

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EVLERDE KULLANILAN BUZDOLAPLARIN İÇ
HAVASINDAN İZOLE EDİLEN MİKROFUNGUSLAR
ÜZERİNDE MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR**

Soner ÖZDİL
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Danışman
Prof. Dr. Ahmet ASAN
EDİRNE 2013

**EVLERDE KULLANILAN BUZDOLAPLARIN İÇ HAVASINDAN İZOLE
EDİLEN MİKROFUNGUSLAR ÜZERİNDE MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
ÇALIŞMALAR**

SONER ÖZDİL

**YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Ahmet ASAN

2013

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....
Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı

Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Ahmet ASAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Ahmet ASAN (Danışman)

.....

Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL

.....

Yrd. Doç. Dr. Suzan SARICA ÖKTEN

.....

Tarih:/...../.....

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

10/06/2013
Soner ÖZDİL

Yüksek Lisans Tezi

Evlerde Kullanılan Buzdolapların İç Havasından İzole Edilen Mikrofunguslar Üzerinde
Morfolojik ve Moleküler Çalışmalar

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, 4 farklı evde kullanılan buzdolaplarının iç ortam havasında bulunan mikrofungusların morfolojik ve moleküler tanısı yapılarak, buzdolabı havası floradaki mikofungal çeşitliliğin tesbiti amaçlanmıştır.

Araştırma materyali Ekim, Kasım ve Aralık 2012 aylarının ilk ve son haftasında her bir istasyondan (her ay ikişer kez olmak üzere) toplam 24 kez örnekleme yapılarak elde edilmiştir. Örnek alımında mikrobiyal hava örnekleme cihazı (Millipore) kullanarak, bir örneklemede 100 L hava aspire edilmiştir. Örnekleme işleminde Dichloran Glycerol Agar (DG 18) besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar saf kültür olarak elde edilip yatık PDA besiyerine pasaj alınarak 25 °C'de 7 gün inkübe edilmiş ve daha sonra stok kültür olarak +4 °C'de saklanmıştır. Elde edilen izolatlar özelliklerine göre PDA, MEA, CYA, CY₂₀S G₂₅N, CZ, CREA, YES ve DG 18 besiyerlerine ekilmiş olup, ilgili monograflardan yararlanılarak morfolojik teşhisleri yapılmıştır. Moleküler teşhiste ise elde edilen fungal ampikonların dizi analizleri Sanger Yöntemi ile, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir ve gen bankasındaki benzer sekanslarla BLAST Analizi yapılarak kıyaslanmıştır.

Araştırmanın sonucunda teşhisi yapılan mantarların yüzdeleri dağılımları % 34 *Penicillium*, % 24 *Cladosporium*, % 17 *Alternaria*, % 11 *Aspergillus* türleri ve % 9 diğer türler olarak tespit edilmiştir.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı : 61

Anahtar Kelimeler : Havayla taşınan funguslar, ITS gen dizisi, Buzdolabı, Q-PCR, Sanger Dizileme

Msc Thesis

Morphological and molecular studies on microfungi isolated from indoor air of refrigerators used at homes

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determination of microbial diversity from indoor air flora of refrigerators used at four different homes with conventional and molecular identifications.

Research materials were obtained by taking samples twice each months from all refrigerators (totally twenty four times) at first and last weeks of October, November and December months of 2012. Microbial air sampler (Millipore) were used to take samples and 100 L air was aspirated for each sampling. Dichloran Glycerol Agar (DG 18) medium was used on the sampling process. All isolates taken like a pure culture and to incubated at 25 °C during 7 days after to passaged on slant PDA medium. After that, these pure cultures at PDA medium were stored at +4 °C as storage cultures. Conventional identifications of obtained isolates were diagnosed according to their features by using related monographs after to cultured on PDA, MEA, CYA, CY₂₀S, G₂₅N, CZ, CREA, YES and DG 18 mediums. On the molecular identification, sequence analysis of obtained fungal amplicons were determined on Sanger Method at ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, ABD) by using ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit and to compared with similar sequences on gene bank by BLAST Analysing.

As a result of this study, it was identified what 34 % *Penicillium*, 24 % *Cladosporium*, 17 % *Alternaria*, 11 % *Aspergillus* species and 9 % other species as a percentage distribution of obtained fungi izolates.

Year : 2013

Number of Pages : 61

Keywords : airborne fungi, ITS region, refrigerator, Q-PCR, Sanger Sequencing Method

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren, bilgisi ve tecrübesini benden esirgemeyen, çalışmış olduğum proje ve tezimin yürütücülüğünü üstlenen, burs almama olanak sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN'a (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Çalışmalarım süresince, gerek laboratuvarıda gerekse laboratuvar dışında beni yalnız bırakmayan ve bana sürekli destek olan, karşılaştığım tüm problemlere karşı birlikte çözüm üretmeye çalıştığımız değerli hocam Sayın Araş. Gör. Dr. Burhan ŞEN'e (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Çalışmalarım boyunca hiç bir desteğini ve yardımını benden esirgemeyen, karşılaştığım problemlerde her zaman beni motive etmeyi başaran değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Suzan SARICA ÖKTEN'e (Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ecz. Teknolojisi Bölümü),

Laboratuvar çalışmalarımıda gerektiğinde benimle birlikte saatlerce çalışan ve moleküler çalışmalarımıda bana yardımcı olan arkadaşım Elçin TÜNEY'e,

Moleküler çalışmalarımıda bana yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Dr. Mustafa KOLUKIRIK'a (Boğaziçi Üniversitesi Teknopark), Sayın Canan Ketre'ye, Sayın Dr. Melek TİKVEŞLİ'ye, arkadaşlarım Döndü GÜMÜŞKAYA ve Ayten SARI'ya,

Hayatımın her aşamasında üzerime titreyen, maddi ve manevi desteklerini benden hiç bir zaman esirgemeyen kıymetli AİLEME,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Soner ÖZDİL

İÇİNDEKİLER

DOĞRULUK BEYANI	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER ve KISALTMALAR	VII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
TABLO LİSTESİ	XI
BÖLÜM 1	
1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Funguslar, Ekolojik Özellikleri ve Yaşam Alanları	2
2.1.1. Fungus (Çoğul=Fungi).....	2
2.1.2. Mantarların Karakteristik Özellikleri	2
2.1.3. Mantarların Canlılar Arasındaki Yeri.....	5
2.1.4. Mantarların Diğer Canlılarla olan ilişkileri	6
2.2. Fungusların Gıda Mikrobiyolojisindeki Yeri Ve Önemi	6
2.2.1. Mikotoksinler.....	6
2.2.1.1. Aflatoksinler.....	6
2.2.1.2. Okratoksin A (OTA)	7
2.2.1.3. Fumonisinler	7
2.2.1.4. Trikotesenler	8
2.2.1.5. Patulin	8
2.2.1.6. Penisilik Asit	8
2.2.1.7. Sitrinin.....	8
2.2.1.8. Moniliformin	9
2.2.1.9. Ergot Alkoloidleri	9
2.2.2. Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar	9

2.3. Moleküler Sistematiik İle İlgili Bilgiler,Önemi Ve Geçerliliği.....	10
2.3.1. Fungal Sistematiik	10
2.3.2. Moleküler Sistematiikte Yaygın Olarak Kullanılan Yöntem: PCR.....	12
2.3.2.1. Yuvalanmış (Nested) PCR	13
2.3.2.2. RAPD (Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA)	13
2.3.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	13
2.3.2.4. Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	14
2.3.2.5. Demirlenmiş (Anchored) PCR.....	14
2.3.3. Funguslarda Moleküler Sistematiikte Kullanılan DNA Çeşitleri	14
2.3.3.1. rDNA Bölgesi	14
2.3.3.2. ITS ve IGS Bölgeleri (Transkripsiyonu Yapılmayan Bölgeler)	16
BÖLÜM 3	
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Metod.....	17
3.2.1. Mikrofungusların Buzdolaplarının İç Havasından izolasyonu	17
3.2.2. Mikrofungusların Morfolojik Tanısı.....	18
3.2.3. Mikrofungusların Moleküler Tanısı	19
3.2.3.1. DNA İzolasyonu	19
3.2.3.2. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR (Q-PCR)	20
3.2.3.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz	20
BÖLÜM 4	
4. SONUÇLAR	22
4.2. Tanısı Yapılan Bazı Türlerin Makroskobik ve Mikroskobik Fotoğrafları	31
BÖLÜM 5	
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
AFLP	: Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
LSU	: Büyük Alt Birim
SSU	: Küçük Alt Birim
ITS	: Internal Transcribed Spacer
IGS	: Intergenic Spacer
bp	: Base pair
L	: Litre
PDA	: Patates Dekstroz Agar
MEA	: Malt Ekstrat Agar
CYA	: Czapek Yeast Agar
YES	: Yeast Ekstrat Agar
G ₂₅ N	: % 25 Gliserol Nitrat Agar
CREA	: Creatine Sucrose Agar

CY _{20S}	: Czapek Agar with 20% Sucrose
CZ	: Czapek Dox Agar
DG-18	: Dichloran % 18 Glycerol Agar
µl	: Mikrolitre
mM	: Mikromolar
M	: Molar
mg	: Miligram
rpm	: Revolutions per minute (Dakikada devir sayısı)
v/v	: Volume/volume
CFU	: Colony-forming Unit (koloni oluşturan birim)
MI	: Maximum Identification

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Mantarların canlılar arasındaki yeri.....	5
Şekil 2.2. Fungal soy ağacı	12
Şekil 2.3. rDNA organizasyonu	15
Şekil 4.1. İzole edilen mikrofungus kolonilerinin genel dağılımı	22
Şekil 4.2. İzole edilen mikrofungus türlerinin istasyonlara göre dağılımı (CFU/m ³)....	23
Şekil 4.3. Tanısı yapılan türlerin Neighbor-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları	26
Şekil 4.4. <i>Alternaria alternata</i> ; A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B.MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü C. Mikroskopik görüntüsü (x1000)..	31
Şekil 4.5. <i>Alternaria tenuissima</i> ; A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B.MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü C. Mikroskopik görüntüsü (x1000)..	32
Şekil 4.6. <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü C. Mikroskopik görüntüsü (x1000)	33
Şekil 4.7. <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ; A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü C. Mikroskopik görüntüsü (x1000)	34
Şekil 4.8. A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü 1. <i>Cladosporium grevilleae</i> 2. <i>Cladosporium macrocarpum</i>	35
Şekil 4.9. <i>Aspergillus tubingensis</i> (7 günlük koloni görünümü); A. CYA 37 °C B. CYA C. MEA D. CY20S E. Mikroskopik görüntüsü (x400)	36

- Şekil 4.10.** *Aspergillus flavus* (7 günlük koloni görünümü); **A.** CYA 37 °C
B. CYA **C.** MEA **D.** CY20S **E.** CZ **F.** DG-18 **37**
- Şekil 4.11.** *Aspergillus niger* (7 günlük koloni görünümü); **A.** CYA 37 °C
B. CYA **C.** MEA **D.** G25N **E.** CZ **F.** DG-18 **38**
- Şekil 4.12.** *Aspergillus niveoglacus* (7 günlük koloni görünümü); CYA 37 °C'de üreme yok **A.** CYA **B.** CY20S **C.** MEA **D.** DG-18 **E.** Mikroskopik görüntüsü (x400) **39**
- Şekil 4.13.** *Penicillium griseofulvum* (7 günlük koloni görünümü); CYA 30 °C'de üreme yok **A.** CYA **B.** MEA **C.** YES **D.** CREA **E.** Mikroskopik görüntüsü (x400) ... **40**
- Şekil 4.14.** *Penicillium aurantiogriseum* (7 günlük koloni görünümü);
A. CYA 30 °C **B.** CYA **C.** MEA **D.** G25N **E.** YES **F.** CREA **41**
- Şekil 4.15.** *Penicillium pimateouiense* (7 günlük koloni görünümü);
A. CYA 30 °C **B.** CYA **C.** MEA **D.** G25N **E.** YES **F.** CREA **42**
- Şekil 4.16.** *Cochliobolus australiensis*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000) **43**
- Şekil 4.17.** *Geosmithia pallida*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü
B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000). **44**
- Şekil 4.18.** *Trichoderma longibrachiatum*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü
C. Mikroskopikgörüntüsü (x1000) **45**
- Şekil 4.19.** *Acremonium implicatum*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü
B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000). **46**
- Şekil 4.20.** **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **1.** *Lewia infectoria* **2.** *Trichotesium roseum* **47**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Mantarlar, hayvanlar ve bitkiler arasındaki bazı karakteristik özelliklerin karşılaştırılması.....	4
Tablo 2.2. Gıda intoksikasyonları	10
Tablo 3.1. Araştırma için seçilen evlerdeki buzdolaplarının iç ortam havasından materyalinin teminiyle ilgili ayrıntılar.....	17
Tablo 3.2. Isı döngüsü programı.....	21
Tablo 4.1. Karşılaştırmalı olarak morfolojik ve moleküler tanımlar	23
Tablo 4.2. Tür düzeyinde tanımlı yapılamayan türlerin BLAST Analizi sonuçları	27
Tablo 4.3. Türlerin istasyonlardaki koloni miktarları	28

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Küflerin propagüllerinin çok uzak mesafelere kadar ulaşabilmesinin en önemli etkenlerden biri hava yolu ile taşınmalarıdır. Hava küflerin gelişimleri için uygun bir ortam değildir. Ancak rüzgar sayesinde çeşitli kaynaklardan atmosfere nüfus eden küf propagülleri uzun mesafelere kadar taşınabilmektedir [1,2].

Hem iş yerlerinde hem de evlerde havayla taşınan biyolojik ajanlara maruz kalınmasının; enfeksiyon hastalıkları, akut toksik etkiler, alerji ve kanser gibi önemli halk sağlığı hastalıkları ile ilişkilendirilmesinden bu yana, iç ortam havasında bulunan mantarlara karşı olan ilgi oldukça artmış bulunmaktadır [3,4].

Mantarların gelişimi; ekşime, küflenme, bozulma, patojenik ve alerjik propagüllerin oluşumu gibi bazı gıda bozulmalarıyla sonuçlanabilmektedir. Üstelik bir çok gıda kaynaklı mantarlar mikotoksin üretir. Bu nedenle gıdalar ve yemler üzerindeki fungal üreme engellenmelidir [5,6].

Sıcaklık, mantarların gelişimi için çok önemli bir faktör olmasına rağmen, 20 °C'nin altında da *Penicillium* ve *Cladosporium* gibi soğuğu tolere edebilen (psikrotrof) mantarların üremesi mümkündür [7].

Yapılan bu çalışmada, buzdolaplarının iç ortam havasında bulunan mikrofungusların morfolojik ve moleküler tanısı yapılarak, buzdolabı havası florasındaki fungal çeşitliliğin tespiti amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Funguslar, Ekolojik Özellikleri ve Yaşam Alanları

2.1.1. Fungus (Çoğul=Fungi)

Fungi (Mantarlar), özellikle organik maddelerin biyodegradasyonu olmak üzere çevresel faaliyetlerde önemli rol oynayan, fotosentetik olmayan ve geniş dağılım gösteren eukaryotik canlılardır [8].

Mantarlar, heterotroflar içerisinde çeşitlilik gösteren ve geniş bir yer kaplayan, ağırlıklı olarak absorpsiyon yöntemiyle beslenen bir gruptur. Mantar türleri sıklıkla multinükleer hif üretirler ve hücre duvarlarında hem β -glucan hem de kitin maddelerini içerirler [9].

2.1.2. Mantarların Karakteristik Özellikleri

Tüm mantarlar eukaryotiktirler. Bir başka deyişle, mantar hücreleri bir kaç kromozom içeren membran zarıyla çevrili nükleusa ve membran zarıyla çevrili sitoplazmik organellere (mitokondri, vakuol, vs.) sahiptirler.

Mantarlar tipik olarak, uç kısımlarından uzama gösteren **hif** adı verilen filamentöz yapı sayesinde gelişirler. Hücreler zinciri dahilinde tekrarlanan hücre bölünmesi ile büyüme gösteren filamentöz organizmaların aksine (ör: yeşil algler) apikal büyüme ortaya koyarlar. Fungal hiflerin defalarca uç kısımlarından birbirleri ile birleşerek oluşturduğu ağsı yapıya ise **misel** adı verilir [10]. Ancak *Saccharomyces cerevisiae*' de olduğu gibi bazı mantar türleri (mayalar) tek hücreli olarak gelişirler.

Mantarlar heterotrof canlılardır. Hücre sentezi için karbon iskeletini ve enerji gereksinimlerini önceden meydana getirilmiş karbon kaynaklarından karşılarlar. Mantarların hücre duvarı fagositoz yoluyla besinlerin hücre içine alınımını engeller. Bu

sebepten dolayı mantarlar sadece basit absorpsiyon yoluyla hücre duvarı ve hücre zarında çözünebilen maddeleri doğrudan alır. Birçok durumda hiflerde üretilen salgı enzimleriyle depolimerizasyonu gerçekleştirerek kompleks moleküllerin daha basit moleküllere dönüşmesini sağlar.

Mantarlar genellikle hücre duvarında kitin ve glukcan (ağırlıklı olarak β -1,3 ve β -1,6 bağlarıyla oluşan glikoz polimeri) maddelerini içerir. Özellikle bazı primitif mantarlar olmak üzere bazı mantarların hücre duvarında kısa uzunluklarda selülozun varlığı da tespit edilmiştir. Ancak hücre duvarında selülozun zengin olmaması mantarları bitkilerden ayırt edici kılar.

Mantarlar karakteristik ölçüde çözünebilir karbonhidratlar ve depolanabilir bileşikler olarak mannitol, trehalose ve glikojene sahiptirler. Bu bileşikler özellikle arthropodlarda olmak üzere bazı hayvanlarda aynıdır ancak bitkilerde farklıdır.

Mantarları neredeyse tüm diğer ökaryotik canlılardan farklı kılan en önemli özellik, mantarların genellikle haploid nükleusa sahip olmalarıdır. Ancak fungal hifler her bir hifal bölümlerde genellikle bir kaç haploid nükleusa sahiptirler. Bunun yanında, bazı tomurcuklanmayla çoğalan mayalar da diploid nükleusa sahiptirler.

Mantarlar hem eşeyli hem de eşeyli olmadan çoğalabilirler ancak genellikle spor üreterek çoğalırlar. Fungal sporlar fungusun dispersal ya da dormant özelliğine göre şekil, büyüklük ve diğer özellikler bakımında geniş ölçüde farklılık gösterirler [11].

Mantarlar, hayvanlar ve bitkiler arasındaki bazı karakteristik özellikler Tablo 2.1'de özet olarak gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Funguslar, hayvanlar ve bitkiler arasındaki bazı karakteristik özelliklerin karşılaştırılması [11]

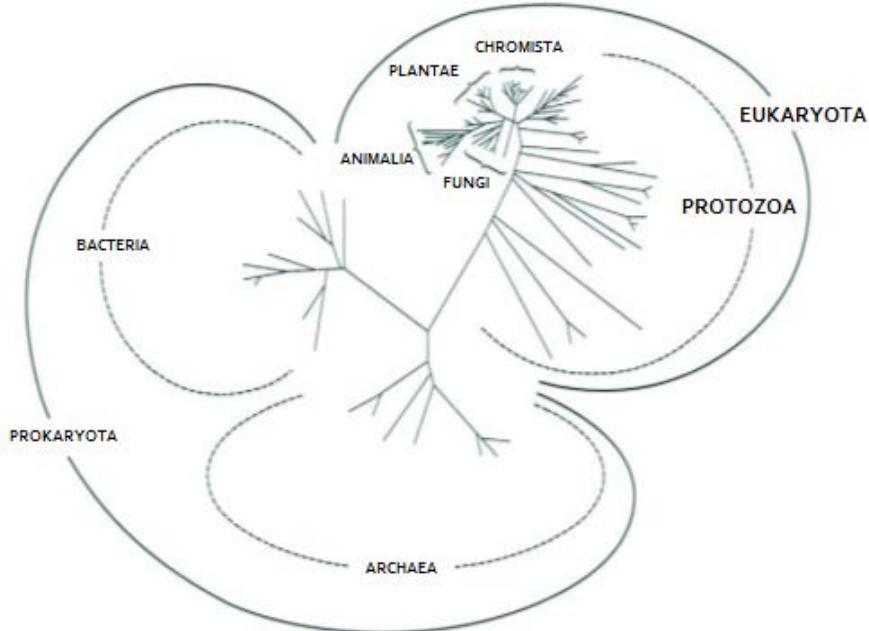
<i>Özellik</i>	<i>Funguslar</i>	<i>Hayvanlar</i>	<i>Bitkiler</i>
Gelişme şekli	Hifal büyüme ya da mayalarda tomurcuklanma	Hifal değil	Çok hücreli doku
Beslenme	Heterotrofik, çözünebilir besinlerin absorpsiyonu	Heterotrofik, yutarak beslenme	Fotosentetik
Hücre duvarı	Genellikle kitin içerir	Yok. Fakat bazı böcek egzoiskeletinde kitin bulunur	Yaygın olarak selüloz
Nukleus	Genellikle haploid; nükleer membran bölünme boyunca varlığını sürdürür.	Genellikle diploid; nükleer bölünme sırasında membran parçalanır	Diploid; nükleer bölünme sırasında membran parçalanır
Histon Proteinleri	Histon 2B	Histon 2B	Bitki histonları
Mikrotübüller	Benzimidazol ve griseofulvine karşı duyarlı	Kolhisine karşı duyarlı	Kolhisine karşı duyarlı
Lysine sentezi	AAA metabolik yolu tarafından sentezlenir	Sentezlenmez, dışardan alınması gerekir	DAP metabolik yolu tarafında sentezlenir
Golgi cisimciği	Kümelenmemiş, tübüler	Kümelenmiş, plaka gibi	Kümelenmiş, plaka gibi
Mitokondri	Plaka veya disk şeklinde	Plaka veya disk şeklinde	Tübüler
Yer değiştirebilir karbonhidratlar	Polioller(mannitol, arabitol, vs.)	Böceklerde trehaloz	Glikoz, fruktoz, sükroz
Depolanabilir bileşikler	Glikojen, lipidler, trehaloz	Glikojen, lipidler, bazılarında trehaloz	Nişasta
Mitokondrial kodon kullanımı	Triptofan için UGA	Triptofan için UGA	Zincirin sonlanması için UGA
Membran Steroidleri	Ergosterol	Kolesterol	Sitosterol ve diğer bitki steroidleri

2.1.3. Mantarların Canlılar Arasındaki Yeri

Yaklaşık olarak 1,5 milyon kadar mantar türünün varlığı düşünülmesine rağmen, sadece 80.000 ilâ 120.000 arasında mantar türü tanımlanabilmiştir [9, 12]. 1960'lı yılların sonuna kadar mantarlar bitkiler olarak sınıflandırılmıştır. Fakat daha sonraki laboratuvar çalışmaları mantarları bitkilerden ayıran en az dört farklı özellik olduğunu ortaya koymuştur:

- Bitkiler klorofil pigmentine sahip olmasına rağmen, mantarlar bu pigmente sahip değildir.
- Mantarların hücre duvarı kitin adı verilen karbonhidrat maddesini içerirken, bitkilerin hücre duvarında selüloz bulunur.
- Mantarların büyük bir çoğunlu bitkilerde olduğu gibi multiselüler değil, üniselülerdir.
- Mantarlar heterotrofik canlılar olmasına rağmen, bitkilerin büyük bir çoğunluğu ototroftirler.

Bu temel sebeplere dayanarak, mantarlar soy ağacındaki *Eukarya* domaini içinde yer alan ve "Fungi" olarak isimlendirilen kendilerine ait farklı bir aleme yerleştirilmişlerdir [13] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mantarların canlılar arasındaki yeri [14]

2.1.4. Mantarların Diğer Canlılarla Olan İlişkileri

Mantarlar ve algler tarafından meydana getirilen simbiyotik beraberliğe **liken** adı verilir. Likenler; rutubetli yerleri severler, kayalar ve ağaç kabuklarında gelişirler. Mantar ve alg birlikteliğinde (liken), mantarlar su ve suda çözülmüş besinlerin alınması, algler ise fotosentez yolu ile besin üretimini sağlarlar. Likenler hava kirliliği olduğu yerlerde canlılıklarını sürdürmezler bu nedenle biyoindikatör olarak düşünülürler.

İleri organizasyonlu bitkilerin kökleri ile mantarların simbiyotik ilişki içinde yaşadığı birlikteliğe **mikoriza** adı verilir. Bu tip simbiyotik yaşamda, mantar hifleri ağaç kökçüğünü manto gibi sarar, kökçükler kısa ve küt kalır, miseller kökçüğün su ve mineral alma görevini üstlenir. Bitki de mantar için besin üretir ve mantar bu üretilen besinleri hazır besin olarak alır.

Bitki, hayvan ve insan gibi ilişki içinde olduğu canlının zarar gördüğü, mantarın tek taraflı yarar sağladığı ilişkiye ise **parazitik (asalak)** ilişki denir [15].

2.2. Fungusların Gıda Mikrobiyolojisindeki Yeri ve Önemi

2.2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, filamentöz mikrofunguslar tarafından üretilen, omurgalı hayvanlar tarafından sindirim, solunum ve absorpsiyon gibi doğal yollarla alınması sonucunda çeşitli hastalıklara sebep olan sekonder metabolitlerdir [16].

Mantarların tamamı sekonder metabolit üretirler. Ancak neyse ki bunların sadece bir kısmı omurgalılar için toksik etki gösterir. Bazı mikotoksinler akut olarak, bazıları kronik olarak, bazıları ise hem akut hem de kronik olarak toksik etki gösterirler. Ayrıca mikotoksinlerin birleşerek sinerjik etki göstermesi de mümkündür. Bu da farklı sekonder metabolit türlerinin mikrobiyolojik açıdan incelenmesini farklı bir boyuta taşır ve önemli kılar [17].

2.2.1.1. Aflatoksinler

Aflatoksin, insanlar da dahil olmak üzere tüm omurgalı hayvanlar üzerinde en etkili kanserojenik etkiye sahip olan doğal bileşik olarak bilinmektedir. Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ en yaygın olarak üretilen bileşiklerdir. Ancak, örneğin süt içerisinde, M₁, M₂ gibi biyotransformasyona uğrayan aflatoksinler de meydana gelebilir [18].

Aspergillus flavus (Link, 1867) tropikal ülkelerdeki bir çok gıdada aflatoksin üreten en yaygın türdür. *A.flavus* türü mısır, yer fıstığı ve pamuk üzerinde yaygın olarak görülür ve sadece aflatoksin B üretir [19]. *A.flavus* türüne fenotipik olarak oldukça benzeyen *A. nomius* (Kurtzman et al., 1987), *A. zhaoqingensis* (Sun ve Qi, 1991) ve *A. bombycis* (Peterson et al., 2001) türleri B ve G tipi aflatoksinleri üretirler. Fakat aralarındaki yakınlık derecelerinin saptanması için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

A. parasiticus (Spear, 1912) yer fıstığında yaygın olarak görülür. Diğer gıdalarda oldukça nadir olarak rastlanır. *A.flavus* ile karşılaştırıldığında, coğrafi olarak daha sınırlı alanda görülür. *A. parasiticus* hem aflatoksin B hem de aflotoksin G üretir bilenen tüm isolatları toksijeniktir [19].

Aflotoksin üretiminde etkin olan bir diğer tür de *A. pseudotamarii*'dir (Ito et al., 2001). Aflatoksin B ve aflatoksin G üretir. *A. pseudotamarii* türüne oldukça yakın bir tür olan *A.tamarii*'nin (Kita, 1913), bazı kaynaklarda aflatoksin ürettiği iddia edilmesine rağmen aflatoksin üretememektedir [20, 21].

2.2.1.2. Okratoksin A (OTA)

Okratoksin A'nın insanlar üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, test edilen bütün hayvan türlerinde nefrotoksijenik etkiye neden olduğu görülmüştür. Muhtemel insan karsinojeni (sınıf 2B) olarak listelenmiştir.

Başlıca OTA üreten mikrofungusları; *Aspergillus* section *Flavi*, *Circumdati* ve *Nigri* ve *Penicillium* section *Verrucosa* olduğu tespit edilmiştir. [22, 23, 24].

Aspergillus ochraceus (G. Wilh, 1877) ve *A.westerdijkiae* (Frisvad ve Samson, 2004) türlerinin çok fazla miktarda OTA ürettikleri görülmüştür. Bu türler kahve ve depo edilen tahıllarda görülmektedir [23].

P. verrucosum (Dierckx, 1901) depolanan tahıllarda meydana gelen ve OTA üreten en önemli türdür [25].

2.2.1.3. Fumonisinler

Fusarium verticillioides (Nirenberg, 1976) ve *F. proliferatum* (Nirenberg, 1976) türleri mısırlardaki en önemli fumonisin kaynağıdır. Darı, sorgum ve pirinç üzerinde gelişen ve fumonisin üreten diğer türler ise; *F. nygamai* (L.W. Burgess ve

Trimboli, 1986), *F. napiforme* (Marasas ve ark., 1988), *F. thapsinum* (Klittich ve ark., 1997), *F. anthophilum* (Wollenw, 1916) ve *F. dlaminii* (Marasas ve ark., 1988) türleridir [26].

2.2.1.4. Trikotesenler

200'den fazla trikotesen tanımlanmıştır ve makrosiklik olmayan mikotoksinler en önemli olanlardır. Trikotesenlerin, hayvanlarda kusma, iştahsızlık ve ishal gibi tipik hematotoksik ve immünosupresif belirtileri vardır. Avrupa Birliği çalışma grubu tarafından yayınlanan rapor ile gıdalarda varlığı kamuoyuna duyurulmuştur. *Fusarium nivale* (Ces. ex Berl. ve Voglino, 1886) (Fusarenon); *F. tricinctum* ((Corda) Sacc., 1886) (Nivalenol); *Trichotesium roseum* (Lakshmikanth, 1990) (Tricatheum); *Trichoderma viride* (Pers. 1794) (Trichodermin) trikotesen üreten bazı önemli mikrofungus türleridir [27].

2.2.1.5. Patulin

Patulin genel olarak hem prokaryotlar hem de eukaryotlarda aşırı toksik etki gösterir fakat insanlardaki toksitesisi kesin olarak ispatlanmamıştır. *Penicillium expansum* (Link, 1809) şimdiye kadar tespit edilen en önemli patulin kaynağıdır [28].

2.2.1.6. Penisilik Asit

Penisilik asit üreten en önemli türler; *Penicillium puberulum* (Bainier, 1907) ve *Aspergillus ochraceus* türleridir. Penisilik asitin biyolojik etkileri patulin ile aynıdır. Karaciğer ve mide kanserine yol açtığı bilinmektedir. Buğday, yulaf, peynir ve kahve çekirdekleri toksin kaynağı olarak bildirilmiştir [29].

2.2.1.7. Sitrinin

Sitrinin hayvanlarda nöropatiye neden olan bir nörotoksindir. *Penicillium citrinum* (Thom, 1910), *P. viridicatum* (Westling, 1911) ve bazı bir kaç *Aspergillus* türleri tarafından üretilir. Sitrininin en önemli kaynağı; pirinç, küflü ekmek, jambon, buğday, yulaf, çavdar ve arpadır [29].

2.2.1.8. Moniliformin

Moniliformin, memelilerde ve kümes hayvanlarında protein ve enzim sentezini inhibe eden, kromozomların zarar görmesine neden olan ve kalp yetmezliğini indükleyen sitotoksik bir metabolittir [30].

Mısırdaki *Fusarium proliferatum* ve *F. subglutinans* (Nelson ve ark., 1983) türleri, darı ve pirinçte ise *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. verticillioides* (Nirenberg, 1976) ve *F. thapsinum* türleri moniliformin üreten en önemli türlerdir [31].

2.2.1.9. Ergot Alkoloidleri

Ergot alkoloidleri, *Claviceps* türlerinin sklerotialarında yaygın olarak görülür, Çavdar ekmeği üretiminde kullanılan çavdarların büyük bir kısmında sıklıkla meydana gelir. Bu sklerotialar çavdarın öğütülmesi sırasında ortamdan uzaklaştırılır. *Claviceps purpurea* (Tul, 1853), *C. fusiformis* (Loveless, 1967) ve *C. paspali* (Stevens ve Hall, 1910) en önemli ergot alkoloidleri kaynağıdır [32].

2.2.2. Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar

Tüketilen besinlerde patojen bir mikroorganizmanın ya da onun ürettiği toksinin bulunması sebebiyle meydana gelen hastalıklara "gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar" denir. Eğer hastalık patojen mikroorganizmanın gıda ile birlikte vücuda alınması sonucu meydana geliyorsa, hastalığa "gıda kaynaklı enfeksiyon"; eğer hastalık patojen mikroorganizmanın vücuda alınması sebebiyle değil de mikroorganizmanın salgılamış olduğu toksinin alınması sonucu meydana geliyorsa "gıda kaynaklı intoksikasyon" adı verilir. (Tablo 2.2) [33].

Tablo 2.2. Gıda intoksikasyonları [33].

Gıda İntoksikasyonları		
Organizma Adı	Hastalık	Tehlike Derecesi
<i>Aspergillus flavus</i> ¹	Aflatoksikozis	Yüksek
<i>A. parasiticus</i> ¹	Aflatoksikozis	Yüksek
<i>Penicillium citreoviride</i> ² (Biourge, 1923)	Cardiac-beriberi	Yüksek
<i>P. citreoviride</i> ² (Biourge, 1923)	Cardiac-beriberi	Yüksek
<i>A. ochraceus</i> ³	Okratoksikozis (Balkan nefropati)	Yüksek
<i>P. viridicatum</i> ³	Karsinogenesis	Yüksek
<i>P. patulum</i> ⁴ (Bainer, 1906)	Karsinogenesis	Yüksek
<i>P. expansum</i> ⁴	Karaciğer toksikasyonu	Yüksek
<i>Fusarium graminearum</i> ⁵ (Schwabe, 1839)	Alimentary toksik aleukia	Düşük
<i>F. roseum</i> ⁵ (Link, 1809)	Yellow rice disease	Düşük
<i>F. poae</i> ⁵ (Wollenw, 1913)	Akut toksikosis	Düşük
<i>A. versicolor</i> ⁶	Karsinogenesis	Orta
<i>A. nidulans</i> ⁶ (Winter, 1884)	Karsinogenesis	Orta
<i>F. graminearum</i> ⁷	Estrojenik sendrom	Yüksek

1:Aflatoksinler, 2:Sitroviridin, 3:Okratoksinler, 4:Patulin, 5:Trikotesenler, 6:Sterigmatosistin, 7:Zearalenon

2.3. Moleküler Sistematik İle İlgili Bilgiler, Önemi ve Geçerliliği

Mantarlarla ilgili yeterli doküman olmadığından dolayı kingdom içerisindeki filogenetik ilişkileri henüz tam olarak anlayamamıştır. Ancak son dönemde yapılan çalışmalar mantarların evrimsel tarihine ışık tutmaktadır [34, 35]. Genel olarak mantarların sınıflandırılması, başlıca spor taşıyan yapılar ile ilişki içerisinde olarak; morfolojik, kimyasal ve anatomik karakterler baz alınarak yapılır. Oysa ki, moleküler yaklaşımlar tekrarlanabilir evrim özelliği yaklaşımını ortaya koyar ve böylece bu geleneksel sınıflandırmalar içinde ortaya çıkan yapay grupları ortadan kaldırır. Bu nedenle moleküler veriler mantarlar arasındaki ilişkilerin daha iyi anlaşılabilmesine ve sınıflandırmanın daha doğal bir biçimde yapılmasına olarak sağlamaktadır [36].

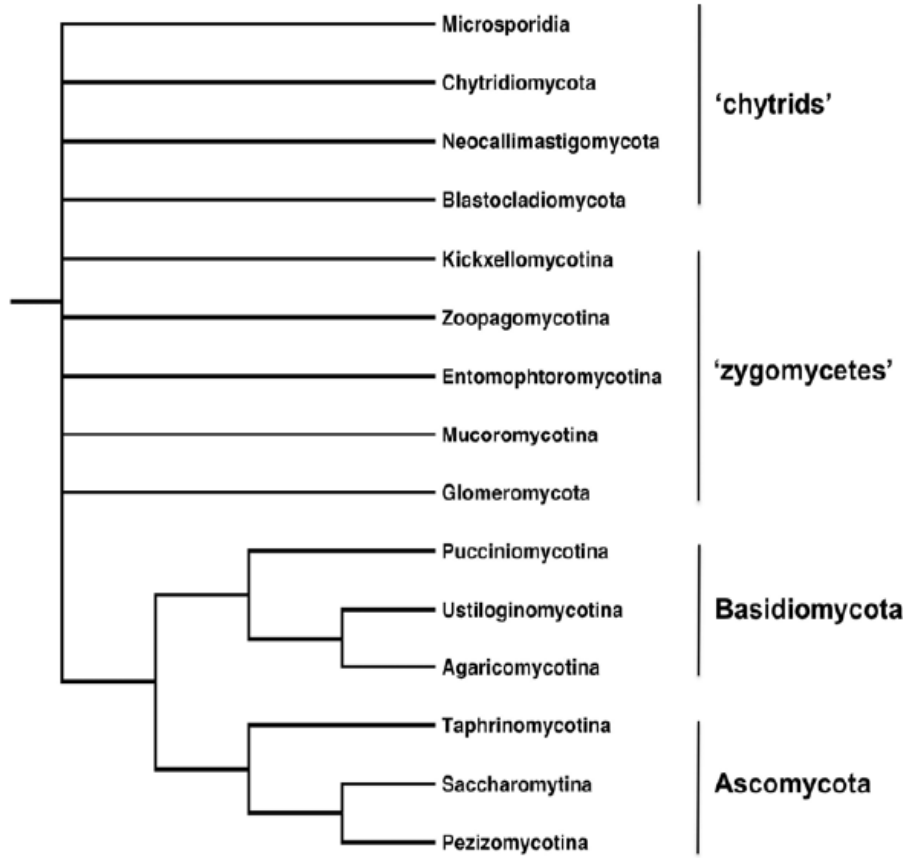
2.3.1. Fungal Sistematik

Fungi alemi içinde yer alan organizmada hem eşeyli hem de eşeysiz üreme evreleri görülmektedir. Mantarların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriter, eşeyli

üreme evresi sırasında oluşturdukları üreme yapılarıdır. Fakat eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında meydana geldiği için bazı fungusların eşeyli üreme evrelerinin tamamen ortadan kalktığı düşünülebilir ya da bu yapılar henüz tam olarak tanımlanamamış olabilir. Bu sebepten dolayı funguslar günümüzde iki şekilde sınıflandırılmaktadır: Fungusların yaşam döngülerinin eşeyli üreme evrelerinde oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları baz alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma şekli olan "teleomorfik" sınıflandırma ve eşeyli üreme yapıları tespit edilemediği için, fungusların tallus yapıları ve eşeysiz sporları baz alınarak yapılan sınıflandırma biçimi olan "anamorfik" sınıflandırmalardır. Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin dezavantajı; gözlemlere dayalı olması, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının yüksek olmasıdır. Bu belirsizlik, bazı fungusların sınıflandırılmasında bir çok kez aynı taksonun iki farklı şekilde adlandırılmasına ve hatta farklı organizmalara aynı ismin verilmesine sebebiyet vermektedir. Örneğin mayaların taksonomisinde en önemli kaynaklardan biri kabul edilen Lodder ve Kreger van Rij (1952) literatürüne göre, *Saitoella complicata* olarak tanımlanmış 2 maya izolatu (Himalayalardan izole edilen) daha sonra yapılan bir takım moleküler çalışmalar sonucunda tanımlanan türün morfolojik benzerliğine rağmen bu iki izolatu farklı türler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yamazaki ve Komagata (1981)'in çalışmasına kadar önceki tanılamadan hiç kimse şüphe duymamıştır. Literatürde, fenotipe dayalı hatalı tanı konusunda oldukça fazla çalışma vardır. Bu tür karışıklıkların önüne geçilmesi için günümüzde güvenilirliğinden dolayı moleküler yöntemler tercih edilmeye başlamıştır. Moleküler yöntemlerde ağırlıklı olarak kullanılan molekül DNA'dır. DNA molekülleri evrimsel değişikliğin ilk olarak yansıdığı moleküller olduğu için moleküler araştırmalar daha güvenilir ve hızlı sonuçlara ulaşmamızı sağlayabilmektedir [37].

Son yıllarda mikoloji toplulukları fungal sistematüğün gelişmesi amacıyla büyük yatırımlar yapmaktadır. İki Ulusal Bilim Vakfı (NSF); "Deep Hypha Research Coordination Network ve the Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL1)" projeleriyle bu konuya katkı sağlamak için çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalar, mikoloji topluluğu ile tüm mantar gruplarına ait yaklaşık 1500 türün moleküler jenerasyon verileri (7 nesil için) arasında bilgi paylaşımına olanak sağlamıştır [36]. Bu

sonuç, bugüne kadar kanıtlanan, monofiletik gruplar baz alınarak yapılan kingdom fungusdaki en kapsamlı sınıflandırma olmuştur [35]. (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Fungal soy ağacı [35].

Yapılan fungal soy ağacı genel olarak mikologlar tarafından çalışılan Oomycetes ve cıvık mantarlar gibi non-fungal grupları değil, sadece gerçek mantarları içermektedir. Bu soy ağacında aynı zamanda; microsporidians (yüksek oranda genom ve mitokondriyi indirgeyen uniselüler, obligat endoparazitik organizmalar), bazı chytrids (kamçılı mantar) nesilleri ve Zygomycetes grupları da bulunmaktadır [35].

2.3.2. Moleküler Sistematiğe Yaygın Olarak Kullanılan Yöntem: PCR

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), tek iplikli DNA'yı kalıp olarak deoksiribonükleotitleri substrat olarak kullanan DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir. DNA polimeraz bütün diğer polimerazlarda olduğu gibi, 5'→3' yönünde sentez yapar ve sentezi başlatabilmesi için 3'-OH grubuna mutlak gereksinim duyar. Enzimin senteze başlaması için gerekli olan bu 3'-OH grubunu PCR'da kullanılan

oligonükleotitler (primerler), sağlar. Kısaca, kalıp DNA, DNA polimeraz, deoksiribonükleotitler ve oligonükleotitlerin bulunduğu bir solüsyon, uygun koşullar sağlandığında, primerler kalıp DNA üzerinde kendilerini komplementer olan bölgelerle eşleyerek enzimin senteze başlamasında başlatıcı görev yaparlar. Daha sonra DNA polimeraz, primerlerin ucuna serbest deoksiribonükleotitleri ekleyerek komplementer DNA ipliğini sentezler [38].

2.3.2.1. Yuvalanmış (Nested) PCR

Yuvalanmış (Nested) PCR, çoğaltılması istenmeyen ürünlerin oluşumunu engelleyen, hassasiyeti yüksek olan bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde art arda iki PCR yapılır. İlk PCR sonucunda istenmeyen ürünler meydana gelir. İkinci PCR ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren "nested" primerleri kullanılarak yapılır. İlk PCR sonucunda oluşan ürünler ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve çoğaltılmak istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilir. Bu nedenle nested PCR doğru ürünlerin çoğaltılması için uygun bir PCR yöntemidir. [39].

2.3.2.2. RAPD (Rastgele Amplifiye Olmuş Polimorfik DNA)

RAPD yönteminin en büyük avantajı DNA dizisinin bilinmesinin gerekli olmamasıdır. Bundan dolayı herhangi bir rastgele primer herhangi bir fungal DNA bölgesini amplifiye etmek için kullanılabilir. RAPD primerleri deneysel olarak seçilebilir ve çalışılan taksonlar arasında polimorfik olan RAPD bantlanma modelini bulmak için deneysel olarak test edilebilir. RAPD yöntemi fungusların ayırt edilmesinde, tür içi ve türler arası düzeyde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [37].

2.3.2.3. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), farklı organizmalara ait aynı ya da homolog olan DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi esasına dayanır ve kıyaslama amacıyla kullanılır. DNA parçaları agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde büyüklüklerine göre ayrılır. Uygun bir boyama tekniğiyle jeldeki DNA görünür hale getirilir. Genellikle jellerdeki örneklerin transferi nitro-selüloz veya naylon membranlar üzerine yapılır. Jelin alkali ortamda ısıtılmasıyla DNA parçaları denatüre edilir ve nitro-selüloz zar üzerine transfer edilerek radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA

probenun bulunduğu solüsyona daldırılır. Parçalarla probun hibridizasyonu otoradyografi ile açığa çıkartılır [40, 41].

2.3.2.4. Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

Yapılan son çalışmalarda, çeşitli organizmalar arasındaki polimorfizmi değerlendirmek için AFLP yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem funguslarda tür içi ve türler arası genetik varyasyonu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. AFLP RAPD'e göre, her bir reaksiyonun çözünürlük seviyesi ve tekrarlanabilirliği açısından daha avantajlıdır. Ayrıca AFLP yöntemi özellikle tür düzeyindeki bir çok fungus arasındaki varyasyonların belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. [42].

2.3.2.5. Demirlenmiş (Anchored) PCR

Demirlenmiş (Anchored) PCR, çoğaltılması istenen DNA'nın sadece bir bölgesinin (primerin bağlanacağı bölge) bilinmesi durumlarda uygulanır. Bu yöntemin amacı, bilinen bölgeden yararlanılarak ilgilenilen DNA parçasının çoğaltılmasıdır. Bu amaçla çoğaltılacak DNA bilinen bir diziyeye bağlanır ve bilinen dizi 2. primer bölgesi olarak kullanılır.

Çoğaltılması istenen DNA'nın bir vektöre klonlanması, Anchored PCR için kullanılan temel yöntemlerden biridir. Anchor dizi ligasyon ile standart bir vektöre bağlanır ve böylece ikinci primer bağlanma dizisini sağlamış olur. Bunun sonucunda biri bilinen dizi, diğeri ise hemen yanında çoğaltılacak DNA'nın yerleştirildiği vektöre ait dizi olmak üzere iki primerle PCR gerçekleştirilir [39].

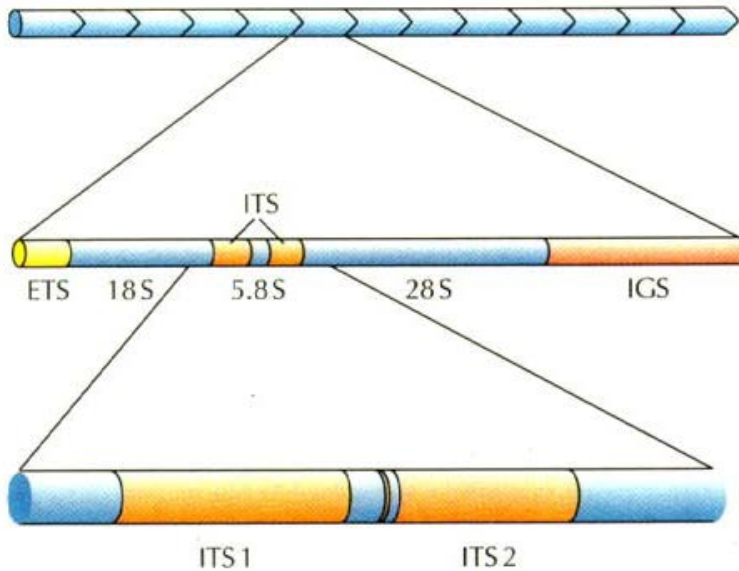
2.3.3. Fungusların Moleküler Sistematığında Kullanılan DNA Çeşitleri

2.3.3.1. rDNA Bölgesi

Tüm organizmalarda ortak bir özellik olarak protein sentezinin çok uzun yıllardan bu yana devam ediyor olması, organizmalar arasındaki evrimsel ilişkinin ayırt edilebilmesinde rRNA'ları elverişli moleküller haline getirmektedir. rRNA eski, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yayılış gösteren (yaygın), bunun yanında filogenetik farkı ölçülü bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. Ayrıca rRNA'nın büyük bir molekül olmasından dolayı olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik yakınlığı ortaya koymaktadır. rRNA dizi analizlerinin

sonucunda çizilen filogenetik ağaçlar, organizmalar arasındaki doğru evrimsel ilişkileri yansıtır [43].

rRNA genleri tarafından kodlanan DNA dizileri, fungusların taksonomik ilişkilerini ve genetik varyasyonlarını belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Funguslarda nükleus, ardışık olarak tekrarlayan rDNA birimleri olarak organize olmuştur. rRNA gen kümesi nükleusta ve mitokondride bulunmakta olup, hem korunmuş hem de değişken gen bölgelerini içermektedir. Fungal nükleus rRNA genleri, her genomda birkaç yüz kopyası olan ve ardışık tekrarlanan yapılar olarak düzenlenmiştir. Her bir birimde küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.) olmak üzere üç farklı rRNA geni bulunmaktadır. (Şekil 2.3). Gen kümesinin sonunda yer alan 5S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir ya da 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 bir çok taksonomik çalışmada kullanılmaktadır. Funguslarda 18S rDNA bölgesi nisbeten yavaş bir şekilde evrim geçirmesi sebebiyle uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında elverişlidir. Ancak kodlanmayan bölge olan ITS ve IGS, daha hızlı evrim geçirdiği için bir tür içindeki suşların ya da bir cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılmasında elverişlidir. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri de türler arasında değişkenlik gösterir [37].



Şekil 2.3. rDNA organizasyonu [44]

2.3.3.2. ITS ve IGS Bölgeleri (Transkripsiyonu Yapılmayan Bölgeler)

Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgelerden, transkripsiyonu yapılmayan bölge ITS, genler arası bölge ise IGS olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgeler alt birim dizilerine göre daha değişkendir ve tek bir cins içindeki türler arasındaki veya tür içi populasyonlar arasındaki çalışmalarda yüksek ölçüde kullanılmaktadır.

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır (Şekil 2.3). ITS bölgesinin karakterizasyon çalışmaları için kullanışlı olması özellikle şu 4 temele dayanır:

1. ITS bölgesi nispeten küçüktür (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir.
2. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik ya da oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir.
3. Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı ITS RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.
4. ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir. Bir çok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir.

ITS bölgesinin aksine, IGS bölgesi üzerine çalışmalar daha azdır. Her ne kadar ITS bölgesi kadar yoğun çalışılan bir bölge olmasa da, bu bölgenin de en azından çalışılan fungal türler için ayırt edici olduğu tesbit edilmiştir [37].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırma materyali, 4 farklı evde kullanılan buzdolaplarının iç ortam havasından Tablo 3.1’de belirtilen şekilde, Ekim 2012, Kasım 2012 ve Aralık 2012 aylarının ilk haftasında ve son haftasında, her ay 2’şer kez (her bir istasyondan) olmak üzere toplam 24 kez örnekleme yapılarak temin edilmiştir.

Tablo 3. 1. Araştırma için seçilen evlerdeki buzdolaplarının iç ortam havasından materyalinin teminiyle ilgili ayrıntılar

İstasyon	Örnek Zamanı ve Aspire Edilecek Hava Miktarı (L)			Toplam(L)
	Ekim 2012	Kasım 2012	Aralık 2012	
1. Ev	200	200	200	600
2. Ev	200	200	200	600
3. Ev	200	200	200	600
4. Ev	200	200	200	600
TOPLAM (L)	800	800	800	2400

3.2. Metod

3.2.1. Mikrofungusların Buzdolaplarının İç Havasından İzolasyonu

Araştırmada seçilen evlerdeki buzdolaplarının iç ortam havasından Tablo 3.1.’de belirtilen şekilde, mikrobiyal hava örnekleme cihazı (Millipore) kullanarak, bir örneklemede 100 L olmak üzere hava aspire edilmiştir. Örnekleme işleminde Dichloran Glycerol Agar (DG 18) besiyerleri kullanılmış ve örnek alma işleminden sonra laboratuvar ortamına getirilerek 25 °C’lik etüvde inkübe edilmiştir. Gelişen mikrofungus kolonilerinden tek spor izolasyonu [45] yapılarak saf kültür elde edilip,

izolatlar yatkı PDA besiyerine pasajlanarak +4 C’de saklanmıştır. DG 18 besiyerinin içerisinde, petri plağı içerisinde gelişmekte olan mikrofungus kolonilerinin çok fazla yayılmalarını inhibe eden Dichloran maddesi ile bakterilerin gelişmelerini inhibe eden Chloramphenicol ve Chlortetracycline antibiyotikleri bulunur [46]. Dichloran maddesi, Rose Bengal Agar’daki Rose Bengal Boyası’yla aynı fonksiyonu yerine getirir.

3.2.2. Mikrofungusların Morfolojik Tanısı

İzole edilen *Dematiaceous*, *Hyphomycetes* grubuna ait mikrofunguslar, tüplerdeki stok kültürlerden PDA ve MEA besiyerlerine ekilmiştir. Bu grup mikrofungusların tanısı için, Ellis’in (1971) “*Dematiaceous Hyphomycetes*” [47] adlı eseri, *Alternaria* türlerinin tanısı için Simmons’un (2007) “*Alternaria an identification manual*” [48] adlı eseri ve *Cladosporium* türlerinin tanısı için Crous ve Ark. (2007)’nın “*The Genus Cladosporium and similar Dematiaceous Hyphomycetes*” [49] adlı eserleri kullanılmıştır. *Penicillium* cinsine ait türlerin tanımlanması için CYA, YES, G₂₅N, CREA Agar ve MEA besiyerleri [50, 51] kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plaklardaki kolonilerin makroskopik olarak büyüklüğü (mm cinsinden), şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı araştırılmış ve mikroskopik özellikleri de ışık mikroskopunda incelenmiştir. Bu cinsin tür tanısında; Pitt’in “*The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces* (1979)” [50] ve “*A Laboratory Guide To Common Penicillium Species* (2000)” [51] adlı eserleri, Samson ve Pitt (2000)’in “*Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*” [52] adlı eseri (Bu eser gerçek manada bir manual olmamasına rağmen taksonomi açısından değerli bilgiler içermektedir) ve Samson Ark. (2002)’nin “*Intoduction to Food-and Airborne Fungi*” [53] adlı eserinden faydalanılmıştır. *Aspergillus* türlerinin tanısı için CYA, CY₂₀S, CZ, DG-18 ve MEA besiyerleri kullanılmıştır ve Raper & Fennel’in (1965)’in “*The Genus Aspergillus*” [54] adlı eseri ile Klich’in (2002) “*Identification of common Aspergillus Species*” [55] adlı eserinden ve CBS-KNAW’in yayınladığı yayınlardan (Samson ve Ark. 2011) faydalanılmıştır. Ayrıca *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin tanısında Samson ve Ark. (2010)’nın “*Food and Indoor Fungi*” [46] adlı eserinden de faydalanılmıştır. Mikrofunguslar cins seviyesinde, Barnett ve Hunter’ın (1999) “*Illustrated genera of imperfect fungi*” [56] eseri ve Hasenekoğlu’nun (1991) “*Toprak Mikrofungusları*” [57]

kullanılarak tanısı yapılmıştır. Mikrofungusların besiyerlerinde inkübasyon sonrası ışık mikroskopunda inceleme yapılabilmesi için inceleme ortamı olarak Lakto pamuk mavisi (Lacto-Cotton Blue – LCB- Mounting Medium [58]) kullanılmıştır.

3.2.3. Mikrofungusların Moleküler Tanısı

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy Fungal DNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Bir mikrofüj tüpüne 600 µl Parçalama Tamponu (% 2 CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) eklenmiş, daha sonra katı besiyerinden alınan yaklaşık 200 mg mikrobiyal sürüntü numunesi tamponun içine bırakılmıştır.
2. Numunenin homojenizatörde 2 dk, 6000 rpm'de homojenizasyonundan sonra 95 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
3. Tüp 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar Bağlama Tamponu (6.75M Guanidinium thiocyanate, 15 mM Tris-Cl pH 8.0) eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır.
4. Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 14000 rpm de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.
5. Kolona 500 µl İnhibitör Eleme Tamponu (5 M thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6, %40 EtOH) eklenmiş, 14000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır.
6. Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; % 80 v/v Ethanol) eklenmiş, 14000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır.
7. Kolun 14000 rpm de 1 dk boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir.
8. Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Fungal Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Primerlerin tercihi için literatür taraması yapılmıştır ve bunun sonucunda kite Conrad vd. (2012) [59] tarafından tanımlanan, 18S rRNA'nın 3' ucu kısmi dizisi, ITS1, 5.8S rRNA ve ITS2 bölgesinin tümü ve 28S rRNA'nın 5'ucu kısmi dizisi bölgesini hedefleyen ileri 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ve geri 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' primerleri dahil edilmiştir. Bütün reaksiyonlarda Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x SybrGreen-I, 5 ng/μl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmış Tablo 3.2'deki ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları Roche LightCycler NanoSoftware 1.0'da analiz edilmiştir.

3.2.3.3. Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Elde edilen Fungal ampliconların dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir. Dizi analizi için Bioeksen firmasından hizmet alınmıştır. Her bir fungal örnek için elde edilen diziler Finch programıyla analiz edilmiştir. Elde edilen dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir. DNA data bankasındaki mevcut dizilere % 97 ve üzeri benzerlik gösteren diziler, benzer dizilime sahip organizma ile aynı tür olarak kabul edilmiştir. % 70-97 arasında benzerlik gösteren türler ise, hem morfolojik özellikleri hem de ITS bölgelerinin en çok benzediği organizma göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen diziler ClustalW yazılımı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) kullanılarak birbirleriyle karşılaştırılmış, hizalanmış ve ardından manuel ayarlama yapılmıştır. Analizde sadece açıkça uyumlu baz pozisyonları kullanılmıştır. Yapılan dizi karşılaştırmalarına dayanan filogenetik ağaçların çizimi için MEGA yazılımı (<http://www.megasoftware.net/>) kullanılmıştır. Filogenetik ağaçlar neighbor-joining (1000 bootstrap) algoritmasına göre çizilmiştir.

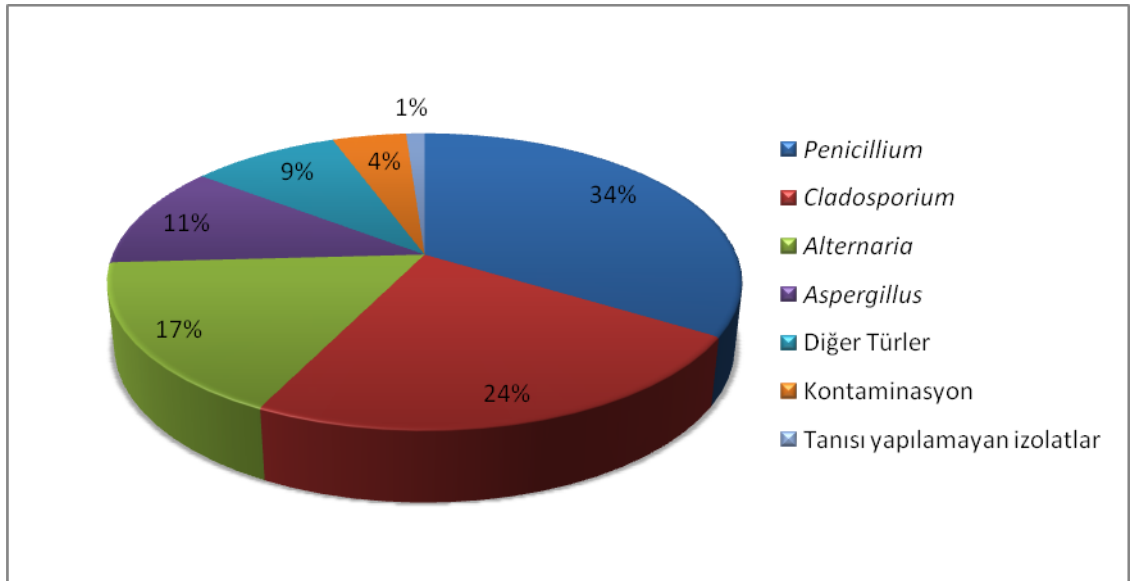
Tablo 3.2. Isı döngüsü programı

Tespit Formatı		Reaksiyon Hacmi		
SYBR Green		20 µl		
Programlar				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	35	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	Okuma Modu	Bekletme (hh:mm:ss)	Hız (°C/s)	Okuma (°C başına)
Ön İnkübasyon				
95		00:10:00	4,8	–
Çoğalma				
95		00:00:20	4,8	–
55		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
Erime Eğrisi				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	1	10
Soğuma				
40	Tek	00:00:10	2,5	–

BÖLÜM 4

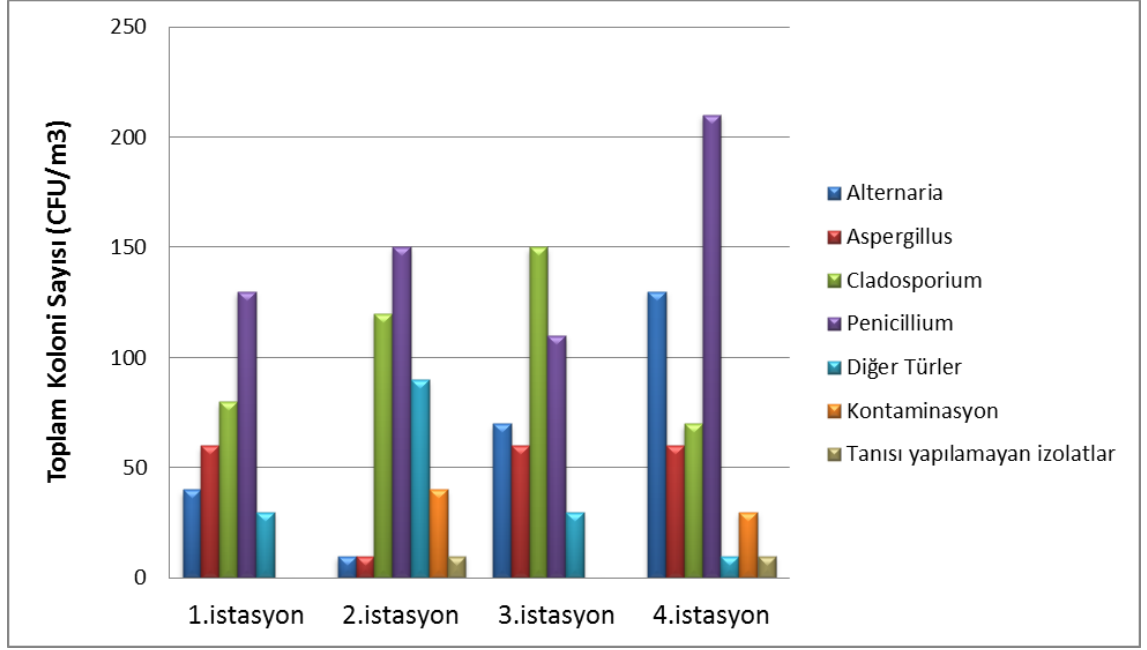
SONUÇLAR

4 farklı buzdolabı havasından alınan örneklemeler sonucunda tanısı yapılamayan türler ve kontaminasyonlar hariç toplam 1620 CFU/m³ mikrofungus izole edilmiştir. Bu koloniler içerisinde *Penicillium* türleri başta olmak üzere sırasıyla *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* ve diğer türler tespit edilmiştir. (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. İzole edilen mikrofungus kolonilerinin genel dağılımı

Yapılan örneklemelerin ardından izole edilen mikrofungusların cins düzeyinde istasyonlardaki dağılımı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. İzole edilen mikrofungus türlerinin istasyonlara göre dağılımı (CFU/m³)

Morfolojik tanı sonucunda tahmin edilen türler ile moleküler tanı sonucunda elde edilen türler arasındaki karşılaştırma yapılarak tür düzeyinde tanı yapılmıştır (Tablo 4.1)

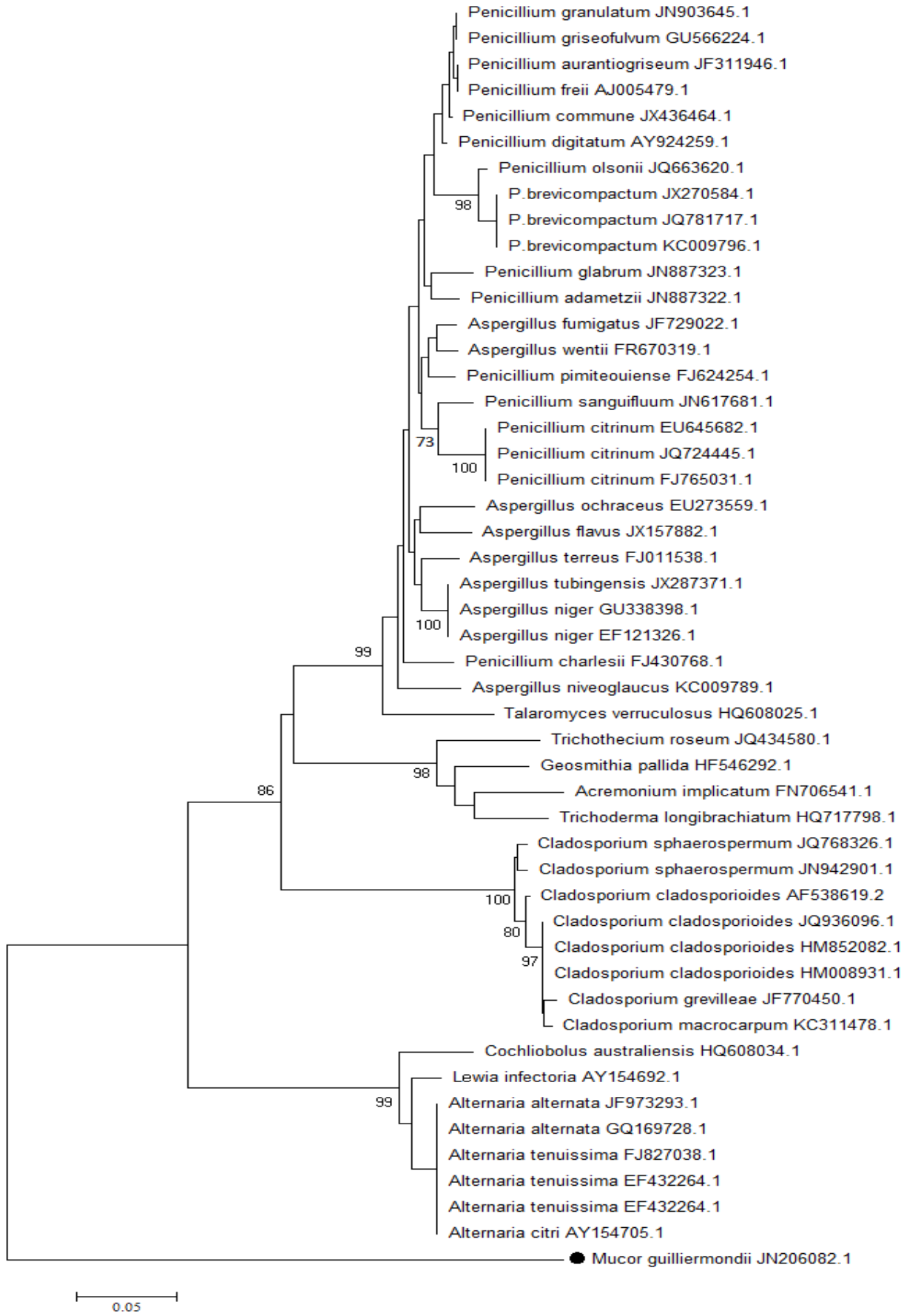
Tablo 4.1. Karşılaştırmalı olarak morfolojik ve moleküler tanımlar

Kodu	Morfolojik Tanı	Moleküler Tanı	Accession No
28.3H1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i> (Keissl, 1912)	JF973293.1
33.1E42	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	GQ220708.1
40.1N31	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	GQ169728.1
91.2B2	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	JF817259.1
57.1N24	<i>Alternaria citri</i>	<i>Alternaria citri</i> (Mussat, 1900)	AY154705.1
37.1E8	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Lewia infectoria</i> (Barr ve Simmons, 1986)	AY154692.1
58.6E5	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria tenuissima</i> (Wiltshire, 1993)	FJ827038.1
74.6E6	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria tenuissima</i>	EF432264.1
53.2H2	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	JX157882.1
97.6E4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresen, 1863)	JF729022.1
21.1N20	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> (Tiegh, 1867)	EF121326.1

34.5H2	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	GU338398.1
64.3H12	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	EU273559.1
65.1N18	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i> (Thom, 1918)	FJ011538.1
98.3E5	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> (Tirab, 1908)	AJ937755.1
103.1E19	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus wentii</i> (Wehmer, 1896)	FR670319.1
4.1N15	<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Aspergillus wentii</i>	FR670319.1
36.2H1	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus tubingensis</i> (Mosseray, 1934)	JX287371.1
39.2B16	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niveoglaucus</i> (Thom ve Raper, 1941)	KC009789.1
2.1E32	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Vries, 1952)	HM008931.1
11.1N28	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AF538619.2
99.2H23	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JQ936096.1
104.1E24	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	HM852082.1
50.3H10	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	<i>Cladosporium macrocarpum</i> (Preuss, 1848)	KC311478.1
81.6E3	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (Penz, 1882)	JQ768326.1
95.4E7	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	JN942901.1
75.2B4	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium grevilleae</i> (Crous ve Summerell, 2011)	JF770450.1
45.1H6	<i>Drechslera australiensis</i> (Bugnic ve ark., 1966)	<i>Cochliobolus australiensis</i> (Alcorn, 1983)	HQ608034.1
62.2N11	<i>Penicillium adametzii</i>	<i>Penicillium adametzii</i> (Zalessky, 1927)	JN887322.1
14.1N7	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (Dierckx, 1901)	JF311946.1
1.3N3	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i> (Dierckx, 1901)	KC009796.1
22.2E7	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	JX270584.1
23.2E5	<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	JQ781717.1
12.2H4	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i> (Thom, 1910)	EU645682.1
31.2H6	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	JQ724445.1
66.4H1	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	FJ765031.1

61.2N6	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	JQ776540.1
19.6H1	<i>Penicillium commune</i>	<i>Penicillium commune</i> (Thom, 1910)	JX436464.1
13.5N1	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Penicillium digitatum</i> (Sacc, 1881)	AY924259.1
6.6B1	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Penicillium glabrum</i> (Westling, 1911)	JN887323.1
10.1B9	<i>Penicillium granulatum</i>	<i>Penicillium granulatum</i> (Bainier, 1905)	JN903645.1
24.3H7	<i>Penicillium griseofulvum</i>	<i>Penicillium griseofulvum</i> (Dierckx, 1901)	GU566224.1
41.4B3	<i>Penicillium olsonii</i>	<i>Penicillium olsonii</i> (Bainier ve Sartory, 1912)	JQ663620.1
17.3N1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium sanguifluum</i> (Svilv, 1941)	JN617681.1
30.6B3	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium pimateouiense</i> (Peterson, 1999)	FJ624254.1
42.3H8	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium charlesii</i> (G. Sm, 1933)	FJ430768.1
44.2E9	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Talaromyces verruculosus</i> (Samson ve ark., 2011)	HQ608025.1
59.1E2	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium frei</i> (Frisvad ve Samson, 1994)	AJ005479.1
3.6N2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (Rifai, 1969)	HQ717798.1
52.1B12	<i>Trichotesium roseum</i>	<i>Trichotesium roseum</i>	JQ434580.1
26.1B16	Tanısı yapılamadı	<i>Acremonium implicatum</i> (Gams, 1975)	FN706541.1
93.5B3	Tanısı yapılamadı	<i>Geosmithia pallida</i> (Kolařík ve ark., 2004)	HF546292.1
89.4B7	<i>Aspergillus</i> sp.	Kontaminasyon	-
18.4B1	<i>Cladosporium</i> sp.	Kontaminasyon	-
25.1B10	<i>Cladosporium</i> sp.	Kontaminasyon	-
29.4B8	Tanısı yapılamadı	Kontaminasyon	-
90.2N3	Tanısı yapılamadı	Kontaminasyon	-
5.2B14	Tanısı yapılamadı	Kontaminasyon	-

Moleküler olarak tanısı yapılan türlerin aralarındaki akrabalık ilişkilerinin incelenmesi amacıyla Neighbor-Joining (bootstrap) filogenetik ağaç çizilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Tanısı yapılan türlerin Neighbour-Joining filogenetik ağaçtaki dallanmaları (% 70 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir)

Morfolojik ve moleküler analizin sonucunda 2 farklı mikrofungus izolatının tanısı yapılamamış olup, 18 farklı mikrofungus izolatının morfolojik olarak cins düzeyinde tanıları yapılmış ve bu tanıları "*Blast Analizi*" ile de desteklenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Tür düzeyinde tanısı yapılamayan türlerin "*BLAST Analizi*" sonuçları

Kodu	Morfolojik Tanı	Moleküler Tanı	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Max Ident	Accession No
77.1B1	<i>Acremonium</i> sp.**	<i>Acremonium</i> sp.	1105	1105	%98	0.0	% 100	HQ608111.1
49.1N11	<i>Alternaria</i> sp1*	<i>Alternaria tenuissima</i>	821	821	%94	0.0	%94	FJ827038.1
92.1E6	<i>Alternaria</i> sp2	<i>Alternaria</i> sp.	933	933	%89	0.0	%99	KC139480.1
		<i>Alternaria alternata</i>	928	928	%88	0.0	%99	JF973293.1
		<i>Alternaria tenuissima</i>	928	928	%88	0.0	%99	EU326185.1
		<i>Alternaria arborescens</i>	922	922	%88	0.0	%99	KC464334.1
102.1H7	<i>Alternaria</i> sp3	<i>Alternaria tenuissima</i>	1062	1062	%98	0.0	% 100	JN542519.1
		<i>Alternaria alternata</i>	1062	1062	%98	0.0	% 100	GQ121322.2
		<i>Alternaria longipes</i>	1062	1062	%98	0.0	% 100	AY154684.1
		<i>Alternaria mali</i>	1062	1062	%98	0.0	% 100	AY154683.1
35.2N32	<i>Cladosporium</i> sp1*	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	800	800	%89	0.0	%95	JQ946393.1
51.1E41	<i>Cladosporium</i> sp2*	<i>Cladosporium</i> sp.	649	649	%82	0.0	%92	FR799496.1
96.2H17	<i>Cladosporium</i> sp3*	<i>Cladosporium</i> sp.	865	865	%94	0.0	%96	HQ696055.1
46.2B11	<i>Cladosporium</i> sp4	<i>Cladosporium</i> sp.	1035	1035	%98	0.0	% 100	JX164083.1
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	968	968	%92	0.0	% 100	AF538619.2
		<i>Cladosporium aphidis</i>	955	955	%98	0.0	%98	JN906978.1
55.6B2	<i>Cladosporium</i> sp5**	<i>Cladosporium</i> sp.	1024	1024	%97	0.0	% 100	HQ608074.1
73.4B2	<i>Cladosporium</i> sp6	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	929	929	%92	0.0	%98	DQ681347.1
		<i>Cladosporium ramotenellum</i>	926	926	%90	0.0	%99	JF499839.1
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	926	926	%90	0.0	%99	AY361994.1
100.4E8	<i>Cladosporium</i> sp7	<i>Cladosporium coralloides</i>	1027	1027	%98	0.0	% 100	AF393695.2
		<i>Cladosporium tenuissimum</i>	1027	1027	%98	0.0	% 100	AJ300331.1
		<i>Cladosporium gossypicola</i>	1024	1024	%98	0.0	% 100	AF393702.2
101.4H5	<i>Cladosporium</i> sp8	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1027	1027	%98	0.0	% 100	JQ936096.1
		<i>Cladosporium phaenocomae</i>	1027	1027	%98	0.0	% 100	JF499838.1
		<i>Davidiella tassiana</i>	1027	1027	%98	0.0	% 100	FN868485.1
		<i>Cladosporium tenuissimum</i>	1027	1027	%98	0.0	% 100	AF393724.2
43.2E17	<i>Cladosporium</i> sp9	<i>Cladosporium langeronii</i>	952	952	%90	0.0	%99	HQ115727.1
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	952	952	%90	0.0	%99	AF455525.1
		<i>Cladosporium colocasiae</i>	935	935	%90	0.0	%99	FJ216453.1
9.3E1	<i>Penicillium</i> sp1*	<i>Penicillium cordubense</i>	732	732	%81	0.0	%92	AF527055.1

20.4N2	<i>Penicillium</i> sp2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	1007	1007	%90	0.0	%99	JQ781768.1
		<i>Penicillium griseofulvum</i>	1007	1007	%90	0.0	%99	JQ781745.1
		<i>Penicillium dipodomyicola</i>	1007	1007	%90	0.0	%99	GQ161752.1
		<i>Penicillium commune</i>	1007	1007	%90	0.0	%99	EU833215.1
		<i>Penicillium citrinum</i>	1007	1007	%90	0.0	%99	EU833214.1
		<i>Penicillium vinaceum</i>	1007	1007	%90	0.0	%99	DQ681340.1
38.3N2	<i>Penicillium</i> sp3	<i>Penicillium argentinense</i>	996	996	%92	0.0	%98	JN831361.1
		<i>Penicillium euglaucum</i>	990	990	%92	0.0	%98	JN617699.1
		<i>Penicillium anatolicum</i>	942	942	%85	0.0	%99	GU944598.1
60.4E1	<i>Penicillium</i> sp4	<i>Penicillium glabrum</i>	1007	1007	%91	0.0	%99	JX421718.1
		<i>Penicillium spinulosum</i>	1002	1002	%92	0.0	%99	HQ608085.1
		<i>Penicillium thomii</i>	1000	1000	%91	0.0	%99	KC167849.1
7.1B14	Tanısı yapılamadı	<i>Acremonium implicatum*</i>	551	551	%79	3E-153	%86	HQ914930.1
63.2B19	Tanısı yapılamadı	<i>Eurotium amstelodami*</i>	640	640	%97	4E-180	%91	JN862800.1

* Baz sayısı yetersiz olan izolat

** Max ident %100 olmasına rağmen tür düzeyinde (DNA veri bankasında eşleşen tür olamaması nedeniyle) tanısı yapılamayan izolat

Morfolojik ve moleküler analizlerin ardından yapılan tür tanısının sonucunda (cins düzeyinde yapılanlar hariç) *Alternaria* cinsine ait toplam 3, *Aspergillus* cinsine ait toplam 9, *Cladosporium* cinsine ait toplam 4, *Penicillium* cinsine ait toplam 14 farklı tür tespit edilmiştir. Bunların yanında *Acremonium* sp., *Cochliobolus australiensis*, *Geosmithia pallida*, *Lewia infectoria*, *Talaromyces verruculosus*, *Trichoderma longibrachiatum* ve *Trichotesium roseum* türlerinin tanısı yapılmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.3. Morfolojik ve moleküler incelemeler sonucunda tür düzeyinde ve cins düzeyinde tanısı yapılan türlerin istasyonlara göre dağılımları

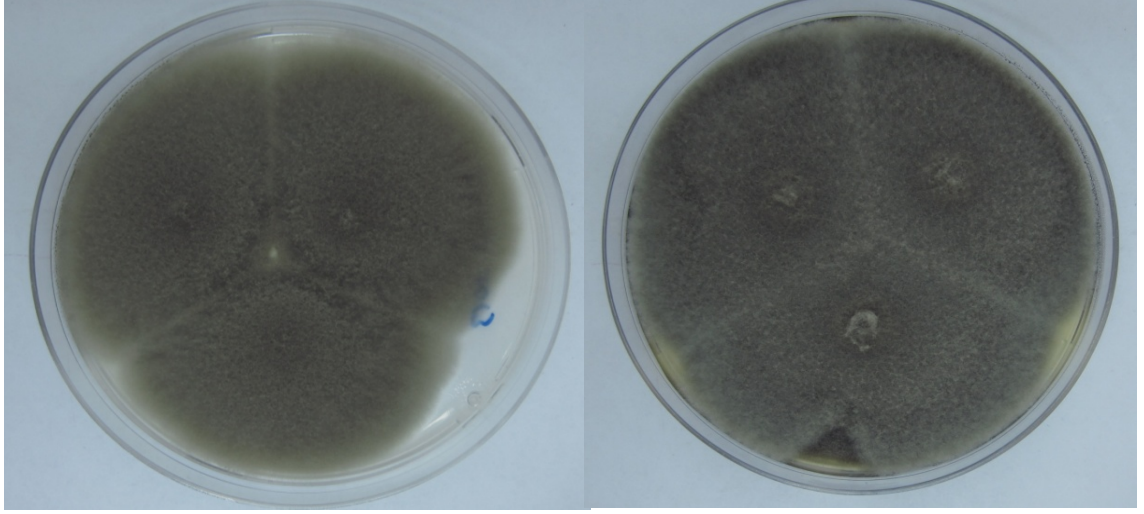
Tür ismi	İstasyonlara Göre Dağılımları (CFU/m ³)				
	1. istasyon	2. istasyon	3. istasyon	4. istasyon	TOPLAM
<i>Alternaria</i> spp.	40	10	70	130	250
<i>Alternaria alternata</i>	10	10	20	60	110
<i>Alternaria tenuissima</i>	20	0	20	20	60
<i>Alternaria citri</i>	0	0	20	30	50
<i>Alternaria</i> sp1	0	0	0	20	20
<i>Alternaria</i> sp2	0	0	10	0	10
<i>Alternaria</i> sp3	10	0	0	0	10
<i>Aspergillus</i> spp.	60	10	60	60	190
<i>Aspergillus flavus</i>	10	0	0	0	10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	10	0	10
<i>Aspergillus niger</i>	20	0	0	20	40
<i>Aspergillus niveoglaucus</i>	0	10	10	10	30
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10	0	0	0	10
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	0	10	10
<i>Aspergillus tubingensis</i>	20	0	0	0	20

<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	10	0	10
<i>Aspergillus wentii</i>	0	0	30	20	50
Cladosporium spp.	80	120	150	70	420
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	20	10	60	30	120
<i>Cladosporium grevilleae</i>	10	10	0	0	20
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	10	0	0	0	10
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	0	20	0	20
<i>Cladosporium sp1</i>	0	0	10	10	20
<i>Cladosporium sp2</i>	0	0	10	0	10
<i>Cladosporium sp3</i>	20	40	10	20	90
<i>Cladosporium sp4</i>	10	30	0	0	40
<i>Cladosporium sp5</i>	0	10	0	0	10
<i>Cladosporium sp6</i>	0	20	0	0	20
<i>Cladosporium sp7</i>	0	0	10	0	10
<i>Cladosporium sp8</i>	10	0	20	0	30
<i>Cladosporium sp9</i>	0	0	10	10	20
Penicillium spp.	130	150	110	210	600
<i>Penicillium adametzii</i>	0	0	0	10	10
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	0	0	0	10	10
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0	0	30	10	40
<i>Penicillium charlesii</i>	10	0	0	0	10
<i>Penicillium citrinum</i>	40	0	0	10	50
<i>Penicillium commune</i>	30	10	20	0	50
<i>Penicillium digitatum</i>	0	0	10	20	30
<i>Penicillium freii</i>	0	0	10	0	10
<i>Penicillium glabrum</i>	0	20	0	0	20
<i>Penicillium granulatum</i>	0	20	0	0	20
<i>Penicillium griseofulvum</i>	30	10	0	0	40
<i>Penicillium olsonii</i>	0	10	0	0	10
<i>Penicillium pimateouiense</i>	0	10	0	0	10
<i>Penicillium sanguifluum</i>	0	0	0	10	10
<i>Penicillium sp1</i>	0	0	10	0	10
<i>Penicillium sp2</i>	20	10	20	70	120
<i>Penicillium sp3</i>	0	0	0	10	10
<i>Penicillium sp4</i>	0	0	10	0	10
<i>Penicillium sp5</i>	0	60	0	60	120
Diğer Türler	30	90	30	10	160
<i>Acremonium implicatum</i>	0	10	0	0	10
<i>Acremonium sp.</i>	10	20	0	0	30
<i>Cochliobolus australiensis</i>	20	0	0	0	20
<i>Geosmithia pallida</i>	0	20	0	0	20
<i>Lewia infectoria</i>	0	0	20	0	20
<i>Talaromyces verruculosus</i>	0	0	10	0	10
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0	0	0	10	10
<i>Trichotesium roseum</i>	0	40	0	0	40
Kontaminasyon	0	40	0	30	70
Tanısı yapılamayan izolatlar	0	10	0	10	20
TOPLAM	340	430	420	520	1710

Yapılan bu çalışmanın sonucunda, Türkiye'den daha önce izole edilmemiş 5 farklı mikrofungus türü tespit edilmiştir:

- *Talaromyces verruculosus* ((Peyronel) Samson, Yılmaz, Frisvad ve Seifert, comb. nov. 2011)
- *Aspergillus niveoglaucus* (Thom ve Raper, 1941).
- *Penicillium sanguifluum* ((Sopp) Biourge, 1923).
- *Penicillium pimateouiense* (S. W. Peterson, 1999).
- *Penicillium freii* (Frisvad ve Samson, 1994).

4.2. Tanısı Yapılan Bazı Türlerin Makroskobik ve Mikroskobik Fotoğrafları



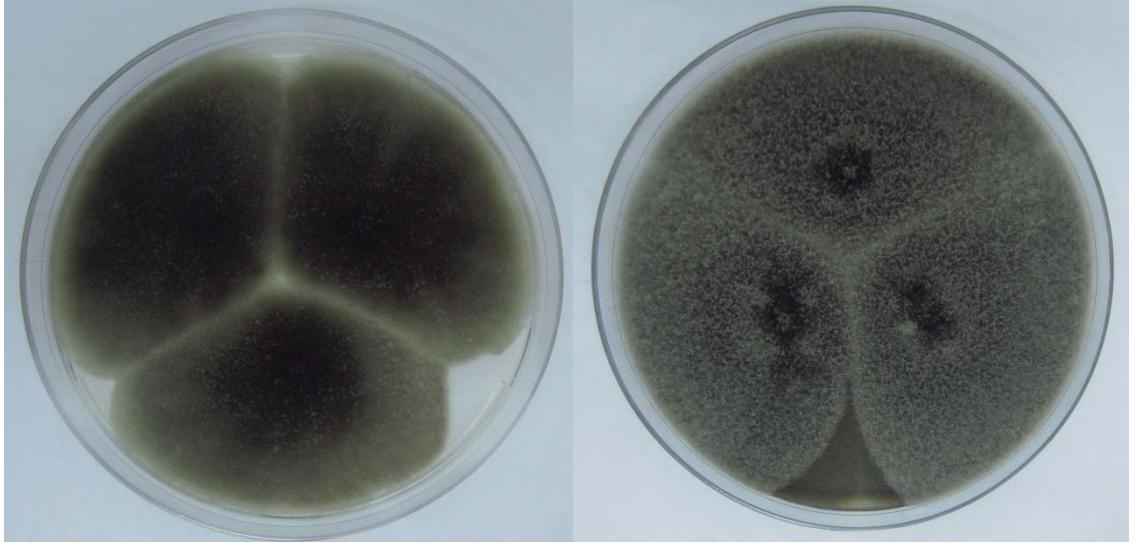
A

B



C

Şekil 4.4. *Alternaria alternata* ; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskobik görüntüsü (x1000)



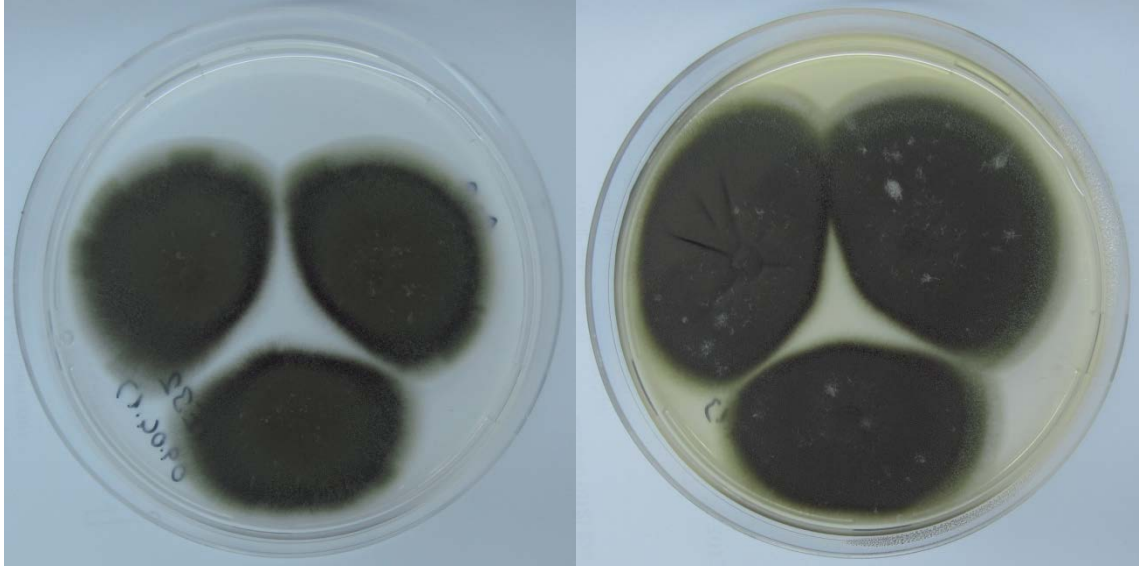
A

B



C

Şekil 4.5. *Alternaria tenuissima* ; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000)



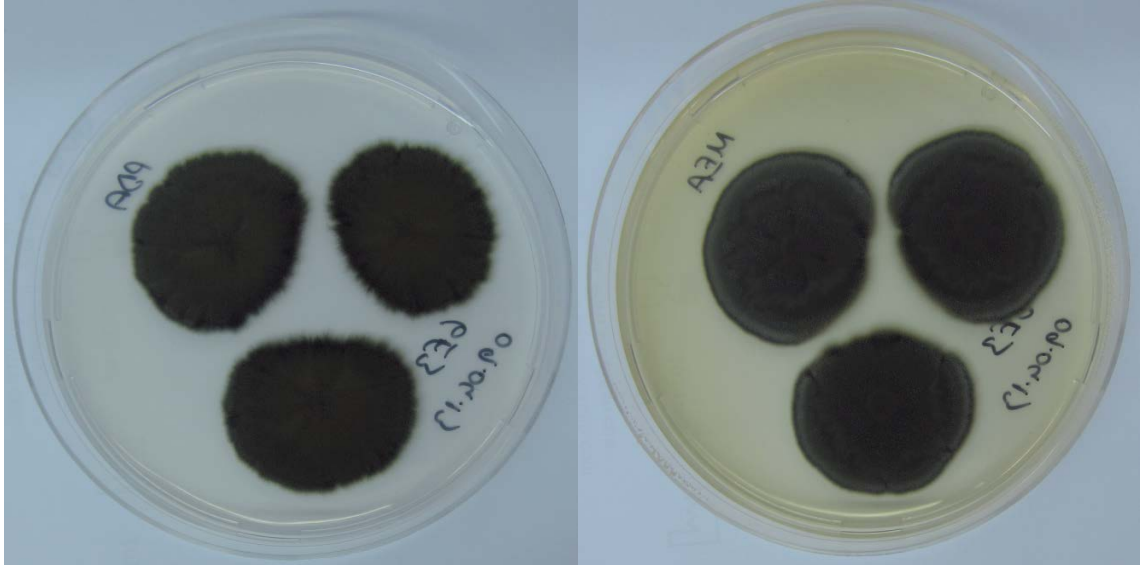
A

B



C

Şekil 4.6. *Cladosporium cladosporioides* ; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000)



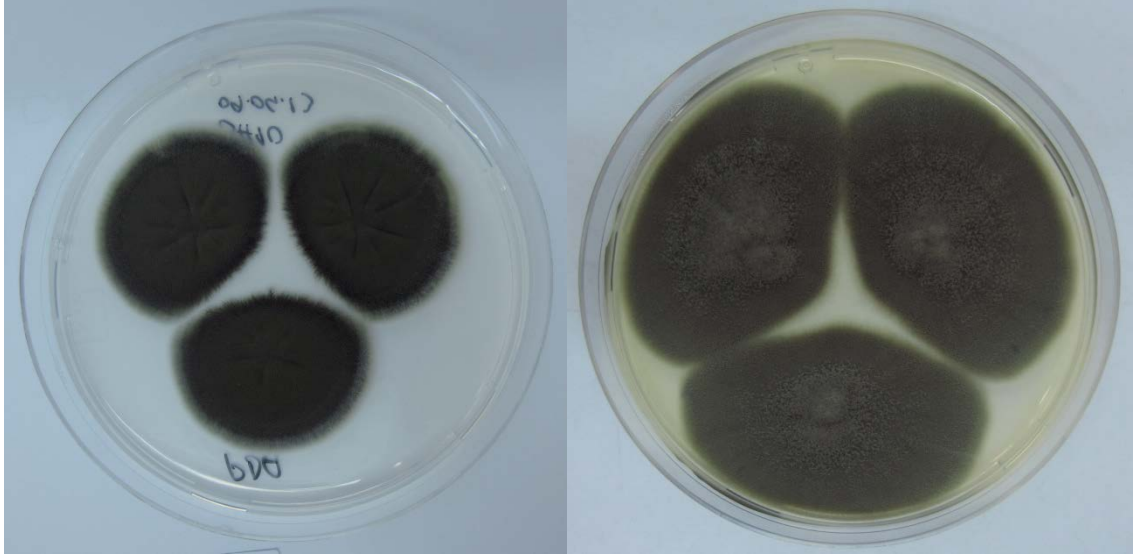
A

B



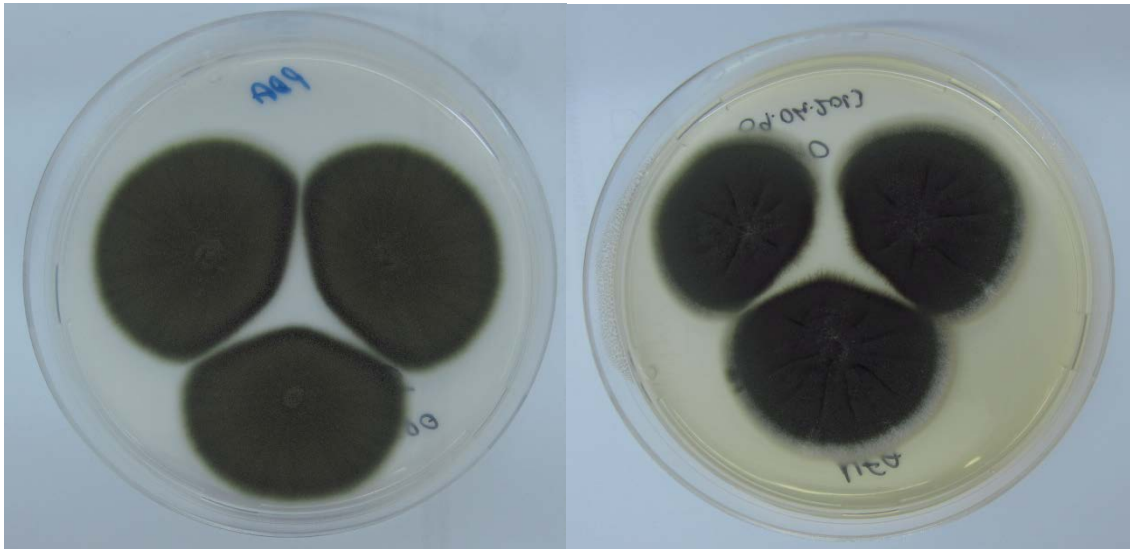
C

Şekil 4.7. *Cladosporium sphaerospermum*; A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü C. Mikroskopik görüntüsü (x1000)



A 1

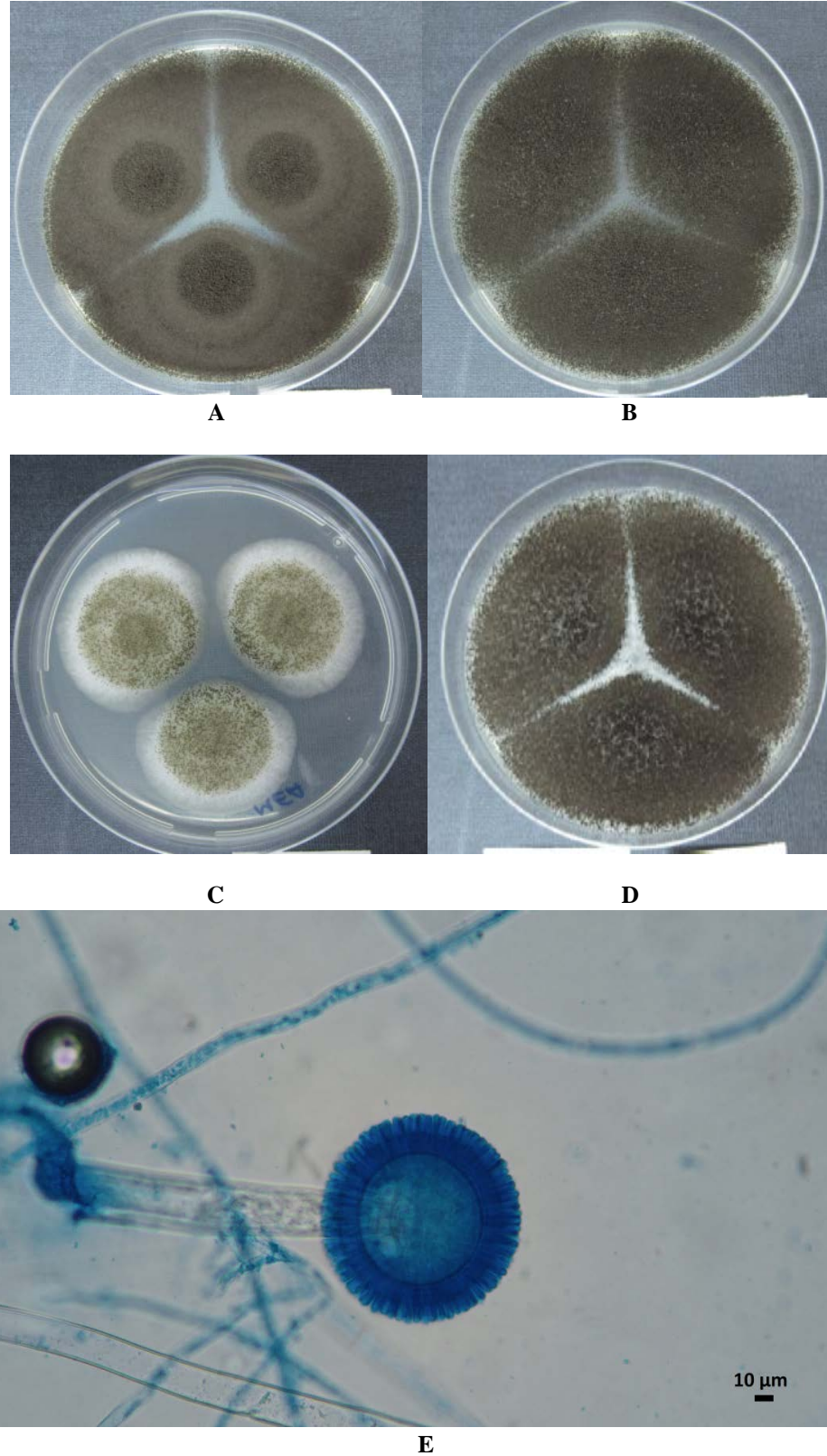
B 1



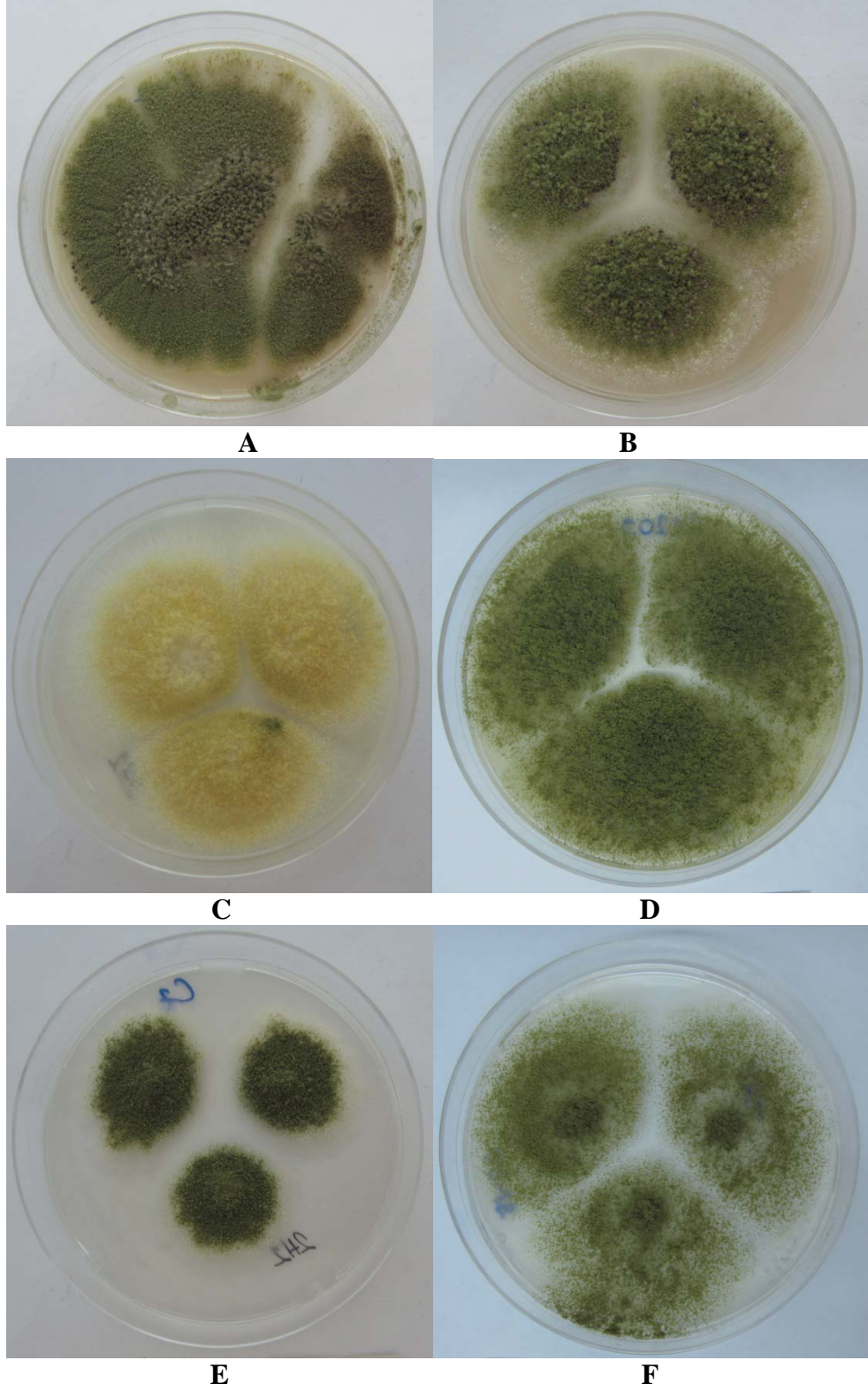
A 2

B 2

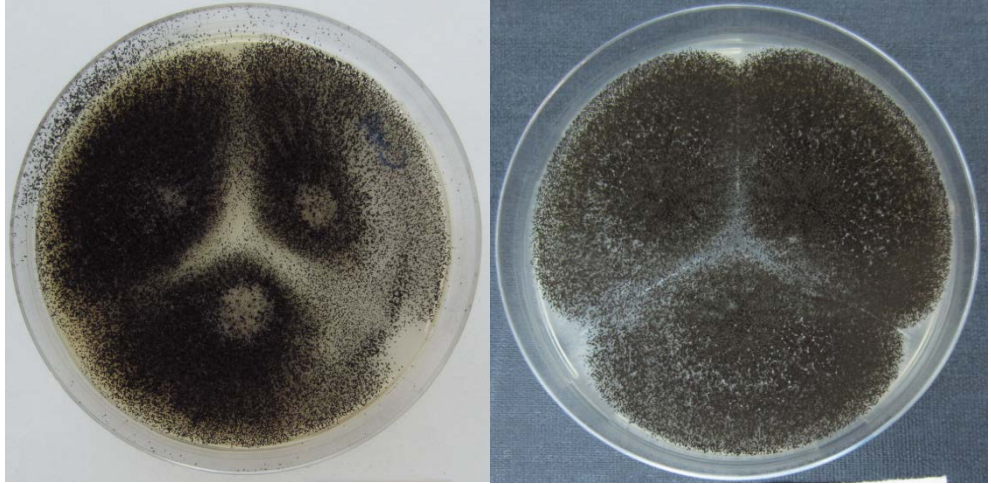
Şekil 4.8. A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **1.** *Cladosporium grevilleae* **2.** *Cladosporium macrocarpum*



Şekil 4.9. *Aspergillus tubingensis* (7 günlük koloni görünümü); **A.** CYA 37 °C **B.** CYA **C.** MEA **D.** CY20S **E.** Mikroskopik görüntüsü (x400)

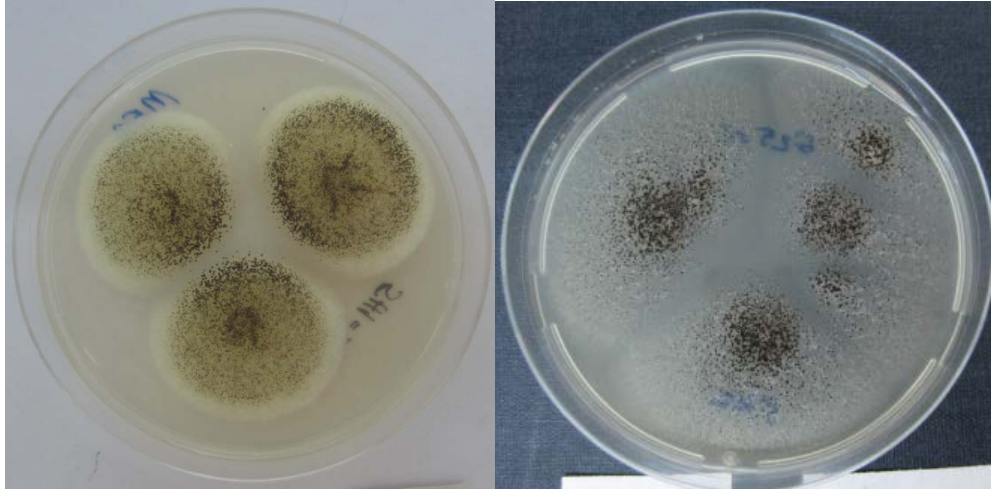


Şekil 4.10. *Aspergillus flavus* (7 günlük koloni görünümü); **A.** CYA 37 °C **B.** CYA **C.** MEA **D.** CY20S **E.** CZ **F.** DG-18



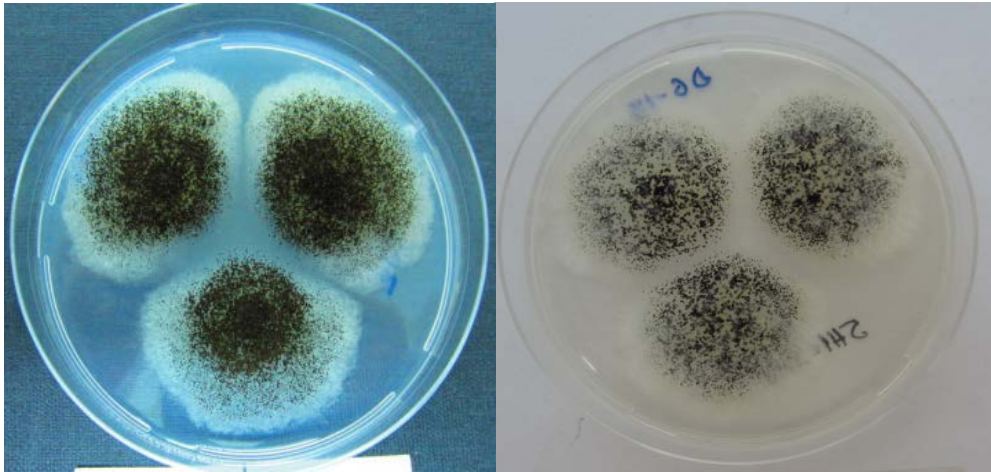
A

B



C

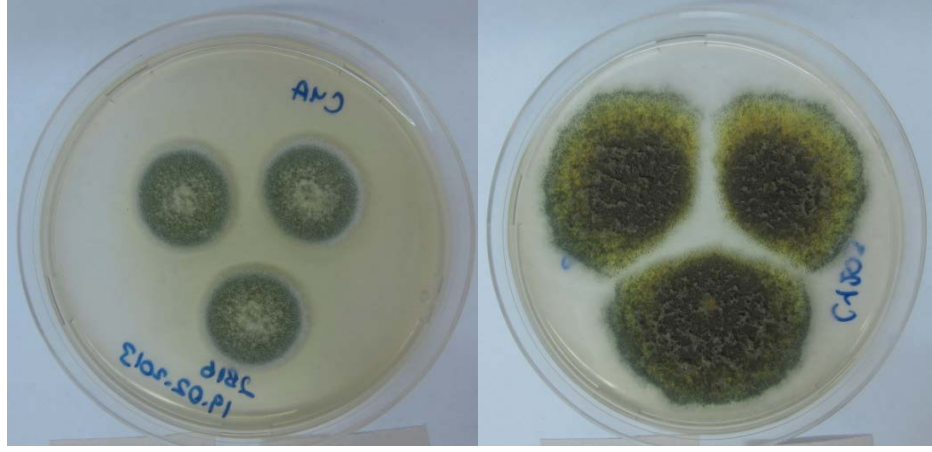
D



E

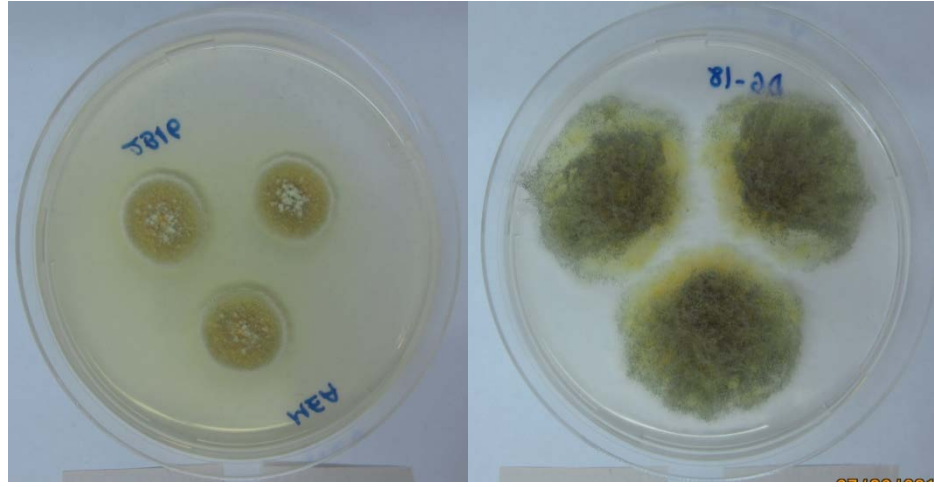
F

Şekil 4.11. *Aspergillus niger* (7 günlük koloni görünümü); **A.** CYA 37 °C **B.** CYA **C.** MEA **D.** G25N **E.** CZ **F.** DG-18



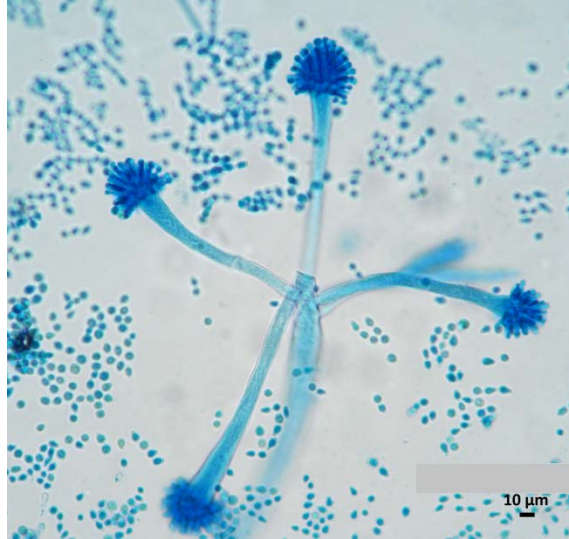
A

B



C

D



E

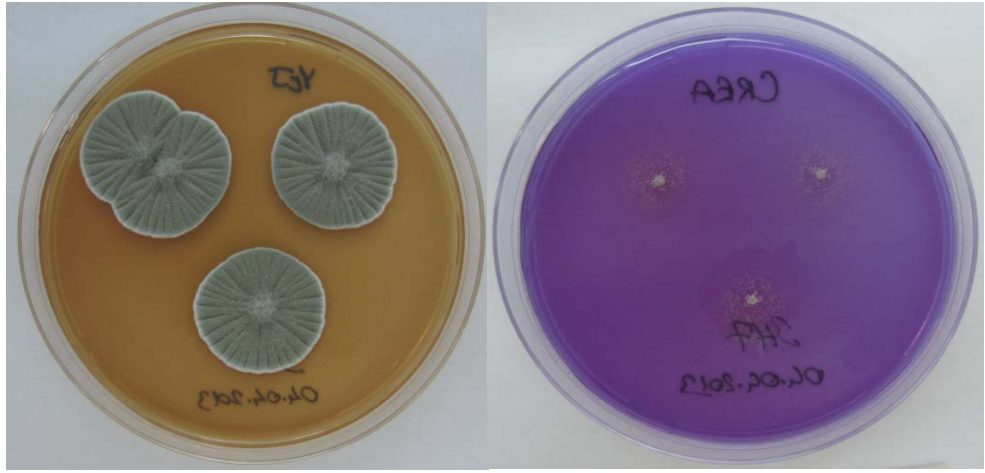
Şekil 4.12. *Aspergillus niveoglacus* (7 günlük koloni görünümü); CYA 37 °C'de üreme yok

A. CYA B. CY20S C. MEA D. DG-18 E. Mikroskopik görüntüsü (x400)



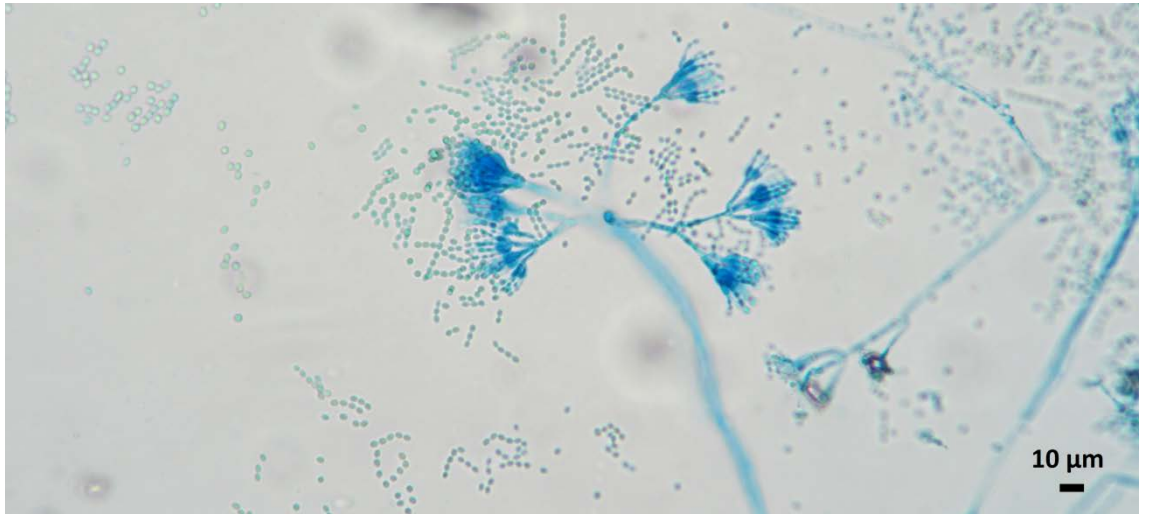
A

B



C

D



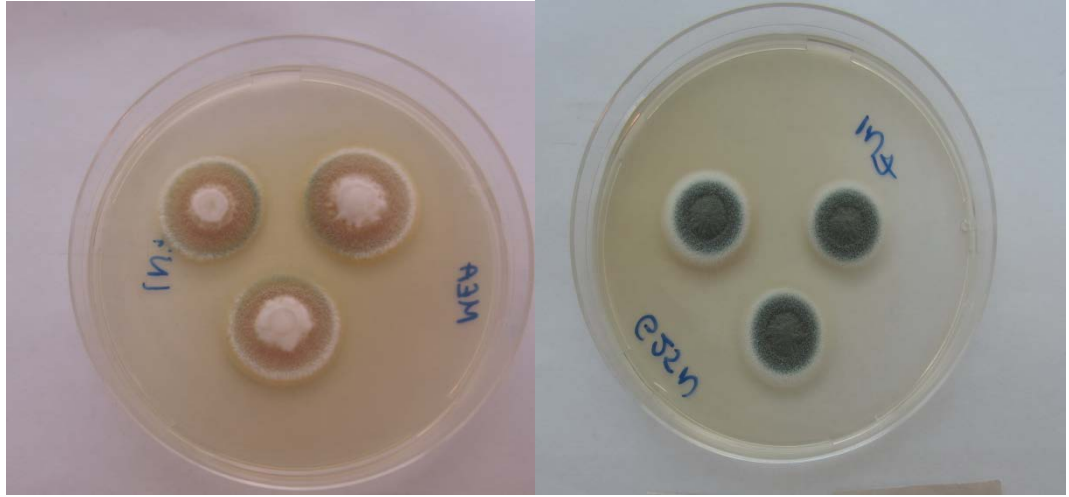
E

Şekil 4.13. *Penicillium griseofulvum* (7 günlük koloni görünümü); CYA 30 °C'de üreme yok
A. CYA B. MEA C. YES D. CREA E. Mikroskopik görüntüsü (x400)



A

B



C

D



E

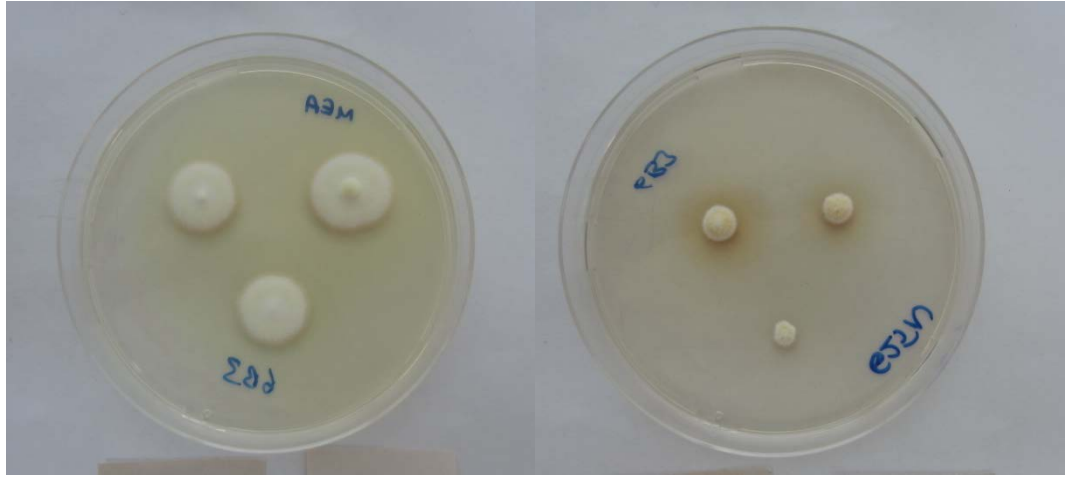
F

Şekil 4.14. *Penicillium aurantiigriseum* (7 günlük koloni görünümü); A. CYA 30 °C B. CYA C. MEA D. G25N E. YES F. CREA



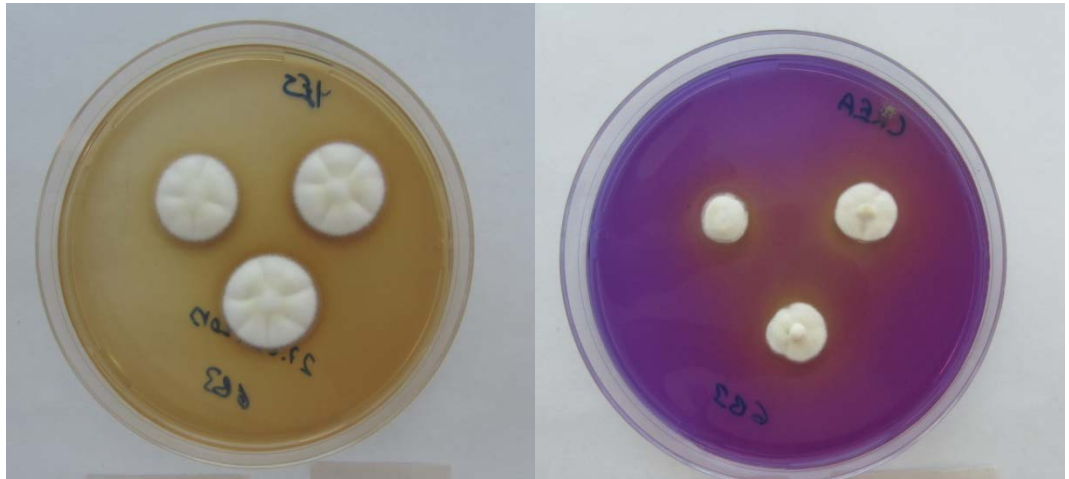
A

B



C

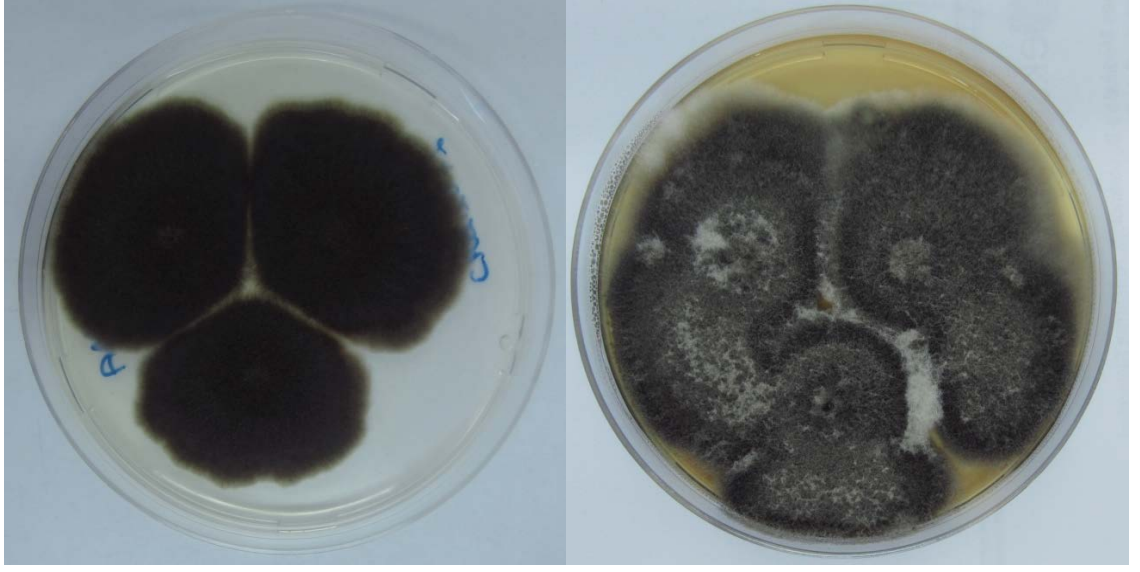
D



E

F

Şekil 4.15. *Penicillium pimateouiense* (7 günlük koloni görünümü); A. CYA 30 °C B. CYA C. MEA D. G25N E. YES F. CREA



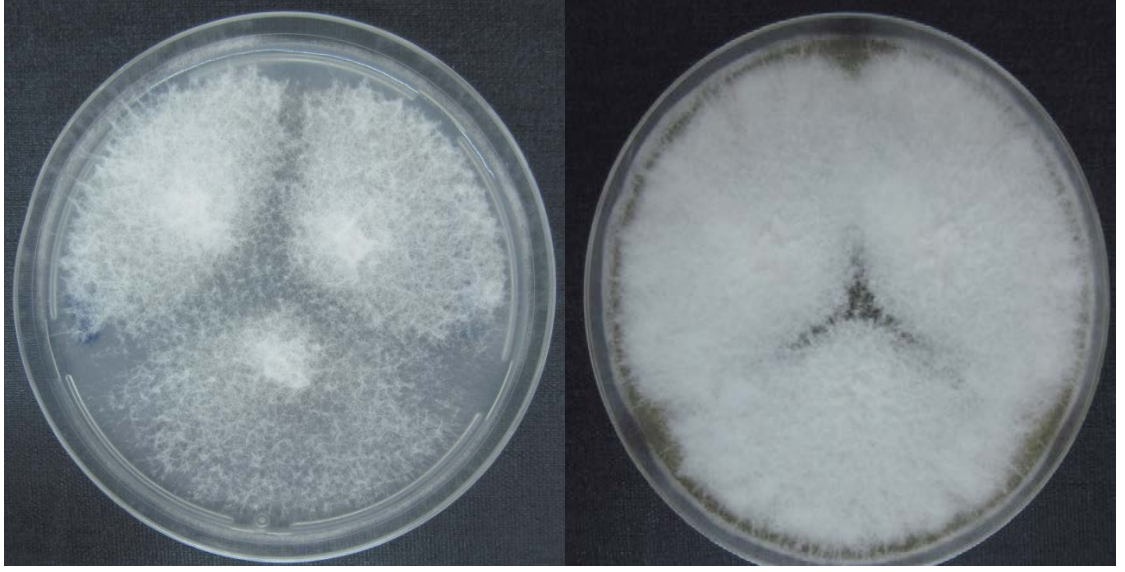
A

B



C

Şekil 4.16. *Cochliobolus australiensis*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000)



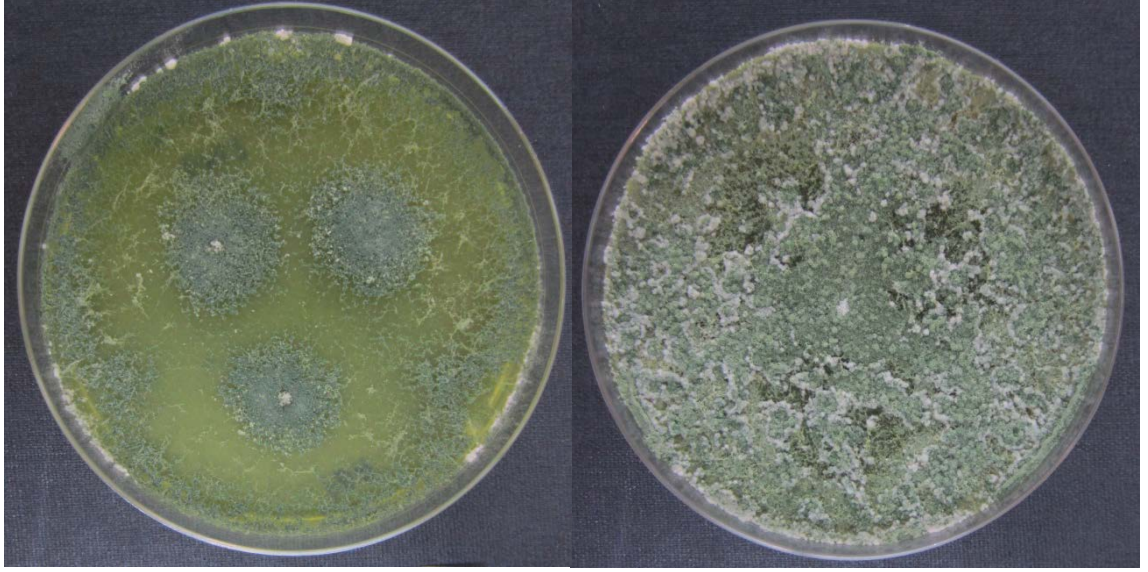
A

B



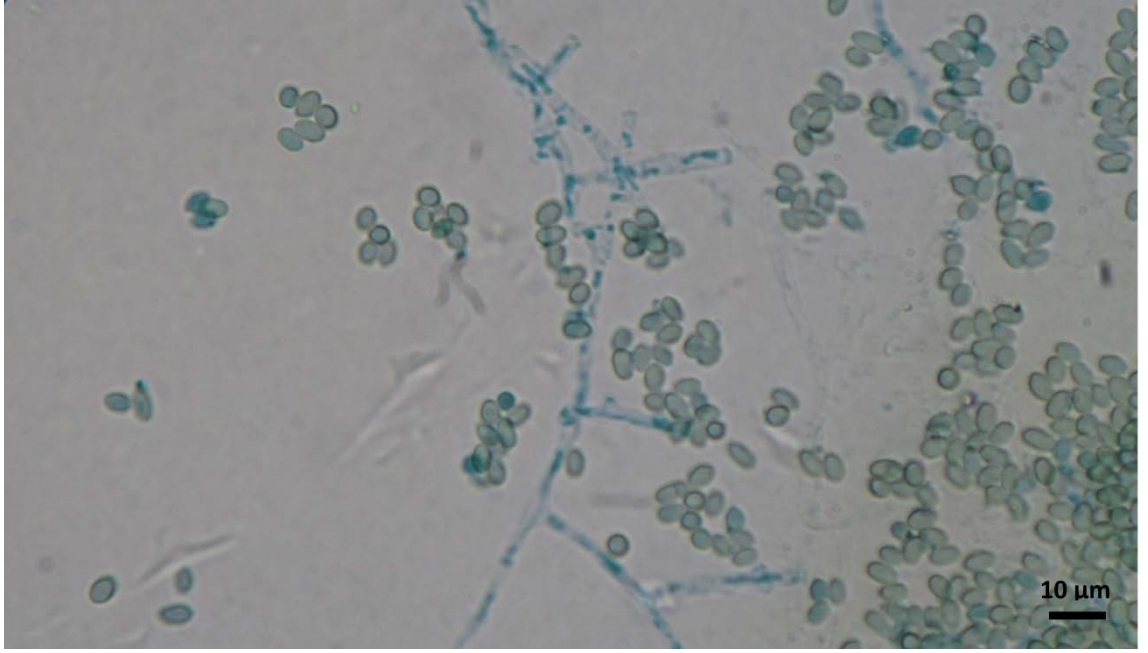
C

Şekil 4.17. *Geosmithia pallida*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000)



A

B



C

Şekil 4.18. *Trichoderma longibrachiatum*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000)



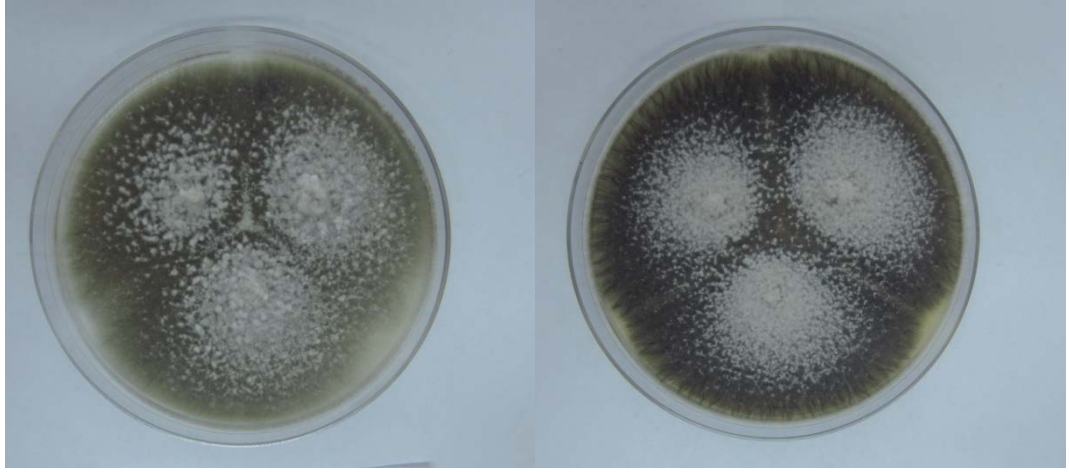
A

B



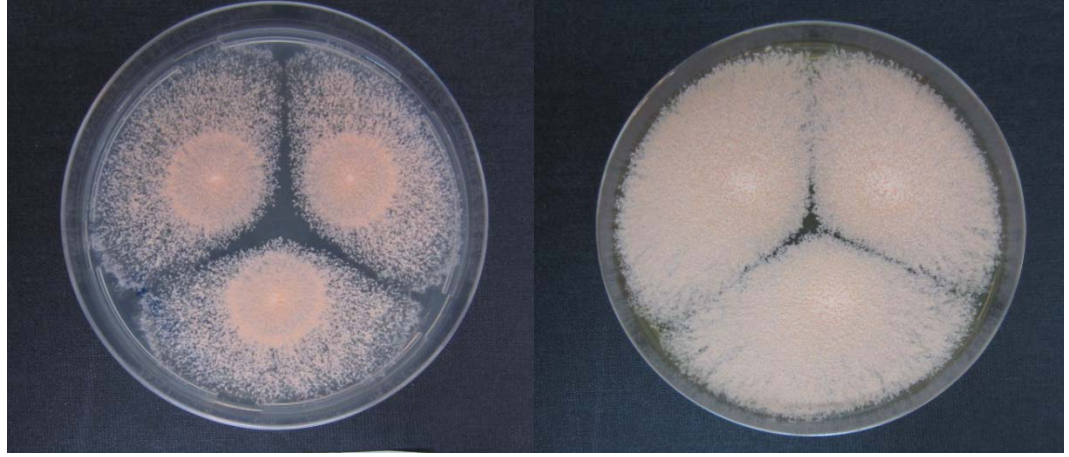
C

Şekil 4.19. *Acremonium implicatum*; **A.** PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **B.** MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **C.** Mikroskopik görüntüsü (x1000)



A 1

B 1



A 2

B 2

Şekil 4.20. A. PDA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü B. MEA besiyerinde 10 günlük koloni görünümü **1.** *Lewia infectoria* **2.** *Trichotesium roseum*

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Gıdalar sadece insanlar için değil tüm canlıların yaşamlarını sürdürebilmesi için gereklidir. Mikroorganizmaların gelişmesinde de önemli rol oynamaktadır. İnsanlık tarihi boyunca gıdaları daha uzun sürelerde saklamak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin hepsinin ortak prensibi aslında mikroorganizmaları gıdalardan uzak tutmaktır. Bu yöntemlerden birisi soğukta saklama metodudur. Günümüzde kullanılan buzdolapları bu ihtiyaca yönelik geliştirilmiştir.

Mikroorganizmalar doğada her yerde bulunabilirler. Fungusların üreme sıcaklığı oldukça geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu sıcaklık sınırları 0 °C ile 60 °C arasında olmakla birlikte türlere göre değişkenlik gösterir. Funguslar bakterilerde de olduğu gibi; Soğuk ortamda (genellikle 0 - 15 °C) gelişenler psikrofilikler, ılık ortamda (15 - 40 °C) gelişenler mesofilikler, sıcak ortamda gelişenler (40 °C'den yüksek sıcaklıkta) ise termofilikler olmak üzere üreme sıcaklıkları derecelerine göre üç farklı gruba ayrılırlar. Fungus Hifleri en yüksek sıcaklık limitinin üstünde kolayca ölmelerine rağmen, sporları yüksek sıcaklığa ve değişik çevre koşullarına çok daha fazla dayanıklılık göstermektedir. Buzdolabı sıcaklığında da üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan funguslara her zaman rastlamak mümkündür [60, 61]. Bizim çalışmamız da bu fikri desteklemektedir. Çalışma boyunca buzdolaplarından toplam 11 farklı fungus cinsi izole edilmiştir. İzole edilen fungus sayısının bu kadar çok olması aslında fungal propagüllerin canlı kalabilme sıcaklık aralığının ne kadar geniş olduğunu göstermektedir.

Gıdaları saklamak için kullanılan buzdolaplarında bulunan funguslar dolap kaynaklı olmayıp, dolaba gıdalar ile birlikte gelmiş olabilirler. Funguslar klorofil pigmentine sahip olmadıkları için fotosentez yapamazlar. Bu nedenle gıda gereksinimlerini (beslenme) dışardan karşılamak zorundadırlar. Fungusların bazıları

kuvvetli enzimler sentezleyerek bunların aracılığı ile çevredeki gıda maddelerini ayrıştırır ve bunlardan yararlanırlar. Örneğin *Aspergillus niger* (amilase, sellobiase, katalase, lipase, protease, maltase, vs.) [60]. Bizim çalışmamızda izole edilen *A. niger*'in çok sayıda çıkmasını besinler üzerinde yaşayabilme özelliğinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Fungusların sentezledikleri ve sekonder metabolit olan toksinler (mikotoksinler) insan ve hayvan sağlığı için büyük tehlike göstermektedir. Bunlar arasında *A. flavus* 'un ve diğer mantarların sentezledikleri Aflatoksin karaciğerde kanser oluşturacak nitelikte etkiye sahiptir [60]. Bizim çalışmamız bu nedenle daha da önem kazanmıştır. Çalışmamızda *A. flavus* sadece 1. istasyondan izole edilmiş olması ve diğer istasyonlardan izole edilmemiş olmasını, örnek alınan buzdolapları arasında 1. istasyonun en eski buzdolabı olması ile ilişkilendirilebilir. Bu buzdolabının çok kullanılmış olması, bu fungusun buzdolabına besinlerle mi geldi yoksa buzdolabında mı kolonize olduğu tartışmasını doğurabilir.

Mantarlar, meyve, sebze, ağaç gövdeleri, depolardaki çeşitli gıdalar ve diğer gıdalar üzerinde ya da içinde üreyerek bunların bozulmasına, değerinin ve kalitesinin düşmesine neden olurlar. *Alternaria* ve *Cladosporium* cinsleri bazı atıkların ve bitkilerin üzerinde yaygın olarak bulunur. Sıklıkla koloniler; havadan, topraktan, gıdalardan, boyalardan, tekstil ürünlerinden ve diğer organik maddelerden izole edilir [62, 63, 64]. Çalışmamız boyunca en fazla izole edilen ikinci fungus cinsi *Cladosporium* (420 CFU/m³), üçüncü cins ise *Alternaria* (300 CFU/m³) cinsidir. Her iki cinsin bitki patojeni olması ve organik gıdalar üzerinde bulunma özellikleri, bu iki cinsin buzdolabı havası florasına buzdolabında bulunan meyve ve sebzelerle taşınmış olabileceğini gösterebilir.

Soğukta muhafaza edilen gıdalarda *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Aeromonas*, *Yersinia* gibi bakteriler önemli bir risk oluşturmaktadır. Küflerden ise *Cladosporium* ve *Sporotrichum* 6.7 °C de, *Penicillium* 4 °C, bazı maya türleri ise 5 °C de gelişirler. Genel olarak 5 °C'de muhafaza edilen bir gıda 0 °C muhafaza edilen bir gıdaya göre daha hızlı bozulur. Bu nedenle soğukta muhafaza tek başına uygulanmaz [65]. Altunatmaz ve ark. 2012 [66] yılında yapmış olduğu çalışmada ve bizim çalışmamızda en fazla izole edilen

fungus *Penicillium* cinsidir (600 CFU/m³). *Penicillium* türlerinin +4 °C de üreyebilme yetenekleri, bu sonucun tesadüfi olmadığını göstermektedir.

Günümüzde teknolojinin ilerlemesiyle yeni nesil buzdolaplarının üretiminde, antimikrobiyal özelliklerinin artırılması için UV lambası ve hava temizleme sistemi gibi sistemler kullanılmaktadır. Bu durum yiyeceklerin doğal olarak daha uzun süreli bozulmadan saklanmasında büyük önem taşır. Ne yaparsak yapalım buzdolaplarının içine hava akımının girişini engelleyemeyiz ancak yeni nesil buzdolapları kullanılarak, bunun sonucunda da buzdolabı iç havasında bulunan fungal propagüllerin verimsizleşmesi sağlanarak besinlere zarar vermesi engellenebilir. Bu da besinlerin bozulma süresini tatmin edici derecede uzatmaktadır.

Toplam 6 *Alternaria* izolatından 3'ünün tür düzeyinde tanısı yapılmış, diğer 3'ünün ise yapılamamıştır. *Cladosporium* cinsine ait toplam 13 farklı izolatın 4'ünün tür düzeyinde tanısı yapılmış, 9'unun ise yapılamamıştır.

Alternaria sp1, *Cladosporium* sp1, *Cladosporium* sp2 ve *Cladosporium* sp3, e baktığımızda (Tablo 4.3), "*BLAST Analizi*" sonucunda en yüksek oranda benzerlik gösteren türler için maximum identification (MI) değerleri sırasıyla % 94, % 95, % 92 ve % 96 bulunmuştur. Bu da demek oluyor ki, sekans analizi sonucunda elde edilen baz sayısının yetersiz ya da baz dizisinin verimsiz olmasından dolayı, tanısı yapılmak istenen örneklerle Gen Bankasındaki örneklerin benzerlik oranları düşüktür.

Alternaria sp1, *Cladosporium* sp1, *Cladosporium* sp2 ve *Cladosporium* sp3 dışındaki tanısı yapılamayan diğer *Alternaria* ve *Cladosporium* izolatlarına baktığımızda ise (Tablo 4.3), "*BLAST Analizi*" sonucunda MI %'si tür düzeyinde tanıya uygun olmasına rağmen, söz konusu bu izolatların MI %'si, birden fazla farklı türle aynı olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik incelemeler sonucunda da bu duruma bir çözüm getirilememesinden dolayı bu izolatların tür düzeyinde tanısı yapılamamıştır.

Son dönemde yapılan filoetik çalışmalarda protein kodlayan genler kullanılmaktadır. Bu genler son derece değişken intron bölgeleri içerir ve türler arasındaki ayrımın daha spesifik bir şekilde yapılmasını sağlar. Bu durum, bu genleri ilgi çekici hale getirir. Bu genlerden en sık kullanılanları; elongation factor 1 alpha (TEF1 α), calmodulin (Cmd), β -tubulin (BenA), actin (Act) ve histone (HIS) genleridir. Bu genler ITS bölgesine göre daha fazla değişkenlik gösterdiği için türler arasındaki ayrımında ITS bölgesine göre daha kullanışlıdır [46].

Tüm bu problemlerin ortadan kaldırılabilmesi için Dematiaceous grubuna ait türlerin moleküler tanısında kullanılan ve türler arası ayırmada ITS'ye oranla daha spesifik olan aktin geninin dizilenmesine gereksinim duyulduğu görülmektedir.

Aspergillus türlerinin tamamının moleküler olarak tanısı yapılabilmektedir. Toplam 19 *Penicillium* izolatının 14'ü tür düzeyinde tanısı yapılmış, 5'i ise yapılamamıştır. *Penicillium* sp1 için (tür düzeyinde tanısı yapılamadı), blast analizi sonucunda en fazla benzerlik (=MI), % 92 oranında *P. cordubense* olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3). *Alternaria* sp1, *Cladosporium* sp1, *Cladosporium* sp2 ve *Cladosporium* sp3'te olduğu gibi, sekans analizi sonucunda elde edilen baz sayısının yetersiz ya da baz dizileme işleminin verimsiz olmasından dolayı, tanısı yapılmak istenen örneklerle Gen Bankasındaki örneklerin benzerlik oranları düşüktür. *Penicillium* sp1 dışındaki tür düzeyinde tanısı yapılamayan diğer *Penicillium* izolatlarına baktığımızda ise, "BLAST Analizi" sonucunda MI %'si tür düzeyinde tanılamaya uygun olmasına rağmen, söz konusu bu izolatların MI %'sinin, birden fazla farklı türle aynı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Morfolojik incelemeler sonucunda bu izolatların tür düzeyinde tanıları yapılamadığı için ve moleküler analiz sonucunda da bu duruma bir çözüm getirilememesinden dolayı bu izolatların tür düzeyinde tanısı yapılamamıştır.

Tüm bu problemlerin ortadan kaldırılmasında *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri için moleküler tanıda kullanılan ve türler arası ayırmada ITS'ye oranla daha spesifik olan β -tubulin, Calmodulin, TEF 1 α gibi gen bölgelerinin alternatif destekleyici gen dizisi olarak araştırılması gerekmektedir [46].

Bu çalışmamızda *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin moleküler tanısının Dematiaceous grubuna ait türlerden daha başarılı olduğu görülmüştür. *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin besiyerlerinde gelişirken sporulasyon miktarının genellikle çok olması nedeniyle DNA izolasyonunun ilk basamağında (hiflerin tampon içeren ekstraksiyon tüpüne aktarılması) karşılaşılan problemi minimuma indirerek, DNA izolasyonunun ve dolayısıyla PCR işlemindeki başarılı sonuçların elde edilmesiyle bağdaştırılabilir.

Moleküler açıdan bakıldığında, ITS gen bölgesi sekans analizi esnasında yeterli ve doğru sayıda baz okuduğunda DNA veri bankasındaki sekanlarla % 100 ve % 99 gibi yüksek yüzdelerle eşleşebilmesine rağmen, bazen sekanslama yönteminden ve/veya dizileme esnasında cihaz okuma verimsizliğinden kaynaklanan problemlerden dolayı,

bölgenin (ITS-1, 5,8S, ITS-2) içerdiği bazdan daha az sayıda (ve bazen sanal olarak fazla sayıda) ve kalitede baz okunması gerçekleşebilmektedir. Bu durumda eğer MI % 97'den az ise ITS gen bölgesinin okunması tekrarlanmalıdır. Eğer % 97-100 arasında ise moleküler tanıyı desteklemek amacıyla mutlaka 2. bir gen bölgesi okunmalıdır. Örneğin; Stephen W. Peterson adlı araştırmacının yaptığı bir araştırmada, taksonomik uzmanların çoğunlukla *P. spinulosum* (Thom, 1910), *P. glabrum*, *P. montanense* (M. Chr. ve Backus, 1963) ve *P. purpurascens* (Biourge, 1923) türlerinin rDNA sekans datalarının birbirine çok yakın olmalarına rağmen birbirlerinden 4-8 nükleotid farklılıklar göstermesi sayesinde farklı türler olarak kabul ettiklerini belirtmiştir. *P. thomii* (Maire, 1917) ve *Eupenicillium lapidosum* (D.B. Scott ve Stolk, 1967) morfolojik olarak farklı fakat DNA sekansı farkı içermezken, yukarıda bahsedilen ilk 4 tür DNA sekansı açısından farklılık gösterir fakat çok az morfolojik farklılık gösterirler [67]. Bu örnekten ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, küf izolatlarının sınıflandırılmasında sadece morfolojik ya da sadece moleküler yöntemler değil, her iki yöntem ele alındığında tüm bu tereddütler ortadan kaldırılabilir. Dolayısıyla bu çalışma bir adım daha ileriye götürülerek incelenen gen bölgesi dışında cinse spesifik alternatif ve destekleyici başka gen bölgelerinin de araştırılmasıyla daha güvenilir bir şekilde aydınlatılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Şen, B., Asan, A. *Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): Seasonal distribution and relationship with climatic factors*, Environ Monit Assess, 151:209–219, (2009)
- [2] Ökten S.S., Asan, A., Sabuncuoğlu, Y., Yavuz, E. *Airborne Fungal Concentrations Of Morning And Evening In East Patch Of Edirne City Using Two Sampling Methods*, Trakya Univ J Sci, 8(1): 15–20, (2007).
- [3] Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M. *The Spectrum of FungalAllerg*, Int. Arch. Allergy Immunol., vol. 145, pp. 58–86, (2008).
- [4] Brett, J., Green, J., Tovey, E. R., Sercombe, J. K., Blachere, F. M., Beezhold, D. H., Schmechel, D. *Airborne fungal fragments and allergenicity*, Medical Mycology, vol. 44, pp. 245-255, (2006).
- [5] Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. *Introduction to food- and airborne fungi*, 187 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 389 pp., (2004).
- [6] Blackburn, C. V., Hocking, A. D., Pitt, J. I., Samson, R. A., Thrane, U. *Food spoilage microorganisms Woodhead Publishing*, Advances in food mycology, Springer, 371 pp., (2006).
- [7] Atanda, S. A., Pessu, P. O., Agoda, S., Isong, I. U., Adekalu, O. A., Echendu, M. A., Falade, T. C. *Fungi and mycotoxins in stored foods*, African Journal of Microbiology Research Vol. 5(25), pp. 4373-4382, (2011).

- [8] Hanson, J. R. *The Chemistry of Fungi*, RSC Publishing, Cambridge CB4 0WF, (UK, 2008).
- [9] Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., Stalpers, J.A. *Ainsworths & Bisbys Dictionary of The Fungi*, 9th Edition. CABI Publishing, (Wallingford, 2001).
- [10] Carlile, M. J. *The success of hypha and mycelium*, In: Gow, N.A.R. and Gadd, G.M., eds., *The Growing Fungus* . London: Chapman and Hall, pp. 3–19, (1995).
- [11] Deacon, J.W. *Fungal Biology*, 4th Edition. Blackwell Publishing, (Malden, Oxford, Australia, 2006).
- [12] Hawksworth, D. L. *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*, *Mycological Research*, 105, 1422_1432, (2001).
- [13] Pommerville, J.C. *Alcamo's Fundamentals Of Microbiology*, 9th Edition. Jones And Bartlett Publishers, (Boston, Toronto, London, Singapore, 2011).
- [14] Michael, J. C., Sarah, C. W., Graham, W.G. *The Fungi*, 2nd Edition. Academic Press, (London, California, 2001).
- [15] Sümer, S. *Genel Mikoloji*. Nobel Yayın Dağıtım, (Ankara, İstanbul, İzmir, 2006).
- [16] Jennessen, J., Nielsen, K. F., Houbraken, J., Lyhne, E. K., Schnürer, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. *Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1833-1840, (2005).
- [17] Frisvad, J. C., Samson, R. A. *Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins*. *Studies in Mycology* 49:1-173, (2004).

- [18] Cole, R. J., Cox, R. H. *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, (New York 1981).
- [19] Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelley, J., Carnaghan, R. B. A. *Toxicity associated with certain samples of groundnut*, Nature 192:1096- 1097, (1961).
- [20] Goto, T., Wicklow, D. T., Ito, Y. *Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium- producing Aspergillus tamarii strain*, Applied and Environmental Microbiology 62:4036- 4038, (1996).
- [21] Klich, M., Mullaney, E. J., Daly, C. B., Cary, J. W. *Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by Aspergillus tamarii and A. ochraceoroseus*, Applied Microbiology and Biotechnology 53:605-609, (2000).
- [22] Frisvad, J. C. Samson, R. A. *Neopetromyces gen. nov. and an overview of teleomorphs of Aspergillus subgenus Circumdati*, Studies in Mycology 45:201-207, (2000).
- [23] Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Samson, R. A. *New ochratoxin producing species of Aspergillus section Circumdati*, Studies in Mycology 50:23-43, (2004).
- [24] Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O, Samson, R. A. *Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in Penicillium subgenus Penicillium*, Studies in Mycology 49:201-242, (2004).
- [25] Lund, F., Frisvad, J. C. *Penicillium verrucosum in cereals indicates production of ochratoxin A*. Journal of Applied Microbiology 95:1117- 1123, (2003).

- [26] Seifert, K. A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., de Gruyter, J., Leslie, J. F., Logrieco, A., Marasas, W. F. O., Nirenberg, H. I., O'Donnell, K., Rheeder, J. P., Samuels, G. J., Summerell, B. A., Thrane, U., Waalwijk, C. ***The name Fusarium moniliforme should no longer be used***, Mycological Research 107:643-644, (2003).
- [27] Schothorst, R. C., Egmond, H. P. van. ***Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states***, Report from SCOOP task 3.2.10, Subtask: trichothecenes. Toxicological Letters 153:133-143, (2004).
- [28] Andersen B., Frisvad, J. C. ***Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes***, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52:7507-7513, (2004).
- [29] Bhunia, A., K. ***Foodborne Microbial Pathogens***, Springer, Purdue University, (West Lafayette, ABD, 2008).
- [30] Bryden, W. L., Logrieco, A., Abbas, H. K., Porter J. K., Vesonder, R. F., Richard, J. L., Cole, R. J. ***Other significant Fusarium mycotoxins***, In Fusarium. Paul E. Nelson Memorial Symposium (Summerell, B. E., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., and Burgess, L. W., eds.), APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 360-392, (2001).
- [31] Schütt, F., Nirenberg, H. I., Deml, G. ***Moniliformin production in the genus Fusarium***. Mycotoxin Research 14:35-40, (1998).
- [32] Blum, M. S. ***The toxic action of marine and terrestrial alkaloids***, Alaken Inc., (Fort Collins, Colorado, 1995).

- [33] Ünlütürk, A., Turantaş, F., Acar, J., Karapınar, M., Temiz, A., Gönül, Ş. A., Tunçel, G. ***Gıda Mikrobiyolojisi***, düzeltilmiş Üçüncü Baskı. META Basım MATbaacılık Hizmetleri, (İzmir, 2003).
- [34] James, T. Y. , Kauff, F. , Schoch, C. L., Matheny, P. B. , Hofstetter, V. ***Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny***, Nature 443 :818-822, (2006).
- [35] Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F. ***A higherlevel phylogenetic classification of the Fungi***, Mycological Research 111 :509-547. (2007)
- [36] McLaughlin, D. J., Hibbett, D. S., Lutzoni, F. ; Spatafora, J. W., Vilgalys, R. ***The search for the fungal tree of life***. Trends in Microbiology 17 :488-497, (2009).
- [37] Kılıçoğlu, M. Ç., Özkoç, İ. ***Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler***, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2008,23(1):65-72, (2008).
- [38] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M.,Tanyolaç B. ***Moleküler Biyoloji***. Nobel Yayın Dağıtım, (Ankara, 2007).
- [39] Temizkan, G., Arda, N. ***Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler***. Nobel Tıp Kitabevleri, (İstanbul, İzmir, Ankara, 2008).
- [40] Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., ***Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms***, Theor Appl Genet., 98, 411, (1999).

- [41] Amane, M., Lumaret, R., Hany, V., Ouazzani, N., Debain, C., Vivier, G., Deguilloux, M. F., *Chloroplast-DNA Variation in Cultivated and Wild Olive (Olea Europaea L.)*, Theor Appl Genet, 99, 133, (1999).
- [42] Bridge, P. D., Arora, D. K., Reddy, C. A., Elander, R. P. *Appliation of PCR in Mycology*, Cab International, (New York, 1998).
- [43] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker. J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, 10th edition, Pirentice Hall, (Pearson, 2012).
- [44] Schlötterer1, C., Tautz1, D. *Chromosomal homogeneity of Drosophila ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution*. Volume 4, Issue 9, Pages 777–783, September (1994),
- [45] Choi, Y.W., Hyde K.D., Ho W.H., *Single spore isolation of fungi*, Fungal Diversity 3, 29-38, (1999).
- [46] Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. *Food and Indoor Fungi*, CBS KNAW Fungal Diversity Centre, (Utrecht, The Netherlands, 2010).
- [47] Ellis, M. B. *Dematiaceous Hyphomycetes*, London and Reading commonwealth Mycological Institute. The Eastern Press Ltd, (Kew, Surrey, UK, 1971).
- [48] Simmons, E. G., *Alternaria An Identification Manual*, CBS Biodiversity Series No:6, CBS Fungal Biodiversity Centre, (Utrect, The Nethetlands, 2007).
- [49] Crous, P.W., Braun, U., Schubert, K., Groenewald, J.Z., *the genus Cladosporium and Similar Dematiaceous Hyphomycetes*, Studies in Mycology 58, Pp: 253, (2007).

- [50] Pitt, J. I., *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*, London: Academic, Pp: 634, (1979).
- [51] Pitt, J. I., *A laboratory guide to common Penicillium species* (p. 1973rd edition). Australia: Food Science (Australia, 2000).
- [52] Samson, R. A., Pitt, J. I. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, Harwood Academic Publishers, (Singapore, 2000).
- [53] Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O. *Introduction to Food-and Airborne Fungi*, 6th Edition, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, (Utrecht, 2002).
- [54] Raper, K. B., Fennel, D. I. *The Genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, (Baltimore, 1965).
- [55] Klich, M. A. *Identification of common Aspergillus Species*, 1st edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, (Utrecht, 2002).
- [56] Barnett, H. L., Hunter, B. B., *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th edition. APS Press, The American Phytopathological Society, (St. Paul, Minnesota, USA, 1999).
- [57] Hasenekoğlu, İ. *Toprak Mikrofungusları*. Atatürk Üniversitesi Yayınları, (Erzurum, 1991).
- [58] Sime, A. D., Abbott, L. L., Abbott, S, P. *A mounting medium for use in Indoor Air Quality spore-trap analyses*. Mycologia. 94 (6): 1087, 1088, (2002).

- [59] Conrad L. Schoch, Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen ve Fungal Barcoding Consortium. ***Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi***. University of Pennsylvania, Philadelphia, (2012).
- [60] <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CF A79D6F5E6C1B43FF2C8B4054E89DE972> (10 Mayıs 2013).
- [61] Kavanagh, K. ***Fungi Biology and Applications***, 2nd edition. Wiley-Blackwell, (Maynooth, Ireland, 2011).
- [62] Ellis, M. B. ***More Dematiaceous Hyphomycetes***, Commonwealth Mycological Institute, (Kew, 1976).
- [63] Ellis, M. B. ***More Dematiaceous Hyphomycetes***, Commonwealth Mycological Institute, (Kew, 1971).
- [64] Schubert, K. ***Morphotaxonomic revision of foliicolous Cladosporium species (hyphomycetes)***. PhD thesis, Martin-Luther-University, (Halle, 2005).
- [65] Alanyalı, F. S., Sarıözlü, N. Y., Güven, A., Kıvanç, M., Yılmaz, M., Demirel, R., Güven, K., Mutlu, M. B. ***Gıda Muhafaza***, Anadolu Üniversitesi, (Eskişehir, 2009).
- [66] Altunalmaz, S., S., Issa, G., Aydın, A. ***Detection Of Airborne Psychrotrophic Bacteria and Fungi In Food Storage Refrigerators***. Brazilian Journal of Microbiology:1436-1443 ISSN 1517-8382 (2012).
- [67] Samson, R., A., Pitt, J., I. ***Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification***, Harwood Academic Publishers, (Australia, Canada, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, 2001).

ÖZGEÇMİŞ

22.11.1989 tarihinde Konak/İZMİR’de doğdum. 2002 yılında Manisa Demirci Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda ilköğrenimimi, 2007 yılında ise İstanbul Küçükköy Vefa Poyraz YDA Lisesi’nde orta öğrenimimi tamamladım. Lisans öğrenimimi 2011 yılında Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladım. 2011 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Programına başladım.