

Exophiala dermatitidis ve Exophiala phaeomuriformis Kökenlerinin Malaşit Yeşilini Renksizleştirme Aktivitelerinin Değerlendirilmesi[§]

Mustafa ŞENGÜL*[®], Çağrı ERGİN*[®], Engin KAPLAN**[®], Levent AKSOY*[®],
Macit İLKİT***[®], G Sybren de HOOG****[®]

*Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

**İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin Üniversitesi, Mersin

***Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı, Adana

****Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Hollanda

ÖZ

Amaç: Malaşit yeşili (MY) tekstil endüstrisi ve kültür balıkçılığında yaygın olarak kullanılan, N-metillemiş diaminotriphenilmetan bir boyadır. Mikobakteri izolasyonu, spor boyama ve fotodinamik tedavi amaçlı olarak tıbbi mikrobiyolojide de kullanılır. Çevresel tehlikeli kirliliğe neden olan boya ların ortamd an temizlenmesinde mikroorganizmaların kullanımı, günümüzde uygulanan yöntemlere önemli bir alternatiftir. Sunulan araştırmada, insanlar tarafından hidrokarbon atıklar ile kirlenmiş çevrede sıklıkla karşılaşılan Exophiala türlerinin malaşit yeşilini renksizleştirme aktiviteleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: MY renksizleştirme aktivitesini incelemek üzere çalışmaya, 109'u Exophiala dermatitidis (69 bulaşık makinesi, 33 demiryolu traversi ve 7 klinik kökeni) ve 82'si de Exophiala phaeomuriformis (32 bulaşık makinesi ve 50 demiryolu travers kökeni) olmak üzere toplam 191 köken dâhil edildi. Kökenlerin agar dilüsyon yöntemi ile MY duyarlılıkları ve renksizleştirme aktiviteleri incelendi. Tüm Exophiala kökenlerinin renksizleştirme aktiviteleri 32 µg/mL MY içeren buyyon besiyerinde spektrofotometrik olarak araştırıldı.

Bulgular: Agar dilüsyon yöntemi ile her iki tür Exophiala kökeninde, MY MIK_{90} değeri 128 µg/mL olarak bulundu. Göz ile incelemede, en iyi renksizleştirme aktivitesi ≥ 32 µg/mL MY konsantrasyonunda görüldü. Katı besiyerinde yapılan testlerde Exophiala türleri arasında MY renksizleştirme oranları yönünden farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Spektrofotometrik olarak yapılan renksizleştirme aktivitesi karşılaştırmalarında da, Exophiala türleri ve izolasyon bölgeleri arasında fark saptanmadı ($p>0.05$). Tüm kökenler arasında, bulaşık makinesinden izole edilen bir E. dermatitidis kökeni %62.6 ile en yüksek renksizleştirme oranını gösterdi.

Sonuç: Exophiala cinsi gibi esmer mantarlarda görülen renksizleştirme potansiyeli ve çevresel ortamlardaki toksik boya ların biyolojik yıkımlarında uygulanabilirliği daha ileri araştırmalar ile değerlendirilmelidir.

Anahtar kelimeler: Renksizleştirme, biyo-yıkım, esmer mantar, Exophiala, malaşit yeşili

ABSTRACT

Evaluation of Malachite Green Decolorizing Activity of Exophiala dermatitidis and Exophiala phaeomuriformis Strains

Objective: Malachite green (MG), an N-methylated diaminotriphenylmethane dye, is widely used in aquaculture, textile industry, and various microbiological techniques including mycobacterial isolation, spore dying, and photodynamic therapy. The use of microbes for the removal of environmentally hazardous dyes is emerging as a promising alternative to the current treatments. In this study, MG-degradation activity of Exophiala species, which are regularly encountered in human-made, hydrocarbon-polluted environments, has been examined.

Material and Methods: In order to investigate the MG decolorization activities a total of 191 Exophiala strains consisting of 109 Exophiala dermatitidis strains isolated from 69 dishwashers, 33 railway sleepers, and 7 clinical samples, and 82 Exophiala phaeomuriformis strains isolated from 32 dishwashers and 50 railway sleepers were included in the study. MG sensitivities and decolorization activities of the strains were tested by agar dilution method. Decolorization activities of all Exophiala strains were investigated spectrophotometrically in broth medium containing 32 µg/mL MG.

Results: In both Exophiala species, the MG MIK_{90} values were found to be 128 µg/mL by the agar dilution method. On unaided visual evaluation, the best decolorization activity was seen in ≥ 32 µg/mL MG concentration. There was no difference in decolorization rates of MG between Exophiala species in agar based-medium tests ($p>0.05$). In comparison of the spectrophotometrically performed decolorization activities, no difference was found between Exophiala species and isolation regions ($p>0.05$). Among all strains, an E. dermatitidis strain isolated from a dishwasher showed the highest decolorization ratio as 62.6%.

Conclusion: The decolorization potential of black yeasts such as Exophiala species and its applicability in the biodegradation of toxic dyes in environments should be further investigated.

Keywords: Black yeast, biodegradation, decolorization, Exophiala, malachite green

Alındığı tarih: 04.02.2018

Kabul tarihi: 30.04.2018

[§] Bu araştırma 37.Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (16-20 Kasım 2016, Belek, Antalya) sunulmuştur.

Yazarların ORCID bilgileri:

Mustafa Şengül 0000-0003-2271-2618 Çağrı Ergin 0000-0001-7783-8723 Engin Kaplan 0000-0001-5705-717X
Levent Aksoy 0000-0003-2297-9013 Macit İlkit 0000-0002-1174-4182 G Sybren de Hoog 0000-0002-5344-257X

GİRİŞ

Malaşit yeşili (MY) tekstil endüstrisi başta olmak üzere kültür balıkçılığı ve mikrobiyolojide yoğun olarak kullanılan sentetik N-metillenmiş-diaminotrifenilmetan bir boyadır. Laboratuvar ortamında yaygın olarak, mikobakterilerin izolasyonu, spor boyaması ve pH indikatörü olarak kullanılır⁽¹⁻⁴⁾. Ayrıca fotodinamik tedavi için fotosensitizer etkisi de bildirilmiştir⁽⁵⁾. İnsanda toksik, karsinojen, mutajen ve teratojen etkileri nedeni ile Avrupa Birliği ülkelerinin yanı sıra diğer birçok ülkede de sağlığa zararlı kimyasal olarak kabul edilmektedir^(1,2,6-8).

MY'nin renginin farklı etkenler ile açılması, çoğunlukla kimyasal yapısının yıkımını göstermektedir. Literatürde tanımlandığı şekilde birçok yolla (biyolojik, fotokatalitik, fotoooksidatif, günışığı, koagülasyon-flokülasyon, ozonasyon, fenton re-ajanı, solvent ekstraksiyonu, sonokimyasal ve sonokatalitik) yıkılarak renksiz bileşiklere dönüştürülmektedir⁽³⁾. Ortaya çıkan yıkım ürünlerinin sağlığa zararlı etkileri daha azdır. Tüm yöntemlerin belirli bir etkinliği, avantaj/dezavantajı ve maliyeti bulunmaktadır. Ticari balıkçılık ortamlarında ve sanayinin atıklarında bulunan kimyasal boyaların renksizleştirilmesi, dolayısıyla sağlığa zararlı etkilerinin minimize edilmesinde, bakteri ve mantar kökenleri aracılı biyo-yıkım yapılabileceği belirtilmektedir^(3,8-17). MY'nin çevresel ortamdan temizlenmesinde doğal veya yapay aktif karbon bileşikleri, kil toprak yapılar, biyopolimerler ve bataklık turba toprağı da bulunmaktadır⁽³⁾. MY'nin biyolojik etkenler ile renksizleştirilmesi, temel olarak boyaların enzimler ile redüksiyonu, aynı zamanda da N-demetilasyon reaksiyonları sonucu olduğu belirtilmektedir. N-demetilasyon reaksiyonları genellikle mantarların çevresel-odun yapı ortamlarında kolonizasyonuna yardımcı olan lignin peroksidaz tarafından da katalizlenebilmektedir⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Exophiala cinsi esmer mantarların, monoaromatik yapılu karbonik bileşikler için potent biyoyıkım özellikleri bulunduğunu ve özellikle sanayi ortamlarında, örneğin stirenin ortamdaki uzaklaştırılması gibi çevresel kazanımlar oluşturmada yararlı olabileceği gösterilmiştir⁽¹⁸⁻²¹⁾. Ülkemizde *Exophiala* türlerinin çevresel ortamlarda varlığına ilişkin araştırmalarda, petrol türevleri ile kirlenmiş ortamlardan (özellikle meşe ağacından yapılan demiryolu traversleri)⁽²²⁾, bulaşık makinelerinden⁽²³⁾, toprak⁽²⁴⁻²⁷⁾ ve gıdalar⁽²⁷⁾ gibi farklı ortamlardan izolasyonlar bildirilmiştir.

Sunulan araştırmada, klinik ve insan yapımı çevresel ortamlardan sıklıkla izole edilen *Exophiala* kökenlerinin MY'yi renksizleştirme etkisi ve bu etkinin olası MY parçalanması ile ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma izolatları

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji Bilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önce yapılan araştırmalarda ülkemizden izole edilen ve ITS sekans analizi ile identifikasyonu ve genotiplendirmesi yapılan 102 *Exophiala dermatitidis* ve 82 *E. phaeomuriformis* kökeni çalışmaya alındı^(22,23). Ayrıca, Westerdijk Mantar Biyoçeşitlilik Enstitüsü (Utrecht, Hollanda) kültür koleksiyonundan elde edilen 7 klinik izolat da araştırmaya dâhil edildi (Tablo 1).

Kökenlerin renksizleştirme aktivitesini incelemek için araştırma; MY direncinin saptanması ve renksizleştirme oranının belirlenmesi olmak üzere iki aşamada yapıldı.

Seçilmiş *Exophiala* kökenlerinde MY direncinin araştırılması

Çalışmada kullanılan kökenler stok ortamların-

dan çıkarılarak Sabouraud'un dekstrozu agar (SDA, HiMedia, Hindistan) besiyerinde 37°C'da beş gün süre ile kültüre edilerek canlandırıldı. Tüm kökenler arasından rastgele seçilen 44 (21 *E. dermatitidis*, 23 *E. phaeomuriformis*) kökenin MY direnci araştırıldı. Steril serum fizyolojik içinde süspansiyon edilen mayalar, Thoma lamında sayılarak 10⁶ cfu/ml yoğunluğa ayarlandı. SDA besiyeri içinde MY konsantrasyonu 256-0.06 µg/ml aralığında olacak şekilde seri agar dilüsyon besiyerleri hazırlandı. Besiyeri pH'sı 6.5±0.2 olarak ayarlandıktan sonra, 121°C'da 15 dakika süre ile otoklavda steril edilerek petri plaklarına 4 mm kalınlıkta döküldü. Her maya süspansiyonundan, farklı konsantrasyondaki plaklara 15 µl spot ekim yapıldı. Besiyerleri, aerob koşullarda, 30°C'deki nemli ortamda inkübe edildi. Ekimler üçer günlük kontrollerle dokuz gün boyunca değerlendirildi. Çıplak göz ile koloni varlığı değerlendirildi. Kökenlerin kontrol ekimleri eşzamanlı olarak SDA besiyerine yapıldı.

Renksizleştirme oranının spektrofotometrik ölçümü

Tablo 1'de dağılımı verilen kökenler, mayaözütü-pepton-dektroz (YÖPD; %1 maya özütü, %2 pepton, %2 dekstroz) besiyerinde çoğaltıldı. Seçilmiş *Exophiala* kökenlerinde saptanmış olan direnç profiline göre, mayaların MY'nin renksizleştirme aktivitesi 32 µg/mL MY konsantrasyonunda araştırıldı. İçinde 32 µg/mL MY içeren YÖPD besiyerlerine yapılan ekimler, oda ısısının

da 48 saat inkübe edildi. Her köken, düz taban mikrotitrasyon plağındaki (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) farklı üç kuyucuğa 250'şer µL aktararak, 630 nm'de spektrofotometrik (BioTek ELx808, ABD) olarak değerlendirildi. Kontrol besiyerine ekim yapılmadı ancak süre sonunda aynı işlem bu besiyeri için de yinelenildi. Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılan mikrotitrasyon plakları bir hafta süre ile aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, her kuyucuktan SDA besiyerine üreme kontrolü ekimi yapıldı. Üreme görülen kökenlerin 32 µg/mL MY konsantrasyonuna dirençli olduğu kabul edilerek, bu kökenlere ait spektrofotometrik veriler istatistiksel analize alındı.

MY renksizleştirme oranı:

$$(\%) \text{Renksizleştirme} = \frac{(\text{Kontrol Malaşit Yeşili}_{\text{OD650}} - \text{Test Malaşit Yeşili}_{\text{OD650}})}{\text{Kontrol Malaşit Yeşili}_{\text{OD650}}} \times 100$$

İstatistik değerlendirme

Minitab 16.0 (Köln, Almanya) programı ile yapıldı ve hata payı %5 (p<0.05 değeri anlamlı) olarak kabul edildi.

BULGULAR

Araştırmaya alınan rastgele seçilmiş *Exophiala* kökenlerinde MIK₉₀ değeri 128 µg/mL olarak bulundu (Tablo 2). Her iki tür için de MIK₉₀ değeri 128 µg/mL olarak saptandı.

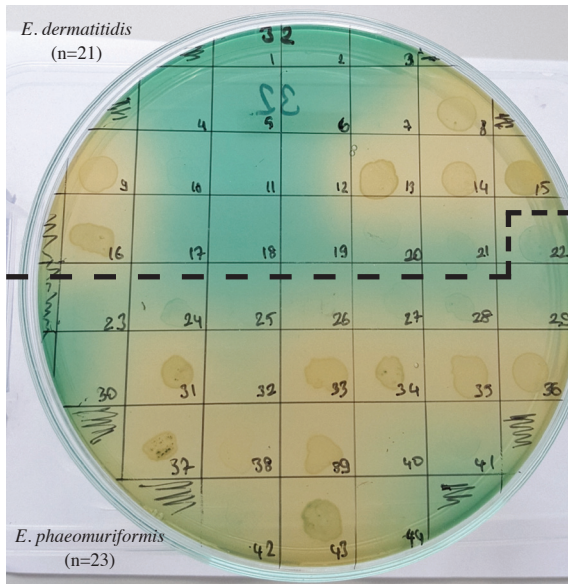
Tablo 1. Çalışmaya alınan tüm kökenlerin dağılımı (N=191).

	<i>Exophiala dermatitidis</i>		<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	
	Referans	Referans-dışı	Referans	Referans-dışı
Cevresel				
Bulaşık makinesi	17	52	7	25
Demiryolu	3	30	2	48
Klinik	7	-	-	-
Toplam		109		82

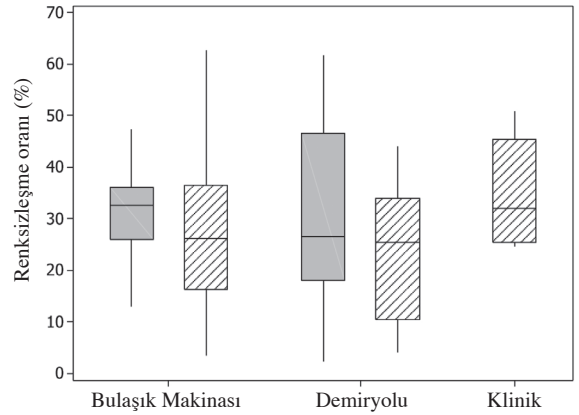
Referans: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)'a kayıtlı köken

Tablo 2. Rastgele seçilmiş *Exophiala* (N=44) kökenlerinin inhibe olduğu en düşük malaşit yeşili konsantrasyonları.

Malaşit Yeşili konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=21)	<i>Exophiala phaeomuriformis</i> (n=23)	Toplam inhibisyon (n, %)
≤ 1	-	-	0 (0.0)
2	6	6	12 (27.2)
4	8	3	23 (52.2)
8	-	2	25 (56.8)
16	-	-	25 (56.8)
32	-	-	25 (56.8)
64	-	-	25 (56.8)
≥ 128	7	12	100 (100.0)

Şekil 1. Malaşit yeşili (32 $\mu\text{l/mL}$) içeren SDA besiyerinde koloni çevrelerinde görülen renksizleştirme profilleri.

Rastgele seçilmiş *Exophiala* (n=44) kökenlerinin renksizleştirme aktivitelerinin çalışıldığı katı besiyeri incelendiğinde, MY'nin 32 $\mu\text{g/mL}$ ve üstündeki konsantrasyonlarında renksizleştirme aktivitesi göz ile değerlendirilebildi (Şekil 1). Renksizleştirme aktivitesi değerlendirilen kökenler arasında, yüksek MY konsantrasyonunda üreyebilen kökenlere karşı daha düşük konsantrasyonlarda (2-8 $\mu\text{g/mL}$) inhibe olan kökenlerin de varlığı saptandı (Tablo 2). Katı besiyerinde renksizleştirme aktivitesinin iyi gözlemlendiği 32 $\mu\text{g/mL}$ MY konsantrasyonunda üreyebilen 19 izolatın 15'inde (%78.9) sınırları keskin olmayan "renk açılması/beyazlatma" görüldü (Tablo 2, Şekil 1). Test edilen 32 $\mu\text{g/mL}$

Şekil 2. Farklı kaynaklardan izole edilen *E. phaeomuriformis* (n=46; düz sütun) ve *E. dermatitidis* (n=68; çizgili sütun) kökenlerinin malaşit yeşilini renksizleştirme aktivitelerinin karşılaştırılması.

konsantrasyonda üreyebilen *E. dermatitidis* kökenlerinin 6'sınının (%85.7) ve *E. phaeomuriformis* kökenlerinin 9'unun (%75.0) MY'yi renksizleştirdiği, türler arasında istatistiksel farklılık olmadığı ($p>0.05$) bulundu.

Araştırmaya alınan tüm *Exophiala* (N=191) kökenlerinin 32 $\mu\text{g/mL}$ MY içeren YÖPD besiyerinden 48 saat inkübasyon sonrasında yapılan kontrol ekimlerinde; 68 *E. dermatitidis* (48 bulaşık makinası, 15 demiryolu traversi ve 5 klinik örnek) ve 46 *E. phaeomuriformis* (18 bulaşık makinesi ve 28 demiryolu traversi) kökeni olmak üzere toplam 114 köken üreme gösterdi. Bu *Exophiala* kökenlerindeki türler arasında, MY'yi

renksizleştirme oranları bakımından istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Aynı şekilde türlerin izolasyon bölgeleri (demiryolu traversi, bulaşık makinesi ve klinik kökenler) arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$, Şekil 2). Bununla birlikte, MY'yi en yüksek düzeyde renksizleştirme oranının (%62.6), bulaşık makinasından izole edilen bir *E. dermatitidis* kökeninde olduğu saptandı.

TARTIŞMA

Avrupa Birliği verilerine göre kaçak olarak yaygın bir şekilde kullanılan MY, çevresel kirlenmeye de neden olmaktadır^(3,7). Günümüzde, bölgesel olarak ekonomide önemli yere sahip olan tekstil sektörünün ortaya çıkardığı en önemli sorunlardan biri de, tekstil boyama çukurları kaynaklı atık sulardır. Bu atık sularda polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ağır metal iyonları, surfaktanlar, boyalar, çözücüler ve deterjanlar bulunmaktadır⁽⁸⁾. Her ne kadar gıda sektöründe kullanılan MY ve türevleri, endüstriyel atık olan sulardaki MY konsantrasyonlarına ulaşmıyorsa da, gıda ile doğrudan insana geçiş söz konusudur^(1,2,7). Bu nedenle, çevresel MY'nin yıkımına yönelik yeni araştırmalar sürekli gündemdedir⁽³⁾. *Exophiala* kökenleri benzer çevresel kirliliğin olduğu bölgelerde kolaylıkla çoğalabildiği bilinmektedir. Farklı aromatik bileşiklerin bulunduğu ortamda çoğalabilen *Exophiala* türleri, bu çevresel kirleticilerin biyo-yıkımlarında rol alabilirler⁽¹⁸⁻²¹⁾. MY klorid veya oksalat tuzları (kromatik) şeklinde olabildiği gibi nötral karbinol veya indirgenmiş löko formunda da bulunabilir. MY olarak anılan yeşili, akril parlak yeşil, benzaldehit yeşili vb. gibi çok sayıda benzer yapıda boyar maddeler vardır. MY, biyolojik bilimlerde okside formda ["Chemical Abstract Services" (CAS) numarası 2437-29-8, renk indeksi (CI) 42000] kullanılır⁽¹⁾.

Toksik ve karsinogenetik etkisi olan MY, çevresel bakteriler ve özellikle intestinal flora tarafın-

dan yapısal olarak farklılaştırılarak renksiz formlarına dönüştürülmektedir^(1,28). MY'nin ortamda renk kaybı kimyasal yapı dönüşümünün bir göstergesidir. Ortaya çıkan yıkım ürünleri, MY'nin biyolojik etkileşimlerini (lipoprotein yapıya bağlanma, DNA ile interkalasyon vb.) göstermez. Özellikle mikobakterilerin izolasyonunda yoğun olarak kullanılan MY'nin, indirgendiği formda antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin önemli oranda azaldığı gösterilmiştir^(2,13,29,30). Yapılan çalışmalarda, MY'nin biyoyıkımlarında, lökomalaşit başta olmak üzere, birçok farklı yapıdaki bileşiğe yıkıldığı görülmüştür^(9-11,13-16,29,30).

Exophiala türlerinin insanlarda özellikle immüno-süpresyon varlığında yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturmaları nedeni ile çevresel kolonizasyon bölgeleri risk faktörü olarak araştırılmaktadır. Virülans özelliklerinin morfogenez ile ilişkili olduğu, besin ortamının az ve toksik olduğu sıra dışı ortamların virülansı etkilediği belirtilmiştir⁽³²⁾. Malaşit yeşili, balık yetiştirme ortamlarında bulunan fungal ve parazitik enfeksiyon etkenlerine karşı sıvı ortama doğrudan verilir. Özellikle kültür balıkçılığında, inkübas-yondaki balık yumurtalarının oomiçet mantarların aşırı çoğalmasını önlemede, bazı balık türlerinin sistemik hastalıklarının tedavisinde ve yetiştirme ortamlarının dezenfeksiyonunda etkindir^(2,7). Gıdada yüksek kullanım ve boya sanayi atıkları nedeni ile MY ile çevresel kirlilik yüksektir.

Sunulan araştırmada, özellikle hidrokarbon ile kirlenmiş ortamlara kolaylıkla kolonize olabilen *Exophiala* cinsinin insan patojeni olan iki türünde de MY'yi renksizleştirme etkisi saptanmıştır. Ulaşılabilen literatürde, genellikle MY'yi renksizleştirme etkisi bulunan tek kökenin mikrobiyolojik ve biyoteknolojik özelliklerinin ön planda incelenmektedir. Genellikle bu kökenler yüksek MY renksizleştirme aktiviteleri gösterirler ve çevresel biyo-iyileştirme açısından önemlidir⁽¹³⁻

¹⁷⁾. *Exophiala* kökenlerinin toksik sanayi atıklarında kolonize olabilmesi, insan sağlığına zararlı MY'nin yapısını değiştirmesi nedeni ile önemlidir. *Exophiala* cinsinin de içinde yer aldığı *Chaetothyriales* takımının doğada odunsu yapılarda kolonizasyonunu kolaylaştıran ligninolitik enzimleri, aynı zamanda polisiklik aromatik hidrokarbonların yıkımlarını sağlayan mikrobiyal enzim gruplarındandır⁽²⁰⁾. Bununla birlikte, sunulan araştırmada odunsu yapıların bulunmadığı bulaşık makinelerinden izole edilen kökenler ile travers gibi katran ile karşılaşan odun yapıdan izole edilen demiryolu kökenli izolatların MY yıkım kapasiteleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 2). Sunulan araştırmada en yüksek renksizleştirme oranı ise bulaşık makinasından izole edilen bir *E. dermatitidis* kökeninde %62.6 olarak bulunmuştur. Bu durum, hipotetik olarak, *Exophiala* cinsinde, ligninolitik enzimlerin dışında farklı biyoyıkım mekanizmalarının aktif olarak etkili olabileceğini göstermektedir.

Birçok mikrobiyal yapı belirli bir oranda MY'yi yıkabilmektedir. Yüksek biyo-yıkım kapasitesine sahip kökenler genellikle daha ileri araştırmalar kapsamında, endüstriyel biyoyıkımdaki ekonomik ve çevresel kazanımlar açısından incelenmektedir. Bu nedenle, ülkemizde çevresel ortamlardan izole edilen esmer mantar kökenlerinin, çevresel kirleticilerin biyo-yıkım potansiyelleri açısından araştırılması önem göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Culp SJ, Beland FA. Malachite green: A toxicological review. *Int J Toxicol*. 1996;15(3):219-38. <https://doi.org/10.3109/10915819609008715>
2. Alderman DJ. Malachite green: a review. *J Fish Dis*. 1985;8(3):289-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb00945.x>
3. Raval NP, Shah PU, Shah NK. Malachite green "a cationic dye" and its removal from aqueous solution by adsorption. *Appl Water Sci*. 2017;7(7):3407-45. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0512-2>
4. Banaei N, Kincaid EZ, Lin SY, Desmond E, Jacobs WR Jr, Ernst JD. Lipoprotein processing is essential for resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to malachite green. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3799-802. <https://doi.org/10.1128/AAC.00647-09>
5. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD, Pereira CA, Munin E, Jorge AO. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2010;25(3):385-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-009-0706-z>
6. Council Regulation 2377/90/EEC. *Off J Eur Commun* 1990; L224.
7. Olesen PT. Risk assessment of malachite green in food. National Food Institute, Technical University of Denmark, Soeborg, Danimarka, 2007.
8. Ning XA, Liang JY, Li RJ, et al. Aromatic amine contents, component distributions and risk assessment in sludge from 10 textile-dyeing plants. *Chemosphere*. 2015;134:367-73. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.015>
9. Ali H. Biodegradation of synthetic dyes – a review. *Water Air Soil Pollut*. 2010;213(1-4):251-73. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>
10. Cheriaa J, Khairredine M, Rouabhia M, Bakhrouf A. Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *Sci World J*. 2012; 2012:512454. <https://doi.org/10.1100/2012/512454>
11. Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresour Technol*. 1996;58(3):217-27. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00113-7)
12. Fu Y, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresour Technol*. 2001;79(3):251-62. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00028-1)
13. Chen CH, Chang CF, Liu SM. Partial degradation mechanisms of malachite green and methyl violet B by *Shewanella decolorationis* NT0U1 under anaerobic conditions. *J Hazard Mater*. 2010;177(1-3):281-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.030>
14. Parshetti G, Kalme S, Saratale G, Govindwar S. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chim Slov*. 2006;53:492-8.
15. Jadhav JP, Govindwar SP. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast*. 2006;23(4):315-23. <https://doi.org/10.1002/yea.1356>
16. Deivasigamani C, Das N. Biodegradation of basic violet 3 by *Candida krusei* isolated from textile wastewater. *Biodegradation*. 2011;22(6):1169-80. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9472-2>
17. Cha C, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(9):4353-60. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4358-4360.2001>
18. Cox HH, Moerman RE, Van Baalen S, van Heyningen WJM, Doddema HJ, Harder W. Performance of a styrene-degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. *Biotechnol Bioeng*. 1997;53(3):259-66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970205\)53:3<259::AID-BIT3>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970205)53:3<259::AID-BIT3>3.0.CO;2-H)
19. Prenafeta-Boldu' FX, Summerbell R, de Hoog GS. Fungi growing on aromatic hydrocarbons:

- biotechnology's unexpected encounter with biohazard. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(1):109-30. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x>
20. Blasi B, Poyntner C, Rudavsky T, Prenafeta-Boldú FX, de Hoog GS, Tafer H, Sterflinger K. Pathogenic yet environmentally friendly? Black fungal candidates for bioremediation of pollutants. Geomicrobiol J. 2016;33(3-4):308-17. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1052118>
 21. Isola D, Selbmann L, de Hoog GS, et al. Isolation and screening of black fungi as degraders of volatile aromatic hydrocarbons. Mycopathologia. 2013;175(5-6):369-79. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9635-2>
 22. Gümrall R, Tümgör A, Saraçlı MA, Yıldırım ŞT, İlkit M, de Hoog GS. Black yeast diversity on creosoted railway sleepers changes with ambient climatic conditions. Microb Ecol. 2014;68(4):699-707. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0459-5>
 23. Döğen A, Kaplan E, Oksüz Z, Serin MS, İlkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol. 2013;51(5):493-8. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738313>
 24. Göçmen H, Özkan VK. A research on the microfungus flora of some greenhouse soils in the vicinity of Lapseki Canakkale, Turkey. Mycopathologia. 2002;153(2):103-12.
 25. Sert H, Akdeniz F. Turizmin vazgeçilmez arkeolojik eserlerde fungal korozyon: Phaselis örneği. Phaselis. 2017;3:73-80. <https://doi.org/10.18367/Pha.17004>
 26. Ergin Ç, Kaleli İ, Mete E. Turistik kaya mezarlarının iç ortam havasında küf mantarlarının dağılımı. Turk Mikrobiyol Cem Derg. 2009;39(3-4):103-7.
 27. Yılmaz SÖ. Identification of microflora in butter samples from Turkey by using microbial identification system. Asian J Chem. 2009;21(4):3257-62.
 28. Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, Cerniglia CE. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. Appl Environ Microbiol. 1997;63(10):4099-101.
 29. Jones JJ, Falkinham JO 3rd. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(7):2323-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2323-2326.2003>
 30. Hu Y, Yu X, Zhao D, Li R, Liu Y, Ge M, Hu H. Isolation of nontuberculous mycobacteria from soil using Middlebrook 7H10 agar with increased malachite green concentration. AMB Express. 2017;7:69. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0373-6>
 31. Sav H, Ozakkas F, Altınbaş R, et al. Virulence markers of opportunistic black yeast in *Exophiala*. Mycoses. 2016;59(6):343-50. <https://doi.org/10.1111/myc.12478>