



Aydın İlinde Termofilik Çevreden İzole Edilen Mayaların Moleküler Tanısı

H. Halil BIYIK^{1*}, Esin POYRAZOĞLU ÇOBAN¹,
Yusuf GEROĞLU¹, Ilgıt KIRGIZ¹

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, AYDIN

Öz: Termofilik mayaların izolasyonu için Aydın ili Buharkent ilçesi Bereket Jeotermal tesislerinin çevresindeki toprak ve su örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Elde edilen veriler ve analizler sonucunda, izolatların %98 ve %99 gibi değişen oranlarda belirli türlerinin ITS1 ve ITS2 bölgeleriyle homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Bu türlerin GenBank'ta kayıtlı *Saccharomyces cerevisiae* strain levure 23, *Candida albicans*, *Candida albicans* strain m74a, *Cyberlindnera jadinii* strain ATCC 22023, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* strain P2, *Pichia manshurica* strain h79b, *Candida glabrata* strain 86A adlı maya suşları olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Toprak, Su, Termofilik maya, İzolasyon, ITS, Filogenetik analiz.

Molecular Identification of Yeasts Isolated from Thermophilic Environment in Aydın Province

Abstract: For the isolation of thermophilic yeasts, soil and water samples around of Bereket geothermal plants in Buharkent district of Aydın province were used as material. As a result of the obtained data and analyzes, it was determined that certain strains showed homologies with the regions of ITS1 and ITS2 at the rates of 98% and 99% of the isolates. These species are registered in GenBank *Saccharomyces cerevisiae* strain levule 23, *Candida albicans*, *Candida albicans* strain m74a, *Pichia jadinii* strain ATCC 22023, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* strain P2, *Cyberlindnera jadinii* strain h79b and *Candida glabrata* strain 86A are identified as yeast species.

Key words: Soil, Water, Thermophilic yeast, Isolation, ITS, Phylogenetic analysis.

Giriş

Mayalar doğada yaygın olarak bulunan genellikle tek hücreli, ökaryotik mantarlardır. Maya türleri zorunlu aerobik veya fakültatif anaerobik özelliğe sahiptirler. Mayalar tomurcuklanma yoluyla eşeysiz ve eşeyli olarak ürerler. Çoğu maya, yüksek şekerli çevresel örneklerden izole edilebilir. Üzüm, elma veya şeftali gibi meyvelerde bitki özsuğu sızmalarında bulunur. Bazı mayalar da toprak ve böceklerde bulunur (Lee,1996).

Birçok maya, *Ascomycota* bölümüne ait

olmakla beraber bazıları *Basidiomycota*'ya aittirler. *Candida albicans* gibi bazı maya türleri insanlarda enfeksiyona yol açabildiği gibi *Rhodotorula* türleri de duş perdelerinde ve evdeki nemli yüzeylerde yaşar ve yüzeyler üzerinde lekeli bir görünüm oluşturur (Pfaller ve Diekema, 2004; Charles ve ark., 2005).

Bazı mayaların insanlarda ve çevrede yarattıkları olumsuz etkileri olmasına rağmen birçok maya türünün faydalı fizyolojik özellikleri olması nedeniyle biyoteknoloji alanında kullanılmaları çok yaygındır.

*Sorumlu Yazar:hbiyik@adu.edu.tr



Mayalar endüstriyel proseslerde en fazla kullanılan mikroorganizmalardandır. Çeşitli gıdaların hem üretilmelerinde hem de bozulmalarında önemli role sahiptirler. Fermantasyon yeteneklerinin çok yüksek olması nedeniyle alkol, şarap, bira ve ekmek endüstrisinde çok geniş bir kullanım alanı bulmuşlardır (Vaughan-Martini, 2003). Mayaların ökaryotik hücre yapısında olmaları, laboratuvar şartlarında kolayca üretilebilmeleri ve genetik düzeyde manipulasyonlar yapılabilmesi gibi özellikleriyle moleküler biyoloji çalışmalarında da önemli bir yeri vardır (Lopes ve ark., 1998).

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitelerin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, düşük sıcaklık, asidik, alkali pH ve yüksek basınç gibi ekstrem olarak bilinen çevrelerde de bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bu ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalar ekstremofiller olarak adlandırılırlar (Van den Burg, 2003). Ekstremofilik mikroorganizmaların, yüksek sıcaklıkta yaşayan üyeleri termofillerdir. Yüksek sıcaklıkta üreme, diğer mikroorganizmalar ile kontaminasyon riskini de azaltır. Ayrıca termofilik mayaların enzimleri özel avantajlara sahiptir.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Fernandez-Espinar ve ark., 2006). Etanol üretimi için de termofilik mikroorganizmalardan yararlanma mümkündür ve birçok avantaj sağlamaktadır.

Taksonomide kullanılan geleneksel yöntemler, mikroorganizmaların ekolojik kaynak, morfoloji, fizyoloji ve üreme gibi fenotipik özelliklerini belirlemeye dayanmaktadır. Biyoteknolojik olarak büyük bir öneme sahip olan maya türlerinin klasik yöntemle tanımlanması hem zaman alıcı hem de daha az güvenilirdir. Bu

nedenle son yıllarda mayaların tanımlanması ile ilgili DNA esaslı değişik yöntemler üzerinde durulmuştur (Lopes ve ark., 1998; Vaughan-Martini, 2003). Moleküler taksonomi alanında yapılan ilk çalışmaların ardından tanımlamada; ribozomal RNA (rRNA) veya tamamlayıcı molekülü olan ribozomal DNA (rDNA)'daki belirli bölgelerin hedeflendiği çeşitli tekniklerin geliştirildikleri ve günümüzde de sıklıkla kullanıldıkları bilinmektedir (Vaughan-Martini, 2003; Hierro ve ark., 2004). Filogenetik çalışmalarda da kullanılan bu yöntemler; 26S rDNA, 18S rDNA veya 18rDNA' daki ara bölgelerin (ITS1, ITS2, ITS3, ITS4) tanımlanmasına yöneliktir. Günümüzde, DNA baz dizi analizi çalışmaları sonucunda oldukça fazla sayıda veri bankasının oluşturulması ve PCR teknolojisinin geliştirilmesiyle, mayaların hızlı ve doğru bir şekilde tür ve suş düzeyinde tanımlanmaları mümkün olabilmektedir (Lopes ve ark., 1998; Van Der Vossen ve ark., 2003).

Bu çalışma ile Aydın ilinde termofilik çevrelerden izole edilen termofilik maya suşlarının PCR tekniği kullanılarak hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmaları ve tanımlanan suşların bir sonraki çalışmalarda endüstriyel kullanım potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Toprak Örneklerinin Toplanması

Aydın ilinde Buharkent Bereket Jeotermal Su kaynağı çevresinden (Enlem: 37° 56" 62' ; Boylam: 28° 51"51' ; Yükseklik: 138 m) 7 adet toprak, 2 adet su örneği aseptik koşullara uygun olarak alınmıştır. Örnekler steril kilitli poşetlere konularak laboratuvara getirilmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Mayaların İzolasyonu

Laboratuvara getirilen toprak ve su örnekleri, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} e kadar seyreltilerek dilüsyonları hazırlanmıştır.

Hazırlanan seyreltmelerden sodyum propiyonat içeren YGC agar (%4 Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar, % 0,1 Sodyum Propiyonat) petrilere yayma ekim tekniği kullanılarak, ekim yapılmıştır.



25-30 °C de 3-7 gün inkübe edildikten sonra maya kolonileri seçilerek, YEP Agar (10 g/L Yeast Extract, 20 g/L Bacto-peptone, 20 g/L Agar, 20 g/L Dextrose) besiyetinde geliştirilmiş ve 200 g/L skim milk içerisinde saklanmıştır (Genç ve Çıldır, 2012; Zhang ve ark., 2014).

Moleküler Tanılama

DNA izolasyonu, Hoffman ve Winston (1987)'nin modifiye edilmiş metodu ile gerçekleştirilmiştir. Maya izolatları YEP Agar'da 30 °C de 24 saat geliştirildikten sonra hücreler 1 mL steril distile suda süspansiyon edilmiştir. 14,000 rpm de 2 dk santrifüj edilerek, hücreler toplanmış ve fenol-kloroform yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen DNA ekstraksiyonu %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

% 1 konsantrasyonda 0,5 X TBE tamponu ile hazırlanan 100 mL'lik agaroz jel içine ticari olarak satılan SafeView jel görüntüleme boyasından 3.5µL konulmuştur. Donan jel kuyucuklarına DNA örneğinden 5 µL, 6X Loading Dye DNA çöktürme boyasından 5µL ile karıştırılarak kuyucuklara doldurulmuştur. İlk kuyucuğa DNA'nın büyüklüğünü anlamak için marker olarak 1kb'lık DNA Ladder eklenmiştir. DNA'nın jeldeki görüntüsünü elde etmek için 40 dakika elektrik akımı (80 volt) uygulanmıştır. DNA UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Total DNA konsantrasyonu ve DNA kirliliği de NanoDrop'ta ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

PCR denemesi, Dlačhy ve ark., (1999)'na göre yapılmıştır. 30 µL reaksiyon hacmi için 0,5 µL DNA polimeraz (2 U/ µL, 0,3 µL dNTP, 3 µL 10X tampon, 3 µL MgCl₂ (25 mM), 3 µL primer (10Mm) kullanılmıştır. PCR denemesi, White ve ark. (1990)'nın tanımladığı primerler ile gerçekleştirilmiştir.

ITS1 (5⁰-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3⁰)

ITS4 (5⁰-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3⁰)

PCR koşulları, 94 °C de 5 dk, 57 °C de 30 sn, 72 °C de 1dk, 72 °C de 5 dk olarak yapılmıştır.

Elde edilen PCR ürünlerinin sekansı Almanya'daki GATC BIOTECH Firması tarafından gerçekleştirilmiş ve sekans analizi ABI Primse sekans sistemi ile yapılmıştır.

Filogenetik Ağacın Oluşturulması

Filogenetik ağaç, 300bç-700bç arasındaki uzunluğunda diziler baz alınarak neighborjoining metot kullanılarak oluşturulmuştur (bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir).

Bulgular

Mayaların İzolasyonu

Aydın ilinde Buharkent Bereket Jeotermal Su kaynağı çevresinden maya izolasyonu için toprak ve su örnekleri alınmıştır (Şekil 1). Fakat sadece toprak örneğinden maya izolasyonu yapılabildiği görülmüştür (Tablo 1).



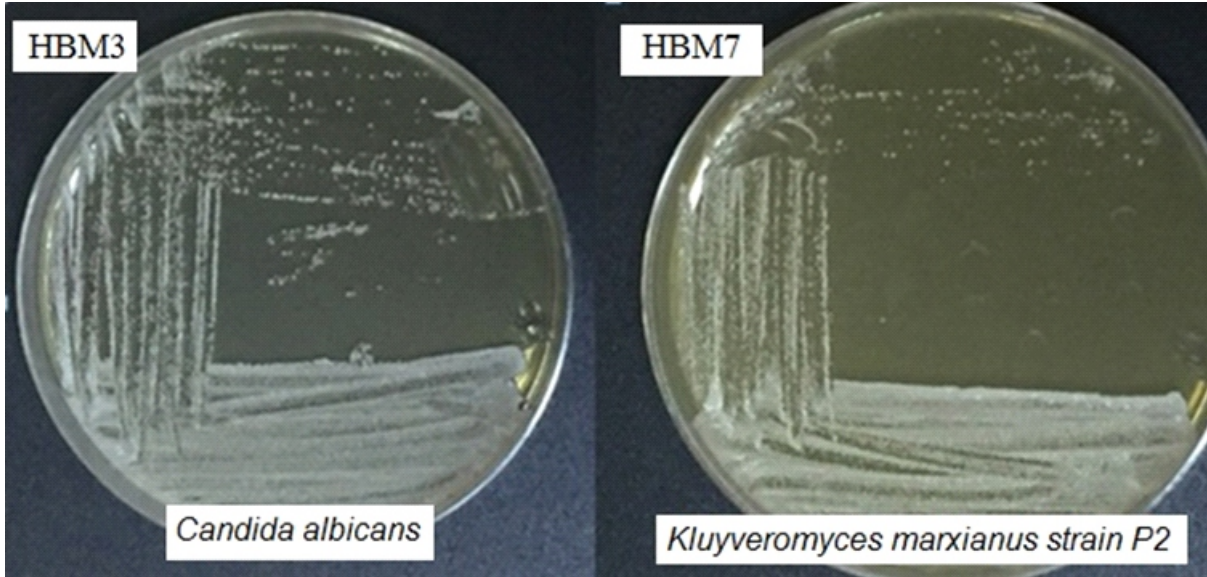
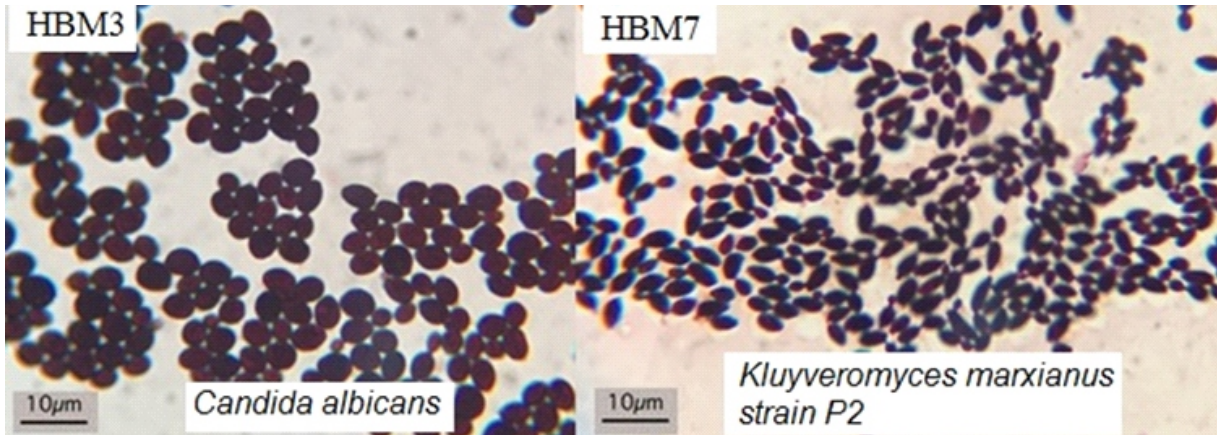
Şekil 1. Aydın ili Buharkent Bereket Jeotermal Su kaynağı. HBM1, HBM2; HBM3, HBM4, HBM5, HBM6, HBM7, HBM8, HBM9 izolatları için alınan su ve toprak örneklerinin doğal görüntüsü.

**Tablo 1.** Maya izolasyonu için alınan örnek çeşitleri ve izolat numarası

Örnek Çeşitleri	İzolat Numarası
Toprak (1)	HBM1, HBM2
Toprak (2)	HBM3
Toprak (3)	HBM4, HBM5
Toprak (4)	HBM6
Toprak (5)	HBM7
Toprak (6)	HBM8
Toprak (7)	HBM9
Su (1)	
Su (2)	

YEP Agar besiyerisinde gelişen maya kolonileri saflaştırılmıştır (Şekil 2). Saflaştırılan

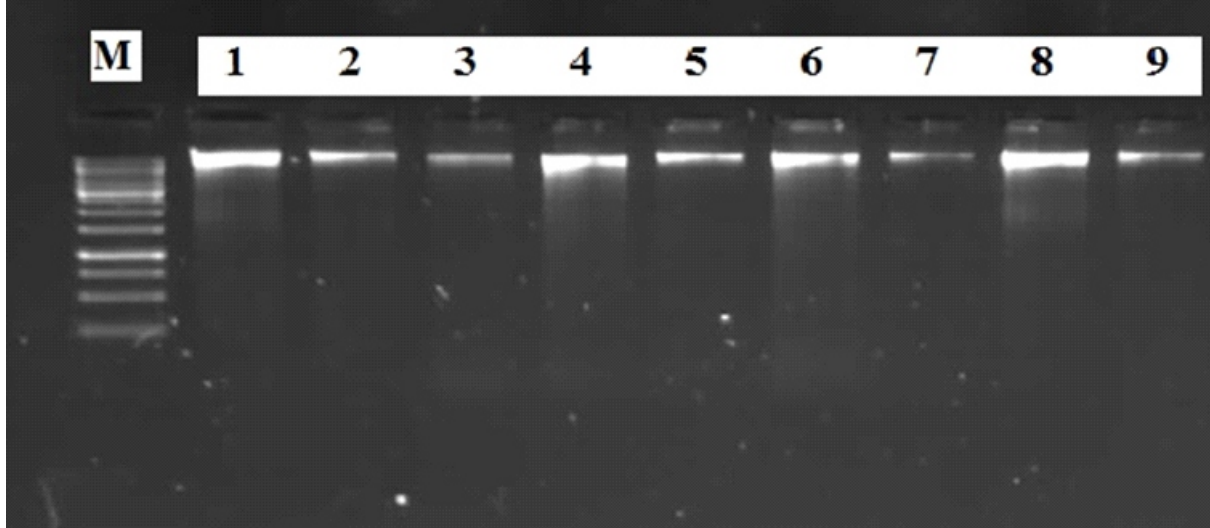
kolonilerin vejetatif hücre yapıları 100x immersiyon objektifinde incelenmiştir (Şekil 3).

**Şekil 2.** İzolasyonu yapılan bazı maya kolonilerinin YEP Agar besiyerisinde görüntüsü**Şekil 3.** Saflaştırılan izolatlara ait vejetatif hücre yapılarının 100x immersiyon objektifindeki mikroskopik görüntüsü



Moleküler Tanılama

HBM1, HBM2; HBM3, HBM4, HBM5, HBM6, HBM7, HBM8, HBM9 olarak numaralandırılmış 9 izolata ait DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü verilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 9 izolatin toplam DNA'larının agaroz jel elektroforezi görüntülenmesi.

Marker olarak 1kb'lık DNA Ladder kullanılmıştır. 1:HBM1, 2:HBM2; 3:HBM3; 4:HBM4; 5:HBM5; 6:HBM6; 7:HBM7; 8:HBM8; 9:HBM9

Total DNA konsantrasyonu ve DNA kirliliğinin NanoDrop'ta ölçüm değerleri (Tablo 2)' de verilmiştir.

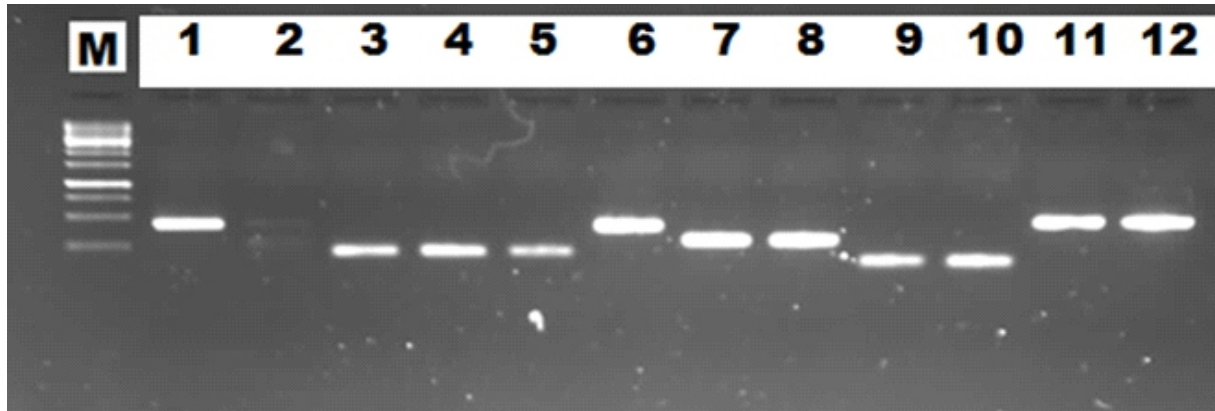
Tablo 2. Total DNA konsantrasyonu ve DNA kirliliğinin NanoDrop'taki ölçümü

İzolat Numarası	Nükleik Asit ng/µL	260/280(Abs)	Örnek Tipi
HBM1	136,5 ng/µL	1,92	DNA
HBM2	806,5ng/µL	1,73	DNA
HBM3	577,9 ng/µL	1,86	DNA
HBM4	989,6 ng/µL	2,01	DNA
HBM5	711,2 ng/µL	1,78	DNA
HBM6	1038,4 ng/µL	1,83	DNA
HBM7	639,3 ng/µL	1,97	DNA
HBM8	281,2 ng/µL	1,88	DNA
HBM9	412,4 ng/µL	1,91	DNA

PCR ürünleri Agaroz Jel Elektroforezinde yürütülmüş ve UV ışığında jel görüntüsü alınmıştır (Şekil 5).

Elde edilen sekansların BioEdit 7.1.3 programı kullanılarak, baz dizilimleri ve hizalamaları yapılmıştır. Hizalama yapıldıktan sonra elde edilen diziler NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) ile GenBank'taki kayıtlı dizilerle karşılaştırılmış ve türler tespit edilmiştir.

HBM1, HBM3, HBM4, HBM5, HBM6, HBM7, HBM8 ve HBM9 numaralı izolatların GenBank'ta kayıtlı türlerle benzerliği bulunmasına rağmen izolat HBM2'nin GenBank'ta karşılığı tespit edilememiştir. Bu nedenle toplam 8 izolatın GenBank'taki karşılığı saptanmıştır. İzolatların numaraları, tür isimleri, accession numaraları, depolanmış türlere benzerlik yüzdeleri ve identifikasyon skorları Tablo 3'de verilmiştir.



Şekil 5. Maya izolatlarına ait PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi (1. kuyucuk: HBM1; 2. kuyucuk: HBM2; 3. kuyucuk: HBM3; 4. kuyucuk: HBM4; 5. kuyucuk: HBM5; 6. kuyucuk: HBM6; 7. ve 8. kuyucuk: HBM7; 9. ve 10. kuyucuk: HBM8; 11. ve 12.. kuyucuk: HBM9; M:1kb DNA Ladder, 100bç- 2500bç).

Tablo 3. Elde edilen sekansların GenBank'taki kayıtlı dizilerle karşılaştırılmaları ve tespit edilen tür isimleri

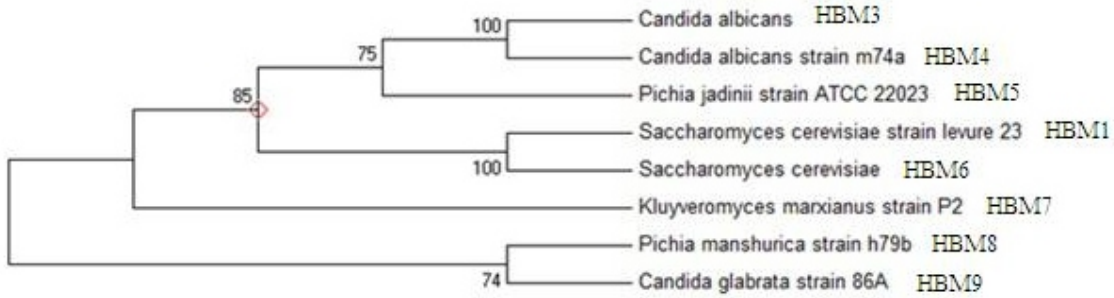
İzolat Numarası	Tür İsmi	Accession Numarası	Benzerlik (%)	Max. Skor
HBM1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain levure 23	KT726925.1	98	307
HBM2	DNA'sı elde edilmiş fakat tür ismi tespit edilememiştir.	–	–	–
HBM3	<i>Candida albicans</i>	GU373665.1	99	318
HBM4	<i>Candida albicans</i> strain H295B	KP675008.1	99	316
HBM5	<i>Pichia jadinii</i> strain ATCC 22023	AF335929.1	99	321
HBM6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KP998094.1	99	311
HBM7	<i>Kluyveromyces marxianus</i> strain P2	KF851351.1	99	398
HBM8	<i>Pichia manshurica</i> strain H79a	KP674783.1	98	283
HBM9	<i>Candida glabrata</i> strain 86A	KP764981.1	98	297

Tablo 3'deki mayalar, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen/Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarında kodlanan izolat numaralar ile liyofilize halde saklanmaktadır.



Filogenetik Analiz Sonuçları

Filogenetik ağacın oluşturulması için MEGA 6 programı kullanılmıştır. GenBank'dan elde edilen referans organizmaların ve bu çalışmada elde edilen izolatların baz dizileri programa yüklenmiştir. MEGA 6 bünyesinde yer alan ClustalW programı kullanılarak, baz dizi benzerliklerine göre sıralanmıştır. MEGA 6 programının 1000 tekrarlı "Bootstrap test of phylogeny" özelliği seçilerek "neighbourjoining" özelliğine dayalı olarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu yöntemde taksonlar arasındaki yakınlık analiz edilmiştir.



Şekil 6. Suşların MEGA6 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağacı. Dalların yanındaki rakamlar istatistiksel bootstrap değerlerini göstermektedir. İstatistiksel olarak ağaçtaki verilere göre türler arasındaki % benzerlik ve yakınlık dereceleri hakkında bilgi elde edilmiştir

Tartışma

Termofilik mayalar *bacteria* ve *archaea* türleri gibi daha yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olamazlar ve 60°C'nin üzerinde yaşayan ökaryotikler de yoktur. Üstelik 60°C'nin üzerinde ökaryotik organeller yaşayamaz ve sadece prokaryotik yaşam formları olabilir (Madigan ve ark., 2015). Bu yüzden 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayanlar termotolerant/termofilik mayaların temsilcileri olabilir (Arthur ve Watson, 1976). Psikrofilik ve termofilik terimleri tanımlanırken organizmanın maya mı, ekstrem çevrelerdeki prokaryot mu veya ökaryot mu olduğuna bakılmaksızın sadece türler dikkate alınarak mikroorganizmalara göre yapılmaktadır. Mayaların üst termofilik limiti, termofilik organizmalar için en düşük limit tanımlaması yaklaşık 46°C'dir (Arthur ve Watson 1976; Madigan ve ark., 2015).

Ökaryotlardan birçoğu, 40-45°C'den yüksek ısıda yaşamadıkları için termofilik mantarlar da uzun süre fark edilmemiştir. Bir asır önce Lindt tarafından ekmekten ilk termofilik mantar *Mucor pusillus* izole edilmiş, ardından Tsiklinskaia tarafından *Thermomyces*

lanuginosus patatesden izole edilmiştir. Bu küflerin her ikisi de tesadüfen keşfedilmişlerdir. Hugo Miehe, termofilik mantarlar ile ilgili geniş araştırmalar yapan ilk kişi olmuştur. Miehe'in yaptığı çalışmalardan dolayı termofilik mantarların temel yaşam koşulları belirlenmiştir. Cooney ve Emerson izole ettikleri 13 termofilik mantar türünü yaşama ortamlarına göre sınıflandırmış ve bu alanda çalışmaların artmasını sağlamışlardır (Deacon, 2007).

Termofilik mayaların hepsinde olmasa da, bazılarında sitoplazmik zara bağlı yağ dolu cisimcikler görülmüştür. Ayrıca bu yapıların endoplazmik retikulumda da devam ettiği gösterilmiştir. Asıl lipid depolanması, 50 °C 'de değil, 37 °C 'de üreyen hiflerde bulunur. Bu yağ cisimcikleri henüz tam anlaşılacakla birlikte, termofili mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Hudson, 1987).

Termofilik mantarlar buldukları yerlere göre, jeotermal bölgelerde üreyenler ve çürümüş bitki kümeleri, gübre gibi kendini ısıtan (self-heating) kaynaklarda üreyenler olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır.



Jeotermal topraklar, dünyada birçok yerde bulunur. Amerika Birleşik Devletleri'nde Yellowstone Milli Parkı'nda bu tür sıcak su kaynakları bulunmaktadır. Buradaki toprağın özelliği, ısısının 70 °C ve daha fazla olması, ağır metaller içermesi, pH'sının 2-7 arasında veya daha az olması, az organik madde içermesidir (Redman ve ark., 1999).

Dünyamız'da solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır (Baker, 2001). Yapılan çalışmalarda, sıcaklığın mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermiştir. Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde resmi kayıtlara alınmış 140 adet jeotermal saha bulunmaktadır. İller bankasının 2001 yılında yayınlamış olduğu listeye göre ülkemizdeki jeotermal kaynaklar ve kuyu başı sıcaklıkları da verilmiştir, bu kaynaklardan bazıları da Aydın ilinde bulunmaktadır (Anonim, 2001).

Aslında bu tür mantarlar çevremizde çok yaygındır. Isısı 40-50 °C olan sıcak suların, topraktan, sıcak havuzlardan, yağmur ormanlarının etrafından, çamurdan, ağaç yapraklarından, topraktan hem mezofilik hem de termofilik mantarlar bir arada izole edilmiştir (Deacon, 2007).

Aydın ili Buharkent Bereket Jeotermal Su kaynağı çevresine bırakılan termal suların sıcaklığının minimum 65°C olduğunu bildiğine göre bulgulardan elde edilen veriler termofilik mayaların bu tür çevrelerde yaygın olgunun bir göstergesidir.

Günümüzde mayaların tanımlanmalarında kullanılan kültürel yöntemlerin geçerliliği olmasına rağmen mayaların morfolojik, fizyolojik ve üreme gibi fenotipik özelliklerinde meydana gelebilecek değişiklikler her zaman genotipik özellik olarak yansımamaktadır (Vaughan-Martini, 2003). Bu nedenle klasik yöntemlerle yapılan tanılamada hata payının fazla olması, tekrarlanabilirlik yüzdesinin düşük olması ve zaman kaybına sebebiyet vermesi mümkün olduğu için son yıllarda araştırmacılar tanıla-

mada moleküler metotları kullanmaya yönelmişlerdir. DNA esaslı olarak PCR teknolojisinin geliştirilmesiyle mayaların hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde tür ve suş düzeyinde tanımlanmaları mümkün olabilmektedir. Özellikle ribozomal RNA (rRNA) veya ribozomal DNA (rDNA)'daki belirli bölgelerin hedeflendiği çeşitli teknikler günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılmış DNA bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kesimine dayanan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) kullanılan yöntemler arasındadır. Tanılamada kullanılan DNA esaslı bu yöntemler; 26S rDNA, 18S rDNA veya 18rDNA' daki ara bölgelerin (ITS1 ve ITS2) tanımlanmasına yöneliktir (Hierro ve ark., 2004).

Mayaların tür tespiti ve türler arası ilişkilerinin belirlenmesinde ITS bölgelerinin kullanılması yaygındır. ITS bölgeleri ribozomal RNA içerisinde tekrarlanan bir bölgedir. Bu bölgede 5' external transcribed sequence (5' ETS), 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA ve son olarak da 3' ETS bölgeleri bulunmaktadır. Mayaların tanımlanmasında ITS bölgesinin; ITS1, ITS2, ITS5, ITS3 ve ITS4 primerleri ile çoğaltıldıkları bilinmektedir (Schoch ve ark., 2012).

Arxiozyma telluris (= *Kazachstania telluris*) mayası 28 ve 45°C arasında dar bir büyüme sıcaklığı gösterdiği için zorunlu termofilik olarak sınıflandırılmıştır. *A. telluris*'ün etanol de 37°C'de büyütüldüğü zaman maksimum hücre verimine ulaştığı görülmüştür. 25°C'de büyüme oldukça yavaş ve 20°C'de ise hiçbir büyüme gözlenmemiştir, üstelik bu termotolerant *Candida parapsilosis* mayasından ziyade daha çok termofilik bir karaktere sahip tür olduğunu gösterir. *A. telluris*'in büyüme için üst büyüme sıcaklığı yaklaşık 45°C idi (Arthur ve Watson 1976).

Kore'de topraktan izole edilen Y94T maya suşu daha yüksek sıcaklıklarda büyüme kapasitesine sahiptir. Suş, çoklu tomurcuklanma ile eşeysiz üreme, nişasta gibi ekstraselüler bileşiklerin yokluğu, negatif bir diazonyum



mavisi B renk reaksiyonu ve artrosporlar, balistik konidya ve askosporların yokluğu gibi karakteristik özelliklere sahip olduğundan *Candida* genusu içine yerleştirilebilir. Diğer belirli fizyolojik karakterleri yanında maksimum büyüme sıcaklığı 50–51°C olan ve diğer askomiset mayalardan ayrılan kısmi tek 26S ribozomal DNA lı bu suşdur. Bu yeni suş *Candida thermophila* olarak tanılanmıştır (Shin ve ark.,2001).

Çalışmada ITS bölgeleri kullanılarak yapılan moleküler tanılama sonucu % 98 oranında benzerlikle maya izolatlarının tanıları yapılmıştır. Sadece bir türün tanısı yapılamamıştır. Bu da bize uygulanan tekniklerin termofilik çevredeki mayaların izolasyon ve tanısı için geçerli bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Bulgularımız olan *Candida albicans*, *Candida albicans* strain m74a, *Pichia jadinii* strain ATCC 22023, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* strain P2, *Pichia manshurica* strain h79b ve *Candida glabrata* strain 86A türleri, ülkemiz ve Aydın bölgesindeki jeotermal kaynakların bulunduğu yerlerdeki topraktan alınan ilk termofilik maya örnekleri olabilir. Çünkü kayıtlarda bu termofilik maya örneklerine rastlanmamıştır.

Dünya literatür kaynaklarında mayaların çeşitli çevrelerden izolasyonu ve tanılarının ITS bölgeleri kullanılarak yapıldığını gösteren fazlaca çalışmalar vardır. Senses-Ergul ve ark., (2006) gıdalardan izole edilen bazı mayaların hem klasik hem de moleküler metotlarla identifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İzole edilen 22 adet maya suşunda ITS-18S rRNA gen bölgesi sekanslanmış ve *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus albidus*, *Aureobasidium* spp., *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Pichia anomala*, *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica* olarak tanılanmıştır. Fitzpatric ve ark., (2006) izole ettikleri fungusların filogenetik identifikasyonu sonucunda *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces*

hansenii, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Lodderomyces elongisporus* mayalarını tanılamışlardır. Tofalo ve ark., (2009) şaraptan izole ettikleri mayaların ITS gen bölgelerini sekanslayarak, *Candida apicola*, *Candida zemplinina* ve *Zygosaccharomyces bailii* olarak osmotolerant maya türlerini tanıya etmişlerdir. Choi ve ark., (2010) topraktan 2 maya suşu izole etmişler ve ITS1 ve ITS2 gen bölgelerini sekanslayarak, *Saccharomyces cerevisiae* olarak belirlemişlerdir. González-Hernández ve ark., (2012) etanol üretiminde kullanılan mayaların izolasyonunu ve moleküler identifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. RFLP yöntemini kullanarak *Saccharomyces cerevisiae* maya türünü tanılamışlardır. Kurtzman ve Robnett (2013) izole ettikleri maya suşlarının filogenetik identifikasyonunu yapmışlar ve *Pichia* sp., *Saturnispora* sp., *Kregervanrija* sp., *Dekkera* sp., *Ogataea* sp., *Ambrosiozyma* sp., *Barnettozyma* sp., *Cyberlindnera* sp., *Phaffomyces* sp., *Starmera* sp., *Wickerhamomyces* sp., *Kodamaea* sp., *Metschnikowia* sp., *Debaryomyces* sp., *Zygoascus* sp., *Yarrowia* sp. olarak belirlemişlerdir. El-Latif Hesham ve ark., (2014) peyniraltı suyu gibi endüstriyel atıklardan izole ettikleri maya suşunun 5.8S-ITS rDNA ve 26S rRNA gen bölgelerinin sekansını yapmışlar ve %99 benzerlikle *Kluyveromyces marxianus* ve *Kluyveromyces lactis* olarak belirlemişlerdir. Šuranská ve ark., (2016) beyaz peynirden izole ettikleri maya suşlarının identifikasyonu için ITS gen bölgelerini kullanmışlar ve *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Galactomyces geotrichum* maya suşları tanılanmıştır. Abdel-Sater ve ark., (2016) deri ve tırnak örneklerinden izole edilen 21 maya suşunun ITS gen bölgelerini sekanslayarak *Saccharomycopsis fibuligera*, *Candida galli* ve *Trichosporon dohaense* olarak tanılanmıştır.



Benzer yöntemler ile termofilik maya türlerini tanılamamız *Candida Pichia*, *Saccharomyces* ve *Kluyveromyces* cinslerine ait türler tanılamamız kullanılan tanı yönteminin geçerliliği açısından oldukça önemlidir.

Suşların MEGA6 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağacında; Moleküler tanılama için kullanılan DNA bölgesinde oluşabilecek bir nokta veya bölgesel bir mutasyon, dizileme sırasında oluşan bir gap veya yanlış eşleşmeler baz dizi verisinde değişmeye yol açabileceği için filogenetik ağaç oluşturan programın farklı yorumlamasına yol açmış olabilir. Bu değişiklikler tür tayinini etkilemese de filogenetik ağaç çıkarırken farklılıklara yol açabilmektedir

Ege bölgesi ve özellikle Aydın ili jeotermal kaynakların en fazla olduğu illerimizden biridir. Aydın ilinde jeotermal kaynaklardan izole edilen termofilik mikroorganizmalar; özellikle bakteriler ve mikrofunguslar ile ilgili çalışmalar oldukça

fazladır. Termofilik mayalar ve bunların taksonomisi ile yapılan çalışmalar oldukça azdır. Termofilik mikroorganizmaların biyoteknoloji ve enzim biyoteknolojisinde kullanımının önemi göz önünde bulundurulduğunda toprak ve su örneklerinden izole edilen 8 termofilik mayanın izolasyon ve tanısının katkısı yadsınamaz. Çalışmamızda termofilik çevreden alınan toprak ve su örneklerinden izole edilen 9 maya suşunun ITS1 ve ITS2 gen bölgeleri çoğaltılarak, sekans analizi yapılmıştır. Termofilik mayalar kayıt altına alınarak stoklarımıza girmiştir. Böylece elde edilen suşların endüstriyel potansiyellerin araştırılması ve bir sonraki çalışmalar için kullanım olanağı sağlayacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK-BİDEP 2209 (Proje No: 1919B011500712) projesi ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdel-Sater M.A., Moubasher A.A., Soliman Z. *Identification of three yeast species using the conventional and internal transcribed spacer region sequencing methods as first or second global record from human superficial infections*, Mycoses, 59(10) 652-661 (2016).
- Anonim. Kaplıcaya Sahip Belediyeler Birliği (2001).
- Arthur H., Watson K. *Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts*, Journal of Bacteriology, 128 56-68 (1976).
- Baker G.C., Gaffer S., Cowan A.D., Suharto A.R. *Bacterial community analysis of Indonesian hot springs*, FEMS Microbiology Letters, 200 103-109 (2001).
- Charles P.E, Dalle F., Aube H., Doise J.M, Quenot J.P, Aho L.S, Chavanet P., Blettery B. *Candida spp. colonization significance in critically ill medical patients: a prospective study*, Intensive Care Medicine, 31(3) 393-400 (2005).
- Choi G.W., Umb H.J., Kim Y., Kang H.w., Kim M., Chung B.W., Kim Y.H. *Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch*, Biomass and Bioenergy, 34(8) 1223-1231 (2010).
- Deacon J. *The microbial world: Thermophilic microorganisms produced by institute of Cell and Molecular Biology*. The University of Edinburgh, (<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/thermo.htm>.) (2007).
- Dlauchy D., Tornai-Lehoczki J., Peter G. *Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification*, Systematic and Applied Microbiology, 22(3) 445-53 (1999).
- El-Latif Hesham A., Wambui V., Henry Ogola J.O., Maina J.M. *Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences*, Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 12(1) 37-43 (2014).



- Fernandez-Espinar M.T, Martorell R., De Llanos R., Querol A. *Molecular methods to identify and characterize yeasts in food and beverages*. In: *Yeasts in food and beverages*: Querol A. and Fleet G (eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, p. 55-82, (2006).
- Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., Butler G. *A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis*, BMC Evolutionary Biology, 6(99) 1-15 (2006).
- Genç T.T., Çıldır İ.N. *Bozcaada üzüm çeşitleri üzerinde Non-Saccharomyces mayaların dağılımı*, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(1) 115-120 (2012).
- González-Hernández J.C., Perez E., Damian R.M., Chavez-Parga M.C. *Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcal elaboration*, Revista Mexicana de Ingeniería Química, 11(3) 389-400 (2012).
- Hierro A., Sun J., Rusnak A.S., Kim J., Prag G., Emr S.D., Hurley J.H. *Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex*, Nature, 431(7005) 221-225 (2004).
- Hoffman C.S., Winston F. *A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli*, Gene, 57(2) 267-272 (1987).
- Hudson H.J. *Fungal Biology*. Edward Arnold Press, London, 6 158-75 (1987).
- Kurtzman C.P., Robnett C.J. *Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species*, FEMS Yeast Research, 13(1) 23-33 (2013).
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock biology of microorganisms*, 14th edn. Pearson Education Limited (2015).
- Lee B.H. *Fundamentals of food biotechnology*, VCH Publishers, USA, p. 431, (1996).
- Lopes M.B, Soden A., Martens A., Henschke P.A, Langridge P. *Differentiation and species identification of yeasts using PCR*, International Journal of Systematic Bacteriology, 48(1) 279-286 (1998).
- Pfaller M.A., Diekema D.J. *Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond Candida albicans and Aspergillus fumigatus*, Journal of Clinical Microbiology, 42(10) 4419-4431 (2004).
- Redman R.S, Litvintseva A., Sheehan K.B., Henson J.M., R odriguez R.J. *Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park*. Applied and Environmental Microbiology, 65 5193-7 (1999).
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Consortium F.B. *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi*, Pnas, 109(16) 6241-6246 (2012).
- Senses-Ergul Ş., Agoston R., Belak A., Deak T. *Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests*, International Journal of Food Microbiology, 108(1) 120-124 (2006).
- Shin K.S, Shin Y.K, Yoon J.H, Park Y.H. *Candida thermophila sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil*, International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 51 2167-2170, (2001).
- Šuranská H., Raspor P., Uroić K., Golić N., Kos B., Mihajlović S., Begović J., Šušković J., Topisirović L., Čadež N. *Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques*, Folia Microbiologica (Praha), 61(6) 455-463 (2016).
- Tofalo R., Chaves-López C., DiFabio F., Schirone M., Felis G.E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G. *Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must*, International Journal of Food Microbiology, 130(3) 179-187 (2009).
- Van den Burg B. *Extremophiles as a source for novel enzymes*, Current Opinion Microbiology, 6(3), 213-218 (2003).
- Van Der Vossen J.M.B.M., Rahaoui H., De Nijs M.W.C.M., Hartog B.J. *PCR methods for tracing and detection of yeasts in the food chain*. In: *Yeasts in Food*, Boekhout T, Robert V (eds), Bayerlein GmbH, Neuss, Germany, p. 123-137, (2003).



- Vaughan-Martini A. *Reflections on the clasification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine*, International Microbiology, 6(3) 175-182 (2003).
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR protocols: A guide to method sand applications. Academic Press Inc., New York, p. 315–322, (1990).
- Zhang Y., Wu W.P., Hu D.M., Su Y.Y., Cai L. *A new thermophilic species of Myceliophthora from China*, Mycological Progress, 13(1)165–170 (2014).