

Fungal Antijenlere Karşı Antiserum Hazırlanması ve Floresan Antikor Tekniği ile Domates Ürünlerindeki Fungal Hiflerin Saptanması ¹

Şeref Tağı ², Velittin Gürgün ³

Özet

Domates salçası ve diğer işlem görmüş gıda ürünlerinde fungal kontaminasyonun derecesini tayin etmek amacıyla Howard küf sayım tekniği (HMC) uygulanmaktadır. HMC tekniğinde küf hiflerinin domates dokularından ayırt edilmesi güç olduğu için sayım sonuçları da subjektif olmaktadır.

Bu araştırmada immunofloresans tekniğinin domates salçası ve ketçapta uygulanarak küf hiflerinin spesifik olarak gösterilmesi ve böylece HMC tekniğinde küflü sahaların daha kolay sayılabilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla domatesin bozulmasında en fazla etkin olan küflerden *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus stolonifer* ve *Fusarium* sp. kullanılarak antijen karışımı elde edilmiştir. Bu antijen karışımından hazırlanan çözünmeyen antijen fraksiyonu tavşanlara 11 haftalık bir süre boyunca aşılanmış ve antiserum elde edilmiştir. Antiserum titresi çözünmeyen, çözünen ve hiç işlem görmemiş ham antijen kullanılarak jel immunodifüzyon testi ile saptanmıştır.

Elde edilen antiserum amonyum sülfat ile kısmen saflaştırıldıktan sonra "goat antirabbit IgG" konjugatı kullanılarak indirekt floresan antikor (IFA) testinde ve antiserum fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilerek de direkt floresan antikor (DFA) testinde kullanılmıştır.

Antiserumun salça ve ketçap örneklerinde küf hifleriyle spesifik olarak birleştiği, küf hiflerinin IFA testinde DFA testine göre daha iyi görüldüğü ve antiserumun antijen karışımında yer almayan küflerden *Aspergillus niger* ve *Penicillium frequentans* ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır.

¹ Bu makale, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Prof. Dr. Velittin Gürgün danışmanlığında 1992 yılında tamamlanan yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır. Araştırma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 90-25-00-013 no 'lu proje ile desteklenmiştir.

² Dr., ³ Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Dışkapı Ankara. Yazışmalardan Sorumlu yazarın E-posta adresi staq@agri.ankara.edu.tr

Giriş

Isıl işlem görmüş ürünlerde küflerin varlığı, ya sanitasyona uygun olmayan işleme koşullarını ya da hammaddenin kalite düzeyini göstermektedir. Domates işleme endüstrisinde özellikle hammaddeden kaynaklanan küf kontaminasyonu önemli bir problem oluşturmaktadır.

Domates ve diğer bazı işlem görmüş gıda ürünlerindeki fungal kontaminasyonun derecesini tayin etmek için direkt mikroskopik sayım yöntemlerinden Howard küf sayım (HMC) yöntemi önerilmektedir. Howard sayım yönteminde prensip, mikroskopta sayılan küflü saha oranı ile hammaddenin küf yükü arasında oransal bir ilişkinin bulunmasıdır. Burada mikroskopik olarak gözlenen küf filamentlerinin bulunduğu saha adedi arttıkça, hammaddenin kalitesinin de kötü olduğu sonucuna varılmaktadır (1).

HMC yöntemi pratik ve çok düşük maliyetli olmasına, yaygın kullanımına karşın subjektif ve sonuçları geniş varyasyon gösteren bir yöntemdir. Sonuçların doğruluğu temelde yöntemi uygulayan kişinin küf filamentlerini domates hücre ve dokularından ayırt etme yeteneği ve tecrübesine bağlı olmaktadır (2). Bu nedenlerden dolayı alternatif yöntemler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Kimyasal yonteme dayalı olan ve HPLC ile fungal kitin analizi (3, 4, 5), glukozamin (6) ve enzimatik formik asit (7) tayini alternatif yöntemler olarak çalışılmıştır. Ancak bu yöntemlerin pahalı, zahmetli ve zaman alıcı olmaları nedeniyle kontrol kuruluşları ve endüstri tarafından kabul görmemişlerdir. Son yıllarda ise polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı yöntemler çalışılmaya başlanmış fakat başlangıç düzeyinde olan bu çalışmalar henüz uygulama aşamasına gelmemiştir (8, 9).

Diğer yandan fungal kültürlerden hazırlanan antijenler ile elde edilen antiserumlar, özellikle tıbbi öneme sahip patojen funguslardan bazılarının presipitasyon, kompleman fiksasyon ve immunoelktroforez teknikleriyle tanısı amacıyla kullanılmıştır (10). Bu serolojik testlerin, küflerdeki ortak antijenlerin varlığı nedeniyle gıdalardaki küf kontaminasyonunun klasik kültürel ve direkt mikroskopik sayım yöntemlerine göre daha hızlı ve duyarlı olarak saptanmasında potansiyeli vardır (11, 12). Bu amaçla enzim immunoassay (EIA) yöntemleri küflerin kantitatif olarak saptanması amacıyla çalışılmıştır (13, 14; 15).

Yine serolojik yöntemlerden olan İmmunofloresans veya floresan-antikor tekniği küf hifleri ve misellerinin spesifik olarak boyandıktan sonra gerek teşhisi gerekse bazı ürünlerde hiflerin invazyonunun mikroskop ile gözlenmesi amacıyla bir çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (16, 17, 18, 19). Robertson ve ark. (20) ise domateste bulunan farklı küf türlerinin antijen karışımı ile elde ettikleri antiserumu domates salçasında küf hiflerini indirekt immunofloresans tekniği kullanarak spesifik olarak domates hif ve dokularından ayırt edilebileceğini göstermişlerdir.

Küflere karşı elde edilen antiserumun genellikle tür bazında küfleri ayırt edememesi farklı cinslerle ve türlerle çapraz reaksiyon vermesi, immunojen karışımında yer almayan ve domates ürünlerinde bulunması olası her küf türü pozitif olarak değerlendirileceği için avantaj sağlayacaktır. İmmunofloresans tekniği ile küf hiflerinin görsel olarak diğer hif benzeri yapılardan ayırt edilmesi ve HMC yönteminde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Bu nedenle araştırmamızda, domates ürünlerinde en sık bulunan farklı küf cinslerine ait türlerden oluşan antijen karışımı elde edilmesi, antiserum hazırlanması ve bu antiserumun direkt ve indirekt floresan antikor tekniklerinde kullanılması, en uygun olan tekniğin kullanılarak domates ürünlerindeki küf hiflerinin spesifik olarak ayırt edilmesi ve sonuçta bu yöntemin Howard sayım yönteminde uygulanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Küf Kültürleri ve Besiyerleri

Bu çalışmada domateslerde en sık rastlanan küflerden *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus stolonifer* türleri ve bir *Fusarium* türü antiserum elde etmek amacıyla antijen olarak seçilmiştir (1, 20). Antiserumun çapraz reaksiyonunu test etmek için *Geotrichum* sp., *Penicillium frequentans* ve *Aspergillus niger* türleri kullanılmıştır. Hazırlanan küf antijenlerinden antiserum elde etmek amacıyla 2.5-3 kg ağırlığında beyaz, Yeni Zelanda tipi tavşanlar kullanılmıştır.

Küf kültürleri potato dextrose yatık agar (PDA, Oxoid Ltd., Hants, England) besiyerinde 4 °C 'de muhafaza edilmiştir. Küf kültürlerinin sporlandırılması amacıyla malt extract agar (MEA, Oxoid), kültürlerden miselyum elde etmek amacıyla malt extract broth (MEB, Oxoid) besiyerleri kullanılmıştır.

Küflerden Antijen Hazırlanması ve Antiserum Üretilmesi

Yatık PDA üzerinde 4 °C'de muhafaza edilen kültürler MEA yatık besiyerine aşılınmış ve 5 gün inkübe edilerek iki kez aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürler spor elde etmek amacıyla MEA yatık besiyerlerine (3x20 cm tüplerde 20 ml MEA) aşılınmış ve sporlanmayı teşvik etmek için ultraviyole ışığı altında ($\lambda=360$ nm) 24 °C 'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Besiyerinde gelişen sporlar, her bir tüpe % 0.05 Tween 20 (Sigma Chemical Co., st. Louis, MO, USA) içeren 10 ml saf su eklenerek ve hafifçe çalkalanarak sıvı faza geçirilmiştir (21). Bu işlemi takiben spor süspansiyonlarından 5 ml alınarak içerisinde 200 ml MEB içeren 500 ml hacimli erlenlere yaklaşık 10^5 spor olacak şekilde aşılınmış ve erlenler çalkalamalı inkübatörde (Gallenkamp Co. Ltd., London, England) 24 °C' de, 150 devir/dk.'da 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. MEB besiyerinin pH'sı domatesin pH'sı göz önüne alınarak tartarik asitle 4.2'e ayarlanmıştır. Aşılama süspansiyonundaki spor sayısı Thoma lamı kullanılarak doğrudan mikroskopik sayım yöntemiyle belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan küf miselleri, üzerinde filtre kağıdı yerleştirilen (Whatman no:2) bir Buhner hunisine vakum uygulanarak aseptik koşullarda filtrasyonla besiyerinden ayrılmış ve miseller altta berrak bir filtrat görülene kadar 4-5 kez yıkanmıştır. Yıkanan ve ağırlıkları belirlenen miseller steril kaplarda antijen hazırlama işlemine kadar 4 °C 'de, daha sonra testlerde kullanılmak üzere -20 °C 'de saklanmıştır.

Antijen Hazırlanması

Antijen hazırlanmasında Preece (22)'in önerdiği havanda parçalama yöntemi ile Buxton ve ark. (23)'ünün kullandığı dondurma ve çözme işlemleri esas alınmış ve bu işlemler liyofilizasyon işlemi (20) ile kombine edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla her bir küfe ait yaş misellerden 2'şer g tartılarak toplam 10 g'lık bir karışım elde edilmiş ve bu karışımın üzerine % 0.85 NaCl içeren fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.1, 0.01 M) ilave edilmiş ve karışım steril havana aktarılarak -20 °C'de dondurulmuştur. Donmuş haldeki misel karışımı havanda ezilerek parçalanmış, sonra da iyice çözünen miseller tekrar dondurulmuş ve bu işlemler 5 kez tekrarlanmıştır.

Bu şekilde parçalanan misel karışımı liyofilize edilerek (Speedivac, Model 5 PS, Edwards High Vacuum Ltd., Sussex England) kurutulmuş ve steril havanda öğütülerek toz haline getirilmiştir. Bu öğütme işlemine, hazırlanan süspansiyon karışımı 1 ml'lik şırınganın 1 no'lu iğne ucundan rahatça geçebilecek bir inceliğe gelene kadar devam edilmiştir. Daha sonra, toz halindeki bu antijen karışımından çözünmeyen ve çözünür antijenik fraksiyonları elde edilmiştir.

Aşılamada Çözünmeyen Antijen Fraksiyonunun Hazırlanması

Antiserum elde etmek amacıyla tavşanlara aşılama üzere antijen fraksiyonu hazırlanmıştır. Bu amaçla Robertson ve ark. (20)'ünün kullandığı antijen hazırlama yöntemi uygulanmıştır. Yönteme göre toz halindeki antijen karışımından 600 mg tartılarak santrifüj tüpü içerisinde 30 ml PBS içinde süspanse edilmiş ve soğutmalı santrifüjde (PHYWE, Göttingen, Germany) 10.000 g'de 10 dk süreyle santrifüjlenerek süpernatant kısmı atılmış ve bu işlem 2 kez daha tekrarlandıktan sonra kalan peletin yaş ağırlığının 3 katı PBS ilave edilerek karıştırılmış ve kullanılıncaya kadar 1ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'de saklanmıştır. Antijen fraksiyonundaki antijenin miktarını toplam ağırlık olarak ifade etmek amacıyla karışım önceden kurutulmuş ve darası alınmış filtre kağıdı ile (Whatman no: 114, 5.5 cm) filtre edilip vakumlu etüvde 70 °C'de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuş ve ağırlığı saptanmıştır (14).

Çözünür Antijen Fraksiyonunun Hazırlanması

Jel immunodifüzyon testlerinde kullanılmak üzere çözünür fungal fraksiyon elde etmek için Robertson ve ark. (20)'ünün önerdiği sonikasyon yöntemi esas alınmıştır. Bu amaçla toz halindeki antijenden 100 mg tartılarak içinde %0.05 Tween 20 bulunan 5 ml PBS'de çözülmüş ve süspansiyonun her bir ml için 4 °C'de 30 saniyelik aralıklarla, 9 amper şiddet uygulanarak, toplam 1 dk. süreyle sonikasyon (Schoellerschall KLK 250, Germany) işlemine tabi tutulmuştur (24). Hazırlanan karışım 3000 g'de, soğutmalı santrifüjde 5 dakika süreyle santrifüjlenmiş, ayrılan süpernatant kısmı ise 4 °C'de, 24 saat boyunca saf suya karşı suyun 2 kez değiştirilmesi suretiyle diyaliz işlemine tabi tutulmuş ve bu diyalizat kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Antiserum Elde Edilmesi

Bu amaçla Johnson ve ark. (24)'nin uyguladığı yöntem aşılama şeması bakımından modifiye edilerek aşağıdaki şekilde uygulanmıştır. Aşılamadan önce her bir tavşandan kan alınarak serum kısımları aşılanacak küf antijen karışımına karşı kontrol edilmiş ve negatif kontrol serumu olarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Aşılama için çözünmeyen antijen süspansiyonu Freund's complete adjuvantı (Difco Lab., Detroit, USA) ile 1:1 oranında stabil emülsiyon haline getirilmiş (25) ve emülsiyondan 2 ml alınarak tavşanlar subcutaneous (deri altı) yolla sırt kısmının iki tarafı boyunca üçer noktadan eşit miktarlarda aşılanmıştır. İkinci hafta da aynı şekilde aşılanan tavşanlar iki hafta süreyle dinlenmeye bırakılmış ve bu kez adjuvansız olarak doğrudan 1 ml çözünmeyen süspansiyon ile aşılanmıştır. Bundan sonraki aşılama ilk aşılama gibi yapılmış fakat bu defa antijen Freund's incomplete adjuvantı ile emülsiyon edilmiştir. Beşinci ve altıncı haftalarda aşılanan tavşanlar iki hafta daha dinlendirildikten sonra dokuzuncu ve onuncu haftalarda bu kez 3 ml 'lik antijen adjuvant karışımı ile aşılanmıştır. Her aşılama önce kulak damarından alınan kanın antiserum titresi kontrol edilerek antiserum oluşumu takip edilmiştir. Onuncu haftada yeterli titreye ulaşıldığında tavşanlar son bir defa aşılanarak bir hafta beklenmiş ve apex cordis (kalpten) yoluyla alınan kandan serum santrifüj ile ayrılmıştır. Antiserum sodyum azid (NaN₃) ilave edilerek (%0.05) fluoresan boya konjugatı elde edilme aşamasına kadar 4°C'de saklanmıştır.

Antiserumun titrasyonunun belirlenmesi amacıyla jel immunodifüzyon testinden yararlanılmıştır (26). Test PBS (0.01 M, pH: 7.1) ile hazırlanmış %0.8 ion agar No.2 (Oxoid) içerisinde 8 mm çapında ve 4 mm derinliğinde kuyucuklar açılan petri kutularında yapılmıştır (22). Farklı Petri kutularının ortasındaki antijen kuyucuklarına sırasıyla direkt çözünür fungal fraksiyonu, kuru madde olarak 30 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan çözünmeyen ve toz haldeki ham antijen karışımından 150'şer µl konulmuştur. Antijen kuyucuğunun etrafındaki kuyucuklara ise negatif kontrol serumu ve seyreltilen antiserumdan 150'şer µl konulmuş ve jeller 20°C ve 4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla aynı işlemler ion agar yerine agaroz (Sigma) kullanılarak tekrar edilmiştir.

Jellerde oluşan presipitasyon bantlarının fotoğrafları, jeller boyanmaksızın ve koyu bir zemin elde edilerek doğrudan çekilmiştir. Bu amaçla, Ouchterlony ve Nilson (26)'nin önerdiği düzeneğe esas alınarak karton kutudan tesis ettiğimiz karanlık alan düzeneği kullanılmıştır.

Antiserumun Saflaştırılması ve Floresan-Antikor Konjugatının Elde Edilmesi

Uygun titrede elde edilen antiserum direkt (DFA) ve indirekt fluoresan antikor (IFAT) tekniğinde kullanılmadan önce amonyum sülfat ile çöktürme ve jel filtrasyon işlemleri ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla 15 ml antiserum 4 °C damla damla ilave edilen 15 ml doymuş amonyum sülfat ile (pH 7.1) çöktürülmüş ve santrifüjlenerek (6000 g, 30 dk) pelet kısmı PBS (0.01 M pH:7.1) ile 15 ml tamamlanmış ve çöktürme işlemi 3 kez daha tekrar edilmiştir. Elde edilen pelet 7.5 ml PBS'de çözülmüş ve saf suya karşı 4 °C diyaliz edilmiştir (27). Saflaştırılan antiserumun (immunoglobulin)

protein miktarı biüre yöntemi kullanılarak saptanmış ve sığır serum albumini (BSA) ile hazırlanan standarda göre hesaplanmıştır (36).

Floresan antikor konjugatı elde etmek amacıyla fluorescein isothiocyanate (FITC, Merck, Darmstadt Germany) boyasından 0.03 mg FITC/mg protein olacak şekilde immunoglobulin çözeltisine ilave edilmiş ve pH'sı sodyum hidroksitle 9.4'e ayarlanmış 0.1 M sodyum fosfat buffer (PB) içerisinde oda sıcaklığında yavaş karıştırma ile bir gece süresince boyanın immunoglobulinlerle birleşmesi sağlanmıştır. Boyanın proteinlerle birleşmeyen fazlası jel filtrasyon kromatografisi ile ayrılmıştır. Bu amaçla 2.5x40 cm boyutlarındaki cam kolon içerisine PBS ile paketlenen ve yıkanan sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals Inc., Sweden) kullanılmıştır. Kolondan elue edilen boya-immunoglobulin fraksiyonu, polyethylen glycol 6000 (Sigma Chemical, MO, St. Louis, U.S.A) ile konsantre hale getirilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C saklanmıştır (27).

DFA ve IFA Tekniklerinin Saf Kültür ve Gıda Örneklerinde Uygulanması

Bu amaçla Robertson ve ark. (20)'nin önerdiği yöntem daha iyi sonuç verdiği için antijen ve floresan boya-antikor konjugatı farklı miktarlarda kullanılarak uygulanmıştır. Buna göre, -20 °C saklanan küf miselleri 10 mg/ml PBS olacak şekilde süspansiyon edilmiş, 3000 g'de 5 dakika santrifüj işlemiyle 2 kez yıkandıktan sonra pelet üzerine 750 µl PBS ile 20 µl FITC-antikor konjugatından ilave edilerek 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben santrifüjlenerek iki kez yıkanan pelet 1 ml PBS içinde süspansiyon edilmiş ve bundan yaş preparat hazırlanarak epi-floresan mikroskopu ile incelenmiştir.

IFA tekniğinde ise DFA tekniğinde olduğu gibi santrifüjlenerek yıkanmış küf misellerine FITC-antikor konjugatı yerine konjuge edilmemiş antiserum kullanılmıştır. İnkübasyonu takiben bağlanmayan antiserum fazlası yıkama ile giderildikten sonra kalan misel üzerine bu kez ticari olarak temin edilmiş FITC-goat antirabbit IgG konjugatından (Sigma) 10 µl ilave edilmiş ve diğer işlemlere DFA tekniğindeki gibi devam edilmiştir.

Gıda örneklerinden domates salçası ve ketçap, AOAC (1990)'de (28) belirtilen örnek hazırlama yöntemine göre hazırlanmış fakat serolojik testlerin uygulanabilmesi amacıyla belirtilen yöntemden farklı olarak pH'sı 7.1'e ayarlanmış, PBS ile 8.5 briks derecesine kadar seyreltikten sonra kullanılmıştır. Ketçap örnekleri ise yine pH'sı 7.1 olacak şekilde %3 oranında pektin içeren PBS çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak stabilize edilmiştir. Hazırlanan örneklerden dereceli santrifüj tüplerine 200 µl aktarılmış ve üzerine 4 ml PBS ilave edilerek 3000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve pelet üzerine 750 µl PBS ilave edilmiştir. Bu şekilde çözünür maddeleri uzaklaştırılmış olan örnekler yukarıda açıklanan DFA ve IFA teknikleri uygulanarak epi-floresan mikroskopta incelenmiştir. Ayrıca aynı yöntem örnek seyreltilmeden orijinal hacmine tamamlanarak da uygulanmıştır.

Preparatların İncelenmesi ve Fotoğraf Çekimi

DFA ve IFA teknikleri ile hazırlanan preparatlar ile HBO 50W/ac (Osram) ışık kaynağı bulunan Zeiss marka epifluoresan mikroskobu (Zeiss, Germany) vasıtasıyla BP 435-490, FT 510 ve LP 520 filtre sistemi kullanılarak incelenmiştir. Fotoğrafların çekiminde 400 ASA Kodak filmleri misellerin yoğunluğuna bağlı olarak 20-90 saniyeler arasında poz süresi ile kullanılmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Elde edilen misel ağırlığının aşıl原因 spor adedine oranı esas alındığında; bu küflerden *R. stolonifer* ve *B. cinerea* 'nın kullanılan diğer küf türlerine göre daha fazla misel oluşturdukları saptanmıştır. Her bir yaş miselyumdan 2 'şer g alınarak oluşturulan 10 g'lık miselyumdan dondurup çözme, öğütme ve liyofilizasyon işlemleri sonunda çalışmanın tüm aşamaları için yeterli miktarda, toplam 1.62 g toz halinde kuru miselyum karışımı elde edilmiştir.

Çizelge 1. Küflerin MEB besiyerinde oluşturdukları misel miktarları

Kullanılan küf	Yaş misel/aşıl原因 spor oranı (mg misel/ aşıl原因 10 ³ spor)	Toplam yaş misel ağırlığı (g /200 ml besiyeri)
<i>Mucor circinelloides</i>	3.28	2.50
<i>Fusarium sp.</i>	4.38	3.50
<i>Alternaria alternata</i>	6.60	3.30
<i>Rhizopus stolonifer</i>	10.9	5.00
<i>Botrytis cinerea</i>	17.5	5.45

Gerek aşıl原因 boyunca gerekse antiserum saflaştırıldıktan sonra, antiserumun titresi Ouhcterlony Jel immunodifüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir (26). Çeşitli antijen fraksiyonları kullanılarak antiserum ile elde edilen jel immunodifüzyon testi sonuçları Çizelge 2 ve presipitasyon bantlarına ait fotoğraflar Ek Şekil 1'de verilmiştir. Çizelgeden ve fotoğraflardan görüldüğü gibi çözünen ve yıkanmış fraksiyonlar ile antikor test edildiğinde sadece tek bir presipitasyon bandı oluştuğu halde, fraksiyonlarına ayrılmayan ham antijenden hazırlanan süspansiyon kullanıldığında üç farklı bandın oluştuğu gözlenmiştir. Çözünen fraksiyon ile oluşan presipitasyon bandının 6. günde belirgin hale geldiği ve diğerlerinininkinden daha az belirgin olduğu saptanmıştır.

Çizelge 2. İon agar ve agaroz ile hazırlanan jellerde farklı küf fraksiyonları ile elde edilen antikor titreleri, presipitasyon bant sayıları ve bunların oluşum süreleri.

Kullanılan küf fraksiyonu	Antiserum* titresi	Presipitasyon* bant sayısı	Bantların oluşum süresi	
			İon agar	Agaroz
Çözünmeyen fungal fraksiyon	1:8	1	5	2
Çözünen fungal fraksiyon	1:8	1	6	3
İşlem görmemiş ham antijen	1:8-1:16	3	5	2

* Değerler İon agar ve agaroz için aynıdır

Antiserumun, bunun elde edilmesinde kullanılan antijen fraksiyonu ile tek bant vermesine karşın ham antijenle birden fazla bant vermesi nedeninin, ham antijende bulunan ve santrifüjleyerek yıkama işlemi ile uzaklaştırılabilen birbiriyle ortak özelliklere sahip ve hücre yüzeyinde bulunan çoklu antijen sistemine sahip olmasından ileri geldiği düşünülebilir. Bu sonuç fungal ekstraktların birbirinden farklı ve çok sayıda antijenik sistem içerdiğini de doğrulamaktadır (10).

Sonuçta, aşılama için kullanılan antijene karşı 11 haftada elde edilen antiserum titresi çözünen ve yıkanmış antijen fraksiyonu kullanılarak test edildiğinde 1/8 olarak saptanmıştır. Diğer yandan ham antijenle test edildiğinde antiserumun titresi presipitasyon bantlarından birisi için 1/16 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre antiserum elde etmek için hiç işlem görmemiş ve fraksiyonlarına ayrılmamış ham antijen kullanmak daha yüksek titrede antiserum elde edilmesi açısından bundan sonraki çalışmalarda daha yararlı olacaktır. Ayrıca ham antijenin farklı antijenik fraksiyonları içermesi, elde edilen antiserumun bu fraksiyonları içeren farklı küf türlerini tanıma oranını da artıracaktır (29). Genellikle küfler zayıf immunojen özelliği gösterdiği için elde edilen antiserum titresi de oldukça düşüktür (30). Bu çalışmadakine benzer olarak farklı küf türleri için Lin ve ark. (15) ham antijen kullandıklarında 1/4 ila 1/8 arasında antikor titresine ulaşırken, Gooding ve ark. (29) ham antijen ile 1/16, çözünen makromoleküller antijenle ise 1/8 titre elde etmişlerdir.

Çalışmada 11 haftalık aşılama sonunda immunofloresans tekniğinde kullanılacak titrede antiserum elde edilebilmiştir. Benzer olarak Lin ve Ark. (15) on bir haftada antiserum elde ederken, Denzel (19) yirmi sekiz haftada, Robertson ve ark. (20) ise yirmi yedi haftada antiserum elde edebilmiştir. Antiserum oluşum sürelerinin farklı oluşu farkı aşılama yolları ve fungal fraksiyonlar kullanılması yanında kullanılan küf türlerinin farklı olmasından ileri gelebilir.

Diğer yandan ion agar yerine agaroz kullanıldığında presipitasyon bantlarının ion agardakine göre 3 gün daha kısa sürede oluştuğu saptanmıştır. İnkübasyon sıcaklığının presipitasyon bandı oluşumuna etkisine bakıldığında, +20 °C'de ion agarda bant oluşumu 5-6 günde meydana gelirken +4 °C'de ise ancak 14. günden sonra bant oluşumu gözlenmiştir. Yüksek sıcaklığın difüzyonu artırdığı bilinmektedir (31). Bu işlemi +20 °C'de uygulayan Gooding (29) 6 günde sonuç almış, 4 °C'de uygulayan Burrell ve ark. (32) 10 günde, diğer yandan Amos ve Burrell (33) yedinci günde presipitasyon bandının oluşumunu gözlemişlerdir.

Antiserumun DFA ve IFA teknikleri kullanılarak test edilmesi amacıyla her bir küf türüne ait önceden hazırlanıp 4 ay süreyle dondurularak saklanan miseller antijen olarak kullanılmış fakat floresanslığın çok zayıf olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan aynı işlemler taze olarak üretilen ve 4 °C'de bir gece saklanan küf miselleri kullanılarak yapıldığında elde edilen floresanslığın çok daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle antiserum, bir gece önceden üretilmiş küf miselleri kullanılarak test edilmiş ve bunların sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. Burada küf misellerini dondurarak saklamanın küf antijenlerinin stabilitesini bozduğu veya antijenik özelliğini etkilediği düşünülebilir. Ancak literatürlerde değinilmeyen ve dondurulmuş ürünlerde önemli olacağını düşündüğümüz bu ön bulgunun daha detaylı bir çalışmayla belirlenmesi gerekmektedir.

Küf kültürlerinin antiserumla DFA ve IFA teknikleri uygulandığında verdikleri floresanslık Çizelge 3 ve bunlara ait fotoğraflar Ek Şekil 2'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi floresan mikroskopta yapılan incelemede küf hiflerinin parlaklık derecesi bir artı (+) üzerinden değerlendirildiğinde, referans antiserum olmadığı için en parlak floresanslığı veren preparat dört artı (++++) ile hiç floresanslık vermeyen preparat ise (-) olarak değerlendirilmiştir. Antiserumun, antijen karışımı elde edilen küf türlerinin her birisi ile reaksiyona girdiği ve IFA tekniği kullanıldığında DFA tekniğine göre daha parlak floresanslık elde edildiği görülmektedir. Küf türlerinden *R. stolonifer*'in en yüksek oranda otofloresanslık verdiği diğer türlerin ise ihmal edilebilecek kadar çok zayıf otofloresanslık verdiği saptanmıştır. Bununla birlikte DFA ve IFA tekniği ile incelenen misellerin renginin parlak sarı-yeşil olduğu halde, otofloresanslıktan ileri gelen rengin donuk sarı kahverengi olduğu bu nedenle otofloresanslığın bir etkileşime yol açmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 3. Antijen olarak kullanılan küflerin DFA ve IFA tekniklerinde verdikleri floresanslık değerleri.

Kullanılan küf	Uygulanan serolojik teknik		Otofloresanslık*
	DFA*	IFA*	
<i>Mucor circinelloides</i>	++++	++++	<u>±</u>
<i>Alternaria alternata</i>	++++	++++	<u>±</u>
<i>Fusarium sp.</i>	++++	++++	<u>±</u>
<i>Rhizophus stolonifer</i>	++++	++++	++
<i>Botrytis cinerea</i>	+++	+++	<u>±</u>

* Floresanslık derecesi; hiç floresanslık vermeyen (-) ile en parlak (++++) arasında değerlendirilmiştir.

Ek Şekil 2'de görüldüğü gibi IFA tekniği uygulanarak hazırlanan preparatlardaki hiflerin hücre duvarları ve uç kısımları çok daha yoğun bir floresanslık gösterdiği iç bölgelerinin ise daha soluk olduğu görülmektedir. Al-Doory ve Gordon (16) patojenik funguslarda, Burell ve ark. (32) *Phytophthora* türlerinde, Stuka ve Burrell (34) *Trichophyton rubrum*'da, Denizel (19) *Aspergillus flavus* türleri ile yaptıkları çalışmalarda buna benzer sonuçlar elde etmişler ve antijenlerin daha çok hücre duvarına bağlı olduğunu ve bu bölgelerde yoğunlaştığını belirtmişlerdir. Küf türlerinden sadece *B. cinerea*'nın diğer küf türlerine oranla daha zayıf reaksiyon verdiği ve antiserumun bu küf türüne ait misellerin hücre duvarının her bölgesinde reaksiyona girmediği gözlenmiştir.

Antiserum, elde edildiği küf türleri dışındaki bazı küf türlerine karşı DFA tekniği kullanılarak test edilmiş ve antiserumun bu küflerle değişik oranlarda reaksiyon verdiği saptanmıştır. Bu amaçla antijen karışımında yer almayan *P. frequentans* ve *A. niger* 'in antijen olarak kullanılan türlere göre daha düşük düzeyde floresanslık göstermekle birlikte çapraz reaksiyon verdikleri (Ek Şekil 3), buna karşın *G. candidum* 'un hiç çapraz reaksiyon vermediği saptanmıştır.

Küflerde farklı cins ve türler arasında ortak antijenlerin olduğu ve bu nedenle çapraz reaksiyonların yaygın olduğu bilinmektedir (10). *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*'a karşı elde edilen antiserumun 43 farklı *Penicillium* türü ile (20), farklı

Penicillium türlerine karşı elde edilen antiserumun ise *Alternaria alternata* ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır (11). Bu çalışmamızdaki benzer olarak Robertson ve ark. (20) beş farklı küf cinsi kullanarak hazırladıkları antijen karışımı ile elde ettikleri antiserumun *Penicillium cryosegenum* ile çapraz reaksiyon verdiğini diğer yandan Yong ve Cousin (35) ise 6 farklı küf cinsinden oluşan karışıma karşı elde ettikleri antiserumun farklı 10 küf cinsiyile çapraz reaksiyon verdiğini belirtmişlerdir.

Lin ve ark. (15), yaptığı çalışmada *A. alternata*, *R. stolonifer* ve *G. candidum* için hazırlanan antiserumların birbiri ile çapraz reaksiyon vermediğini, Tsai ve Cousin (13) ise *G. candidum* için hazırlanan antiserumun *Geotricum* için spesifik olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da *G. candidum* için benzer sonuç elde edilmiştir. Diğer yandan, farklı küfler arasında ortak antijenlerin bulunması ve çapraz reaksiyonların yaygın olması bu araştırmadaki gibi cins ve tür ayrımının hedeflenmediği durumlarda avantaj sağlamaktadır. Böylece antiserum elde etmek amacıyla hazırlanacak olan antijen karışımı içine hedeflenen küflerden *G. candidum* gibi ortak antijenlere sahip olmayanların dahil edilmesi, ortak antijenlere sahip olanların ise antijen karışımına dahil edilmemesi mümkün olabilecektir. Fakat burada spesifik olmayan hedef küflerin tümünü kapsayan bu tip bir antiserum elde etmek için küf türlerine ait antijen özelliklerinin detaylı olarak bilinmesi gerekmektedir.

Analize alınan salça ve ketçap örnekleri, DFA ve IFA teknikleri kullanılarak incelendiğinde örnek içerisinde bulunan küf misel ve fragmentlerinin antiserumla reaksiyona girdiği, floresan mikroskopta parlak sarı-yeşil renkte görüldüğü ve IFA tekniğiyle daha iyi sonuç alındığı saptanmıştır. Örnekler adi ışık mikroskobu ile incelendiğinde domates doku ve hücrelerinden küf hiflerini ayırt etmek son derece güç olduğu halde, floresan mikroskop altında aynı görüş alanı incelendiğinde küf hifleri parlak yeşil rengi ile domates doku ve hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Ek Şekil 4.1-4.4). Bu yöntemle ışık mikroskobunda bakıldığında domates doku ve lifleri arasında küf hifi olduğu tereddüt edilen hiflerin kolayca ayırt edilmesi mümkün olmaktadır.

Antiserumun ısı işlem görmüş bir ürün olan salça ve ketçaptaki küf hifleriyle birleşmesi ısı işlemin antijenik yapıyı olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir. Gerek çözünür gerekse çözünmeyen antijenlerin ısı işlem ile antijenik özelliklerini yitirmediği bazı araştırmacılar tarafından saptanmıştır (20, 21).

Diğer yandan bu çalışmada, zaman zaman domates hücrelerinden kaynaklanan spesifik olmayan floresanslık gözlenmiştir. Benzer problem domates salçalarında IFA tekniği kullanan Robertson ve ark. (20) tarafından da gözlenmiş ve olası sebepler olarak, FITC ile işaretli ikincil antikörlerin dokulara spesifik olmadan bağlanması, birincil antikörlerin dokularla çapraz reaksiyona girmesi ya da misellerden kaynaklanan floresan ışığın yansıtılması olabileceğini belirtmişlerdir. Çapraz reaksiyonun diğer bir nedenin ise, bu araştırmacıların kullandıkları domates suyu içeren besiyerindeki immunojenik domates proteinleri olabileceği belirtilmiştir (20). Diğer taraftan çalışmamızda bu araştırmacıardan farklı olarak bir işlem uygulamadan kullandığımız MEB ise diyaliz edilmeden kullanıldığında antijenik karakter gösterdiği (21) ve ELISA testinde pozitif reaksiyona neden olduğu belirtilmektedir (14).

Bu çalışmada salça ve ketçap örnekleri belli bir işleme tabi tutulduktan sonra seyreltilmiş olarak antiserumla muamele edilmiştir. Ancak standart Howard sayım

yönteminde salça konsantrasyonunun 8-9 briks derecesinde olması öngörülmektedir. Bu nedenle örnekler bu briks derecesine ayarlandıktan sonra antiserumla muamele edilmiş ve floresan mikroskopla incelendiğinde bazı hiflerin antiserumla reaksiyona girdiği ancak büyük bir bölümünün birleşmediği saptanmıştır. Bu nedenle yöntemin seyreltme yapılmadan örneklerle uygulanması başarılı sonuç vermemiştir. Dolayısıyla bu nedenden ötürü doğrudan iki yöntemin karşılaştırılması mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak, floresan antikör yöntemi ile incelenen örneklerde küf hifleri çok belirgin olarak görülebilmekte ve domates dokularından daha kolay ayırt edilebilmektedir. Buna karşın örneğin hazırlanmasında antijen antikör reaksiyonu nedeniyle belirli işlem basamaklarının uygulanması yöntemin en önemli dezavantajıdır. Bu nedenle daha basit bir örnek hazırlama yöntemi geliştirilmesi ve HMC tekniğine uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Ancak yöntem bu haliyle, HMC yöntemini öğrenen ya da sayım yapan kişinin küf hiflerini tanıması ve diğer benzer doku ve hiflerden küf hiflerini ve fragmentlerini ayırt edebilmesi ve tecrübe kazanması yönünde yardımcı ve eğitici amaçla kullanılabilir.

Kaynaklar

- 1- Troy, V.S. 1952. Mold Counting of Tomato Products, Bulletin No. 30, Continental Can Company Inc., Chicago, 43 p.
- 2- Vas, K., Fábri, I., Kutz, N., Lang, Á., Orbányi, T., Szabó, G. 1959. Factors Involved in the Interpretation of Mold Counts of Tomato Products. Food Technology, 13:318-322.
- 3- Jarvis, B. 1977. A Chemical Method for the Estimation of Mould in Tomato Products. Journal of Food Technology, 12:581-591.
- 4- Bishop, R.H., Duncan, C.L., Evanco, G.M. and Young, H. 1982. Estimation of Fungal Contamination in Tomato Products by a Chemical Assay for Chitin. Journal of Food Science, 47:437-439.
- 5-Cousin, M.A., Zeidler, C.S. and Nelson, P.E. 1984. Chemical Detection of Mold in Processed Foods. Journal of Food Science, 49:439-445.
- 6- Lin, H.H. and Cousin, M.A. 1985. Detection of Mold in Processed Foods by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Food Protection, 48(8):671-678.
- 7- Ekşi, A. and Şimşir, I. 1987. Zusammenhang von Ameisensäuregehalt und der Schimmelzahl in Tomatenmark. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 83(5):156-157.
- 8- Zur, G., Hallerman, E.M., Sharf, R. and Kashi, Y. 1999. Development of a Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Detection of *Alternaria alternata* Fungal Contamination in Food Products. Journal of Food Protection, 62(10):1191-1197.
- 9- Zur, G., Shimoni, E., Hallerman, E.M, and Kashi, Y. 2002. Detection of *Alternaria* Fungal Contamination in cereal Grains by a Polymerase Chain Reaction-Based Assay. Journal of Food Protection, 65(9):1433-1440.
- 10- Pepys, J. and Longbottom, J.L. 1978. Immunological Methods in Mycology. P.41.1 Handbook of Experimental Immunology. Weir, D.M. (Edt.), 3rd Ed. Blacwell Sci. Pub., Oxford.
- 11- Kamphuis, H.J., Notermans, S., Veeneman, G.H., Boom, V.J.H. and Rombouts, F.M. 1989. A Rapid and Reliable Method for the Detection of Molds in Foods: Using the Latex Agglutination Assay. Journal of Food Protection, 52(4):244-247.
- 12- Li, S., Marquardt, R.R. and Abrahams, D. 2000. Immunochemical Detection of Molds. Journal of Food Protection, 63(2):281-291.

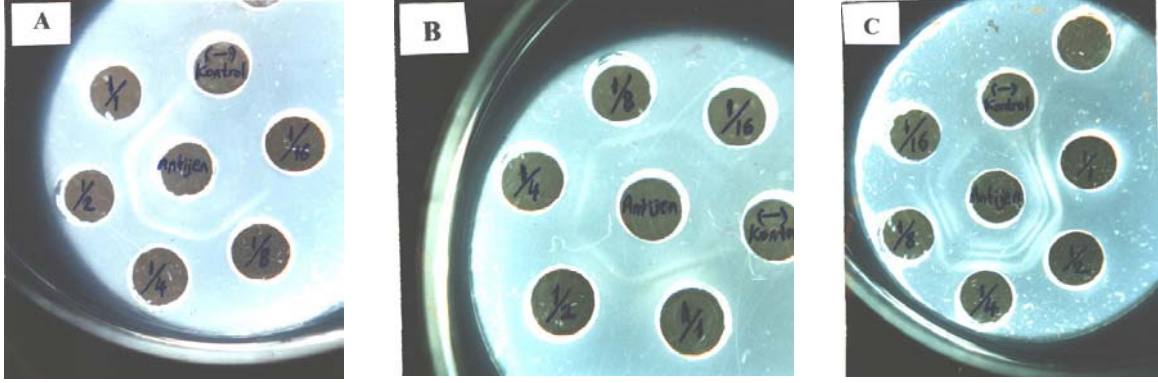
- 13- Tsai, G.J. and Cousin, M.A. 1990. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of molds in Cheese and Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 73:3366-3378.
- 14- Notermans, S., Heuvelman, C.J., Egmond, H.P.V., Paulsch, W.E. and Besling, J.R. 1986. Detection of Mold in Food by Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Food protection*, 49(10):786-791.
- 15- Lin, H.H., Lister, R.M. and Cousin, M.A. 1986. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Mold Tomato Puree. *Journal of Food Science*, 51(1):180-183.
- 16- Al-Doory, Y. and Gordon, M.A. 1963. Application of Fluorescent-Antibody Procedures to the Study of Pathogenic Dematiaceous Fungi. I. Differentiation of *Cladosporium carrionii* and *Cladosporium bantianum*. *Journal of Bacteriology*, 86:332-338.
- 17- Grappel, S.F., Blank, F. and Bishop, C.T. 1967. Immunological Studies on Dermatophytes. I. Serological Reactivities of Neutral Polysaccharides with Rabbit Antiserum to *Microsporum quinckeanum*. *Journal of Bacteriology*, 93(3):1001-1008.
- 18- Warnock, D.W. 1971. Assay of Fungal Mycelium in Grains of Barley, Including the Use of Fluorescent Antibody Technique for Individual Fungal Species. *Journal of General Microbiology*, 67:197-205.
- 19- Denizel, T. 1974. Factors Affecting Aflatoxin Formation in Turkish Pistachio Nuts. PhD Thesis. University of Reading, England. 215 p.
- 20- Robertson A., Patel, N. and Sargeant, J.G. 1988. Immunofluorescence Detection of Mould-An Aid to the Howard Mould Counting Technique. *Food Microbiology*, 5:33-42.
- 21- Notermans, S., Wieten, G., Engel, H.W.B., Rombouts, F.M., Hoogerhout, P. and Van Boom, J.H. 1987. Purification and Properties of Extracellular Polysaccharide (EPS) Antigens Produced by Different Mould Species. *Journal of Bacteriology*, 62:157-166.
- 22- Preece, T.F. 1971. Immunological Techniques in Mycology. Booth, C. (Editor). *Methods in Microbiology*, Vol. 4. Academic Press, London. 795 s.
- 23- Buxton, E.W., Culbreth, W. and Esposito, R.G. 1961. Serological separation of forms and physiological races of pathogenic *Fusarium Oxysporum*. *Phytopathology*. 51:575.
- 24- Johnson, M.C., Pirone, T.P., Siegler, M.R. and Varney, D.R: 1982. Detection of Epichloe Typhina in Tall Fescue by Means of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology*, 72(6):647-650.
- 25- Tijssen, P. 1985. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Burton, R.H. and Knippenberg, V.P.H. (Edts.). Elsevier, Amsterdam. 594 p.
- 26- Ouchterlony, O. and Nilson, L.A. 1978. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. Vol 1, p. 19.1. Weir, D.M. (edt.), *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Sci. Pub., Oxford.
- 27- Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1985. Methods in legume Rhizobium Technology. University of Hawaii, NifTal Project and MICEN. Department of Agronomy and Soil Science. 367 p.
- 28- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- 29- Gooding, G.Y. 1966. Preparation of Macromolecular Antigens from *Fomes annosus*. *Phytopathological Notes*, 1310-1311.
- 30- Seeliger, H.P.R. 1968. Serology as an Aid to Taxonomy. Sussman, A.S. (edt.). *The Fungi*. Vol. 3. Academic Press, New York. 738 p.
- 31- Crowle, A.J. 1973. Immunodiffusion. Academic Press, New York.

- 32- Burrell, R.G., Clayton, C.W., Gallegly, M.E. and Lilly, V.G. 1966. Factors Affecting the Antigenicity of the Mycelium of three Species of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 56:422-426.
- 33- Amos, R.E. and Burrell, R.G. 1967. Serological differentiation in *Ceratocystis*. *Phytopathology*, 57:32-34.
- 34- Stuka, A.J. and Burrell, R. 1967. Factors Affecting the Antigenicity of *Trichophyton rubrum*. *Journal of Bacteriology*, 94(3):914-918.
- 35- Yong, R.K. and Cousin, M.A. 1995. Nonspecific Enzyme-Linked Immunosorbent Assays For Molds in Foods. *Journal of Food Science*. 60:1375-1363.
- 36- Robyt, J.F. White, B.J. 1990. *Biochemical Techniques*. Waveland Press, Inc., Illinois. 407 s.

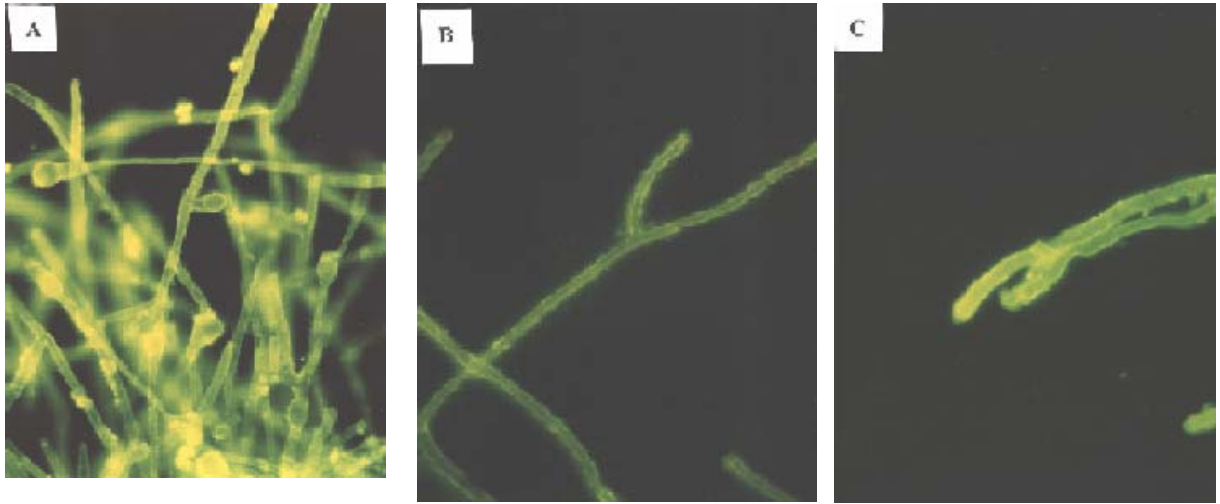
Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmada küf kültürlerinden bir kısmını temin eden Prof. Dr. Zekai Katırcıoğlu (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü), immunoloji ve floresan mikroskop aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığı Prof. Dr. Günay Alçıgır ve Prof. Dr. Ayşe Çakmak'a (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi) ve projeyi destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne teşekkür eder.

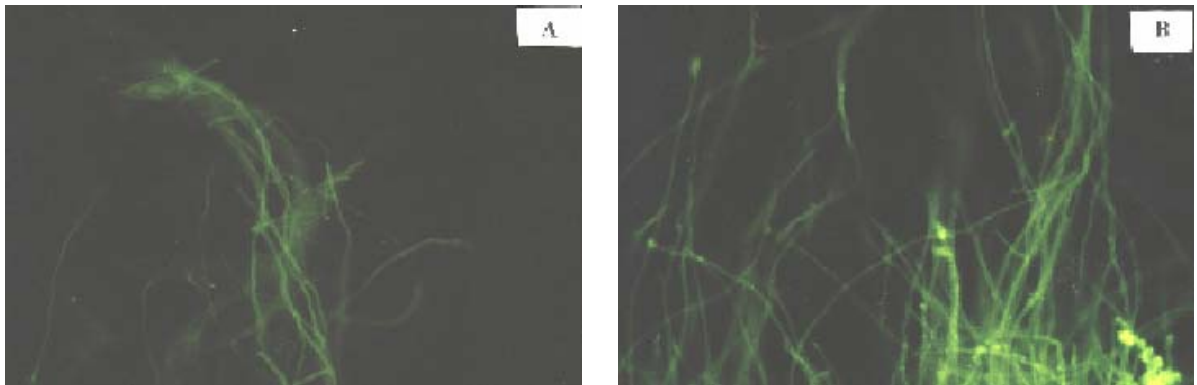
EKLER (ŞEKİLLER)



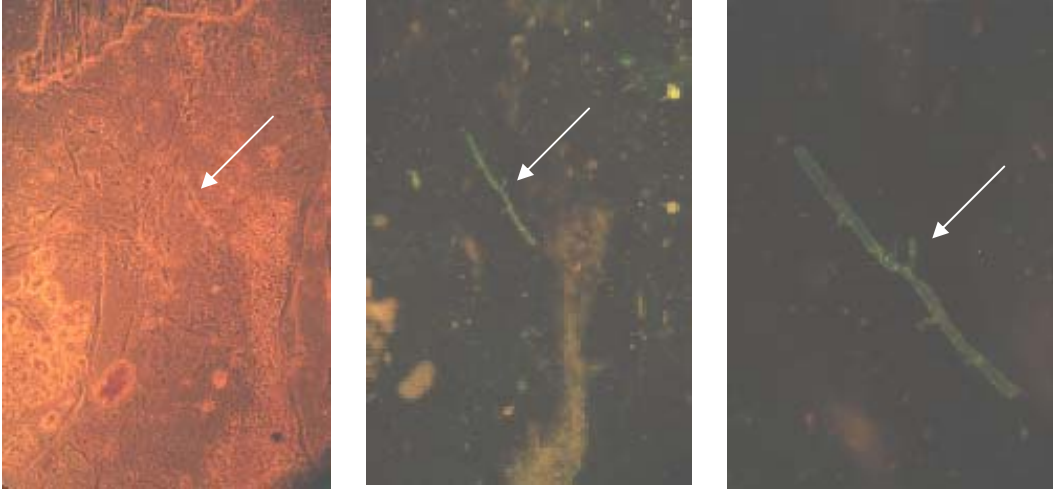
Şekil 1. İon Agarda elde edilen jel immunodifüzyon test sonuçları: a) çözünmeyen fraksiyon b) çözünen fraksiyon c) ham antijen kullanılarak elde edilen presipitasyon bantları. Ortadaki kuyucuklar antijen kenardaki kuyucuklar antiserum seyreltilerinin bulunduğu kuyucuklardır. İmmunize edilmemiş tavşan antiserumu negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



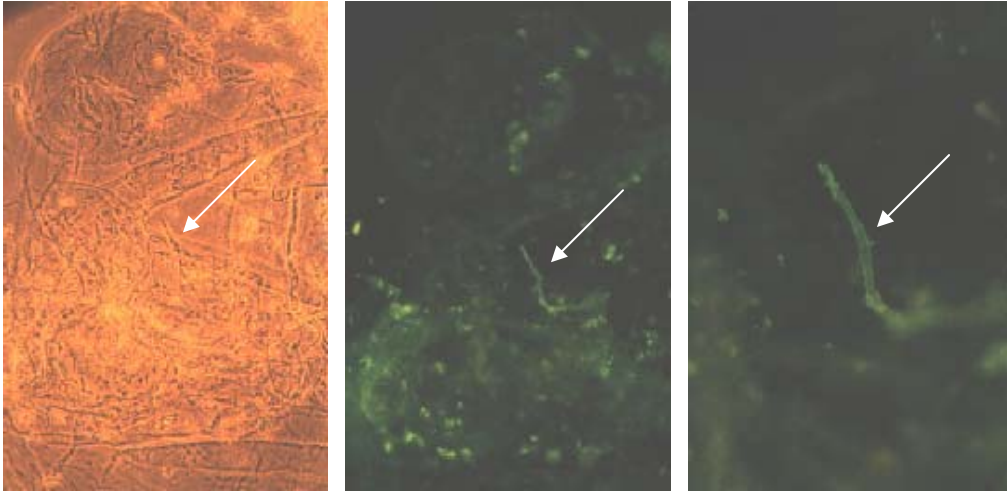
Şekil 2. IFA tekniğiyle boyandıktan sonra a) *Fusarium* sp. b) *Alternaria alternata* c) *Mucor circinelloides* hiflerinin görüntüsü



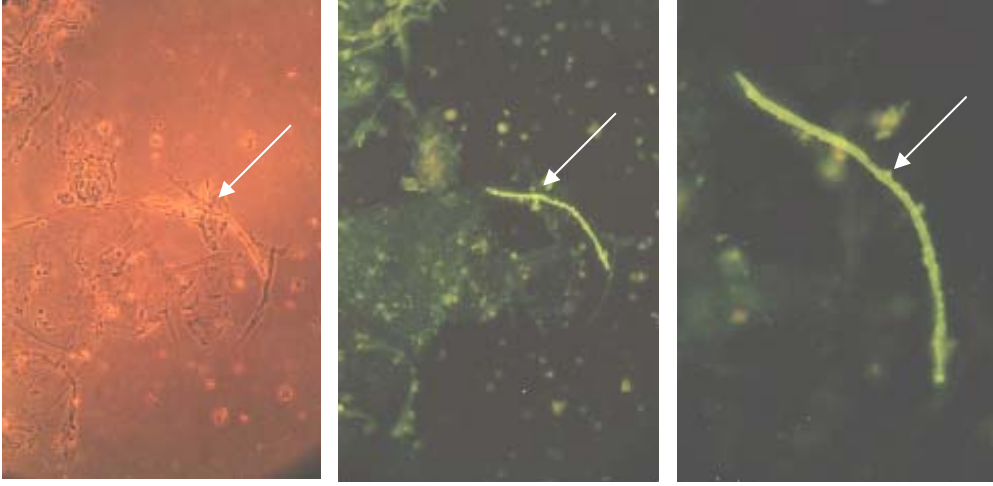
Şekil 3. a) *Penicillium frequentans* ve b) *Aspergillus niger* 'in antiserum ile verdiği çapraz reaksiyon. Kültürler IFA tekniği ile boyanmıştır



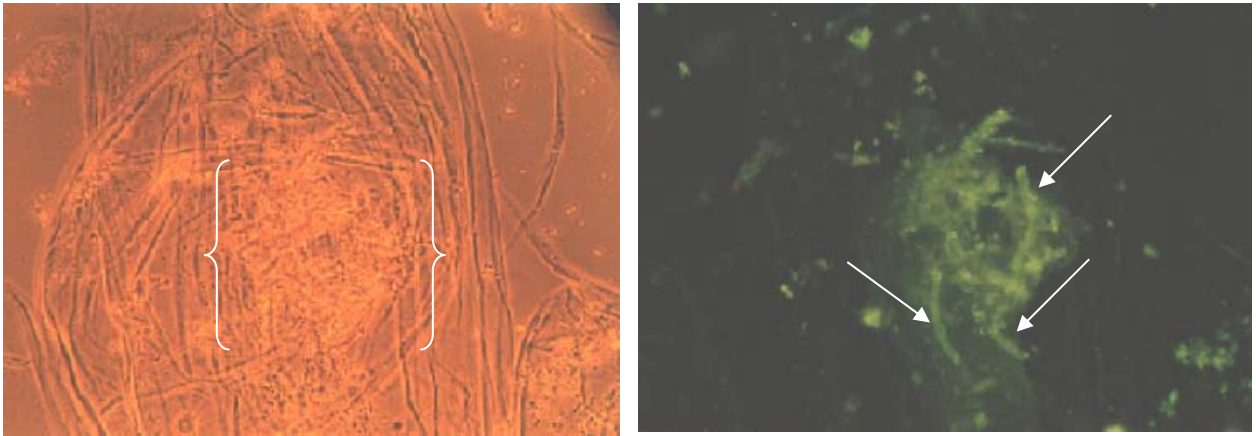
Şekil 4.1. Salça örneğinde bulunan küf hiflerinin IFA tekniği ile boyandıktan sonra adi ışık ve floresan ışıkta görünüşleri



Şekil 4.2. Salça örneğinde bulunan küf hiflerinin IFA tekniği ile boyandıktan sonra adi ışık ve floresan ışıkta görünüşleri



Şekil 4.3. Salça örneğinde bulunan küf hiflerinin IFA tekniği ile boyandıktan sonra adi ışık ve floresan ışıkta görünüşleri



Şekil 4.4. Salça örneğinde bulunan küf hiflerinin IFA tekniği ile boyandıktan sonra adi ışık ve floresan ışıkta görünüşleri