

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI KULLANILMIŞ KOZMETİK ÜRÜNLERİNDE BULUNAN
MİKROFUNGUSLARIN TESPİTİ

Döndü GÜMÜŞKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ASAN

EDİRNE-2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

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

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

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

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

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

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

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Ahmet ASAN (Danışman)

.....

Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN

.....

Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU

.....

24/01/2014

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

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

24/01/2014
Döndü GÜMÜŞKAYA

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Kullanılmış Kozmetik Ürünlerinde Bulunan Mikrofungusların Tespiti

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli saklama koşullarında kullanılmış kozmetik ürünlerde bulunan mikrofungusların morfolojik yöntemlerle cins düzeyinde tanımlamaları yapılarak, ürünlerdeki mikrofungal çeşitliliğin tespiti amaçlanmıştır.

Çalışmada; farklı süre ve koşullarda kullanılmış kozmetik ürünler kullanıcılardan temin edilmiştir. Bu ürünlerin her birinden 5'er adet olmak üzere ruj, allık, rimel, göz farı, göz kalemi, pudra, göz makyaj temizleme ürünü ve roll-on olarak gruplandırılmış ve toplam 40 adet ürün incelenmiştir. Mikrofungus izolatları saf kültür olarak elde edilip yatık PDA besiyerine pasaj alınarak 25°C'de 7 gün inkübe edilmiş ve daha sonra stok kültür olarak +4°C'de saklanmıştır. İnkübasyon sonucunda izole edilen mikrofungusların makroskobik ve mikroskobik incelemeleri yapılarak cins düzeyinde tespiti yapılmıştır. Çalışma sonucunda baskın mikrofungus % 57.9 oranında *Penicillium* cinsi olup % 23.5 oranında *Aspergillus*, % 10.3 oranında *Cladosporium* ve % 8.3 oranında *Alternaria* cinsleri tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen kozmetik ürünlerden en fazla mikrofungus üremesi görülen ürün grupları sırasıyla 76 koloni far, 50 koloni ruj ve 49 koloni pudradır.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 35

Anahtar Kelimeler : Kozmetik Ürün, Mikrofungus, İnkübasyon, Morfoloji

Msc Thesis

Determination of the Microfungi in Certain Cosmetic Products That Were Used

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

Determination of the microfungi variety in cosmetic products that have been used is aimed in this study via defining microfungi on cosmetic products used in different storage conditions at the genus level by means of morphological methods.

In the study, the cosmetic products used under different conditions for a different period of time were obtained from various consumers. In total, forty products were investigated in groups of blushers, lipsticks, mascaras, eyeshadows, eyeliners, powders, roll-ons and eye-cleaners where each group had five instances. Isolated microfungi obtained in pure culture were incubated at 25°C on PDA-medium and then stored as stock culture at +4°C. The microfungi isolated as a result of incubation are identified to the genus level by microscopic and macroscopic examination. The study showed that the dominant genus were *Penicillium* (% 57.9) whereas the others were *Aspergillus* (% 23.5), *Cladosporium* (% 10.3) and *Alternaria* (% 8.3). The product groups in which the most microfungi reproduction were seen were eyeshadows (76 colonies), lipsticks (50 colonies) and powders (49 colonies), respectively.

Year : 2014

Number of Pages : 35

Keywords : Cosmetic Products, Microfungus, Incubation, Morphology

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ASAN'a (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Tez hazırlama süresince, laboratuvar çalışmalarım ve yazım aşamasında bilgi ve deneyimlerini aktaran değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Suzan ÖKTEN'e (Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Ecz. Teknolojisi Bölümü), ve Sayın Arş. Gör. Dr. Burhan ŞEN'e (Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardım eden arkadaşım Soner ÖZDİL'e ve yazım aşamasında karşılaştığım problemleri çözmemde yardımcı olan arkadaşım Önder AÇIKGÖZ'e

Eğitim tutkusu ve azmini bana aşıl原因 Annem'e

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Döndü GÜMÜŞKAYA

İÇİNDEKİLER

DOĞRULUK BEYANI	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
TABLOLAR LİSTESİ.....	IX
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2	2
GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kozmetik Ürünlerin Tanımı.....	2
2.2. Kozmetik Ürünlerin Kontaminasyonu.....	2
2.2.1.Mikroorganizma Üremesine Duyarlı Kozmetik Ürünler	3
2.3. İzole Edilen Mikrofungus Cinsleri Hakkında Genel Bilgiler	4
2.3.1. <i>Aspergillus</i>	4
2.3.1.1. <i>Aspergillus</i> Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri.....	4
2.3.2. <i>Penicillium</i>	6
2.3.2.1. <i>Penicillium</i> Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri.....	7
2.3.3 <i>Cladosporium</i>	8
2.3.3.1 <i>Cladosporium</i> Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri.....	8
2.3.4 <i>Alternaria</i>	9
2.3.4.1 <i>Alternaria</i> Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri	10
2.4. Kozmetik Ürünlerin Kontaminasyonu İle İlgili Çalışmalar	11
BÖLÜM 3	14
MATERYAL METOD.....	14

MATERYAL.....	14
3.1. Çalışmada Kullanılan Kozmetik Ürünler	14
3.2. Kozmetik Ürünlerin Gruplandırılması.....	14
3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler.....	15
3.3.1. Patato Dextrose Agar (PDA).....	15
3.3.2. pH 7 Fosfat Tamponu	15
3.3.3. Lakto Pamuk Mavisi Çözeltisi	16
METOD.....	17
3.4. Kozmetik Ürünlerin Hazırlanması.....	17
3.5. Kozmetik Ürünlerde Bulunan Mikrofungusların Saflaştırılması ve Tanımlanması.....	17
BÖLÜM 4	18
SONUÇLAR	18
4.1 <i>Penicillium</i> Üremesine Ait Sonuçlar	20
4.2 <i>Aspergillus</i> Üremesine Ait Sonuçlar.....	21
4.3 <i>Cladosporium</i> Üremesine Ait Sonuçlar	22
4.4 <i>Alternaria</i> Üremesine Ait Sonuçlar	23
4.5.1. <i>Penicillium</i> Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler	24
4.5.2. <i>Aspergillus</i> Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler	25
4.5.3. <i>Cladosporium</i> Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler.....	26
4.5.4. <i>Alternaria</i> Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler	27
BÖLÜM 5	28
TARTIŞMA	28
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

CTFA	: Cosmetic Toiletry and Fragrance Association
FDA	: Food and Drug Administration
g	: Gram
KH_2PO_4	: Potasyum Hidrojen Fosfat
K_2HPO_4	: Di-Potasyum Hidrojen Fosfat
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
μm	: Mikronmetre
PDA	: Patates Dekstroz Agar
USP	: United States Pharmacopeia

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.3.1.1 Konidial Baş Yapısı; (a) Uniseriat, (b) Biseriat	5
Şekil 2.3.1.2 Vezikül Şekilleri; (a) Globoz, (b) Klavat, (c) Subklavat	5
Şekil 2.3.1.3 Konidial Baş Şekilleri: (a) Kolumnar (b) Radyal	6
Şekil 2.3.2.1 Konidiyofor Şekilleri: (a) Monovertisillat (b) Bivertisillat (c) Tervertisillat	7
Şekil 2.3.3.1 A, B, C, D, E Konidiyofor Yapısı F, G Konidialar	9
Şekil 2.3.4.1 Konidiyofor Yapısı ve Konidiyalar	10
Şekil 4 (a) İzole Edilen Cinslerin Bulunma Oranları.....	18
Şekil 4.1 <i>Penicillium</i> Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları	20
Şekil 4.2 <i>Aspergillus</i> Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları.....	21
Şekil 4.3 <i>Cladosporium</i> Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları.....	22
Şekil 4.4 <i>Alternaria</i> Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları	23
Şekil 4.5.1 (a) <i>Penicillium</i> Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 Günlük Koloni) Görünümü	24
Şekil 4.5.1 (b) <i>Penicillium</i> Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400).....	24
Şekil 4.5.2 (a) <i>Aspergillus</i> Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 günlük koloni) Genel Görünümü	25
Şekil 4.5.2 (b) <i>Aspergillus</i> Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400).....	25
Şekil 4.5.3 (a) <i>Cladosporium</i> Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 günlük koloni) Genel Görünümü	26
Şekil 4.5.3 (b) <i>Cladosporium</i> Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400).....	26
Şekil 4.5.4 (a) <i>Alternaria</i> Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 günlük koloni) Genel Görünümü	27
Şekil 3.5.4 (b) <i>Alternaria</i> Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400).....	27

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.2 Toplanılan Ürünlerin Kullanım Süreleri ve Saklanma Koşulları.....	15
Tablo 4 (b) Tespit Edilen Cinslerin Koloni Sayıları, Bulunma Yüzdeleri ve İzole Edildikleri Toplam Ürün Sayıları	19
Tablo 4 (c) Kozmetik Ürün Gruplarında Üreyen Cinsler ve Koloni Sayıları	19

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Güzellik anlayışı çağlara ve toplumlara göre değişse de çağlar boyu güzel görünmek temiz ve bakımlı bir cilde sahip olmak insanlar için son derece önemli olmuştur. Bu durum kozmetik kullanımını günümüze kadar devam ettirmiştir [1].

Kozmetik ürünlerin ve ürün hammaddelerinin mikrobiyolojik uygunluğu ürün kalite ve stabilite uygunluğu açısından olduğu kadar tüketicilerin sağlığı ve ürünlerin güvenli kullanımı yönünden de son derece önemlidir [2].

Steril olma zorunluluğu bulunmayan piyasaya arz edilen kozmetik ürünler üretici tarafından önerilen makul kullanım şartları altında uygulandığında insan sağlığına zarar vermeyecek nitelikte olması gerekmektedir [3].

Kozmetik ürünlerde mikrobiyal kirliliğe neden olan flora; ham maddeden, imalat işlemlerinden, paketlenme materyallerinden, personelden, çevreden ve depo şartlarından kaynaklanabildiği gibi kullanıcıların kullanım ve saklama koşullarından da kaynaklanabilir. Kozmetik ürünlerin kontaminasyonu, kullanım sırasında mikroorganizmalarla kontamine eller veya yüzeylerle teması halinde koruyucu veya antifungal içermelerine rağmen kaçınılmazdır. Kontamine kozmetik ürünlerin vücut yüzeyine uygulanması sonucu kozmetik ürün içeriğindeki mikrobiyal flora derideki kesik, çatlak ve yarıklardan derin dokulara ve kana geçebilir. Ve bunun sonucu olarak ciltte aşınma, iritasyon ve alerji gibi hastalıklar oluşabilir [4].

Bu çalışmada, farklı kullanıcılar tarafından çeşitli saklama koşullarında kullanılan bazı kozmetik ürünlerde bulunan mikrofungusların morfolojik yöntemlerle cins düzeyinde tanımlanması yapılarak, kullanılmış kozmetik ürünlerindeki mikrofungal çeşitliliğin tespiti amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Kozmetik Ürünlerin Tanımı

Sağlık Bakanlığının 24/3/2005 tarihli ve 25823 sayılı Kozmetik Yönetmeliğine göre, kozmetik ürün: İnsan vücudunun epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlar gibi değişik dış kısımlarına, dişlere ve ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek ve/veya vücut kokularını düzeltmek ve/veya korumak veya iyi bir durumda tutmak olan bütün preparatlar veya maddeler olarak ifade edilmektedir.

Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik standardizasyonu ile ilgili kurallar Dünya'da Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA), FDA ve Avrupa Komisyonu gibi kuruluşlar tarafından yayınlanan raporlarla düzenlenmiştir. Bu raporlara göre kozmetikler göz çevresine uygulanan ürünler, bebek ürünleri ve diğer ürünler olmak üzere gruplandırılmıştır. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı tarafından 1998 yılında Resmi Gazetede yayınlanan Kozmetik Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğe göre kozmetik ürünler bebek ürünleri, göz çevresi veya gözle temas edecek ürünler ağız çevresine uygulanan ürünler ve diğer ürünler olarak gruplandırılmıştır [5].

2.2. Kozmetik Ürünlerin Kontaminasyonu

Modern kozmetik ürün içerikleri; mineraller, üreme faktörleri ortam asitliği ve nem ile mikroorganizma üremesi için uygun ortam sağlamaktadır. Geleneksel kozmetik ürünlerinde bulunan; karbonhidratlar, şeker alkolleri, yağ asitleri, proteinler, aminoasitler, glikozidler, yağ alkolleri, steroidler, peptitler, vitaminler ve bitkisel

hammadeler mikroorganizmalar için besin teşkil ederler ve aynı zamanda mikroorganizmaların çoğalmasını desteklemede potansiyel oluşturlar [2].

Kozmetik bileşiminde bulunan maddelerin mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesi sonucu ortamda biriken metabolik atıklar; preparatın stabilitesini bozarak renginin değişmesine, kokuşmasına, deride iritasyon veya alerjik reaksiyonların oluşmasına neden olur [6].

Kozmetik ürünlerin mikroorganizmalarla kontamine olabildikleri ilk kez 1946 yılında Yeni Zelanda'da, *Clostridium tetani* ile kontamine talk pudrasının kullanılması sonucu meydana gelen bebek ölümleri ile fark edilmiştir. 1969 yılında İsveç'te Prof.Kallings tarafından yapılan bir çalışmada ilk kez kozmetiklerin kontamine olabildikleri belirlenmiştir. 1970'li yıllardan itibaren *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella* türleri ile kontamine kozmetik ürünlerin kullanımına bağlı olarak gelişen nazokomiyal infeksiyonlar ve epidemilerin bildirilmesi ve konu üzerinde yapılan çalışmalar, kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik analizlerinin yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur [5].

2.2.1.Mikroorganizma Üremesine Duyarlı Kozmetik Ürünler

Özellikle şampuanlar, içerdikleri sudan dolayı Gram-negatif bakterilerle kontaminasyona duyarlıdır. Şampuanlarda gözle görülür bir bozulma olmaksızın mikroorganizma üremesi sonucu; kaygan çökeltiler, ince zarlar, renk değişimi, koku oluşumu ve köpürme özelliğinin kaybı gibi durumlarda gözlenmiştir.

Krem ve losyon içeriklerinde bulunan hayvansal protein ve vitamin gibi doğal maddeler mikroorganizmalar için besin kaynağı olmalarının yanı sıra koruyucu maddeleri inaktive ederek kontaminasyona neden olurlar. Ayrıca içeriklerinde bulunan gliserin, kozmetik ürünlerde kullanılan suda bulunan mikroorganizmalar tarafından metabolize edilebilen bir maddedir.

Pudra içeriğini oluşturan talk, diğer absorban özelliği olan tozlar gibi çevresel kontaminantları ve mikroorganizmaları tutabilmektedir. Pudra formundaki ürünlerin bozulmaları en fazla nemli koşullarda oluşan gözle görülür küf üremesi ile bağlantılıdır.

Genellikle koruyucu içeren dudak boyalarının bazılarında küf üremesi görülmektedir. Küflerin dudak boyaları üzerinde üremesi genellikle ürünün kullanım sırasında solunum yoluyla nemlenmesinden kaynaklanmaktadır.

Göz çevresine uygulanan göz kalemi, göz farı ve rimel gibi ürünler de küf ve Gram negatif bakteri üremesi görülen ürünler olup göz enfeksiyonuna neden olurlar [2].

2.3. İzole Edilen Mikrofungus Cinsleri Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. *Aspergillus*

Aspergillus cinsi 1729 yılında Floransalı mikolog papaz P.A. Micheli tarafından ilk kez tanımlanmıştır. *Aspergillus* ismi; bu cinsin spor oluşturan yapısının karakteristik olarak, kiliselerde kutsal su serpmek için kullanılan aspergillum'a benzerliği nedeniyle verilmiştir [7].

Aspergillus türleri çeşitli substratların yaygın kontaminantlarıdır. Subtropikal ve tropikal bölgelerde *Penicillia*'dan daha yaygın bulunurlar. Bazı türleri insan ve hayvanda patojen olmaları ya da toksin üretme yeteneklerinden dolayı dikkat çekmiştir. Geleneksel besin üretiminde fermantasyon, endüstriyel uygulamalarda organik asit üretimi, sekonder metabolit ya da enzim üretimi ve kimyasalların biyolojik dönüşümü diğer önemli rollerindedir. *Aspergillus* cinsini sınıflandırmada başlıca dayanak morfolojik karakterlerdir. 1965'te Raper ve Fennell cinsi 18 gruba bölmüş ve 132 tür ile 18 varyete kabul etmişlerdir. Cins şuanda 180 den fazla türü kapsamaktadır [8].

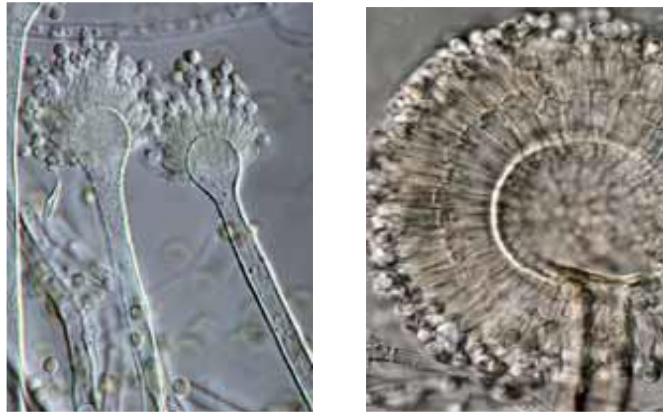
Aspergillus türleri genellikle koloni karakterleri, konidi evreleri, veziküllerin durumu, fiyalidlerin özellikleri ve teleomorf devrelerine göre tanımlanırlar. Koloni özelliklerinden koloni rengi, koloni alt rengi, büyüme hızı, büyüme şekli, bazal miselyum, yüzey miselyumu, konidi başlarının nispi bolluğu ve düzenlenmesi, konidi başlarının şekli, sklerosyum ve kleistotesyum gibi yapıların bulunup bulunmaması gibi özellikler önemlidir [9].

2.3.1.1. *Aspergillus* Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri

Aspergillus cinsi; konidiyofor, vezikül, konidiyum taşıyıcı hücreler (filayitler: uniseriat ya da biseriat olabilirler) ve ayak hücresi bulundurmaları ile karakterize

edilebilirler. Cinsin ayak hücreleri genellikle farklı morfolojidedir. Bazı türlerinde sklerotia bulunabilir fakat çoğu türlerinde sklerotia bulunmamaktadır [10].

Hızlı gelişen koloniler genellikle beyaz, pembe, sarı, sarı-kahve, kahve, siyah ya da yeşil gölgeli; çoğunlukla yoğun dik konidioforludur. Genellikle septasız, dallanma yapmayan konidioforlar şişkin tepeli (Vezikül) dir. Fiyalitler doğrudan uniseriat ya da metula üzerinde biseriat dizilirler. Şekil 2.3.1.1

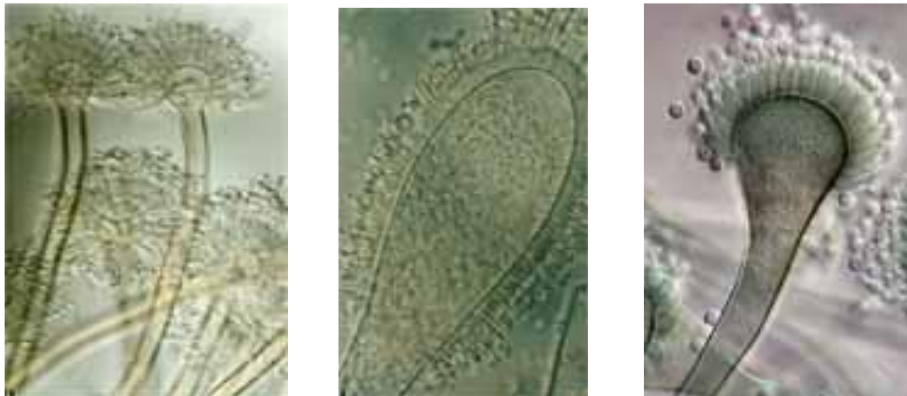


(a)

(b)

Şekil 2.3.1.1 Konidial Baş Yapısı; (a) Uniseriat, (b) Biseriat [8, fig. 90]

Konidyoforun en uç kısmının, küresel, yarı küresel, elipsoidal ya da uzun çomak şeklinde genişlemesiyle vesikül olarak bilinen yapı oluşur. Vesiküller şeffaf ya da pigmentli olabilir fakat genellikle konidyoforla aynı renktedir. Şekil 2.3.1.2



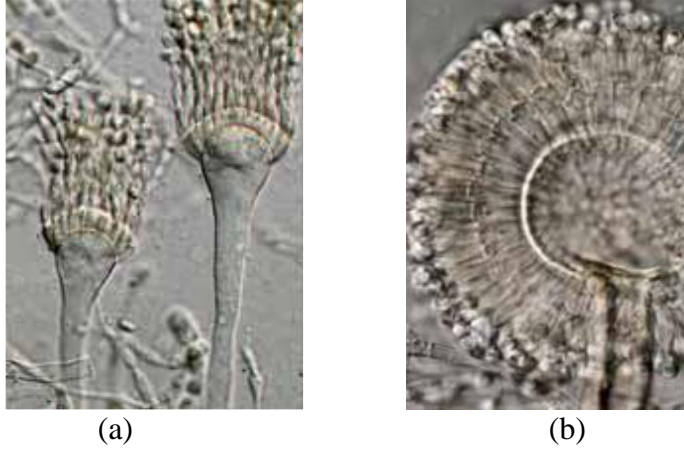
(a)

(b)

(c)

Şekil 2.3.1.2 Vezikül Şekilleri; (a) Globoz, (b) Klavat, (c) Subklavat [8, fig.80]

Kompakt kolonlar oluşturan kuru zincirler halinde (kolumnar) veya dağınık (radyal) yapılar oluşturan konidiyalar; bir hücreli düz, süslü, hiyalinli ya da pigmentli olabilir. Şekil 2.3.1.3 Türler hülle hücresi (tek ya da zincir şeklinde kalın ve düzgün cep hücreleri) ya da sklerotia (sert genellikle küresel hif kütleleri) üretebilirler [8].



Şekil 2.3.1.3 Konidial Baş Şekilleri: (a) Kolumnar (b) Radyal [8, fig.80]

2.3.2. *Penicillium*

Penicillium Latince “küçük fırça” anlamındaki *Penicillus* kelimesinden türetilmiş olup ilk kez 1809 da Link tarafından “Observationes in Ordines Plantarum Naturales” adlı eserde yayımlanmıştır [11].

Penicillium cinsi yaklaşık olarak 250 türe sahip yaygın bir cinistir. Tanımlanan *Penicillium* türlerinin çoğu topraktan izole edilmiştir, bunun yanı sıra çok sayıda tür besin ve iç ortamla ilgilidir. Birçok *Penicillium* türü çeşitli substratların yaygın kontaminantıdır fakat bazı türler belirli ürünler ile ilişkilidir. Örneğin *P.roqueforti* koruyucu içeren ürünler ile *P.digitatum* ve *P. italicum* narenciye meyveleri ile ilişkilidir. *Penicillialar* aynı zamanda potansiyel mikotoksin üreticileri olarak ta bilinirler. *Penicillium* türleri spesifik büyüme koşullarında sekonder metabolit üretirler [8].

Sınıflandırmada; büyüme oranı, koloni dokusu, yüzey ve alt rengi özelliklerine ek olarak konidiyoforların morfolojik özellikleri de kullanılır. Günümüzde temel polifazik bir yaklaşımda *Penicillium* tür kavramı; konidiya ve konidiyofor morfolojisi,

çeşitli besiyerleri ve sıcaklıklardaki koloni özellikleri, elektrolit profilleri ve moleküler veri kombinasyonları kullanılarak tanımlanmaktadır [8].

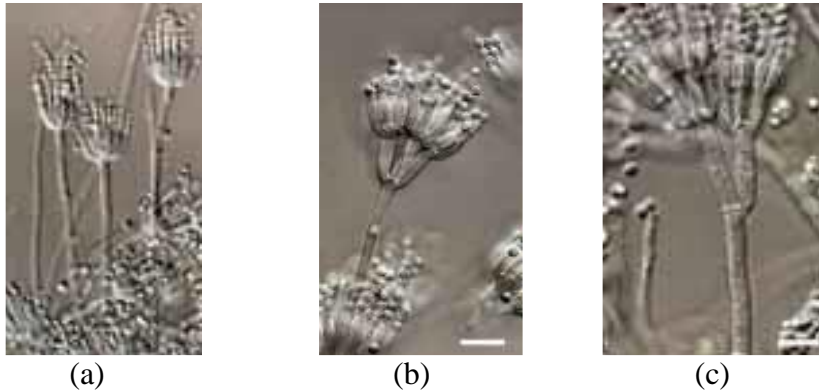
2.3.2.1. *Penicillium* Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri

Makro morfolojide koloni rengine (alt ve Üst), koloni şekline ve büyüklüğüne, eksuda ve pigment oluşumuna bakılırken mikro morfolojide dallanma kalıpları ve filyalit şekline bakılır.

Eksuda; bazı türlerin miselyum tabakasında damlacık şeklinde oluşturduğu yapılardır. Renk ve eksuda üretiminin varlığı taksonomik özellik olarak kullanılır [9].

Penicillium cinsinin kolonileri genellikle hızlı büyür, sıkça gölgeli yeşil, bazen beyaz renkli çoğunlukla yoğun konidiyofordur. Konidiyoforlar besiyerinden(kadife görümlü), havasal hiflerden veya yere yatık, dik gevşek ya da sıkı hif demetlerinden oluşur.

Konidiyoforlar şeffaf, düzgün ya da pürüzlü çeperli, tekli veya demet halinde olup tek bir sapın tepe noktasında filyalitlerin dizilmesiyle ya da *penicillus* halinde oluşabilirler. (monovertisillat) *Penisillus* metula ve dallanmalardan oluşur. Metula ve sap arasındaki bütün hücreler dallanma olarak adlandırılır. Diğer dallanma modelleri bivertisillat, tertvertisillat ve kuatervertisillat olarak belirtilebilir [8]. Şekil 2.3.2.1



Şekil 2.3.2.1 Konidiyofor Şekilleri: (a) Monovertisillat (b) Bivertisillat (c) Tertvertisillat [8, Fig.168]

2.3.3 *Cladosporium*

Cladosporium türleri dünyanın her yerine yayılmıştır ve bütün bitki türlerinde, mantar ve diğer debrislerde yaygın olarak rastlanılmıştır. Ayrıca topraktan, besinlerden, boyadan, tekstil ürünlerinden ve diğer organik materyallerden ya da bitki patojenlerinin neden olduğu yaprak yaralarında ikincil istilacı olarak kolonizasyonlardan sıklıkla izole edilmiştir. *Cladosporium* türlerinin konidiyaları aynı zamanda havadan izole edilen fungal parçacıkların yaygın temsilcileridir. Genellikle dallı zincirler halinde bulunan küçük konidiyaları ile geniş alanlara kolayca yayılmada iyi adaptasyon sağlarlar.

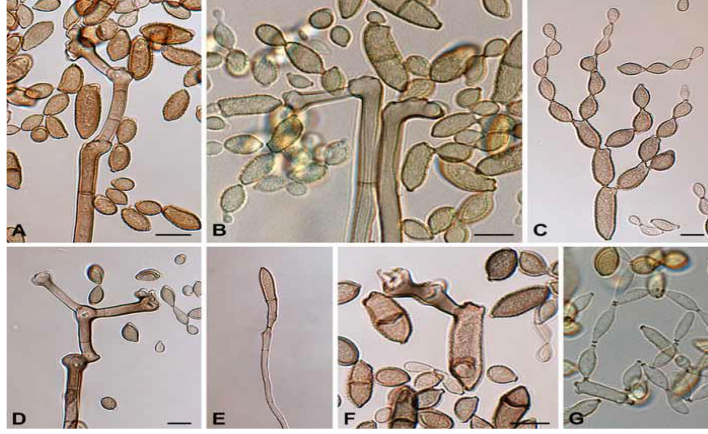
Bu cinsin diğer türleri bitki patojeni olup yaprakta leke ve yaralara neden olur. *Cladosporium* türlerinin aynı zamanda yaygın endofit olduğu bilinmektedir. Bazı türleri Alerjik Akciğer Mikozu'na neden olabilir. Birçok *Cladosporium* türü kozmopolit olmaları; çürüme, bozulma etkeni olmaları, alerjik olmaları ve hatta bitki ve hayvanlarda hastalığa neden olmaları ya da yüksek çevresel etkilerinden dolayı birçok farklı disiplindeki araştırmacıların ilgi alanına girmektedirler [12].

2.3.3.1 *Cladosporium* Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri

Koloniler çoğunlukla zeytin kahveden siyah kahveye ya da çoğu besiyerinde grimsi-zeytin yeşili görüntüdedir. Koloniler kadifemsi ya da yünümsü ve bol konidiyadan dolayı tozlanırlar. Bazı türler zenginleştirilmiş besiyerinde oldukça yavaş büyür fakat V8 besiyerinde genellikle bol sporlu geniş koloniler verir. SNA besiyerinde az miktarda biyomas oluşur fakat iyi sporulasyon oluşur ve morfolojik tanımlama için tavsiye edilir [8].

Dik, pigmentli, ağaç benzeri blastospor zincirlerinden oluşmuş dalları olan konidiyoforlar bu cins için karakteristik bir özelliktir. Cinsin tanımı genellikle sadece konidileri ile yapılabilir. Konidilerinde çok belirgin bağlantı kalıntıları(konidi çıkıntıları) görülmektedir [9].

Koniyoforlar vejetatif hif, dik, düz ya da eğri, dalsız ya da sadece apikal bölgelerde dallanmalı olanlardan az ya da çok farklılık gösterirler, bazı türlerde ganliyonlu simpodiyal uzama görülür. Akropetal zincirler halinde dallanan konidiyalar farklı konidiya üreten bölgelerden sıralı ya da eş zamanlı oluşmuşlardır [8]. Şekil 2.3.3.1



Şekil 2.3.3.1 A, B, C, D, E Konidiyofor Yapısı F, G Konidialar [12, fig.160]

Alt konidialar geniş ve septalı (ramo konidiya), üst konidialar bir hücreli, elipsoidal, fusiform, oval, küre şeklinde, sık belirgin benekli, soluktan koyu zeytin kahvesine, düz-pürtüklü, siğilli veya ekinülat halinde görülürler. Konidiyolar çoğunlukla küçük çıkıntılar üzerinde (1-3) gruplar halinde konidiyoforların zirvelerinde – altapikal olarak septumun altında veya daha önce oluşmuş konidiaların üzerinde oluşurlar [8].

2.3.4 Alternaria

Saprofitik, küçük sporlu *Alternaria* grupları dünya çapında görülür ve çeşitli bitkilerden, besin maddelerinden, topraktan, tekstil ve diğer ürün ve yüzeylerden iç ortam havasından izole edilen yaygın bir saprofitir [13].

Alternaria'nın belirgin obklavat veya gagalı muriform konidileri bu cinsin kolayca tanınmasını sağlar. Cinsin patojen türlerinin konidilerinde uzunluğuna bölme azdır veya hiç yoktur. *Alternaria*'nın taksonomisi zordur. Zira konidilerin şekli, büyüklüğü ve bölmelilik durumları aynı tür içinde bile farklılık gösterir [9].

2.3.4.1 *Alternaria* Cinsinin Makro ve Mikro Morfolojik Özellikleri

PDA besiyerindeki koloniler türlere bağlı olarak grimsi beyazdan, koyu siyahımsı yeşile kadar çeşitlilik gösterirler, ama hepsi bir haftada 60-70 mm çapına ulaşırlar. Genelde PDA da koloniler daha yoğun fakat PCA ile karşılaştırıldığında sporulasyon dağınık ve daha azdır.

Birincil konidiyoforlar düzgün ve vejetatif miselyumdan daha koyu olup 15-20µm ile 100-200µm arasında değişen uzunluktadır. Birincil konidiyoforlar dik, dar veya eğri, dallanmalı ya da dallanmasız, sıklıkla herhangi bir agar yüzeyinde ya da ariyal miselyumdan oluşan çoklu konidiyum üreten hücrelidirler. Konidialar altın sarısından koyu kahveye ve yüzeyleri süslü yapıda düzgün, yoğun olarak siğillidir. Konidiyum yapısı yuvarlak eliptik ampuliform, obpyriform, obklavat gibi değişken şekilli ve 15µm-80µm değişik boyutlardadır. Konidialar, uzunluğu 10µm-100µm değişen ikincil konidiforlar tarafından dallı veya dalsız zincirler halinde oluşturulurlar [8]. Şekil 2.3.4.1



Şekil 2.3.4.1 Konidiyofor Yapısı ve Konidialar [14, Fig.20]

2.4. Kozmetik Ürünlerin Kontaminasyonu İle İlgili Çalışmalar

“Kozmetik ürünlerde bakteriyal ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve PCR yöntemi kullanılarak saptanması” adlı çalışmada [1] Türkiye'de kozmetik ürün satan firmalara ait 43 adet hiç açılmamış, 84 adet kullanılmış toplam 127 adet kozmetik ürünün incelendiği çalışma sonuçlarına göre çalışılan örneklerde en az kontaminasyon spreylerde, en fazla kontaminasyon ise kavanoz ve tüp ambalajlı ürünlerde görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca kullanılmamış ürünlerde % 28,57 ve kullanılmış ürünlerde % 63,88 oranı ile ambalaj grupları içinde bakteri kontaminasyon oranı en yüksek olan grup kavanozlar olduğu belirtilmiştir.

Naki Sivri ve Ark. [2] yaptıkları çalışmada pudra içeriğini oluşturan talkın, diğer absorban özelliği olan tozlar gibi çevresel kontaminantları ve mikroorganizmaları tutabildiği, pudra formundaki ürünlerin bozulmaları en fazla nemli koşullarda oluşan gözle görülür küf üremesi ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada genellikle koruyucu içeren dudak boyalarının bazılarında küf üremesinin nedeni genellikle ürünün kullanım sırasında solunum yoluyla nemlenmesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Özyaral ve Ark. [18] çalışmasında incelenen 45 adet örnekte baskın küf florası örneklerin % 46.7'sinde bulunma sıklığı ile birinci sırada *P. rugulosum*, ikinci sırada % 42.2 ile *A. versicolor* ve üçüncü sırada % 35.6 ile *Dematiaceous* olarak bulunmuştur.

Bir çalışmada [5] kullanılmamış kozmetik ürünlerin patojen ve potansiyel patojen mikroorganizmalar içerebildiği ve bunların engellenmesi için katılan koruyucuların da etkisiz olabileceği görülmüştür. Aynı çalışmada çalışılan 50 üründen yedi tanesinin koruyucusunun en az bir deney mikroorganizmasına karşı etkisiz olduğu ve bu ürünlerden bir tanesinin *Aspergillus niger* tarafından degradasyona uğrayarak renk değiştirdiği tespit edilmiştir

“Dudak Boyalarının Mikrobiyal Kontaminasyon ve Biyostatik Etkinlik Yönünden İncelenmesi” adlı çalışmada [6] incelenen 35 dudak boyasından 24'ü total jerm yönünden, 28'i ise total maya ve küf yönünden steril olduğu belirtilmiştir.

“Kullanılmış Kozmetik Örneklerinin Mikrobiyolojik Yönden Araştırılması” adlı çalışmada [15] incelenen 73 adet örnekten 3 rimel, 3 göz farı, 2 ruj ve 2 fondoten olmak üzere toplam 10 örnekte mikrobiyal kontaminasyon tespit edilmiştir. Örneklerin 5’inde total aerobik bakteri sayısı izin verilen sınırlar dışında bulunmuştur. *Salmonella spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* gözlenmemekle birlikte, kozmetiklerde bulunmaması gereken *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus* ve *E.coli* bazı örneklerde saptanmıştır.

“Farmasotik önemi olan bazı droglarda mikolojik analizler” adlı çalışmada [16] tıbbi önemi olan ve infüzyon halinde geniş kullanım alanı bulunan *Folium Salviaetribolae* (Anadolu ada çayı yaprağı), *Filos tiliae* (Ihlamur çiçeği) ve *Folium Menthae piperitae* (Nane yaprağı)’nın mikolojik florası araştırılmıştır. Mikolojik analizleri yapılan droglardan 27 ayrı türe ait toplam 122 adet küf mantarı izole edilmiş bunların 81adedinin % 33.6’lık kayıpla infüzyonlarda canlı kaldıkları tespit edilmiştir.

Cerrahi ipliklerin saklandığı ambalajların kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada [17] içlerinde 12 adet cerrahi iplik bulunan, 31 adet kapalı kutu olmak üzere toplam 372 örnek, küf mantarı kontaminasyonu yönünden incelenmiştir. Örneklerden çok fazla sayıda ayrımı yapılan suşlar depo küfü olarak belirlenmiş, ambalaj malzemesi olarak kullanılmasının rutubeti geçirmesi ve küf gelişimini desteklemesi nedeniyle uygun olmadığı kanısına varılmıştır.

“Bebek pudralarında alerjik küf mantarı kontaminasyonunun incelenmesi” adlı çalışmada [18] 10 ilaç fabrikasında ilaç hammaddesi olarak kullanılan 30 adet ham talk ile 11 firmaya ait 47 adet paketlenmiş bebek pudraları üzerinde mikolojik araştırmalar yapılmış ve çalışmada toplam 403 adet küf suşu izole edilerek tanımlaması yapılmıştır

“Ambalajları açılmış ve evlerde kullanılmış tablet örneklerinde kuf kontaminasyonunun incelenmesi” adlı çalışmada [19] evlerde kullanılmış olan toplam 147 tablet örneği üzerinde mikolojik analizler yapılmış örneklerin tamamının mikolojik açıdan kontamine oldukları saptanmıştır. Çalışmada toplam 406 adet küf suşu izole edilmiş ve tanıları yapılmıştır. İzole edilen küf suşlarının % 50’ye yakını *Ascomycetes* ve *Deuteromycetes* sınıfından *Penicillium* ’lara ait olup aynı şekilde izole edilen 75 adet *Aspergillus* suşunun *Ascomycetes* sınıfından olduğu saptanmıştır.

Ev, hastane vb. iç ve dış ortam havası bakteri ve mikrofungus florasının araştırıldığı farklı çalışmalarda en sık izole edilen mikrofungus cinsleri *Cladosporium*, *Penicillium* ve *Aspergillus* olduğu tespit edilmiştir [20,21,22-26].

BÖLÜM 3

MATERYAL METOD

Bu çalışmada farklı kullanıcılardan temin edilen bazı kullanılmış kozmetik ürünlerde bulunan mikrofunguslar; Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia-USP) tarafından önerilen yöntemler ile mikroskopik ve morfolojik tanı yöntemleri kullanılarak cins düzeyinde tespit edilmiştir.

MATERYAL

3.1. Çalışmada Kullanılan Kozmetik Ürünler

Çalışmada; farklı süre ve koşullarda kullanılmış kozmetik ürünler kullanıcılardan temin edilmiştir. Ürünler kullanım amaçlarına göre gruplandırılarak sayıları belirlenmiştir. Buna göre ruj, allık, rimel, göz farı, göz kalemi, pudra, göz makyaj temizleme ürünü ve ter önleyici roll-on olarak gruplandırılan her bir üründen 5 er adet olmak üzere toplam 40 adet ürün incelenmiştir.

3.2. Kozmetik Ürünlerin Gruplandırılması

Çalışmada ruj, allık, rimel, göz farı, göz kalemi, pudra, göz makyaj temizleme ürünü ve ter önleyici roll-on gruplarını temsilen her grup için farklı kullanıcıdan beşer adet olmak üzere temin edilen ürünler 1 den 5 e kadar numaralandırılarak kullanılmıştır. Çalışmada incelenen ürünlerin kullanım süreleri ve saklanma koşulları Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Toplanılan ürünlerin kullanım süreleri ve saklanma koşulları

Ürünler	1.ürün	2.ürün	3.ürün	4.ürün	5.ürün
Far	7 yıl oda	5 yıl oda	5 yıl oda	5 yıl nemli ev (oda)	5 yıl nemli ev (banyo)
Rimel	3 yıl oda	2 yıl nemli ev (oda)	3 yıl oda	3 yıl oda	3 yıl oda
Ruj	5 yıl oda	5 yıl oda	3 yıl oda	3 yıl nemli ev	2 yıl oda
Göz Makyaj Temizleme Ürünü	2,5 yıl nemli ev (banyo)	3 yıl oda	2 yıl banyo	5 yıl nemli ev	1 yıl oda
Allık	3 yıl nemli ev (oda)	3 yıl nemli ev (oda)	4 yıl oda	3 yıl oda	3 yıl oda
Pudra	2 yıl oda	3 yıl oda	5 yıl oda	5 yıl oda	5 yıl oda
Ter Ön. Roll-on	1 yıl nemli ev (oda)	2 yıl oda	3 yıl oda	1 yıl oda	4 yıl oda
Göz Kalemi	1,5 yıl oda	3yıl	3 yıl oda	3 yıl oda	6 yıl oda

3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

3.3.1. Patates Dekstroz Agar (PDA)

Bu besiyeri özellikle *Dematiaceous*'ların teşhisinde kullanılan besiyeridir. Birçok fungus için çok iyi bir gelişme ortamıdır. Aşırı derecede misel gelişimi ve sporulasyon gözlenir. Bunun dışında yatık besiyeri olarak stok kültür hazırlanmasında ve sayım için de kullanılır. Ticari olarak satılan Merck toz besiyerinden 1000 ml distile su için 39 g tartılarak hazırlanır.

3.3.2. pH 7 Fosfat Tamponu

KH_2PO_4	0,4 g
K_2HPO_4	1,36 g
Damıtık su	100 ml

KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 damıtık su ilave edilerek çözdürüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanılır. Daha sonra cam tüplere 9 ml dağıtılır ve içerisine 0,09 ml Tween 80 ilave edilerek otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edilir.

3.3.3. Lakto Pamuk Mavisi Çözeltilisi

Gliserol	250 ml
% 85'lik Laktik asit	100 ml
Pamuk Mavisi Stok	3 ml
Distile Su	50 ml

Distile su, laktik asit ve gliserin karıştırıcı üzerinde 1 saat karıştırılır. Bu karışıma 3 ml Pamuk Mavisi Stok çözeltisi homojen olarak ilave edilir ve 1 saat daha karıştırılır. Havadan herhangi bir bulaşmayı engellemek için erlenin ağzı parafilmle kapatılır.

METOD

3.4. Kozmetik Ürünlerin Hazırlanması

Kozmetik ürünler Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia-USP) tarafından önerilen yöntemlerine göre hazırlanmıştır. Steril ortamda her üründen 1 gr örnek alınmış ve daha önceden hazırlanan pH 7 fosfat tampon çözeltisi bulunan tüplere eklenerek dilüsyonu yapılmıştır. Dilüsyon sıvısından 0,1 ml alınarak PDA besiyeri içeren plaklara aktarılmıştır. Steril cam baget yardımı yayma plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Ters çevrilen plaklar 25°C'lik etüvde 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır [5].

3.5. Kozmetik Ürünlerde Bulunan Mikrofungusların Saflaştırılması ve Tanımlanması

İnkübasyona bırakılan plaklar 7 günün sonunda kontrol edilmiştir. Saflaştırma için üremenin olduğu plaklarda her bir koloniden yatık PDA besiyerine pasaj alınarak 25°C'de 7 gün inkübe edilmiş ve daha sonra stok kültür olarak +4°C'de saklanmıştır.

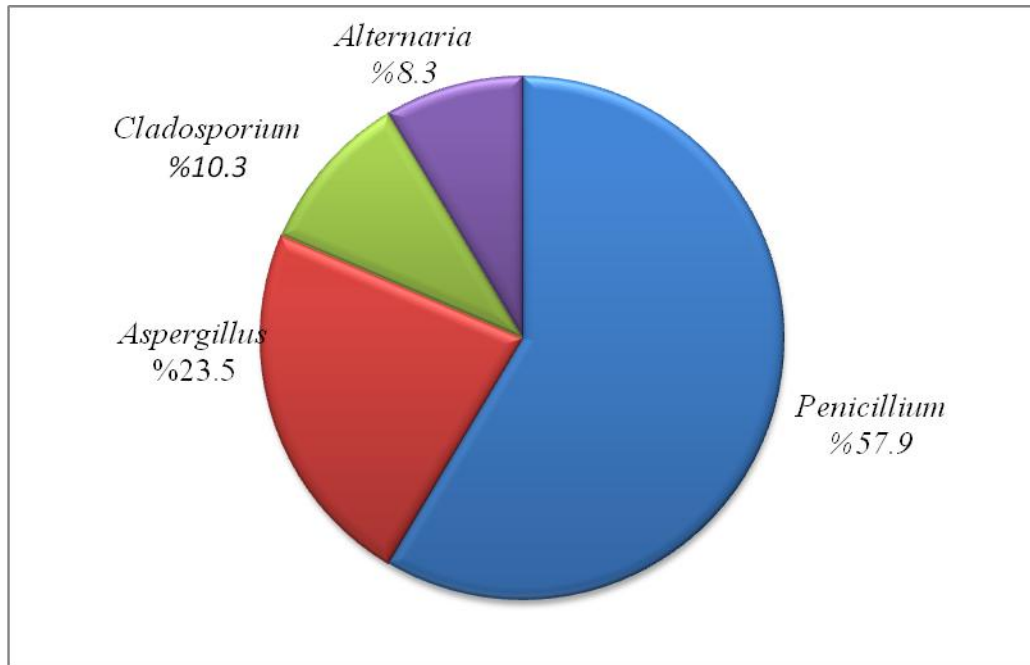
İnkübasyon süresinin sonunda mikrofungusların cins düzeyinde tespitinde makroskobik veri sağlaması için saflaştırılan örneklerden üç nokta ekimi yaparak cinslerin koloni görüntüleri elde edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda plaklardaki kolonilerin makroskobik olarak büyüklüğü (mm cinsinden), şekli, üstten ve alttan rengi, eksudasyon ve pigmentasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Mikroskobik özellikleri ise Stereo mikroskop ile koloni tekstürü, konidial başlıkların tipi incelenmiştir. Işık mikroskobu ile konidiyoforum uzunluğu, genişliği, çeper özelliği, fiyalitlerin uzunluğu ve genişliği, konidinin şekli, büyüklüğü, çeper özelliği tespit edilmiştir. Tüm bu özellikler değerlendirilip cins düzeyinde tanımlama yapılmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Bu çalışmada incelenen 40 adet kullanılmış kozmetik üründen 30 adedinde mikrofungus kontaminasyonu tespit edilmiştir. İnkübasyon sonucunda toplam 10 adet kullanılmış kozmetik üründe herhangi bir üreme görülmemiştir. Mikrofungus üremesi görülen kullanılmış kozmetik ürünlerdeki baskın cins % 57.9 *Penicillium* cinsidir. Diğer üreyen cinsler % 23.5 *Aspergillus* % 10.3 *Cladosporium* % 8.3 *Alternaria* cinsleridir. İzole edilen cinslerin bulunma oranları Şekil 4 (a)'da gösterilmiştir.



Şekil 4 (a) İzole Edilen Cinslerin Bulunma Oranları

İnkübasyon sonucunda mikrofungus kontaminasyonu görülen kozmetik ürünlerden 16 adet üründe toplam 118 koloni *Penicillium*, 7 adet üründe toplam 48 koloni *Aspergillus*, 14 adet üründe toplam 21 koloni *Cladosporium* ve 3 adet üründe toplam 17 koloni *Alternaria* olmak üzere toplam 204 koloni tespit edilmiş olup Tablo 4 (b)'de gösterilmiştir

Tablo 4 (b) Tespit edilen cinslerin koloni sayıları, bulunma yüzdeleri ve izole edildikleri toplam ürün sayıları

Cins	Koloni Sayısı	%	Ürün Sayısı
<i>Penicillium</i> spp.	118	57.9	16
<i>Aspergillus</i> spp.	48	23.5	7
<i>Cladosporium</i> spp.	21	10.3	14
<i>Alternaria</i> spp.	17	8.3	3

Çalışmada incelenen kullanılmış kozmetik ürün gruplarından en fazla mikrofungus üremesi 76 koloni ile far grubunda; en az üreme ise 3 koloni ile allık grubunda gözlenmiştir. Üremesi tespit edilen cinsler ve ürün grupları Tablo 4 (c)'de gösterilmiştir.

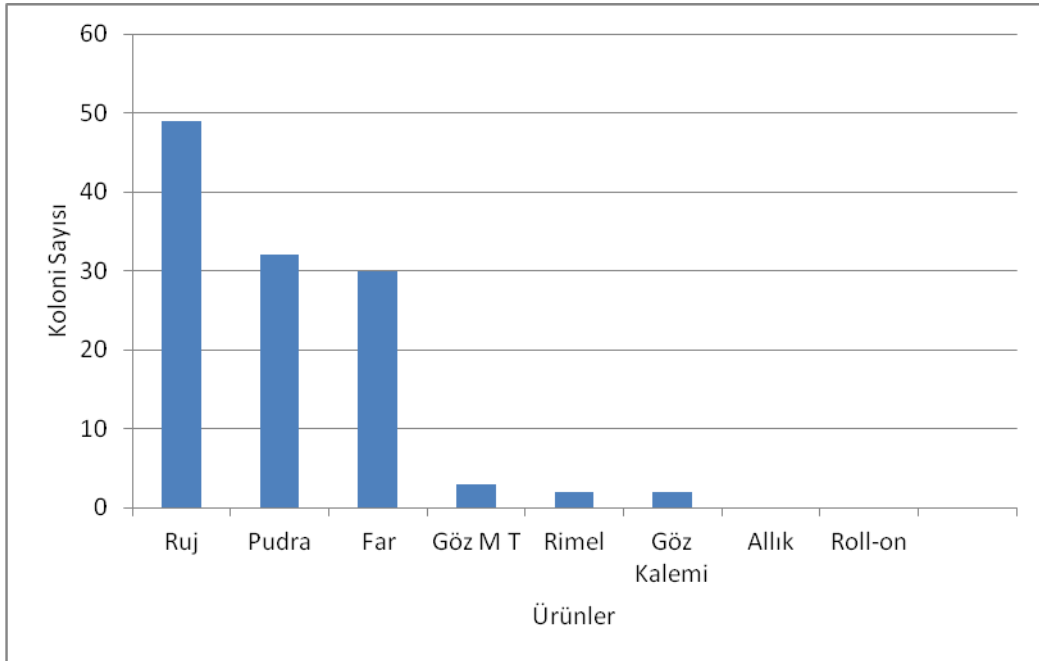
Tablo 4 (c) Kozmetik Ürün Gruplarında Üreyen Cinsler ve Koloni Sayıları

Ürünler	Far	Rimel	Ruj	Göz Mak. Tem. Ürünü	Allık	Pudra	Roll-on	Göz Kalemi
<i>Penicillium</i>	30 koloni	2 koloni	49 koloni	3 koloni	Üreme yok	32 koloni	Üreme yok	2 koloni
<i>Aspergillus</i>	44 koloni	Üreme yok	Üreme yok	1 koloni	Üreme yok	2 koloni	Üreme yok	1 koloni
<i>Cladosporium</i>	1 koloni	7 koloni	1 koloni	2 koloni	3 koloni	Üreme yok	5 koloni	2 koloni
<i>Alternaria</i>	1 koloni	Üreme yok	Üreme yok	1 koloni	Üreme yok	15 koloni	Üreme yok	Üreme yok
Toplam	76	9	50	7	3	49	5	5

4.1 *Penicillium* Üremesine Ait Sonuçlar

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen İnkübasyon sonucunda 4 adet far, 2 adet rimel, 3 adet ruj, 3 adet göz makyaj temizleme ürünü, 3 adet pudra ve 1 adet göz kalemi olmak üzere toplamda 16 adet üründe *Penicillium* üremesi görülmüştür. *Penicillium* üremesinin en fazla olduğu ürün 4. Ruj (nemli bir ev 3 yıl) dur.

Penicillium; ürün gruplarından farda 30 koloni, rimelde 2 koloni, rujda 49 koloni göz makyaj temizleme ürününde 3 koloni, pudrada 32 koloni ve göz kaleminde 2 koloni olmak üzere toplam 118 koloni ürettiği tespit edilmiştir. *Penicillium* üremesi görülen ürünler ve üreme miktarları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



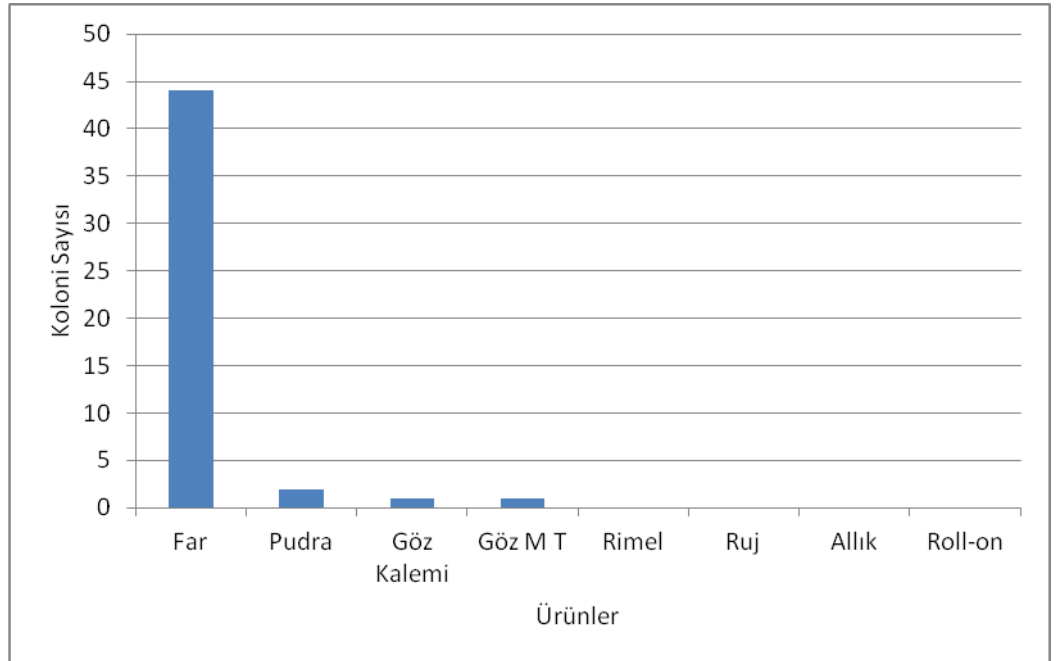
Şekil 4.1 *Penicillium* Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen inkübasyon sonucunda; 1 adet far, 3 adet rimel, 2 adet ruj ve 2 adet göz makyaj temizleme ürünleri ile allık ve roll-on ürün grubunda *Penicillium* üremesi görülmemiştir.

4.2 *Aspergillus* Üremesine Ait Sonuçlar

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen inkübasyon sonucunda 4 adet far, 1 adet göz makyaj temizleme ürünü, 1adet pudra ve 1adet göz kalemi olmak üzere toplamda 7 adet üründe *Aspergillus* üremesi görülmüştür. *Aspergillus* üremesinin en fazla olduğu ürün 5. Far (nemli bir ev banyo 5 yıl) dır.

Aspergillus; ürün gruplarından farda 44 koloni, göz makyaj temizleme ürününde 1 koloni, pudrada 2 koloni ve göz kaleminde 1 koloni olmak üzere toplam 48 koloni ürettiği tespit edilmiştir. *Aspergillus* üremesi görülen ürünler ve üreme miktarları Şekil 4.2 de gösterilmiştir.



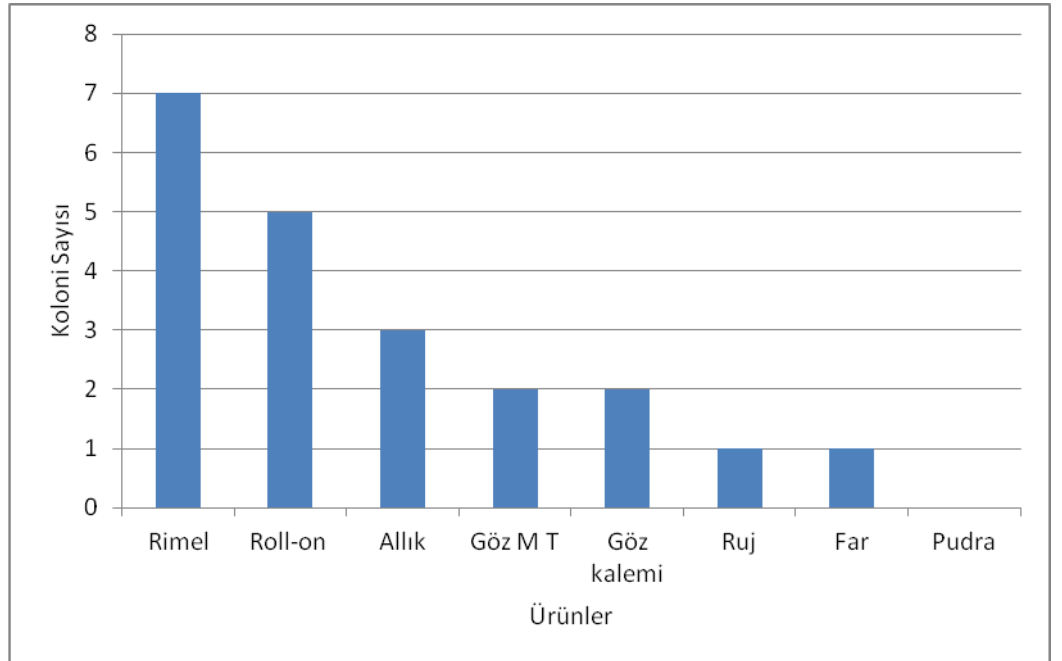
Şekil 4.2 *Aspergillus* Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen inkübasyon sonucunda; 1 adet far,4 adet pudra,4 adet göz kalemi ve 4 adet göz makyaj temizleme ürünleri ile rimel, ruj, allık ve roll-on ürün grubunda *Aspergillus* üremesi görülmemiştir.

4.3 *Cladosporium* Üremesine Ait Sonuçlar

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen İnkübasyon sonucunda 4 adet far, 1 adet göz makyaj temizleme ürünü, 1adet pudra ve 1adet göz kalemi olmak üzere toplamda 7 adet üründe *Cladosporium* üremesi görülmüştür. *Cladosporium* üremesinin en fazla olduğu ürünler 1. Roll-on (nemli bir ev 1 oda yıl) ve 4. Rimel (3 yıl oda) dir.

Cladosporium; ürün gruplarından rimelde 7 koloni, roll-onda 5 koloni, allıkta 3 koloni, göz kaleminde 2 koloni, göz makyaj temizleme ürününde 2 koloni, farda 1 koloni ve rujda 1 koloni, olmak üzere toplam 21koloni ürediği tespit edilmiştir. *Cladosporium* üremesi görülen ürünler ve koloni sayıları Tablo 4.3’de gösterilmiştir.



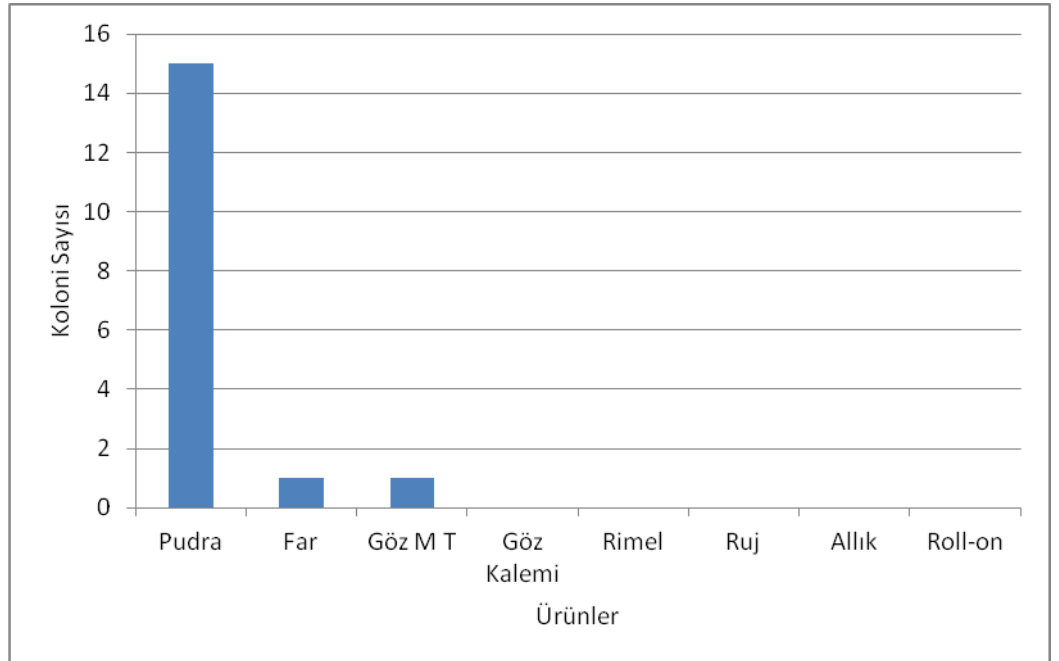
Şekil 4.3 *Cladosporium* Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen inkübasyon sonucunda; 4 adet far, 4 adet ruj, 3 adet roll-on, 3 adet allık, 3 adet göz kalemi , 3 adet göz temizleme ürünleri ile pudra ürün grubunda *Cladosporium* üremesi görülmemiştir.

4.4 *Alternaria* Üremesine Ait Sonuçlar

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen İnkübasyon sonucunda sadece far, pudra ve göz makyaj temizleme ürün gruplarından birer adet üründe *Alternaria Sp.* üremesi görülmüştür. *Alternaria* üremesinin en fazla olduğu ürün 3. Pudra (5 yıl oda) dır.

Alternaria; ürün gruplarından pudrada 15 koloni, göz makyaj temizleme ürününde 1 koloni ve rujda 1 koloni, olmak üzere toplam 7 koloni ürettiği tespit edilmiştir. *Alternaria* üremesi görülen ürünler ve koloni sayıları Şekil 4.4 de gösterilmiştir.

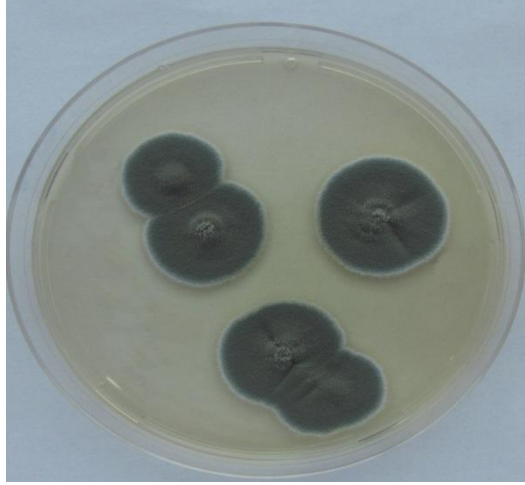


Şekil 4.4 *Alternaria* Üremesi Görülen Ürünler ve Koloni Sayıları

Çalışmada incelenen 40 adet kozmetik üründen inkübasyon sonucunda; 4 adet far, 4 adet göz makyaj temizleme ürünü, 4 adet pudra ürünleri ile ruj, roll-on, allık, göz kalemi ve rimel ürün gruplarında *Alternaria* üremesi görülmemiştir.

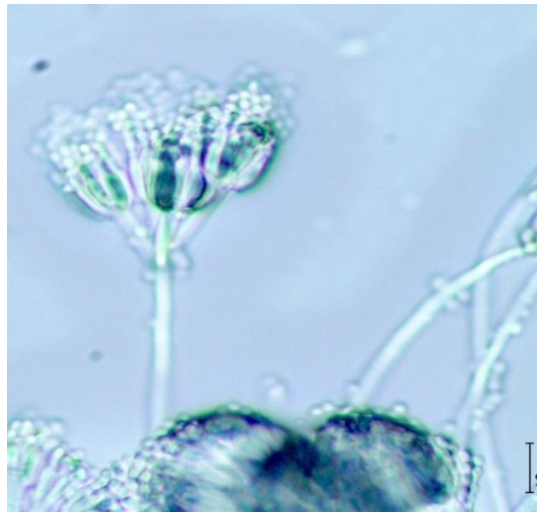
4.5.1. *Penicillium* Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler

PDA besiyerinde 25⁰C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda mavimsi gri renkli, beyaz kenarlı, 20 mm çapında koloniler oluşmuştur. Şekil 4.5.1 (a)



Şekil 4.5.1 (a) *Penicillium* Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 Günlük Koloni) görünümü

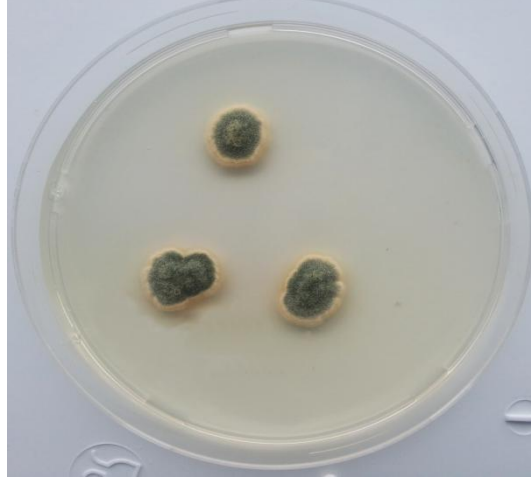
Mikroskobik incelemede *Penicillium* cinsine ait bivertisillat konidiyofor yapısı gözlenmiştir. Şekil 4.5.1 (b)



Şekil 4.5.1 (b) *Penicillium* Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400)

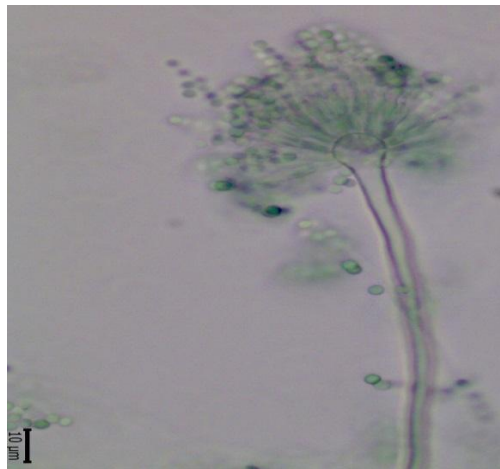
4.5.2. *Aspergillus* Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler

PDA besiyerinde 25°C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda koyu gri renkli kenarları beyaz çerperli 15 mm çaplı *Aspergillus* kolonileri oluşmuştur. Şekil 4.5.2 (a)



Şekil 4.5.2 (a) *Aspergillus* Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 günlük koloni) Genel Görünümü

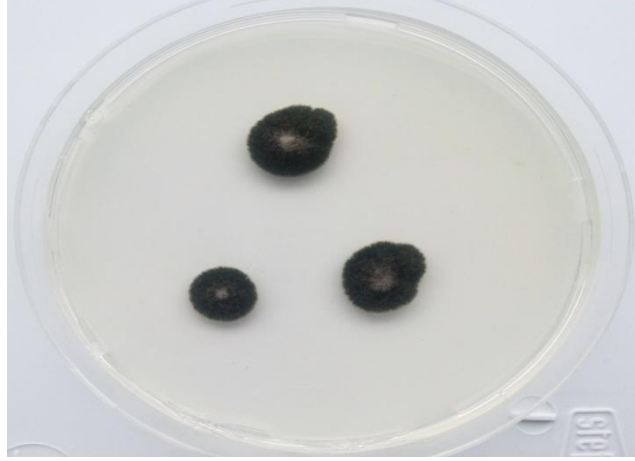
Mikroskobik incelemede *Aspergillus* cinsinin tipik septasız koniyofor yapısı gözlenmiştir. *Aspergillus* cinsine ait mikroskobik görüntü şekil 4.5.2 (b) de gösterilmiştir.



Şekil 4.5.2 (b) *Aspergillus* Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400)

4.5.3 *Cladosporium* Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler

PDA besiyerinde 25°C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda siyah renkli merkezi beyaz pamuksu 15-20 mm çaplı *Cladosporium* kolonileri oluşmuştur. Şekil 4.5.3 (a)



Şekil 4.5.3 (a) *Cladosporium* Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 günlük koloni) Genel Görünümü

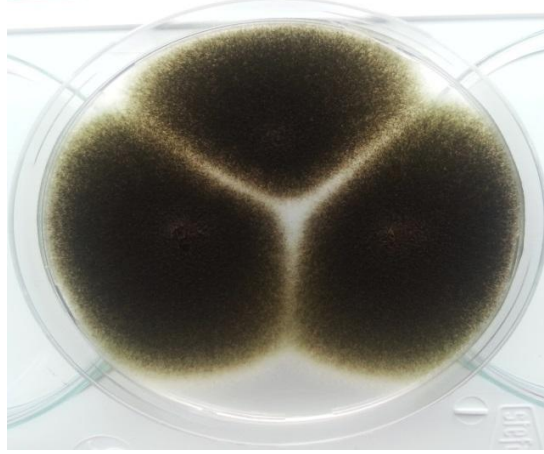
Mikroskobik incelemede karakteristik dik, pigmentli, ağaç benzeri blastospor zincirlerinden oluşmuş dalları olan konidiyoforlar gözlenmiştir. Şekil 4.5.3 (b)



Şekil 4.5.3 (b) *Cladosporium* Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400)

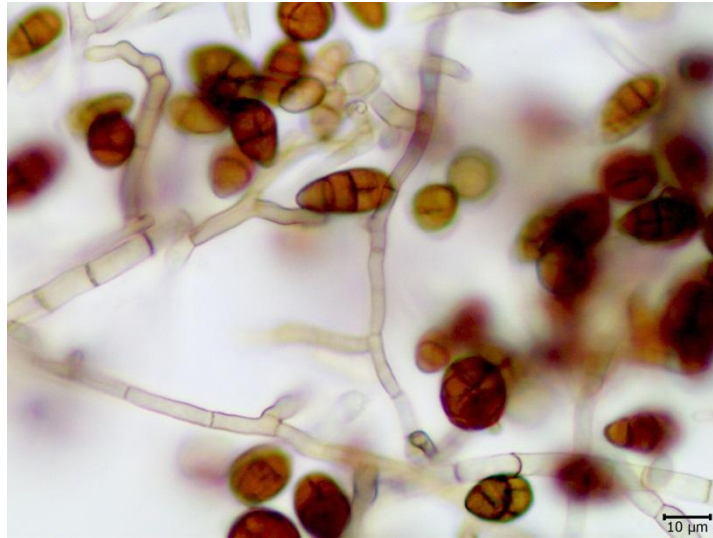
4.5.4. *Alternaria* Cinsine Ait Makroskobik ve Mikroskobik Görüntüler

PDA besiyerinde 25 °C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda koyu yeşil renkli *Alternaria* kolonileri oluşmuştur. Şekil 4.5.4



Şekil 4.5.4 (a) *Alternaria* Cinsinin PDA Besiyerindeki (7 günlük koloni) Genel Görünümü

Mikroskobik incelemede *Alternaria* cinsine ait 2-3 bölmeli parlak kahve rengi konidialar ve eğri dallanmalar yapan konidiyofor yapısı gözlenmiştir. Şekil 4.5.4. (b)



Şekil 3.5.4 (b) *Alternaria* Konidiyofor Yapısı (Işık mikroskobu x 400)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Çalışmamızda örnekleme yapılan kullanılmış kozmetik ürünlerdeki üreme sonuçlarını değerlendirdiğimizde izole edilen cinslerin sırası ile % 57.9 oranında *Penicillium*, % 23.5 oranında *Aspergillus*, % 10.3 oranında *Cladosporium* ve % 8.3 oranında *Alternaria* olduğu görülmüştür.

Özyaral ve Ark. [4] yaptıkları çalışmada incelenen 45 adet örnekte baskın küf florası örneklerin % 46.7'sinde bulunma sıklığı ile birinci sırada *P. rugulosum*, ikinci sırada % 42.2 ile *A. versicolor* ve üçüncü sırada % 35.6 ile *Dematiaceous* grubu olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da yine *Penicillium* ve *Aspergillus* ilk iki sırada yer almış olup bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Ev, hastane ve dış ortam havasında bulunan mikroorganizma florasının incelendiği farklı çalışmalarda iç-dış ortam havasında en sık izole edilen mikrofungus cinsleri *Cladosporium*, *Penicillium* *Aspergillus* olarak tespit edilmiştir [20,21,22,-26]. Belirtilen çalışmalarda tespit edilen cinslerin bizim çalışmamızda da ilk sırada yer alması bu çalışmalarda belirtilen nem faktörü bizim çalışmamızda da *Penicillium* üremesinin en fazla olduğu ürün 4. Ruj örneğinin nemli bir evden ve üç yıllık bir üründen elde edilmesini açıklayabilir. Aynı gerekçenin *Aspergillus* üremesinin en fazla olduğu nemli bir evin banyosunda saklanan beş yıllık 5. Far örneğinden elde edilmesinin tesadüfi bir sonuç olmadığına göstergesi olabilir.

Naki Sivri ve Ark. [2] yaptıkları çalışmada pudra içeriğini oluşturan talk, diğer absorban özelliği olan tozlar gibi çevresel kontaminantları ve mikroorganizmaları tutabildiğini, pudra formundaki ürünlerin bozulmalarının en fazla nemli koşullarda

oluşan gözle görülür küf üremesi ile bağlantılı olduğunu ifade etmişlerdir. Bizim Çalışmamızda da incelenen kullanılmış kozmetik ürün gruplarından en fazla mikrofungus üremesi birinci sırada 76 koloni ile far grubunda, ikinci sırada 50 koloni ile ruj grubunda ve üçüncü sırada 49 koloni ile pudra grubunda gözlenmesi özellikle pudra grubu kozmetiklerin absorban özellikleri ile ilişkilendirilebilir.

Aynı çalışma grubu, genellikle koruyucu içeren dudak boyalarının bazılarında küf üremesi görüldüğünü ve küflerin dudak boyaları üzerinde üremesinin genellikle ürünün kullanım sırasında solunum yoluyla nemlenmesinden kaynaklandığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda *Penicillium* cinsinin özellikle ruj preparatlarında fazla sayıda görülmesi bu nedene dayandırılabilir.

Fusarium, *Aspergillus* cinsleri *Dematiaceous* grubundan sonra fungal keratite en sık neden olan funguslardır. Çalışmamızda izole ettiğimiz mikrofunguslar arasında rimel örneklerinde en fazla *Cladosporium* üremesi oldukça ilgi çekicidir. Göz preparatlarında mikrobiyal üremenin daha az sayıda olması beklenirken özellikle *Cladosporium* cinsinin göz hastalığı olan keratomikoziz'e neden olması bu cinsin rimel örneğinden izole edilmesinin önemini bir kat daha arttırmıştır [27,28,29].

Geleneksel kozmetik ürünlerinde bulunan; karbonhidratlar, şeker alkoller, yağ asitleri, proteinler, aminoasitler, glikozidler, yağ alkoller, steroidler, peptitler, vitaminler ve bitkisel hammaddeler mikroorganizmalar için besin teşkil ederler ve aynı zamanda mikroorganizmaların çoğalmasını desteklemede potansiyel oluştururlar[2]. Bunu engellemek için birçok koruyucu madde kullanılmaktadır. Kozmetik ürün serisi içindeki koruyucular, mikroorganizmaların yok edilmesi süresince azalır. Sonunda ürünlerdeki koruyucu tamamen tükenir ve ürün kontamine olabilir. Koruyucuların etkinliğinin azalması, mikroorganizmaların direncini artırır ve ömrünü uzatır. Pek çok organik koruyucu bakteri ve mantarlar tarafından metabolize edilir ve mikroorganizmalara büyüme substratı olarak davranır. Ürünü kontamine eden pek çok saprofit mikroorganizma, koruyucunun etkisiz olduğu durumlarda, ürün içinde bulunan eser elementleri kullanarak ürer. Pek çok patojen mikroorganizma, farmasötik formülasyonlarda bulunmayan özel büyüme faktörlerine ihtiyaç duyar ve bu patojenler koruyucular altında yaşamını sürer ancak çoğalamaz [30].

Çalışmamızda son kullanma tarihleri belli olmayan ve uzun süre kullanılan kozmetik ürünlerde mikrofungus üreme oranlarının yüksek çıkması, belirtilen nedenlerle bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

Kozmetik ürünlerinin kullanımı kişileri mutlu etse de bu ürünlerin yönetmeliklere uygun koşullarda üretilmediği veya doğru kullanılmadığı durumlarda allerji, keratit deri yapısının bozulması ve iritasyon gibi risklerinin olduğu göz ardı edilmemelidir. Kozmetik ürünlerde bulunan koruyucuların etkinliğinin zamanla azaldığı bilinmektedir. Bu nedenlere bağlı olarak bir kozmetik ürününü tercih ederken ve kullanırken nelere dikkat etmeliyiz sorusuna kısaca cevap verecek olursak;

- 1- Kozmetik ürünün içeriği (İçerdiği kimyasallar)
- 2- Kozmetik ürünün son kullanma tarihi (ürünlerin ambalajları üzerinde yazmaktadır)
- 3- Kozmetik ürünün içeriğinde özellikle koruyucu madde miktarı (ki birçok kozmetik ürünüde belirtilmemektedir)
- 4- Kozmetik ürünün saklama koşulları (nemli ortamlar mikroorganizmaların üremesi için uygun ortamlardır.) gibi kriterleri sıralayabiliriz.

Biz çalışmamızda kullanılmış kozmetik ürünlerde bulunan mikrofungus florasını belirlemeye yönelik incelemeler yaptık, ancak bu tür çalışmalarda mikroorganizma izole edilirken FDA, USP raporlarında ve ülkemizde Kozmetik Yönetmelikleri'nde belirtildiği üzere eş zamanlı olarak incelenen kozmetik ürünlerin içeriğindeki koruyucu madde miktarlarının ve mikrofunguslara etkinliklerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Yavaşal Çarıkçı A.İ., Uçar F., Yalçın H.T. *Kozmetik ürünlerde bakteriyal ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve PCR yöntemi kullanılarak saptanması*. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR 6:1-16 2008
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702080101.pdf
- [2] Naki N., Yekta A., Ozalp M., Atakan N. and Polat M . *Decontamination of Cosmetic Products and Raw Materials by Gamma Irradiation* FABAD J. Pharm. Sci. ,31 : 198-209 2006
- [3] *Sağlık Bakanlığı. Kozmetik Yönetmeliği*. Resmi Gazete, Sayı 25823, 23 Mayıs 2005
- [4] Özyaral O., Cevikbas A., Ergin E. *Microbial investigation in non-sterile pharmaceutical and cosmetic products I. The detection of mycotic contamination in eye cosmetics*. Journal of Pharmacy of University of Marmara. 9 (1): 141-155, 1993
- [5] Tüysüz M. *Piyasada Bulunan Bazı Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik İçeriğinin ve Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2010.
- [6] Durak Y. *Dudak boyalarının Mikrobiyal Kontaminasyon ve Biyostatik Etkinlik Yönünden İncelenmesi* Kukem Dergisi Cilt:21, Sayı:3 Sayfa: 25-32 1998
- [7] Klich M A. *Identification of common Aspergillus Species*, No:1,122 pp. Published by The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands, March 2002

- [8] Samson R.A, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. ***Food and Indoor Fungi***, 390 pp. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, The Netherlands.2010
- [9] Hasenekoğlu İ, ***Toprak Mikrofungusları***, Atatürk Üniversitesi Yayınları No:689 Erzurum 1991
- [10] Asan A, ***Aspergillus, Penicillium and Related Species Reported from Turkey*** Mycotaxon 89 (1): 155-157, January-March, 2004.
- [11] Pitt J I. ***The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces***. 634 pp. Academic Pres. Inc. London, 1979
- [12] Bensch K., U. Braun, J.Z. Groenewald, P.W. Crous. ***The genus Cladosporium***. Studies in Mycology 72: 1–401. Published online: 22 May 2012; doi:10.3114/sim0003.
- [13] Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Filtenborg O. ***Introduction to food- and airborne fungi***, 389 pp., Centraalbureau voor Schimmelcultures-Utrecht 2002
- [14] Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder B., Crous P.W. ***Alternaria Redefined***. Studies in Mycology 75: 171–212. Published online: 31 May 2013; doi:10.3114/sim0015.
- [15] Kaynak Onurdağ F., Özgen S., Abbasoğlu D. ***Microbiological Investigation of Used Cosmetic Samples*** Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Vol: 30 / N: 1/ pp. 1-16 / January 2010
- [16] Özyaral O., Tarkan O., Cevikbas A., Johansson C.B. ***Farmasotik onemi olan bazı droglarda mikolojik analizler (Mycological analyses of some of the***

- pharmaceutically important crude herbs*). Mikrobiyoloji Bulteni 28 (4): 359-365, 1994.
- [17] Özyaral O., Johansson C.B. *Evaluation of the quality of packaging materials of stored surgical strings*. İstanbul Ec.Fak.Mec. (30): 11-18, 1994
- [18] Özyaral O, Johansson C.B., Cevikbas A. *Bebek pudralarında alerjik küf mantarı kontaminasyonunun incelenmesi (The investigation of allergic mould contaminants on baby powders)* Marmara Üniversitesi Eczacılık Dergisi-Journal of Pharmacy of University of Marmara. 9 (1): 59-66, 1993.
- [19] Özyaral O., Johansson CB. *Ambalajları açılmış ve evlerde kullanılmış tablet örneklerinde küf kontaminasyonunun incelenmesi (Investigation of mould contamination on tablet samples in opened packages)*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 17 (3-4): 172-179, 1987.
- [20] Şen, B., Asan, A. *Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): Seasonal distribution and relationship with climatic factors*, Environ Monit Assess, 151:209–219, (2009)
- [21] Ökten S.S., Asan, A., Sabuncuoğlu, Y., Yavuz, E. *Airborne Fungal Concentrations Of Morning And Evening In East Patch Of Edirne City Using Two Sampling Methods*, Trakya Univ J Sci, 8(1): 15–20, (2007).
- [22] Yoltaş A., Yücelmiş U., Çiftçi H.M., Utlı S., Haliki Uzaktan A., *Alerji Problemi Yaşanan Evlerde Hava Kökenli Potansiyel Alerjen Mikrofungus Florası ve Dağılımının İncelenmesi* Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 3 (1):7-17, 2010 ISSN: 1308-3961, www.nobel.gen.tr
- [23] Aydogdu H, Asan A., Tatman-Otkun M, Ture M. *Monitoring of Microorganisms in the Indoor Air of Primary Schools in Edirne City, Turkey*. Indoor and Built Environment. 14 (5): 411-425, 2005.

- [24] Asan A., Sen B., Sarica S. *Airborne fungi in urban air of Edirne City (Turkey)*. Biologia. 57 (1): 59-68, 2002.
- [25] Aydogdu H., Asan A. **Airborne Fungi in the Child Day-Care Centers in Edirne City, Turkey**. Environmental Monitoring and Assessment. 147 (1-3): 423-444, 2008.
- [26] Ökten S., Asan A. *Airborne fungi and bacteria in indoor and outdoor environment of the Pediatric Unit of Edirne Government Hospital*. Environmental Monitoring and Assessment. 184 (3) : 1739-1751, 2012.
- [27] Zbang X., Sun X., Wan Z., Zbang Y., Hou W. *Keratitis-Associated Fungi Form Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility* IOVS, Vol. 53, No. 12 November 2012
- [28] Chew F.L., Subrayan V., Chang P.P., Goh M.C., Ng P. *Cladosporium cladosporioides keratomycesis: a case report*. Jpn J Ophthalmol Vol 53: 648–668, 2009
- [29] Thomas P. A. and Kalliamurthy J. *Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management* Clinical Microbiology and Infection, Volume: 19 Number: 3, March 2013
- [30] Abbasoğlu U., Çevikbaş A. *Farmasötik Mikrobiyoloji* Elif Yayınevi Mayıs 2011

ÖZGEÇMİŞ

26.05.1983 tarihinde ARTVİN Hopa'da doğdum. 1993 yılında Osmaniye köyü İlkokulu-1996 yılında Kemalpaşa Ortaokulu'nda ilköğrenimimi, 2000 yılında ise Kemalpaşa Çok Programlı Lisesi'nde orta öğrenimimi tamamladım. Lisans öğrenimimi 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Giresun Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 2010 yılında Trakya Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu'na idari personel olarak atandım. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladım.