

Trichophyton mentagrophytes ve *Trichophyton rubrum* Kökenlerinin FT-IR Spektroskopisi ile Ayırımında Tween-80 Etkisi*

The Effect of Tween-80 on the Differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* Strains with FT-IR Spectroscopy

Çağrı ERGİN¹, Macit İLKİT², Yaşar GÖK³, Ahmet Hilmi ÇON⁴, Mustafa Zafer ÖZEL⁵,
Nilgün KABAY⁶, Aylin DÖĞEN⁷, Yasemin BAYGU³

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

² Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

² Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

³ Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Anorganik Kimya Anabilim Dalı, Denizli.

³ Pamukkale University Faculty of Arts and Sciences, Department of Inorganic Chemistry, Denizli, Turkey.

⁴ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Samsun.

⁴ Ondokuz Mayıs University Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Samsun, Turkey.

⁵ York Üniversitesi, Kimya Bölümü, York, YO10 5DD, İngiltere.

⁵ York University, Department of Chemistry, York, YO10 5DD, United Kingdom.

⁶ Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli.

⁶ Pamukkale University Faculty of Technology, Department of Biomedical Engineering, Denizli, Turkey.

⁷ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

⁷ Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma, XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-11 Kasım 2010, Girne, KKTC)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 31.03.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.06.2014

ÖZET

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Trichophyton mentagrophytes* ve *Trichophyton rubrum* en sık tanımlanan iki dermatofit türüdür. Her ne kadar yeni teknolojiler dermatofitlerin tür düzeyinde tanımlanmasına yardımcı olabiliyorsa da, bu yöntemlerin doğrudan uygulanmasında kabul edilebilir sonuçlar için geliştirilmelerine ihtiyaç vardır. FT-IR spektroskopisi ile yapılan önceki araştırmalar, bazı kısıtlılıklarının bulunmasıyla birlikte, bu yöntemin dermatofitlerin tanımlanmasında kullanılabileceğini göstermektedir. Küf mantarlarının ökaryotik karmaşık yapılarından dolayı özellikle FT-IR spektrumdaki organik bağ bölgesi

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Çağrı Ergin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kınıklı, Denizli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 258 296 2491, **E-posta (E-mail):** cagri@pau.edu.tr

oldukça düzensizlikler göstermektedir. Bu çalışmada, inorganik bir molekül olan Tween-80'in, dermatofitlerin üreme ortamına ilave edilmesiyle, dermatofitlerin FT-IR spektroskopisi analizine etkisi incelenmiştir. Çalışmada, toplam dokuz referans dermatofit kökeni [5 *T.mentagrophytes* kompleks (*T.asteroides* CBS 424.63, *T.erinacei* CBS 344.79, *T.erinacei* CBS 511.73, *T.erinacei* CBS 677.86, *T.mentagrophytes* CBS 110.65) ve farklı morfolojide 4 *T.rubrum* kompleks (*T.fluviomuniense* CBS 592.68, *T.kuryangei* CBS 422.67, *T.raubitschekii* CBS 102856, *T.rubrum* CBS 392.58)] incelenmiştir. Tüm kökenler %1 Tween-80 içeren ve içermeyen Sabouraud glukoz agar'da üç hafta süreyle çoğaltılmış; inkübasyon sonunda, yüzeyden toplanan her bir dermatofit kökeni FT-IR spektroskopisi ile incelenmiştir. Tüm ölçümler 4400 ile 400 cm^{-1} aralığında transmisyon modunda yapılmıştır. Çok sayıda spektral pencere bölgesi, temel bileşenler analizi ve hiyerarşik kümeleme ile incelenerek değerlendirilmiştir. *T.mentagrophytes* kompleks ve *T.rubrum* kompleks, beş farklı bölge spektrumlarının ikinci dereceden türevlerin birlikte değerlendirilmesiyle kolaylıkla ayrı olarak gruplandırılmıştır. Çalışmanın diğer bir bulgusu da, Tween-80 ile inkübasyon sonrasında tüm *T.mentagrophytes* kökenlerinin küf yapılarında lipid bağ bileşimlerinin saptanması olmuş ($p=0.025$); bu bağlar *T.rubrum* kökenlerinde belirlenememiştir ($p=0.269$). Sonuç olarak, *T.mentagrophytes* kompleks kökenlerinin *T.rubrum* kompleks kökenlerinden FT-IR spektroskopisi ile ayrılabilmesi için, kültür ortamına Tween-80 eklenmesinin yeterli olduğu belirlenmiş; bunun nedeninin, kültür ortamından *T.mentagrophytes* kökenlerinin hücre yapısına geçen lipid bileşikleri olduğu düşünülmüştür. Tween-80'in, *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* kompleks kökenlerinin FT-IR spektroskopisi ile ayrımındaki bu olumlu etkisinin desteklenmesi için, gerek daha fazla sayıda referans köken, gerekse antifungal ilaçlar ve inorganik iyonlar gibi farklı çevresel etkenlerle karşılaşılan klinik kökenler ile yapılacak ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Trichophyton; FT-IR spektroskopisi; Tween-80; sınıflandırma.

ABSTRACT

Trichophyton mentagrophytes and *Trichophyton rubrum*, are two of the frequently identified dermatophyte species in routine microbiology laboratories. Although newer technologies may assist in species-level identification, direct application of these methods usually require improvement in order to obtain reliable identification of these species. Earlier data have shown that dermatophytes may be identified with FT-IR spectroscopy although there are some limitations. In particular, the organic bond ranges in FT-IR spectra showed more irregularity because of the eucaryotic complexity of the molds. In this study, Tween-80 which is an inorganic molecule, was added to the dermatophyte growth medium in order to investigate its effect on FT-IR spectroscopy analysis of dermatophytes. Nine reference dermatophyte strains [5 *T.mentagrophytes* complex (*T.asteroides* CBS 424.63, *T.erinacei* CBS 344.79, CBS 511.73, CBS 677.86, *T.mentagrophytes* CBS 110.65) and 4 *T.rubrum* complex strains with different morphotypes (*T.fluviomuniense* CBS 592.68, *T.kuryangei* CBS 422.67, *T.raubitschekii* CBS 102856, *T.rubrum* CBS 392.58)] were included in the study. All strains were cultured on Sabouraud glucose agar either with or without 1% Tween-80 for three weeks. After the incubation period, superficial scrapings from each dermatophyte colony were analyzed using FT-IR spectroscopy. All measurements were performed in transmission mode between 4400 and 400 cm^{-1} . Numerous spectral window data were analyzed by principal component analysis and hierarchical clustering was performed. The second derivations of spectral ranges revealed clear grouping of *T.mentagrophytes* complex and *T.rubrum* complex in association over five separate spectral ranges. The findings also showed that while all of the *T.mentagrophytes* strains contained lipid compounds in their mold structure after Tween-80 incubation ($p<0.025$), *T.rubrum* strains did not. Based on these results, it was concluded that culture medium containing Tween-80 was sufficient to enable differentiation of *T.mentagrophytes* complex from *T.rubrum* complex by FT-IR spectroscopy. This effect might be attributed to the possible transfer of lipid compounds from culture to cell structure during growth. Further studies with the use of large number of reference strains and clinical isolates exposed to different environmental factors, such as antifungal agents and inorganic ions, are needed to support these data indicating favorable effect of Tween-80 on the differentiation of *T.mentagrophytes* and *T.rubrum* complexes by FT-IR spectroscopy.

Key words: Trichophyton; FT-IR spectroscopy; Tween-80; classification.

GİRİŞ

Dermatofitlerin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan klasik mikolojik yöntemler olan morfolojik ve fizyolojik testler, çoğunlukla yanlış tanıya neden olmaktadır¹. Koloni yapısı ve mikroskop incelemesiyle yapılan tanımlama, türler arasındaki benzerlikler nedeniyle önemli bilgi birikimi ve deneyime gereksinim duymaktadır²⁻⁴. Dermatofitlerin tür düzeyinde tanımlanması için 1980'li yıllardan itibaren birçok moleküler yöntem uygulamaya girmiş, bu yöntemlerle elde edilen veriler cins ve tür düzeyinde taksonomik değişikliklerin zorunlu olduğunu göstermiştir^{1,2}. Farklı teknikler ile aynı sonuçların alınmaması, rutin uygulanabilir yöntemlerin kabulünü ve yaygınlaşmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle dermatofitlerin tanımlanmasında; hızlı, maliyet ve iş yükünün düşük olduğu ve kolay uygulanabilir yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Otomatize sistemlerde tanımlamaya yönelik veritabanlarının hızlı şekilde geliştirilmesiyle rutin uygulama sorunlarının bir kısmı çözümlenen kemotaksonomik yöntemler (kültür filtrat proteinlerinin disk elektroforezi, yağ asitleri piroliz-gaz-likit kromatografisi, zimogram paterni analizine yönelik total hücre protein ekstraktlarının poliakrilamid gradienti, ince tabaka poliakrilamid jelde somatik ekstrelerin izoelektrik odaklaması, MALDI-TOF vb.), klasik tekniklerden daha hızlı ve doğru olarak tanıya ulaşsa da birçok laboratuvar için rutin uygulamalarda ulaşılabilir değildir^{2,3}.

Kemotaksonomik bir yöntem olan "Fourier dönüşümlü kızılötesi" (Fourier Transform Infrared; FT-IR) spektroskopi tekniği ile özel bir grup olan dermatofitlerin hem cins hem de tür düzeyinde tanımlanması amacıyla yapılan araştırmalar, bu yöntemin geliştirilmesine ihtiyaç olduğunu göstermiştir^{5,6}. Doğrudan analizde karşılaşılan tür ayırım zorluklarını aşmaya yönelik olarak; hücre yapısına etki etmesi sonucunda türler arası farklılık oluşturacak ve ölçülebilecek yöntemler geliştirilmelidir. Ökaryot bir canlı olan maya mantarlarının, çevresel uyuma zorlandığında farklılık oluşturabileceği esas yapının hücre duvarı olduğu bilinmektedir⁷.

Yüzey aktif maddeler (sürfaktanlar), bir çözücüde düşük konsantrasyonda çözüldüğünde, ara yüzeyin fiziksel özelliklerini değiştirerek bu yüzeylerde adsorbe olma özelliğine sahip olan organik moleküllerdir. Etkileşime girdiği ortamdaki ara yüzde, hidrofilik ve hidrofobik kısımların toplanması kendiliğinden gerçekleşir ve sonuçta yüzey gerilimi düşer. Gerçek yüzey aktif maddeler, çözücü fazında kendiliğinden düzenlenen yapıları (miselleri) oluşturabilme özelliği ile ayırt edilir. Yüzey aktif maddeler genel olarak; emülsiyon oluşturucu, dağılım, ıslatıcı, köpük ya da deterjan özelliklerine göre sınıflandırılır. Kolloidal yapılar olarak çok yönlü bir faz davranışı ve çeşitliliği nedeniyle yüzey aktif maddeler; yüksek yüzey alanları, kolloidal sistemlerin yüzey aktivitesi veya stabilite modifikasyonunun gerekli olduğu pek çok endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır^{8,9}. Tween serisi sürfaktanlar ise, bakteri ve filamentöz mantarların üretiltikleri ortamlara, üremenin artırılması ve çeşitli mikroorganizmaların ürün ve enzimlerinin salgılanmasının sağlanması amacıyla eklenmektedir. Non-iyonik bir sürfaktan olan Tween-80, bu sürfaktanlar arasında doymamış yağ asidi kalıntıları (oleat) bulunduran tek maddedir. Hücre zarı geçirgenliğini de artıran Tween serisi sürfaktanların hücre çoğalması ve gelişimiyle

ilgili etkisi henüz yeterince belirlenememiştir. Tween-80 bulunduran ortamlarda mantar kökenleriyle yapılan araştırmalar; mantarın ekzopolisakkarit yapılarının dağılımının değiştiğini, ancak cinsler arasında bu değişimin farklı olabileceğini bildirmektedir^{10,11}. Sürfaktanlar gibi, mikroorganizma metabolitlerinin artmasına neden olan etkenler, hücre membranındaki organizasyonu bozarak geçirgenliği değiştirmekte veya enzimlerin sentez basamaklarına doğrudan etki ederek bu sonuca ulaşmaktadır¹¹. Bazı araştırmacılar bu deneylerde, Tween-80 yapısının hızlı bir şekilde parçalandığını ve oleik asidin ortaya çıktığını bildirmişlerdir¹².

Sunulan araştırmada, hem dünyada hem de ülkemizde saçsız deri ve tırnak dermatofitozlarında en sık saptanan iki tür olan *Trichophyton rubrum* ve *Trichophyton mentagrophytes*'in, FT-IR spektroskopisi ile ayrımları aşamasında, besiyeri ortamına eklenen Tween-80 molekülünün etkisi irdelenmiş ve araştırma sonuçları tartışmaya açılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, *T.mentagrophytes* kompleks üyesi 5 köken ile farklı morfotipte 4 *T.rubrum* kökeni olmak üzere toplam 9 referans köken değerlendirildi (Tablo I). *Trichophyton* kökenleri %1 Tween-80 içeren (Tween-80⁺) ve içermeyen (Tween-80⁻) Sabouraud glukoz agarda 3 hafta süreyle oda ısısında inkübe edilerek üretildi. Saf kültür kökenler 2 ml saf su içinde süspanse hale getirildikten sonra liyofilize edildi.

FT-IR spektroskopisi analizi Perkin-Elmer FT-IR spektrometre (Model BX-40, ABD) cihazında absorpsiyon modunda yapıldı. Çalışmada 4400-400 cm⁻¹ spektral sınırlar alındı. Spektral çözünürlük 4 cm⁻¹'e ayarlandı. Tüm veriler, spektrumların alındığı spektrometrenin bağlı olduğu bilgisayarda (Spectrum, v5.0.1, Perkin-Elmer, ABD) kaydedildi. Verilere sırasıyla temel çizgi düzeltmesi (baseline correction), yumuşatma (smoothing), normal

Tablo I. Araştırmaya Alınan Dermatofit Kökenleri

Referans köken	Katalog no	İzolasyon kaynağı
<i>T.mentagrophytes</i> kompleks		
<i>T.asteroides</i>	CBS 424.63	Kol derisi (Haarlem/Hollanda)
<i>T.erinacei</i>	CBS 344.79	Kol derisi
<i>T.erinacei</i>	CBS 511.73	Kirpi (Yeni Zelanda)
<i>T.erinacei</i>	CBS 677.86	Tırnak (Almanya)
<i>T.mentagrophytes</i>	CBS 110.65	Pubik kıllar (Hollanda)
<i>T. rubrum</i> kompleks		
<i>T.fluviomuniense</i>	CBS 592.68	Saçsız deri (Rio Muni/Gine)
<i>T.kuryangei</i>	CBS 422.67	Tinea kapitis (Zaire)
<i>T.raubitschekii</i>	CBS 102856	El başparmağı (İtalya; Kamerunlu olgu)
<i>T.rubrum</i>	CBS 392.58	Tinea pedis (Rotterdam/Hollanda)

dağılım uyarlaması (normalization) ve sınıra genişletme (abex fitting) işlemleri uygulandı. Her kökene ait spektral verilerin, üst üste binmeyen birim aralıklarının (pencere) saptanması gibi tanımlayıcı bölgelerin araştırılması amacıyla ikinci dereceden türevleri alındı. Türler arasında grupta oluşturabilecek verilerin varlığı için çok sayıda farklı spektral pencere için inceleme uygulandı.

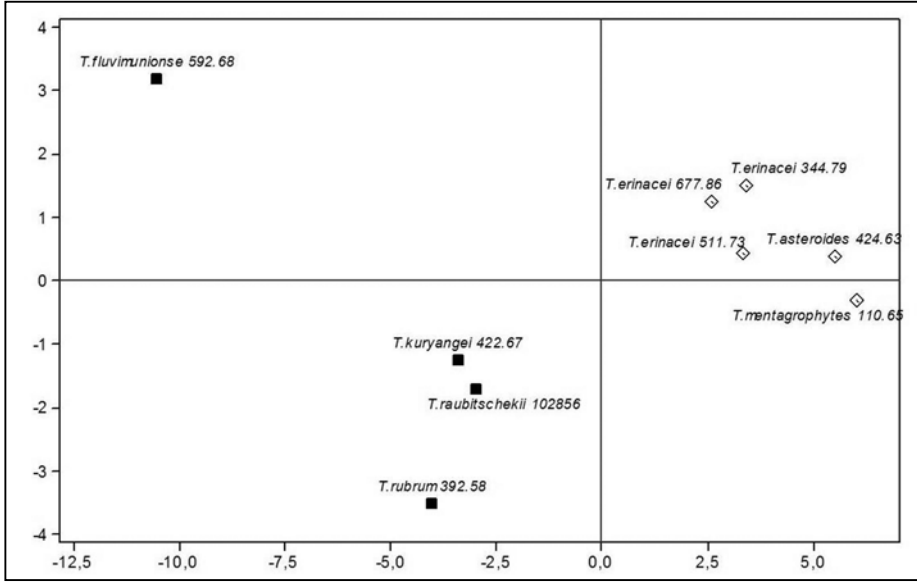
Spectrum® yazılımı ile "*.spc" formatında elde edilen tüm veriler Origin 8.0 (Northampton, ABD) programında örneklendi ve Minitab 16.0 (Lead Tech, ABD) istatistik programına aktarıldı. Veriler öncelikle temel bileşenler analizi (Principal Component Analysis; PCA) ile değerlendirildi. Verilerdeki toplam varyansın %90 ve daha fazlasını açıklayan temel bileşen sayısı belirlendikten sonra yeteri sayıda temel bileşen vektörü kullanılarak hiyerarşik kümeleme analizi (Hierarchical Cluster Analysis; HCA) ile örneklerin kümelenme eğilimleri incelendi. HCA analizinde, kümeleme metodu için Ward algoritması ve sayısal aralık için karesel öklidyan uzaklık işlemleri uygulandı. Bu aşamada Tween-80 varlığında dermatofitlerin spektrum verileri incelendi⁶.

Türler arası ayırım oluşturan bölüm pencerelerinde elde edilen veri değişimlerinin, bir türe ait kökenler için aynı şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini saptamaya yönelik olarak; Tween-80 içeren ve içermeyen dermatofit kökenlerinin verileri incelendi. Taksonomik ayırım yaptığı düşünülen bölüm pencerelerinin spektral verilerine HCA analizi uygulandı. Bu yöntemde yukarıdaki işlemde farklı olarak orta noktalama (centroid) algoritması seçildi. Elde edilen değerler dermatofit kökenlerinin Tween-80 ile inkübasyon etkisinin yokluğu ve varlığındaki üremeleri esnasında değişim gösteren nokta-sayısal verilerini oluşturdu. Bu verilere eşleşmiş örneklerde t-testi analizi yapılarak *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* kökenlerindeki tür içi değişim verileri değerlendirildi. İstatistiksel hata payı (p) 0.05 olarak alındı.

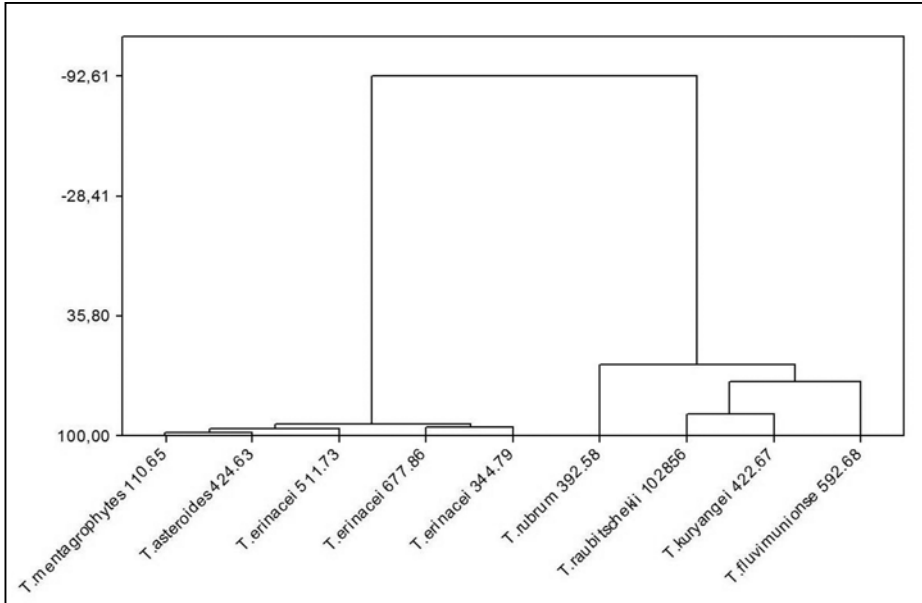
BULGULAR

Çalışmada, beş *T.mentagrophytes* ve dört *T.rubrum* kökeninin FT-IR spektrum verileri ile farklı pencere aralıklarının doğrudan spektral veri değerlendirmesinde, türlerin ayırımında yardımcı olacak bölgeler belirlenememiştir. Buna karşın, iki spektral veri noktası arasındaki değişimi gösteren ikinci derece türev verilerinde farklılıklar gösteren bölümler saptanmıştır. Benzer kimyasal yapı özelliği gösteren farklı bölgeler, aynı sınıflama altına alınarak gruplandırılmıştır. Buna göre Bölge 1: '3920'- '3922' '3914' '3904' '3896' '3890'- '3888' '3880' '3872' '3854' '3840' '3822' '3812' '3796' '3750' '3676' '3670'- '3666' '3650' '3644'- '3642' '3628' '3600' '3568' cm^{-1} ; Bölge 2: '3346' '3338' '3334'- '3332' cm^{-1} ; Bölge 3: '2982'- '2980' '2974' cm^{-1} ; Bölge 4: '1416'- '1414' '1410'- '1406' cm^{-1} ; ve Bölge 5: '1174' cm^{-1} olarak tanımlanmıştır. Bölge aralıklarının birlikte kullanımı ile türlerin birbirlerinden ayrılabilirdiği görülmüştür (Şekil 1,2).

Tween-80+ ortamda inkübe edilen türlerin FT-IR spektroskopisine bölgesel etkisine yönelik PCA grafiklerinin istatistiksel incelemesinde; Tween-80+ ortamda üreyen *T.mentagrophytes* kökenlerinde lipid kök yapılarının spektral analiz bölgelerinde değişiklikler görülürken, *T.rubrum* kökenlerinde incelemeye alınan spektral analiz bölgelerinin

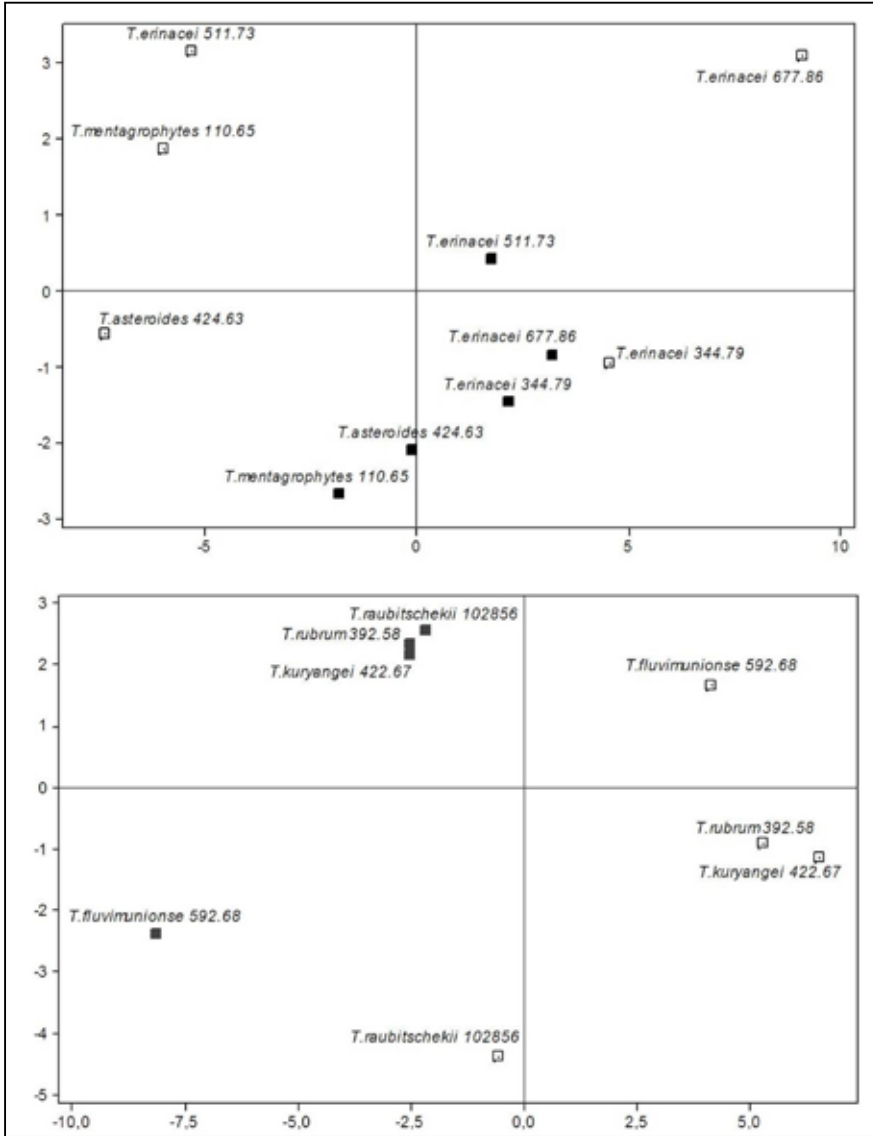


Şekil 1. *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* morfolotiplerinin beş farklı bölgeden FT-IR spektroskopisi verilerinin temel bileşenler analizi ile ayrımı.

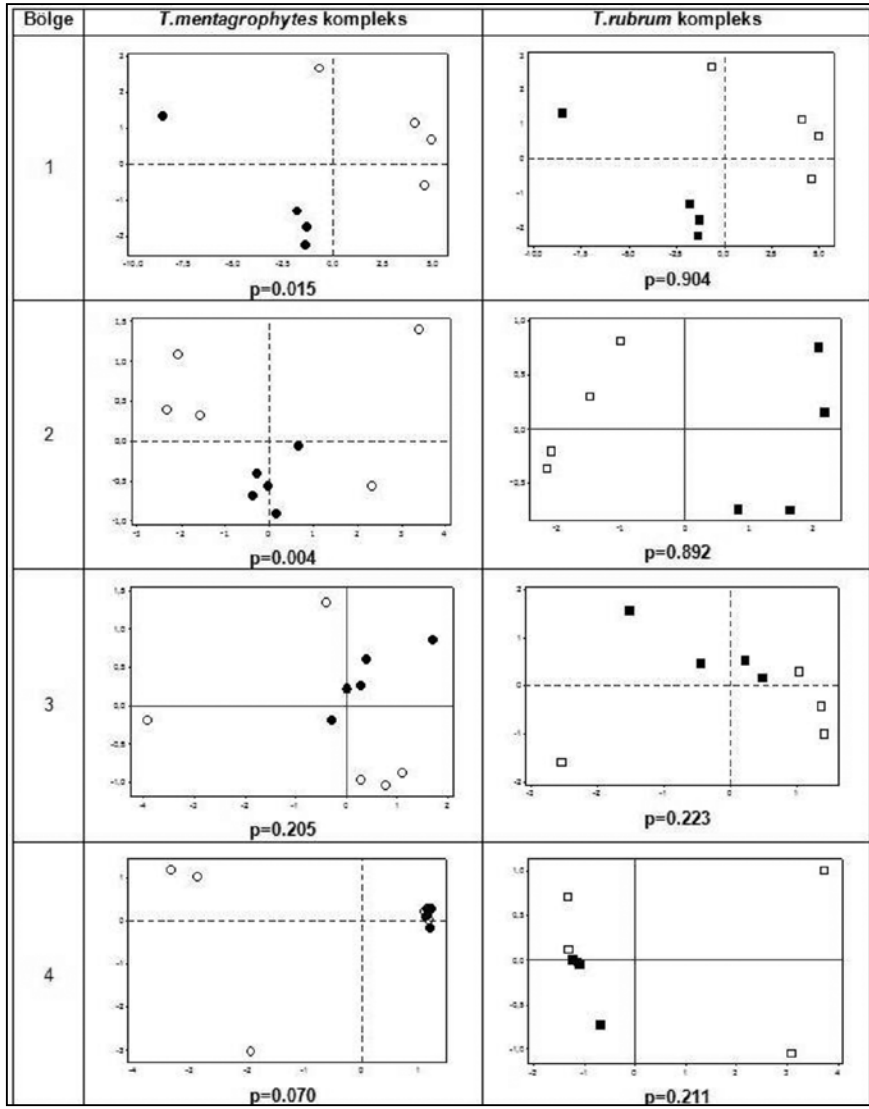


Şekil 2. *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* morfolotiplerinin beş farklı bölgeden FT-IR spektroskopisi verilerinin hiyerarşik kümeleme analizi ile elde edilen dendrogramı.

hiçbirisinde fark görülmemiştir (Şekil 3). Bu farklılığı oluşturan verilerin *T.mentagrophytes* kaynaklı olduğu saptanmıştır ($p= 0.025$). Tween-80⁺ ortamda üretilen *T.mentagrophytes* kökenlerinde lipid bağ gerilimi gösteren spektrumların daha çok bulunduğu ve Tween-80⁻ ortamda üretilen kökenlerden farklı bölgelerde (Bölge 1 ve Bölge 2) yer aldığı saptanırken, bu değişimlerin *T.rubrum* kökenlerinde olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 3. Orta noktalama (centroid) algoritması ile Tween-80 bulunmayan (içi boş) ve bulunan (içi dolu) ortamlarda grupların kendi içlerindeki dağılımlarının değerlendirilmesi [*T. mentagrophytes* kökenleri (üstte) için $p= 0.025$; *T. rubrum* kökenleri (altta) için $p= 0.269$].



Şekil 4. *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* türlerinin farklı spektral bölgelerde Tween-80 bulunmayan (içi boş) ve bulunan (içi dolu) ortamlarda üretilerek yapılan HCA analizinde grupların değerlendirilmesi (Bölge 1: 3920-3568 cm^{-1} ; Bölge 2: 3346-3332 cm^{-1} ; Bölge 3: 2982-2974 cm^{-1} ; Bölge 4: 1416-1406 cm^{-1}).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* kompleks üyelerinin FT-IR spektroskopi tekniği ile tür düzeyinde ayrımı için yeni ve otomasyona uygun bir yöntem sunulmuştur. Çalışma verileri, rutin uygulamada pratik olarak kullanılabilir manuel ve ucuz spektroskopik bir cihaz için yazılım algoritmasındaki dalga boylarını belirtmektedir. Halen kullanımda olan kızılötesi spektroskopik ölçüm yapılabilen cihazlardan da bu sayısal veri-

ler kolaylıkla alınabilmektedir. Bununla birlikte, klinik örnekten izole edilen herhangi bir kökenin, Tween-80⁺ ortamda tekrar inkübe edilmesi gereği ve son tanımlama için zamana ihtiyaç olması, daha önceki tanısal yöntemlerde de karşılaşılan önemli bir sorundur.

Sunulan araştırmada, FT-IR spektrada lipid bileşiklere karşılık absorpsiyon alan bölgele-
rin yoğun olarak bulunduğu dalga boylarında farklılıklar gözlenmiştir. Bir hipotez olarak, Tween-80⁺ ortamda üretilen dermatofitlerin, kimyasal olarak parçaladıkları Tween-80'i hücre duvar yapısına alarak, hücre kompozisyonunda saptanabilir değişim olduğu öne sürülebilir. Ayrıca, iki farklı tür arasındaki farklılıkların, test edilen spektral aralıklara göre değerlendirilmesi, türlerin ayırımında kullanılmaktadır. Buna göre beş farklı grup spektral bölgenin değerlendirilmesinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılabılır:

1. 3920-3568 cm⁻¹ arasını içeren FT-IR spektrumlarında; 3900-3550 cm⁻¹ bölgesinde gözlenen gerilme frekansları assosiyasyon (birleşme) olmamış O-H titreşimlerini ve intramoleküler hidrojen bağlarının varlığını işaret etmektedir. Özellikle 3700-3580 cm⁻¹ aralığında ortaya çıkan gerilme titreşimleri serbest alkollerin varlığını da ortaya koymaktadır¹³.

2. 3346-3332 cm⁻¹ arası; protein yapısındaki N-H gerilme titreşimlerinin gözlemlendiği 3340-3330 cm⁻¹ bölgesi ayrıca NH₂ ve COOH gruplarının bulunduğu yapılarda karşımıza çıkan (N-H) gruplarının varlığına işaret eden rezonansların ~3300 cm⁻¹ ortaya çıktığını belirtmektedir. Aynı zamanda proteinlerde gözlenen zwitter iyon formuna ait karakteristik (C=O) frekansı yaklaşık 1600 cm⁻¹'de ortaya çıkmakta ve bu yapının overtone bandları ise yaklaşık 3500 cm⁻¹ görülmektedir¹⁴. Sunulan araştırmada elde edilen ayırım özelliklerinin bu bölgeden kaynaklandığı, bu bölgedeki farklılıkların bir önceki bölgeyi de etkilediği anlaşılmaktadır. Tween-80 molekülünün parçalanarak *T.mentagrophytes* hücre duvarı yapısında farklılaşmaya neden olduğu, ancak bu özelliğin *T.rubrum* morfotiplerinde bulunmadığı saptanmıştır (Şekil 4).

3. 2982-2974 cm⁻¹ arasına karşılık olarak; 2980-2970 cm⁻¹ bölgesinde karşımıza çıkan rezonanslar alifatik karbon iskeletindeki CH₂ gerilme frekanslarını ve beklenildiği gibi bu grupların varlığını ortaya koymaktadır¹⁵. Bu grubun verileri, hücre duvarındaki alifatik karbon yapılarında morfotip grupları arasında farklılık olmadığını düşündürmektedir (Şekil 4).

4. 1416-1406 cm⁻¹ arasına karşılık olarak; alifatik karbon iskeletindeki CH₂ gruplarının varlığını işaret eden eğilme titreşimlerinin görüldüğü 1416-1400 cm⁻¹ bölgesi; ayrıca, protein ve yağ yapısındaki bileşiklerde bulunan -C=O gruplarına komşu CH₂ formlarının bulunduğunu göstermektedir. Yağ formunda gözlenen ve karboksilat grubuna ait (C=O) titreşimleri de yine bu bölgede (1405 cm⁻¹) ortaya çıkmaktadır¹³. Bir önceki gruba benzer şekilde, morfotipler arasında yapısal karbon iskeletlerinin farklı olmadığı görülmektedir (Şekil 4).

5. Diğer bir bölge olan 1174 cm⁻¹; yağ ve proteinlerde gözlenen -C-O gruplarına ait eğilme titreşimlerini ve bu grupların yanı sıra alkol ve ester gruplarının varlığını da ifade etmektedir¹⁵. Bu bölge verisi, grup olmadığı için morfotipler arası farklılıklar değerlendirilememiştir.

Mantar hücre duvarının komplike yapısı, tipik olarak kitin, 1,3- β -glukan ve 1,6- β -glukan ile birlikte mannoproteinleri içerir. Hem konidya faz hem de miçel evresinde bu elementler bulunmakla birlikte oranları değişkendir^{7,16}. Protein tabanlı bir yapının konidyalı kaplayacak şekilde *Trichophyton* sporlarında da bulunduğu gösterilmiştir⁷. Ayrıca miçel ve konidya evrelerindeki metabolik aktivite farklılıkları, dış ortamdaki zorlayıcı etkenlere bağlı olarak değişmektedir. Buna en iyi örnek; stresden koruyucu mantar metabolizması ile kontrol edilerek mantarın kendi genini aktiflemesi sonucunda hücre duvarının kuru kitlesi içindeki oranı artan trehalozdur^{7,17}. *T.rubrum* kökenlerindeki proteomik çalışmaları, çevresel ortamdaki şartlara (kuruluk, ısı, oksidatif stres, ozmotik stres, açlık, ilaçlar, ortamdaki tuz stresi, protein yapı hasarı, metal iyonları, DNA hasarı vb.) bağlı olarak mantar yapısının değiştiğini göstermiştir⁷. *T.rubrum* kökenlerinin pre-germinasyon evresinde öncü olarak bekleyen genlerin, germinasyon ile birlikte aktifleşerek, eksternal ve/veya abiyotik uyarılara yanıt, transkripsiyon, biyolojik işleyişin kontrolü, hücre haberleşmesi, çoğalma, metabolizma, sinyal iletimi ve protein sentezi gibi farklı işlevlere sahip proteinleri eksprese ettiği gösterilmiştir^{7,18}. Bu veriler ile karşılaştırılabilecek benzer araştırma sonuçları henüz *T.mentagrophytes* kompleks için bulunmamaktadır.

Tween-80 bulunduran ortamlarda mantarın ekzopolisakkarit yapılarının dağılımının değiştiği bildirilmiştir¹⁰. Yapılan farklı çalışmalar, Tween-80'in mantarlarda hifal üreme ve metabolizma üzerine stimülatör etkisini araştırırken, kültür ortamında Tween-80'in hızla hidrolize olarak ortamda oleik asit yapısının serbest kaldığını, kültür ortamında oleik asidin arttığını göstermiştir^{11,12}. Tween-80 opasite testi, *T.rubrum* ve *T.mentagrophytes* ayırımında kullanımı denenilen ve opasitenin görülme zamanı üzerine odaklanmış bir testtir^{19,20}. Lipid bileşikler hem *T.mentagrophytes* hem de *T.rubrum* tarafından enzim aktivitesiyle parçalanabilmekle birlikte, bu enzim aktivitesinin farklı türler ve/veya morfolotipler arasında farklı olabileceği bildirilmiştir^{21,22}. Zoosporik (veya slime) mantar olarak sınıflandırılan, ancak protista olduğu kabul edilen *Thraustochytrium aureum* ile laboratuvar koşullarında yapılan deneylerde, Tween-80 yapısında bulunan oleik asidin canlı hücre içine alınmasına lipazın etkisi olabileceği ileri sürülmüştür. Aynı zamanda hidrolitik enzimler ile Tween-80'in ester bağlanma bölgesinden parçalanması ve serbest yağ asitleri formunda oleik asidin hücre yapısına alındığı düşünülmektedir²³. Bununla birlikte, Muhsin ve Salih²² araştırmalarında *T.mentagrophytes*'in bir morfolotipi olan *T.erinacei*'de lipaz aktivitesi saptamadıklarını bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada ise, *T.mentagrophytes* kökenlerinin hepsinin Tween-80 ortamda üretilmelerini takiben hücre yapılarında lipid bağlara sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 3,4). Elde edilen bu verilere göre, *T.mentagrophytes* kompleks üyelerinin hücre yapısında bulundurduğu lipid fraksiyonların, slime mantarlardan farklı olarak ester bağlarından hidrolize olan Tween-80 yolağından farklı bir mekanizma ile olabileceği öne sürülebilir.

Çalışma bulgularına göre; spektral analizde lipid bağ bölgelerinde görülen gruplar arasındaki farklılık, Tween-80 besiyerinde üreyen *T.mentagrophytes* kökenlerinin hücre duvarında, *T.rubrum* kökenlerine göre daha fazla lipid kök içeren bileşik bulundurduğunu göstermektedir. Ancak, dermatofitlerin morfolotip farklılıklarının bulunması ve inkübasyon süresine bağlı olarak kökenlerin morfolojik farklılıklar göstermesi, sonuçların yorumunu

zorlaştırmaktadır. Verilerimiz, *T.mentagrophytes* ve *T.rubrum* kompleksin ayırımında, kökenlerin ürediği besiyerlerine Tween-80 ilave edilmesi ile FT-IR spektroskopinin tek başına ayırım gücü bulunabileceğine işaret etmektedir. Yeni planlanacak araştırmalar ile farklı dermatofit kökenlerine ilişkin verilerin karşılaştırılması yararlı ve yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008; 166(5-6): 239-56.
2. Nenoff P, Erhard M, Simon JC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry - a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol* 2013; 51(1): 17-24.
3. Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol* 2013; 20: 336-51.
4. Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; 166(5-6): 307-17.
5. Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF. Identification of dermatophytes by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Mycoses* 1999; 42(9-10): 525-8.
6. Ergin Ç, İlkit M, Gök Y, Özel MZ, et al. Fourier transform infrared spectral evaluation for the differentiation of clinically relevant *Trichophyton* species. *J Microbiol Methods* 2013; 93(3): 218-23.
7. Leng W, Liu T, Li R, et al. Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia. *BMC Genomics* 2008; 9: 303.
8. Evans DF, Wennerström H (eds). *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. 1999, John Wiley & Sons Inc, New York.
9. Ogino K, Masahido A (eds). *Mixed Surfactants Systems*. 1993, Marcel Dekker, New York.
10. Rose DL, Tully JG, Bové JM, Whitcomb RF. A test for measuring growth responses of mollicutes to serum and polyoxyethylene sorbitan. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43(3): 527-32.
11. Nascimento AE, Shariá AEN, Lima MAB, Campos-Takaki GM. A cytochemical study of acid carbohydrates on the surface of *Candida lipolytica* grown in Tween 80-containing medium. *Braz J Microbiol* 2000; 31(1): 30-6.
12. Cui JD, Zhang YN. Evaluation of metal ions and surfactants effect on cell growth and exopolysaccharide production in two-stage submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 168(6): 1394-404.
13. Silverstein RM, Webster FX. *Spectroscopic Identification of Organic Compounds*. 1997, 6th ed. John Wiley & Sons, New York.
14. Kemp W (ed). *Organic Spectroscopy*. 1991, 3th ed. William Publication, Hampshire ELBS, UK.
15. Erdik E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*. 1998, 2.baskı. Gazi Kitabevi, Ankara.
16. Schmit JC, Brody S. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol Rev* 1976; 40(1): 1-41.
17. Thevelein JM. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* 1984; 48(1): 42-59.
18. Liu T, Zhang Q, Wang L, et al. The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination. *BMC Genomics* 2007; 8: 100.
19. Slifkin M, Cumbie R. Evaluation of the Tween opacity test for the identification of dermatophytes. *Med Microbiol Lett* 1996; 5(8): 401-7.
20. Ates A, Ozcan K, İlkit M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Med Mycol* 2008; 46(8): 811-22.

21. Muhsin TM, Aubaid AH, al-Duboon AH. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses* 1997; 40(11-12): 465-9.
22. Muhsin TM, Salih TH. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. *Mycopathologia* 2001; 150(2): 49-52.
23. Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S, Hayashi M. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J Biosci Bioeng* 2011; 111(4): 420-4.