

**TİTREŞİM SPEKTROSKOPİSİ İLE
MİKROBİYAL İDENTİFİKASYON**

Yüksek Lisans Tezi

Görkem BAKIR

Eskişehir, 2016

TİTREŞİM SPEKTROSKOPİSİ İLE MİKROBİYAL İDENTİFİKASYON

Görkem BAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. M. Türkay AYTEKİN AYDIN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Temmuz, 2016

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1304F076 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Görkem BAKIR' ın “Titreşim Spektroskopisi İle Mikrobiyal İdentifikasyon” başlıklı tezi 20/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
Üye :	Yrd. Doç. Dr. M. Türkay AYTEKİN AYDIN
Üye :	Prof. Dr. S. Elif KORCAN
Üye :	Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ
Üye :	Yrd. Doç. Dr. Semra MALKOÇ

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

TİTREŞİM SPEKTROSKOPİSİ İLE MİKROBİYAL İDENTİFİKASYON

Görkem BAKIR

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz, 2016

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. M. Türkay AYTEKİN AYDIN

Bu çalışmada ökaryotik mikroorganizmaların titreşim spektroskopisi ile identifikasyonu amaçlanmıştır. Titreşim spektroskopisi kızılötesi ve Raman spektroskopi yöntemleri olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Bu iki yöntem birbirine bağlı olmasına rağmen kızılötesi ve Raman spektrumları tam olarak aynı değildir ve her biri kendine has özelliklere sahiptir. Çalışmada beş maya ve üç dermatofit fungus Sabouroud dextrose agar (SDA) besiyerinde geliştirilmiş ve FT-IR ve Raman spektroskopisi ile profil analizleri yapılmıştır. Raman spektroskopisi ile SERS analizinde sinyal artışı gözlenmiş ve analiz sonrası elde edilen spektrumlar SPSS istatistik programı yardımıyla Hiyerarşik Küme Analizi yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan mayaların; *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Trichosporon asahii* bir kümede ve dermatofit küflerin; *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* ayrı bir kümede toplandığı gözlenmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri gümüş nanopartiküller ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim gücünün hücre duvarının biyokimyasal yapısına bağlı olduğu sonucunu vermiştir.

Anahtar Sözcükler: Raman Spektroskopi, FTIR, SERS, İdentifikasyon, SEM, SPSS

ABSTRACT

MICROBIAL IDENTIFICATION WITH THE VIBRATIONAL SPECTROSCOPY

Görkem BAKIR

Department of High Technologies

Anadolu University, Graduate School of Sciences, July, 2016

Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. M. Türkay AYTEKİN AYDIN

In this study, identification of eukaryotic microorganisms was aimed by using vibrational spectroscopy. Two methods of vibrational spectroscopy are Infrared and Raman. Although these two methods are connected to each other, the infrared (IR) and Raman spectra are not exactly the same and, each has its own characteristics. Five species of yeasts and three species of dermatophytes were grown on SDA and their profiles were analyzed by FT-IR and Raman spectroscopy. The signal enhancement was observed via SERS, which is the method of Raman spectroscopy, and the spectra obtained was compared using Hierarchical Cluster Analysis by SPSS statistics programme. It was observed that yeasts; *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Trichosporon asahii* congregated in one cluster and the dermatophytes; *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* congregated in another cluster. It was concluded that, the silver nanoparticles and the strength of the interaction between the cell walls of the microorganisms depend on the biochemical structure by looking at the images taken from scanning electron microscope (SEM).

Keywords: Raman spectroscopy, FT-IR, SERS, Identification, SEM, SPSS

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar tecrübesi ve bilgileriyle yönlendiren, yardım ve katkılarını benden esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Kıymet GÜVEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezim süresince her türlü tecrübe desteğini gördüğüm, sorularımı yanıtlamaktan rahatsızlık duymayan, bana disiplinler arası çalışma fırsatı sunan Fizik Bölümündeki çok değerli ikinci danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Meryem Türkay AYTEKİN AYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardım ve dayanışmalarından ötürü tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, arkadaşlarıma ve hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Beni bu zamana kadar destekleyen, güvenen ve bugünlere gelmemde büyük payı olan sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürler.

Görkem BAKIR

Temmuz, 2016

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Görkem BAKIR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Fungusların Genel Özellikleri.....	1
1.2. Fungusların Sınıflandırılması	4
1.2.1. <i>Candida</i> türleri	4
1.2.2. <i>Trichosporon</i> türleri.....	6
1.2.3. Dermatofitler.....	7
1.2.3.1. <i>Trichophyton</i>	7
1.2.3.2. <i>Microsporum</i>	8
1.2.3.3. <i>Epidermophyton</i>	8
1.3. Geleneksel Fungal Tanı Yöntemleri.....	8
1.3.1. Direkt mikroskopik değerlendirme	8
1.3.2. Kültür	9
1.3.3. Biyokimyasal testler	10
1.3.3.1. Karbonhidrat asimilasyon testi	10
1.3.3.2. Nitrat asimilasyon testi	10
1.3.3.3. Karbonhidrat fermentasyon testi	10
1.3.3.4. Üreaz testi	11
1.3.4. Serolojik testler	11
1.4. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	11

1.4.1. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri	12
1.4.2. Sinyal amplifikasyon teknolojileri.....	13
1.4.2.1. Southern-Blotting.....	13
1.4.2.2. Northern Blotting.....	14
1.4.2.3. In-Situ Hibridizasyon	14
1.4.2.4. Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)	14
1.4.2.5. DNA ‘‘microarray’’ yöntemi	14
1.4.2.6. Sekanslama (dizi analizi).....	15
1.5. Spektroskopik Yöntemler.....	15
1.6. Moleküler Titreşimler.....	16
1.6.1. Esneme titreşimleri (stretching).....	17
1.6.2. Bükülme titreşimleri (bending).....	17
1.7. Titreşim Spektroskopisi.....	18
1.7.1. Kızılötesi spektroskopisi	19
1.7.1.1. Katıların kızılötesi spektrumlarının alınması	19
1.7.1.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometresi.....	21
1.7.2. Raman spektroskopisi.....	23
1.7.2.1. Raman spektroskopisinin teorisi	24
1.7.2.2. Raman spektroskopisi cihazı	25
1.7.2.3. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)	25
1.7.2.4. Raman spektroskopisinin biyolojik uygulamaları.....	28
2. MATERYAL VE METOD.....	31
2.1. Materyal.....	31
2.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	31
2.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	32
2.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar	32
2.2. Metod.....	34
2.2.1. Klinik öneme sahip kültürlerin katı besiyerinde geliştirilmesi ve saklanması	34

2.2.2. Mikroorganizmaların süspansiyon haline getirilmesi ve FT-IR analizi	34
2.2.3. Gümüş nitrat (SERS) çözeltisinin hazırlanması	35
2.2.4. Mikroorganizmaların Raman spektroskopisi için hazırlanması ..	35
2.2.5. Raman ve kızılötesi spektrumlarının karşılaştırılması ve değerlendirilmesi.....	36
2.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analiz.....	36
3. BULGULAR	37
3.1. Mikroorganizmaların FT-IR Profilleri.....	37
3.2. Mikroorganizmaların Raman Spektrumları.....	39
3.2.1. Mikroorganizma konsantrasyonu	40
3.2.2. <i>C. albicans</i> 'ın Raman spektrumları.....	40
3.2.4. <i>C. tropicalis</i> 'in Raman spektrumları	43
3.2.5. <i>C. krusei</i> 'nin Raman Spektrumları	46
3.2.6. <i>C. parapsilosis</i> 'in Raman Spektrumları	48
3.2.7. <i>T. asahii</i> 'nin Raman Spektrumları.....	51
3.2.8. <i>M. canis</i> 'in Raman Spektrumları	53
3.2.9. <i>T. mentagrophytes</i> 'in Raman Spektrumları.....	56
3.2.10. <i>T. rubrumi</i> 'nin Raman Spektrumları	58
3.3. Mikroorganizmaların Taramalı Elektron Mikroskobu Analizleri	61
3.4. Raman ve FT-IR Spektrumlarının Hiyerarşik Küme Analizi.....	63
4. TARTIŞMA, SONUÇ, ÖNERİLER.....	67
KAYNAKÇA	75
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Fungus Hücre Duvarında Yer Alan Polisakkaritler.....	3
Tablo 1.2. Kızılötesi Grup Dalga Sayıları.....	19
Tablo 1.3. Mikrobiyal identifikasyon için Çeşitli Raman Spektroskopisi Uygulamaları.....	30
Tablo 2.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Makroskopik-Mikroskopik Görünümleri ve Temin Edildikleri Yerler	31
Tablo 3.1. Biyolojik FT-IR Bant Frekansları.....	37
Tablo 3.2. <i>C. albicans</i> 'in Raman Bant Frekansları	42
Tablo 3.3. <i>C. tropicalis</i> 'in Raman Bant Frekansları	45
Tablo 3.4. <i>C. krusei</i> 'nin Raman Bant Frekansları	47
Tablo 3.5. <i>C. parapsilosis</i> 'in Raman Bant Frekansları	50
Tablo 3.6. <i>T. asahii</i> 'nin Raman Bant Frekansları.....	52
Tablo 3.7. <i>M. canis</i> 'in Raman Bant Frekansları	55
Tablo 3.8. <i>T. mentagrophytes</i> 'in Raman Bant Frekansları	57
Tablo 3.9. <i>T. rubrum</i> 'un Raman Bant Frekansları.....	60
Tablo 3.10. Raman Spektrumlarına Göre Yapılan Küme Analizi	65
Tablo 3.12. FT-IR Spektrumlarına Göre Yapılan Küme Analizi.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Tipik Maya Hücresinin Şematik Gösterimi.....	3
Şekil 1.2. Mayaların Hücre Duvarı Bileşenleri	4
Şekil 1.3. Titreşim Türleri	18
Şekil 1.4. Bir Mull Numunenin Potasyum Bromür (KBr) Pencere Arasına Sıkıştırılmasının Şematik Diyagramı	20
Şekil 1.5. Fourier Transform Kızılötesi Spektrometresi Tekniğinin Basit Şeması	22
Şekil 1.6. FT-IR Spektrometresinin Şeması	23
Şekil 1.7. Raman Saçılmasını Gösteren Enerji Seviye Diyagramı.....	25

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. Çalışmada Kullanılan Kızılötesi Spektrometresi Cihazı (FL 145 FT-IR ve Raman Laboratuvarı)	33
Görsel 2.2. Çalışmada Kullanılan Raman Spektrometresi Cihazı (FL 145 FT-IR ve Raman Laboratuvarı)	33
Görsel 2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu Cihazı (Anadolu Üniversitesi FL 023 Taramalı Elektron Mikroskobu Laboratuvarı (SEM)).....	34
Görsel 2.4. SERS Ölçümü İçin Hazırlanan, Lam Üzerine Damlatılmış Mikroorganizma Süspansiyonları	36
Görsel 3.1. Mikroorganizmaların Karşılaştırmalı FT-IR Profilleri.....	38
Görsel 3.2. Mikroorganizmaların FT-IR Profilleri.(A)1000-1500 cm^{-1} arası B) 3100-2700 cm^{-1} arası).....	39
Görsel 3.3. <i>C. albicans</i> 'ın Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı Raman Spektrumları.....	41
Görsel 3.4. <i>C. albicans</i> 'ın Farklı Konsantrasyonlardaki Raman Spektrumları	42
Görsel 3.5. <i>C tropicalis</i> 'in Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumlar	44
Görsel 3.6. <i>C tropicalis</i> 'in Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları.....	44
Görsel 3.7. <i>C. krusei</i> 'nin Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları.....	46
Görsel 3.8. <i>C. krusei</i> 'nin Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları.....	47
Görsel 3.9. <i>C. parapsilosis</i> 'in Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları.....	49

Görsel 3.10. <i>C. parapsilosis</i> 'in Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları	49
Görsel 3.11. <i>T. asahii</i> 'nin Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları	51
Görsel 3.12. <i>T. asahii</i> 'nin Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları.....	52
Görsel 3.13. <i>M. canis</i> 'un Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları	54
Görsel 3.14. <i>M. canis</i> 'un Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları.....	54
Görsel 3.15. <i>T. mentagrophytes</i> 'in Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları	56
Görsel 3.16. <i>T. mentagrophytes</i> 'in Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları..	57
Görsel 3.17. <i>T. rubrum</i> 'un Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları	59
Görsel 3.18. <i>T. rubrum</i> 'un Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları	59
Görsel 3.19. A)Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan <i>C. albicans</i> 'ın SEM görüntüsü (5.000X büyütme). B)Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan <i>C. parapsilosis</i> 'in SEM görüntüsü 15.000X Büyütme	62
Görsel 3.20. Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan <i>T. mentagrophytes</i> 'in SEM görüntüsü A)10.100X Büyütme B) 58.000X Büyütme	62
Görsel 3.21. Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:50 oranında karıştırılan <i>C. tropicalis</i> 'in SEM görüntüsü (20.000X Büyütme) B) Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan <i>T. asahii</i> 'in SEM görüntüsü (15.000X Büyütme)....	63
Görsel 3.22. Farklı Konsantrasyonlardaki Mikroorganizmaların Raman Profillerine Göre Yapılan HCA Analizi	64

Görsel 3.23. Mikroorganizmaların Raman Profillerine Göre Yapılan HCA Analizi	65
Görsel 3.24. Mikroorganizmaların FT-IR Profillerine Göre Yapılan HCA Analizi.....	66
Görsel 4.1. Literatürdeki Gen Çalışmalarına Göre Hiyerarşik Kümeleme Analizi	71
Görsel 4.2. Raman sonuçlarına göre elde edilen Hiyerarşik Kümeleme Analizi.....	72
Görsel 4.3. FT-IR Sonuçlarına Göre Elde Edilen Hiyerarşik Kümeleme Analizi	72

1. GİRİŞ

İdentifikasyon, "tanıma" anlamına gelir ve izole edilmiş bir mikroorganizmanın cins ve türünün (ya da serotipinin) belirlenmesi anlaşılır. Mikroorganizmalar farklı şekillerde hayatımızda önemli bir etkiye sahip olduğundan, nasıl tespit edilecekleri, bu organizmaların karakterize edilmesi ve tehditlerini önlemek için aktivitelerinin nasıl kontrol edileceğini düşünmek gerekir. Mikroorganizmaların tespiti ve identifikasyonu klinik tıp, gıda güvenliği ve çevre kirliliğini kontrol etmek amacıyla büyük önem taşımaktadır. Bir mikroorganizmanın hızlı identifikasyonu gerçekleştirildiği zaman genel sağlık maliyetlerinin ve ölüm oranlarının önemli ölçüde azaldığı kanıtlanmıştır. Mikrobiyal identifikasyonda en çok kullanılan mevcut yöntemler Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA-DNA Hibridizasyonu, Yağ Asidi Metil Esterlerinin Analizi gibi zor, deneyim isteyen, uzun süre alan ve maliyetli yöntemlerdir. Bu nedenle özellikle tıp, gıda gibi hızlı tanı gerektiren diğer alanlarda mikroorganizmanın hızlı ve ucuz identifikasyonu tercih edilmektedir.

Raman ve kızılötesi (infrared, IR) spektroskopik yöntemleri son zamanlarda biyokimyasal karakterizasyon, hızlı identifikasyon ve geniş bakteri çeşitleri, türleri ve strainlerin geniş bir yelpazede doğru sınıflandırılmaları için cazip bir yaklaşım olarak popülerlik kazanmıştır. Raman Spektroskopisi, hiçbir numune hazırlamayı gerektirmeyen sadece küçük bir numunenin ölçüm için yeterli olduğu ve genellikle numuneye zarar vermeyen bir yöntemdir.

Bu çalışmada klinik öneme sahip bazı mikroorganizmaların titreşim spektroskopisi ile identifikasyonu amaçlanmıştır. SERS yönteminde kullanılan gümüş nanoparçacıklar ile mikroorganizma arasındaki etkileşimin sonucunda hızlı ve doğru identifikasyon hedeflenmiştir. Bu çalışmada test edilen dermatofit küflerin identifikasyonunda bu yöntem ilk defa denenmiştir.

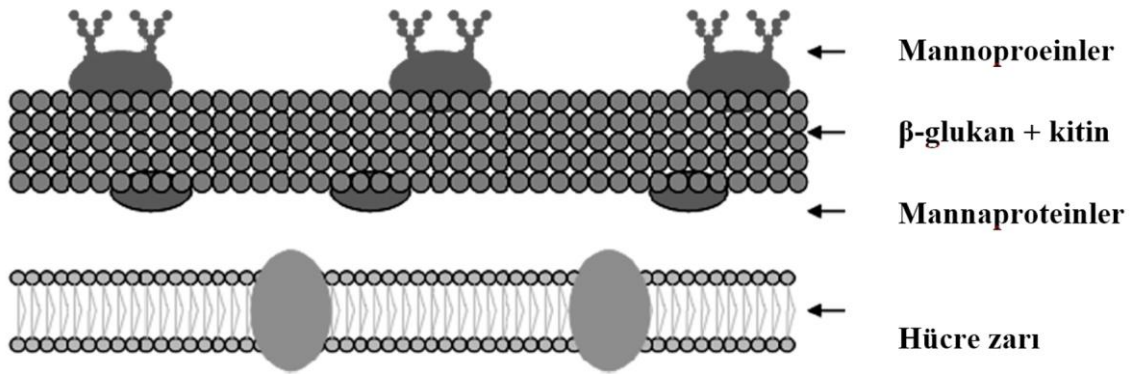
1.1. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar bitki ve hayvanlardan farklılık gösteren gerçek bir çekirdeğe sahip ökaryotik canlılardır (Onur 2009; Tümer 2011). Fotosentetik pigmentleri yoktur ve tek hücreli (mayalar) veya filamentlidirler (küfler). Diğer birçok farklılığın yanında protozoanların aksine hücre duvarına sahiptirler ve spor üretirler. Hücre duvarlarında bulunan kitin ve selüloz özelliği ile bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılırlar (Onur, 2009).

Fungusların 3 büyük grubu vardır: Küfler, Mayalar ve Mantarlar (Martinko, 2010). Maya formu fungusların tek hücreli gelişimini yansıtır. 3-15 µm çapta olup, yuvarlak veya elipsoit şekillidirler. Tomurcuklanma (blast formasyonu) veya ikiye bölünme ile çoğalırlar. Bir maya hücresinin bir veya birkaç noktasından tomurcuklanma olur, olgunlaşan yapı ana hücreden koparak yavru hücreyi oluşturur. Yavru hücreye blastokonidyum denir. Bazı mayalarda oluşan blastokonidyumlar ana hücreden ayrılmadan ardı ardına uzar. Bir ana hücreden peşi sıra oluşan yavru hücrelerin oluşturduğu uzantıya yalancı hif (pseudohif) denir (Tümer 2011). Hifte boğumlar bulunmaz. Ancak yalancı hifte boğumlar oluşur. Mayaların birçoğu yalancı hif oluştururken, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* ve *Rhodotorula*'da bu yapı görülmez (Karaltı, 2011).

Küf formu funguslar ise çok hücreli, kalın, 2-10 µm çapta dallanan paralel duvarlı tüp benzeri hücre uzantıları olan hiflerden oluşurlar (Tümer, 2011). Bu filamentli yapılar (hifler) bölmeli (septumlu) veya bölmesiz (septumsuz, sönosit) ve sık dallıdırlar. Her bir hif hücre çeperi ile sarılmıştır ve sadece uç kısımlardan büyürler. Dallanmış hiflerin oluşturduğu topluluklara misel denir ve miseller gözle görülebilir (Güven, 2011). Besiyerlerinde türlere göre farklı renk ve görünüm oluştururlar.

Bazı fungal hücre duvarları bitki hücre duvarı polisakkariti olan selülozu yapılarında bulundursalar da çoğu fungus hücre duvarı glukoz türevi olan N-asetilglukozaminden yapılmış kitin içerir. Bazı fungal hücre duvarlarında kitin yerine galaktozanlar, mannanlar ve kitozanlar gibi diğer polisakkaritler bulunur. Farklı fungus türlerinde birkaç çeşit polisakkaritin değişik kombinasyonları görülür. Fungal hücre duvarları tipik olarak %80-90 oranında polisakkarit olup proteinler, lipidler, polifosfatlar ve inorganik iyonlar hücre duvarının yapısında bulunur (Martinko, 2010). Hücre duvarı hücreye şekil verir ve osmotik şoktan korur ve antijenik özelliktedir. Fungusların hücre duvarında yer alan polisakkaritler Tablo 1.1 de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. *Mayaların Hücre Duvarı Bileşenleri*

Kaynak: *Sayın, 2009*

1.2. Fungusların Sınıflandırılması

Yeryüzündeki funguslar spor yapılarına, hif yapılarına, eşey özelliklerine göre 5 taksonomik sınıfa ayrılırlar. *Candida*'lardan; eşeyli üreme göstermeyen türler Deuteromycetes içinde yer alırken, eşeyli üreme gösteren türler, Ascomycetes içinde sınıflandırılmaktadır (Onur, 2009).

- a) Ascomycetes (Keseli Funguslar)
- b) Basidiomycetes (Şapkalı Mantarlar)
- c) Zygomycetes (Ekmek Küfleri)
- d) Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)
- e) Oomycetes (Nem Küfleri) (Karaltı,2011)

1.2.1. *Candida* türleri

Candida türleri insanlar üzerinde etkileri olan en yaygın fungal patojenlerdir. İnsan deri ve mukozanın normal florasında bulunurlar. Normal bireylerin %30-50'sinin ağzında ve gastrointestinal kanalında yer alırlar. Uygun şartlarda patojenite kazanarak akut-kronik enfeksiyonlara neden olurlar.

Candida cinsi içinde yaklaşık 200 tür olmasına rağmen tıbbi önemi olan *Candida* türlerinin sayısı azdır. Bu durumun nedeni %65'nin insan vücut ısısında üreyememesidir. Bunlar: *C. albicans* (en sık saptanan tür), *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* (*C. kefyr*), *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. utilis*, *C. ciferrii*, *C. zeylanoides*, *C.*

pulcherrima ve *C. stellatoidea*'dır. Bu listedeki üyelerin sayıları gün geçtikçe artma eğilimindedir (Yiş, 2007).

Candida türleri 3-6 µm büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanma gösteren, beyazdan krem rengine kadar değışen koloniler oluşturan (SDA besiyerine) ve yalancı hif (pseudohif) oluşturan funguslardır (Onur, 2009). Sabouraud dekstroz agar (SDA) gibi rutin besiyerlerinde oda ısısında veya 37°C'de 24 saat içinde genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli; uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat ya da parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar. *C. krusei*'nin ise pürtüklü ve kuru kolonileri vardır (Yiş, 2007).

Candida hücreleri; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, mitokondri, ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciğı ve membran ile çevrili nukleustan oluşur. *Candida*'lar plazma membranının dışına yerleşmiş olup, hücreyi ozmotik değışikliklere karşı koruyan, besin alımında rol oynayan ve konak hücreyle ilişkileri düzenleyen bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı fungus hücresinin biçimini, morfogenezini, virulansını, fungus-konak etkileşimini ve antifungallere duyarlılığını belirleyen dinamik ve kompleks çok tabakalı bir yapıdır. Fungus hücresinin maya, hif gibi büyüme formlarındaki tipik şekillerini korumasından sorumludur. Ayrıca mikroorganizma ile konak arasındaki etkileşimin başlangıç aşamasında aracılık eder. Maya veya hif şekilleri esasen kitin ve selüloz içeren sert yapılı bu dış tabakada büyüme formlarının çeşitli aşamalarında fungusun gereksinimlerine uygun bileşim ve oranlarda glukanlar, peptidomannanlar, polisakkaritler ve glikoproteinler bulundurulur.

Elektron mikroskopik çalışmalara göre *Candida*'ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşümü sürecinde bu sayı ve kalınlık değışir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoprotein kalınlaşır ve fibriler oluşumlar artar. Hücre duvarı %80-90 oranında karbohidratlardan oluşur. Proteinler %6-25, lipidler %1-7 ve kitin %8.5-9 oranındadır. Hücre duvarında polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin bulunmakta olup, polisakkaritlerin %40-85'ini mannan oluşturur. Bunların göreceli miktarları morfolojiye göre değışir. Mannoz polimerleri, yapısal polimerler olan β-glukanlar ve kitinin içine gömüldüğü hücre duvarının amorf matriksini oluşturur.

Candida hücre duvarında en büyük oranda bulunan bileşikler olan karbonhidratlar, β -glukan, mannan ve kitindir. β -glukan dallanmış β -1,3 ve β -1,6 glukoz polimerlerinden, kitin ise dallanmamış β -1,4 N-asetil glukozamin polimerlerinden oluşur. Hücre duvarının en önemli bileşeni mannopteinler olup, proteinlerle kovalan bağlar yapan mannoz polimerlerinden meydana gelir. Mannan, hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturmakta, hücre duvarının ana antijenik yapısı olarak serolojik testlerde sıklıkla kullanılmaktadır. β -1,6 glukozan hücre duvar yapısının diğer bileşenleri için aracı rol oynarken, β -1,3 hücreye şeklini vererek katılığı sağlar. Kitin ise hücre duvarının en az ancak önemli bir bileşendir. Şekerler arasında yer alan hidrojen bağları ile bağlanmış uzunlamasına yapıları kitin molekülleri mikrofibrilleri oluşturur. Maya hücrelerinde kısa zincirler olarak görülen bu mikrofibriller hif duvarlarında uzun karmaşık zincirler olarak yer alırlar. Glikolipidler hücre duvar sentezi, sinyal ileti yolları ve hücre antijenleri olarak önemli işlevlere sahiptir.

Hücre membranı, sterol olarak ergosterol ve zimosterol içermektedir. Bunlardan ergosterol diğer biyolojik membranlarda bulunmadığı için antifungal ilaçların bağlanabileceği iyi bir hedefdir. Ergosterol hücre membranının geçirgenliği, akışkanlığı, bütünlüğü için düzenleyici olarak işlev görmektedir (Onur, 2009).

1.2.2. *Trichosporon* türleri

Trichosporon cinsi, basidiomycetous maya benzeri mikroorganizmalardır. Basidiomycota sınıfındaki, Hymenomyces takımının, Tremelloidae alt takımının, Trichosporonales ailesinde yer almaktadırlar. *Trichosporon* türleri çoğu besiyerinde kolayca ürerler. Katı besiyerlerinde maya benzeri, hızlı büyüyen, pürüzsüz, buruşuk, zeminden kabarık, kadifemsi, kırılabilir, mat, mumsu, beyaz, sarımsak beyaz veya krem rengi koloniler oluştururlar. Koloninin buruşukluğu zamanla daha da belirginleşir. Üreaz enzim üretimi bu türler için tipiktir. *Trichosporon* türleri mısır unu Tween 80 agarda 25°C'de 72 saat inkübasyondan sonra bol miktarda pseudohif ve hif oluştururlar. Blastokonidyumları tek hücreli ve değişken şekildedir. En tipik mikroskopik özellikleri tek hücreli ve genellikle kübik, fiçimsi veya uzun görünümlü artrokonidyum oluşturmalarıdır. Bu özellikleriyle *Candida* ve blastokonidyumlarıyla *Geotrichum* türlerinden ayırt edilirler. *Trichosporon* türlerinin hücre duvarında *Cryptococcus*'a benzer olarak glukuronoksilomannan (GXM) bulunmaktadır. GXM, 1,2-bağlı xyloze

artıklarına ve 1.4-bağlı mannoz kısa yan zincirlerine bağlanmış 1,3-bağlı mannan zinciridir. Ayrıca, fungal hücre duvarı için özel bir polisakkarit bileşeni olan 1,3-β-D-glukan (BDG) içerirler. *Trichosporon* türleri gastrointestinal sistem, üriner sistem, deri normal florasında ve doğada bulunmaktadır. Taksonomide yapılan son değişikliklerle insanlarda yüzeysel enfeksiyonlara neden olanlar *Trichosporon asteroides* ve *Trichosporon cutaneum*; beyaz piedraya neden olanlar ise *Trichosporon ovoides* ve *Trichosporon inkin* olarak isimlendirilmiştir. İnvaziv enfeksiyonlara neden olanlar *T. asahii* ve *T. mucoides* olarak ayrılmıştır (Colombo, 2011; Tümer, 2011; Aydın, 2012; Demir 2013).

1.2.3. Dermatofitler

Dermatofitler, insan ve hayvanların deri, saç, kıl ve tırnak gibi yüzeysel keratinize dokularını infekte ederek besin kaynağını bu dokuları sindirerek elde eden filamentöz funguslardır. Dermatofitler, sadece insan ya da hayvanları infekte ederek canlılığını devam ettiren fungus türleridir. Oluşturdukları enfeksiyona ‘dermatofitozis’ denir. Tinea ya da ringworm (saçkıran) olarak bilinen hastalık, dermatofitlerin dokuyu parçalamak için salgıladıkları enzimlere karşı konakçının verdiği bir reaksiyonun sonucudur. Deri tutulumu ile deride kepeklenme, vezikül oluşumu ve bazen iltihaplanma; kıl ve saç tutulumu ile bunların kırılması, dökülmesi; tırnakların tutulumu ile şekil ve yapılarının bozulması söz konusu olup tinea denilen tipik lezyonlar oluştururlar. Bir kısmı doğada saprofit olarak bulunur, çeşitli yollarla insan ve hayvanlara bulaşır. Konidium oluşumlarına göre üç cinse ayrılırlar (Tanış, 2008).

1.2.3.1. *Trichophyton*

Katı ortamlarda üreyen kolonileri, pamuğumsu örgüde küf kolonileri oluşturur. Pigment üretimi tür ayırımında önemlidir. Mikrokonidiumlar genellikle bulunur ve tür ayırımında yardımcı olur. Şekilleri yuvarlak, armut veya lobut şeklindedir. Makrokonidiumları ince duvarlı olmakla beraber kalın duvarlı da olabilirler, hücre sayısı 1-12 arasında değişir. Genellikle silindir, uçları küt, bazen fuziform şeklindedir. Tek veya demetler halinde olabilirler. Ultraviyole ışığı altında floresans vermezler. Bu cinse ait funguslar deri, saç ve tırnağı infekte ederler.

1.2.3.2. *Microsporum*

Gevşek yün görünümünde koloni oluştururlar. Mikrokonidiumlar hifin kenarları boyunca teker teker dizilmiş armut veya lobut şeklindedir. Makrokonidiumlar uçları sivri, hücre sayısı 1-15 arasında değişir. Bu genusun türleri saç ve deriyi infekte ederler.

1.2.3.3. *Epidermophyton*

Kıvrımlı küf kolonileri yaparlar, ortası tümsek yüzeyi ışınal oluklar oluşturur. Oluşturduğu pigment sarıdan zeytin yeşiline kadar değişir. Mikrokonidium oluşturmazlar, makrokonidiumlar düz duvarlı lobut şeklindedirler. İkili üçlü kümeler oluştururlar, 1-9 bölmelidirler. *E. floccosum* genusun tek patojenidir. Deri ve tırnakları infekte eder, saçlı deride infeksiyon oluşturmazlar. Wood ışığı (nikel oksitli filtreden geçen UVA ışığıdır) altında floresans vermezler (Aşcı, 1992; Ustaçelebi, 1999; Tanış 2008.)

Dermatofitler, ortalama 22-26 °C de üreme gösterirler. Fakat *T. verrucosum* en iyi 37 °C de üreyebilmektedir ve geç ürerler (1-4 hafta). Üreme hızları dermatofit türüne göre değişmektedir. Optimal olarak pH 5.6'da ürerler. Üretilibilmeleri için özel besiyerlerine gereksinim duyarlar. En uygun besiyerleri Sabouroud dekstroz agar (SDA), Patates dekstroz agar (PDA) ve Mycobiotik agardır. Bu besiyerleri, yüksek oranda şeker konsantrasyonu içerir. Azot kaynağı olarak peptonu, karbon kaynağı olarak glukozu kullanırlar. Saprofit küfler dermatofitlerden daha hızlı üremektedir. Bundan dolayı besiyerlerine kontaminasyonu engellemek için antibiyotik ilave edilmesi gerekmektedir (Aşcı, 1992; Tanış 2008).

Dermatofitler infekte dokulardan alındığında mikroskopik incelemede hif parçaları ve artrosporlar şeklinde görülürler. İn vitro koşullarda ise ayırt edici yapı özellikleri ortaya çıkmaktadır. Bu yapılar, makrokonidiumlar, mikrokonidiumlar, raket hifler, spiraller, favus şamdani, klamidosporelar ve nodüllü organlardır (Aşcı, 1992; Tanış 2008).

1.3. Geleneksel Fungal Tanı Yöntemleri

1.3.1. Direkt mikroskopik değerlendirme

Kültür işleminin uzun süre gerektirmesi nedeniyle direkt mikroskopik inceleme çok önemlidir. Mikroskopik incelemede genellikle maya ve küf varlığı açısından ilk veriler elde edilir. Tomurcuklanan maya hücreleri ve yalancı hif oluşumu çoğu *Candida* ve

Trichosporon türü için karakteristiktir. Yalancı hif olmaksızın sadece tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesi, *Candida glabrata*, *Cryptococcus* türleri, *Rhodotorula* türleri ve *Histoplasma capsulatum* için ipucu olabilir. Septalı ya da septasız, dikotom ya da dik açılı dallanan hif benzeri yapıların görülmesi durumunda küften şüphelenilmelidir. Septalı ve dikotom dallanma gösteren hiflerin görülmesi durumunda ilk değerlendirmede *Aspergillus* türleri akla gelmelidir. Ancak bu görünüm *Aspergillus* türleri için karakteristik değildir. *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* ve *Penicillium* gibi küflerde de görülebilmektedir. Hyalen funguslar şeffaf ve renksiz hifler oluşturdukları halde esmer funguslar kahverengi ya da siyah renkli septalı hifler oluştururlar (Karaltı, 2011).

Direkt mikroskopik inceleme için Gram, % 10-20'lik potasyum hidroksit, laktofenol pamuk mavisi, çini mürekkebi gibi boyalar kullanılır. Direkt mikroskopi sonuçları mutlaka kültür ile doğrulanmalıdır (Karaltı, 2011).

1.3.2. Kültür

Birçok fungusun identifikasyonunda SDA gibi birincil izolasyon besiyerindeki koloni özellikleri ve mikroskopik morfolojileri temel alınır (Karaltı, 2011). SDA dışında; koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar, Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar, inhibitör mold agar gibi besiyerleri de kullanılabilir. Bu besiyerleri içine sikloheksimit gibi antimikotikler ilave edilerek kontaminant saprofit fungusların; kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilerek de bakterilerin üremesi engellenmektedir (Yiş, 2007).

Koloni karakteristikleri olarak; i) koloninin yüzey (havasal miçel gibi) ve taban rengi; ii) yüzey yapısı (düz, yün gibi, pudramsı, mumsu, granüler, süetimsi, kadifemsi, tüylü, kabarık); iii) koloninin topografisi (düz, yassı, kabarık, ısınsal, beyinimsi ve krater şeklinde); iv) üreme hızı değerlendirilir. Üreyen etyolojik etkenlerin ince yapılarını incelemek için mısır unu agar ve Patates Dekstroz Agar besiyerlerinde lam kültürleri yapılabilir. Bu besiyerlerindeki pigmentasyon da identifikasyon için ayırıcıdır (Solgun, 2007).

Mayalar için optimum inkübasyon ısısı 37°C iken, küfler için 20-26°C'dir. Optimum pH mayalar için 3.0-7.5; küfler için 2.2-9.0 arasındadır. Mayaların tanımlanması için çeşitli biyokimyasal testler yapmak gereklidir. Bunun için günümüzde

özgüllüğü ve duyarlılığı çok yüksek ticari kitler bulunmaktadır. Küflerin tanımlanması için ise çeşitli teşhis kitaplarından yararlanılmaktadır (Karaltı, 2011).

1.3.3. Biyokimyasal testler

Herhangi bir organizmanın tespiti, her türün kendine birçok biyokimyasal reaksiyonu gerçekleştirebilme yeteneğine bakılarak yapılabilir. Bunlar herhangi bir enzimatik aktiviteyi gerçekleştirebildiğini tespit edebilen uygulamalardan, karbonhidratın fermente edilip edilmediği gibi uygulanan bazı biyokimyasal testler ile farklı türlere ayrılabilir. Mayalar ve diğer funguslar için hızlı biyokimyasal sistemler geliştirilmiştir. Biyokimyasal testlerin bir sınırlaması mutasyonlardır. Bunlar farklı özellikte strainlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Çok sayıda test kullanılmadıkça, bir organizma doğru şekilde tanımlanamayabilir. VITEK 2 Compact System ve Biolog gibi otomatik biyokimyasal test sistemleri hızlı identifikasyon sağlayan test sistemlerine örnektir (Güven, 2011).

1.3.3.1. Karbonhidrat asimilasyon testi

Mayaların karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı oksijen varlığında kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Bu test Wickerman ve Burton gibi rutinde pek kullanılmayan metodlarla yapılabileceği gibi, çeşitli otomatize ve yarı otomatize ticari sistemler kullanılarak da uygulanabilir (Onur, 2009).

1.3.3.2. Nitrat asimilasyon testi

Karbonhidrat asimilasyon testine benzer ve mayaların nitrojen kaynağı olarak nitrata kullanma yeteneklerini ortaya koyar (Onur, 2009).

1.3.3.3. Karbonhidrat fermentasyon testi

Fermentatif funguslar karbondioksit ve alkol oluştururlar. Gaz oluşumu ve pH'da değişiklik olmaması fermentasyonu gösterir. Bu test değişik *Candida* türlerini, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türlerinden ayırmada yararlıdır (Onur, 2009).

1.3.3.4. Üreaz testi

Bu test *Candida*'ların üreaz enzimi üretebilme kapasitelerini gösterir. Uygun substrat varlığında üre, üreazla parçalanarak amonyağı oluşturur. Oluşan amonyak pH'ı yükseltir ve fenol red indikatöründe renk değişimine bağlı olarak kehribar renginden pembemsi bir renge dönüşür (Onur, 2009).

1.3.4. Serolojik testler

Fungus enfeksiyonlarında serolojik testlerin rutin tanıda kullanımı henüz tam olarak yaygınlaşmamıştır. Serolojik testler, fungus enfeksiyonlarının tanısı yanında, hastanın tedaviye cevabının değerlendirilmesinde, hastalık ilerlemesinin gösterilmesinde kullanılabilir. Serolojik testlerin bir kısmı fungus antijenlerine karşı oluşan antikorların gösterilmesine yöneliktir. Diğerleri ise fungus antijenlerinin ve metabolik ürünlerin gösterilmesi esasına dayanır. Antijen ve antikorların birlikte araştırıldığı yeni kombine testler daha özgül sonuçlar verir. Kandidozun tanısında tek başına kullanılacak bir test bulunmamaktadır. Tek örnekten elde edilen sonucun duyarlılığının düşük olması nedeniyle literatürde bir anlaşma oluşmamıştır. Bu nedenle birden çok ardışık örneğin test edilmesi gereklidir. Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar, klinik bulgular ve kan kültür sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir (Tümer, 2011).

1.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

Fungal DNA'nın analizi, antikor belirleyen testlere göre immun sistem fonksiyonundan bağımsızdır ve antikor yanıtı oluşmadan önce erken tanıyı sağlayabilir. Moleküler biyolojik testlerin diğer bir avantajı, birden fazla etkenin neden olduğu enfeksiyonlarda organizmaları tür düzeyinde tanıma yetenekleridir. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) kan örneklerinde 1 kob/ml'ye kadar fungusları belirlemede duyarlı olduğu bildirilmektedir.

Ayrıca epidemiyolojik amaçlarla izolatlar arasındaki genotipik farklılıkların ortaya konmasında, antifungal direnç gibi virulans faktörlerinin varlığının genotipik olarak saptanmasında, genom baz dizisi ve mutasyon analizinde ve taksonomik incelemelerde kullanılmaktadır. Fungal yükün çok az olması sebebiyle kültür ve serolojik tanının henüz yetersiz olduğu evrede, PCR temelli tanı yöntemlerinin çok daha etkin olacağı görülmektedir (Onur, 2009).

Mikoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen fungusların klinik örnekte kültürü yapılmadan önce kısa sürede ve doğru olarak saptanması ve/veya klasik yöntemler ile kültürde üretilmiş olan fungusun hızlı tanımlanmasıdır. Cins düzeyinde tanımlama birçok küfler için yeterli olabilirken, özellikle antifungal ajanlara dirençli olan bazı fungusların tür düzeyinde identifikasyonu önemli bir gereksinimdir. Bu nedenle fungusların doğru ve hızlı identifikasyonu, uygun antifungal sağaltıma erken dönemde başlanması açısından önem taşımaktadır. Moleküler yöntemler; tanı yanında fungusların cins veya tür düzeyinde tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, antifungal direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır. Fungusların hızlı identifikasyonu için halen çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmekte olup, yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Moleküler tanı yöntemleri; nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ve hibridizasyon probelarnın kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri olmak üzere iki grupta toplanabilir (Yiş, 2007).

1.4.1. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir.

Bir mikroorganizma geleneksel yöntemler ile kültür edilemediğinde, enfeksiyona neden olan etmen tanınmayabilir. Ancak, polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction =PCR) olarak adlandırılan teknik, elektroforez ile test edilebilecek seviyede mikrobiyal DNA miktarını çoğaltmak için kullanılabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu ya da PZR, moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Spesifik bir mikroorganizma için bir primer kullanıldığında, amplifiye sayısı artmış DNA'nın varlığı mikroorganizmanın var olduğunu işaret eder.

PCR, bir çeşit "in vitro klonlama"dır. PCR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon) ve daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon) takiben, zincirin uzaması (polimerizasyon) ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanması ile gerçekleşir.

Bu üç adım (denatürasyon/primer bağlanması/uzama) bir PCR döngüsünü oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir (Güven, 2011).

PCR yönteminin hızlı sonuç vermesi ve duyarlılığının yüksek olmasına karşın kullanılan malzemenin pahalı, tekniklerin karmaşık oluşu, kullanımının deneyim gerektirmesi gibi nedenler ile halen, kültür ve serolojik yöntemler gibi klasik identifikasyon uygulamalarının yerini alamamıştır (Yiş, 2007).

Günümüzde Real-time PCR, Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Roche Group, Indianapolis, Ind.) ve benzeri teknolojiler ile bir saatten kısa sürede sonuç alınabilmekte, amplifikasyon ve saptama kapalı bir sistemde gerçekleştirilmekte, böylelikle çapraz kontaminasyon riski ortadan kaldırılmaktadır (Yiş, 2007).

1.4.2. Sinyal amplifikasyon teknolojileri

Hibridizasyon; etkene ait genetik yapının işaretli “probe”lar yardımı ile ortaya konmasını amaçlar. “Probe”lar; hedef nükleik asitlerin belirli bölgelerine komplementer, genellikle 50 bp’den küçük oligonükleotitlerdir. Fungal identifikasyon için Southern blot, Northern blot, dot blot ve in situ hibridizasyon teknikleri ile çalışılmıştır. Nükleik asit hibridizasyon “probe”larının kullanıldığı bu yöntemler kültür doğrulaması için sık kullanılmaktadır. Fungusların tanımlanması için hazırlanmış ticari genetik “probe”lar özellikle kültürde üremiş küflerin tanımlanmasında tanı değeri bulmaktadır. Ancak DNA üzerindeki hedef bölgelerin sınırlı sayıda olması nedeni ile direkt etkene özgün “probe” hibridizasyon testlerinin duyarlılığı düşüktür (Yiş, 2007).

1.4.2.1. Southern-Blotting

Ekstrakte edilen DNA, restriksiyon enzimleri ile kesilir ve kesimden elde edilen DNA parçaları elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde uzunluklarına göre göç ettirilmektedir. Jeldeki DNA’lar nitroselüloz veya naylon membran üzerine aktarılarak işaretleme (blotting) işlemi gerçekleştirilmektedir. Son olarak özgül DNA dizilimlerinin yeri işaretli DNA veya RNA “probe”ları kullanılarak belirlenmektedir. Southern-Blotting tekrarlanabilirliği, tiplendirebilirliği ve ayırım gücü yüksek bir teknik olsa da uygulaması zor ve zaman alıcıdır (Yiş, 2007).

1.4.2.2. Northern Blotting

RNA ekstraksiyonunu takiben, elde edilen RNA parçalarının elektroforezle jelde göç ettirilmesi, nitroselüloz veya naylon membran üzerine aktarılması ve “Southern-Blotting” yöntemindekine benzer şekilde hibridizasyon ve bu membrandaki özgül RNA dizilimlerinin belirlenmesini içeren bir yöntemdir. Özgül RNA dizilimlerinin belirlenmesi için farklı tiplerde “probe”lar seçilebilir (Yiş, 2007).

1.4.2.3. In-Situ Hibridizasyon

Doku, organ ve hücrelerdeki özgül nükleik asitlerin belirlenmesinde kullanılan bir hibridizasyon yöntemidir. Yöntem sürecinde kullanılan DNA veya PNA “probe”ları direkt olarak raportör molekül ile işaretlenir. Yöntemin en önemli avantajı, hücre ve doku içindeki hedef nükleik asitin lokalizasyonunun belirlenmesine olanak sağlaması olup, histopatolojik incelemelerden sonra uygulanabilmesi de diğer bir avantajıdır (Yiş, 2007).

1.4.2.4. Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)

SSCP, iki farklı dizinin hibridize olması sonucu ortaya çıkan heterodupleks molekülde yer alan DNA konformasyonundaki farklılığın belirlenmesi esasına dayanır. Polimorfik DNA bölgeleri işaretli öncüller ile çoğaltılıp, ısı ile denatürasyonu takiben ayrılan sarmalların birleşmesini engellemek için buzda bekletilir. Elektroforez uygulaması sırasında bu yapılar kendi üzerlerine katlanarak yeni bir yapı kazanırlar ve elektroforetik mobiliteleri bu yapı tarafından belirlenir. Elektroforez paterni, öncüllerin işaretlendiği maddeye göre röntgen filminde veya otomatize sistemlerle belirlenir. Bu yöntem ile DNA’daki tek bir mutasyon bile gösterilebilmekte, kısa sürede çok sayıda örnek ile çalışılabilmektedir. Bu teknik DNA sekanslamasına alternatif bir yöntem olup, otomatize edilerek rutin kullanıma geçebilme potansiyeline sahiptir (Yiş, 2007).

1.4.2.5. DNA “microarray” yöntemi

Oligonükleotit “microarray”, katı destek faz üzerinde yerleştirilmiş oligonükleotit gruplarını içeren minyatür araçlardır. Çözelti halindeki işaretli ürün katı bir substrat üzerinde immobilize edilmiş tamamlayıcı dizi ile hibridize olduktan sonra “array” görüntüsü elde edilmekte ve görüntüdeki her eleman için sayısal bir değer çıkarılıp bilgisayar programları ile değerlendirilmektedir (Yiş, 2007).

1.4.2.6. Sekanslama (dizi analizi)

DNA dizi analizi, fungusların alternatif bir tanımlama yöntemidir. Kültürde üretilmiş veya klinik örneklerde etken olan fungusların tanınması amacıyla kullanımı gittikçe daha çok önem kazanmaktadır.

DNA dizi analizinde Taq DNA polimeraz, revers transkriptaz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenmektedir. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, 3' ucunda OH grubu taşımayan ddNTP eklendiğinde zincir uzaması durmaktadır. Kalıp DNA'lar, öncüller, dNTP karışımı ve enzimin konulduğu dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylelikle reaksiyon tüplerinde farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçalarına poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmaktadır. DNA dizi analizi sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asit dizisi veri tabanından bilinen diziyile karşılaştırılır. Yöntem teknik olarak karmaşık olup, gelişmiş laboratuvar olanakları gerektiren, pahalı bir yöntemdir. Ancak gelecekte kullanımını artacak ümit verici bir teknik olarak güncelliğini korumaktadır.

Dizi analizi verileri ile fungusların tanımlanması ve diğer funguslarla olan filogenetik ilişkisi belirlenebilmektedir. Bu yöntem ile mayaların identifikasyonu için geçen süre 24-36 saattir (Yiş, 2007).

1.5. Spektroskopik Yöntemler

Mikroorganizmaların hızlı ve doğru identifikasyonu için, her hangi bir uzmana gerek olmayan, çok iş gücü gerektirmeyen yeni yaklaşımlar son zamanlarda artış göstermiştir. Kütle spektroskopisi (MS) uygulaması, mikroorganizmanın belirli bir türüne özgü biyomoleküllerinin saptanmasını amaçlamıştır (Zolotov, 2012). MALDI-TOF Kütle spektroskopisi de mikroorganizmaların hızlı identifikasyonu için kullanılmaktadır (Prohaska 2013; Loucif 2014). Bu yöntem iş gücü gerektirmeden yüksek tekrarlanabilir ölçümler sağlar ancak tahrip edici ve pahalı bir yöntemdir (Akyar, 2011). Diğer bir yöntem LIBS (Laser-induced breakdown spectroscopy), laboratuvar testleri,

alan tanımlama ve mikrobiyolojik örneklerin identifikasyonu için umut verici bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Diğer spektroskopik yöntemlere göre başlıca avantajı, çok az miktarda örnek kullanılarak az ya da hiç örnek hazırlanması gerektirmeden hedefin elemental kompozisyonunun karakterini tespit eder (Lewis, 2011). LIBS bu özelliği bakımından Raman spektroskopisine benzer.

Titreşim spektroskopisi tekniklerinden, kızılötesi (IR) ve Raman spektroskopisi mikroorganizmalardaki moleküllerin titreşim modlarının dikkatli bir şekilde incelenmesi ile mikroorganizmaların identifikasyonunu gerçekleştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Hamasha, 2011).

Mikroorganizmaların ayrımı için kızılötesi spektroskopisi ile yapılan çalışmalar 1950'lerde görülmektedir. Ancak dağılımlı kızılötesi spektroskopisinin zayıf performansı nedeniyle yaklaşık 20 yıl atıl durumda kalmıştır. Daha sonra modern interferometrik kızılötesi spektroskopisi geliştirilmiştir. Fourier dönüşüm teknikleri ve düşük maliyetli verimli bilgisayarlar yeni araştırmalara ilham vermiştir. 1991 yılında Naumann ve ark. (1991) mikroorganizmaları identifiye etmek, sınıflandırmak ve ayırt etmek için Fourier transform kızılötesi spektroskopisinin (FTIR) kapasitesini bir makalede belirtmiştir. Bu çalışma, aynı takımın birlikte yayınladığı diğer bütün çalışmalara referans olmuştur. Daha sonraki 10 yılda ise FTIR ile mikroorganizmaların karakterizasyon çalışmalarını sürdürmüşlerdir (Mariey, 2001).

1.6. Moleküler Titreşimler

Bir molekülün yapabileceği titreşim sayısı yani molekülün titreşim serbestlik derecesi molekülü oluşturan atom sayısı ile ilgilidir. N atomlu bir molekülde her atomun konumu x, y, z yer değiştirme koordinatları ile verilir. Bir molekülün her bir atomunun aynı fazda ve aynı frekansta titreşmesi her atomun maksimum yer değiştirme konumuna aynı zamanda ulaşması ve her atomun kendi denge konumundan aynı zamanda geçmesi anlamına gelir. Bu özelliklere sahip titreşim moduna temel (normal) titreşim modu, frekansına ise temel titreşim frekansı adı verilir. N atomlu bir molekülün $3N$ tane serbestlik derecesi vardır. Lineer olmayan bir molekül için yani molekül açılı ise molekül içindeki olası titreşimlerin sayısı $(3N-6)$ 'dır. Eğer molekül lineer ise yani açılı değil ise olası titreşimlerin sayısı $(3N-5)$ 'dir. Örneğin üç atomlu lineer olmayan su (H_2O) molekülü için toplam serbestlik derecesi 9 olup bunlardan, 3 tanesi eksen etrafında

dönme, 3 tanesi de eksen boyunca öteleme hareketine aittir. Dolayısıyla su molekülü için olası titreşim sayısı $3N-6 = 3$ olur. CO₂ ise üç atomlu lineer bir molekül olup toplam serbestlik derecesi 9' dur. Bu serbestlik derecelerinden 3 tanesi eksen boyunca öteleme 2 tanesi ise eksen etrafında dönme hareketine ait olduğu için CO₂ molekülü için olası titreşim sayısı $3N-5 = 4$ tür (Aydın, 2005).

Moleküler titreşimler genel olarak esneme ve bükülme titreşimleri olarak iki gruba ayrılır.

1.6.1. Esneme titreşimleri (stretching)

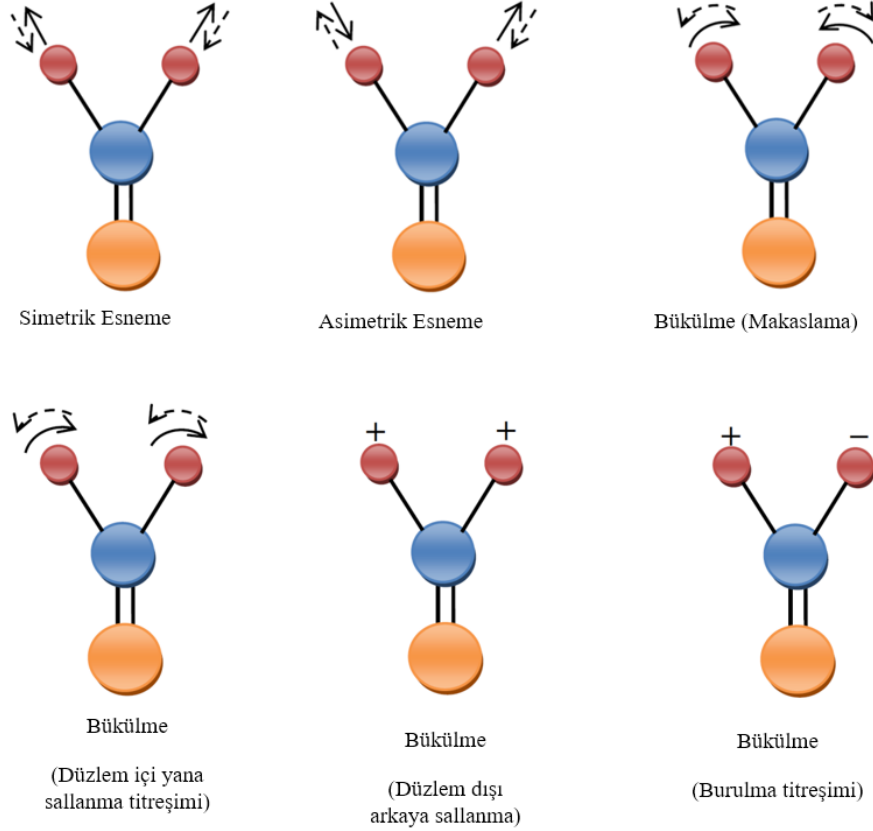
Esneme, bağ eksenini boyunca ritmik bir harekettir ve simetrik veya asimetrik olabilir. Molekülün bütün bağlarının uzaması veya kısılması simetrik esneme titreşimidir. Bağlardan bir veya birkaçı uzarken diğerlerinin kısılması da asimetrik esneme titreşimidir. Bu titreşimde, bağların uzaması veya kısılması bükülme titreşimine göre daha zor olduğu için diğer titreşimlere göre daha çok enerjiye sahiptir.(Hamasha, 2010)

1.6.2. Bükülme titreşimleri (bending)

Bükülme titreşimleri iki bağ arasındaki bağ açısının değişmesi veya bir grup atomun molekülün geriye kalan atomlarına göre hareketinden dolayı gözlenir. Açılıma veya azalmaya göre artma veya azalma şeklinde çizilir. Bükülme titreşimleri kendi içinde gruplara ayrılır.

- a. **Makaslama titreşimi (scissoring)** : İki bağ arasındaki açının değişmesidir.
- b. **Düzlem içi yana sallanma titreşimi (rocking)**: İki bağ arasındaki açının bir bağ ile bir grup atom arasındaki açının değişmesi ile oluşan titreşim hareketidir.
- c. **Düzlem dışı arkaya sallanma titreşimi (wagging)**: Bir bağ ile iki bağın tanımladığı düzlem arasındaki açının değişmesi ile oluşan titreşim hareketidir.
- d. **Burulma titreşimi (twisting)**: Bu titreşimde iki düzlem arasındaki açı değişir. Düzlemler arasında bir mesafe vardır. Yer değiştirme vektörleri bağ doğrultusuna diktir. Tüm simetri işlemleri altında burulma titreşimleri değişmez kalır. Yani bağın deformasyonu söz konusu değildir.

e. **Düzlem dışı bükülme titreşimi (out of plane bending):** Bu titreşimde genellikle simetrik olan bir düzlemin bir atomun hareketi ile yok edilmesidir. Genelde kapalı bir halka oluşturan moleküllerde gözlenir ve genellikle ‘şemsiye’ titreşimi olarak bilinir.



Şekil 1.3. Titreşim Türleri
Kaynak: Hamasha, 2010

1.7. Titreşim Spektroskopisi

Titreşim spektrumları deneysel olarak kızılötesi veya Raman spektrumları şeklinde gözlenir. Bu nedenle titreşim spektrumları kızılötesi veya Raman spektroskopik yöntemleriyle incelemek mümkündür. Kızılötesi ve Raman spektroskopilerinin her ikisinin de çoğunlukla moleküllerdeki titreşim enerji seviyeleri arasındaki geçiş enerjilerini belirlemek için kullanılmasına rağmen temel dayanakları farklıdır. Kızılötesi spektroskopisi uyarıcı ışınla molekülün dipol momentinin değişmesi gerçeğine, Raman spektroskopisi ise ultraviyole veya görünür ışıkla molekülün polarlığının değişmesi gerçeğine dayanır (Aydın, 2005).

1.7.1. Kızılötesi spektroskopisi

Kızılötesi (IR) spektroskopisi maddelerin, elektromanyetik spektrumunun görünür bölge ile mikrodalga bölgesi arasındaki kızılötesi ışınlarını soğurması esasına dayalı bir yöntemdir. Homonükleer moleküller (N₂, O₂, Cl₂ gibi) hariç bütün moleküller kızılötesi ışınlarını soğururlar ve kızılötesi spektrumunu verirler. Kızılötesi ışın molekül ile etkileştiği zaman bu ışın soğurulur ve bu moleküldeki kimyasal bağların titreşmesine neden olur. Kızılötesi spektroskopisi dalga boyuna, dalga sayısına veya frekansa göre yakın, orta ve uzak kızılötesi olmak üzere üç spektral bölgeye ayrılmıştır. Tablo 1.2’ de verilmiş olan bu spektral bölgeler aşağıda kısaca açıklanmıştır. Kızılötesi spektroskopisi ile bir bileşiğin moleküler yapısı hakkında bilgi edinmek mümkündür. Özellikler bir moleküldeki fonksiyonel grupları tanımlamak için kullanılır.

Kızılötesi spektroskopisi genel olarak 25000 nm – 2500 nm dalga boyu aralığındaki kızılötesi ışınlarını kullanır. Bu aralık 3 bölüme ayrılarak incelenir.

Kızılötesi spektroskopisinde ışınlar genellikle dalga sayıları cinsinden ifade edilir. Dalga sayısı $\bar{\nu} = 1/\lambda$ (cm⁻¹) olarak gösterilir. Bu denkleme göre 25000 nm- 2500nm dalga boyu aralığı dalga sayısı cinsinden 4000 cm⁻¹ – 400 cm⁻¹ olur (Aydın, 2005).

Tablo 1.2. *Kızılötesi Grup Dalga Sayıları*

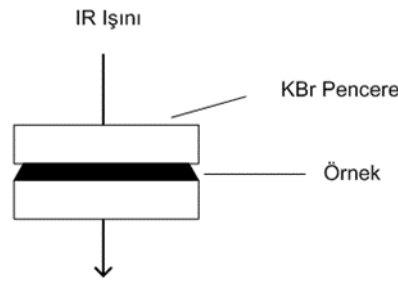
Bölge	Dalga boyu (λ) bölgesi	Dalga sayısı ($\bar{\nu}$) bölgesi
Yakın Kızılötesi	0.78-2.5	12800-4000
Orta Kızılötesi	2.5-50	4200-200
Uzak Kızılötesi	50-100	400-20

1.7.1.1. Katıların kızılötesi spektrumlarının alınması

Katı haldeki numunelerin kızılötesi spektrumları süspansiyon haline getirme yöntemi (mull yöntemi), alkali halojenür disk hazırlama yöntemi veya çözelti haline getirme yöntemi ile alınır.

Katı numuneyi uygun bir sıvı ortamda dağıtma ilkesine dayanan süspansiyon haline getirme yönteminde dağıtma ortamı olarak genellikle sıvı parafin kullanılır. En yaygın kullanılan sıvı parafin nujol yağıdır. Süspansiyon haline getirme yöntemiyle numune hazırlamak için toz halinde az miktardaki numune (yaklaşık 2-3 mg) agat havanda bir iki

damla nujol yağı içinde düzenli bir karışım yani akıcı bir macun (bulamaç) elde edinceye kadar karıştırılır. Elde edilen macun bir potasyum bromür (KBr) pencere üzerine sürülür ve ikinci potasyum bromür (KBr) pencere bunun üzerine kapatılarak macunun homojen bir şekilde yayılması sağlanır. Aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırılan potasyum bromür pencereler özel metalik çerçeveye yerleştirildikten sonra spektrometreye kızılötesi ışınını geçirecek şekilde yerleştirilerek spektrum alınır. Bir mull numunenin potasyum bromür (KBr) pencereler arasına sıkıştırılması şematik olarak Şekil 1.4' de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Bir Mull Numunenin Potasyum Bromür (KBr) Pencereler Arasına Sıkıştırılmasının Şematik Diyagramı

Kaynak: Aydın, 2005

Nujol yağının kızılötesi spektrumunda 2900 cm^{-1} , 1475 cm^{-1} ve 1375 cm^{-1} ' de kuvvetli, 720 cm^{-1} ' de ise zayıf şiddette bantlar gözlenir. Bu nedenle numunenin kızılötesi spektrumunda bazı bantların nujol yağının bantları ile örtülme olasılığı vardır. Bu durumu ortadan kaldırmak için ya süspansiyon haline getirme yönteminde kullanılan nujol yerine poliklorotrifloraetilen, hegzakloro-1,3-bütadien gibi yağlar kullanılır ya da alkali halojenür potasyum bromür disk hazırlama yöntemi kullanılır. İkinci yöntemde 0,5-1 mg katı toz halindeki numune yaklaşık 100 mg kuru, toz potasyum bromür (KBr) ile agat havanda ezmeden karıştırılarak ince homojen bir karışım elde edilir. Bu karışım uygun bir kalıp içine yerleştirilerek hidrolik pres yardımıyla kalıba yaklaşık 10 ton/cm^2 ' lik basınç uygulanır ve karışım saydam geçirgen bir disk haline getirilerek spektrumu alınır. Alkali halojenür disk hazırlama yönteminde alkali metal halojenür olarak en çok potasyum bromür kullanılır. Bunun nedeni potasyum bromürün (KBr) 385 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} aralığında geçirgen olması ve kızılötesi ışınını soğurmamasıdır. Bu yöntemde geçirgen disk hazırlamak için potasyum bromürden başka alkali metal halojenürler de

kullanılır. Örneğin uzun dalga boylarında alınacak spektrumlar için sezyum iyodür (CsI) ve sezyum bromür (CsBr) kullanılabilir.

Numune katı haldeyken dimerleşme ve moleküller arası hidrojen bağları yapabilir. Bu nedenle numunenin bir kez de çözelti halinde spektrumu alınabilir. Böylece incelenen numunenin yapısı hakkında daha fazla bilgi elde edilebilir. Bu yöntemde katı numune uygun bir çözücüde çözülür ve elde edilen çözeltinin uygun pencereler kullanılarak spektrumu alınır. Kullanılan çözeltinin seçimi önemlidir. Çünkü kullanılan çözücü spektrum almak için kullanılan pencerenin yapıldığı maddeyi çözmemelidir. Aynı zamanda çözelti hazırlanırken kullanılan çözücünün spektrumu alınacak numune ile etkileşmemesine ve çalışılan bölgede soğurma yapmamasına dikkat edilmelidir. Yani çözücü numuneyi çözebilmeli fakat numune ile reaksiyona girmemelidir. Ayrıca çözücü numunenin kızılötesi bantlarını örtmeden numuneyi çözmelidir. En yaygın kızılötesi çözücü olarak karbon tetraklorür (CCl₄) ve karbon disülfür (CS₂) kullanılır. Bu iki çözücü içinde çözülerek numunenin spektrumu alındığında ve bu spektrumlar ayrı ayrı incelendiğinde bu iki çözücünün kızılötesi bantlarının numuneninkinden tamamen farklı yerlerde oldukları görülür. Eğer böyle bir çözücü bulunamazsa çift ışınli spektrometreler kullanılarak spektrum alınır. Bu durumda ışın yolunun birine çözelti diğerine çözücü koyularak spektrum alınır. Böylece çözücünden gelen soğurma yok olur. Fakat bu her zaman gerçekleşmez.

Kızılötesi ışınları, molekülün titreşim hareketleri tarafından absorblanması nedeniyle Kızılötesi spektroskopisine titreşim spektroskopisi de denilebilir. Bir molekülün Kızılötesi ışımasını absorblayabilmesi için dipol momentinde bir değişim olmalıdır. Molekülün titreşim frekansı, molekül üzerine gönderilen Kızılötesi ışımasının frekansına eşit olduğu zaman absorpsiyon gerçekleşir.

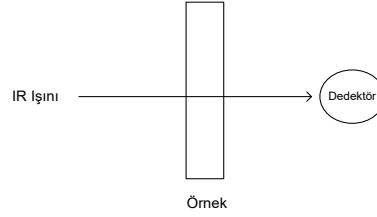
Kızılötesi bölgesindeki absorpsiyonlarda atomların kütlelerine, bağlarının gücüne ve moleküllerin geometrisine bağlı olarak, moleküllerin titreşim ve dönme düzeyleri uyarılır ve titreşim genlikleri değiştirilir. Kızılötesi bölgelerindeki soğurmada, elektronik uyarılma ve molekül bağlarında bozulma gözlenmez (Palancıgiller, 2012).

1.7.1.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometresi

Burada Fourier transform (dönüşüm) kızılötesi tekniğinin dayandığı temel kısaca açıklanmıştır. Fourier transform kızılötesi tekniğinin hem yayınlanma hem de soğurma

spektroskopisine uygulanabilmesine rağmen Fourier transformunu yayınlama spektroskopisi cinsinden ifade etmek daha kolaydır.

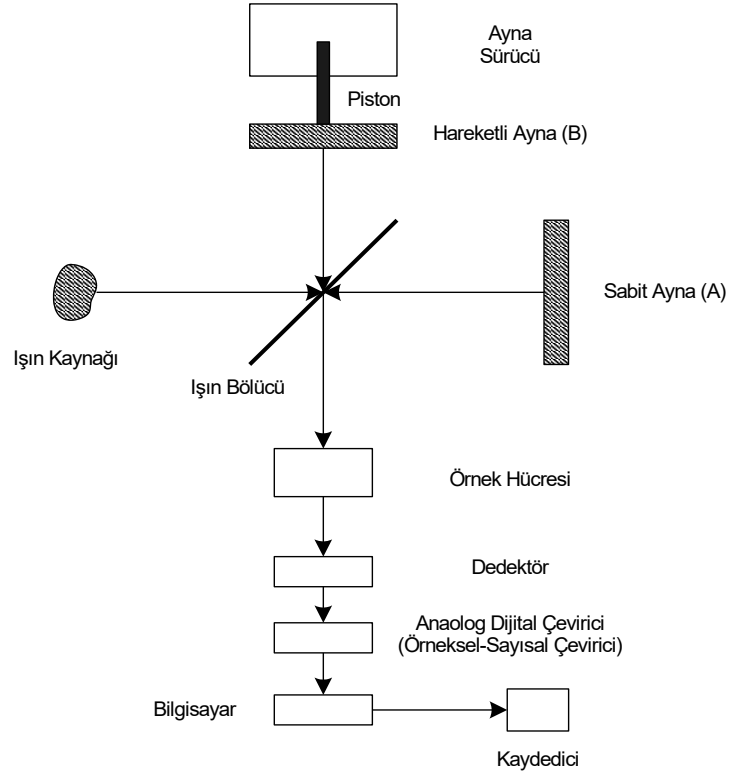
Fourier transform kızılötesi spektrometresi tekniği Şekil 1.5' de görüldüğü gibi kızılötesi ışınının hepsinin örnek içinden geçip hemen dedektöre gelmesi gerçeğine dayalıdır.



Şekil 1.5. *Fourier Transform Kızılötesi Spektrometresi Tekniğinin Basit Şeması*
Kaynak: Aydın, 2005

Bu tür uygulamada spektrum frekans ölçeği yerine zaman ölçeği kullanılarak elde edilir. Zaman ölçeğinde elde edilen bilgiler interferogram adını alır. İnterferogram optik yol farkına karşı ışık şiddetini gösterir. İnterferogram bilinen soğurma spektrumunun Fourier transformudur. Alette bulunan bir bilgisayar ile ters Fourier transformu olarak bilinen bir matematiksel işlemle interferogram frekans ölçeğindeki (frekansa karşı şiddet) bilgilere dönüştürülür. Böylece bilinen soğurma spektrumu frekans ölçeğinde elde edilmiş olur. Spektrum ile interferogram birbirlerine Fourier transformu ile bağlı olduğu için interferogramdan spektrum elde etme yöntemi Fourier transformu kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi olarak bilinir (Aydı, 2005).

Bir Fourier transformu infrared spektrometresinde genel olarak bir ışın kaynağı, potasyum bromür alaşım üzerinde buharlaştırılmış bir germanyum ışın bölücü ve hızlı sinyal üreten tri gliserin sülfat (TGS) piroelektrik dedektör kullanılır. Bir Fourier transformu kızılötesi spektrometresinin şematik diyagramı Şekil 1.6' da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. FT-IR Spektrometresinin Şeması
Kaynak: Aydın, 2005

1.7.2. Raman spektroskopisi

Bir ışın geçirgen bir ortamdan geçerken, ışının bir kısmı ortamdaki diğer türler tarafından farklı yönlerde saçılırlar. 1923 yılında Smekal teorikte inelastik saçılmayı, 1928 yılında ise Hintli fizikçi C. V. Raman bazı moleküller tarafından saçılan ışının ufak bir kısmının dalga boyunun gelen ışının dalga boyundan farklı olduğunu ve ek olarak dalga boyundaki bu kaymaların saçılmaya neden olan moleküllerin kimyasal yapısıyla ilişkili olduğunu keşfetmiştir. Ünlü fizikçi C. V. Raman, bu çalışmasından dolayı 1931 yılında Nobel Fizik ödülünü almıştır. (Skoog, 2000).

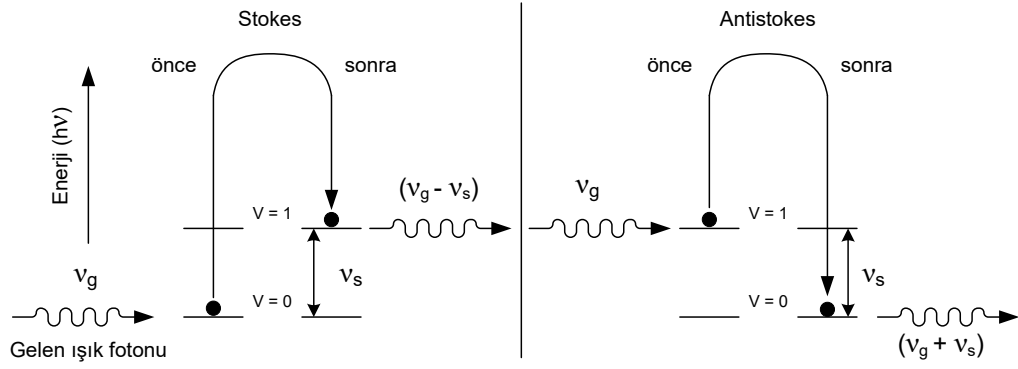
Raman spektroskopisi, bir lazer ışını ile maddenin moleküllerinin etkileşmesi yoluyla analiz eden, güçlü bir moleküler parmak izi tekniğidir. Raman spektroskopisi uygulamaları, minerallerden ilaç polimerlerinin karakterizasyonuna kadar son derece çeşitlidir. Raman uygulamalarının tek bir listede toplanması imkansızdır. Uzun süredir farklı materyallerin karakterizasyonu için kullanılmasına rağmen, son zamanlarda hızlı bir optik identifikasyon ve patojenik organizmaların ayırımı sağlamak için biyolojik örneklerle yapılan çalışmalar vardır. Kullanım alanlarının yaygınlaşması, daha güçlü,

hızlı ve taşınabilir Raman spektroskopisi cihazlarının ve dotaların analizinde kullanılan istatistik tekniklerin gelişmesine bağlıdır. Mikroorganizmaların tanımlanması, potansiyel biyoterör tehditlerinin ve patolojik mikroorganizma enfeksiyonlarının dünya çapında ölüm oranlarının artması nedeniyle gün geçtikçe daha da önemli hale gelmektedir (Hamasha, 2011).

1.7.2.1. Raman spektroskopisinin teorisi

Bir madde üzerine absorplayamayacağı yüksek enerjili bir ışık gönderildiğinde gelen ışığın az bir kısmı her yönde saçılır.

Raman saçılmasında örnek moleküller gelen elektromanyetik dalga ile esnek veya esnek olmayan çarpışma yapabilirler. Esnek çarpışmada enerji kaybı olmayacağından örnek molekül tarafından saçılan fotonun frekansı (ν_s) gelen fotonun frekansı (ν_g) ile aynı olur. Gelen fotonun frekansına eşit frekansta fotonun saçılmasına Rayleigh saçılması denir. Bu, saçılan fotonun en kuvvetli bileşenidir. Esnek olmayan çarpışmada ise örnek molekül ile gelen elektromanyetik dalga arasında enerji alış verişi olur. Enerjinin korunumu ilkesine göre saçılan fotonun enerjisi gelen fotonun enerjisinden bir miktar farklı olacaktır. Temel titreşim seviyesinde bulunan molekül gelen fotonun enerjisini alarak kararsız üst titreşim seviyelerine uyarıldığında ($\nu_g - \nu_s$) frekanslı foton yayınlamaya ilk uyarılmış titreşim seviyesine geçecektir. ($\nu_g - \nu_s$) frekanslı bu saçılmaya Stokes saçılması denir. İlk uyarılmış titreşim seviyesinde bulunan molekül de gelen fotonun enerjisini alarak kararsız üst titreşim seviyelerine uyarılacaktır. Daha sonra ($\nu_g + \nu_s$) frekanslı foton yayınlamaya temel titreşim seviyesine geri dönecektir. ($\nu_g + \nu_s$) frekanslı bu saçılmaya ise Antistokes saçılması denir (Aydın, 2005). Kısaca daha düşük frekansa geçmeye Stokes saçılması, daha yüksek frekansa geçmeye ise anti-Stokes saçılması adı verilir. Bir başka deyişle enerjisi azalan fotonlar Raman spektrumunda Stokes çizgilerini, enerjisi artan fotonlar ise anti-Stokes çizgilerini verirler. Moleküllerin $h\nu$ enerjili fotonla etkileşmesi sırasında saçılan fotonun enerjisinin gelen fotonun enerjisine eşit olması halinde Rayleigh saçılması meydana gelir. Rayleigh saçılması sonucu elde edilen Rayleigh çizgileri gözlenir (Aytekin, 1999). Raman saçılmasını gösteren enerji seviye diyagramı Şekil 1.7' de gösterilmiştir (Aydın, 2005).



Şekil 1.7. Raman Saçılmasını Gösteren Enerji Seviye Diyagramı
Kaynak: Aydın, 2005

1.7.2.2. Raman spektroskopisi cihazı

Modern Raman spektroskopide kullanılan cihazlar üç ana bileşenden oluşur: bir lazer (uyarılma) kaynağı, bir numune aydınlatma sistemi (optik bileşenler) ve uygun bir spektrometre. Bu bileşenlerin performans özellikleri, moleküler spektrometrelerdekinden daha önemlidir ve çok daha iyi olmalıdır, çünkü Raman saçılım sinyali, Rayleigh saçılımından oluşan sinyale göre daha zayıftır (Skoog, 2000).

Modern Raman spektrometride kullanılan ışın kaynakları genellikle lazerlerdir, çünkü makul bir sinyal/gürültü oranıyla ölçülebilir yeterlilikte bir şiddete sahip Raman saçılımı oluşturmak için yüksek şiddetli ışın kaynağı gereklidir. Raman spektroskopide yaygın olarak argon ve kripton iyon kaynakları kullanılmaktadır.

Raman spektroskopik ölçümlerinde, numunenin hazırlanması kızılötesi spektroskopiden daha basittir, çünkü pencereler, mercekler ve diğer optik bileşenler için daha kırılğan ve atmosferik olarak daha az dayanıklı kristal halojenürler yerine cam kullanılabilir. Buna ek olarak lazer kaynağı, numunenin küçük bir alanına kolaylıkla odaklanabilir. Bunun sonucunda çok ufak numuneler bile incelenebilir. Aslında absorpsiyon yapmayan sıvı numuneler için kullanılan yaygın numune tutucusu, sıradan bir cam erime noktası kapileridir (Skoog 2000).

1.7.2.3. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)

Moleküllerdeki titreşimler üzerine çalışan temel teknikler, kızılötesi absorpsiyonu ya da Raman saçılmasının prensibi üzerine kuruludur. Bu teknikler, kimyasal yapılar ve fiziksel formlar üzerinden; karakteristik spektral modellerden (fingerprinting) maddenin

tanımı ve kantitatif veya yarı kantitatif bir biçimde örneğin içindeki madde miktarının tayini için bilgi sağlamada kullanılır. Örneklerin, bütün fiziksel hallerde incelenmesi mümkündür. Örneğin, katı, sıvı, buhar, sıcak veya soğuk haller, viskoz yapılar, mikroskopik partiküller veya yüzey katmanları olarak bütün örnekler bu teknik ile incelenebilir (Smith 2005; Piot, 2001).

Raman spektroskopisi; sulu çözeltilerde, cam küvetler içerisinde, hiçbir hazırlık yapılmaksızın örnek analizlerinde hızlı uygulama imkanları ile kendi imkanlarını geliştirip diğer teknikler arasında yerini almıştır (Smith, 2005).

Temel olarak SERS, Raman sinyallerinin kuvvetlendirilmiş biçimidir. Söz konusu kuvvetlendirme ise SERS substratları ile sağlanmaktadır. SERS substratları için kullanılan yüzeyler, altın, gümüş gibi iletken metallerin nano boyuttaki parçacıklarından oluşmaktadır. Geniş ölçekli bir kuvvetlendirme yüzeylerde oluşturulan nano ölçekli (10-100 nm) pürüzlü yapılar ile sağlanmaktadır. Bu yüzeyler elektrot üzerinde indirgenme-yükseltgenme döngüsünün birkaç kere tekrarlanması ile cam yüzeyler üzerine partikülleri film olarak kaplamak ya da ada şeklinde biriktirmekle, agrege olmuş koloidler, litografik teknikler v.b. kullanılarak hazırlanmaktadır (Matsi, 2000). SERS'deki bu sinyal artışı metaller ile ışığın elektromanyetik etkileşiminden gelmektedir. Metaller bu etkileşim sırasında plazmon rezonans olarak bilinen, lazerin düştüğü alanda, ikincil bir elektromanyetik alan oluştururlar ve ışık kaynağı ile metaller tarafından oluşturulan bu alan rezonansa girerek metal yüzeyinde- örneğin bulunduğu ortamda- bir "elektromanyetik kuvvetlendirme" gerçekleştirmiş olur. Bu kuvvetlendirmeden yararlanabilmek için moleküller metal yüzeyine adsorbe olmalı ya da metal yüzeyine çok yakın (10-15 nm) bulunmalıdır (Schuster, 2000).

Elektromanyetik kuvvetlendirme dışında, oluşan kuvvetlendirmeyi açıklamak için bir diğer teori ise "kimyasal kuvvetlendirme" olarak bilinmektedir. Bu kuvvetlendirme sıklıkla eşleşmemiş elektron çiftleri içeren moleküller üzerinden açıklanmıştır. Analitin yüzeye adsorbe olarak yüzeye etkileşmesi sonucu oluşmaktadır. Bu durumda kimyasal kuvvetlendirme yüzeye kemisorblanan tür ile metal yüzey arasında kurulan yük transferi ile oluşmaktadır. Bu kuvvetlendirmenin bazı özel durumlarda ve muhtemelen elektromanyetik kuvvetlendirmenin gerçekleştiği koşullarda elektromanyetik kuvvetlendirme ile gerçekleştiği sanılmaktadır (Lombardi, 1986).

Özetle SERS'in adını aldığı harfleri inceleyerek yönteme bakarsak; kelime kelime SERS:

- Surface (S): SERS bir yüzey spektroskopi tekniğidir; moleküller yüzey üzerinde ya da yüzeye yakın olmalıdırlar. Bu SERS uygulamalarında temel noktadır.
- Enhanced (E): Sinyal kuvvetlendirmesi metal substratlarda plazmon rezonans ile sağlanır.
- Raman (R): Moleküllerin (SERS prob veya analit) Raman sinyallerini ölçen bir tekniktir. Raman spektroskopi elastik olmayan ışık saçılmasına dayanır.
- Son olarak SERS kodlamasındaki son "S", "Scattering" ya da "Spectroscopy" kelimelerine dayanır (Pekdemir, 2011)

Raman spektrumları bir molekül için kızılötesi spektrumları ile birlikte değerlendirildiğinde o moleküle ait hemen hemen bütün titreşimlerin görülmesini mümkün kılıp molekülün kimyasal yapısının veya nitel analizinin daha güvenilir gerçekleşmesini sağlar. Fakat biyolojik çalışmalarda IR yöntemi su varlığında kuvvetli absorplama özelliği gösterdiği için sorun teşkil etmektedir. Biyolojik çalışmalar için IR spektroskopinin geri planda kalması, Raman spektroskopiyi oldukça ön plana taşımıştır. IR'nin aksine Raman spektroskopinin en büyük avantajlarından birisi olan sulu ortamda bulunan numune analizinin gerçekleştirilmesi daha kolay olmaktadır. Böyle bir teknik ile biyolojik olarak çeşitlilik gösteren canlıların parmak izi bölgeleri çalışılarak tanımlama gerçekleştirilebilmektedir. Bu tarz bir durumda çalışma sonrası elde edilen spektrumun hücresel bileşen tabanlı olduğu söylenebilir (Temür, 2010).

Normal Raman spektroskopi (NRS) sulu ortamda çalışmaya olanak sağlamasına rağmen, düşük şiddet ve hassasiyetle çalışıyor olmasından dolayı, zamanla yerini Rezonans Raman Spektroskopiyeye (RRS) bırakmıştır. RRS, floresans girişiminin daha az olduğu spektrumların eldesinde, konjuge aromatik yapılara karşı verdiği cevap ve elde edilen sinyallerin daha net olması bakımından NR ye göre oldukça üstün bulunmuştur (Temür, 2010).

Rezonans Raman saçılım olayı, bir analitin elektronik absorpsiyon pikine oldukça yaklaşan dalga boyları ile uyarılması sonucu Raman şiddetlerinin büyük ölçüde güçlendiği bir durumdur. Bu koşul altında çoğu Raman piklerinin şiddetleri 10^2 ile 10^6 kat kadar kuvvetlenir. Bunun sonucunda rezonans Raman spektrumları 10^{-8} M'a kadar düşürülebilen analit derişimlerinde kullanılabilir. Bu duyarlılık düzeyi, çoğunlukla 0,1

M'dan daha yukarı derişimlerle sınırlı normal Raman çalışmaları ile çelişkilidir. Rezonans kuvvetlendirmesi, kromofor ile ilgili Raman bantları ile kısıtlanmış olduğundan rezonans Raman spektrumları genellikle sadece birkaç çizgiden oluşur. Bunun da ötesi, rezonans Raman spektrumları oldukça seçimli olarak elde edilebilirler. Çünkü uyarma, spesifik absorpsiyon bantlarına hedeflenebilir.

Bir diğer Raman yöntemi olan yüzeyde kuvvetlendirilmiş Raman saçılması (SERS) ise geliştirilip NR ve RRS'nin önüne taşınmıştır. Özellikle mikroorganizma çalışmalarında, tanımlamaya yönelik sonuçların NR ve RRS ile elde edilebilmesine karşılık, bu sonuçlarla birlikte üç problem de hala süregelmektedir.

Bu problemler;

- Hassasiyet,
- Miktar ve spektral data üzerinde seçicilik ile sıkışıklık problemleri,
- Bunların dışında bir diğer önemli husus ise cihazın fiyatı.

SERS bu problemleri çözmekte oldukça başarılı bir teknik olup bakteri tanımlanmasında ve diğer çalışmalarda uygun genel bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca SERS-aktif substratların floresansı sönümlenmesi ölçümlerde S/N oranını da arttırmaktadır. Bu şekilde elde edilen kuvvetlendirme ile spektrumlarda oluşan sıkışıklık giderilmiş olup daha hassas ölçümlerin SERS substratları ile gerçekleştirilmesi mümkün kılınmıştır (Temür, 2010).

1.7.2.4. Raman spektroskopisinin biyolojik uygulamaları

Raman spektroskopisi biyolojik moleküller ile çalışma sırasında bir takım avantaj ve dezavantajları beraberinde getirir. Avantajları arasından ön plana çıkan, in situ çalışmalarda sulu sistemlerde kullanılabilme kabiliyetidir. Dezavantajlarından biri ise oldukça kuvvetli lazer tarafından uyarılan örnek dokularının zarar görmesidir. Fakat Raman spektroskopisi tekniğine uygun çalışabilecek biyolojik örnekler için oldukça geniş ölçekte sistemler geliştirilmiş durumdadır (Moskovits 1985, Gramlich 2001). Polar gruplar; karboniller, aminler ve amidlerin Raman spektrumları oldukça zayıftır. Bu Raman spektroskopide dezavantaj olarak görünen bir durumdur. Buna rağmen -S-S-, -SH, -CN, -C=C- ve aromatik halkalar spesifik karakterizasyonlar için ayırıcı kuvvetli bantlar gösterirler. Karbonat ve fosfat gibi diğer gruplar da ayırım sağlayabilecek Raman bantları verirler. Raman ile fiziksel formlardaki değişiklikleri tespit etmek mümkündür.

Literatürde geçen çoğu çalışma kimyasal bağlanma, genomikler, proteomikler, protein etkileşimleri, katı faz sentez çalışmaları ile DNA, protein analizi ve hücre çalışmalarına dayanmaktadır. Ayrıca gıda ve biyomedikal alanlarında yayınlanmış birçok çalışma da mevcuttur. SERS'in yaygın bir teknik olarak kullanıldığı alanlara birkaç örnek vermek gerekirse: Amino asit kristallerindeki geçişleri (Zheng ve ark., 2002;Freire 2000), tek hücreli bakteriler (Manfait ve ark., 2000; Schuster 2000), bakteri sporları (Gole ve ark., 2008; Alexander 2003), mikroorganizmaların karakterizasyonu (Wang ve ark., 2009; Sockalingum 1999), fungi (Lyon ve ark., 1998; Arcangeli 2000), hububat karışımları (Elaissari, 2008; Piot 2001), lipozom kompleksleri (Feldheim ve ark., 2002; Matsi 2000), küf (Bruchez ve ark., 1998; Zheng 2002), iyi huylu ve kötü huylu tiroid dokularında meydana gelen oluşumlar (Hayatt, 1989; Manfait 2000) üzerine çalışmalar oldukça yaygındır. Raman ve SERS; tıp alanında ve in situ çalışmalarda türlerin tayini, kromofor gruba sahip birçok biyolojik molekül ile çalışılma uyumluluğu açısından yararlı bir teknik olmuştur ve bunlar Tablo 1.3 te özetlenmiştir.

Tablo 1.3. Mikrobiyal identifikasyon için Çeşitli Raman Spektroskopisi Uygulamaları.

Çalışılan Mikroorganizmalar	Yıl	Referans	Makalenin Orijinal Adı
<i>Clostridium türleri</i>	2000	Schuster ve ark.	Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy
<i>Thioploca, Beggiatoa, Thiomargarita, Thiobacillus, Thiomicrospira türleri</i>	2001	Pasteris ve ark.	Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria
<i>Micrococcus luteus, Bacillus subtilis, Rhodotorula mucilaginosa Bacillus sphaericus Pseudomonas fluorescens</i>	2003	Rösh ve ark.	<i>Micrococcus luteus, Bacillus subtilis, Rhodotorula mucilaginosa Bacillus sphaericus Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Lactarius controversus Lactarius quieticolor Lactarius lacunarum</i>	2005	Gussema ve ark.	Raman spectroscopic study of Lactarius (Fungi)
<i>Acinetobacter</i> strainleri	2006	Maquelin ve ark.	Rapid epidemiological analysis of <i>Acinetobacter</i> strains by Raman spectroscopy
<i>B. Amyloliquefaciens, B. Atrophaeus, B.licheniformis, B. Mojavensis, B. Pumilus, B. Sonorensis, B.subtilis</i>	2006	Hutsebaut ve ark.	Raman microspectroscopy as an identification tool within the phylogenetically homogeneous ' <i>Bacillus subtilis</i> '-group
<i>Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida glabrata</i>	2009	Sayın ve ark.	Characterization of Yeast Species Using Surface-Enhanced Raman Scattering
<i>Shigella sonnei, Proteus vulgaris, Erwinia amylovara</i> ve üç <i>Escherichia coli</i> straini (BFK13, BHK7, DH5 α)	2010	Culha ve ark.	Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering
Gram-pozitif (<i>Enterococcus faecalis</i> ve <i>Streptococcus pyogenes</i>) ve Gram-negatif (<i>Acinetobacter baumannii</i> ve <i>Klebsiella pneumoniae</i>)	2012	Prucek ve ark.	Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation
<i>Lactobacillus fermentum, Escherichia coli</i>	2015	Cui ve ark.	Effect of toxicity of Ag nanoparticles on SERS spectral variance of bacteria
<i>Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Candida albicans</i> .	2015	Mlynáriková ve ark.	Influence of Culture Media on Microbial Fingerprints Using Raman Spectroscopy
<i>L. pneumophila</i>	2015	Jing ve ark	Rapid Identification of Legionella Pathogenicity by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
<i>E. coli, S. Putrefaciens, P. aeruginosa</i>	2016	Mosier-Boss ve ark.	SERS substrates fabricated using ceramic filters for the detection of bacteria
<i>E. coli, L.brevis</i>	2016	Lemma ve ark.	SERS detection of cell surface and intracellular components of microorganisms using nano-aggregated Ag substrate
<i>E. coli, A. Baumannii, K. Pneumoniae, P. Aeruginosa, S. aureus</i>	2016	Kotanen ve ark.	Surface enhanced Raman scattering spectroscopy for detection and identification of microbial pathogens isolated from human serum


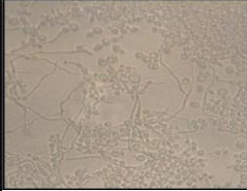

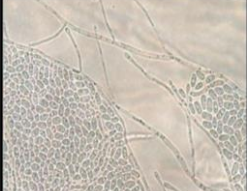

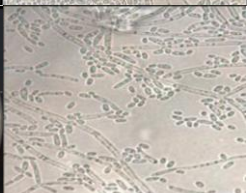

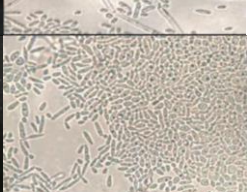
2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal


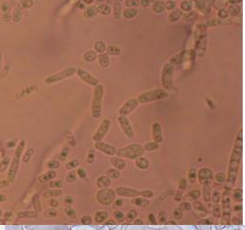





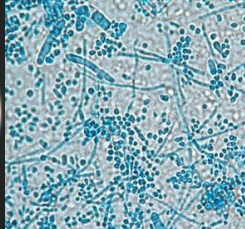
2.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada toplam sekiz fungus kullanılmıştır. Bunlardan *Candida* maya türleri bölümümüzün mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan, *Trichosporon asaii* Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiş olup, dermatofitler ise ve Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarından sağlanmıştır. Test edilen fungusların makroskopik-mikroskopik görünüşleri ve temin edildikleri yerler Tablo 2.1’de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Makroskopik-Mikroskopik Görünüşleri ve Temin Edildikleri Yerler

Mikroorganizma Adı	Kaynak	Makroskopik Görünüşleri	Mikroskopik Görünüşleri
<i>Candida albicans</i> NRRL Y-12983	Anadolu Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		
<i>Candida tropicalis</i> NRRL Y-12968	Anadolu Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		
<i>Candida krusei</i> NRRL Y-7179	Anadolu Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		
<i>Candida parapsilosis</i> NRRL Y-12696	Anadolu Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		

Tablo 2.2. (Devam) Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Makroskopik-Mikroskopik Görünümleri ve Temin Edildikleri Yerler

<i>Trichosporon asahii</i>	Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		
<i>Microsporum canis</i>	Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		
<i>Trichophyton rubrum</i>	Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı		

Kaynak: Aydın, 2012; <http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/> (Erişim Tarihi: 16.05.2016)

2.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Trisodyum sitrat($C_6H_5Na_3O_7$) (Aldrich)

Gümüş nitrat ($AgNO_3$) (Aldrich)

Sodyum borhidrür ($NaBH_4$) (Aldrich)

Sabouraud 4% Dextrose Agar (SDA) (Sigma)

2.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar

Kızılötesi spektrometresi (IFS 66v/S Bruker Optics) (Görsel 2.1)

Raman spektroskopisi sistemi. (Görsel 2.2)

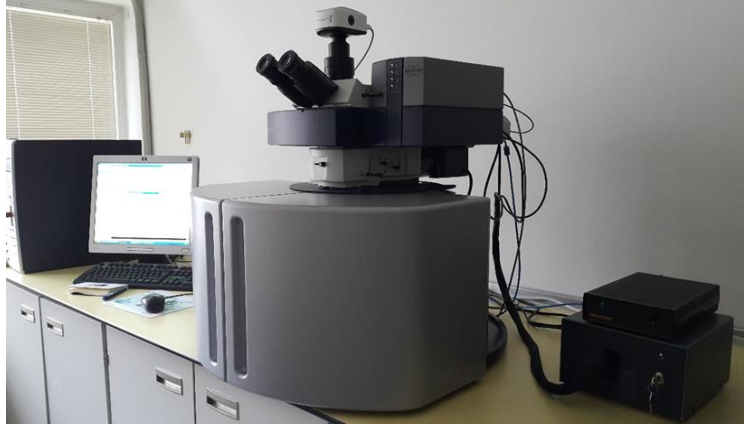
Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Ultra Plus) (Görsel 2.3)

Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5415 R)

İnkübatör (Nüve inkübatör EN120)



Görsel 2.1. *Çalışmada Kullanılan Kızılötesi Spektrometresi Cihazı (FL 145 FT-IR ve Raman Laboratuvarı)*



Görsel 2.2. *Çalışmada Kullanılan Raman Spektrometresi Cihazı (FL 145 FT-IR ve Raman Laboratuvarı)*



Görsel 2.3. *Taramalı Elektron Mikroskobu Cihazı (Anadolu Üniversitesi FL 023 Taramalı Elektron Mikroskobu Laboratuvarı (SEM))*

2.2. Metod

2.2.1. Klinik öneme sahip kültürlerin katı besiyerinde geliştirilmesi ve saklanması

-80 C°'deki %15'lik gliserol ortamında saklanan mikroorganizma izolatlarından 20 ml SDA (katı besiyeri) ile hazırlanan petri kaplarına çizgi ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır ve 2-3 gün 37 C°'de inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.2. Mikroorganizmaların süspansiyon haline getirilmesi ve FT-IR analizi

Mikroorganizma kolonileri petri kabından toplanıp ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra 24 saat desikatörde bırakılarak suyu uçurulmuştur. Kuruyan örnekler spatül yardımıyla agot havana alınarak toz haline getirilmiş ve nujol denilen saf parafinden 1-2 damla konulup iyice karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan süspansiyondan bir küçük damla KBr diskinin üzerine akıtılmış, aynı maddeden ikinci bir disk kapatılarak süspansiyonun diskler arasında düzgün bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Potasyum bromür diskleri özel olarak yapılmış metalik çerçeveye yerleştirilerek spektrumları alınmıştır.

2.2.3. Gümüş nitrat (SERS) çözeltisinin hazırlanması

SERS çözeltisi hazırlanırken kullanılabilecek iki yöntem denenmiştir (Hamasha, 2010)

1.yöntem: 90 mg AgNO_3 500 mL DI suda 1mM AgNO_3 çözeltisi olacak şekilde çözülmüştür. Kaynama noktasına ulaşana kadar karıştırılarak ısıtılmıştır. 10mL %1 lik trisodum sitrat çözeltisi; 0,1 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 'un 10 mL DI (deiyonize) suda çözülmesiyle hazırlanmış olup. İlk hazırlanan çözeltiliye eklenmiştir. 1 saat boyunca

2.yöntem: 2mM NaBH_4 'ün 150mL DI suda çözülmesi ve 10dk karıştırılması ile hazırlanmıştır. 1mM gümüş nitrat 8,49 mg AgNO_3 'ün 50 mL suda çözülmesiyle ve karıştırılarak soğutulması sırasında çözeltiliye porsiyon porsiyon eklenmesi şeklinde hazırlanmıştır. İşlem sonunda kahverengi çözeltili elde edilmiştir.

İlk yöntemde hazırlanan çözeltilinin daha uzun süre saklanabilmesi sebebiyle, çalışmaya ilk yöntem kullanılarak devam edilmiştir.

2.2.4. Mikroorganizmaların Raman spektroskopisi için hazırlanması

İnkübasyona bırakılan mikroorganizma kültürlerinde gelişen tek kolonilerden bir öze dolusu toplanmış ve 1,5 mL deiyonize (DI) su bulunan ependorflara aktarılmış, homojen bir karışım elde etmek için vortekslenmiştir. 7500 rpm de 5 dakika santrifüj ile besi yeri kalıntıları ve süpernetant uzaklaştırılıp üzerine tekrar 1 ml su ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmış, böylelikle toplama sırasında besiyerinden gelebilecek safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonu 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında SERS çözeltisi ile karıştırılıp, hazırlanan süspansiyonlar ve saf mikroorganizma örneği cam lam üzerine damlatılmıştır (Görsel 2.4.). Oda sıcaklığında kurumaması beklendikten sonra, numune Raman spektroskopisi cihazına yerleştirilip ölçüm alınmıştır (Hamasha, 2010).



Görsel 2.4. *SERS Ölçümü İçin Hazırlanan, Lam Üzerine Damlatılmış Mikroorganizma Süspansiyonları*

2.2.5. Raman ve kızılötesi spektrumlarının karşılaştırılması ve değerlendirilmesi

Raman ve kızılötesi spektrumlarının karşılaştırılmasında pek çok farklı istatistiksel yaklaşım uygulanmaktadır. Mikroorganizmaların Raman ve FT-IR analizlerinin tamamlanıp, profillerinin çıkarılmasının ardından elde edilen spektrumlar Opus 7.2 yazılım programıyla okunmuştur. Spektrumlardaki piklerin sayısal değerleri SPSS Statistics 20 analiz programı kullanarak Hiyerarşik Kümeleme Analizi (Hierarchical Cluster Analysis= HCA) gerçekleştirilmiştir.

2.2.6. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analiz

Taramalı elektron mikroskobundan (SEM) görüntü almak için, SERS çözeltisiyle karıştırılan mikroorganizma süspansyonu birkaç kez distile su ile yıkanmış, daha sonra kurutulan hücreler ultra-ince tabakadaki altın ile kaplanarak incelenmiştir (Hamasha, 2011).

3. BULGULAR

Mikroorganizmaların birçoğu insan hayatı, gıda sanayi, tarım ve biyoteknoloji için önemlidir. Bu nedenle mikroorganizmaların tespiti ve identifikasyonu klinik tıp, gıda güvenliği ve çevre kirliliğini kontrol etmek amacıyla hızlı, hassas ve seçici bir şekilde saptanması büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda mikroorganizma numunelerinin identifikasyonu için öncelikle gümüş nanopartüküller kullanılarak Raman spektroskopisi ile uygun bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve sonuçlar diğer bir spektroskopik yöntem olan FTIR ile karşılaştırılmıştır. Bu bölümde, kullanılan analiz yönteminin sonuçları sunulmuştur.

3.1. Mikroorganizmaların FT-IR Profilleri

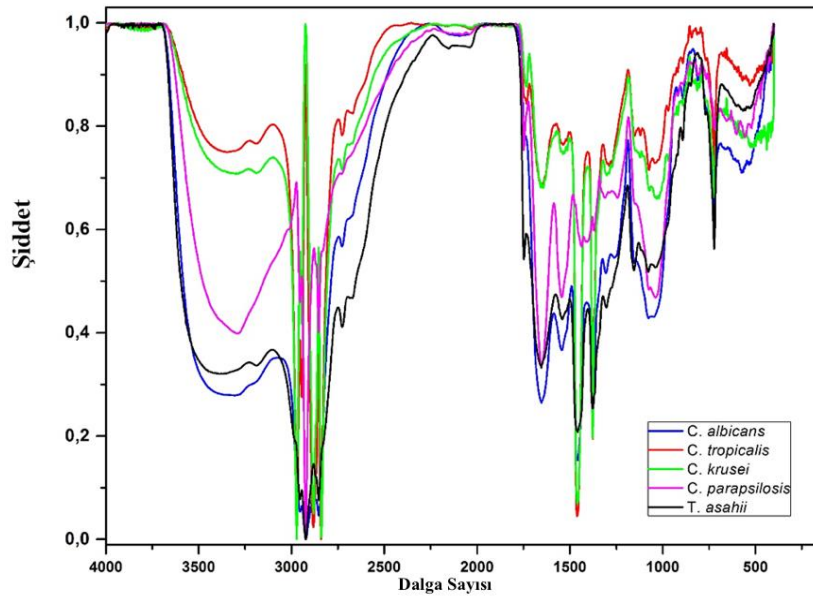
Tablo 3.1. *Biyolojik FT-IR Bant Frekansları*

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>T. asahii</i>
N-H esnemesi (amid A) (protein)	-	-	3294	3290	3186
Yağ asitlerindeki -CH ₃ ün C-H esnemesi (asm)	2955	-	-	2953	2955
> CH ₂ 'deki C-H esnemesi (asm)	-	2944	2944	-	-
Yağ asitlerindeki > CH ₂ nin C-H esnemesi (asm)	2922	-	-	2923	2923
C-H esnemesi (metin grubu)	-	2881	2881	-	-
Yağ asitlerindeki > CH ₂ nin C-H esnemesi (sim)	2853	2840	2838	2853	2853
>C=O esnemesi (ester)	-	1731	1732	1747	1747
Amid I (α -helikal)	1652	1656	1656	1652	1653
Amid I (β -tabaka)	-	-	1643	-	-
Amid II	1543	1536	1536	1544	1539
Tirozin	-	1515	1515	-	-
C-H deformasyonu (>CH ₂)	1457	1460	1460	-	1457
C=O esnemesi (sim) (COO ⁻)	1377	1377-	1377	1371	1376
Amid III	1305	1288	1301	1310	1303
P=O esnemesi (asm) (>PO ₂ ⁻ fosfodiester)	-	-	-	1243	-
C- O, C-C esm, C-O-H, C-O-C def (karbonhidratlar)	1077	1074	-	1074	1077
C- O, C-C esm, C-O-H, C-O-C def (karbonhidratlar)	-	1152	1122	-	1154
C-H sallanma (>CH ₂)	-	722	722	720	722

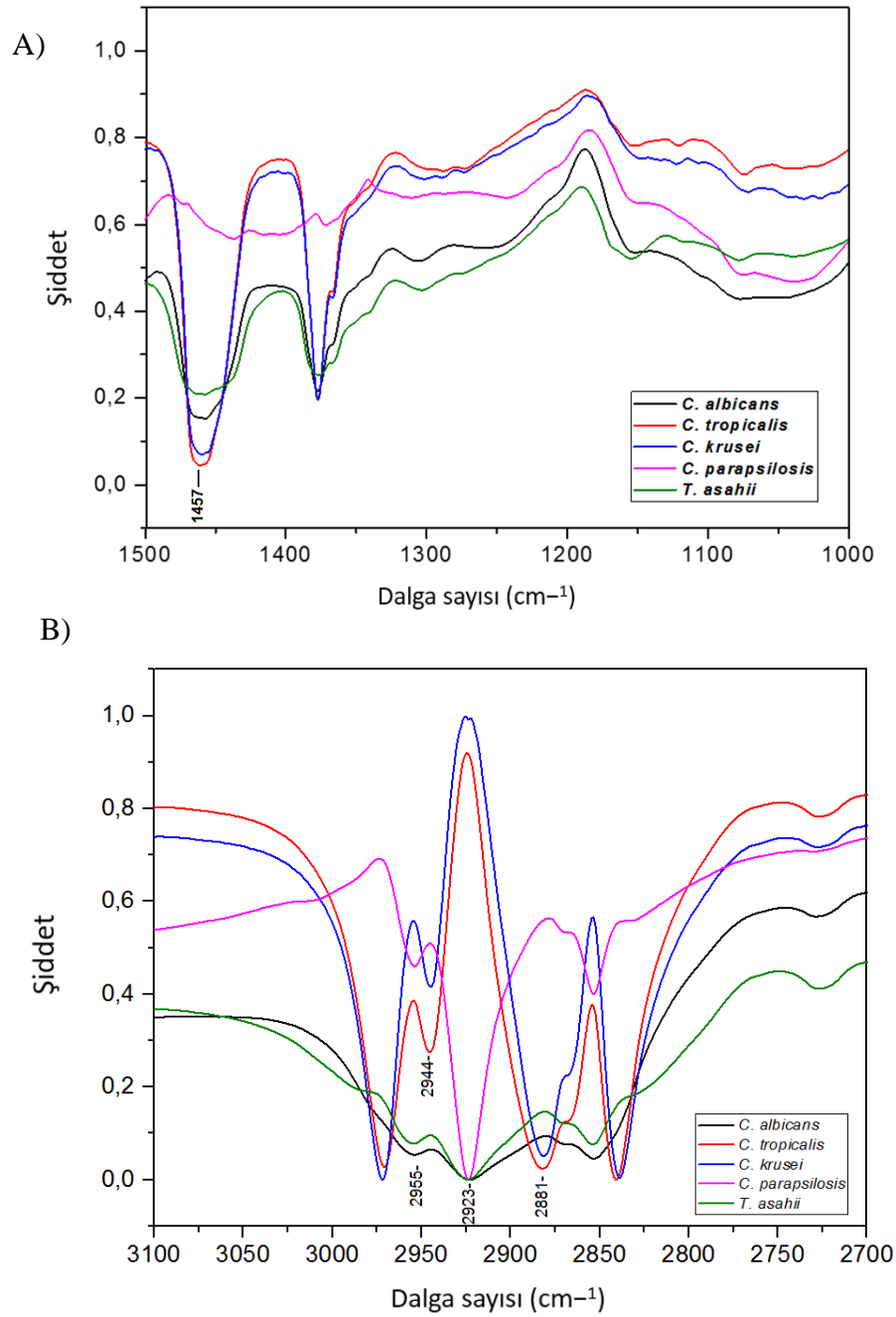
def: deformasyon, esm: esneme, sim: simetrik

Çalışmada kullanılan referans örneklerden *Candida* grupları ve *Trichosporon asahii* için FT-IR profilleri aynı şekilde konularak karşılaştırılmaları sağlanmıştır. Görsel 3.1'de görüldüğü gibi aynı tür olan mikroorganizmaların FT-IR profilleri birbiri ile

hemen hemen örtüşmektedir ve birbirinden çok az farklılık göstermektedir. *Candida* ve *Trichosporon asahii* arasında farklılık gösteren bölgeler yağ asidi bölgesi ve özellikle 1500-1000 cm^{-1} aralığında bölgede görülmektedir (Görsel 3.2). 1457 cm^{-1} civarındaki C-H deformasyon piki bütün örneklerde gözlenirken, *C. parapsilosis*'te gözlenmemiştir. 1243 cm^{-1} civarındaki P=O esneme piki ise sadece *C. parapsilosis*'te gözlenmiştir. 3000 ile 2800 cm^{-1} aralığı yağ asitleri bölgesi olarak bilinmekte olup bu bölgede, 2881 cm^{-1} civarındaki C-H esnemesini (metin grubu) gösteren pik ve 2944 cm^{-1} deki $> \text{CH}_2$ 'deki C-H esnemesi piki sadece *C. tropicalis* ve *C. krusei*'de gözlenmiş olup, 2923 cm^{-1} civarındaki yağ asitlerindeki $> \text{CH}_2$ nin C-H esnemesini gösteren pik ve 2955 cm^{-1} civarındaki yağ asitlerindeki $-\text{CH}_3$ ün C-H esnemesini gösteren pik bu organizmalarda gözlenmemiştir.



Görsel 3.1. Mikroorganizmaların Karşılaştırmalı FT-IR Profilleri.



Görsel 3.2. Mikroorganizmaların FT-IR Profilleri.(A)1000-1500 cm⁻¹arası B) 3100-2700 cm⁻¹arası)

3.2. Mikroorganizmaların Raman Spektrumları

Mikroorganizmaların Raman spektrumlarında genellikle pikler, proteinlerde mevcut olan amid fonksiyonel grubu (CO-NH) ile ilgili yanıtları gösterir. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların Raman spektrumlarında gözlenen 1350 cm⁻¹ ve 1570 cm⁻¹ civarındaki Raman pikleri gümüş nanopartikülleriyle mannoproteinlerdeki azot

atomu aracılığıyla etkileşim haline olduklarını göstermektedir. Spektrumlardaki çoğu pik azot temelli grupları ve bağları temsil etmektedir. Bu da mannopteinlerin üzerindeki gümüş-azot etkileşiminin varlığını doğrulamaktadır. Örneğin. 1520-1530 cm^{-1} deki COO^- esnemeleri gibi. Bu aynı zamanda amino asitlerdeki oksijen atomu ile gümüş arasında da etkileşim olduğunu göstermektedir. Gümüş farklı amino asit ve proteinler için farklı affinitelere sahiptir. Bu spektrumların çeşitliliğinin moleküler düzeyde açıklamasıdır.

Gümüşün oksijen ve azot ile arasındaki farklı etkileşim tipleri daha önce amino asitler için onaylanmıştır. Bu sonuçların benzer çalışmalar ile uyum içinde olduğu gözlenmiştir ve bu çalışmalar referans alınarak bant işaretlemeleri yapılmıştır (Maquelin, 2002; Sayın, 2009; Sujith, 2009,).

3.2.1. Mikroorganizma konsantrasyonu

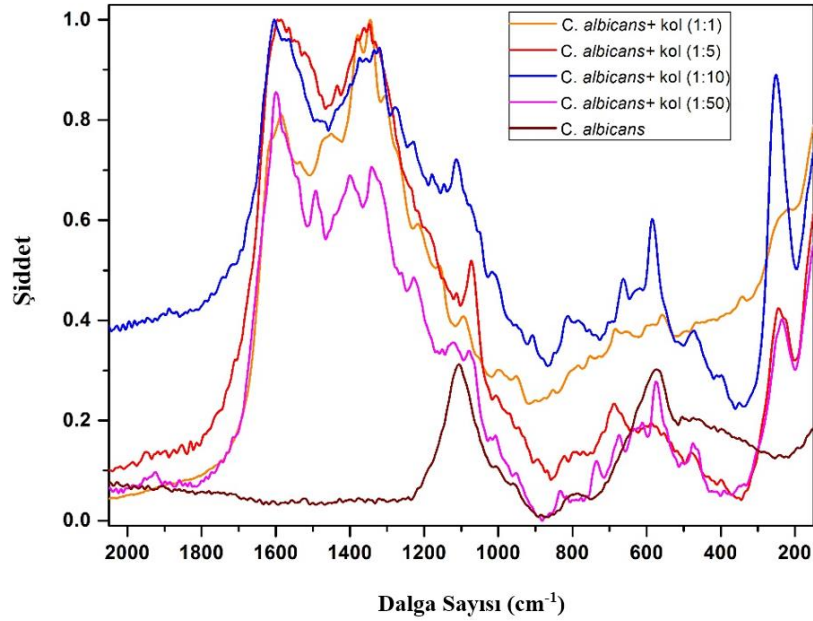
SERS Raman spektroskopisi için moleküllerin nanoparçacıklara yakın olması gerekmektedir (Smith, 2005). Bundan dolayı mikroorganizma ve nanoparçacık oranları mikroorganizma spektrumu için önemlidir. En iyi oranı tespit etmek için sekiz farklı mikroorganizma ile çalışıldı ve mikroorganizma miktarı sabit tutulup koloit miktarı artırıldı. Yapılan deneylerde 4 farklı konsantrasyon ile çalışıldı. Bu konsantrasyonlar; hazırlanan mikroorganizma süspansiyonu, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında SERS çözeltisi ile karıştırıldı. Yapılan deneylerde hazırlanan karışımların Raman spektrumları karşılaştırıldığında SERS çözeltisi ile karıştırılan mikroorganizma konsantrasyonlarının önemli farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan mikroorganizma spektrumlarına göre karışım spektrumlarının sinyalleri önemli ölçüde arttığı ve pikler belirgin hale geldiği gözlenmiştir.

3.2.2. *C. albicans*'ın Raman spektrumları

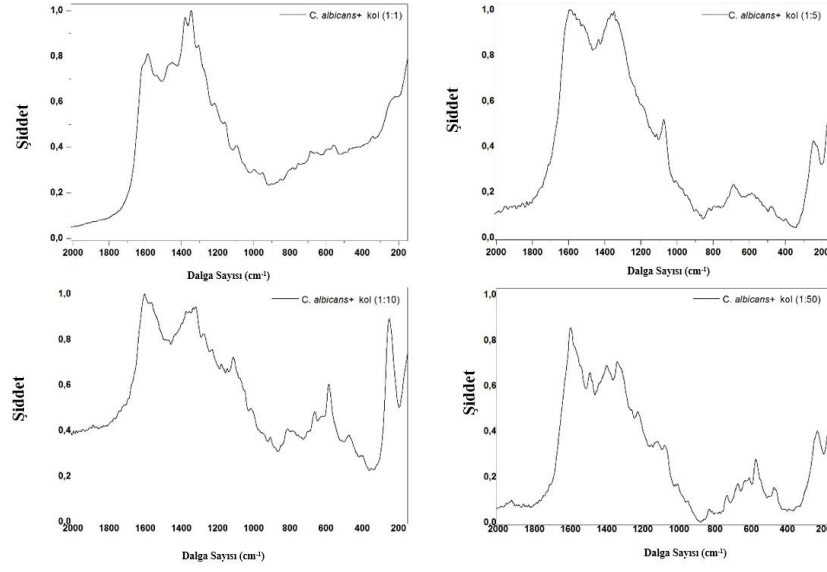
SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *C. albicans*'ın Raman profilleri ile çözelti eklenmeden alınan *C. albicans*'ın Raman profili karşılaştırılmıştır. Görsel 3.3'de görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:50 oranında görülmüştür. Görsel 3.4'de ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.

Raman spektrumları 1450 cm^{-1} civarındaki C-H₂ deformasyon bantları ile karakterizedir. Bantlar genellikle, lipitlerdeki, karbonhidratlardaki ve proteinlerin aminoasit zincirlerindeki - CH₃, - CH₂, ve C-H fonksiyonel gruplarından ileri gelmektedir. 1600 ve 1250 cm^{-1} civarı, sırasıyla, proteinlerdeki amid I ve amid III bağlarını göstermektedir. Bunun dışında, raman spektrumları, RNA/DNA nükleotid baz çifti guanin (G), timin (T), adenin (A), sitozin (C), urasil (U), ve proteinlerdeki amino asit grupları olan triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenilalaninin (Phe) bantlarını göstermektedir (Maquelin, 2002).

C. albicans'ın karakteristik bantlarından biri olan, $570-580\text{ cm}^{-1}$ civarında görülen bantı yapısındaki karbohidratlar ve fosfotidilinozitolde ileri gelmektedir. $660-675\text{ cm}^{-1}$ aralığı guanine, $815-830\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler tirozine işaret edebilir. 930 cm^{-1} civarındaki görülen bantlar C-N esnemesine işaret etmektedir. 950 cm^{-1} nin üstünde görülen $1006, 1048, 1074, 1152, 1235, 1346, 1347, 1362, 1566, 1612\text{ cm}^{-1}$ deki pikler protein fonksiyonel gruplarından ileri gelmektedir. $1107, 1400, 1584\text{ cm}^{-1}$ deki pikler ise yapısındaki lipitlerden türemişlerdir.



Görsel 3.3. *C. albicans*'ın Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı Raman Spektrumları



Görsel 3.4. *C. albicans*'in Farklı Konsantrasyonlardaki Raman Spektrumları

Tablo 3.2. *C. albicans*'in Raman Bant Frekansları

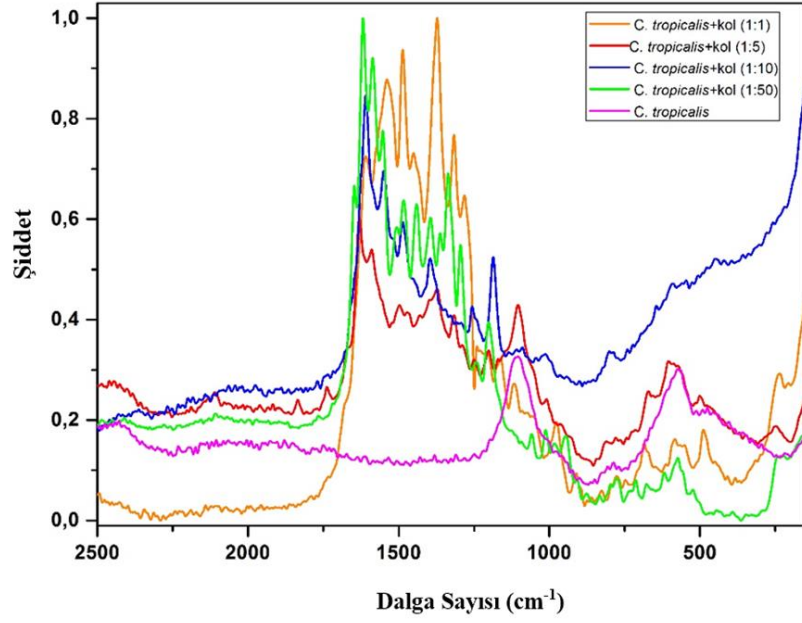
<i>(C. albicans)</i>	1:1	1:5	1:10	1:50
Polisakkaritler	499	478	472	475
S-S esnemesi	-	-	-	505
COC glikozidik halka deformasyonu	-	534	-	-
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	553	552	-	-
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	-	587	584	574
Fenilalanin	625	-	-	611
Tirozin	-	-	-	637
Guanin	675	689	665	675
Adenin	733	-	704	737
Sitozin, urasil (halka , esneme)	758	-	754	777
O-P-O	809	799	783	-
Exposed tirozin	821	823	816	834
Buried tirozin	-	-	851	-
CC STR, COC 1,4 glikozidik bağ	-	867	-	-
COC esneme	-	893	-	-
Glukoz	-	-	907	-
C-N esnemesi	938	944	939	950
Fenilalanin	990	1004	1006	1007
C-N ve C-C esneme	-	-	1048	-

Tablo 3.3. (Devam) *C. albicans*'in Raman Bant Frekansları

C-N ve C-C esneme	1080	1071	1074	1066
lipid	1107	1112	1113	-
C-N ve C-C esneme	1152	-	1147	1151
C-N ve C-C esneme	1182	1183	1179	-
Amid III	1235	1234	1228	1227
Amid III	1261	1268	1272	1259
CH ₂ deformasyonu	1298	-	-	-
C-H protein	-	1321	1319	-
C-NH ₂ esneme	1346	1347	-	1341
C-H protein	-	1362	1375	-
C-H ₂ (protein, lipid)	1394	-	1401	1400
C-H ₂ (protein, lipid)	1415	1435	1439	-
C-H ₂ deformasyonu	1451	1476	1466	1444
NH ₂	-	-	-	1492
Amid II (NH-CN)	1504	-	-	-
COO ⁻	1526	1521	-	-
Amid III	1566	-	-	-
C=C lipid	1584	-	-	-
Fenilalanin	-	1598	1606	1602
Tirozin	-	1612	-	-
Amid I	1637	-	1661	-
>C=O ester esnemesi	1687	-	-	-

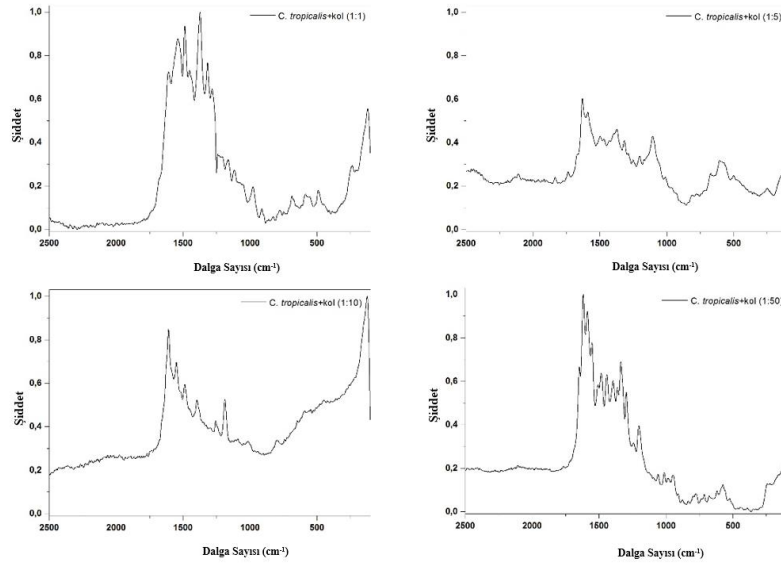
3.2.4. *C. tropicalis*'in Raman spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *C. tropicalis*'in Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.5'da görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:50 oranında görülmüştür. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.6'de ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.



Görsel 3.5. *C. tropicalis*'in Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları

C. tropicalis'in Raman bantları incelendiğinde gümüş konsantrasyonu ile pozitif bir ilişki içerisinde olduğu görülmüştür. 1507 cm^{-1} deki amid II bandı 1:50 konsantrasyonunda görülmüştür. Ancak 1600 cm^{-1} civarındaki fenilalanin bandı bu örnekte hiç gözlenmemiştir. 1526 ve 1523 cm^{-1} deki COO bandı 1:10 ve 1:50 oranlarında, 890, 1073, 1320 civarı ve 1460 cm^{-1} deki pikler konsantrasyon arttıkça kaybolmuştur.



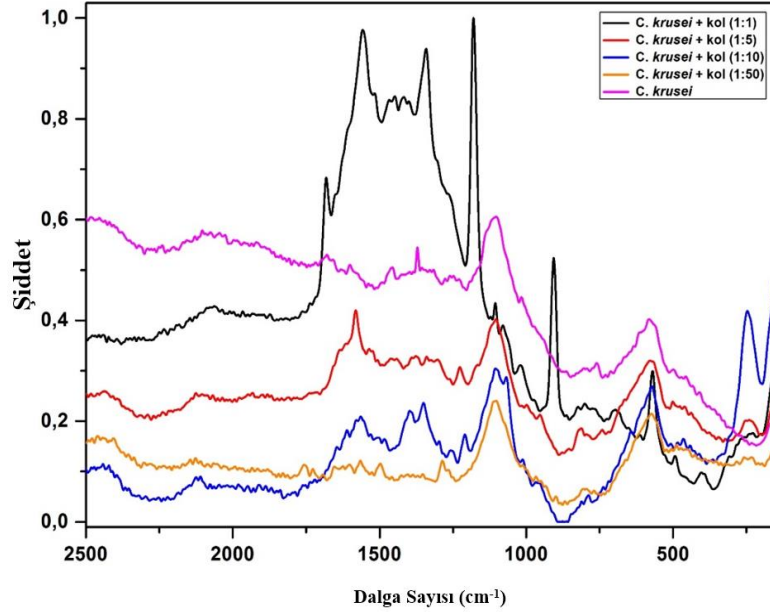
Görsel 3.6. *C. tropicalis*'in Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.4. *C. tropicalis*'in Raman Bant Frekansları

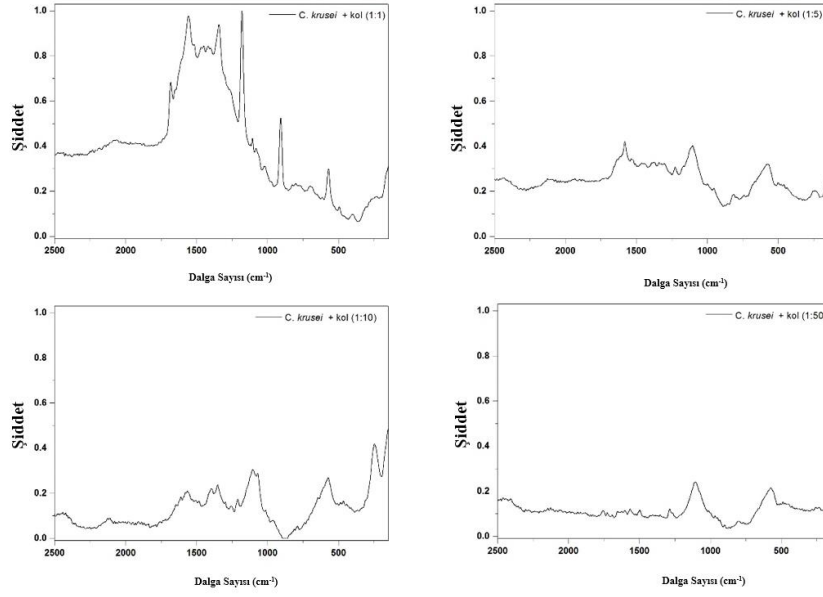
<i>(C. tropicalis)</i>	1:1	1:5	1:10	1:50
Polisakkaritler	484	500	506	500
S-S esnemesi	-	516	-	522
COC glikozidik halka deformasyonu	542	-	534	537
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	576	572	575	573
Fenilalanin	594	606	612	619
Tirozin	640	644	641	640
Guanin	683	674	676	679
Adenin	-	-	703	713
Adenin	743	745	703	713
Sitozin, urasil (ring, str)	782	780	785	773
O-P-O	794	-	798	798
Exposed tirozin	828	815	813	833
Buried tirozin	-	844	842	855
CC esnemesi, COC 1,4 glikozidik bağ	868	875	873	876
COC esnemesi	-	889	894	-
Glukoz	-	902	906	906
Glukoz	914	924	-	-
C-N esnemesi	965	958	951	942
Fenilalanin	1013	1008	1005	1013
C-N ve C-C esnemesi	1039	1052	1044	-
C-O esnemesi	1075	-	1073	1060
>PO ₂ ⁻ esnemesi (simetrik)	-	1103	1106	1109
C-N ve C-C esnemesi	1122	1144	1127	1123
Fosfat titreşimi	1166	1172	1154	1168
Amid III	1202	1202	1202	1201
Amid III	-	1250	1259	1240
CH ₂ deformasyonu	1285	1286	1298	1294
C-H protein	1320	1316	1329	-
C-NH ₂ esneme	-	1340	1347	1336
C-H protein	1374	1372	1371	1362
C-H protein	-	1397	1396	1394
C-H ₂ (protein, lipid)	-	1432	1433	1441
C-H ₂ deformasyonu	1452	1467	1457	-
NH ₂	1482	1498	1483	1483
Amid II (NH-CN)	-	-	-	1507
COO ⁻	1526	1523	-	-
Amid III	1558	-	-	1552
Guanin, adenin (halka esnemesi)	1595	1590	1574	1586
Fenilalanin	-	-	-	1619
Tirozin	-	-	-	-
Amid I	1639	1631	-	1648
>C=O ester esnemesi	1671	1673	1667	

3.2.5. *C. krusei*'nin Raman Spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *C. krusei*'nin Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.7'de görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:50 oranında görülmüştür. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.8'de ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir. *C. krusei*'nin bant frekansları tablosu incelendiğinde 1030 ve 1120 cm^{-1} civarındaki C-N ve C-C bantının hiç gözlenmediği görülmüştür. Ayrıca bazı bantlar 1:50 oranında kaybolmuştur. Ancak genel piklere bakıldığında en fazla pikin bu konsantrasyonda olduğu görülmüştür.



Görsel 3.7. *C. krusei*'nin Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları



Görsel 3.8. *C. krusei*'nin Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.5. *C. krusei*'nin Raman Bant Frekansları

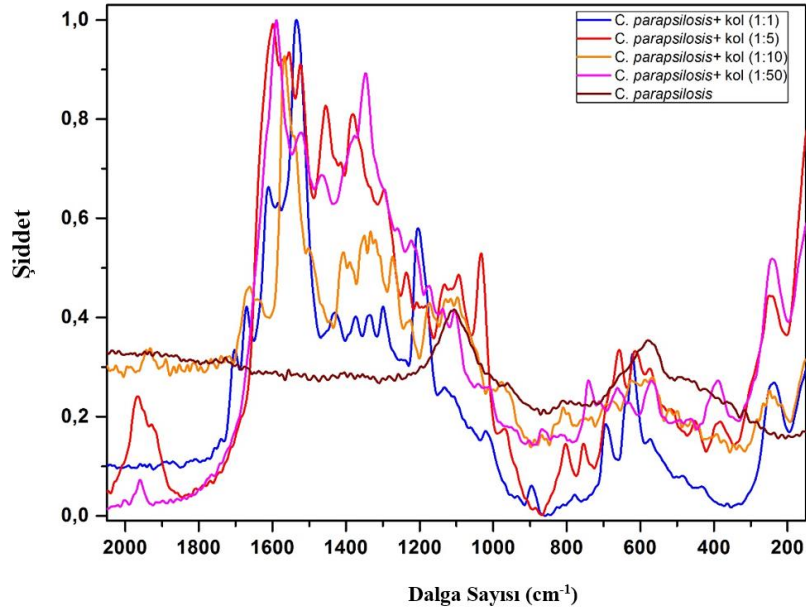
<i>C.krusei</i>	1:1	1:5	1:10	1:50
S-S esnemesi	521	517	526	522
COC glikozidik halka deformasyonu	-	-	-	-
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	573	576	572	574
Fenilalanin	610	-	-	-
Tirozin	-	-	645	-
Guanin	696	682	677-	678
Adenin	757	742	750	753
Sitozin, urasil (halka, esneme)	780	-	788	769
O-P-O	-	796	-	796
Exposed tirozin	822	821	826	828
Buried tirozin	-	856	849	852
CC esneme, COC 1,4 glikozidik bağ	863	879	864	869
COC esneme	-	-	876	883
Glukoz	904	900	906	899
C-N esnemesi	946	952	954	997
Fenilalanin	998	998	993	-
Fenilalanin	-	1014	1011	1011
C-O esneme	1073	-	1068	-
>PO ₂ ⁻ esneme (simetrik)	1115	1109	1105	1103
Phosphate titreşimi	1171	1169	1178	1180
Amid III	1227	1227	1210	1221
Amid III	1235	-	-	1235
Amid III	1245	-	1252	1250
Amid III	1274	1260	-	1265

Tablo 3.6. (Devam) *C. krusei*'nin Raman Bant Frekansları

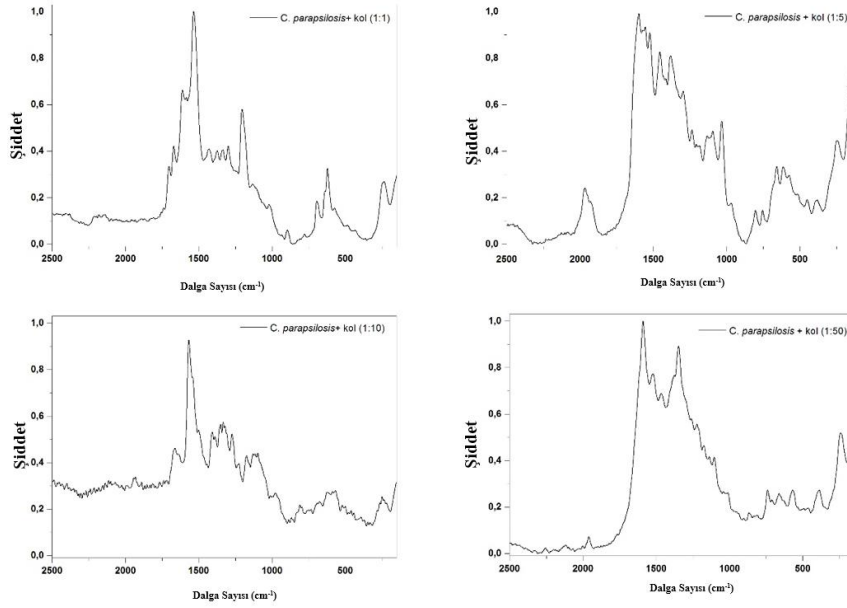
CH₂ deformasyonu	1307	1300	1296	1286
C-H protein	-	1340	-	-
C-NH₂ esneme	1353	-	1350	1353
C-H protein	1376	1377	-	1370
C-H protein	-	1391	1399	1387
C-H₂ (protein, lipid)	1424	1410	1412	1427
C-H₂ (protein, lipid)	-	1142	1440	1444
C-H₂ deformasyonu	1472	1462	-	1458
NH₂	-	1491	1482	1498
Amid II (NH-CN)	-	1506	1502	-
COO⁻	-	1522	-	1526
COO⁻	-	1535	1530	-
Amid III	-	-	1564	1565
Guanin, adenin (halka esnemesi)	1591	1581	1579	1589
Fenilalanin	-	-	1593	1602
Tirozin	-	1616	1623	1625
Amid I	-	1658	1646	1655
>C=O ester esnemesi	1688	1693	1683	1692

3.2.6. *C. parapsilosis*'in Raman Spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *C. parapsilosis*'in Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.9'da görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:50 oranında görülmüştür. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.10'da ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir. Raman spektrumları 1450 cm⁻¹ civarındaki C-H₂ deformasyon bantları ile karakterizedir. Bantlar genellikle, lipitlerdeki, karbonhidratlardaki ve proteinlerin aminoasit zincirlerindeki – CH₃, – CH₂, ve C–H fonksiyonel gruplarından ileri gelmektedir. 1600 ve 1250 cm⁻¹ civarı, sırasıyla, proteinlerdeki amid I ve amid III bağlarını göstermektedir. Bunun dışında, raman spektrumları, RNA/DNA nükleotid baz çifti guanin (G), timin (T), adenin (A), sitozin (C), urasil (U), ve proteinlerdeki amino asit grupları olan triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenilalaninin (Phe) bantlarını gösterir (Maquelin, 2002).



Görsel 3.9. *C. parapsilosis*'in Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları



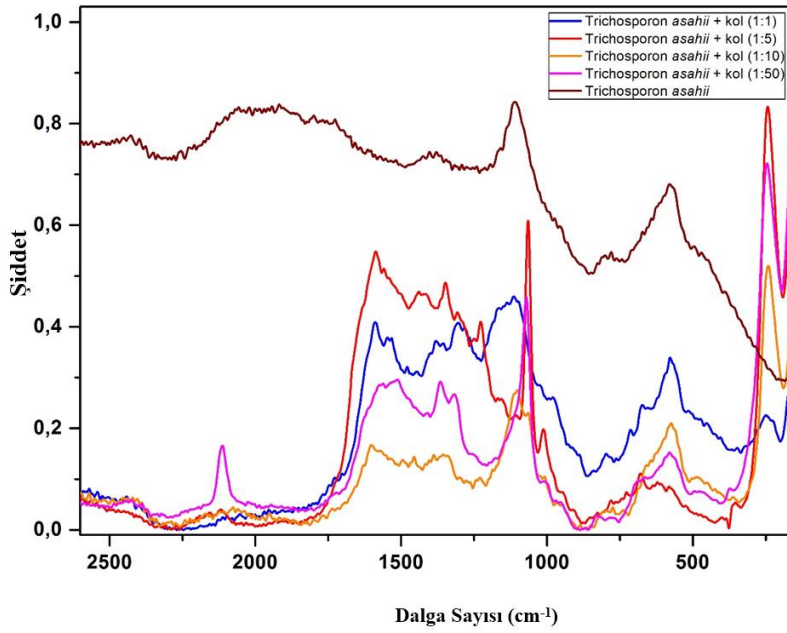
Görsel 3.10. *C. parapsilosis*'in Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.7. *C.parapsilosis*'in Raman Bant Frekansları

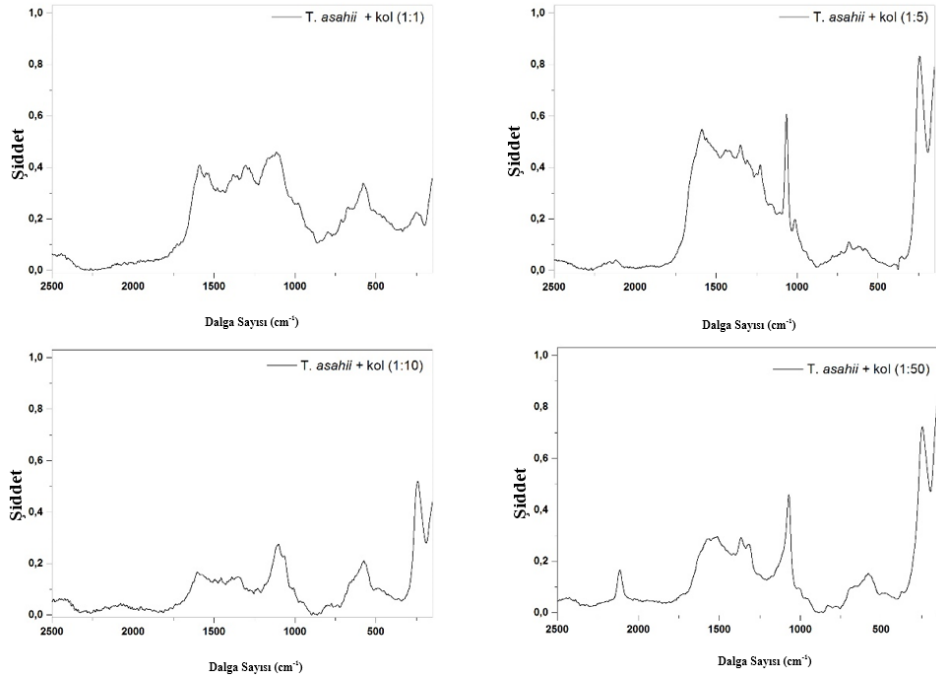
<i>C.parapsilosis</i>	1:1	1:5	1:10	1:50
S-S esnemesi	518	510	498	507
COC glikozidik halka deformasyonu	547	536	535	534
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	572	571	571	569
Fenilalanin	622	616	610	629
Tirozin	640	-	647	-
Tirozin	-	659	-	663
Guanin	696	684	702	-
Adenin	722	732	730	742
Adenin	753	755	-	-
Sitozin, urasil (halka, esneme)	-	-	765	-
O-P-O	795	804	808	792
Exposed tirozin	827	-	831	836
Buried tirozin	-	856	857	-
CC esneme, COC 1,4 glikozidik bağ	865	-	-	869
COC esneme	-	884	885	-
Glukoz	895	922	918	902
C-N esnemesi	949	965	945	-
C-N esnemesi	-	-	985	980
Fenilalanin	1019	1031	1016	1008
C-N ve C-C esneme	-	-	1039	1040
C-O esneme	1077	-	-	1071
>PO ₂ ⁻ esneme (simetrik)	-	1093	1089	-
>PO ₂ ⁻ esneme (simetrik)	1105	-	1108	1102
C-N ve C-C esneme	1132	1134	1133	1137
Fosfat titreşimi	1171	1181	1194	1172
Amid III	1204	1208	1222	1221
Amid III	1237	1235	-	1257
Amid III	1270	-	1269	-
CH ₂ deformasyonu	1299	1293	1298	1294
C-H protein	1334	1333	-	-
C-NH ₂ esneme	-	-	1352	1346
C-H protein	1373	1381	1396	1378
C-H ₂ (protein, lipid)	1429	1414	1421	1402
C-H ₂ deformasyonu	1462	1456	1460	1462
NH ₂	-	-	1495	-
Amid II (NH-CN)	-	-	-	-
COO ⁻	1531	1524	1538	1521
Amid III	-	1555	-	-
Guanin, adenin (halka esnemesi)	1586	1577	1577	1590
Fenilalanin	-	1601	-	-
Tirozin	1613	-	1615	-
Amid I	1671	-	1662	-
>C=O ester esnemesi	-	1686	-	-

3.2.7. *T. asahii*'nin Raman Spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *T. asahii*'nin Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.11'de görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Gümüş nanopartiküllerin konsantrasyonu arttıkça piklerde artma gözlenmiştir ancak 1:50 oranındaki en yüksek konsantrasyonda spektrumdaki piklere azalma görülmektedir. Bunun nedeni diğer fungus örneklerine göre daha az katı ve daha çeşitli moleküler yapılar içermesi olabilir (Tablo 3.6). SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.12'de ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir.



Görsel 3.11. *T. asahii*'nin Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları



Görsel 3.12. *T. asahii*'nin Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.8. *T. asahii*'nin Raman Bant Frekansları

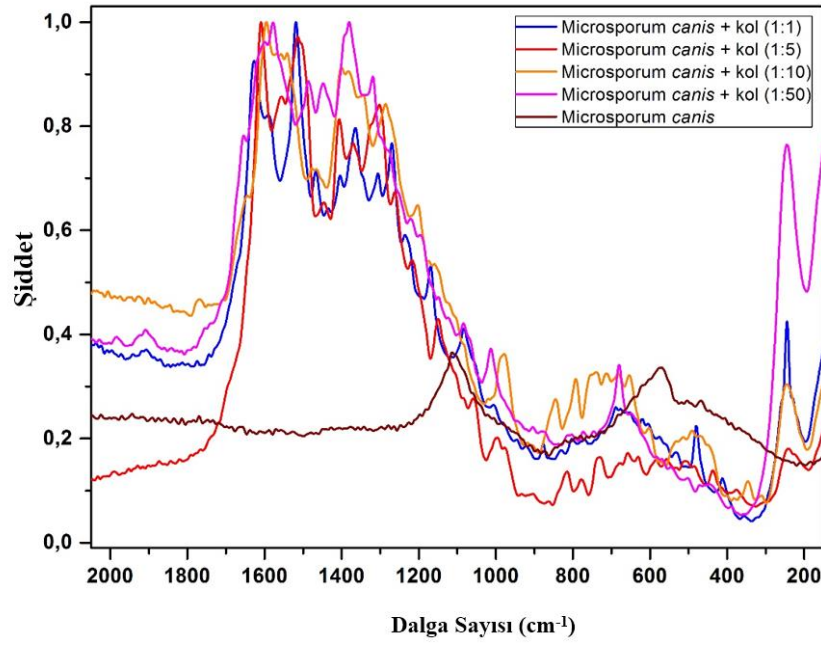
<i>T.asahii</i>	1:1	1:5	1:10	1:50
S-S esnemesi	514	-	503	-
COC glikozidik halka deformasyonu	-	-	-	-
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	578	582	574	579
Fenilalanin	-	622	-	-
Tirozin	-	-	646	-
Tirozin	-	-	662	-
Guanin	676	680	689	-
Guanin	-	-	709	700
Adenin	715	728	738	-
Sitozin, urasil (halka, esneme)	763	782	774	-
O-P-O	798	-	798	-
Exposed tirozin	844	827	811	832
Buried tirozin	-	-	850	-
CC STR, COC 1,4 glikozidik bağ	-	-	868	-
COC esnemesi	887	-	887	-
Glukoz	926	906	907	-
C-N esnemesi	943	943	947	951
Fenilalanin	1022	1011	1007	998
C-N ve C-C esnemesi	-	-	-	-
C-O esnemesi	-	1065	1064	1071
>PO ₂ ⁻ esnemesi (simetrik)	1097	-	1101	-
>PO ₂ ⁻ esnemesi (simetrik)	1112	-	-	-

Tablo 3.9. (Devam) *T. asahii*'nin Raman Bant Frekansları

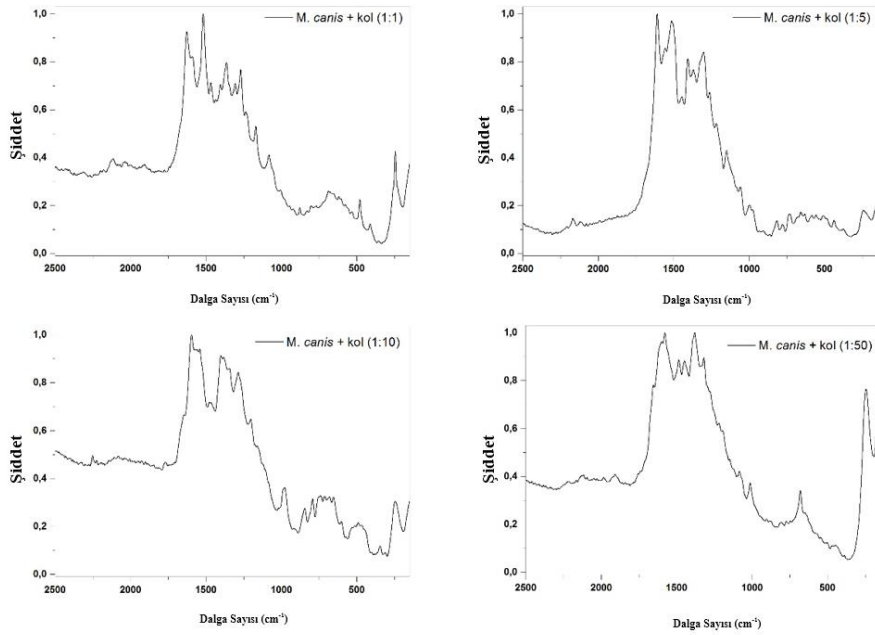
C-N ve C-C esnemesi	1136	1154	-	-
Fosfat titreşimi	1169	-	1174	-
Amid III	1212	-	1201	-
Amid III	1233	1226	1230	-
Amid III	1246	-	1244	-
Amid III	1267	-	1263	-
Amid III	1282	-	1276	-
CH₂ deformasyonu	1305	1306	1298	1314
C-H protein	-	1348	1337	-
C-NH₂ esneme	1356	-	-	1365
C-H protein	1382	-	1389	-
C-H₂ (protein, lipid)	1402	-	1404	1409
C-H₂ (protein, lipid)	-	1414	1418	-
C-H₂ deformasyonu	1466	1440	1456	1470
NH₂	1479	-	1494	-
Amid II (NH-CN)	-	-	1514	1511
COO⁻	1533	-	1529	-
Amid III	1548	1560	-	1577
Guanin, adenin (halka esnemesi)	1586	1589	-	-
Fenilalanin	1592	-	-	-
Tirozin	-	-	1604	-
Amid I	-	1646	1631	-
Amid I	-	-	1659	-

3.2.8. *M. canis*'in Raman Spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *M. canis*'in Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.13'de görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:50 oranında görülmüştür. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.14'de ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir. Raman spektrumları 1450 cm⁻¹ civarındaki C-H₂ deformasyon bantları ile karakterizedir. Bantlar genellikle, lipitlerdeki, karbonhidratlardaki ve proteinlerin aminoasit zincirlerindeki – CH₃, – CH₂, ve C–H fonksiyonel gruplarından ileri gelmektedir. 1600 ve 1250 cm⁻¹ civarı, sırasıyla, proteinlerdeki amid I ve amid III bağlarını göstermektedir. Bunun dışında, raman spektrumları, RNA/DNA nükleotid baz çifti guanin (G), timin (T), adenin (A), sitozin (C), urasil (U), ve proteinlerdeki amino asit grupları olan triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenilalaninin (Phe) bantlarını gösterir (Maquelin, 2002).



Görsel 3.13. *M. canis* 'un Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları



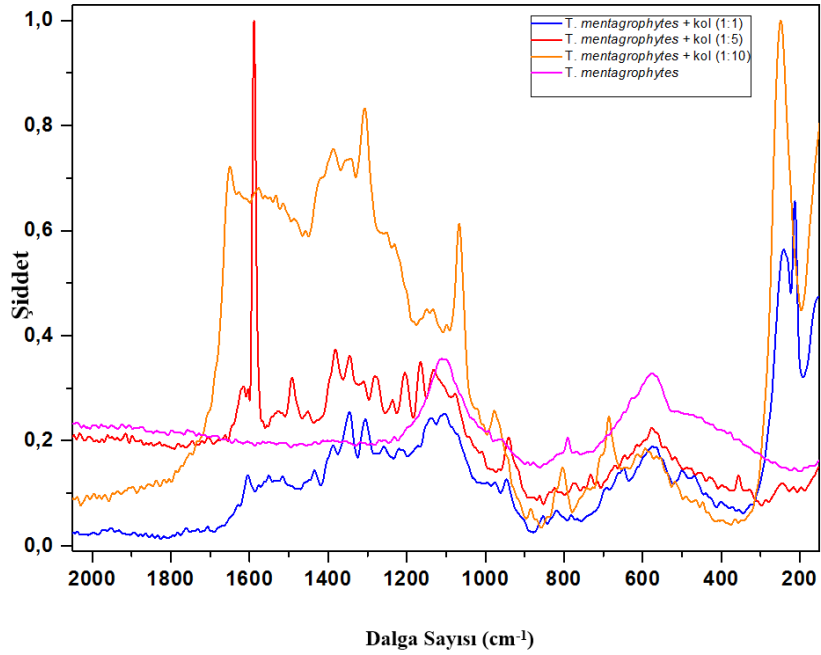
Görsel 3.14. *M. canis* 'un Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.10. *M. canis*'in Raman Bant Frekansları

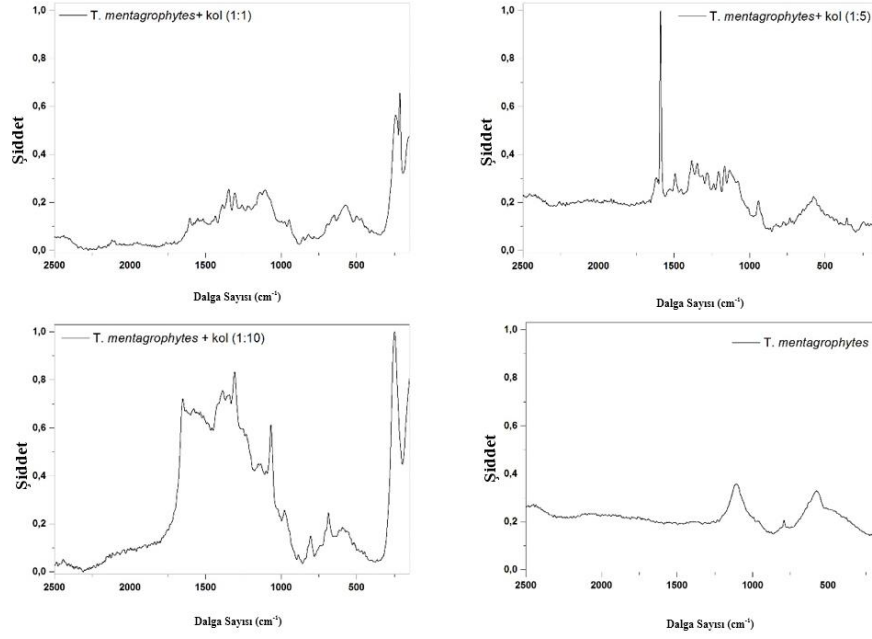
<i>M.canis</i>	1:1	1:10	1:50
Polisakkaritler	480	491	473
S-S esnemesi	-	515	500
COC glikozidik halka deformasyonu	555	544	544
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	575	-	567
Fenilalanin	603	600	
Fenilalanin	620		635
Tirozin	651	651	-
Guanin	690	681	680
Adenin	-	757	747
Sitozin, urasil (halka, esneme)	769	-	774
O-P-O	804	793	-
Exposed tirozin	831	-	815
Buried tirozin	-	846	-
CC esnemesi, COC 1,4 glikozidik bağ	877	-	872
COC esnemesi	-	-	-
Glukoz	920	918	904
C-N esnemesi	975	977	-
Fenilalanin	1004	-	1012
C-N ve C-C esnemesi	1054	1021	-
C-O esnemesi	1082	1081	1083
>PO ₂ ⁻ esnemesi (simetrik)	-	1102	-
C-N ve C-C esnemesi	-	1120	1121
C-N ve C-C esnemesi		1147	1147
Fosfat titreşimi	1165	1173	1163
Amid III	1226	1201	1219
Amid III	-	-	1250
Amid III	1269	-	1274
CH ₂ deformasyonu	1306	1285	1318
C-H protein	-	-	-
C-NH ₂ esneme	1334	1343	-
C-H protein	1364	-	1381
C-H ₂ (protein, lipid)	1405	1403	-
C-H ₂ deformasyonu	1436	-	1448
C-H ₂ deformasyonu	1466	1465	
NH ₂	-	1477	1487
Amid II (NH-CN)	1518	-	-
COO ⁻	-	1540	-
Amid III	-	1557	-
Guanin, adenin (halka esnemesi)	-	-	1578
Fenilalanin		1596	1609
Tirozin	1628	-	
Amid I	-	-	1657

3.2.9. *T. mentagrophytes*'in Raman Spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10 oranlarında karıştırılan *T. mentagrophytes*'in Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.15'de görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:10 oranında görülmüştür. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.16'da ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir. 870 cm^{-1} civarında gözlenmesi beklenen CC esneme, COC 1,4 glikozidik bağ piki ve 1360 cm^{-1} civarında ki C-H protein piki bu örnekte gözlenmemiştir. Raman spektrumları 1450 cm^{-1} civarındaki C-H₂ deformasyon bantları ile karakterizedir. Bantlar genellikle, lipitlerdeki, karbonhidratlardaki ve proteinlerin aminoasit zincirlerindeki – CH₃, – CH₂, ve C–H fonksiyonel gruplarından ileri gelmektedir. 1600 ve 1250 cm^{-1} civarı, sırasıyla, proteinlerdeki amid I ve amid III bağlarını göstermektedir. Bunun dışında, raman spektrumları, RNA/DNA nükleotid baz çifti guanin (G), timin (T), adenin (A), sitozin (C), urasil (U), ve proteinlerdeki amino asit grupları olan triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenilalaninin (Phe) bantlarını gösterir (Maquelin, 2002).



Görsel 3.15. *T. mentagrophytes*'in Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları



Görsel 3.16. *T. mentagrophytes*'in Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.11. *T. mentagrophytes*'in Raman Bant Frekansları

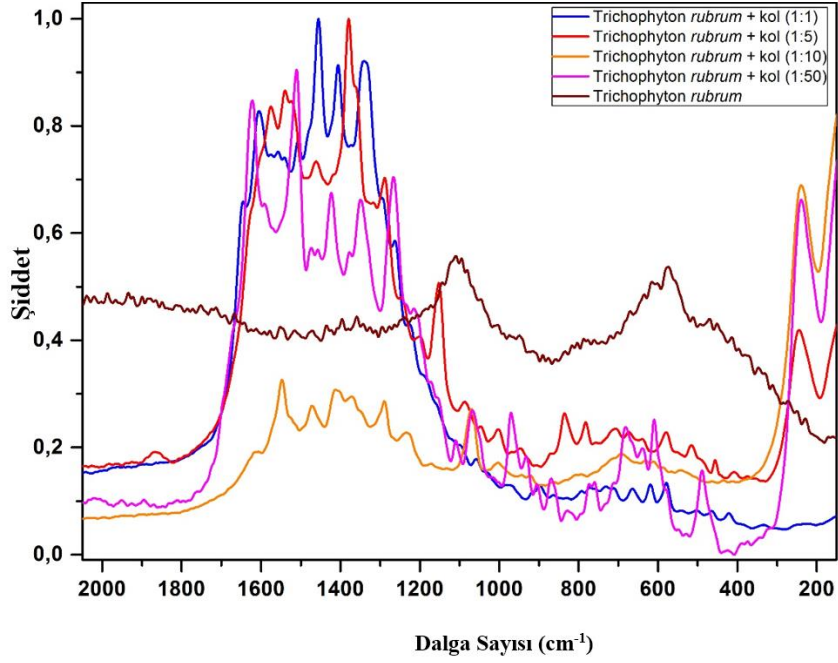
<i>T. mentagrophytes</i>	1:1	1:5	1:10
S-S esnemesi	501	-	517
COC glikozidik halka deformasyonu	-	-	536
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	565	576	563
Fenilalanin	-	-	616
Tirozin	649	648	-
Guanin	698	-	786
Adenin	-	733	743
Sitozin, urasil (halka, titreşim)	-	776	-
O-P-O	782	-	804
Exposed tirozin	819	824	844
Buried tirozin	854	862	-
CC esneme, COC 1,4 glikozidik bağ	-	-	-
COC esnemesi	-	-	884
Glukoz	901	-	-
C-N esnemesi	945	940	943
C-N esnemesi	974	-	976
Fenilalanin	995	1007	1004
C-N ve C-C esnemesi	-	-	1019
C-O esnemesi	1070	1075	1066
>PO ₂ esnemesi (simetrik)	1102	-	1098
C-N ve C-C esnemesi	1141	1133	1150
C-N ve C-C esnemesi	-	-	1150
Fosfat titreşimi	1173	1166	-

Tablo 3.12. (Devam) *T. mentagrophytes*'in Raman Bant Frekansları

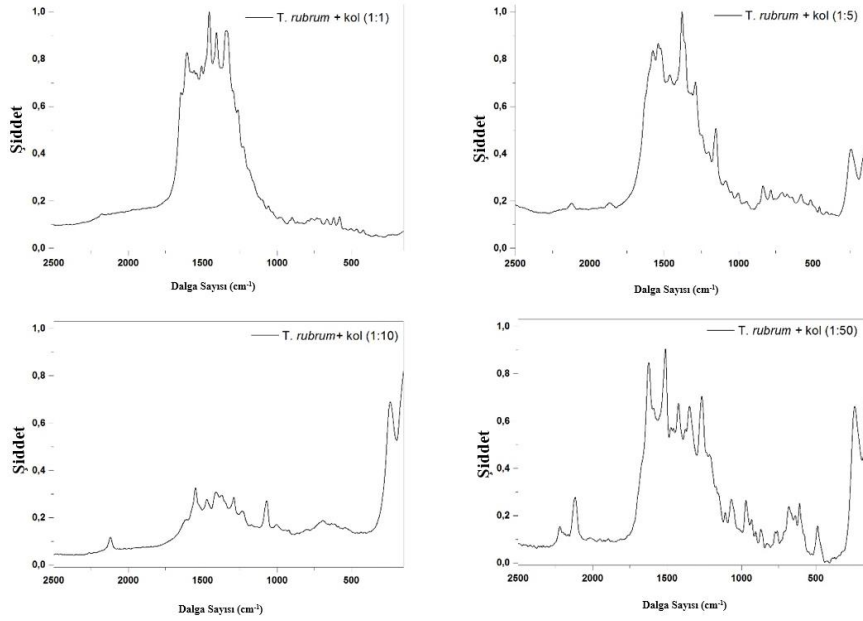
Amid III	1220	1205	1200
Amid III	-	1236	1229
Amid III	1258	1278	1250
CH ₂ def	1306	1308	1306
C-H protein	-	-	-
C-NH ₂ esneme	1346	1345	1341
C-H protein	1390	1382	1388
C-H ₂ (protein, lipid)	1435	-	1425
C-H ₂ deformasyonu	-	1451	1458
NH ₂	-	1492	1479
Amid II (NH-CN)	1516	-	1514
COO ⁻	-	1527	1533
Amid III	1551	-	1547
Guanin, adenin (halka esnemesi)	1577	-	1578
Fenilalanin	1605	1599	-
Tirozin	1631	-	-
Amid I	-	-	1653
>C=O ester esnemesi	1681	-	-

3.2.10. *T. rubrumi*'nin Raman Spektrumları

SERS çözeltisi ile, 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 oranlarında karıştırılan *T. rubrum*'un Raman profilleri karşılaştırılmıştır. Görsel 3.17'de görüldüğü gibi SERS yöntemi ile alınan Raman ölçümlerinin sinyallerinde önemli miktarda artış görülmüştür. Pikler en iyi ve anlaşılır şekilde 1:50 oranında görülmüştür. SERS çözeltisi ile karıştırılmayan örneğin neredeyse düz bir profil verdiği görülmüştür. Görsel 3.18'de ise aynı profiller ayrı ayrı grafiklerde gösterilmiştir. Bu örnekte 1320 cm⁻¹ civarındaki C-H protein piki gözlenmemiştir. Raman spektrumları 1450 cm⁻¹ civarındaki C-H₂ deformasyon bantları ile karakterizedir. Bantlar genellikle, lipitlerdeki, karbonhidratlardaki ve proteinlerin aminoasit zincirlerindeki – CH₃, – CH₂, ve C–H fonksiyonel gruplarından ileri gelmektedir. 1600 ve 1250 cm⁻¹ civarı, sırasıyla, proteinlerdeki amid I ve amid III bağlarını göstermektedir. Bunun dışında, raman spektrumları, RNA/DNA nükleotid baz çifti guanin (G), timin (T), adenin (A), sitozin (C), urasil (U), ve proteinlerdeki amino asit grupları olan triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenilalaninin (Phe) bantlarını gösterir (Tablo 3.9) (Maquelin, 2002).



Görsel 3.17. *T. rubrum* 'un Farklı Konsantrasyonlardaki Karşılaştırmalı SERS Spektrumları



Görsel 3.18. *T. rubrum* 'un Farklı Konsantrasyonlardaki SERS Spektrumları

Tablo 3.13. *T.rubrum*' un Raman Bant Frekansları

<i>T.rubrum</i>	<i>1:1</i>	<i>1:5</i>	<i>1:10</i>	<i>1:50</i>
Polisakkaritler	502	484	485	489
S-S esnemesi	-	516	522	-
COC glikozidik halka deformasyonu	-	550	544	547
Karbohidratlar, fosfotidilinozitol	578	579	585	577
Fenilalanin	619	-	609	609
Fenilalanin	-	637	632	638
Tirozin	664	674	654	683
Guanin	709	705	692	-
Adenin	733	735	717	715
Adenin	756	-	741	-
Sitozin, urasil (ring, str)	-	782	765	774
O-P-O	793	-	-	-
Exposed tirozin	829	836	835	830
Buried tirozin	-	-	867	-
CC esnemesi, COC 1,4 glikozidik bağ	864	872	-	869
COC esnemesi	-	-	893	-
Glukoz	917	905	920	904
C-N esnemesi	950	945	943	931
C-N esnemesi	966	970	-	971
Fenilalanin	1028	1001	1003	-
C-N ve C-C esnemesi	1057	1045	-	1067
C-O esnemesi	1095	1085	-	-
>PO ₂ esnemesi (simetrik)	-	-	1110	1110
C-N ve C-C esnemesi	1136	-	1131	-
Fosfat titreşimi	1156	-	1171	1169
Fosfat titreşimi	1183	1196	-	-
Amid III	-	-	1203	1205
Amid III	1221	1242	1226	-
Amid III	1259	-	1266	-
CH ₂ deformasyonu	1291	-	-	-
C-H protein	-	-	-	-
C-NH ₂ esneme	-	-	1347	-
C-H protein	1374	-	1369	1378
C-H ₂ (protein, lipid)	-	1420	-	-
C-H ₂ deformasyonu	-	1461	1471	1475
NH ₂	-	1486	1496	-
Amid II (NH-CN)	1508	-	-	1511
COO ⁻	-	1540	1547	-
Amid III	1558	1556	1565	-
Guanin, adenin (halka esnemesi)	-	1587	1580	1592
Fenilalanin	-	1606	1606	1606
Tirozin	-	1628	1614	1622
Amid I	-	1671	-	1639
>C=O ester esnemesi		1691		

3.3. Mikroorganizmaların Taramalı Elektron Mikroskobu Analizleri

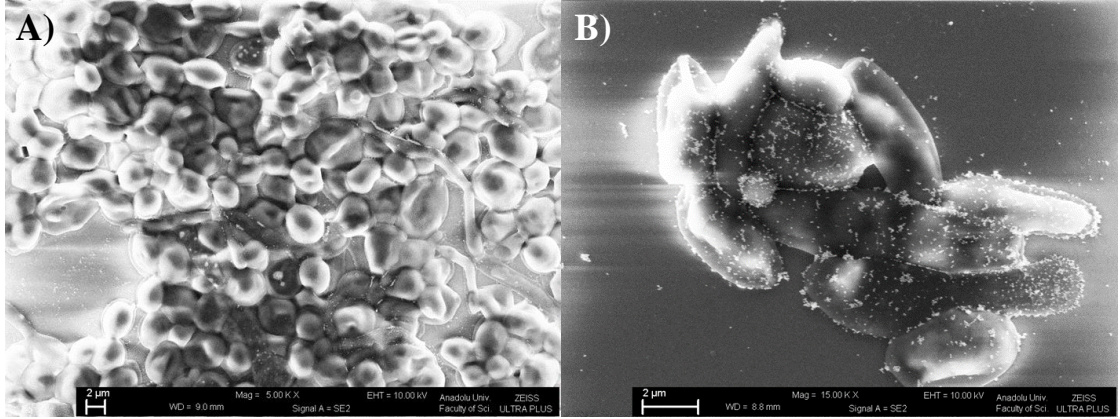
Gümüş nanopartiküllerinden oldukça büyük olan bakteri ve maya gibi moleküler organizasyonlardan alınan, tekrarlanabilir spektrumların elde edilebilmesi için numune hazırlanması adımı SERS ölçümlerinde çok önemli bir adımdır.

Bakteriler gümüş kolloidal nanopartikülleriyle karıştırıldığında, bakteri ve gümüş nanopartikülleri heterojen bir karışım oluşturur. Maya hücreleri bakteri hücrelerinden çok daha büyük boyutlarda oldukları için, gümüş kolloidal süspansiyonu ile karıştırılan maya hücreleri bakteri hücrelerinden daha heterojen bir görünüm oluşturur. Bu SERS spektrumlarında önemli farklılıkları ortaya çıkartabilir. SEM görüntülerinde örneklerdeki gümüş nanopartiküllerinin dağılımı farklılıklar göstermektedir. Bu maya hücrelerinin hücre duvarlarındaki biyokimyasal yapıların farklı olmasından dolayıdır. Gümüş ve altın gibi nanopartiküllerin, $-NH_2$, COO^- , ve özellikle $-SH$ gibi bazı fonksiyonel gruplara karşı bir afiniteye sahip olduğu bilinmektedir. Görsel 3.19 (A) ve Görsel 3.21 (B)' de görüldüğü gibi gümüş nanopartiküllerinin afinitesi önemli ölçüde yüksek değildir ve gümüş nanopartikülleri *C. albicans* ve *Trichosporon asahii* 'nin etrafında birikmiştir. Ancak nanopartiküller *Candida tropicalis* ve *Trichophyton mentagrophytes* (Görsel 3.21 (A) ve Görsel 3.20) ile karıştırıldığında hücrelerin çoğu gümüş nanopartiküller ile kaplanır. Bu hücre duvarı yapısında daha fazla fonksiyonel grup olduğunda olabilir. Nanopartiküllerin ve hücre yüzeyindeki agregatlarının yoğunluğu göz önüne alındığında, bazı $-SH$ ve $-NH_2$ gruplarının mevcut olduğu sonucuna varılabilir.

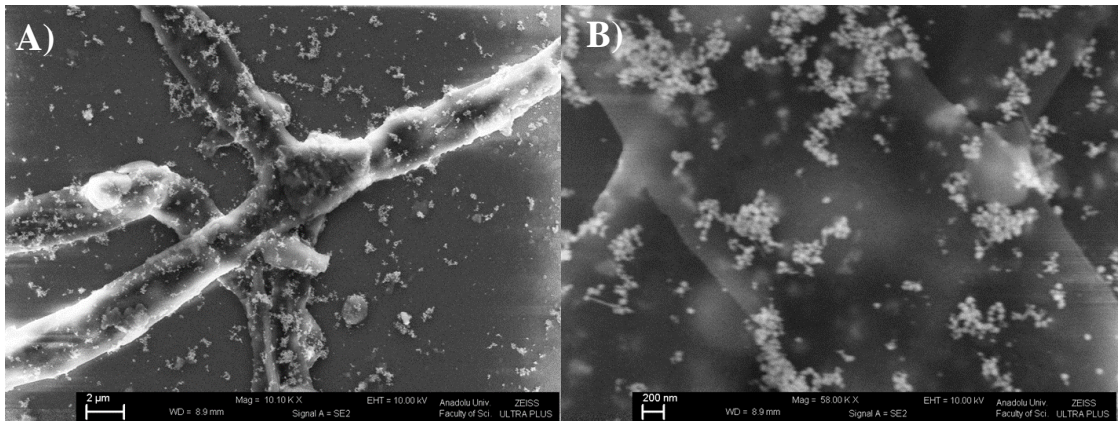
Maya hücrelerinin hücre yüzeyi kaplama derecesi SERS spektrumlarının tekrarlanabilirliğini noktadan noktaya etkiler. Bu çalışmada gümüş nanopartiküllerinin ortalama büyüklüğü 5 nmdir. Maya hücre duvarının por büyüklüklerine ilişkin raporlar, 1 ile 400 nm arasında olduğunu iddia ederler. Ancak aynı zamanda hücre duvarının, çalışmada kullanılan gümüş nanopartiküllerinden önemli ölçüde daha küçük olan, 600 daltondan daha büyük partiküllerin girişini engelledikleri bildirilmiştir. Ek olarak maya hücrelerinin katman katman kaplanması işlemi sırasında gümüş nanopartiküllerinin difüzyonu gözlenmemiştir.

Raman saçılmasını geliştirmek için gümüş nanopartiküllerin hücre duvarı ile temas etmesi gerektiğinden, SEM görüntülerinde görülen nanopartiküllerin dağılımı SERS spektrumunun yorumlanması için önemli bilgiler sağlamaktadır.

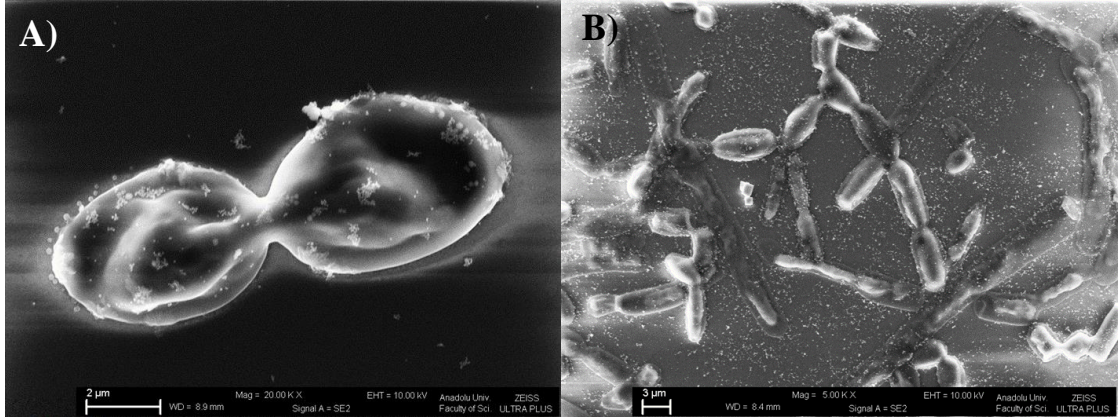
-NH₂ ve -SH gibi fonksiyonel gruplar sadece gümüş nanopartiküller ile güçlü bir etkileşimde bulunabilir. Maya hücre duvarının yüzeyindeki mannoprotein domainlerinin varlığı göz önüne alındığında bu fonksiyonel grupların ve gümüş metal yüzeyi arasındaki etkileşimi kuvvetle muhtemeldir. Bu gibi protein domainleri üzerindeki gümüş nanopartiküllerin lokalizasyonu SERS spektrumlarını çok etkiler.



Görsel 3.19. A) Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan *C. albicans*'in SEM görüntüsü (5.000X büyütme). B) Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan *C. parapsilosis*'in SEM görüntüsü 15.000X Büyütme



Görsel 3.20. Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan *T. mentagrophytes*'in SEM görüntüsü A) 10.100X Büyütme B) 58.000X Büyütme

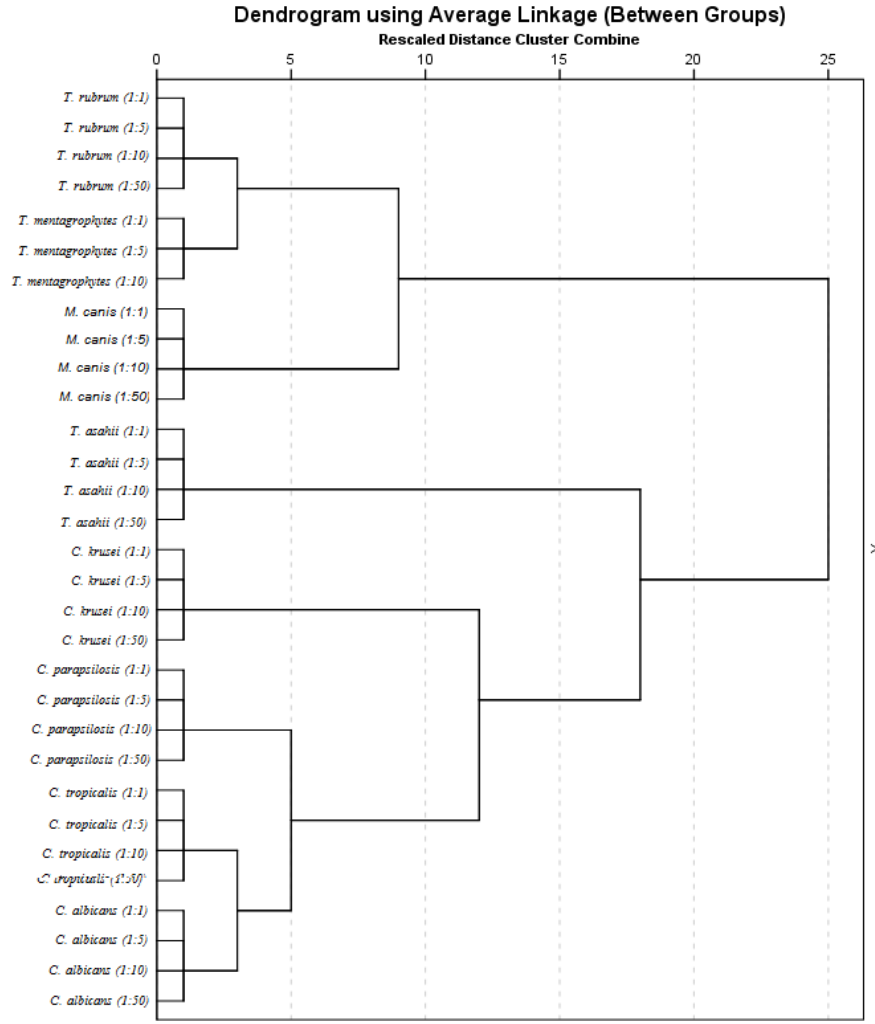


Görsel 3.21. Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:50 oranında karıştırılan *C. tropicalis*'in SEM görüntüsü (20.000X Büyütme) B) Gümüş kolloidal çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan *T. asahii*'in SEM görüntüsü (15.000X Büyütme)

3.4. Raman ve FT-IR Spektrumlarının Hiyerarşik Küme Analizi

Dendrogramlar, spektrumlardan elde edilen sayısal veriler kullanılarak IBM SPSS Statistics 20 programı yardımı ile çizilmiştir. Görsel 3.30'da yapılan küme analizi sonuçlarına göre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *T. asahii* bir kümede; *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* ise diğer bir kümede toplanmıştır.

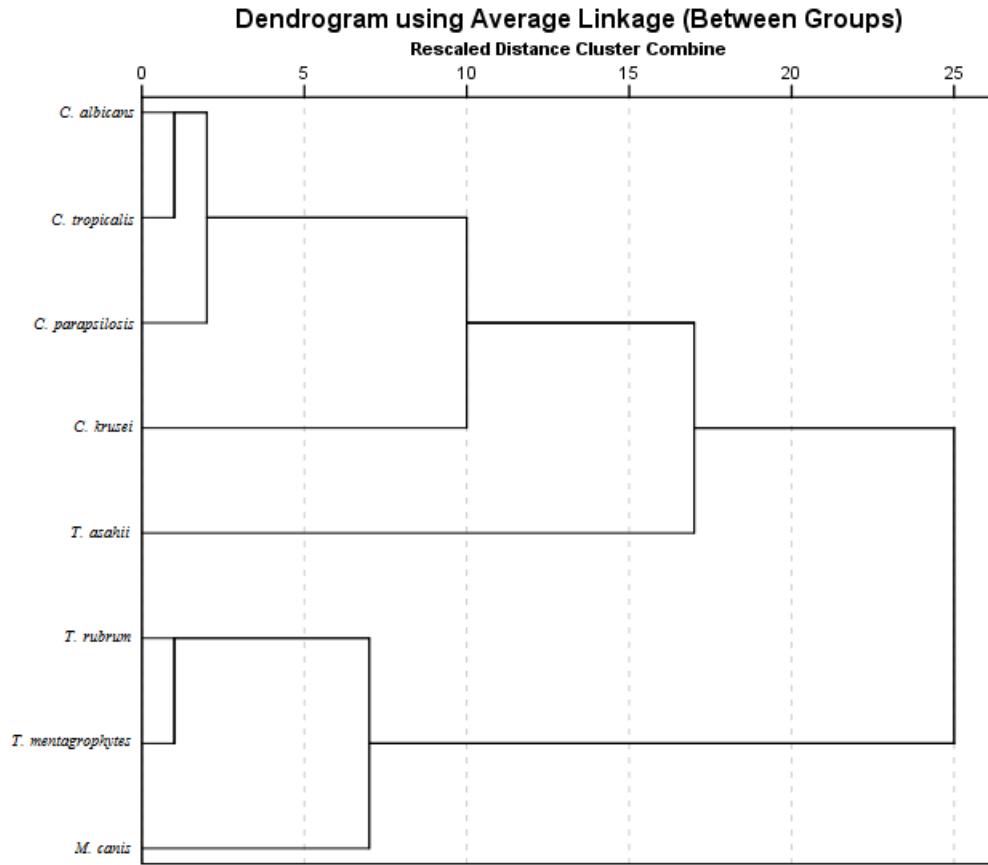
İki küme iki alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grubu *C. albicans* ve *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*, ikinci alt grubu ise *T. asahii* oluşturmaktadır. İkinci kümede kendi içinde iki alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grubu *T. mentagrophytes* ve *T. rubrum* oluştururken, *M. canis* ikinci alt grupta bulunmaktadır.



Görsel 3.22. Farklı Konsantrasyonlardaki Mikroorganizmaların Raman Profillerine Göre Yapılan HCA Analizi

Mikroorganizmaların her konsantrasyonu için alınan spektrum verileri her mikroorganizma grubu için ayrı ayrı kendi aralarında ortalaması alınarak tek bir veri elde edilip ikinci bir dendrogram oluşturulmuştur (Görsel 3.31)

Yapılan uzaklık analizi sonuçlarına göre, *C. albicans* ve *M. canis* arasındaki uzaklık en fazladır (436,672). Aralarındaki uzaklık en az olan, yani birbirine en yakın olan (46,917) ikili ise; *C. albicans* ve *C. tropicalis*' dir. Yani birbirine en yakın türler *C. albicans* ve *C. tropicalis*' olarak ortaya çıkmıştır.

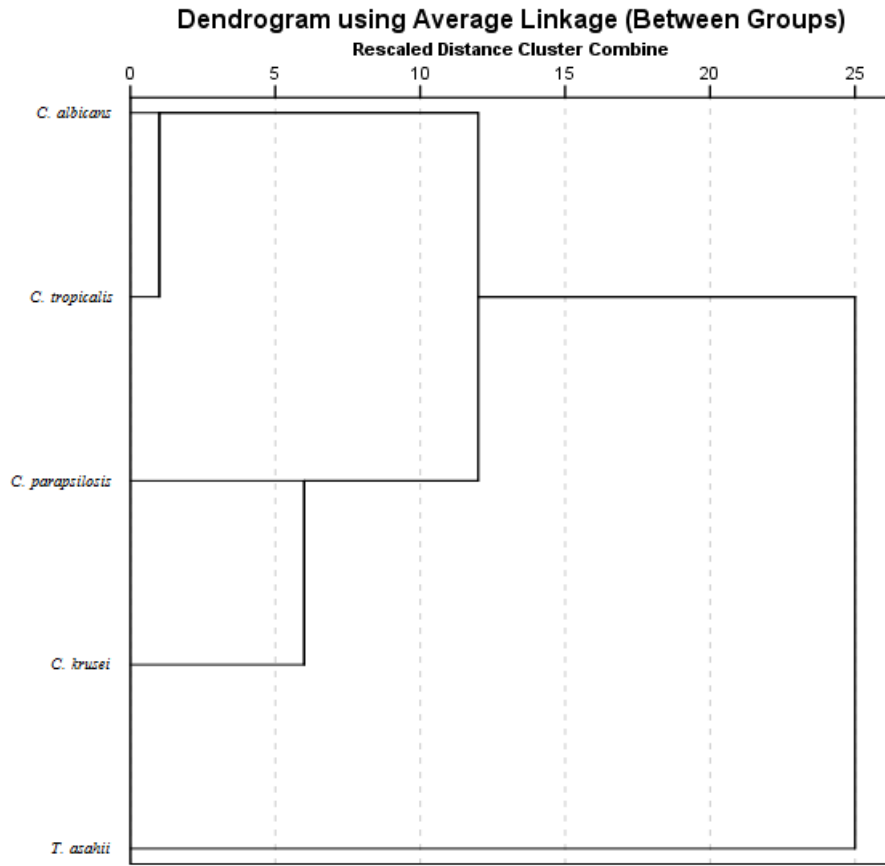


Görsel 3.23. Mikroorganizmaların Raman Profillerine Göre Yapılan HCA Analizi

Tablo 3.14. Raman Spektrumlarına Göre Yapılan Küme Analizi

İlk küme	İkinci küme	Uzaklık Değeri
<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	46,917
<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	51,739
<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	73,908
<i>M. canis</i>	<i>T. rubrum</i>	152,906
<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	199,041
<i>C. albicans</i>	<i>T. asahii</i>	303,492
<i>C. albicans</i>	<i>M. canis</i>	436,672

FT-IR verilerine göre yapılan küme analizi sonuçlarına göre (Görsel 3.32), Raman sonuçlarına benzer şekilde *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* bir grupta toplanırken, birbirine en uzak olan ikili (354,799) *C. albicans* ve *T. asahii*'dir. *C. albicans* ise en yakın *C. tropicalis* ile benzerlik göstermiştir (12, 856).



Görsel 3.24. Mikroorganizmaların FT-IR Profillerine Göre Yapılan HCA Analizi

Tablo 3.15. FT-IR Spektrumlarına Göre Yapılan Küme Analizi

İlk Küme	İkinci Küme	Uzaklık değeri
<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	12,856
<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	81,534
<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	168,480
<i>C. albicans</i>	<i>T. asahii</i>	354,799

4. TARTIŞMA, SONUÇ, ÖNERİLER

Mikroorganizmaların identifikasyonu için hâlihazırda kullanılan, moleküler yöntemler, geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve spektroskopik yöntemlerden olan kütle spektroskopisi (MS), MALDI-TOF, LIBS gibi yöntemler uzun zaman ve maliyet gereksinimi, numunenin tahrip olması gibi dezavantajlara sahiptirler.

Bu yöntemlere alternatif olarak, titreşim spektroskopisi tekniği olarak geliştirilen FT-IR ve Raman spektroskopisinin mikroorganizma identifikasyonu için uygun bir yöntem olup olmadığı araştırılmıştır.

Mikroorganizmaları hücre düzeyinde incelemek, gözlemek ve identifikasyonunu gerçekleştirmek için, bu tezde titreşim spektroskopisi metotlarından olan FT-IR ve Raman spektroskopisi ile çalışılmıştır. Bu teknikler sadece rutin identifikasyon, genel mikrobiyoloji ve spesifik klinik uygulama alanları ile kısıtlı değildir. Raman ve FT-IR gibi yöntemlerin hızlı identifikasyon programları katı kültür ortamından direk ölçüm almak için klinik mikrobiyolojik tanımlama da büyük öneme sahiptir. Elde edilen spektrumlar tüm hücre kompozisyonunun bir yansıması olduğu için, titreşim spektroskopisi mikroorganizmaların identifikasyonu için en ideal yöntemdir (Maquelin, 2002).

Farklı mikroorganizmaların moleküler oluşumları birbirinden farklı olduğu için, bu durum titreşim spektrumlarına da yansımıştır. Ayrıca titreşim spektroskopisi klinik tanımlamada, az miktarda numune ile çalışılabilmesi ve pahalı kimyasalların, boyaların kullanımını gerektirmemesi sebebiyle çok pratik bir yöntemdir (Maquelin, 2002).

Raman spektrumları bir molekül için kızılötesi spektrumları ile birlikte değerlendirildiğinde o moleküle ait hemen hemen bütün titreşimlerin görülmesini mümkün kılıp molekülün kimyasal yapısının veya nitel analizinin daha güvenilir gerçekleşmesini sağlar. Fakat biyolojik çalışmalarda kızılötesi spektroskopik yöntemi su varlığında kuvvetli absorplama özelliği gösterdiği için sorun teşkil etmektedir. Biyolojik çalışmalar için kızılötesi spektroskopisinin geri planda kalması, Raman spektroskopiyi oldukça ön plana taşımıştır. Kızılötesi spektroskopisinin aksine Raman spektroskopinin en büyük avantajlarından birisi olan sulu ortamda bulunan numune analizinin gerçekleştirilmesi daha kolay olmaktadır. Böyle bir teknik ile biyolojik olarak çeşitlilik gösteren canlıların parmak izi bölgeleri çalışılarak tanımlama gerçekleştirilebilmektedir.

Bu tarz bir durumda çalışma sonrası elde edilen spektrumun hücresel bileşen tabanlı olduğu söylenebilir (Temür, 2010).

Farklı mikroorganizmalar için genel olarak farklılık veren bölgeler; farklı türlerin farklı kimyasal moleküller içermesindedir ve spektrumlardaki farklılık içeren bölgelerin bu farklı kimyasal moleküllerden olduğu düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların hücre duvarlarının biyokimyasal yapısı, gümüş nanopartiküllerin yoğunluğunu ve dağılımını belirler ve SERS spektrumlarının tekrarlanabilirliğini güvenilir bir biçimde etkilemektedir. Elde edilen SERS spektrumları, hücre duvarının yapısı ile gümüş nanoparçacıkların etkileşimini gösterdiğinden, mayalardan ve küflerden, hücre duvarlarının biyokimyasal yapılarının daha iyi anlaşılması için moleküler düzeyde bilgi kolayca elde edilebilir. (Sayın, 2009)

Kemometrik tekniklerle birlikte FT-IR spektroskopisi mikrobiyal türlerin identifikasyonu için büyük bir potansiyel sergilemektedir. İdentifikasyonun güvenilirliği hem bakteriler hem de mayalar için yüksektir ve hatta hassas tiplendirme sistemlerinin yüksek sınıflandırma oranları vardır. Referans FT-IR spektrumlarının dünya çapında erişilebilir bir veri tabanının olmamasının temel nedenlerinden biri olan örnek hazırlanması için katı protokollerin takibi zorunlu olması gibi bazı dezavantajlara rağmen FT-IR spektroskopisi rutin türlerin identifikasyonu için birkaç avantajın bir araya gelmesiyle cazip bir teknik olarak görülür. Uygulaması nispeten kolay ve asgari çalışma maliyetleri gerektirir. Kullanıcıya özel taleplere ve bakteriyel adlandırmadaki değişikliklere adapte edilebilir açık veri tabanlarını kullanır. Türlerin identifikasyonu için mevcut olan tüm teknikler arasında, ek bir deney yapmadan tiplendirme amacıyla da kullanılabilen tekniklerinden sadece bir tanesidir. Bu da onu epidemiyolojide değerli bir araç yapar (Wenning, 2013).

Gümüş nanoparçacıkları canlı maya hücresinin yüzeyine geçici olarak bağlanır. Hücre duvarı spektrumlarının varyasyonlarının açıklaması titreşim spektral analiz ile elde edilebilir. Sadece maya hücre yüzeyinden ekstrakte edilmiş şekerlerin (glukan, mannan ve kitin) SERS yöntemi ile alınan spektrumlarında gözlenen bantlar zayıf şiddetlidir. Bu da bileşiklerin SERS'e cevaplarının çok zayıf olduğunu gösterir. Diğer olasılık proteinlerden alınan SERS yanıtıdır. Maya hücresinin dış yüzeyi mannan bağlı proteinler ile kaplıdır. Ayrıca gümüş nanoparçacıklar yüzey üstüne adsorbe edilir. SERS spektrumlarında gözlenen bantların mannoproteinlerden geldiği sonucuna ulaşılmıştır.

Fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin gibi amino asitler kromofor grubuna sahip mannoproteinler içinde yer alır.

Bu çalışmada SERS yöntemi ile maya ve filamentli fungus hücre yüzeylerinin analizi yapılmıştır. Burada her bir agregatın spektrumlardaki çeşitliliğini görebilmekteyiz. SERS spektrumlarındaki bu değişkenlik, gümüşün proteinlerdeki farklı kimyasal türler ile etkileşmesindeki farklılıktan dolayı olabilir. Numunelerin SERS spektrumları karşılaştırıldığında fungus hücre duvarına ait pek çok pik gözlenmiştir. Bu pikler, fungus hücre zarı proteinlerinin Raman titreşim pikleri olarak belirlenmiştir. Gümüş / sitrat partikülleri için bağlanma afinitesi, güçlü bir şekilde yüke bağlıdır ve katyonik gruplar anyonik gruplara göre daha güçlüdür. Bu sebeple, katyonik gruplar genellikle SERS spektrumunda baskın, anyonik gruplar ise neredeyse görünmez. (Sujith.2009). SERS tekniği, mikroorganizmaların identifikasyonu için daha fazla araştırılması gereken çok hızlı mikrobiyolojik identifikasyon yöntemidir (Jarvis, 2006).

Kastanos (2012)' a göre FT-IR spektroskopik yöntemi, Raman spektroskopik yöntemine göre daha hassastır ancak biyolojik sistemlerdeki kullanımı, çalışılan spektrum bölgesinde suyun güçlü absorpsiyonu nedeniyle çok sınırlıdır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, FTIR ve oldukça karmaşık sınıflandırma analizi yöntemlerini kullanarak mikroorganizmaların ayrıştırılabildiği gösterilmiştir.

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi yani kısaca SERS olarak adlandırılan işlem, sinyalleri önemli ölçüde arttıran (10^{14} kat), daha hızlı basit ve daha doğru tespit yapan bir Raman spektroskopisi çeşididir. Ayrıca düşük maliyette ve yüksek hızda sinyalleri önemli ölçüde geliştirilmesini sağlayan nispeten ucuz ve basit ekipmanları kullanan bir yöntemdir. SERS mikroorganizma türlerini ve fonksiyonlarının tanımlanması için önemli avantajlar sunmaktadır;

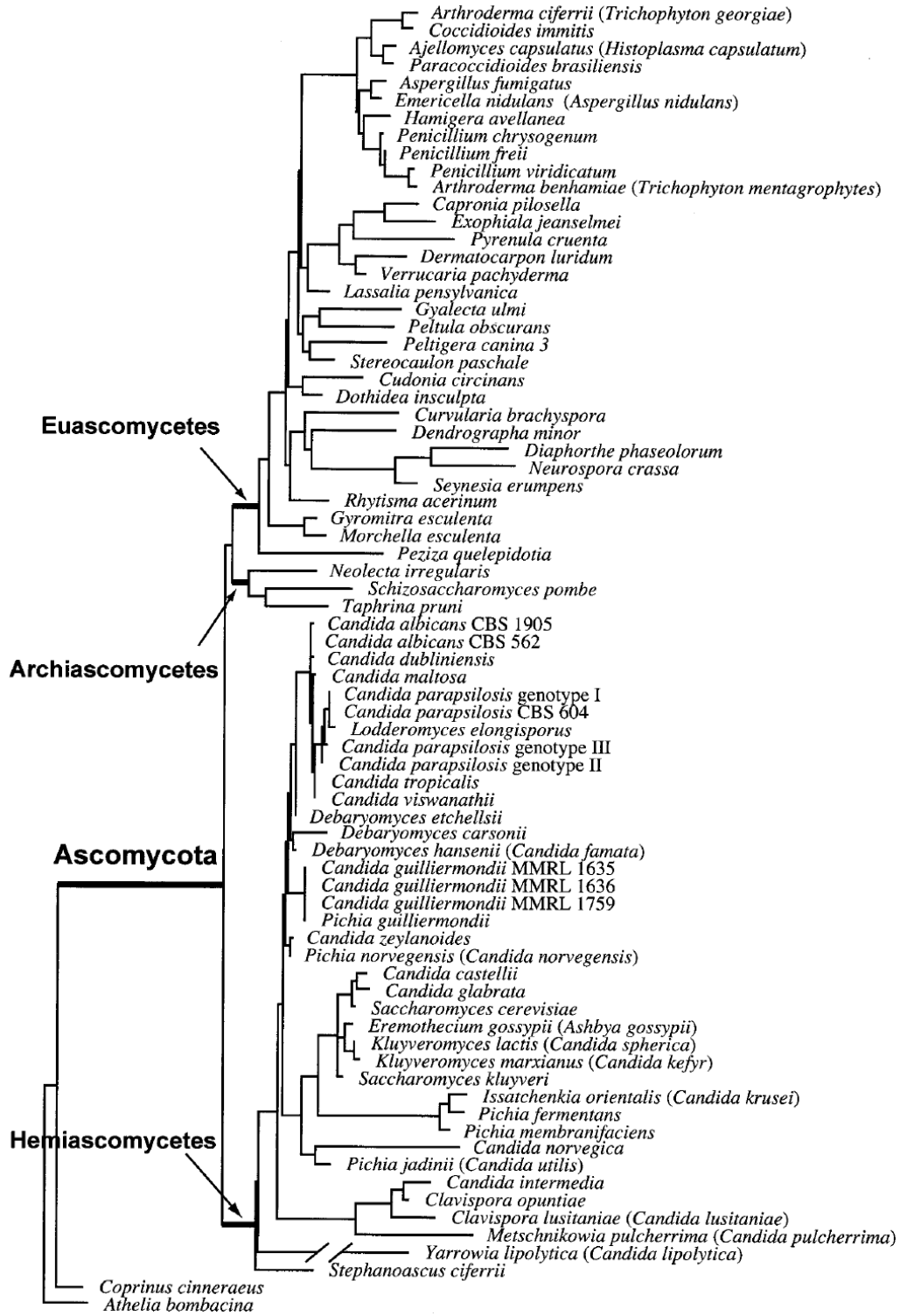
a. Raman sinyallerindeki geliştirme az miktarda mikroorganizmanın net olarak belirlenmesine olanak sağlar, bu nedenle, kültür basamakları için gerekli zaman ve kaynak tüketimi ortadan kaldırılmış olur.

b. Raman spektroskopisi durumunda, SERS tarafından sağlanan geliştirme, birden fazla bileşenli örneklerin durumunda identifikasyon seçiciliğini artırır hatta tek tek mikroorganizma belirlenmesini sağlar.

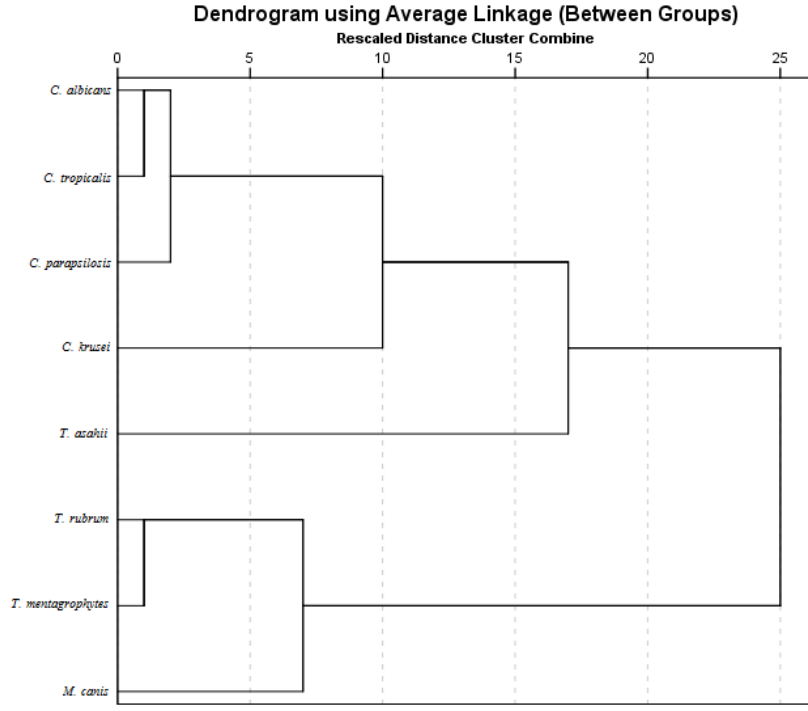
c. Metal nanoparçacıklar, belirli koşullar altında, bakterinin iç ortamı kadar dış moleküllerinde (hücre duvarı) sinyallerinin geliştirilmesini sağlayarak bakteriler

tarafından içselleştirilir. Bu bakteri sınıflandırılmasının duyarlılık ve seçiciliğini arttırdığı için çok önemli bir avantajdır (Kastanos, 2012). Bu özelliklerinden dolayı titreşim spektroskopisinin mikrobiyolojik örneklerin incelenmesinde ve identifikasyonunda son derece kullanışlı bir yöntem olduğu ortadadır.

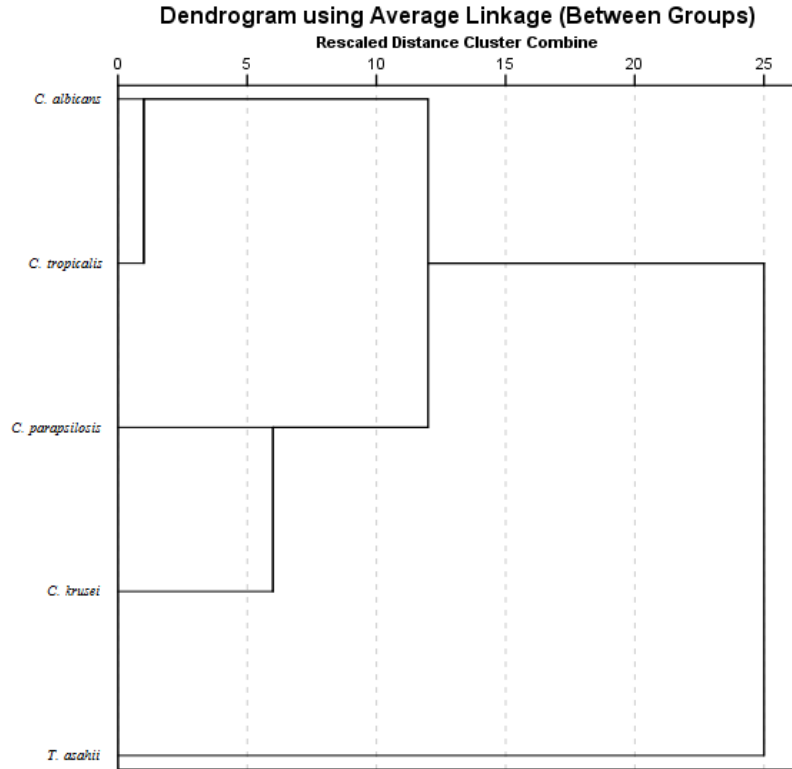
Bu çalışmada elde edilen FT-IR ve Raman spektroskopisi sonuçlarının hiyerarşik küme analizi (Görsel 4.2 ve 4.3) ile *Candida* türlerinin filogenetik analizi (Görsel 4.1) (Diezmann, 2004; Fitzpatrick, 2006) örtüşmekte ve *C. albicans* ve *C. tropicalis* birbirine en yakın iki tür olurken *C. parapsilosis* ve *C. krusei*, sırasıyla filogenetik ağaçta daha uzakta yer almaktadır. Sonuç olarak çalıştığımız *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* ile *Trichosporon asaii* için titreşim spektroskopisi teknikleri ile gen seviyesinde analize yakın bir identifikasyon sonucu alınabilir. Ayrıca maya benzeri *T. asahii*, *Candida* cinslerine yakın bir kümede; *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* miselli fungusları da ayrı kümelerde yer alarak titreşim spektroskopisi ile identifikasyonun mümkün olacağını kanıtlamışlardır.



Görsel 4.1. Literatürdeki Gen Çalışmalarına Göre Hiyerarşik Kümeleme Analizi
Kaynak: Diezmann, 2004



Görsel 4.2. Raman sonuçlarına göre elde edilen Hiyerarşik Kümeleme Analizi



Görsel 4.3. FT-IR Sonuçlarına Göre Elde Edilen Hiyerarşik Kümeleme Analizi

Mikroorganizmaların FT-IR spektrumlarını almak için yapılan ön hazırlıkta 24 saat boyunca ependorfların kapakları açık bırakılarak içlerindeki suyun uçurulması hedeflenmiştir. Su molekülünün kızılötesi bölgede girişim yapmasından dolayı yukarıdaki işlem uygulanmıştır. Ancak Raman spektroskopisinde böyle bir durum söz konusu olmadığı için mikroorganizmalar direkt olarak analiz edilmiştir (Kastanos, 2012).

Sonuç olarak;

1. SERS yöntemi ile elde edilen piklerin normal Raman piklerine göre sinyallerinde önemli ölçüde artış olduğu gösterilmiştir.

2. Gümüş nanopartiküller ile karıştırılan örneklerde, karıştırılmayanlara göre pik sayısında ve yoğunluğunda önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Farklı mikroorganizmaların Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüleri karşılaştırılarak, gümüş nanoparçacıkların hücre duvarlarına bağlanma afiniteleri açıklanmıştır.

3. SERS ve FTIR profillerinden Hiyerarşik Küme Analizi (HCA) ile elde edilen dendrogramlar karşılaştırılarak aynı tür mikroorganizmaların birbiri ile benzer profilleri olduğu gösterilmiştir.

4. Elde edilen dendrogramlar gen alizi çalışmaları ile karşılaştırılmış ve filogenetik ilişkileri bakımından Raman analizine göre yapılan dendrogram ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır. SERS yöntemi ile tür düzeyinde ayırım yapılabildiği sonucuna varılmıştır.

5. FTIR sonuçlarına göre oluşturulan dendrogram referans çalışmalarla karşılaştırıldığında, benzerlik gösterdiği aynı zamanda Raman spektroskopisi yöntemi sonuçlarına göre oluşturulan dendrogram ile benzer olduğu görülmüştür.

6. Çalışmada kullanılan iki farklı titreşim spektroskopisi yönteminin de doğru sonuç verdiği ve birbirini tamamlayıcı iki yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

7. FTIR spektroskopisi yöntemi ile maya ve maya benzeri mikroorganizmaların tür düzeyinde ayrılabilirdiği gösterilmiştir.

8. SERS yöntemi ile mayaların ve filamentli küflerin tür düzeyinde ayrılabilirdiği gösterilmiştir.

Çalışmada yapılan istatistiksel analiz yöntemleri ile titreşim spektroskopisinin tür seviyesindeki mikroorganizmaların ayırımında kullanılabileceği görülmektedir. Her farklı tür kümeleme analizinde farklı bir kümede toplanmaktadır. Bundan yola çıkarak mikroorganizmaların FTIR ve Raman profillerinin yüklendiği bir kütüphane oluşturarak,

yeni çalışılan bir mikroorganizmanın genel olarak hangi türlere benzediği titreşim spektroskopisi analizleriyle anlaşılabilir.

Bu çalışmada elde edilen FT-IR ve Raman spektrumları literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında benzer oldukları görülmüştür. Çalışmada mikroorganizmalar için geliştirilen SERS tekniğinin sadece karakterizasyon için değil, aynı zamanda sınıflandırma ve identifikasyon için de kullanılabilceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda yapılan istatistiksel analiz yöntemleri ile FT-IR'nin ve SERS yönteminin tür seviyesindeki mayaların ve filamentli küflerin ayırımında kullanılabilceği görülüyor. Her farklı tür kümeleme analizinde farklı bir kümede toplanmaktadır. Bundan yola çıkararak; maya ve filamentli küflerin FT-IR ve SERS profillerinin yüklendiği bir kütüphane oluşturarak; yeni çalışılan, bilinmeyen bir türün genel olarak hangi türlere benzediği titreşim spektroskopisi yöntemiyle anlaşılabilir.

Literatürde, daha önce filamentli küflerle yapılan SERS yöntemi çalışmaları bulunmadığından, elde edilen SERS spektrumları literatür ile karşılaştırılamamaktadır. Ancak biyolojik moleküllerin Raman bantlarının değerleri bilindiği için elde ettiğimiz verileri literatürdeki tabloları referans alıp her mikroorganizma için Raman bant işaretlemeleri yapılmıştır.

Maya ve filamentli küfler için genel olarak farklılık veren bölgeler; maya ve filamentli küflerin farklı kimyasal moleküller içermesindedir ve FT-IR ile Raman spektrumlarındaki farklılık içeren bölgelerin bu farklı kimyasal moleküllerden olduğu düşünülmektedir.

Bu alışma ile 5 farklı maya ve 4 küfün Raman profili çıkarılmıştır. FT-IR profilleri ise sadece mayalarda analiz edilmiştir. Klinik öneme sahip bu mikroorganizmaların profilleri ile bir FT-IR ve Raman kütüphanesi oluşturularak ileride hızlı tanı koymak mümkün olabilir. Böylelikle bir hastadan ya da gıdadan elde edilen mikroorganizmaların tanısı, bu kütüphane sayesinde kolaylıkla yapılabilir. Bu yöntemlerin özellikle de SERS yönteminin filamentli küflerin tür altı seviyede tanısı için kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmalıdır.

KAYNAKÇA

- Akyar, I. (2011), Kütle Spektrometrisinin Mikrobiyolojide Kullanımı, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 177-183.
- Albayrak, G. (2010), *Halofilik Arkea ve Bakteria İdentifikasyonunda FT-IR (Fourier Transform- Infrared Spektroskopisi) Kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.
- Alexander, T.A., Pelligrino, P.M, and Gillespie, J.B. (2003). Near-Infrared Surface enhanced Raman Scattering Mediated Detection of Single Optically Trapped Bacterial Spores, *Appl. Spectrosc.*, 57; 1340-1345.
- Arcangeli, C. and Cannistraro, S. (2000). In situ Raman microspectroscopic identification and localization of carotenoids: approach to monitoring of UV-B irradiation stress on Antarctic fungus. *Biopolymers.*, 57; 179-186.
- Aşçı, Z., (1992). *Elazığ Yöresinde İzole Edilen Dermatofit Etkenleri ve İnvitro Duyarlılıklarının Araştırılması*, Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi .
- Aydın, M. (2012). *Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida, Trichosporon, Geotrichum Ve Rhodotorula Kökenlerinin Dna Dizi Analizi Yöntemi İle Tanımlanması*, Ankara: Gazi Üniversitesi.
- Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. and Alivisatos, A.P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science*, 281 (5385), 2013-2016.
- Calderone, R., and Clancy, Cornelius J. (2011) eds. *Candida and Candidiasis* (2nd Edition). Washington, DC, USA: ASM Press,.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D et al. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 130- 180.
- Cui, L, Chen, S. and Zhang, K., (2015). Effect of toxicity of Ag nanoparticles on SERS spectral variance of bacteria, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 1061–1066
- Colombo, A., L, Padovan, A. C., Chaves, G. M. (2011). Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis, *Clin. Microbiol Rev*, 24(4): 682-700.
- Demir, F. (2013), *Trichosporon Türlerinde Bazı Virulans Faktörlerinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi.

- Denyer, S. P., Hodges, N. A. and Gorman, S. P. (2008). eds. Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology. Chichester, GBR: Wiley.
- Elaissari, A. (2008). Colloidal Nanoparticles in Biotechnology. New Jersey, John Wiley & Sons
- Feldheim, D.L., Foss, C.A. (2002). Introduction to Optical and Electronic Behaviors in Metal Nanoparticles in Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications. New York.
- Freire, P.T.C. (2000). Proceedings of the International Conference on Raman Spectroscopy. Zhang S.L, Zhu B.F. New york: John Wiley & Sons;.440.
- Gole, A., Stone, J.W., Gemmill, W.R., Loye, H.J., Murphy, C.J. (2008). Iron oxide coated gold nanorods: synthesis, characterization, and manipulation. Langmuir, 24, 6232–6237
- Gramlich, H.U, Yan, B. (2001). Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. New york: Marcel Dekker, Inc.
- Güven, K. (Ed) (2011), Genel Mikrobiyoloji, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir
- Hamasha, K. M. (2011), *Raman Spectroscopy For The Microbiological Characterization And Identification Of Medically Relevant Bacteria*, Ph.D, Detroit, A.B.D.: Wayne State University,
- Hayatt, M.A. (1989). Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications, Academic Press, San Diego.
- James, J., Baker, C., Swain, H. (2008), Principles of Science for Nurses, John Wiley & Sons, Chichester, GBR.
- Jarvis, R., Brooker, A., Goodacre, R. (2006) Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria, Faraday Discuss, 132, 281–292
- Kahraman, M. (2007), Bakterilerin Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektrumlarını Etkileyen Parametrelerin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Karaltı, İ. (2011), *Candida Ve Aspergillus Enfeksiyonlarının Real Time Pcr Yöntemi İle Hızlı Tanısının Kültür Yöntemi İle Karşılaştırılması Ve Antifungal Direncin Kolorimetrik Yöntemle Tayini*, Doktora Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi,

- Kastanos, E., Kyriakides, A., Hadjigeorgiou, K., Pitris, C. (2012). A Novel Method for Bacterial UTI Diagnosis Using Raman Spectroscopy, *International Journal of Spectroscopy*, 7, 1-13.
- Lewis, D. E., Martinez, J., Akpovo, C. A., Johnson, L., Chauhan, A., Edington, M. D. (2011). Discrimination of bacteria from Jamaican bauxite soils using laser-induced breakdown spectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 2225-2236.
- Lombardi J.R, Birke R.L, Lu T, Xu J. (1986). Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Herzberg-Teller Contributions. *J. Chem. Phys.*: 84; 4174-4180.
- Loucif, L., Bendjama, E., Gacemi-Kirane, D., Rolain, J. M. (2014), Rapid identification of *Streptomyces* isolates by MALDI-TOF MS, *Microbiological Research*, 169, 940–947.
- Lyon, A.L., Musick, M.D., Natan, M.J. (1998). Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing., *Anal. Chem.*, 70, 5177-5183.
- Manfait, M., Lamaze, P., Lamfarraj, H., Pluot, M., Sockalingum, G.D. (2000). Biomed. Spec. Vibrational Spectroscopy and Other Novel Techniques. SPIE, 3918, 135-143.
- Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., Travert, J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vibrational Spectroscopy*, 26, 151-159.
- Matsi, H., Pan, S. (2000). Conformation Change of Poly(dG-dC)•Poly(dG-dC) in Cationic Polyamine Liposome Complexes: Effect of Charge Density and Flexibility of Amine Chains in Headgroups. *J. Phys. Chem B*, 104, 8871-8875.
- Moskovits, M., (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Rev., Mod. Phys.*, 57, 783.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. (1991), Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy, *Nature*, 351, 81-82.
- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H. (1991), Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, 43, VCH, New York, A.B.D..
- Onur, A. (2009), *Mikrobiyoloji Laboratuvarında İzole Edilen Maya Funguslarının VITEK 2 Compact System İle İdentifikasyonu ve Antifungal Duyarlılıklarının Tespiti*, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi

- Pekdemir, M. E. (2011). *Manyetik Nanopartiküller Kullanılarak Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektrometrisi İle Immunoassay Sisteminin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Tokat: Gaziosmanpaşa Üniversitesi.
- Piot, O., Autran, J.C., Manfait, M. J. (2001). Investigation by confocal Raman microspectroscopy of the molecular factors responsible for grain cohesion in the *Triticum aestivum* bread wheat. Role of the cell walls in the starchy endosperm *Cereal Sci.*, 34(2), 191-205.
- Prohaska, S., Pflüger, V., Ziegler, D., Scherrer, S., Frei, D., Lehmann, A., Wittenbrink, M. M., Huber, H. (2013). MALDI-TOF MS for identification of porcine *Brachyspira* species, *Letters in Applied Microbiology*, 58, 292-298.
- Renders, N. H., Kluytmans, J. A., Verbrugh, H. A. (1995). Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification, *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 508-510.
- Sayin, I; Kahraman, M; Sahin, F; Yurdakul, D; Culha, M. (2009). *Applied Spectroscopy*, 63; 11,1276-1282.
- Schuster, K.C., Reese, I., Urlab, E., Gapes, J.R., (2000). Lendl B. Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy., *Anal. Chem.*, 72, 5529-5534.
- Smith E., Dent, G., (2005). *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester, Wiley, 1-20.
- Sockalingum G.D, Lamfarraj H, Beljebbar A, Pina P, Delavenne M, Witthuhn F, Allouch P, Manfait M. (1999). Vibrational spectroscopy as a probe to rapidly detect, identify, and characterize micro-organisms. *SPIE*, 3608; 185-194.
- Solgun, G. (2007). *Trichophyton rubrum* Suşlarının Hemolitik Aktivitesi Ve Antifungal İlaçlara In Vitro Duyarlılığının Saptanması, Uzmanlık Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi.
- Sujith, A., Itoh, T., Abe, H., Yoshida, K., Kiran, M. S., Biju, V., Ishikawa, M. (2009). *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 394, 7, 1803-1809.
- Tanış, H. (2008), *Kahramanmaraş Ve Çevresinde Dermatofitozis Etkenlerinin Belirlenmesi ve Trichophyton rubrum, Trichophyton Mentagrophytes 'in Proteaz Aktivitesinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- Temür, E. (2010). *Bakteri Tayini İçin Nanopartikül Tabanlı Sensör Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi.

- Tümer, S. (2011). *Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Türlerinin Dağılımı Ve Antifungal Duyarlılıkları*, Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi.
- Ustaçelebi, Ş. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, s: 1016-1043 Güneş Kitabevi Ankara
- Wang, C., Chen, J., Talavage, T., Irudayaraj, J. (2009). Gold Nanorod/Fe₃O₄ nanoparticle nano-pearl-necklaces for simultaneous targeting, dual-mode imaging, and photothermal ablation of cancer cells. *Angew Chem Int Ed.*, 48, 2759–2763.
- Wenning, M., Scherer, S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97,7111–7120.
- Yiş, R. (2007). *Candida Türlerinin Restriksiyon Enzim Analizi İle İdentifikasyonu*, Uzmanlık Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi.
- Zheng, J., Zhou, Q., Zhou, Y., Lou, T., Cotton, T.M., Chumanov G. (2002). Surface-enhanced resonance Raman spectroscopic study of yeast iso-1-cytochrome c and its mutant. *J. Electroanal. Chem.*, 530(1-2), 75-81.
- Zolotov, Y. A. (2012). Analytical Identification of Microorganisms, *Journal of Analytical Chemistry*, 67, 189.