



## Evlerde Kullanılan Buzdolaplarının İç Ortamında Havayla Taşınan Fungusların Biyoçeşitliliği

Soner OZDIL<sup>1</sup>, Ahmet ASAN<sup>2,3</sup>, Burhan SEN<sup>2</sup>, Suzan OKTEN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Edirne

<sup>2</sup>Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Edirne

<sup>4</sup>Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Edirne

**Öz:** Bu çalışmada, 4 farklı evde kullanılan buzdolaplarının iç ortam havasında bulunan mikrofungal morfolojik ve moleküler identifikasyonu yapılarak, buzdolabı hava ortamındaki mikrofungal çeşitliliğin tesbiti amaçlanmıştır. Araştırma materyali Ekim, Kasım ve Aralık 2012 aylarının ilk ve son haftasında 4 farklı istasyondan (her ay ikişer kez olmak üzere) toplam 24 kez örnekleme yapılarak elde edilmiştir. Hava örnekleme cihazı (Millipore) ile, bir örneklemede 100 L hava aspire edilerek alınmıştır. Örnekleme işleminde Dichloran Glycerol Agar (DG 18) besiyerleri kullanılmıştır. İzolatlar saf kültür olarak elde edilip yatık Potato Dextrose Agar (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, Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Czapek Yeast Extract Agar with 20% Sucrose (CY20S), Glycerol Nitrate Agar (G25N), Czapeks-Dox Agar (CZ), Creatine Sucrose Agar (CREA), Yeast Extract Sucrose Agar (YES) ve DG 18 besiyerlerine ekilerek morfolojik teşhisleri ilgili monograflardan yararlanılarak yapılmıştır. Moleküler teşhiste ise elde edilen fungal amplikonların 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 ve gen bankasındaki benzer sekanslarla BLAST Analizi yapılarak kıyaslanmıştır. Araştırmanın sonucunda teşhisi yapılan mantarların yüzdelik dağılımları % 34 *Penicillium*, % 24 *Cladosporium*, % 17 *Alternaria*, % 11 *Aspergillus* türleri ve % 9 diğer türler olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Havayla taşınan funguslar, ITS gen dizisi, Buzdolabı, RT-Q-PCR, Sanger Dizileme

### Biodiversity of Airborne Fungi in the Indoor Environment of Refrigerators Used in Houses

**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. 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 Potato Dextrose Agar (PDA) medium.

<sup>3</sup>Sorumlu yazar: ahmetasan84@gmail.com



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, Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Czapek Yeast Extract Agar with 20% Sucrose (CY20S), Glycerol Nitrate Agar (G25N), Czapeks-Dox Agar (CZ), Creatine Sucrose Agar (CREA), Yeast Extract Sucrose Agar (YES) and DG18 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 isolates.

**Key words:** Airborne fungus, ITS gene region, Refrigerator, RT-Q-PCR, Sanger Sequencing

### Giriş

Fungal yapıların, özellikle sporların uzak mesafelere kadar ulaşabilmesinin en önemli etkenlerden biri hava yolu ile taşınmalarıdır. Aslında hava, fungal gelişim için uygun bir ortam değildir. Ancak rüzgar, insan faaliyetleri, hayvanlar v.s. sayesinde çeşitli kaynaklardan atmosfere nüfuz eden fungal yapılar, uzun mesafelere kadar taşınabilmektedir (Sen ve Asan, 2009; Okten ve Ark., 2007). 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 funguslara karşı olan ilgi oldukça artmış bulunmaktadır (Simon-Nobbe ve Ark., 2008; Brett ve Ark., 2006). Sıcaklık, mantarların gelişimi için çok önemli bir faktör olmasına rağmen, 20°C'nin altında da *Penicillium* spp. ve *Cladosporium* spp. gibi soğuğu tölere edebilen (psikrotrof) mantarların üremesi mümkündür (Atanda ve Ark., 2011). Çalışmamızda, buzdolaplarının iç ortam havasında bulunan mikrofungusların morfolojik ve moleküler tanısı yapılarak, buzdolabı hava ortamındaki fungal çeşitliliğin tesbiti amaçlanmıştır.

Türkiye'de, iç hava funguslarıyla ilgili çeşitli çalışmalar olmakla birlikte (Sen ve Asan, 2009; Okten ve Ark., 2007; Çolakoğlu, 2004;

Kadaifçiler ve Ark., 2013), yapılan literatür araştırmasına göre, direkt buzdolabı ortam havasını inceleyen araştırmalar çok az olsa da, vardır (Altunatmaz ve Ark., 2012; Dogen ve Ark., 2013).

### Materyal ve Metot

#### Materyal

Araştırma materyali, 4 farklı evde kullanılan buzdolaplarının iç ortam havasından Tablo 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.

#### Metot

Araştırmada seçilen evlerdeki buzdolaplarının iç ortam havasından 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 [Choi ve Ark., 1999] yapılarak saf kültür elde edilip, izolatlar yatkı Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerine pasajlanarak 4°C'de saklanmıştır.



Tablo 1. Araştırma için seçilen evlerdeki buzdolaplarının iç ortam havasından aspire edilen hava miktarı.

İstasyon	Örnek zamanı ve aspire edilen hava miktarı (L)			Toplam(L)
	Ekim 2012	Kasım 2012	Aralık 2012	
1. Ev	100	100	100	300
2. Ev	100	100	100	300
3. Ev	100	100	100	300
4. Ev	100	100	100	300
<b>Toplam (L)</b>	<b>400</b>	<b>400</b>	<b>400</b>	<b>1200</b>

DG 18 besiyerinin içerisinde olan mikrofungus kolonilerinin çok fazla yayılmalarını engelleyen dichloran maddesi ile bakterilerin gelişmelerini inhibe eden chloramphenicol ve chlortetracycline antibiyotikleri bulunur (Samson ve Ark., 2010). Dichloran maddesi, Rose Bengal Agar'daki Rose Bengal Boyası'yla aynı fonksiyonu yerine getirir.

#### Mikrofungusların Morfolojik-Koloniyal Tanısı

*Dematiaceous Hyphomycetes* türlerinin teşhisi için, Ellis'in (1971)'in "Dematiaceous Hyphomycetes"; *Alternaria* spp. türlerinin teşhisi için Simmons'un (2007) "*Alternaria an Identification Manual*" ve *Cladosporium* spp. türlerinin teşhisi için Crous ve Ark. (2007)'nin "*The Genus Cladosporium and Similar Dematiaceous Hyphomycetes*" adlı eserleri kullanılmıştır. *Penicillium* spp. cinsine ait türlerin tanımlanması için Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA), Yeast Ekstrat Sukroz (YES), % 25 Gliserol Nitrat Agar (G<sub>25</sub>N), Kreatin Sukroz (CREA) Agar ve Malt Ekstrat Agar (MEA) besiyerleri ve Pitt'in eserleri (1979 ve 2000) kullanılmıştır. *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. türlerinin teşhisi için Samson ve Ark. (2010) "*Food and Indoor Fungi*" adlı eserinden faydalanılmıştır. *Aspergillus* spp. türlerinin üretilmesinde CYA, % 20 Sukroz içeren Czapek Yeast Ekstrat Agar (CY<sub>20</sub>S), Czapek Agar (CZ), DG-18 ve MEA besiyerleri kullanılmıştır. *Aspergillus* spp. için ayrıca Raper & Fennell'in (1965) ve Klich'in (2002) eserlerinden de yararlanılmıştır. Mikrofunguslar cins seviyesinde, Barnett ve Hunter'ın (1999)

"*Illustrated genera of imperfect fungi*" eseri ve Hasenekoğlu'nun (1991) "*Toprak Mikrofungusları*" kullanılarak teşhis edilmiştir. Fungal inceleme ortamı olarak ise lakto pamuk mavisini (Lacto-cotton blue – LCB- Mounting Medium (Sime ve Ark., 2002) kullanılmıştır.

#### Mikrofungusların Moleküler Tanısı DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy Fungal DNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır. DNA kalite kontrolü için; MSP-100 Mikro Spektrofotometre (Inovia Teknoloji Ltd. Şti., Türkiye) kullanılarak DNA örneklerinin saflıkları (ABS<sub>260</sub>/ABS<sub>280</sub>) ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Miktarı en az 20 ng/µl olan ve ABS<sub>260</sub>/ABS<sub>280</sub> değeri 1,6-2,0 aralığında olan DNA izolatları analizlerde kullanılmıştır.

#### Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Fungal Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit (Conrad ve Ark., 2012) 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' primerlerini içermektedir. Bütün reaksiyonlarda Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 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.

#### Dizi Analizi

Elde edilen Fungal ampikonların 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 (Schoch ve Ark., 2012) bölgelerinin en çok benzediği organizma göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır.

Tablo 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)
<b>Ön İnkübasyon</b>				
95		00:10:00	4,8	–
<b>Çoğalma</b>				
95		00:00:20	4,8	–
55		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
<b>Erime Eğrisi</b>				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	1	10
<b>Soğuma</b>				
40	Tek	00:00:10	2,5	–



### Bulgular

4 farklı buzdolabı havasından alınan örneklemeler sonucunda teşhis edilemeyen türler ve kontaminasyonlar hariç toplam 1680 CFU/m<sup>3</sup> mikrofungus izole edilmiştir (Tablo 3). Bu koloniler içinde *Penicillium* spp. türleri (% 34) başta olmak üzere sırasıyla *Cladosporium* spp. (% 24), *Alternaria* spp. (% 17), *Aspergillus* spp.

(% 11) ve diğer türler (% 9) tespit edilmiştir. Ayrıca tüm izolatların % 4'ünde kontaminasyon görülmüş ve % 1'i teşhis edilememiştir. Toplam 6 *Alternaria* spp. izolatından 3'ünün tür düzeyinde teşhisi yapılmış, diğer 3'ünün ise yapılamamıştır. *Cladosporium* cinsine ait toplam 13 farklı izolatın 4'ünün tür düzeyinde teşhisi yapılmış, 9'unun ise yapılamamıştır.

Tablo 3. Türlerin istasyonlardaki koloni miktarları

Tür ismi	İstasyonlara Göre Dağılımları (CFU/m <sup>3</sup> )				TOPLAM
	1. istasyon	2. istasyon	3. istasyon	4. istasyon	
<b><i>Alternaria</i> spp.</b>	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
<b><i>Aspergillus</i> spp.</b>	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
<b><i>Cladosporium</i> spp.</b>	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</i> sp1	0	0	10	10	20
<i>Cladosporium</i> sp2	0	0	10	0	10
<i>Cladosporium</i> sp3	20	40	10	20	90
<i>Cladosporium</i> sp4	10	30	0	0	40
<i>Cladosporium</i> sp5	0	10	0	0	10
<i>Cladosporium</i> sp6	0	20	0	0	20
<i>Cladosporium</i> sp7	0	0	10	0	10
<i>Cladosporium</i> sp8	10	0	20	0	30
<i>Cladosporium</i> sp9	0	0	10	10	20
<b><i>Penicillium</i> spp.</b>	130	150	110	210	600
<i>Penicillium adametzii</i>	0	0	0	10	10



Tablo 3. devamı

Tür ismi	İstasyonlara Göre Dağılımları (CFU/m <sup>3</sup> )				TOPLAM
	1. istasyon	2. istasyon	3. istasyon	4. istasyon	
<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
<b>Diğer Türler</b>	<b>30</b>	<b>90</b>	<b>30</b>	<b>10</b>	<b>160</b>
<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
<b>Kontaminasyon</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>70</b>
<b>Tanısı yapılamayan izolatlar</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>TOPLAM</b>	<b>340</b>	<b>430</b>	<b>420</b>	<b>520</b>	<b>1710</b>

Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Erime sıcaklığı 80-85 °C aralığında olan ürünler spesifik ITS ampikonları, 74-76 °C olan ürünler spesifik olmayan primer dimer ampikonları olarak değerlendirilmiştir. Bu sıcaklık aralıkları dışında, spesifik olmayan bir ampikon türü gözlemlenmemiştir.

DNA dizi analizi öncesi, 80-85 °C aralığında spesifik ITS ampikonunun içeren PCR ürünleri, reaksiyonlarda hedef ürün dışında

bulunan nükleotidler, floresan boyalar, primerler, primer dimerler vb. bileşenlerden PCR ürün saflaştırılması ile ayrıştırılmıştır. Saflaştırma için silika DNA kolonları, DNA bağlama tamponu (4M Guanidinium thiocyanate, %50 izopropanol, 15mM Tris-Cl pH 8.0), yıkama tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v Etanol) ve çözücü olarak moleküler ölçekli su kullanılmıştır.

Morfolojik teşhis sonucunda tahmin edilen türler ile moleküler teşhis sonucunda elde edilen türler arasındaki karşılaştırma yapılarak tür düzeyinde teşhis yapılmıştır (Tablo 4).



Tablo 4. Karşılaştırmalı olarak morfolojik ve moleküler teşhisler

Morfolojik Tanı	Koleksiyon No	GenBank Accession Numaraları	Closest Blast hit (% identity/%coverage)
<i>Alternaria alternata</i>	28.3H1	KY859400	<i>A.alternata</i> JF973293.1 (549/549)
<i>A.alternata</i>	33.1E42	KY859401	<i>A.alternata</i> GQ220708.1 (526/526)
<i>A.alternata</i>	40.1N31	KY859403	<i>A.alternata</i> GQ169728.1 (565/565)
<i>A.alternata</i>	91.2B2	KY859360	<i>A.alternata</i> JF817259.1 (563/565)
<i>A.citri</i>	57.1N24	KY859404	<i>A.citri</i> AY154705.1 (1488/1488)
<i>Alternaria sp.</i>	37.1E8	KY859402	<i>L.infectoria</i> AY154692.1 (579/579)
<i>Alternaria sp.</i>	58.6E5	KY859405	<i>A.tenuissima</i> FJ827038.1 (552/552)
<i>Alternaria sp.</i>	74.6E6	KY859406	<i>A.tenuissima</i> EF432264.1 (571/571)
<i>Aspergillus.flavus</i>	53.2H2	KY859367	<i>A.flavus</i> JX157882.1 (576/576)
<i>A.fumigatus</i>	97.6E4	KY859370	<i>A.fumigatus</i> JF729022.1 (597/597)
<i>A.niger</i>	21.1N20	KY859363	<i>A.niger</i> EF121326.1 (538/538)
<i>A.niger</i>	34.5H2	KY859364	<i>A.niger</i> GU338398.1 (569/569)
<i>A.ochraceus</i>	64.3H12	KY859368	<i>A.ochraceus</i> EU273559.1 (559/559)
<i>A.terreus</i>	65.1N18	KY859369	<i>A.terreus</i> FJ011538.1 (578/578)
<i>A.versicolor</i>	98.3E5	KY859361	<i>A.versicolor</i> AJ937755.1 (524/540)
<i>A.wentii</i>	103.1E19	KY859371	<i>A.wentii</i> FR670319.1 (568/568)
<i>Aspergillus sp.</i>	36.2H1	KY859365	<i>A.tubingensis</i> JX287371.1 (499/499)
<i>Aspergillus sp.</i>	39.2B16	KY859366	* <i>A.niveoglaucus</i> KC009789.1 (527/527)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2.1E32	KY859391	<i>C.cladosporioides</i> HM008931.1 (515/515)
<i>C.cladosporioides</i>	11.1N28	KY859392	<i>C.cladosporioides</i> AF538619.2 (524/524)
<i>C.cladosporioides</i>	99.2H23	KY859398	<i>C.cladosporioides</i> JQ936096.1 (556/556)
<i>C.cladosporioides</i>	104.1E24	KY859399	<i>C.cladosporioides</i> HM852082.1 (521/521)
<i>C.macrocarpum</i>	50.3H10	KY859394	<i>C.macrocarpum</i> KC311478.1 (515/515)
<i>C.sphaerospermum</i>	81.6E3	KY859396	<i>C.sphaerospermum</i> JQ768326.1 (536/536)
<i>C.sphaerospermum</i>	95.4E7	KY859397	<i>C.sphaerospermum</i> JN942901.1 (509/509)
<i>Cladosporium sp.</i>	75.2B4	KY859395	* <i>C.grevilleae</i> JF770450.1 (574/574)
<i>Drechslera australiensis</i>	45.1H6	KY859393	<i>Cochliobolus australiensis</i> HQ608034.1 (549/549)
<i>Penicillium adametzii</i>	62.2N11	KY859389	<i>P.adametzii</i> JN887322.1 (490/490)
<i>P.aurantiogriseum</i>	14.1N7	KY859377	<i>P.aurantiogriseum</i> JF311946.1 (522/522)



Tablo 4. devamı

Morfolojik Tanı	Koleksiyon No	GenBank Accession Numaraları	Closest Blast hit (% identity/%coverage)
<i>P.brevicompectum</i>	1.3N3	KY859372	<i>P.brevicompectum</i> KC009796.1 (550/550)
<i>P.brevicompectum</i>	22.2E7	KY859380	<i>P.brevicompectum</i> JX270584.1 (518/518)
<i>P.brevicompectum</i>	23.2E5	KY859381	<i>P.brevicompectum</i> JQ781717.1 (517/517)
<i>P.citrinum</i>	12.2H4	KY859375	<i>P.citrinum</i> EU645682.1 (460/460)
<i>P.citrinum</i>	31.2H6	KY859384	<i>P.citrinum</i> JQ724445.1 (464/464)
<i>P.citrinum</i>	66.4H1	KY859390	<i>P.citrinum</i> FJ765031.1 (480/480)
<i>P.citrinum</i>	61.2N6	KY859362	<i>P.citrinum</i> JQ776540.1 (276/312)
<i>P.commune</i>	19.6H1	KY859379	<i>P.commune</i> JX436464.1 (558/558)
<i>P.digitatum</i>	13.5N1	KY859376	<i>P.digitatum</i> AY924259.1 (556/556)
<i>P.glabrum</i>	6.6B1	KY859373	<i>P.glabrum</i> JN887323.1 (555/555)
<i>P.granulatum</i>	10.1B9	KY859374	<i>P.granulatum</i> JN903645.1 (564/564)
<i>P.griseofulvum</i>	24.3H7	KY859382	<i>P.griseofulvum</i> GU566224.1 (564/564)
<i>P.olsonii</i>	41.4B3	KY859385	<i>P.olsonii</i> JQ663620.1 (561/561)
<i>Penicillium sp.</i>	17.3N1	KY859378	* <i>P.sanguifluum</i> JN617681.1 (541/541)
<i>Penicillium sp.</i>	30.6B3	KY859383	* <i>P.pimiteouiense</i> FJ624254.1 (530/530)
<i>Penicillium sp.</i>	42.3H8	KY859386	<i>P.charlesii</i> FJ430768.1 (557/557)
<i>Penicillium sp.</i>	44.2E9	KY859387	<i>Talaromyces verruculosus</i> HQ608025.1 (571/571)
<i>Penicillium sp.</i>	59.1E2	KY859388	<i>P.freii</i> AJ005479.1 (564/564)
<i>Trichoderma sp.</i>	3.6N2	KY859408	<i>T.longibrachiatum</i> HQ717798.1 (600/600)
<i>Trichotesium roseum</i>	52.1B12	KY859410	<i>T.roseum</i> JQ434580.1 (618/618)
Tanısı yapılamadı	26.1B16	KY859407	<i>A.implicatum</i> FN706541.1 (535/535)
Tanısı yapılamadı	93.5B3	KY859409	<i>G.pallida</i> HF546292.1 (597/597)
<i>Aspergillus sp.</i>	89.4B7		Kontaminasyon
<i>Cladosporium sp.</i>	18.4B1		Kontaminasyon
<i>Cladosporium sp.</i>	25.1B10		Kontaminasyon
Teşhis edilemedi	29.4B8		Kontaminasyon
Teşhis edilemedi	90.2N3		Kontaminasyon
Teşhis edilemedi	5.2B14		Kontaminasyon

\*ITS sekansı bakımından Türkiye için yeni kayıt (4 tür) (Asan, 2004; Asan ve Ark., 2016)

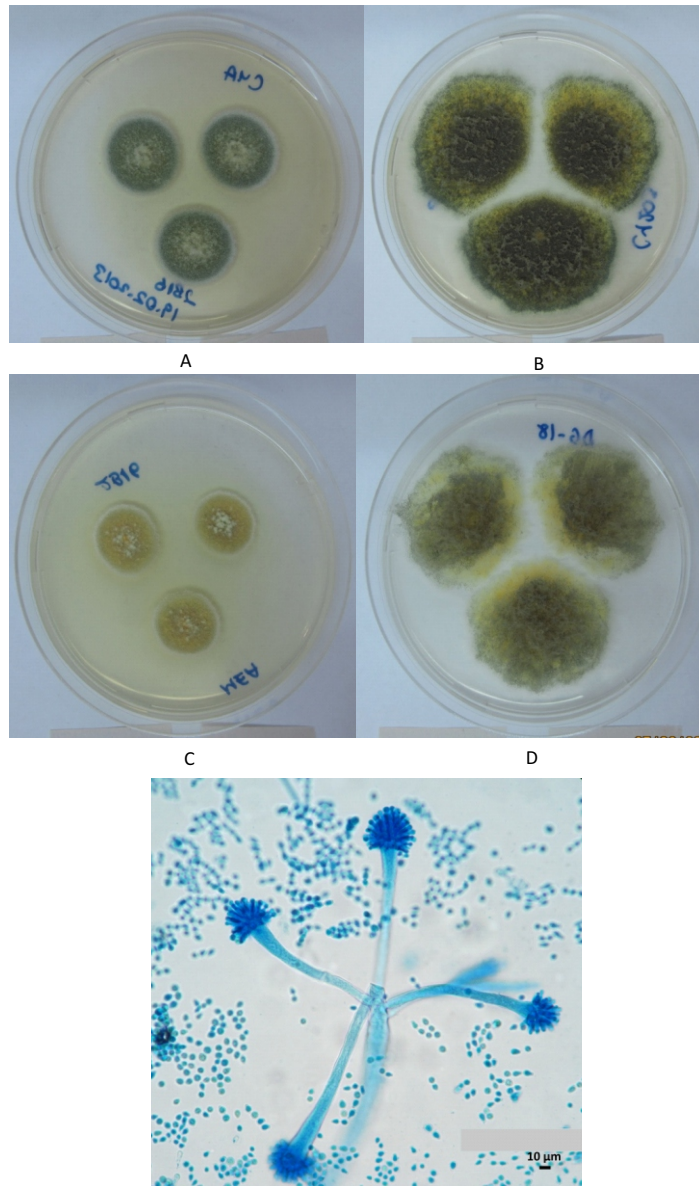




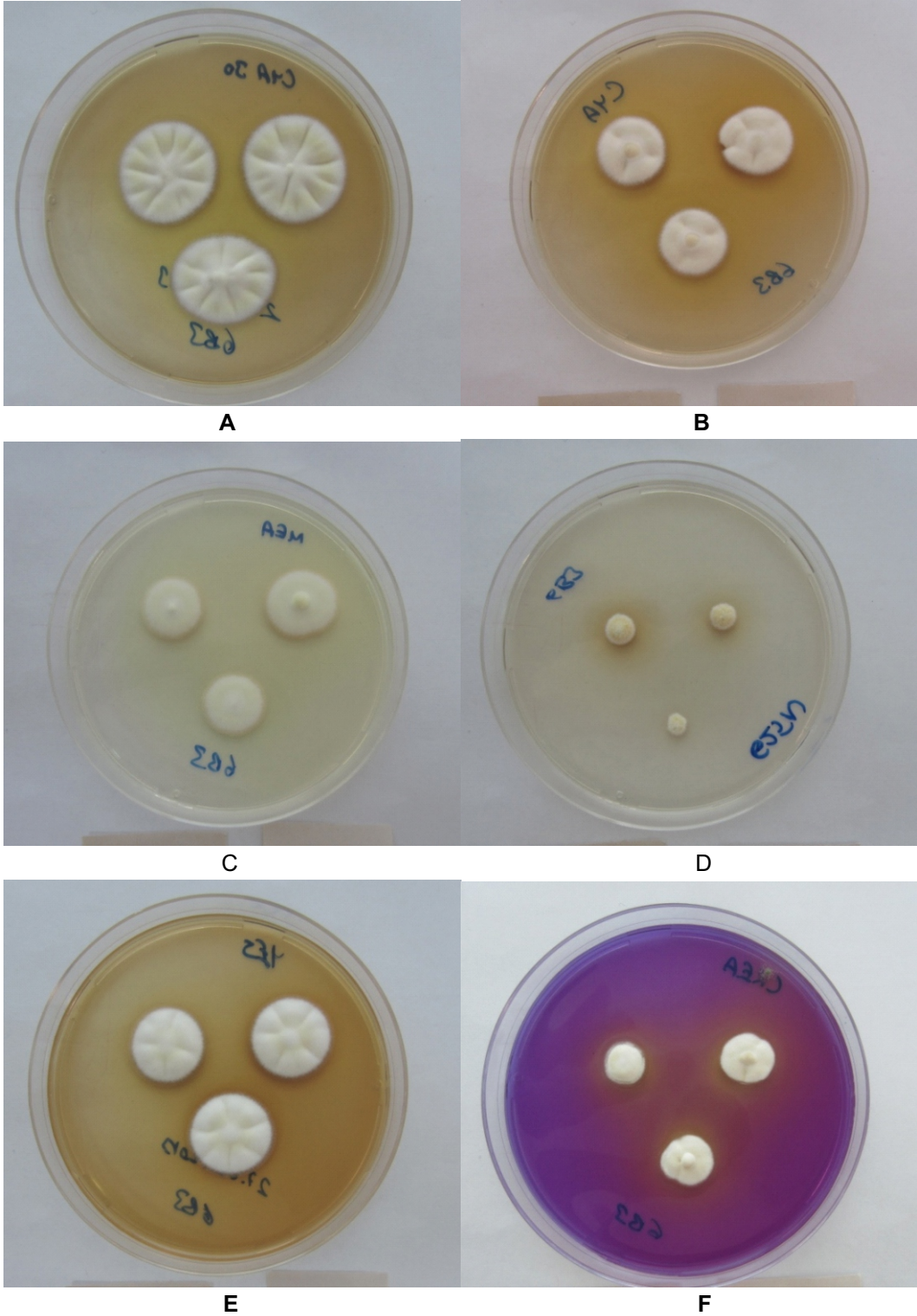
Morfolojik ve moleküler analizin sonucunda 2 farklı mikrofungus türünün teşhisi yapılamamış olup, 18 farklı mikrofungus izolatının morfolojik olarak cins düzeyinde teşhisleri yapılmış ve bu teşhisler Blast Analizi ile de desteklenmiştir.

Morfolojik ve moleküler analizlerin ardından yapılan tür teşhislerinin 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 teşhisi yapılmıştır. Bunlardan Türkiye için yeni kayıt olanlardan 2 tanesiyle ilgili fotoğraflar verilmiştir (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. *Aspergillus niveoglacus* (7 günlük koloni görünümü); CYA 37 °C'de üreme yok. A. CYA B. CY20S C. MEAD. DG-18 E. Mikroskopik görüntüsü (x400)



Şekil 2. *Penicillium pimitouense* (7 günlük koloni görünümü); A. CYA 30°C B. CYA C. MEA D. G25N E. YES F. CREA



### Tartışma

Buzdolabı sıcaklığında üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan funguslara her zaman rastlamak mümkündür [www.mikrobiyoloji.org, Kavanagh, 2011]. 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 fungusların canlı kalabildiği sıcaklık aralığının ne kadar geniş olduğunu göstermektedir [Pietikäinen ve Ark., 2005]. Gıdaları saklamak için kullanılan buzdolaplarında bulunan funguslar genellikle dolap kaynaklı olmayıp, gıdalar ve hava hareketleriyle gelmiş olabilirler. Çalışmamızda izole edilen *Aspergillus spp.* içinde *A.wentii* ve *A. niger*'in fazla görülmesini (Tablo 3), türlerin gıdalar üzerinde yaşayabilme özelliğinden kaynaklandığını söyleyebiliriz; çünkü *A.wentii* ve *A. niger*, amilaz, sellobiaz, katalaz, lipaz, proteaz, maltaz, vs. gibi çeşitli enzimlere sahiptir [www.mikrobiyoloji.org]. En fazla izole edilen ikinci fungal cins *Cladosporium spp.* (420 CFU/m<sup>3</sup>), üçüncü cins ise *Alternaria spp.* (300 CFU/m<sup>3</sup>)'dir. Her iki cinsin bitki patojeni olması ve organik gıdalar üzerinde bulunma özellikleri bu iki cinsin buzdolabı havası ortamına meyve ve sebzelerle taşınmış olması olasılığını arttırmaktadır [Brensch ve Ark., 2012, El-Alwany 2015].

Uygun saklama sıcaklıklarında dahi, bozulmaya neden olan veya patojen mikroorganizmalar düşük sıcaklıklarda büyür ve raf ömrünü kısaltır veya tüketici sağlığını etkiler [Irkin, R. 2010]. Altunatmaz ve Ark. (2012)'nin yapmış oldukları çalışmada da en fazla izole edilen cins *Penicillium spp.*'dur (600 CFU/m<sup>3</sup>). *Penicillium spp.* türlerinin 4°C'de üreyebilme yetenekleri, bu sonucun tesadüf olmadığını göstermektedir. Buzdolaplarında fungusların bulunması, sağlık açısından da risk oluşturmaktadır. Nitekim, Brunetti ve Ark. (2006), patojenik fungal sporların buzdolabı gibi ekipmanlarda bulunabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca Kowalski (1998), fungal sporların nem ve besin buldukları zaman, buzdolabı bobinlerinde çimlenip üreyebileceklerini belirtmiştir. İlave olarak, Baumgardner (2016), küflerin buzdolabı

kapı lastiklerinde bulunabileceğini belirtmiştir. Dolayısıyla fungal sporlar buralardan havaya karışabilir ve kapı açıldıkça buzdolabı içine de girebilir. Thrasher (2016) ise, buzdolabı kompressörlerden elde ettikleri tozlardan çeşitli mikotoksinler tespit etmişlerdir; bu durum da orada fungusların bulunduğunu göstermektedir.

*Alternaria sp1*, *Cladosporium sp1*, *Cladosporium sp2* ve *Cladosporium sp3*'e baktığımızda, "BLAST Analizi" sonucunda en yüksek oranda benzerlik gösteren türler için maksimum teşhis değerleri sırasıyla % 94, % 95, % 92 ve % 96 olarak bulunmuştur (Tablo 5). Dolayısıyla, sekans analizi sonucunda elde edilen baz sayısının yetersiz ya da baz dizisinin verimsiz olmasından dolayı, teşhisi yapılmak istenen örneklerle Gen Bankasındaki örneklerin benzerlik oranları düşüktür. Tanımlanması yapılan fungal türleri değerlendirdiğimizde, hemen hemen tüm cinslerinin morfolojik tanımlama ile yapılan tür teşhisleri ile moleküler yöntemler ile yapılan tür teşhislerinin benzer olduğu görülmektedir. Ancak morfolojik olarak tür tanımı yapılamamış funguslarda moleküler yöntemler daha etkili olmuş ve tür tanımlanması gerçekleştirilebilmiştir. Buna rağmen bazı cinslerde moleküler yöntemlerin de yetersiz kaldığı görülmüştür.

*Alternaria sp1*, *Cladosporium sp1*, *Cladosporium sp2* ve *Cladosporium sp3* dışındaki teşhis edilemeyen diğer *Alternaria spp.* ve *Cladosporium spp.* izolatlarına baktığımızda ise, "BLAST Analizi" sonucunda MI (Maksimum teşhis) %'si tür düzeyinde teşhise uygun olmasına rağmen, sözkonusu bu izolatların MI %'si, birden fazla farklı türle aynı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5). Morfolojik incelemeler sonucunda da bu duruma bir çözüm getirilememesinden dolayı bu izolatların teşhisi yapılamamıştır. Son zamanlarda tür teşhisi için yapılan moleküler analizlerde, protein kodlayan genler ön plana çıkmaktadır. Bu genler; elongation factor 1 alpha (TEF1  $\alpha$ ), calmodulin (Cmd),  $\beta$ -Tubulin (Ben A), Actin (act) ve histone (HIS) genleridir (Samson ve Ark., 2010). Dolayısıyla, bu problem protein kodlayan uygun bir gen dizisi incelenerek çözülebilir.



*Aspergillus* spp. türlerinin tamamının moleküler olarak teşhisi yapılabilmektedir. Toplam 19 *Penicillium* spp. izolatının 14'ü tür düzeyinde teşhis edilebilmiş, 5'i ise edilememiştir. *Penicillium* sp1 için, blast analizi sonucunda en fazla benzerlik (=MI), % 92 oranında *P. cordubense* olarak tespit edilmiştir (Tablo 5). *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, teşhisi

yapılmak istenen örneklerle Gen Bankasındaki örneklerin benzerlik oranları düşüktür. *Penicillium* sp1 dışındaki teşhis edilemeyen diğer *Penicillium* spp. izolatlarına baktığımızda ise, "BLAST Analizi" sonucunda MI %'si tür düzeyinde teşhise uygun olmasına rağmen, sözkonusu bu izolatların MI %'sinin, birden fazla farklı türle aynı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5). Morfolojik incelemeler sonucunda da bu duruma bir çözüm getirilememesinden dolayı bu izolatların teşhisi yapılamamıştır.

Tablo 5. 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



Tablo 5. devamı

Kodu	Morfolojik Tanı	Moleküler Tanı	Max Score	Total Score	Query Cover	E Value	Max Ident	Accession No
100.4E8	Cladosporium 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 gossypiicola</i>	1024	1024	%98	0.0	%100	AF393702.2
101.4H5	Cladosporium sp8	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1027	1027	%98	0.0	%100	JQ936096.1
		<i>Cladosporium phaenocoma</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	Cladosporium 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



Çözüm amacıyla, *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. türleri için moleküler teşhisinde kullanılan ve türler arası ayırmada ITS'ye oranla daha spesifik olan  $\beta$ -tubulin, Calmodulin, TEF 1  $\alpha$  gibi gen bölgelerinin alternatif destekleyici gen dizisi olarak araştırılması yararlı olabilir [Samson ve Ark., 2010]. Çalışmamızda *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. türlerinin moleküler teşhisinin Dematiaceous grubuna ait türlerden daha başarılı olduğu görülmüştür. *Aspergillus* spp. ve *Penicillium* spp. 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 maksimum teşhis % 97'den az ise ITS gen bölgesinin okunması tekrarlanmalıdır. Eğer % 97-100 arasında ise moleküler teşhisi desteklemek amacıyla mutlaka 2. bir gen bölgesi okunması yararlı olur. *Penicillium thomii* ve *Eupenicillium lapidosum* morfolojik olarak farklı fakat DNA sekansı farkı içermezken, *Penicillium spinulosum*, *P. glabrum*, *P. montanense* ve *P. Purpurescens* ise DNA sekansı açısından farklılık gösterir fakat çok az morfolojik farklılık gösterirler (Samson ve Pitt, 2000). Bu örnekten ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, küf izolatlarının sınıflandırılmasındaki tüm bu tereddütler morfolojik ve moleküler yöntemlerin birlikte ele alındığında 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.

#### Teşekkür

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü TÜBAP-2012/184 numaralı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Bunun için Trakya Üniversitesi Rektörlüğü İdari Mali İşler Daire Başkanlığı TÜBAP Komisyon Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

- Altunatmaz SS, Issa G, Aydın A. *Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators*. Brazilian Journal of Microbiology. 1436-1443, 2012.
- Asan A, Ozkale E, Kalyoncu F. *Checklist of Cladosporium species reported from Turkey*. Celal Bayar University Journal of Science. 12 (2): 221-229, 2016.
- Asan A. *Aspergillus, Penicillium and related species reported from Turkey*. Mycotaxon. 89 (1): 155-157, 2004 (Son güncelleme tarihi: 10 Şubat 2015).
- Tam Metin: <http://www.mycotaxon.com/resources/checklists/asan-v89-checklist.pdf>
- Atanda SA, Pessu PO, Agoda S, Isong IU, Adekalu OA, Echendu MA, Falade TC. *Fungi and mycotoxins in stored foods*, African Journal of Microbiology Research Vol. 5(25), pp. 4373-4382, (2011).
- Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4<sup>th</sup> edition. APS Press, The American Phytopathological Society, (St. Paul, Minnesota, USA, 1999).
- Baumgardner DJ. *Disease-Causing fungi in homes and yards in the Midwestern United States*. Journal of Patient-Centered Research and Reviews. 3 (2): 99-110, 2016.
- Bensch K., Braun U., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2012 The genus Cladosporium Studies in Mycology 72: 1–401.



- Brett J, Green J, Tovey ER, Sercombe JK, Blachere FM, Beezhold DH. Schmechel, D. *Airborne fungal fragments and allergenicity*, Medical Mycology: 44: 245-255, 2006.
- Brunetti L, Santoro E, Cavallo P, Boccia G, Motta O, Capunzo M. *Two-years surveillance of fungal contamination in three hospital departments in Campania Region*. J Preventive Med and Hygiene. 47: 22-25, 2006.
- Choi YW, Hyde KD, Ho WH. *Single spore isolation of fungi*, Fungal Diversity 3: 29-38, (1999).
- Crous PW, Braun U, Schubert K, Groenewald JZ. *The genus Cladosporium and Similar Dematiaceous Hyphomycetes*, Studies in Mycology. 58: pp: 253, 2007.
- Çolakoglu G. *Indoor and outdoor mycoflora in the different districts of the city of Istanbul (Turkey)*. Indoor and Built Environment. 13: 91-100, 2004.
- Dogen A, Kaplan E, Oksuz Z, Serin MS, Ilkit M, De Hoog GS. *Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey*. Medical Mycology. 51: 493–498, 2013.
- El-Alwany, A.M. 2015. Plant Pathogenic Alternaria Species in Libya. Open Access Library Journal, 2: e1662. <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1101662>
- Ellis, M. B. *Dematiaceous Hyphomycetes*, London and Reading commonwealth Mycological Institute. The Eastern Press Ltd, (Kew, Surrey, UK, 1971).
- Hasenekoğlu İ. *Toprak Mikrofungusları*. Atatürk Üniversitesi Yayınları, (Erzurum, 1991).
- Irkin, R. 2010. Determination of microbial contamination sources for use in quality management of cheese industry: "Dil" cheese as an example. J. Verb. Lebensm., 5, 91-96.
- Kadaifciler DG, Okten S, Sen B. 2013. *Mycological contamination in dental unit waterlines in Istanbul, Turkey*. Brazilian Journal of Microbiology. 44 (3): 977-981.
- Kavanagh, K. *Fungi Biology and Applications*, 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Blackwell, (Maynooth, Ireland, 2011).
- Klich MA. *Identification of common Aspergillus Species*, 1<sup>st</sup> edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht-The Netherlands, 2002.
- Kowalski WJ. *Airborne respiratory diseases and mechanical systems for control of microbes*. HPAC Heating/Piping/AirConditioning. Sayfa 34-48, 1998.
- 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).
- Pitt JI. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*, London: Academic, Pp: 634, 1979.
- Pitt, JI., *A laboratory guide to common Penicillium species*. 197 pp. 3<sup>rd</sup> Ed. Australia: Food Science, 2000.
- Raper KB, Fennell DI. *The Genus Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore-USA, 1965.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. *Food and Indoor Fungi*, CBS KNAW Fungal Diversity Centre, (Utrecht, The Netherlands, 2010).
- Samson RA, Pitt JI. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, Harwood Academic Publishers, (Singapore, 2000).
- Schoch, Conrad L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. & Miller, A. N. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(16), 6241-6246., 2012.
- Sime AD, Abbott LL, Abbott SP. *A mounting medium for use in Indoor Air Quality spore-trap analyses*. Mycologia. 94 (6): 1087, 1088, (2002).
- Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M. *The Spectrum of Fungal Allergy*. Int. Arch. Allergy Immunol., vol. 145, pp. 58–86, (2008).
- Simmons EG. *Alternaria An Identification Manual*, CBS Biodiversity Series No:6, CBS Fungal Biodiversity Centre, (Utrecht, The Netherlands, 2007).



Sen 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*. Environmental Monitoring and Assessment. 151: 209–219, 2009.

Thrasher JD. *Fungi, Bacteria, Nano-particulates, Mycotoxins and Human Health in Water-Damaged Indoor Environments*. J Comm Pub Health Nurs 2 (2): 115, 2016. doi:10.4172/2471-9846.1000115.

<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CF A79D6F5E6C1B43FF2C8B4054E89DE972> (10 Mayıs 2013).