis strain 3.4342 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	820	820	86%	0.0	94%

[dbj|AB369898.1](#) Aspergillus niger genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, strain: IFM 54309 Length=623 Score = 820 bits (908), Identities = 531/560 (94%), Gaps = 19/560 (3%)

[gb|EF151436.1](#) Aspergillus awamori isolate F11 5.8S ribosomal RNA gene complete sequence partial sequence Length=600 Score = 820 bits (908), Identities = 531/560 (94%), Gaps = 19/560 (3%)

[gb|EF136365.1](#) Aspergillus niger 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=599 Score = 820 bits (908), Identities = 531/560 (94%), Gaps = 19/560 (3%)

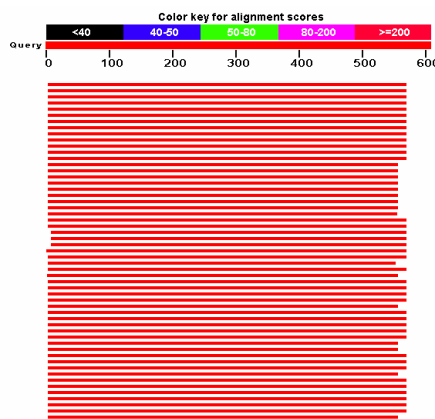
[gb|DQ778910.1](#) Aspergillus tubingensis IBL 03117 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=576 Score = 820 bits (908), Identities = 531/560 (94%), Gaps = 19/560 (3%)

[gb|EF621571.1](#) Aspergillus tubingensis strain 3.4342 18S ribosomal RNA gene, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=674 Score = 820 bits (908), Identities = 531/560 (94%), Gaps = 19/560 (3%)

M5 Reverse

```
AACTTTTGTGCGGGGGGAAAGGGCCCCCGGGGAAAAAGGGGGCCCCCAAAGAACCGTA
TTATAAACCGAGGGGGGCCCAAAATCCGTAGTGAAC TTTCGCAGGATTATTACCGAGTGG
GGTCCTTGGGGCCACCTCCATCGGGTTAATATACCCTGTGCTTCGGCGGCCGCGCTTTCGC
CGCGGGGGGCGCTTGGCCCCCGGCCCGTGCCCGCCGAGACCCACACGAACACTGTCTGA
AGGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGT TAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTGG
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGG
ACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAC
ATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTCCAACCATTTTTTCACAGGTTGACTC
GGATTCGGTA
```

EK 14: M6 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF634380.1	Aspergillus tubingensis isolate NRRL 35179 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	92%	0.0	97%
AB369898.1	Aspergillus niger genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, strain: IFM 54309	939	939	92%	0.0	97%
EF151436.1	Aspergillus awamori isolate F11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	92%	0.0	97%
EF136365.1	Aspergillus niger 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	92%	0.0	97%
EF621571.1	Aspergillus tubingensis strain 3.4342 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	939	939	92%	0.0	97%

[gb|EF634380.1](#) Aspergillus tubingensis isolate NRRL 35179 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1156 Score = 939 bits (1040), Identities = 549/563 (97%), Gaps = 4/563 (0%)

[dbj|AB369898.1](#) Aspergillus niger genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, strain: IFM 54309 Length=623 Score = 939 bits (1040), Identities = 549/563 (97%), Gaps = 4/563 (0%)

[gb|EF151436.1](#) Aspergillus awamori isolate F11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length =600 Score = 939 bits (1040), Identities = 549/563 (97%), Gaps = 4/563 (0%)

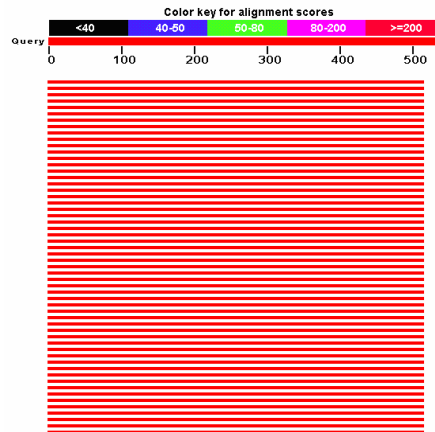
[gb|EF136365.1](#) Aspergillus niger 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=599 Score = 939 bits (1040), Identities = 549/563 (97%), Gaps = 4/563 (0%)

[gb|EF621571.1](#) Aspergillus tubingensis strain 3.4342 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=674 Score = 939 bits (1040), Identities = 549/563 (97%), Gaps = 4/563 (0%)

M6 Forward

```
AAGATATTACCGAGTGC GG GTCTCTTGGGCCCAACCTCCCTATCCGTGTCTATTATACCCTGT
TGCTTCGGCGGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTG
CCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGC
AATCAGTAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTAGAACGCACATTG
CGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCTGGC
TTGTGTGTTGGGTGCGCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACC
GCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCCTG
CCGACGTTTTCCACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGGGAT
GAAACATATGGGGGTGCGGGGAACCCCCCGGTTTTCTTACGCCGCCT
```

EK 15: M7 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ467988.1	Aspergillus parasiticus strain 2999 18S ribosomal RNA gene, part	646	646	95%	0.0	91%
EF661568.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 6433 18S ribosomal RNA qer	643	643	95%	0.0	91%
EF661557.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 424 18S ribosomal RNA gene	643	643	95%	0.0	91%
EF661555.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 4123 18S ribosomal RNA qer	643	643	95%	0.0	91%
EF661546.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 1988 18S ribosomal RNA qer	643	643	95%	0.0	91%

[gb|DQ467988.1](#) Aspergillus parasiticus strain 2999 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=595 Score = 646 bits (716), Identities = 470/513 (91%), Gaps = 36/513 (7%)

[gb|EF661568.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 6433 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1152 Score = 643 bits (712), Identities = 469/513 (91%), Gaps = 37/513 (7%)

[gb|EF661557.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 424 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1152 Score = 643 bits (712), Identities = 469/513 (91%), Gaps = 37/513 (7%)

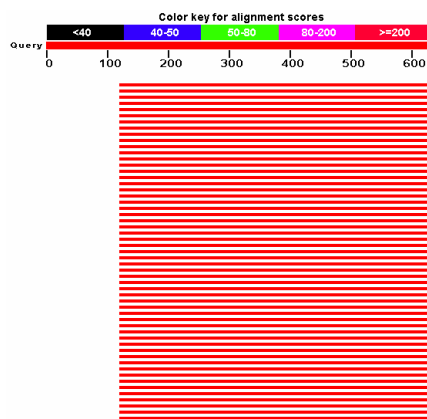
[gb|EF661555.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 4123 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1152 Score = 643 bits (712), Identities = 469/513 (91%), Gaps = 37/513 (7%)

[gb|EF661546.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 1988 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=1152 Score = 643 bits (712), Identities = 469/513 (91%), Gaps = 37/513 (7%)

M7 Forward

```
CTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAATCGGTTGTGTTTGC GTTCGGCAAGCGCCGCC
GGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCTCCCATACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCCG
TGCCTTTGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGCCAACACACAAGCCGTGCTTG
ATGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGACTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTTGCTGCGT
TCCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCACTCGTTAGAAATTGTTTAACTGACTCGCGA
TACAAATCAACTCAAGACTTCACTAGAATCAAGAACACAGTTCCCGTGGGTGTCTCCGTGGC
GGGGCGCCGGGGCCCGGGGGGCTGAACGACCCCGGGGCGGCCATTGAACGGGCGGGGC
CCCGCCAAAAGCAACCTAAGGGTTCCCGTTAAACAACGGGGGTGGG
```

EK 16: M8 İzolatının ITS Bölgesi DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF502829.1	Leaf litter ascomycete strain its317 isolate 1000529907 internal t	634	634	80%	2e-178	91%
EU520105.1	Botryosphaeria dothidea isolate NW338 18S ribosomal RNA gene	632	632	80%	6e-178	91%
EU497955.1	Penicillium sp. F23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; in	632	632	80%	6e-178	91%
EU497943.1	Penicillium sp. 36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	632	632	80%	6e-178	91%
EU069429.1	Penicillium sp. MZKI P-267 18S ribosomal RNA gene, partial seq	632	632	80%	6e-178	91%

[gb|AF502829.1](#) Leaf litter ascomycete strain its317 isolate 1000529907 partial sequence Length=559 Score = 634 bits (702), Expect = 2e-178 Identities = 463/508 (91%), Gaps = 35/508 (6%) Strand=Plus/Plus

[gb|EU520105.1](#) Botryosphaeria dothidea isolate NW338 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Length=580 Score = 632 bits (700), Expect = 6e-178 Identities = 463/508 (91%), Gaps = 35/508 (6%)

[gb|EU497955.1](#) Penicillium sp. F23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=609 Score = 632 bits (700), Expect = 6e-178 Identities = 463/508 (91%), Gaps = 35/508 (6%)

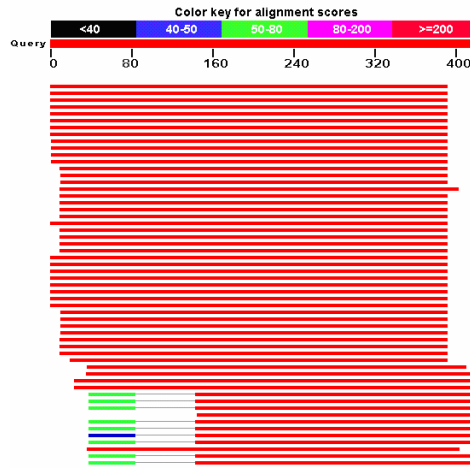
[gb|EU497943.1](#) Penicillium sp. 36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=609 Score = 632 bits (700), Expect = 6e-178 Identities = 463/508 (91%), Gaps = 35/508 (6%)

[gb|EU069429.1](#) Penicillium sp. MZKI P-267 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=535 Score = 632 bits (700), Expect = 6e-178 Identities = 463/508 (91%), Gaps = 35/508 (6%)

M8 Reverse

TTTTCCGTGTTGTGGTTGTGCACCCCGTGGCGGGGAAGTGGATTTC AATTTACCCCGGAGGT
 GGAGGGGGCCCCCTTTTTGGGGTTCCCAACCCCTCCCCCAACCCCGGGTGTTTTATTTTTTA
 CCCTTTGGTTGGCTTCCGGGCGGGCCCGTCCCTTAACGTGGGCGCGGGGGGCTTACGC
 CCCC CGGACCCGCGCCCGCCAGAACACCCCTGAACCTGTCTGGAAGATTGTAGTCTGA
 GTGAAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACCTGGATCTCTTGGTTCCGGCATTCTGTA
 AGAACGCAGCGAAATGCGATACGTGATGTGAATTGCAAATTCAGTGTATCATCGTAGTCTTT
 GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
 TCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGCATCCCGGGGACGGGCCCCGCACAAG
 GCAGCGGCGGCACCTGCGTCCGGTCGCTCGCAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCGTCTGTA
 GGCCCGGCGCGGCCTTGCCGATCTAACCCACGATTTTTATCACAGGTTGACCTCGGTAT
 TCAGGT

EK 17: M2 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF651902.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 35697 beta-tubulin gene, partia	706	706	93%	0.0	100%
EF651901.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 35696 beta-tubulin gene, partia	706	706	93%	0.0	100%
EF651900.1	Aspergillus hollandicus isolate NRRL 25850 beta-tubulin gene, partia	706	706	93%	0.0	100%
EF651899.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 4716 beta-tubulin gene, partial	706	706	93%	0.0	100%
EF651898.1	Eurotium amstelodami isolate NRRL 108 beta-tubulin gene, partial c	706	706	93%	0.0	100%

[gb|EF651902.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 35697 beta-tubulin gene, partial cds
Length=409 Score = 706 bits (782), Identities = 391/391 (100%), Gaps = 0/391 (0%)

[gb|EF651901.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 35696 beta-tubulin gene, partial cds
Length=409 Score = 706 bits (782), Identities = 391/391 (100%), Gaps = 0/391 (0%)

[gb|EF651900.1](#) Aspergillus hollandicus isolate NRRL 25850 beta-tubulin gene, partial cds
Length=409 Score = 706 bits (782), Identities = 391/391 (100%), Gaps = 0/391 (0%)

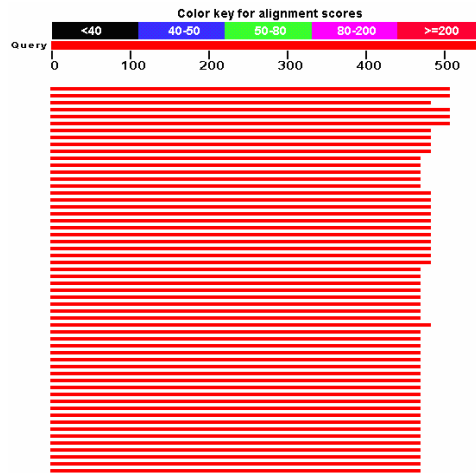
[gb|EF651899.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 4716 beta-tubulin gene, partial cds
Length=409 Score = 706 bits (782), Identities = 391/391 (100%), Gaps = 0/391 (0%)

[gb|EF651898.1](#) Eurotium amstelodami isolate NRRL 108 beta-tubulin gene, partial cds
Length=409 Score = 706 bits (782), Identities = 391/391 (100%), Gaps = 0/391 (0%)

M2 Reverse

```
CTGGTTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTTTTTAAAATATTGGGAGATGGATTGGG
AGATATACTAACAGTATCACAGGCAGACTATCTCCGGCGAGCACGGTCTCGACGGCTCTGGT
GTGTAAGTACAGTCGGGTCTCCGAGATGGACGCGTATCGGATATGGATATCTAACGGATTTC
AGCTACAACGGATCCTCCGACCTCCAGTTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTTG
CCTATCCGTTTCGTGTTTGTGTGGAACAGCTCTGACAGTGATAGGCCTCCAACAACAAATAT
GTCCCCCGTGCCGTCTCGTTCGACCTTGAGCCAGGTACCATGGATGCCGTCCGTGCCGGTCC
CTTCGGTCAGTCTTCCGCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCC
```


EK 18: M3 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AY017537.1	Aspergillus parasiticus NRRL 502 beta-tubulin gene, partial cds	904	904	92%	0.0	99%
L49386.1	Aspergillus parasiticus beta-tubulin gene, exons 1-8, complete cds	890	890	92%	0.0	99%
EF661481.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 502 beta-tubulin gene, partial cds	870	870	88%	0.0	100%
AP007169.1	Aspergillus oryzae RIB40 DNA, SC038	865	907	92%	0.0	100%
AY017536.1	Aspergillus flavus NRRL 1957 beta-tubulin gene, partial cds	865	865	92%	0.0	98%

[gb|AY017537.1](#) Aspergillus parasiticus NRRL 502 beta-tubulin gene, partial cds Length=795 Score = 904 bits (1002), Identities = 504/506 (99%), Gaps = 0/506 (0%)

[gb|L49386.1|ASNBT](#) Aspergillus parasiticus beta-tubulin gene, exons 1-8, complete cds Length=2076 Score = 890 bits (986), Identities = 501/506 (99%), Gaps = 0/506 (0%)

[gb|EF661481.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 502 beta-tubulin gene, partial cds Length=498 Score = 870 bits (964), Identities = 482/482 (100%), Gaps = 0/482 (0%)

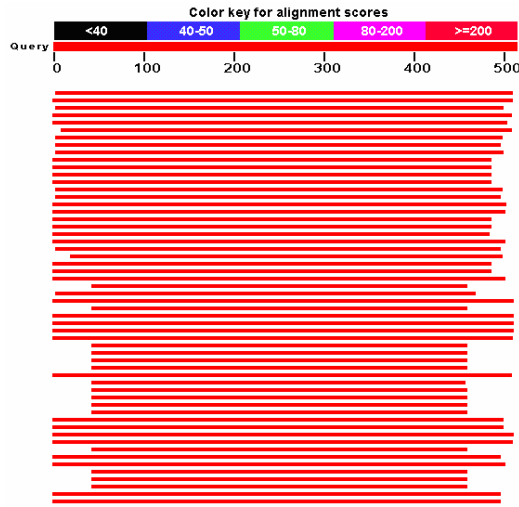
[dbj|AP007169.1](#) Aspergillus oryzae RIB40 DNA, SC038 Length=1725576 Score = 865 bits (958), Identities = 496/506 (98%), Gaps = 1/506 (0%)

[gb|AY017536.1](#) Aspergillus flavus NRRL 1957 beta-tubulin gene, partial cds Length=795 Score = 865 bits (958), Identities = 496/506 (98%), Gaps = 1/506 (0%)

M3 Forward

```
CTTCGAGTTAATATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTA
TTATATCTGCCACGTGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTT
GACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATATGGCAT
TAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCTGATCTCCAGCTGG
AGCGTATGAATGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACG
CTTTGCAACTCTGACCGCTTCTCCAGGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTC
GTTCGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGT
CCCACAACCTTCGTTTTCGGCCAATCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACAC
TGAAGGTAGGGGGGGAACCTTCAANCCTCCCCATTTGGTTTCCA
```

EK 19: M5 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ902579.1	Aspergillus tubingensis beta-tubulin gene, partial sequence	895	895	98%	0.0	99%
AY820009.1	Aspergillus tubingensis strain CBS 42565 beta tubulin gene, exons 3 through 6 and partial cds	884	884	99%	0.0	98%
DQ768442.1	Aspergillus tubingensis strain CIRM-BRFM 115 beta-tubulin gene, partial cds	877	877	96%	0.0	99%
AY820012.1	Aspergillus tubingensis strain CBS 11732 beta-tubulin-like gene, partial cds	866	866	99%	0.0	98%
AY820010.1	Aspergillus tubingensis strain CBS 12652 beta-tubulin-like gene, partial cds	863	863	98%	0.0	98%

[gb|DQ902579.1](#) Aspergillus tubingensis beta-tubulin gene, partial sequence Length=511 Score = 895 bits (992), Identities = 506/510 (99%), Gaps = 2/510 (0%)

[gb|AY820009.1](#) Aspergillus tubingensis strain CBS 42565 beta tubulin gene, exons 3 through 6 and partial cds Length=550 Score = 884 bits (980), Identities = 507/515 (98%), Gaps = 4/515 (0%)

[gb|DQ768442.1](#) Aspergillus tubingensis strain CIRM-BRFM 115 beta-tubulin gene, partial cds Length=500 Score = 877 bits (972), Identities = 496/500 (99%), Gaps = 2/500 (0%)

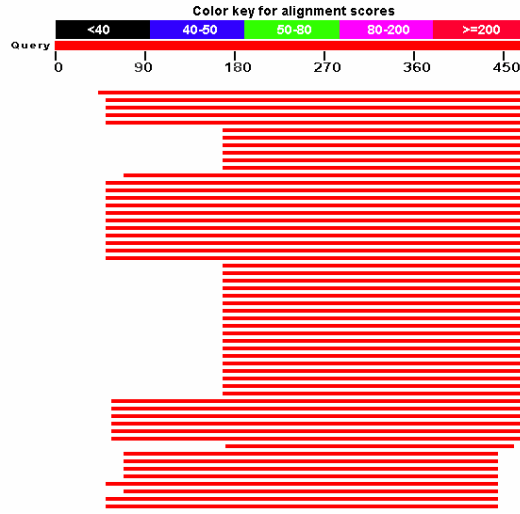
[gb|AY820012.1](#) Aspergillus tubingensis strain CBS 11732 beta-tubulin-like gene, partial sequence Length=553 Score = 866 bits (960), Identities = 504/514 (98%), Gaps = 6/514 (1%)

[gb|AY820010.1](#) Aspergillus tubingensis strain CBS 12652 beta-tubulin-like gene, partial sequence Length=537 Score = 863 bits (956), Identities = 500/510 (98%), Gaps = 5/510 (0%)

M5 Forward

```
CACTGGATTGGGGATGGAACCTCATCTCTCAAGCTATCTTAGCTTGAGTTCGATGTTATCCATC
GGGGATATAGCTACGGTTACGAACACGTCTAACAACTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGA
GCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAACCTTTTTCACACCTCTCAATTGGTCAACA
ATGTGGAAAGGATTGGGTTTCTGACGCGCAGATAGTTACAATGGCACCTCCGACCTCCAGC
TGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTAGATCACACCGTCCCTGAGTTTTTTCACGA
CAATATCATCAATGTCCTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAACAAGTATGTCCCCCGTGCC
GTCCTCGTCGATCTCGAGCCCGGTACCATGGACGCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGCCAGCT
CTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTC
ACTACACTGAGGGTGGG
```

EK 20: M8 İzolatının β -tubulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU140824.1	Sagenomella sp. HMH-2007a beta-tubulin (TUB2) gene, partial sequ	385	385	89%	1e-103	81%
AY017574.1	Aspergillus bombycis NRRL 29241 beta-tubulin gene, partial cds	336	336	88%	5e-89	78%
AY017547.1	Aspergillus bombycis NRRL 26010 beta-tubulin gene, partial cds	336	336	88%	5e-89	78%
AY017546.1	Aspergillus bombycis NRRL 25593 beta-tubulin gene, partial cds	336	336	88%	5e-89	78%
AY017540.1	Aspergillus tamarii NRRL 20818 beta-tubulin gene, partial cds	336	336	88%	5e-89	78%

[gb|EU140824.1](#) Sagenomella sp. HMH-2007a beta-tubulin (TUB2) gene, partial sequence Length=1550 Score = 385 bits (426), Expect = 1e-103 Identities = 348/429 (81%), Gaps = 13/429 (3%)

[gb|AY017574.1](#) Aspergillus bombycis NRRL 29241 beta-tubulin gene, partial cds Length=795 Score = 336 bits (372), Expect = 5e-89 Identities = 344/440 (78%), Gaps = 33/440 (7%)

[gb|AY017547.1](#) Aspergillus bombycis NRRL 26010 beta-tubulin gene, partial cds Length=795 Score = 336 bits (372), Expect = 5e-89 Identities = 344/440 (78%), Gaps = 33/440 (7%)

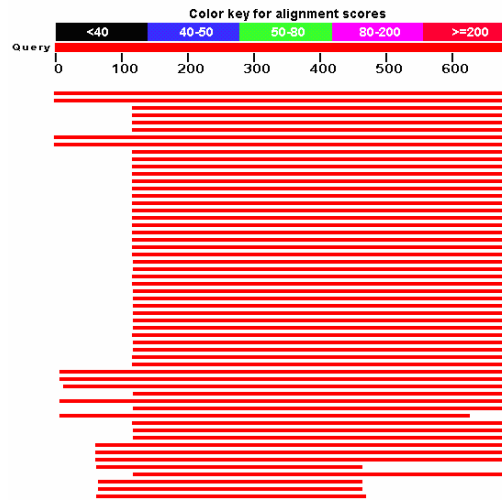
[gb|AY017546.1](#) Aspergillus bombycis NRRL 25593 beta-tubulin gene, partial cds Length=795 Score = 336 bits (372), Expect = 5e-89 Identities = 344/440 (78%), Gaps = 33/440 (7%)

[gb|AY017540.1](#) Aspergillus tamarii NRRL 20818 beta-tubulin gene, partial cds Length=801 Score = 336 bits (372), Expect = 5e-89 Identities = 343/437 (78%), Gaps = 28/437 (6%)

M8 Forward

```
TGACAACGGTCCTTGAACATAGATTCTGAGCGTGCCTGGGTGTCAATTGCTGTTTTCTAA
CTGCTACGCAGGCAAACATCGCTGGCGAGCATGGCCTGGACGGCTCTGGTGTGTATGTAAC
TCAACCAACGTTTTGGTGTTCGGATAATCCCGAAAATGGATCGCGGCCTGACTGGGGGACA
GGTACAATGGCACCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTTTCGT
ACTAGCGTTCGATTTAGCTACGTGAGCATGCTCAATTCTGACCGCATCCAGGCCAGTGGAA
ACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTTCTGGTCGACCTTGAGCCCGGTACCATGGATGCTGTCCGTT
CCGGTCCCTTTGGTCAGCTCTTCCGTCGCAACTTTGTTTTCGGCCAGTCGGGTGCTGGTA
ACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGGTAG
```

EK 21: M1 İzolatının Kalomodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AM920437.1	Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255 complete genome, contig Pc00c22	1211	1211	98%	0.0	99%
EF198585.1	Penicillium chrysogenum strain NRRL 35635 calmodulin gene, partial cds	1151	1151	98%	0.0	97%
DQ911130.1	Penicillium chrysogenum strain imi24314 calmodulin (cmd) gene, partial cds	1007	1007	81%	0.0	99%
AY678563.1	Penicillium griseoroseum strain AS3.4302 calmodulin (cmd) gene, partial cds	1007	1007	81%	0.0	99%
AY678570.1	Penicillium chrysogenum strain AS3.6555 calmodulin (cmd) gene, partial cds	993	993	81%	0.0	99%

[emb|AM920437.1](#) Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255 complete genome, contig Pc00c22 Length=6387817 Score = 1211 bits (1342), Identities = 677/681 (99%), Gaps = 0/681 (0%)

[gb|EF198585.1](#) Penicillium chrysogenum strain NRRL 35635 calmodulin gene, partial cds Length=715 Score = 1151 bits (1276), Identities = 664/681 (97%), Gaps = 0/681 (0%)

[gb|DQ911130.1](#) Penicillium chrysogenum strain imi24314 calmodulin (cmd) gene, partial cds Length=579 Score = 1007 bits (1116), Identities = 561/563 (99%), Gaps = 0/563 (0%)

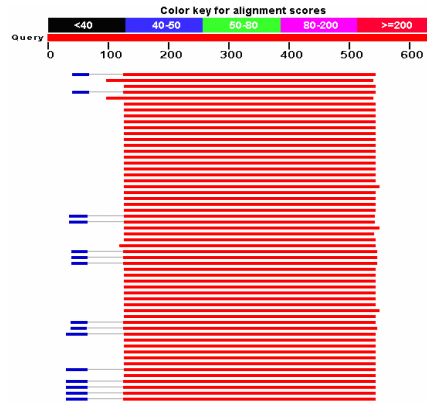
[gb|AY678563.1](#) Penicillium griseoroseum strain AS3.4302 calmodulin (cmd) gene, partial cds Length=579 Score = 1007 bits (1116), Identities = 561/563 (99%), Gaps = 0/563 (0%)

[gb|AY678570.1](#) Penicillium chrysogenum strain AS3.6555 calmodulin (cmd) gene, partial cds Length=579 Score = 993 bits (1100), Identities = 558/563 (99%), Gaps = 0/563 (0%)

M1 Reverse

```
AATCACAAGTGCCACCGAACTTGTGGTCAAAGGAAAACGAGAGGGTTAGCAATTTGGG
GAGGCAAGGCCCGTAGGGCTCCAAGATTGTTTCCAAAACATACAGTNGATCCGGCCATCAC
CATCCTGGTCCGCCTCGCGGATCATCTCGTCCACTTCGTCGTCGGTCAGCTTCTCGCCGATGG
AAGTCATGACGTGGGCGAAGCTCGGCGGCGGAAATGAACCCGTTGTTTATCGCGATCGAAG
ACCTTGAATGCCTCGCGGATCTCCTCCTCGGAATCGGTATCCTTCATCTTACGAGCCATCATT
GTAAGGAATTCTACCGCACGTCAGTAGCCGTCTCTCGTTTATAACCAGTAGATTATGGTGAAG
TACCGGGGAAGTCAATAGTGCCGTTGTTGTGCGGCATCAACCTCGTTGATCATATCCTGCAAT
TCGGACTCGGAGGGGTTCTGACCCAGCGAGCGCATGACTGTGCCAAGTTCCTTGGTGGTGAT
TTGCCCTATTTGTAGGATTGCATGTTAGAATGTTTTCTTTTCTCTCGAGATTCCATCGCCGAG
GACCTGTCTGTGGCTCGACTAAGCTGTGTGCGGGCGGACACACGTACCATCGCCATCCTT
GTCCTATTTCCGCAACAAAACAAACCCCGGTCAGCATGTATTTCGATGATCACATCTTCTAATG
TGTGTGTGGTGT
```

EK 22: M2 İzolatının Kalomodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF669564.1	Aspergillus ambiguus isolate NRRL 4737 calmodulin gene, partial cd	<u>403</u>	448	69%	6e-109	96%
EF661169.1	Aspergillus heteromorphus isolate NRRL 4747 calmodulin gene, part	<u>398</u>	398	69%	3e-107	81%
EF669700.1	Aspergillus clavatoflavus isolate NRRL 5113 calmodulin gene, partia	<u>398</u>	398	65%	3e-107	82%
EF669565.1	Aspergillus microcysticus isolate NRRL 4749 calmodulin gene, partia	<u>398</u>	438	69%	3e-107	93%
AM421461.1	Aspergillus heteromorphus partial cal gene for calmodulin, type str	<u>398</u>	398	69%	3e-107	81%

[gb|EF669564.1](#) Aspergillus ambiguus isolate NRRL 4737 calmodulin gene, partial cds Length=728 Score = 403 bits (446), Expect = 6e-109 Identities = 344/416 (82%), Gaps = 15/416 (3%)

[gb|EF661169.1](#) Aspergillus heteromorphus isolate NRRL 4747 calmodulin gene, partial cds Length=687 Score = 398 bits (440), Expect = 3e-107 Identities = 363/446 (81%), Gaps = 18/446 (4%)

[gb|EF669700.1](#) Aspergillus clavatoflavus isolate NRRL 5113 calmodulin gene, partial cds Length=780 Score = 398 bits (440), Expect = 3e-107 Identities = 344/416 (82%), Gaps = 13/416 (3%)

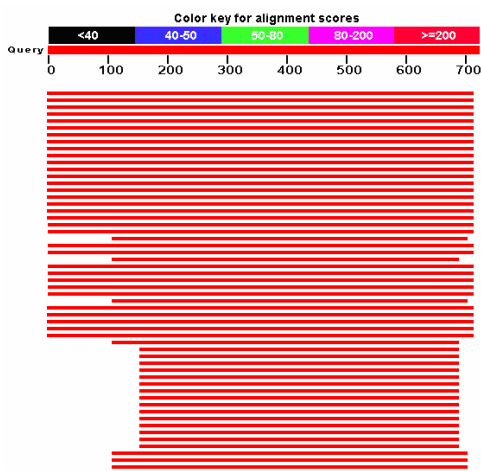
[gb|EF669565.1](#) Aspergillus microcysticus isolate NRRL 4749 calmodulin gene, partial cds Length=725 Score = 398 bits (440), Expect = 3e-107 Identities = 343/419 (81%), Gaps = 22/419 (5%)

[emb|AM421461.1](#) Aspergillus heteromorphus partial cal gene for calmodulin, type strain ITEM 7045T Length=700 Score = 398 bits (440), Expect = 3e-107 Identities = 363/446 (81%), Gaps = 18/446 (4%)

M2 Forward

```
TCCCCTGTTCCAGCTGCAGACGACGAACACTGATCCCAAACAGGACAGGATGGCGATGG
TTAGTGCGAGACTCTCTTGCCACTCTCCCGGTCGGTACCCACAGTGCTGATACGACTCGAT
ATCCAGGCCAAATCACGACCAAGGAGCTGGGGACGGTCATGCGACTCTTAGGCCAAAACC
CGTCCGAGTCCGAGACTGCAGGACATGATTAACGAGGTTGATGCGGACAACAATGGCACCA
TCGATTTCCCGGTACGATGCGAACCTTTTCTGTGGGTGGACTCCATCCCGGACGGATGT
TGACGTATTGCAGAATTCCTTACCATGATGGCCCGCAAGATGAAGGATACCGATTTCGGAGG
AGGAGATCCGGGAGGCATTCAAGGTCTTCGACCGCGATAATAACGGCTTCATCTCCGCCGC
TGAGCTGCGCCACGTCATGACTTCCATCGGGGAGAAGCTCACCCGACGATGAAGTGGACGA
GATGATCCCGTGAAGCCCGATCCGGACGGCGATGGCCGGATTGACTGTACGTGTCCCTCGTC
TGTTGTCGCGTGCCTCAATCCTGACCGTCTGCAAGACCAGTTTGTCTTCTGATTCAAAAAA
AGGCTCAAACATAA
```

EK 23: M3 İzolatının Kalomodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF661518.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 4123 calmodulin gene, partial cds	1222	1222	98%	0.0	98%
EF661517.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 1988 calmodulin gene, partial cds	1222	1222	98%	0.0	98%
EF661516.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 502 calmodulin gene, partial cds	1222	1222	98%	0.0	98%
EF661515.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 424 calmodulin gene, partial cds	1222	1222	98%	0.0	98%
EF661519.1	Aspergillus parasiticus isolate NRRL 6433 calmodulin gene, partial cds	1216	1216	98%	0.0	98%

[gb|EF661518.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 4123 calmodulin gene, partial cds
Length=736 Score = 1222 bits (1354), Identities = 700/710 (98%), Gaps = 4/710 (0%)

[gb|EF661517.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 1988 calmodulin gene, partial cds
Length=736 Score = 1222 bits (1354), Identities = 700/710 (98%), Gaps = 4/710 (0%)

[gb|EF661516.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 502 calmodulin gene, partial cds
Length=736 Score = 1222 bits (1354), Identities = 700/710 (98%), Gaps = 4/710 (0%)

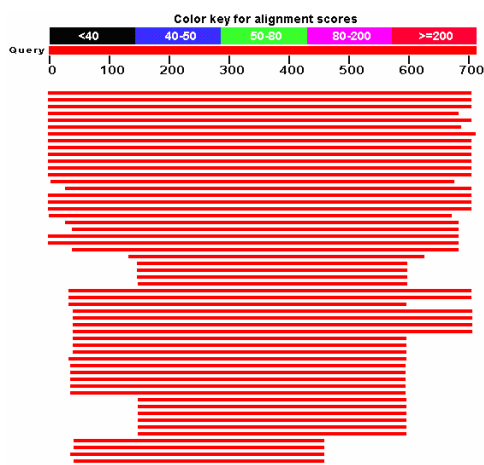
[gb|EF661515.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 424 calmodulin gene, partial cds
Length=736 Score = 1222 bits (1354), Identities = 700/710 (98%), Gaps = 4/710 (0%)

[gb|EF661519.1](#) Aspergillus parasiticus isolate NRRL 6433 calmodulin gene, partial cds
Length=736 Score = 1216 bits (1348), Identities = 699/710 (98%), Gaps = 4/710 (0%)

M3 Reverse

```
AATCACAAGTGCCACCGAACTTNGTGGTCAAAGGAAAACGAGAGGGTTAGCAATTTGGG
GAGGCAAGGCCCGTAGGGCTCCAAGATTGTTCCAAAACATACAGTGATCCGGCCATCACC
ATCCTGGTCCGCCTCGCGGATCATCTCGTCCACTTCGTCTCGTTCAGCTTCTCGCCGATGGA
AGTCATGACGTGGGCGAAGCTCGGCGGCGGAAATGAACCCGTTGTTTATCGCGATCGAAGA
CCTTGAATGCCTCGCGGATCTCCTCTCGGAATCGGTATCCTTCATCTTACGAGCCATCATTG
TAAGGAATTCTACCGCAGTCAAGTACGCGTCTCTCGTTTATACCAGTAGATTATGGTGAAGT
ACCGGGGAAGTCAATAGTGCCGTTGTTGTCGGCATCAACCTCGTTGATCATATCCTGCAATT
CGGACTCGGAGGGGTTCTGACCCAGCGAGCGCATGACTGTGCCAAGTTCCTTGGTGGTGATT
TGCCCTATTTGTAGGATTGCATGTTAGAATGTTTTCTTTCTCTCGAGATTCCATCGCCGAGG
ACCCTGCTGTGGGCTCGACTAAGCTGTGTCGGGCGCGACCACACGTACCATCGCCATCCTTG
TCCTATTTTCGAACAAAACAAACCCCGGTCAGCATGTATTCGATGATCACATCTTCTAATGT
GTGTGTGGTGT
```

EK 24: M5 İzolatının Kalomodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF661149.1	Aspergillus tubingensis isolate NRRL 365 calmodulin gene, partial cd	1256	1256	99%	0.0	99%
EF661150.1	Aspergillus tubingensis isolate NRRL 4851 calmodulin gene, partial c	1251	1251	99%	0.0	99%
EF661151.1	Aspergillus tubingensis isolate NRRL 4875 calmodulin gene, partial c	1236	1236	99%	0.0	99%
AJ964876.1	Aspergillus tubingensis partial cdl gene for calmodulin, exons 2-3, s	1211	1211	95%	0.0	99%
EF661152.1	Aspergillus tubingensis isolate NRRL 4750 calmodulin gene, partial c	1166	1166	99%	0.0	97%

[gb|EF661149.1](#) Aspergillus tubingensis isolate NRRL 365 calmodulin gene, partial cds Length=724 Score = 1256 bits (1392), Identities = 701/703 (99%), Gaps = 1/703 (0%)

[gb|EF661150.1](#) Aspergillus tubingensis isolate NRRL 4851 calmodulin gene, partial cds Length=724 Score = 1251 bits (1386), Identities = 700/703 (99%), Gaps = 1/703 (0%)

[gb|EF661151.1](#) Aspergillus tubingensis isolate NRRL 4875 calmodulin gene, partial cds Length=725 Score = 1236 bits (1370), Identities = 698/704 (99%), Gaps = 2/704 (0%)

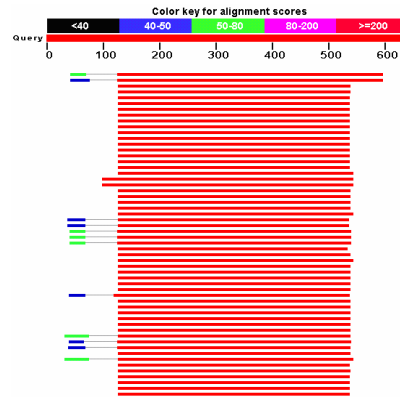
[emb|AJ964876.1](#) Aspergillus tubingensis partial cdl gene for calmodulin, exons 2-3, strain ITEM 7040 Length=696 Score = 1211 bits (1342), Identities = 678/681 (99%), Gaps = 1/681 (0%)

[gb|EF661152.1](#) Aspergillus tubingensis isolate NRRL 4750 calmodulin gene, partial cds Length=723 Score= 1166 bits (1292), Identities = 682/703 (97%), Gaps = 2/703 (0%)

M5 Reverse

```
AATCACAAGTGCCACCGAACTTNGTGGTCAAAGGAAAACGAGAGGGTTAGCAATTTGGG
GAGGCAAGNGCCCGTAGGGCTCCAAGATTGTTTCCAAAACATACAGTNGATCCGGCCATC
ACCATCCTGGTCCGCTCGCGGATCATCTCGTCCACTTCGTCGTCGGTCAGTTCTCGCC
GATGGAAGTCATGACGTGGGCGAAGCTCGGCGGCGGAAATGAACCCGTTGTTTATCGCGA
TCGAAGACCTTGAATGCCTCGCGGATCTCCTCCTCGGAATCGGTATCCTTCATCTTACGA
GCCATCATTGTAAGGAATTCTACCGCACGTCAGTAGCCGTCTCTCGTTTATAACAGTAGA
TTATGGTGAAGTACCGGGGAAGTCAATAGTGCCGTTGTTGTCGGCATCAACCTCGTTGAT
CATATCCTGCAATTCGGACTCGGAGGGGTTCTGACCCAGCGAGCGCATGACTGTGCCAAG
TTCCTTGGTGGTGATTTGCCCTATTTGTAGGATTGCATGTTAGAATGTTTTCTTTCTCT
CGAGATTCCATCGCCGAGGACCCTGCTGTGGGCTCGACTAAGCTGTGTGCGGGCGCGACCA
CACGTACCATCGCCATCCTTGTCTATTTTCGCAACAAAACAAACCCCGGTCAGCATGTAT
TCGATGATCACATCTTCTAATGTGTGTGTGGTGT
```

EK 25: M8 İzolatının Kalomodulin Geni DNA Dizi Analizi Sonucu



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF669564.1	Aspergillus ambiguus isolate NRRL 4737 calmodulin gene, partial cd	448	502	78%	2e-122	100%
EF669565.1	Aspergillus microcysticus isolate NRRL 4749 calmodulin gene, partia	439	489	79%	8e-120	91%
EF669700.1	Aspergillus clavatoflavus isolate NRRL 5113 calmodulin gene, partia	435	435	64%	1e-118	83%
EF506232.1	Penicillium griseolum isolate NRRL 2671 calmodulin gene, partial cd:	430	430	64%	4e-117	83%
EF198644.1	Penicillium toxicarium strain NRRL 35655 calmodulin gene, partial c	430	430	64%	4e-117	83%

[gb|EF669564.1](#) Aspergillus ambiguus isolate NRRL 4737 calmodulin gene, partial cds
Length=728 Score = 448 bits (496), Expect = 2e-122 Identities = 385/470 (81%), Gaps = 12/470 (2%)

[gb|EF669565.1](#) Aspergillus microcysticus isolate NRRL 4749 calmodulin gene, partial cds
Length=725 Score = 439 bits (486), Expect = 8e-120 Identities = 383/473 (80%), Gaps = 20/473 (4%)

[gb|EF669700.1](#) Aspergillus clavatoflavus isolate NRRL 5113 calmodulin gene, partial cds
Length=780 Score = 435 bits (482), Expect = 1e-118 Identities = 346/412 (83%), Gaps = 8/412 (1%)

[gb|EF506232.1](#) Penicillium griseolum isolate NRRL 2671 calmodulin gene, partial cds
Length=717 Score = 430 bits (476), Expect = 4e-117 Identities = 348/419 (83%), Gaps = 14/419 (3%)

[gb|EF198644.1](#) Penicillium toxicarium strain NRRL 35655 calmodulin gene, partial cds
Length=680 Score = 430 bits (476), Expect = 4e-117 Identities = 343/410 (83%), Gaps = 7/410 (1%)

M8 Forward

```
TCTCCCCTGTTCCAGCTGCAGCGCGAACTCACATGATCCCAAACAGGACAAGGATGGCGATG
GTTAGTGCAGCTCTCTTGCCACTCTCCCGGTCGGTACCCACAGTGCTGATACGCTCGATAT
CCAGGCCAAATCACGACCAAGGAGCTGGGGACGGTCATGCGCTCTTTAGGCCAAAACCCGT
CCGAGTCCGAGCTGCAGGACATGATTAACGAGGTTGATGCGGACAACAATGGCACCATCGA
TTTCCCGGTACGATGCGAACCTTTTCTGTGGGTGGACTCCATTCCCGGACGGATGTTGACG
TATTGCAGAATTCCTTACCATGATGGCCCGCAAGATGAAGGATACCGATTCCGAGGAGGAG
ATCCGGGAGGCATTCAAGGTCTTCGACCGCGATAATAACGGCTTCATCTCCGCCGCTGAGCT
GCGCCACGTCATGACTTCCATCGGGGAGAAGCTCACCGACGATGAAGTGGACGAGATGATC
CGTGAAGCCGATCAGGACGGCGATGGCCGGATTGACTGTACGTTGTCCCTCGTCTGTTTGTG
GCAGTGCCTCCGAATAGTGACCGTGTGCAAGACAACGAGTGTGTCCGCCTCATGTGTCAAAA
AATTTTTTCCCACGGGCGG
```