



## *Fusarium fujikuroi*, *Mucor racemosus*: Sultan Papağanı (*Nymphicus hollandicus*)

Senem ÖZTÜRK KÖSE<sup>1,\*</sup> Banur BOYNUKARA<sup>2</sup> Hacı Halil BIYIK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup>Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ, Türkiye

Geliş Tarihi: 07.05.2024

Kabul Tarihi: 25.06.2024

### ÖZ

Bu çalışmada iştahsızlık, kilo kaybı ve dışkıda kötü koku şikayetleri ile getirilen Sultan papağanının (*Nymphicus hollandicus* Kerr, 1972) dışkı örneği mikolojik yünden incelenmiştir. Dışkı örneğinin aseptik şartlarda seri dilüsyonları yapılarak Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ve kanlı agar besiyerlerine inokülasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler saf koloniler olarak ayrılmış ve bu saf kolonilerden morfolojik, mikroskopik ve moleküler tanımlamalar yapılmıştır. Moleküler tanımlamalarda fenol-kloroform izoamilalkol DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Fungus DNA'larından PCR amplifikasyonu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında ve hizmet alımı olarak ticari firmalarda yaptırılmıştır. Sekanslama hizmetleri Innopenta Biyoteknoloji ve Macrogen Europe tarafından yapılmıştır. ITS1 (5<sup>0</sup>-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3<sup>0</sup>) / ITS4 (5<sup>0</sup>-TCCTCCGTTATTGATATGC-3<sup>0</sup>) primerleri kullanılmıştır. Fungusların tanımlanmasında nBLAST programı kullanılmış ve genetik benzerlik oranlarına göre türler eşleştirilmiştir. Sekans sonuçları GenBank sisteminde kayıt altına alınmış ve kültür koleksiyonuna eklenmiştir. Moleküler çalışmalar sonrasında *Fusarium fujikuroi* HBF578, *Mucor racemosus* HBB579 suşları tanımlanmıştır. Literatür çalışmaları incelendiğinde *Fusarium fujikuroi* HBF578 suşunun Sultan papağanı'ndan daha önce izole edilmediği ilk kez bu çalışmada raporlandığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Fusarium fujikuroi*, *Mucor racemosus*, Sultan papağanı (*Nymphicus hollandicus*).

### ABSTRACT

## *Fusarium fujikuroi*, *Mucor racemosus*: Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*)

In this study, the stool sample of a cockatiel (*Nymphicus hollandicus* Kerr, 1972), brought with complaints of loss of appetite, weight loss and bad smell in the stool, was examined mycologically. Serial dilutions of the stool sample were made under aseptic conditions and inoculated into Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) and blood agar media. After incubation, the samples were separated as pure colonies and morphological, microscopic and molecular identifications were made from these pure colonies. Phenol-chloroform isoamylalcohol DNA isolation method was used for molecular identification. PCR amplification from fungal DNAs was carried out at Aydın Adnan Menderes University Biology Department Microbiology Laboratory and by commercial companies as service procurement. Sequencing services were provided by Innopenta Biotechnology and Macrogen Europe. Primers ITS1 (5<sup>0</sup>-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3<sup>0</sup>) / ITS4 (5<sup>0</sup>-TCCTCCGTTATTGATATGC-3<sup>0</sup>) were used. The nBLAST program was used to identify fungi and species were matched according to their genetic similarity rates. Sequence results were recorded in the GenBank system and added to the culture collection. After molecular studies, *Fusarium fujikuroi* HBF578 and *Mucor racemosus* HBB579 strains were identified. When the literature studies were examined, it was seen that the *Fusarium fujikuroi* HBF578 strain had not been isolated from the Cockatiel before and was reported for the first time in this study.

**Keywords:** *Cockatiel* (*Nymphicus hollandicus*), *Fusarium fujikuroi*, *Mucor racemosus*.

### GİRİŞ

Sultan papağanı (*Nymphicus hollandicus* Kerr, 1972), Cacatuidae familyasına ait Avustralya kökenli bir kuş olup, (Entegre Taksonomik Bilgi Sistemine göre) dünyanın en küçük kakadu türünü temsil etmektedir (Brilhante ve ark. 2010). Hayvanlarda ve insanlarda bağışıklık sistemi güçlüyse fungal hastalıklar tolere edilebilirken, bazı

durumlarda immünolojik ve fizyolojik hastalıklara neden olabilir (Mirhosseini ve Khosravi 2023). Kuşlar, solunum ve sinir sistemi anatomileri nedeniyle mikotik etkenlere karşı hassastır ve serumları çok zayıf antifungal aktiviteye sahiptir. Ancak kuşların gastrointestinal sistemi yapısından dolayı mantarların gelişmesi için daha uygun bir ortam olabilir (Shivachandra ve ark. 2004).



Yabani ve evcil kuşlar üzerine yapılan çalışmalarda, gastrointestinal sistem mikrobiyotaları incelenmiş; *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon* ve *Rhodotorula* gibi maya türleri, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus* gibi filamentli funguslar tespit edilmiştir (Brilhante ve ark. 2010; Simi ve ark. 2018; Boynukara ve ark. 2019).

Kuşların barsaklarında, kloaklarında ve dışkılarında bulunan mikrobiyota ile ilgili çalışmalar, patojen mantarların yayılma yolları hakkında da yeni bilgiler sunmuştur (Gómez-De-Anda ve ark. 2023). Araştırmalarda kuşların yaklaşık %50'sinin, insanlar ve kendileri için patojen olabilecek mantarların konakçısı ve taşıyıcısı haline geldiği görülmüştür (Abbas ve ark. 2017). Taşıyıcı kuşlar, patojen mantarların büyümesini engelleyen yüksek vücut sıcaklıkları nedeniyle genellikle hastalanmazlar ve bu mantarlar, bağışıklık sistemi zayıf olan insanların veya diğer memelilerin vücut sıcaklıklarında tehlikeli hale gelir (Dynowska ve Kisicka 2005).

Bu çalışmada; kilo kaybı, iştahsızlık, ilgisizlik ve dışkıda ekşimsi kötü koku şikayetleri olan 6.5 yaşındaki bir Sultan papağanı'nın dışkı örneği mikolojik yönden incelenmiş ve izole edilen türlerin moleküler tanımlamaları yapılmıştır.

## VAKANIN TAKDİMİ

Bu çalışmada iştahsızlık ve kilo kaybı olan Sultan papağanına ait (Şekil 1) dışkı örneği kullanılmıştır. Çalışma için hasta sahibinden bilgilendirme ve onam formu alınmıştır.



**Şekil 1:** Dışkı örneği incelenen hasta papağan.

**Figure 1:** Sick parrot whose fecal sample were examined.

Dışkı örneklerinin fizyolojik tuzlu su (%0.85) kullanılarak seri dilüsyonları hazırlanmış Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ve kanlı agar besiyerlerine inokülasyonu yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler malt ekstre agar besiyerine tek koloni ekim tekniği ile saflaştırılmıştır. Koloni morfolojileri ve mikroskopik görüntüleri incelenerek morfolojik tanımlamaları yapılmıştır (Boynukara ve ark. 2023).

Saf koloniler DNA izolasyonu için 1 ml'lik steril saf su içerisine aktırılarak -20 °C'de 1 gece saklanmıştır. DNA izolasyonu fenol-kloroform izoamil alkol yöntemi kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'lar jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmiş ve Nanodrop spektrofotometresi (Thermo Fisher) ile saflık ve miktar kontrolleri yapılmıştır. Örneklerin PCR amplifikasyonu için ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri kullanılmıştır. PCR amplifikasyonunda mastermix (Thermo Fisher) kullanılmıştır. Bir fungal örneğin PCR amplifikasyonu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılmış olup sekans hizmeti Innopenta Biyoteknoloji firmasından alınmıştır. Diğer örneğin PCR amplifikasyonu ve sekans hizmeti Macrogen Europa şirketi tarafından gerçekleştirilmiştir. Sekans sonuçları için nBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) adresindeki benzerlik oranları karşılaştırılmış ve benzerlik oranları incelenerek tür tanımlaması yapılmıştır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

İzole edilen ve morfolojik olarak tanımlanan fungal türlere ait DNA'ların Nanodrop spektrofotometresi (Thermo Fisher) ile saflık ve miktar kontrolleri sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Moleküler olarak tanımlaması yapılan türlerin GenBank kayıtları oluşturulmuş ve aksesyon numaraları alınarak kültür koleksiyonumuza eklenmiştir (Tablo 2). Yapılan analiz sonuçlarına göre tanımlanan türler *Fusarium fujikuroi* HBF578 ve *Mucor racemosus* HBF579'dir.

**Tablo 1:** Nanodrop spektrofotometresi DNA saflık ve miktar ölçüm sonuçları.

**Table 1:** Nanodrop spectrophotometer DNA purity and quantity measurement results.

Tür adı	Nükleik asit miktarı (ng/µl)	260/280 Abs
<i>Fusarium fujikuroi</i> HBF578	38.4	1.95
<i>Mucor racemosus</i> HBF579	181.7	1.90

**Tablo 2:** Tanımlanan türlerin sekans sonuçları.

**Table 2:** Sequence results of identified species.

Tür Adı	Aksesyon numarası	Benzerlik (%)
<i>Fusarium fujikuroi</i> HBF578	OR583900	99
<i>Mucor racemosus</i> HBF579	PP738383	100

Kuşlar kanatları ile fungal enfeksiyonları aerosol olarak taşımaktadırlar. Özellikle pet cinsi olan kuşların bulunduğu ortamlara duyarlı insanlarda da farklı enfeksiyonlar oluşmaktadır (Boynukara ve ark. 2019)

*Mucor* cinsi üyeleri mukormikosis'e neden olan funguslardır. *Mucor* türleri kuşlarda ve diğer hayvanlarda hastalıklara neden olmaktadır (Abbas ve ark. 2017; Ciftci ve ark. 2024). Kuşlar üzerine yapılan bir çalışmada, *Mucor racemosus* türünün primer hastalık etkeni olmayıp bağışıklığı düşmüş kuşlarda sekonder enfeksiyon oluşturduğu belirtilmiştir (Galosi ve ark. 2022). Kuş yumurtalarından izole edilen fungal türlerin tanımlandığı çalışmada *Mucor racemosus* tespit edilmiştir (Otayoor ve ark. 2024). *Psittacinae* alt familyasından *Agapornis* (aşk papağanı) türünde sistemik bir mikozis görülmüştür. İncelemeler neticesinde hastalığa sebep olan etkenler *Mucor racemosus* ve *Mucor circinelloides* olarak

tanımlanmıştır (Galosi ve ark. 2018). Ölü olarak bulunan yabani bir kuş olan *Cyanistes caeruleus*'un kırmızı, şiş ve sarkık göz kapaklarından *Mucor racemosus* izole edilmiştir. Çalışmada, kuşun sirovirüs enfeksiyonu sonrasında *Mucor racemosus* kaynaklı sekonder enfeksiyona yakalandığı belirtilmiştir (Schmitz ve ark. 2018). Egzotik kuşların fekal örneklerinden fungal izolasyonun gerçekleştiği bir diğer çalışmada da *Mucor racemosus* tanımlanmıştır (Lozano ve ark. 2023).

*Fusarium* cinsi funguslar genel olarak tahıllar ve yemlerde bulunmakta ve fungal toksinler üretmektedir (Kabak ve Var 2014). Sultan papağanı kanat ve dışkılarından alınan örneklerden izole edilmiş fungus türleri incelendiğinde dışkıdan *Fusarium sp.* izole edilmiştir (Köptcke ve ark. 2021). Orta Batı Brezilya'daki *Psittacidae* familyasındaki kuşlar ve yırtıcı kuşların dışkıları incelendiğinde *Fusarium culmorum*, *Fusarium dimerum*, *Fusarium solani* ve *Fusarium tabacinum* tespit edilmiştir (Simi ve ark. 2018). *Fusarium* cinsi tarafından üretilen (*fumonisin*, *moniliformin*) toksinler hayvan ve insan sağlığı açısından olumsuz etkilere sahiptir. Yapılan çalışmalarda bu toksinlerin kas zayıflığı, solunum güçlüğü ve kalp kası dejenerasyonu gibi etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Altomare ve ark. 2021).

Bu çalışmada, Sultan papağanına (*Nymphicus hollandicus* Kerr, 1972) ait dışkı örneğinde *Mucor racemosus* HBF 579 ve *Fusarium fujikuroi* HBF 578 iki farklı fungal tür moleküler olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmadan önce yapılan ön çalışmada *Mucor racemosus*, morfolojik ve mikroskopik özellikleri incelenerek *Mucor piriformis* olarak tespit edilmesine karşın moleküler analiz sonuçları morfolojik veriler ile incelendiğinde *Mucor racemosus* olarak tanımlanmıştır. Morfolojik veriler moleküler veriler ile birleştirilerek tür tanımlamasında en doğru sonuç elde edilmiştir. Her iki türün de hayvana yemden bulaştığı ve sistemik bir enfeksiyona sebep olduğu düşünülmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde ülkemizde ve Dünya'da Sultan papağanı kaynaklı *Fusarium fujikuroi* kaydına ulaşılamamıştır (Asan 2011). Bu çalışma Sultan papağanı kaynaklı ilk *Fusarium fujikuroi* raporudur.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu araştırmanın ön çalışmaları 5. International Food, Agriculture and Veterinary Sciences Congress (17-19 March 2023-Kafkas University, Kars, Türkiye) isimli kongrede kongre kitabına tam metin olarak basılmıştır. Metin içinde bu ön çalışmaya atıf yapılmıştır.

## YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: BB  
Denetleme/Danışmanlık: BB, HHB  
Veri Toplama ve/veya İşleme: BB  
Analiz ve/veya Yorum: SÖK  
Makalenin Yazımı: SÖK  
Eleştirel İnceleme: BB, HHB

## KAYNAKLAR

- Abbas MS, Yassein SN, Khalaf JM (2017). Isolation and identification of some important mycological isolates from dropping of birds in Baghdad. *J Entomol Zool Stud*, 5 (53), 671-673.
- Altomare C, Logrieco AF, Gallo A (2021). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi: risk and management. A challenge for future global food safety and security. *Encyclopedia of Mycology*, 1, 64-93.
- Asan A (2011). Checklist of *Fusarium* species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 116 (1), 479.
- Boynukara B, Gülhan T, Kurç MA (2019). Komplike mantar enfeksiyonu: muhabbet kuşu. *Doğanın Sesi Dergisi*, 2 (4), 24-32.
- Boynukara B, Gülhan T, Öztürk Köse S, Albayrak AK (2023). Sultan papağanından *Mucor piriformis*, *Rhizopus stolonifer* ve *Fusarium sp.* izolasyonu. 5th International Food, Agriculture and Veterinary Sciences Congress, Kars, Turkey.
- Brilhante RSN, Castelo-Branco DDSCM, Soares GDP et al. (2010). Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. *J Med Microbiol*, 59 (6), 718-723.
- Ciftci A, Büyük HH, Arslan S et al. (2024). Morphological and molecular characterization of mucormycosis and other fungal agents in cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 30 (2), 243.
- Dynowska M, Kisicka I (2005). Participation of birds in the circulation of pathogenic fungi descend from water environments: a case study of two species of Charadriiformes birds. *Int J Ecohydrol Hydrobiol*, 2 (05), 173-178.
- Galosi L, Danesi P, Falcaro C et al. (2018). Systemic mucormycosis in two lovebirds (*Agapornis fischeri* and *Agapornis roseicollis*). 72nd SISVet Congress, Torino, Italy, 370.
- Galosi L, Falcaro C, Danesi P et al. (2022). Atypical mycosis in psittacine birds: A retrospective study. *Front Vet Sci*, 9, 883276.
- Gómez-De-Anda F R, Flores-Jiménez NG, De-la-Rosa-Arana JL et al. (2023). Isolation and identification of filamentous fungi and yeasts with zoonotic potential obtained from cattle egret (*Bubulcus ibis*) droppings. *Vet Res Forum*, 14 (10), 525.
- Kabak B, Var İ (2014). *Fusarium* toksinleri. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 8, 30-42.
- Köptcke FBN, de Assunção Pinto L, Moraes TT et al. (2021). Determinação da microbiota e micotoxinas em rações comerciais destinadas para calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) no Rio de Janeiro, Brasil. *BJAER*, 4 (3), 4385-4394.
- Lozano J, Louro M, Almeida C et al. (2023). Isolation of saprophytic filamentous fungi from avian fecal samples and assessment of its predatory activity on coccidian oocysts. *Sci Rep*, 13 (1), 8965.
- Mirhosseini Z, Khosravi A (2023). Fungal pathogens: emerging threats to birds and human health, assessment the relative frequency of pathogenic fungi in ornamental bird feces. *JPSAD*, 1 (4), 20-24.
- Otayoor RA, Dieware GK, Akpan UM, Oku IY (2024). Fungal culture and bioinformatics analysis of selected eggs of domestic birds in Bayelsa state, Nigeria. *IJBMR*, 12 (1), 20-28.
- Schmitz A, Korbel R, Rinder M (2018). Zygomycosis due to *Mucor racemosus* associated with a circovirus infection in a blue tit (*Cyanistes caeruleus*). *J Comp Pathol*, 165, 67-71.
- Shivachandra SB, Sah RL, Singh SD et al. (2004). Comparative pathological changes in aflatoxin fed broilers infected with hydropericardium syndrome. *Indian J Anim Sci*, 74 (6).
- Simi WB, Leite-Jr DP, Paula CR et al. (2018). Yeasts and filamentous fungi in psittacidae and birds of prey droppings in midwest region of Brazil: a potential hazard to human health. *Braz J Biol*, 79, 414-422.