T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI MANTAR TÜRLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE BÜYÜKERTAŞ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÜLKÜYE DUDU GÜL
İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ ZEYNEP MİNE ŞENOL HASDEMİR

BİLECİK, 2021

10421243

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI MANTAR TÜRLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE BÜYÜKERTAŞ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ÜLKÜYE DUDU GÜL

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ ZEYNEP MİNE ŞENOL HASDEMİR

BİLECİK, 2021

10421243

BEYAN

"Farklı Mantar Türlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi" adlı yüksek lisans tez projesinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

<table>
<tr><td colspan="4">Bu çalışmanın,
Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.</td></tr>
<tr><td>DESTEK ALINMIŞTIR</td><td>X</td><td>DESTEK ALINMAMIŞTIR</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">Destek alındı ise;</td></tr>
<tr><td colspan="4">Destekleyen kurum;</td></tr>
<tr><td colspan="2">Desteğin Türü</td><td colspan="2">Proje Numarası</td></tr>
<tr><td colspan="2">1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)</td><td colspan="2" rowspan="3">2019-02.BŞEÜ.01-02</td></tr>
<tr><td colspan="2">2- TÜBİTAK</td></tr>
<tr><td colspan="2">Diğer;……</td></tr>
<tr><td colspan="4">ETİK KURUL onayı var ise;</td></tr>
<tr><td colspan="2">ETİK KURUL karar tarih/sayı:</td><td colspan="2">……/……..</td></tr>
</table>

Ayşe Büyükertaş

Tarih

……..

İmza

……..

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca her türlü bilgi ve desteğiyle yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ülküye Dudu GÜL'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmasındaki sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) çalışmalarındaki desteğinden dolayı Uzman Murat KOZANLI'ya teşekkür ederim. Sivas yöresindeki mantarları toplayıp gönderen Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Mine ŞENOL HASDEMİR'e teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmalarımı yürüttüğüm Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü'ne ve laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Şule Aybüke YAVUZ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli aileme ve eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2019-02.BŞEÜ.01-02 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ayşe Büyükertaş

2021

ÖZET

FARKLI MANTAR TÜRLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Son yıllarda biyoteknolojinin gelişmesi ile birlikte mantarlardan elde edilen ürünlerin kullanımına yönelik ilgi de artmıştır. Farklı mantar türlerinin özütlerinde bulunan metabolitler antimikrobiyal etki göstermekte olup, tedavi amaçlı kullanılabilirliğine yönelik çalışmalar hala sürdürülmektedir. Bunlara ilaveten, literatürde bitkilerde olduğu gibi mantarların da güçlü antioksidan etki gösterdikleri bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında çeşitli besinsel ya da tarımsal atıklardan izole edilen ve moleküler tanımlaması yapılan mantar türlerinden farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Tez çalışmaları esnasında oluşan mantar atıklarının biyosorpsiyon mekanizması ile tetrasiklin içeren atık su arıtımında kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Moleküler tanımlama çalışmalarında peynir atığı üzerinden izole edilen izolat 1, tarımsal atıktan izole edilen izolat 2 ve Sivas'tan toplanan izolat 3'ün sırasıyla *Penicillium chrysogenum, Fusarium oxysporum* ve *Suillus collinitus* türleri olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında Agar Disk Difüzyon yöntemi kullanılmış olup, bu çalışmalarda izole edilerek tanımlanan türler arasında en yüksek antimikrobiyal aktivitenin *P. chrysogenum* türü tarafından gerçekleştirildiği görülmüştür. *P.chrysogenum* türünün aseton özütüne en duyarlı test mikroorganizması türü ise *Candida albicans* olarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde DPPH giderimi test edilmiş ve *P. chrysogenum*'un etanol özütünde antioksidan aktivite görülmüştür. Mantar atıklarının tetrasiklin giderim aktivitelerini incelemek amacıyla biyosorpsiyon için ön denemeler yapılmış ancak atık mantarlardan elde edilen biyosorbentlerin tetrasiklin giderimi için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Atık mantar biyokütlesi ve tetrasiklin etkileşiminin aydınlatılması için FTIR ve SEM analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak biyolojik aktivite sonuçlarına göre en iyi antimikrobiyal aktiviteyi gösteren mantar türü olarak *P. chrysogenum* türü seçilmiş ve bu türün özütlerde bulunan maddelerin yapısı LC-MS/MS analitik yöntemi ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yapılan tez çalışması yerli izolat mantar türlerinin tanımlanarak kültür koleksiyonuna katılması ve bu çalışmanın bulguları yerli izolat mantar türü *P. chrysogenum*'un biyolojik aktivitesinin belirlenerek değerlendirilmesi açısından önemli sonuçlar içermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mantar, Antimikrobiyal Aktivite, Antioksidan Aktivite, LC-MS/MS.

ABSTRACT

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF DIFFERENT FUNGUS SPECIES

In recent years, with the development of biotechnology, interest in the use of products obtained from mushrooms has increased. Metabolites found in extracts of different mushroom species show antimicrobial effects, and studies on their therapeutic use are still ongoing. In addition to these, it has been reported in the literature that fungi show strong antioxidant effects as well as plants. In this thesis, antimicrobial and antioxidant activities of extracts obtained from fungal species isolated from various nutritional or agricultural wastes and molecularly defined using different solvents were investigated. The biosorption mechanism of fungal wastes formed during the thesis studies and the potential for use in wastewater treatment containing tetracycline were evaluated. In molecular identification studies, it was determined that isolate 1 isolated from cheese waste, isolate 2 isolated from agricultural waste and isolate 3 collected from Sivas are *Penicillium chrysogenum, Fusarium oxysporum* and *Suillus collinitus* species, respectively. Agar Disk Diffusion method was used in antimicrobial activity studies, and it was observed that the highest antimicrobial activity among the species isolated and identified in these studies was performed by *P. chrysogenum*. The test microorganism species most sensitive to acetone extract of *P.chrysogenum* was determined as *Candida albicans*. To determine the antioxidant activity, DPPH removal was tested and antioxidant activity was observed in the ethanol extract of *P. chrysogenum*. In order to examine the tetracycline removal activities of fungal wastes, preliminary experiments were made for biosorption, but it was determined that the biosorbents obtained from waste mushrooms were not suitable for tetracycline removal. FTIR and SEM analyzes were performed to elucidate the interaction of waste fungal biomass and tetracycline. As a result, *P. chrysogenum* was selected as the fungus species that showed the best antimicrobial activity according to the biological activity results, and the structure of the substances in the extracts of this species was tried to be clarified by LC-MS/MS analytical method. The thesis study has important results in terms of identifying local isolate fungal species and adding them to the culture collection, and determining and evaluating the biological activity of the native isolate fungal species *P. chrysogenum* according to the findings of this study.

Keywords: Fungus, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity, LC-MS/MS.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ i

ÖZET ii

ABSTRACT iii

İÇİNDEKİLER ii

TABLOLAR LİSTESİ vii

ŞEKİLLER LİSTESİ viii

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ x

1. GİRİŞ 1

2. LİTERATÜR ÖZETİ 3

2.1. Mantarların Özellikleri 3

2.2. Mantar Metabolitleri 4

2.3. Mantarların Kullanım Alanları 5

2.3.1. Endüstri Alanında Mantarların Kullanılması 5

2.3.2. Gıda Alanında Mantarların Kullanılması 7

2.3.3. Tıp Alanında Mantarların Kullanılması 8

2.3.4. Mantarların Kullanıldığı Diğer Alanlar 10

2.4. Mantarların Antimikrobiyal Özellikleri 10

2.5. Mantarların Antioksidan Özellikleri 12

2.6. Mantarların Biyosorbent Özellikleri 13

2.6.1. Mantarların FT-IR Spektroskopisi ile Analizi 17

2.6.2. Mantarların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi 20

2.7. Mantarların Tanımlanması 21

2.7.1. Mantarların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması 21

2.8. LC-MS/MS ile Fungal Metabolit Tayini 23

3. MATERYAL VE METOT 25

3.1. Materyal 25

3.1.1. Mantarlar 25

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar 26

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri 26

3.1.4. Kullanılan Test Antibiyotikleri 26

3.1.5. Kullanılan Test Mikroorganizmaları……...26

3.1.6. Kullanılan Biyogüvenlik Kabini……...27

3.1.7. Kullanılan Aletler……..27

3.2. Metot 28

3.2.1. Makromantarın Öğütülmesi ve Mikromantarların İzolasyonu 28

3.2.2. Mantarların Moleküler Tür Tanımlaması……...29

3.2.3. Mantarlardan Özüt Elde Edilmesi 30

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Deneyi 30

3.2.5. Antioksidan Aktivite Deneyi 31

3.2.6. Tetrasiklin Giderimi Deneyleri 32

3.2.6.1. Tetrasiklin Analiz Yöntemi……32

3.2.6.2. Biyosorbentlerin Hazırlanması……..33

3.2.6.3. Biyosorbent Karakterizasyonu……..33

3.2.6.3.1. SEM Analizi……..……33

3.2.6.3.2. FT-IR Analizi……..…..33

3.3. Mantar İzolatlarından Elde Edilen Özütlerin Analitik Kimyasal Yöntemlerle İncelenmesi…….. ……34

4. BULGULAR 35

4.1. Mantarların Moleküler Tür Tanımlaması 35

4.2. Mantarlardan Özüt Elde Edilmesi 35

4.3. Mantarların Antimikrobiyal Aktivitesi 35

4.4. Mantarların Antioksidan Aktivitesi 43

4.5. Tetrasiklin Giderimi Deneyleri 43

4.6. SEM Analizi 47

4.7. FT-IR Analizi 49

4.8. LC-MS/MS Çalışmaları 51

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 54

KAYNAKÇA 61

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Mantarlardan Elde Edilen Bazı Endüstriyel Ürünler……**6**

Tablo 2.2. Farmasötik Bileşiklerin Uzaklaştırılması İçin Mantarlarla Yapılan Biyosorpsiyon Çalışmaları……**16**

Tablo 2.3. Mantar Hücrelerinin FT-IR Spektrumlarında Genel Olarak Görülen Absorpsiyon Bantları……..**19**

Tablo 3.1. Test Mikroorganizmaları ve Özellikleri……...**27**

Tablo 3.2. PCR'da Kullanılan Primerler…….……..**30**

Tablo 4.1. İzolatların Kaynağı ve Tür Adı……...…..**35**

Tablo 4.2. *Penicillium chrysogenum* Etanol Özütüne Ait İnhibisyon Zonları……...**40**

Tablo 4.3. *Penicillium chrysogenum* Metanol Özütüne Ait İnhibisyon Zonları……..…….**40**

Tablo 4.4. *Penicillium chrysogenum* Aseton Özütüne Ait İnhibisyon Zonları……...…..**41**

Tablo 4.5. *Penicillium chrysogenum* Kloroform Özütüne Ait İnhibisyon Zonları……...……**41**

Tablo 4.6. *Penicillium chrysogenum* Aseton Özütünün MİK Değerleri (µg/ml)……..…….**42**

Tablo 4.7. Mantar Özütlerinin Yüzde DPPH İnhibisyonu……**43**

Tablo 4.8. Farklı Çözücüler Kullanılarak Hazırlanan Özütlerin Biyosorbent Olarak Kullanıldığı Tetrasiklin Çözeltilerinin Başlangıç (A_0) ve 24 Saat Sonundaki (A_s) Absorbans Değerleri…...**44**

Tablo 4.9. Tetrasiklin Muamelesi Öncesi ve Sonrasındaki FT-IR Analizindeki Değişiklikler……..**50**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mantar Büyüme Eğrisi……**5**

Şekil 2.2. Biyosorpsiyon Mekanizmaları……..**14**

Şekil 3.1. Sivas, Merkez (Koordinat: 39° 75' 05" K ve 37° 01' 50" D) Toplanan Makromantar Türü……...**25**

Şekil 3.2. Peynir Atığı Üzerinde Gelişmiş Mantar Türü Miselyumu.....**25**

Şekil 3.3. Bilecik, Pazaryeri (Koordinat: 39° 58´ 12.2664" K ve 29° 57´ 18.9468".D) Fasülye Tarlası Çevresinden Toplanan Boncuk Fasülye Türlerinin Yetiştirildiği Tarla Çevresinden Toplanan Fasülye Atıkları Üzerinde Gelişmiş Mantar Miselyumu……**26**

Şekil 3.4. Peynir Atığı Üzerinden İzole Edilmiş ve Patates Dekstor Agar (PDA)'da Gelişmiş İzolat 1'e Ait Görüntü……...….**28**

Şekil 3.5. Bilecik, Pazaryeri (Koordinat: 39° 58´ 12.2664" K ve 29° 57´ 18.9468".D) Fasülye Tarlası Çevresinden Toplanan Boncuk Fasülye Türlerinin Yetiştirildiği Tarla Çevresinden Toplanan Fasülye Atıklarından İzole Edilmiş ve Patates Dekstor Agar (PDA)'da Gelişmiş İzolat 2'ye Ait Görüntü……...…….**29**

Şekil 3.6. Tetrasiklin Kalibrasyon Grafiği…….……**32**

Şekil 4.1. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Esherichia coli* ATCC 35200 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri……...…….**36**

Şekil 4.2. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri……..**37**

Şekil 4.3. Farklı çözücüler kullanılarak *Suillus collinitus* türünden elde edilen özütün *Candida albicans* ATCC 24433 test mikroorganizması kullanılarak yapılan antimikrobiyal aktivite deneyi sonucunda elde edilen petri görüntüleri…….**38**

Şekil 4.4. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Enterococcus faecalis* ATCC 29042 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri……..**39**

Şekil 4.5. MİK Deneyi Sonucunda Mikroplakanın Görüntüsü……..…**42**

Şekil 4.6. *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* Mantar Türlerinin Kurutulmuş Biyosorbentleri Kullanılarak 25 mg/L Tetrasiklin Gideriminin Zamana Bağlı Adsorbans Değerleri……**45**

Şekil 4.7. *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* Mantar Türlerinin Kurutulmuş ve HTAB ile Modifiye Edilmiş Biyosorbentleri Kullanılarak 25 mg/L Tetrasiklin Gideriminin Zamana Bağlı Adsorbans Değerleri……..**46**

Şekil 4.8. Çalışmada İzole Edilen *P. chrysogenum* Mantar Türüne Ait SEM Görüntüsü…....**47**

Şekil 4.9. *P. chrysogenum* Mantar Türüne Ait Biyosorbentin SEM Görüntüleri……..…..**48**

Şekil 4.10. *P. chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbentinin FTIR Analizi……...……..**49**

Şekil 4.11. Tetrasiklin Giderimi Sonrasında *P. chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbentin FT-IR Analizi……...…..**50**

Şekil 4.12. Aseton Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)…….……**51**

Şekil 4.13. Aseton Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)……...…..**51**

Şekil 4.14. Etanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)…….…**52**

Şekil 4.15. Etanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)……..**52**

Şekil 4.16. Metanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)…….…..**52**

Şekil 4.17. Metanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)……...…**53**

Şekil 4.18. Kloroform Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)……...…**53**

Şekil 4.19. Kloroform Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)……**53**

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

%: Yüzde

ATCC: American Type Culture Collection

BHT: Bütil Hidroksi Toluen

℃: Santigrat derece

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DPPH:1,1-difenil-2-pikril hidrazil

ESI: Elektrosprey İyonizasyon

FT-IR: Fouirer Transform Infrared (Fouirer Dönüşümlü Kızılötesi)

g: Gram

HTAB: Hegzadesiltrimetil amonyum bromür

ITS: Internal Transcribed Spacer

L: Litre

LC-MS: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometrisi

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolar

MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrisi

nm: Nanometre

OTC: Oksitetrasiklin

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

ppm: parts per million

rDNA: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit

rpm: Revolutions per minute

rRNA: Ribozomal Ribonükleik Asit

SEM: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)

TC: Tetrasiklin

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

1. GİRİŞ

Günümüzde ökaryot canlılar grubunda yer alan, ürettikleri farklı özellikteki enzimlerle çevrelerindeki besinleri parçalayıp absorpsiyon yoluyla beslenen heterotrof canlılar olan mantarlara yönelik çalışmalar ilgi görmektedir. Mantar türleri beslenme özellikleri açısından değerlendirildiğinde farklı isimlerle anılmaktadırlar. Örneğin; bazı mantar türleri besinlerini canlı bir konakçıdan (bitki veya hayvan) alırlar ve bunlara biyotroflar adı verilir; diğer mantar türleri ise besinlerini ölü bitkilerden veya hayvanlardan alır ve saprotroflar (saprofitler, saproblar) olarak adlandırılır. Bazı mantar türleri ise yaşayan bir konağa bulaşır, ancak besinlerini elde etmek için konakçı hücreleri öldürürler; bunlara da nekrotrof denilmektedir (Carris vd., 2012: 1). Mikro (küfler ve mayalar) ile makro (şapkalı mantarlar) mantarlar arasında değişik boyutlarda olan mantarlar sporla ya da tomurcuklanarak çoğalmaktadır (Mukherjee vd., 2018: 92, Carris vd., 2012: 11).

En eski mantar fosilleri, 460 ila 455 milyon öncesine dayanmaktadır (Carris vd., 2012: 2). Uzun bir geçmişe sahip olan mantarlar hava, su ve toprak gibi her türlü ortamda bulunabildiklerinden çok yaygındırlar. Dünyadaki mantar türü sayısının 1,5 milyon ya da 3,5-5,1 milyon arası olabileceği yönünde çeşitli tahminler vardır (Chambergo ve Valencia, 2016: 2567). Bazı mikologlar ise 2,2 milyon ile 3,8 milyon arasında toplam tür olabileceğini tahmin etmektedir ve yaklaşık 144.000 mantar türü tanımlanmıştır (Moore ve Ahmadjian, 2019: 5). Tanımlanan türlerin sayısı toplam türlerin yüzde onundan azdır ve terapötik önemi değerlendirilen türler ise daha az sayıdadır (Smith vd., 2015: 389). Tahminen 3,8 milyona varan tür sayısının yanında az bir kısmın tanımlanmış olması nedeniyle mantarların oldukça az çalışılmış bir grup olduğu belirtilmektedir (Banos vd., 2018: 1).

Uzun yıllar boyunca çeşitli toplumlar tarafından fonksiyonel gıdalar olarak kabul edilmiş olan mantarlar, günümüzde de çeşitli ilaçların ve nutrasötiklerin gelişimi için önemli bir kaynak olarak görülmektedir (Smith vd., 2015: 389). Mantarların biyosentezlediği doğal ürünlerin biyoteknolojik uygulamalarla ilgili olması araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir (Banos vd., 2018: 1). Yapılan tıbbi ve farmakolojik çalışmalarda özellikle Ascomycete ve Basidiomycete şubelerinin biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin bir kaynak olduğu görülmüştür (Smith vd., 2015: 389). Mantarların antioksidan bileşenler, peptit ya da polisakkarit yapıda çeşitli antikanser moleküller, nöroaktif bileşikler, serbest amino asitler, doymamış yağ asitleri vb. biyoaktif bileşikler içermeleri, onları cazip hale getirmektedir (Hyde vd., 2019: 61). Araştırmalar mantarların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesine odaklanmaya devam etmektedir (Gebreyohannes vd., 2019: 1). Geniş bir biyolojik çeşitliliğe sahip olan mantarlar, bu alandaki çalışmalara eşsiz bir kaynak sunmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, çeşitli kaynaklardan izole edilen mantar türlerinin moleküler tanımlamasının yapılması ve bu türlerden farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesidir. Ayrıca özüt eldesi neticesinde oluşan mantar atıklarının sulu ortamlardan tetrasiklin gideriminde biyosorbent olarak kullanım potansiyelinin de araştırılması ve biyolojik aktivitesi yüksek bulunan mantar türünün özütlerindeki maddelerin kimyasal yapısının analitik yöntemlerle aydınlatılması da bu tez çalışmasının amaçları arasında yer almaktadır. Literatürde mantarların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesine yönelik bir çok çalışma olmasına karşın Bilecik ilinde izole edilen yerli izolatların biyolojik aktivitesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca biyolojik aktivitede rol alan maddelerin belirlenmesine yönelik çalışmaya da rastlanmamıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mantarların Özellikleri

Tipik bir filamentli mantar, sert bir hücre duvarı ile çevrelenmiş dallı ve ipliksi bir yapıdan oluşur. Hif adı verilen dallı, mikroskobik tübüler hücreler, miselyum denilen filamentli bir thallus (gövde) oluşturur (Carris vd., 2012: 1). Hif yapısı, septa adı verilen çapraz duvarlara sahip olabilir (septalı; septat) ya da olmayabilir (septasız; aseptat; koenositik). Hif tipi (septat veya aseptat), belirli mantar gruplarının karakteristiğidir. Mantar hücre duvarı, kitin ve glukanlardan (Ascomycota, Basidiomycota ve Chytridiomycota'da), ayrıca kitosan ve diğer bileşenlerden (Zygomycota'da) oluşur. Miselyum, çevreden gelen besinleri kullanarak büyür ve belirli bir olgunluk aşamasına ulaştığında, spor adı verilen üreme hücrelerini oluşturur. Mantarların çoğu sporla çoğalırken bazı mantarlar, özellikle mayalar, miselyum oluşturmazlar, ancak tomurcuklanma veya bölünme yoluyla çoğalırlar. Ayrıca, çevresel koşullara bağlı olarak misel büyümesi ile maya benzeri büyüme arasında geçiş yapabilen mantarlar da vardır. Farklı biçimlerde büyüme yeteneği dimorfizm olarak adlandırılır ve Ascomycota, Basidiomycota ve Zygomycota'nın bazı üyelerinde görülür (Carris vd., 2012: 9).

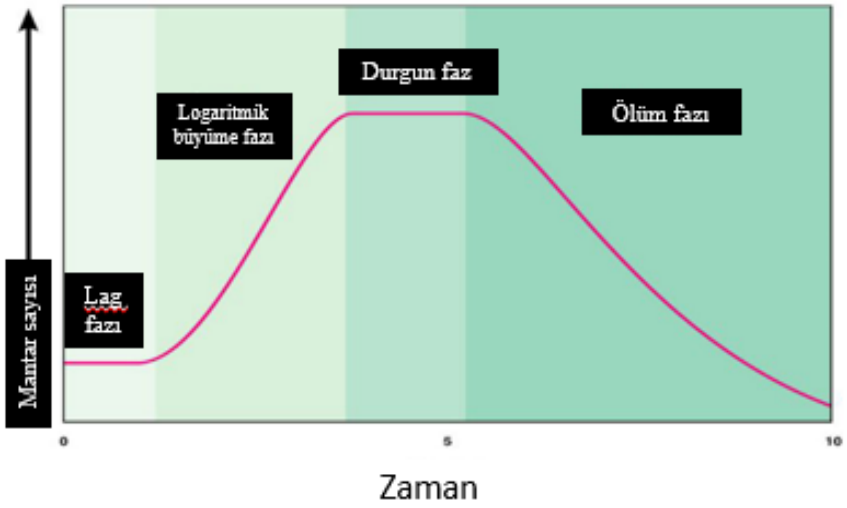
Çok fazla sayıda olan mantarlar her yerde (toprakta, havada, göllerde, nehirlerde ve denizlerde, bitki ve hayvanların üstünde ve içinde, yiyecek ve giysilerde, insan vücudunda) bulunabilirler (Singh vd., 2014: 1). Tatlı su türleri genellikle temiz ve soğuk suda bulunur çünkü yüksek tuzluluğa tolerans gösteremezler. Bununla birlikte, bazı türler hafif acı sularda bulunur ve birkaçı çok kirli akarsularda gelişir (Moore ve Ahmadjian, 2019: 2). Mikroorganizmaların büyümesi için zengin bir habitat olan toprak, çok sayıda mantar türü için ideal bir yaşam alanı sağlar (Ismael ve Ramadan, 2011: 1). Daha kuru alanlarda veya çok az organik madde içeren veya hiç içermeyen habitatlarda yalnızca az sayıda tür bulunur. Mantarlar, büyümeleri için yeterli nemin olduğu dünyanın tüm ılıman ve tropikal bölgelerinde bulunur. Kuzey Kutbu ve Antarktika bölgelerinde birkaç tür mantar yaşar, ancak bunlar nadirdir ve daha çok liken şeklinde alglerle simbiyoz yaşarlar (Moore ve Ahmadjian, 2019: 2). Genel olarak liken, mantar (mikobiyont) ve fotosentetik ortak (fotobiyont) arasında kurulan simbiyotik ilişkiye dayalı organizma olarak tanımlanmaktadır. Likenleri oluşturan mantarların şimdiye kadar bilinen tüm mantar türlerinin yaklaşık beşte birini oluşturduğu ifade edilmektedir (Goga vd., 2018: 1).

Bitkilerin gövde ve yapraklarının iç dokularını kolonize edecek şekilde bitkilerle simbiyotik bir ilişki içinde yaşayan mantarlar ise endofit mantarlar olarak tanımlanır (Patil vd., 2016: 189). Pezizomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes ve Sordariomycetes gibi sınıflara ait mantarlar ile Basidiomycota ve Zygomycota üyeleri bitkilerde yaygın olarak görülen fungal endofitlerdendir (Beram vd., 2016:162).

Mikoloji kitaplarının çoğunda mantarların Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota ve Zygomycota olmak üzere dört ana grup (filum) altında incelendiği görülmektedir. Mantarları incelemek için yeni yöntemler kullanıldıkça, yeni çalışmalar yapıldıkça sınıflandırma sistemi ek değişikliklere uğramaktadır (Carris vd., 2012: 1).

2.2. Mantar Metabolitleri

Mantarlar, çevrelerindeki besinlerden faydalanmak için farklı tipte enzimler üretmelerinin yanı sıra çeşitli işlevleri olan birçok metabolit ürettiği de bilinen önemli bir ökaryotik mikroorganizma grubudur (Mukherjee vd., 2018: 92; Patil vd., 2016: 189). Mantarların yaşam döngüsü içinde primer ve sekonder metabolizma adı verilen iki evrede çeşitli metabolitler üretilir. Protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipit gibi büyüme için gerekli olan primer metabolitler büyüme ortamından elde edilemezlerse bu metabolitlerin öncüllerinin sentezlenmesi gerekir. Genel olarak primer metabolitler organizmanın gelişme fazının başlangıcında oluşurlar ve bu fazın sonlarına doğru maksimum ürün meydana gelir. Enzimler, yağlar, alkoller ve organik asitler en çok üretilen primer metabolitlerdir (Bocks, 1967: 777). Sekonder metabolitler ise üreme evresinin sonunda organizma durgun faza girdiğinde üretilirler (Silah, 2014: 149). Sekonder metabolitler, normal büyüme, gelişme veya üreme için gerekli olmayan, fakat üretici organizmaya rekabet avantajı sağlayan biyolojik olarak aktif organik bileşiklerdir (Al-Fakih ve Almaqtri, 2019: 191). Farklılaşma ve sporlanma ile ilişkili olan bu metabolitlerin bazıları çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler (Herrera vd., 2002: 448). Sekonder metabolitler ilaç, tatlandırıcı, pigment vb olarak kullanılabilmektedir (Al-Fakih ve Almaqtri, 2019: 191). Tıbbi bileşikler olan antibiyotikler, statinler, siklosporinler ve ergot alkoloidleri sekonder metabolitlerin önemli örneklerindendir (Bills ve Gloer, 2017: 1090).



Şekil 2.1. Mantar Büyüme Eğrisi
Kaynak: (Bocks, 1967: 777)

2.3. Mantarların Kullanım Alanları

Mantarlar, insanlığın kullandığı en eski organizmalarından biridir ve çok uzun yıllardır hem filamentli mantarlar hem de mayalar bazı endüstriyel (örneğin alkol), besleyici (örneğin ekmek ve peynir) ve tıbbi olarak yararlı (örneğin penisilin) ürünlerin üretiminde kullanılmışlardır (Adrio ve Demain, 2003: 191; Al-Fakih ve Almaqtri, 2019: 191). Mantarlardan elde edilen ürünlerin kullanımı tıbbi, biyoteknolojik ve çevresel uygulamaları nedeniyle giderek artmaktadır (Córdoba M ve Ríos H, 2012: 71). Gıdadan tıbba, endüstriye kadar çeşitli alanlarda mantarlardan ve onların ürünlerinden yararlanılmaktadır.

2.3.1. Endüstri Alanında Mantarların Kullanılması

Filamentli mantarlar uzun süredir enzimler, antibiyotikler, kozmetikler, yem ürünleri gibi ticari ürünlerin endüstriyel üretimi için kullanılmaktadır (Gmoser vd., 2017: 1). Ayrıca vitaminlerin, lipidlerin, polihidrik alkollerin, polisakkaritlerin ve glikolipidlerin endüstriyel üretim proseslerinde de mantarlar kullanılmaktadır (Adrio ve Demain, 2003: 191). Mantarlardan gıda, ilaç, tekstil, deterjan, biyo-yakıt, kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde de yararlanılmaktadır (Meyer vd., 2016: 1).

Mantarlar endüstriyel ölçekte büyük biyoreaktörlerde yetiştirilebilmeleri, fermentasyon işlemlerinin uygun maliyetli olması gibi avantajları nedeniyle antibiyotikler, enzimler, organik asitler gibi maddelerin üretiminde uzun yıllardır kullanılmışlardır (Hyde vd., 2019: 3). Örneğin sitrik asit üretiminin filamentli bir mantar olan *Aspergillus niger* kullanılarak yapılması mikrobiyal fermantasyonla yapılan organik asitlerin üretimlerine göre daha fazla ürün alınmasını sağlamaktadır (Meyer vd., 2016: 1). Mantarlardan elde edilen endüstriyel ürünlerden bazıları ve sentezlenen türler Tablo 2.1'de gösterilmektedir (Mukherjee vd., 2018: 94, Silah, 2014: 148).

Tablo 2.1. Mantarlardan Elde Edilen Bazı Endüstriyel Ürünler

Endüstriyel ürün	**Üretimde Kullanılan Mantar Türü**	**Uygulama alanı**
Penisilin	*Penicillium chrysogenum*	İnsan/hayvan sağlığı
Sefalosporin	*Cephalosporium acremonium*	İnsan/hayvan sağlığı
Siklosporin	*Tolypocladium inflatum*	İnsan sağlığı
Lovastatin	*Monascus ruber*	İnsan sağlığı
İnsülin	*Saccharomyces cerevisiae*	Diabet tedavisi
Riboflovin	*Candida*	Sağlık endüstrisi
a-Amilaz	*Aspergillus niger*	Nişasta işleme
Selülaz	*Humicola insolens*	Hayvan yemi endüstrisi
Alkol	*Saccharomyces*	Yakıt ve içecek
Sitrik asit	*Aspergillus niger*	Alkolsüz içki endüstrisi
İtakonik asit	*A. terreus, Candida/Rhodoturula*	Kimya endüstrisi

Kaynak: (Mukherjee vd., 2018: 94, Silah, 2014: 148)

Bazı sentetik boyaların sağlığa zararlı etkilerinin olabilmesi nedeniyle doğal pigmentlere yönelik talep her geçen gün artmaktadır (Narsing Rao vd., 2017: 1). Doğal pigmentlerin alternatif bir kaynağı olan mantar pigmentlerinin ucuz kültür ortamında elde edilebilmesi, hızlı büyümeleri, hava koşullarından etkilenmemeleri, genellikle hücre dışı metabolitler olmaları, kolay özütlenmeleri ve büyük miktarlarda salgılanmaları endüstriyel düzeyde kullanılmalarına olanak sağlamış ve mantarları bitkilerden sonra en değerli doğal pigment kaynağı haline getirmiştir (Narsing Rao vd., 2017: 1; Sajid, 2018: 1). Miktarları türden türe değişmekle beraber hemen hemen tüm mantarlar pigment üretmektedir. Yararlı pigmentler üreten en önemli gruplara örnek olarak Basidiyomisetler, Zigomisetler, endofitik mantarlar, lifli mantarlar, mayalar, deniz mantarları ve halofiller verilebilir (Sajid, 2018: 1). Karotenoidler, fenazinler, flavinler, kinonlar, moasinler, ankaflavinler, cantaksantin, indigo, violacein, prodigiosin ve melanin mantarların en çok ürettiği pigmentlere örnektir (Dufossé vd., 2014: 56).

Birçok mantar pigmenti renklendirme özelliğinin yanında antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteler gibi farklı biyolojik özelliklere de sahiptir (Narsing Rao vd., 2017: 1). Örneğin *Monascus* pigmentleri, *Ashbya gossypii*'den elde edilen riboflavin, *Blakeslea trispora*'dan elde edilen likopen ve β-karoten, *Penicillium oxalicum*'dan arpink red gıda renklendiricileri olarak pazara girerken (Dufossé vd., 2014: 56), *Monascus, Fusarium, Talaromyces, Trichoderma, Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinin pigmentlerinin antimikrobiyal aktivitelerini gösteren çalışmalar biyoaktif pigmentlerin gıda ve ilaç endüstrilerinde antibakteriyel bileşenler olarak kullanılabileceğini önermektedir (Lagashetti vd., 2019: 23). *Penicillium, Monascus, Chaetomium* ve *Talaromyces* tarafından üretilen sarı, turuncu ve kırmızı gibi çeşitli renklerdeki azafilon pigmentleri antioksidan ve anti-mikrobiyal özelliklere sahiptir (Venil vd., 2020: 8). *F. oxysporum, T. verruculosus* ve *Chaetomium* türlerinin pigmentlerinin sitotoksik aktiviteleri, *Monascus purpureus, Monascus pilosus, A. nidulans, Shiraia bambusicola, Alternaria* türlerinin pigmentlerinin antikanser aktiviteleri de mantar pigmentlerinin farklı aktivitelerine örnek verilebilir (Lagashetti vd., 2019: 23).

2.3.2. Gıda Alanında Mantarların Kullanılması

Mantarlar lezzetleri, ekonomik ve ekolojik değerleri ve tıbbi özellikleri nedeniyle uzun yıllardır yenmiş ve beğenilmiştir. Genel olarak % 90 su ve % 10 kuru maddeden oluşan mantarlar içerdikleri esansiyel aminoasitler, doymamış yağ asitleri, protein, karbonhidrat, diyet lifi, mineraller ve vitaminler nedeniyle beslenme açısından önemli kimyasal bileşime sahiptirler (Sánchez, 2017: 14).

Makromantarlar hızla artan dünya nüfusu için önemli bir besin kaynağı oluşturmuş ve Amerika, Avrupa ve Uzak Doğu ülkelerinde kültür mantarcılığı bir endüstri dalı haline gelmiştir (Bekçi vd., 2011: 187). Doğrudan tüketimlerinin yanı sıra pulp, ezme, un, toz veya ekstrakt formları halinde çeşitli amaçlarla (ürünün besin öğeleri açısından zenginleştirilmesi, yağ ve enerji (kalori) içeriğinin azaltılması, ürünün bozulmasının önlenmesi, tat ve aroma yönünden zenginleştirilmesi vs.) farklı et, tahıl, sebze, meyve, süt ürünleri, özel gıda, geleneksel gıda ve içecek ürünlerinde kullanılabilmektedirler (Bulam ve Peksen, 2019: 137). Aroma, tat ve kokularından dolayı kültüre alınmış mantarlardan daha çok tercih edilen doğal mantarlar birçok ülkede çorba, salata şeklinde ya da çeşitli yöresel yemeklerin içine karıştırılarak tüketilmektedir (Bozok vd., 2018: 487).

"Ölümsüzlük mantarı", "Reishi" gibi isimlendirmeleri de olan tıbbi bir mantar türü *Ganoderma lucidum* geleneksel Çin tıbbında sağlıklı ve uzun yaşam için uzun yıllar kullanılmıştır (Lu vd., 2004: 9). Hepatit, hipertansiyon, kalp-damar hastalıkları, AIDS, diyabet, kanser ve tümör gibi çeşitli hastalıkları engellemek için uzun zamandır kullanıldığı bilindiğinden her derde deva olarak nitelendirilmektedir (Bozok vd., 2016: 164).

Bozok ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada Adana ili Çukurova Üniversitesi kampüsünden toplanan ve ülkemizin bazı yerlerinde yerel halk tarafından besin olarak da tüketilmekte olan *S. collinitus*'un makromantarlara özgü aroma bileşenleri bakımından zengin olduğu görülmüştür (Bozok vd., 2018: 487)**.**

2.3.3. Tıp Alanında Mantarların Kullanılması

Asya ülkerinde geleneksel olarak tıbbi amaçlı kullanılan makromantarlara olan ilginin Kuzey yarımkürede de artmasıyla son yirmi yılda dünya genelinde tıbbi amaçlı kullanılan makromantarların pazar değeri artmıştır (Kalyoncu vd., 2010: 1).

Tıbbi mantarlar antikanser, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuar, antinörodejeneratif, antidiyabetik, hepatoprotektif, antianjiyojenik ve hipoglisemik etkiler gibi biyoaktiviteleri nedeniyle uzun süredir kullanılmaktadır (Elsayed vd., 2014: 2; Matuszewska vd., 2018: 1). Mantarlardan izole edilerek tanımlanan bazı bileşiklerin ve/veya mantarlardan elde edilen özütlerin antimikrobiyal, antienflamatuar, antioksidan, antiviral, antifibrotik, antidiyabetik, antikanser, antianjiyogenik, anti nörodejeneratif, immünomodülatör ve karaciğer koruyucu gibi çeşitli tıbbi özelliklerinin olduğu bildirilmiştir (Altuner ve Akata, 2010: 46; Elkhateeb vd, 2019: 88).

Tıbbi uygulamalar için kullanılan bazı mantarlara *Grifola fron dosa, Lentinus edodes, Flammulina velutipes, Pleurotus ostreatus, Tremella mesenterica, Hericium erinaceus*, *Ganoderma lucidum, Schizofyllum commune* ve *Trametes versicolor* örnek verilebilir (Matuszewska vd., 2018: 2).

Mantarlar kanser, hiperkolesterolemi ve hipertansiyon gibi hastalıkların önlenmesi amacıyla da kullanılabilir (Altuner ve Akata, 2010: 46). *Penicillium citrinum, Penicillium purpurogenum, Aspergillus terreus* ve *Monascus spp.* gibi çeşitli mantar türlerinden kolestrol düşürücü lovastatin elde edilmektedir (Mulder vd., 2015: 652). *Taxus brevifolia* (porsuk ağacı) kabuğundan elde edilen antikanser bir ilaç olan taksol yüksek piyasa değerine sahip bir ilaçtır (Bungtongdee vd., 2019: 57; Nwakanma vd., 2016: 2). 1993'te Stierle ve arkadaşlarının *Taxomyces andreanae* mantarının taksol üretebildiğini gösteren ilk çalışmalarından sonra taksol ve taksan için kaynak olabilecek potansiyel mantar türleri araştırılmaya başlanmıştır (Chambergo ve Valencia, 2016: 2570).

İlk olarak Dreyfuss ve arkadaşları tarafından hafif aktif bir antifungal antibiyotik olarak keşfedilen siklosporin A, *Tolypocladium inflatum*'un fermentasyonundan türetilen ribozomal olmayan biyosentezlenmiş bir peptittir ve immünomodülatör aktiviteye sahiptir (Hyde vd., 2019: 19).

Scytalidium ve *Phoma* mantarlarının ürettikleri halovirs, equisetin ve phomasetin bileşikleri herpes simpleks ve HIV virüslerine karşı etkilidir (Chambergo ve Valencia, 2016: 2570).

Aspergillus nidulans'ın ikincil metabolitlerinin, nörodejeneratif hastalıklarda (Alzheimer hastalığı dahil) önemli bir protein olan Tau proteininin agregasyonunu inhibe edebileceği veya tersine çevirebileceği potansiyel terapötik yöntemler geliştirilmektedir (Paranjape vd., 2014: 77). *Hypocrea lixii*'nin metabolitleri ise asetilkolinesterazı inhibe edebilme özellikleri sebebiyle Alzheimer hastalığını önleyebilecek veya tedavi edebilecek uygulamalar için potansiyel olarak görülmüştür (Dominguete ve Takahashi, 2018: 299).

Çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle eski Çin halk tıbbında da kullanılmış olan *Trametes* türlerinin antimikrobiyal, antioksidan, antiviral, anti-diyabetik, antiinflamatuar, antikanser aktiviteleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Pop vd., 2018: 344). *Trametes* türlerinin ürettiği çeşitli aktif bileşiklerden olan Polisakkarit Krestin (PSK) ve Polisakkarit Peptid (PSP) immünostimülatör, hepatoprotektif ve antiproliferatif etkiye sahiptir (Knežević vd., 2018: 2). *Trametes versicolor* miselyumundaki PSK ve PSP'den elde edilen polisakkarit özlerin insanlarla yapılan klinik deneylerde in vivo ve in vitro çeşitli immünolojik aktivitelerinin görülmesi nedeniyle bu özler Japonya'da kemoterapide kullanılmaktadır (Córdoba M. ve Ríos H., 2012: 71).

2.3.4. Mantarların Kullanıldığı Diğer Alanlar

Araştırma çevrelerince ilgi gören biyorafineri kavramı substratların katma değerli ürünlere dönüştürülmesi şeklinde özetlenmektedir (Gmoser vd., 2017: 1). Doğal döngülerde önemli rollere sahip olan bazı filamentli mantarlar (*Aspergillus, Fusarium, Neurospora* ve *Monascus* gibi) çeşitli atıklardan pigment, hayvan yemi ve etanol üretimi amacıyla biyorafinerilerde değerlendirilebilir (Ferreira vd., 2016: 334). Fermantasyonla birçok yeni ve değerli ürün üretilirken yan ürünler de üretebilen tesislerin çeşitlendirilmesi için araştırmalar yapılmaktadır (Gmoser vd., 2017: 1).

2.4. Mantarların Antimikrobiyal Özellikleri

Waksman'ın 1947'de yaptığı tanıma göre antibiyotikler mantarlar da dahil olmak üzere mikroorganizmalar tarafından üretilen, bakterilerin ve diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilen veya onları yok edebilen kimyasal maddelerdir (Waksman 1947: 566). Bitki kalıntıları, gübre, toprak gibi ortamlarda yaşayan canlılar arasındaki yüksek rekabet, mantarların antibiyotik üretiminin nedenini açıklayabilecek bir durumdur (Hyde vd., 2019: 4). Biyoaktif ikincil metabolitler üreten önemli bir kaynak olan mantarlar insan ve hayvan sağlığındaki gelişmelere katkıda bulunmuştur (Bills ve Gloer, 2017: 3). Filamentöz mantarlar tarafından üretilebildiği bilinen antibiyotiklere örnek olarak doğal penisilin G, biyosentetik penisilin V, birçok yarı sentetik penisilin ve yarı sentetik sefalosporinler gösterilebilir (Adrio ve Demain, 2003: 193).

Var olan antibiyotiklere karşı dirençli bakteriyel ve fungal patojenlerin sayılarının ve yüzdelerinin arttığı günümüzde uzmanların antibiyotik eksikliğinin ciddi sonuçları hakkındaki uyarıları, akademinin ve özel sektörün yeni antibiyotikler keşfetmeleri yönündeki çabalarını arttırmıştır (Hyde vd., 2019: 5).

Bir Basidiomiset türü olan *Clitopilus passeckerianus*'tan elde edilen pleuromutilinin yarı sentetik türevleri, yeni etki şekli ile insan ve veteriner tıbbında bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir yere sahip olan yeni bir antibiyotik sınıfıdır (Bailey vd., 2016: 1). Basidiomiset kültürleri yavaş büyüdükleri ve genellikle düşük verime sahip olduklarından büyük ölçekli ikincil metabolit üretimi yapmak zordur. Bailey ve arkadaşları 2016'da yaptıkları çalışmada, biyosentetik genleri kolay işlenebilen ve hızlı büyüyen heterolog *Aspergillus* konakçıya aktararak pleuromutilin üretimindeki verimi artırmayı başarmışlardır (Hyde vd., 2019: 6).

Farklı biyolojik aktiviteleri ve yapısal çeşitlilikleri nedeniyle sürekli olarak farmakologların ilgisini çekmiş olan Aspergillus cinsine ait mantar türleri antimikrobiyal aktiviteye sahip çeşitli bileşiklerin başlıca kaynaklarından biridir (Hoai Trinh vd., 2018: 721; Wang vd., 2017: 1). Terpenoidler, poliketidler ve alkaloidler gibi çeşitli ikincil metebolitler üreten *Aspergillus versicolor*'dan iki yeni antimikrobiyal bisabolan seskiterpenoid türevi izole edilmiştir (Li vd., 2019: 1).

Mikromantarların yanında bazı makromantar türlerinin de antimikrobiyal aktiviteleri vardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Akdeniz bölgesinden toplanan 21 yabani makrofungus arasında *Ganoderma lucidum* misellerinin en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kalyoncu vd., 2010: 5). Yenilebilir bir mantar olan *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf. ile yapılan bir çalışmada mantardan elde edilen etanol, metanol, hekzan özütlerinde antimikrobiyal ve antioksidan aktivite görülmüştür (İnci vd., 2019: 252).

Trametes versicolor ile yapılan bir çalışmada mantardan elde edilen kloroform özütü *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde, etanol özütü ise *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* ve *Candida albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivete göstermiştir (Ulusoy vd., 2016: 267).

Kurutulmuş *Morchella esculenta* (L.) Pers 1801 ve *Trametes versicolor* (L.) Lloyd 1921 mantarlarından elde edilen etanol özütlerinin in vitro antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, *T. versicolor*'un etanol özütü test mikroorganizmalarına karşı düşük ila yüksek antimikrobiyal aktivite gösterirken *M. esculenta*'nın etanol özütü orta ila yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Canli vd., 2019: 28).

Farklı *Pleurotus* türlerinin misellerinden sıcak su özütleri elde edilerek yapılan bir araştırmada bu özütlerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu görülmüştür. *H. pylori* kaynaklı ülserin tedavisinde *Pleurotus sajor-caju*'dan tıbbi bir gıda olarak yararlanılabileceği belirtilmiştir (Özdal vd., 2019: 12).

2.5. Mantarların Antioksidan Özellikleri

Canlı organizmalar normal hücresel metabolizmalarının bir ürünü olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretirler (Sánchez, 2017: 14). Kimyasal olarak rektif olan bu moleküllerin düşük ila orta konsantrasyonları hücresel ve metabolik süreçlere faydalı iken, yüksek konsantrasyonları vücutta patolojik durumlara neden olabilmektedir (Sugiharto vd., 2016: 1). Bu patolojik durumlara protein ve DNA hasarı, yaşlanma, inflamasyon, bağışıklık fonksiyon bozukluğu, beyin fonksiyon bozukluğu, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hastalıkları, böbrek yetmezliği ve kanser örnek verilebilir (Hameed vd., 2017:1; Sánchez, 2017: 15). Hücrelerin bu zararlardan korunması için serbest radikallerin veya peroksit radikallerinin bir antioksidan ajan tarafından nötralize edilmesi önemlidir. Antioksidanlar, kendi elektronlarından birini değiştirerek serbest radikallerin oksidasyon reaksiyonunu engelleyen ve böylece serbest radikal moleküllerini stabilize eden kimyasal bileşiklerdir. Polifenoller, glutatyon, C vitamini (askorbik asit), A vitamini (örneğin karotenoidler), E vitamini (a-tokoferol), β-glukan, proteinler vb. gibi endojen veya diyetsel antioksidanlar bu bileşiklere örnek olarak verilebilir (Sánchez, 2017: 15). Canlı hücreler ROS'lara karşı koymak için doğal antioksidan üretim sistemine sahip olsa da doğal endojen antioksidan üretimindeki yetersizlik ya da ROS üretiminin aşırı yüksek olması gibi dengesizlik durumlarında oksidatif stres oluşmaktadır (Hameed vd., 2017: 1). Oksidatif stresin birçok hastalıkla ilişkisi olması nedeniyle son yıllarda antioksidan özelliği olan doğal bileşiklere yönelik araştırmalar artmıştır. Araştırmalarda mantar metabolitleri de incelenmiş ve antioksidan aktivitelerinin olduğu görülmüştür (Dominguete ve Takahashi, 2018: 296).

Gıda endüstrisinde lipit peroksidasyonunu önleyici gıda katkı maddeleri olarak kullanılan sentetik antioksidanların (BHA, BHT, TBHQ gibi) bozunmaları sırasında bazı toksik ve kanserojen bileşikler oluşabilmesi, bu maddelerin uygulamalarını sınırlandırmıştır (Arora ve Chandra, 2010: 766). Doğal antioksidanların ise serbest radikallere karşı koruma sağlarken herhangi bir yan etkisi olmamaktadır (Gebreyohannes vd., 2019: 1). Mantarların antioksidan potansiyellerinin yaygın kullanılan meyve ve sebzelerden daha yüksek olması ilginç özelliklerindendir (Matuszewska vd., 2018: 2).

Mantarlar fitokimyasallar ve fenolik bileşikler gibi antioksidan özellikleri olan biyoaktif bileşiklerce zengindir (Pop vd., 2018: 343). *Mucor* ve *Rhizopus* türleri doğal antioksidan kaynaklarına örnek olarak gösterilebilir. Üç önemli *Mucor circinelloides* suşunun miselyum özütlerinin potansiyel ikincil metabolit üretimleri araştırıldığında tüm özütlerde antioksidan aktivite görülmüştür (Hameed vd., 2017: 1). Yabani mantarlarda da askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, fenolik bileşikler gibi çeşitli antioksidan bileşikler olduğu görülmüştür (Preeti vd., 2012: 65).

Trametes türleri çeşitli farmakolojik özelliklere (antioksidan, antienflamatuar, anti-kanser gibi) sahip bileşiklerce zengindir. Romanya'nın kuzeybatı kesiminden toplanan *Trametes gibbosa* ve *Trametes versicolor* mantarlarıyla yapılan bir çalışmada fenolik asitler, flavonlar, flavonoller, kumarinler, biflavonoidler ve izoflavonoidler gibi antioksidan aktiviteye katkı sağlayan toplam yirmi sekiz fenolik ve flavonoid bileşik tanımlanmıştır (Pop vd., 2018: 343).

Agaricus bisporus, Auricularia auricula-judae ve *Flammulina velutipes* gibi yenilebilir mantar türlerindeki glukanların değerli antioksidan özelliğe sahip olduğunun görülmesiyle bu mantarlar gıda uygulamalarında doğal antioksidanlar olarak önerilmiştir (Hyde vd., 2019: 65).

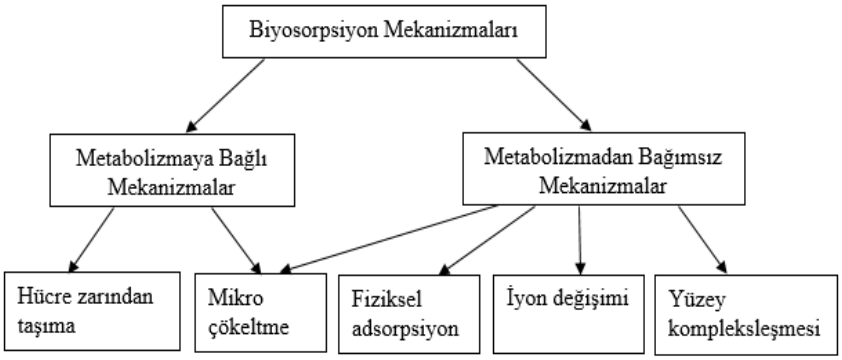
Filamentli mantarların ürettiği bazı pigmentlerin (melaninler, flavinler, violacein, indigo gibi) renklendirme özelliklerinin yanı sıra antioksidan aktivite özelliğine ve tıbbi öneme sahip oldukları gösterilmiştir (Sajid, 2018: 4). Örneğin *Penicillium herquei*'den izole edilen antrovenetin isimli sarı bir pigment, antioksidan aktiviteye sahiptir ve gıda katkı maddeleriyle birlikte kullanılabilmektedir (Gonçalves Tavares vd., 2018: 148).

Yeni antioksidanlar ürettikleri bildirilen çeşitli mantar suşları arasında *Mycelia sterilia, Antrodia camphorata, Colletotrichum gloeosporioides, Aspergillus candidus, Emericella falconensis, Torula sp., Phoma sp., Mortierella, , Acremonium, Chaetomium sp., Cladosporium sp., Penicillium roquefortii* gibi mantarlar yer almaktadır (Chandra ve Arora, 2009: 123).

2.6. Mantarların Biyosorbent Özellikleri

Adsorpsiyon, katı bir materyalin (adsorban) yüzeyi ile kirletici (adsorbat) arasındaki fiziksel veya kimyasal etkileşimi içeren sürecin tamamı olarak tanımlanmaktadır. Biyosorpsiyon ise, adsorpsiyonun bir alt kategorisidir ve basitçe maddelerin biyolojik materyal (canlı veya ölü) tarafından çözeltiden uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Biyosorpsiyon verimli, düşük maliyetli ve geleneksel yöntemlere göre avantajlı bir süreçtir (Silva vd., 2019: 18).

Biyosorpsiyon, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, birkaç mekanizmayı içeren fiziko-kimyasal bir süreçtir. Aktif, enerji açısından zengin bölgelerle karakterize biyosorbent yüzeyler, spesifik elektronik ve uzaysal özelliklerinden dolayı sulu fazdaki bileşiklerle etkileşime girebilirler. Termodinamik açıdan moleküller düşük enerjili bir durumda olmayı tercih ettiklerinden sorpsiyon meydana gelir. Bir yüzeye emilen molekül, sulu faza göre daha düşük enerjili bir duruma sahip olur. Bu nedenle, molekül yüzeye çekilir ve daha düşük bir enerji durumuna geçer. Bir molekülün bir yüzeye çekilmesi, fiziksel ve/veya kimyasal kuvvetlerden kaynaklanabilir. Çoğu sorbat ve biyosorbent arasındaki etkileşimleri elektrostatik kuvvetler yönetir. Bu kuvvetler, dipol-dipol etkileşimlerini veya London/van der Waals kuvvetlerini ve hidrojen bağlarını içerir. pH, sıcaklık, kirletici konsantrasyonu, sorbent ve sorbat doğası, temas süresi, iyonik kuvvetler, diğer bileşiklerin varlığı, ölü veya canlı biyokütlenin kullanımı gibi çeşitli faktörlerin biyosorpsiyonu etkilediği bilinmektedir (Silva vd., 2019: 19).



Şekil 2.2. Biyosorpsiyon Mekanizmaları

Kaynak: (Silva vd., 2019: 19)

Son yıllarda biyolojik materyallerin adsorban (biyosorbent) olarak uygulanmasına büyük önem verilmiştir. Biyosorbentin özellikleri kolaylıkla temin edilebilir, ucuz ve büyük adsorpsiyon verimliliğine sahip olmasıdır. Bakteriler, mantarların canlı ve ölü biyokütleleri, biyolojik materyallerden ekstrakte edilen bileşikler ve modifiye biyomateryaller biyosorbent olarak kullanılmaktadır (Benila Smily ve Sumithra, 2017: 65). Mantar hücre duvarlarının karboksil, hidroksil, amino, sülfonat ve fosfonat gibi çeşitli fonksiyonel gruplar içeren karmaşık yapısı mantarların mükemmel adsorpsiyon özelliklerini ortaya çıkarmaktadır (Silva vd., 2019: 18). Mantarlar, metal bağlama özelliği gösteren hücre duvarı materyalleri nedeniyle biyosorpsiyon ve biyobirikim etkinlikleri açısından diğer biyosorbent materyallere göre büyük avantajlara sahiptir (Benila Smily ve Sumithra, 2017: 66).

Geleneksel teknolojilerle atık su arıtımında farmasötik bileşiklerin parçalanmasının yetersiz görülmesi ve çevrenin bu bileşiklerle kontamine olabileceği endişeleri üzerine, farmasötik bileşiklerin daha etkili bir şekilde arıtımı için yeni teknolojiler araştırılmıştır (Lucas vd., 2018: 1147). Doğadaki atıkların mantarla arıtılması yüzyıllardır bilinmektedir (Leitão, 2009: 1395). Toksik, inatçı kirleticileri çeşitli biyolojik yöntemlerle çevreye zarar vermeyen ürünlere dönüştürmek için uygun maliyetli ve çevre dostu bir yöntem olan biyoremediasyonda mantarlar, morfolojileri ve çeşitli metabolik kapasiteleri nedeniyle önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda mantarlar organik kirleticiler, tekstil boyaları, tekstil atık suları, ağartılmış kraft hamuru, deri tabaklama endüstrileri, petrol, poliaromatik hidrokarbonlar, farmasötikler, pestisitler gibi çok çeşitli atıkların, atık suların arıtılmasında kullanılmış ve mantarların çeşitli tehlikeli ve toksik bileşiklerin biyolojik olarak giderimindeki rolü belirlenmiştir (Deshmukh vd., 2016: 247). Mantar enzimlerinin çeşitli ksenobiyotikleri düşük konsantrasyonlarda bile parçalayabilmesi nedeniyle atık suların fungal arıtımı teknolojik açıdan umut vericidir (Lucas vd., 2018: 1148). Farmasötik bileşiklerin uzaklaştırılması için mantarlarla yapılan bazı biyosorpsiyon çalışmaları örnekleri Tablo 2.3'te verilmiştir (Silva vd., 2019: 13).

Tablo 2.2. Farmasötik Bileşiklerin Uzaklaştırılması İçin Mantarlarla Yapılan Biyosorpsiyon Çalışmaları

Farmasötik bileşikler	**Kullanılan mantarlar**	**Giderim mekanizması**
İbuprofen, klofibrik asit, karbamazepin	*Trametes versicolor* *Irpex lacteus* *Ganoderma lucidum* *Phanerochaete chrysosporium*	Biyodegredasyon Adsorpsiyon
Karbamazepin	*Trametes versicolor*	Biyodegredasyon Adsorpsiyon
Karbamazepin	*Phanerochaete chrysosporium*	Biyodegredasyon Biyosorpsiyon
İbuprofen, klofibrik asit, karbamazepin, ketoprofen, metronidazol, triklosan, 17-α-etinilestradiol, 17-β-estradiol-17-asetat, estron, estriol, 17-β-estradiol, gemfibrozil, amitriptilin, primidon, salisilik asit, diklofenak, naproksen	*Trametes versicolor*	Biyodegredasyon Biyosorpsiyon
Estron, 17-β-estradiol, 17-α-etinilestradiol, estriol	*Trametes versicolor* *Myceliophthora thermophila*	Biyodegredasyon Adsorpsiyon
Sülfapiridin, sülfametazin	*Trametes versicolor*	Biyodegredasyon Biyosorpsiyon
Diklofenak, ketoprofen, atenolol	*Pleurotus ostreatus*	Biyodegredasyon Adsorpsiyon

Kaynak: (Silva vd., 2019: 13)

2.6.1. Mantarların FT-IR Spektroskopisi ile Analizi

FT-IR spektroskopisi çeşitli mikroorganizmaların kimyasal bileşimini (veya fonksiyonel gruplarını) karakterize etmek için kullanılabilen hızlı, tahribatsız, güvenilir, hassas ve uygun maliyetli bir tekniktir (Bhat, 2013: 1820; Santos vd., 2010: 168). FT-IR spektroskopisi, bir numunede bulunan atomik bağ titreşimlerinin enerji seviyelerinin karakterizasyonuna izin veren ışık-madde etkileşimine dayalı fiziko-kimyasal bir analitik yöntemdir (Lecellier vd., 2014: 33). Bu teknik, bir makromoleküldeki bağ uzunluğu ve açılarındaki küçük değişiklikleri bile tespit etme yeterliliğine sahiptir (Bhat, 2013: 1820). Elde edilen kızılötesi absorpsiyon spektrumu yorumlanarak bir moleküldeki kimyasal bağlar ve dolayısıyla ana makromolekül bileşenler (nükleik asitler, proteinler, lipidler, polisakkaritler, vb.) belirlenebilir (Lecellier vd., 2014: 33; Santos vd., 2010: 169). Lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi biyo-moleküller belirli kızılötesi ışık frekanslarına karşılık gelirler ve kendi benzersiz titreşimsel parmak izlerini oluştururlar (Bhat, 2013: 1820). Hücrelerin makromolekül içeriği için titreşim spektrumlarının toplamı, bu biyolojik materyal için moleküler "parmak izi" gibi bir kızılötesi absorpsiyon spektrumu oluşturabilir (Santos vd., 2010: 169). Bu nedenle elde edilen spektrum, mikroorganizmaların karakterizasyonu ve tanımlanması için kullanılabilen küresel bir "moleküler parmak izini" temsil eder (Lecellier vd., 2014: 33).

Mikroorganizmalarla yapılan çalışmalardan bazıları ayrımın sadece cins düzeyinde değil, tür düzeyinde de mümkün olduğunu göstermiştir (Erukhimovitch vd., 2010: 610). IR spektrumları her tür için oldukça spesifiktir. FT-IR spektroskopisi fungal teşhis için de başarıyla uygulanmıştır (Santos vd., 2010: 168). FT-IR görüntüleme ile mantar materyalinin uzamsal olarak çözülmüş kimyasal bileşimi incelenebilir. Seçilen spektral aralıkların alanları veya bant yükseklikleri hesaplanabilir ve numuneler içindeki ilgili kimyasal maddenin uzamsal dağılımı her görüntü pikseli için renk kodu oluşturularak görselleştirilebilir. FT-IR analizi, spektral model farklılıklarını karşılaştırarak mantarların çeşitli taksonomik seviyelerde ayırt edilmesini sağlar. Farklı spektral özelliklere sahip sınırlı sayıda mantarı ayırt etmek çok basit olsa da spektral benzerliğe sahip birçok taksonu ayırt etmek daha karmaşık istatistiksel ayrım modelleri gerektirir (Naumann, 2015: 61).

Mikotoksin üretebilen farklı mantar türleri (*Aspergillus* türü ve *Mucor* türü) arasında ayrım yapmak için (fonksiyonel gruplara dayalı; spektral aralık 3500-500 cm-1) FT-IR spektroskopisinin kullanıldığı bir çalışmanın sonucunda farklı mantarların spektrumları arasındaki genel benzerliklerden bağımsız olarak, fonksiyonel gruplarda kesin farklılıklara sahip her biri için benzersiz bir spektrum olduğu açıkça görülmüştür. Bu sonuçlar mikotoksin üretebilen mantar türlerinin her biri için uygun bir "parmak izi" sağlayarak yararlı olabileceğinden yalnızca *Aspergillus* türlerine ait toksijenik küflerin tanımlanmasında değil aynı zamanda *Fusarium, Penicillium* vb. gibi diğer mikotoksin üreten küflere de bu tekniğin uygulanabileceği belirtilmiştir (Bhat, 2013: 1819).

Bastert ve arkadaşları *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes* ve *Microsporum canis* adlı üç dermatofit türünü FT-IR spektroskopisinden yararlanarak ayırt etmişlerdir (Bastert vd., 1999: 525). Bir başka çalışmada FT-IR spektroskopisi ile *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerine ait 10 türün tanımlanması ve tiplendirilmesi sağlanmıştır (Fischer vd., 2006: 63). Nie ve arkadaşları ise FT-IR spektroskopisini yapay sinir ağları (Artificial Neural Network) algoritması ile birlikte kullanarak beş *Fusarium* türüne ait 16 izolatı ayrıştırmışlardır (Nie vd., 2007: 364).

Patateslerde patojen olan üç farklı mantar (*Colletotrichum coccodes, Rhizoctonia* ve *Helminthosporium*) ile yapılan bir çalışmada elde edilen sonuçlarda bazı piklerin sadece bir mantar türünde görülmesi farklı mantar patojenleri ile enfekte bölgelerin tanımlanması için benzersiz, tutarlı ve önemli spektral biyobelirteçler sağlamıştır (Erukhimovitch vd., 2010: 611).

Bombalska ve arkadaşları mantarların kızılötesi spektrumlarında görülen biyolojik kökenli belirli fonksiyonel gruplara özgü bantları üç ana bölgede toplamıştır: yağ asitleri (3050-2800 cm-1), amit I ve II (1700-1500 cm-1), polisakkaritler (1200-900 cm-1) (Bombalska vd., 2013: 71). Ancak, sadece bu alanların analizi ile elde edilen bilgilerin türleri ayırt etmek için yetersiz olduğunu ve diğer bölgelerdeki absorpsiyon bantlarının varlığının, belirli mantar türlerine özgü olduğunu belirtmişlerdir. 900-700 cm-1, 1500-1200 cm-1, 2800 -1700 cm-1 ve 4000-3050 cm-1 aralıklarındaki spektrumların analizi belirli mantar türleri arasındaki benzerliklerin ve farklılıkların belirlenmesini sağlamıştır (Bombalska vd., 2013: 72).

Mantar hücrelerinin FT-IR spektrumlarında genel olarak görülen absorpsiyon bantları Tablo 2.4'teki gibi özetlenebilir (Dzurendova vd., 2020: 14; Salman vd., 2010: 263).

Tablo 2.3. Mantar Hücrelerinin FT-IR Spektrumlarında Genel Olarak Görülen Absorpsiyon Bantları

Dalga boyu (cm^{-1})	**Bağ çeşidi/kuvveti ve ilgili molekül**
3500-3200	O-H bağ gerilmesi (karbonhidratlar)
3350	O-H bağ gerilmesi (su)
3275	N-H bağ gerilmesi (kitin/kitosan)
3105	N-H bağ gerilmesi (kitin/kitosan)
3010-3008	=C-H bağ gerilmesi (lipitler)
2955	-C-H (C) bağ gerilmesi (lipitler)
2925	$>CH_2$ açil zinciri (lipitler)
2917	CH_2 , CH_3 asimetrik bağ gerilmesi (lipitler)
2855	-C-H (CH_2) bağ gerilmesi (lipitler)
2849	CH_2 , CH_3 simetrik bağ gerilmesi (lipitler)
1750-1745	-C=O esterlerde bağ gerilmesi (lipitler)
1680-1630	-C=O bağ gerilmesi, amit I (proteinler, kitin)
1560-1530	-C-N-H deformasyonu amit II (proteinler, kitin)
1465	-C-H (CH_2, CH_3) bağ bükülmesi (lipitler)
1416	C-N bağ gerilmesi (proteinler)
1377	-C-H (CH_3) bağ bükülmesi (kitin)
1300	Amit III (protein)
1265	P=O bağ gerilmesi (polifosfatlar)
1200-1000	C-O ve C-O-C bağ gerilmesi (karbonhidratlar)
1160	C-O-C esterlerde bağ gerilmesi (lipitler)
1080	PO_2 simetrik bağ gerilmesi (nükleik asit)
885	P-O-P bağ gerilmesi (polifosfatlar)

Kaynak: (Dzurendova vd., 2020: 14; Salman vd., 2010: 263)

Lipitlerle ilişkili en önemli zirvelerden biri, esterlerde gerilen ve hücrede lipit (açilgliserol) içeriğini gösteren karbonil bağı ile ilgili olan ~ 1745 cm-1 pikidir. 3010 cm-1 civarındaki zirve, lipidlerde =C-H gerilmesini ve hücre içindeki lipidlerin doymamışlık düzeyini gösterir. Proteinler 1700-1500 cm-1 arasında zirvelere sahipken glukan zirveleri 1160–1050 cm-1 bölgesinde bulunabilir (Dzurendova vd., 2020: 12).

İçeceklerden izole edilen beş farklı fungal cinsin (*Alternaria, Aspergillus, Mucor, Paecilomyces* ve *Phoma*) 11 türünün FT-IR spektroskopisi ile analiz edildiği bir çalışmada dört spektral bölge [yağ asitleri ve lipit (3200–2800 cm-1, 1300–1000 cm-1), protein – lipit (1800–1200 cm-1), karbonhidratlar (1200–700 cm-1) ve parmak izi (900-700 cm-1)] yeniden üretilebilirlik ve ayırt etme yeteneği açısından değerlendirilmiştir. Sonuçta, değerlendirilen tüm spektral bölgelerin FT-IR ile mantarların ayırt edilmesi için spesifik spektroskopik biyobelirteçler olarak kullanılabileceği görülmüştür (Shapaval vd., 2010: 512). FT-IR analizinin avantajları olsa da tanımlama başarısı referans spektrum kütüphanesinin kalitesi ile sınırlıdır. Spektral veri kütüphanelerinin zamanla gelişmesi bilinmeyen mikrobiyel suşların tanımlanmasına olanak sağlayacaktır (Santos vd., 2010: 173).

2.6.2. Mantarların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), katı nesnelerin yüzeylerini doğrudan incelemek için tasarlanmış, örnek üzerinde düzenli bir şekilde taranan bir elektron probu olarak nispeten düşük enerjili odaklanmış elektron demeti kullanan bir elektron mikroskobu tipidir. Elektron ışınının hareketi, numunenin yüzeyinden yüksek enerjili geri saçılmış elektronların ve düşük enerjili ikincil elektronların emisyonunu uyarır (Bradbury vd., 2019: 1).

SEM, yüzey morfolojisini değerlendirmek ve biyolojik örneklerin topolojik özelliklerini yüksek çözünürlüklü olarak incelemek en etkili ve güçlü tekniklerinden biridir (Saremi vd., 2020: 5; Venkatesh Babu vd., 2018: 1). SEM ile gözeneklerin şeklini ve varlığını belirlemek mümkün olduğundan adsorban malzemelerin görünümünü ve morfolojik özelliklerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Samarghandi vd, 2019: 309). Mantarlar için de SEM, morfolojiyi ve uzamsal ilişkileri belgelemek için yaygın olarak kullanılır (Kaminskyj ve Dahms, 2008: 350). Mantarların biyosorbent olarak kullanıldığı çalışmalarda da mantar biyosorbentinin karakterizasyonu için kullanılan tekniklerden biridir (Gupta ve Tuohy, 2019: 408).

Trichoderma sp. BSCR02'nın işlenmemiş ve alkali ile işlenmiş miselyumunun atık sudan krom biyosorpsiyon yeteneğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada alkali ile muamele edilmiş mantarın daha iyi biyosorbent olduğu görülmüştür. Biyosorpsiyondan önce ve sonra alkali ile işlenmiş biyokütlenin (biyosorbent) yüzey topografisi, SEM analizi ile karakterize edildiğinde SEM mikrograflarında gözle görülür bir fark gözlemlenmiştir (Benila Smily ve Sumithra, 2017: 67).

Saccharomyces cerevisiae'den üretilen biyoadsorbentin sulu çözeltilerden amoksisilin antibiyotiğinin uzaklaştırılmasındaki etkinliğini incelemeyi amaçlayan bir çalışmada SEM görüntüleri incelendiğinde bioadsorbentin kristal olmayan yüzeyinin gözenekli ve katmanlı olduğu görülmüş ve bu özelliği ile amoksisilini adsorbe ettiği düşünülmüştür (Samarghandi vd., 2019: 309).

2.7. Mantarların Tanımlanması

2.7.1. Mantarların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

Tahmin edilen mantar türü sayısına oranla az sayıda mantar türünün tanımlanmış olması, tespit ve doğru sınıflandırmayı mantar araştırmaları için daha kritik hale getirmektedir (Banos vd., 2018: 1). Mantarların tür düzeyinde tanımlanması, hem ekoloji ve taksonomi gibi temel bilimsel araştırmalarda hem de genomik ve biyolojik araştırma gibi uygulamalarda çok önemlidir (Raja vd., 2017: 756).

Mantarların tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında kullanılan geleneksel yöntemler, esas olarak kültür izolasyonuna ve morfolojik özelliklerin (makroskopik ve mikroskobik yapıların) gözlemlenmesine dayanmaktadır (Pinto vd., 2012: 897). Bu yöntemler zaman alıcı ve zahmetli olmasının yanında kültür yoluyla izolasyon için günler veya haftalar gerekebilmektedir (Wu vd., 2003: 5389). Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) ve dizilemeye dayalı moleküler tanımlama yöntemleri ise geleneksel yöntemlere kıyasla mikrobiyal tanımlama için doğru ve hızlı bir araç olarak kabul edilmektedir (Shawky vd., 2019: 670). Ribozomal DNA (rDNA), birçok maya ve mantar türünün farklılaşması için kullanılan yüksek derecede polimorfik 600-800 bp ITS bölgesini (Internal Transcribed Spacers) kodladığından mantar filogeni çalışmaları için ilginç bir hedeftir (Pinto vd., 2012: 897).

ITS bölgesi, mantarların moleküler ekolojisinde en yaygın olarak dizilen DNA bölgesidir ve evrensel mantar barkod dizisi olarak görülmektedir. Tür düzeyinde ve hatta türler içinde moleküler sistematik için oldukça kullanışlı olan ITS bölgeleri, 18S ve 28S rRNA genleri arasında yer alır ve genom başına yaklaşık 100 kopya bulunması nedeniyle duyarlılık dahil olmak üzere diğer moleküler hedeflere göre belirgin avantajları vardır. ITS bölgelerinin sıralı varyasyonu, birçok farklı organizmanın filogenetik çalışmalarında kullanılmasını sağlamıştır (Waing vd., 2015: 140). Mantarların moleküler teknikler kullanılarak tanımlanması, 18S rRNA genlerinin PCR ile amplifiye edilmiş kısmının mantar türlerine evrensel primerler ile dizilenmesiyle gerçekleştirilir (Alsohaili ve Bani-Hasan, 2018: 330).

Hindistan'ın Punjab bölgesindeki tarla topraklarından izole edilen *Beauveria bassiana*'ya benzer özelliklere sahip on üç mantar izolatının moleküler taramasının yapıldığı çalışmada *B. bassiana*'ya özgü primer ile PCR amplifikasyonu ve ITS bölgesinin nükleotid dizi analizi kullanılmıştır. Moleküler tarama sonucunda referans izolatı MTCC 2028 ile birlikte sadece üç izolatın *B. bassiana* (BbR1, BbR2 ve BbR3) olduğu tespit edilmiştir (Dhar vd., 2019: 1).

Endonezya Merkez Kütüphanesi'nden alınan, mantarlar tarafından biyolojik bozulmaya uğramış dört Çin el yazmasından on bir mantar suşunu tanımlamak için yapılan bir moleküler tanımlama çalışmasında ribozomal DNA'nın ITS bölgelerinin nükleotid dizileri kullanılmıştır. PCR ve DNA dizilimi, ileri primer ITS5 ve ters primer ITS4 kullanılarak yapılmış, ITS rDNA dizilerinin homoloji araştırması ise temel yerel hizalama arama aracı (BLAST) programı kullanılarak yapılmış ve tür düzeyinde iki mantar suşu tespit edilmiştir (Oetari vd., 2018: 1).

Nijerya'da mangoda meyve antraknozuna neden olan *Colletotrichum* türlerini geleneksel taksonomik sistemler kullanarak mantar izolatlarının morfolojik özelliklerine göre ayırt etmedeki zorluklar nedeniyle, moleküler yöntem tercih edilmiştir (Awa ve Oguntade, 2015: 99). Yapılan çalışmada, özel evrensel primer kullanılarak mantar izolatlarından PCR ile bir fragman amplifiye edilerek mantar türleri ayırt edilmiştir (Awa ve Oguntade, 2015: 102).

2.8. LC-MS/MS ile Fungal Metabolit Tayini

Genellikle karmaşık verilerden bilinmeyen bileşikleri tanımlamak için kullanılan metabolit profili çıkarmada sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS), özgüllüğü ve yüksek duyarlılığı nedeniyle karmaşık kimyasal veya biyolojik numunelerdeki bilinmeyen metabolitlerin spesifik tespiti için yaygın olarak uygulanmakta olan bir analitik yöntemdir (Kang vd., 2011: 5). Bilinen ve bilinmeyen bileşiklerin iyonlarının moleküler bileşimini tahmin etmede ve doğru kütleleri belirlemede önemli bir role sahip olan sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS), mikrogram konsantrasyonlarında bile farklı elementel bileşime sahip izobarik bileşiklerin farklılaşmasına izin verdiğinden ikincil metabolitleri tespit etmek ve tanımlamak için çok yönlü araç olarak kabul edilmektedir (George vd., 2019: 2). Temel bileşen analizi (PCA) ve kısmi en küçük kareler diskriminant analizi (PLS-DA) gibi istatistiksel analizlerle birleştirildiğinde yöntemin verimliliği artmakta ve LC-MS, metabolit profiline dayalı olarak mikroorganizmaların sınıflandırılması için de uygun ve güçlü bir araç haline gelmektedir (Kang vd., 2011: 5). Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS) ile birleştirilmiş elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanılarak farklı biyoaktif metabolitlerin yapısal analizi de gerçekleştirilebilmekte ve çok çeşitli doğal ürünler doğrudan taranabilmektedir (George vd., 2019: 2).

Çok çeşitli doğal ürünler üretme yeteneğine sahip olan mantarların ürettiği aflatoksinler ve fumonisinler dahil olmak üzere bazı mantar metabolitleri, tarımsal ürünleri ve gıda maddelerini kontamine ederek insan ve hayvan sağlığı için önemli riskler oluşturmanın yanı sıra büyük ekonomik kayıplara neden olurlar (Renaud vd., 2021: 1). Bu nedenle gıdalarda ve hayvan yemlerinde mikotoksinlerin araştırılması ve tespiti önemli hale gelmektedir. Mikotoksin analizi için en yaygın kullanılan tespit yöntemi olan LC-MS/MS, tandem kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş sıvı kromatografisine dayanmaktadır ve nispeten az ve zahmetsiz numune işleme adımları, yüksek seçiciliği, hassasiyeti ve yüksek numune hacmine izin vermesi nedeniyle tercih edilmektedir (Adetunji vd., 2019: 1848). Örneğin Türkiye'nin Aydın bölgesindeki 2017 ve 2018 hasatlarından elde edilen kuru incirlerin mikotoksin analizi için LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır (Sulyok vd., 2020: 381).

Brezilya fındıklarındaki mantar metabolitlerinin oluşumunu nicel olarak değerlendirmeyi amaçlayan bir çalışmada toplam 235 mikotoksin, HPLC-MS/MS'ye dayalı bir çoklu mikotoksin yöntemiyle taranmıştır. Çoklu mikotoksin yöntemlerinin geliştirilmesiyle, mikotoksinler olarak kabul edilen 300-400 mantar metabolitinin daha büyük bir bölümünün eş zamanlı analizi mümkün olmaktadır (Freitas-silva vd., 2009: 1). Bu çalışmada kullanılan LC–MS/MS yöntemi de Brezilya fındıklarındaki ikincil metabolitlerin eş zamanlı ölçümüne başarıyla uygulanmıştır (Freitas-silva vd., 2009: 2).

Stachybotrys cinsi mantarların makrosiklik trikotesenler, atranonlar ve fenilspirodrimanlar gibi çok çeşitli ikincil metabolitler ürettiği bilinmektedir. *Stachybotrys* türleri tarafından üretilen toksikolojik açıdan en önemli ve bol toksinlerin nicel analizinin amaçlandığı bir çalışmada tandem kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC-MS/MS) yöntemi kullanılmıştır. Mantar kültürlerinden 15 ana ikincil metabolit izole edilmiş ve LC-MS/MS analizinde analitik standartlar olarak kullanılmak üzere yapısal olarak karakterize edilmiştir (Jagels vd., 2019: 1).

Biyolojik aktivitesi olduğu bilinen ancak kimyasal bileşimi hakkında sınırlı bilgi bulunan *Lentinula edodes* miselyumunun kahverengi filminin (BF) sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS) ile hedeflenmemiş metabolomik analizi yapılması sonucunda antimikrobiyal aktivitelerle ilgili beş önemli antimikrobiyal metabolit mevcut olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca BF oluşumunun gelişimi hakkında fikir edinmek için, LC−MS/MS yaklaşımı kullanarak BF oluşumunun dört gelişim aşaması araştırılmış ve aşamalardaki metabolik farklılıklar, bir LC−MS/MS algılama platformu, veritabanı ve çok değişkenli istatistiksel analiz birleştirilerek değerlendirilmiştir (Tang vd., 2020: 7567).

Yedi *Trichoderma* türünün (33 suş) ikincil metabolit profiline dayalı kemotaksonomi kullanılarak sınıflandırıldığı bir çalışmada ikincil metabolitler, sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometrisi (LC-ESI-MS-MS) ve çok değişkenli istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir (Kang vd., 2011: 5).

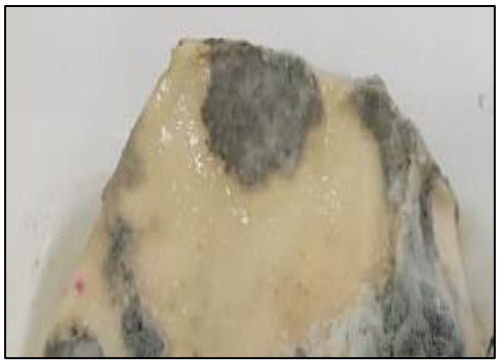
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mantarlar

Tez çalışmasında kullanılan makromantar türü 2019 Eylül ayında Sivas (Merkez) (Koordinat: 39° 75' 05" K ve 37° 01' 50" D) yöresinden toplanmıştır (Şekil 3.1). Mikromantar izolasyonu için ise peynir atığı üzerinde gelişmiş mantar miseli (Şekil 3.2) ve Bilecik, Pazaryeri (Koordinat: 39° 58′ 12.2664" K ve 29° 57′ 18.9468" D)'de boncuk fasülye türlerinin yetiştirildiği tarla çevresinden toplanan fasülye atıkları üzerinden mantar miseli (Şekil 3.3) örnek alınmıştır.

Şekil 3.1. Sivas, Merkez (Koordinat: 39° 75' 05" K ve 37° 01' 50" D) Toplanan Makromantar Türü



Şekil 3.2. Peynir Atığı Üzerinde Gelişmiş Mantar Türü Miselyumu

Şekil 3.3. Bilecik, Pazaryeri (Koordinat: 39° 58′ 12.2664" K ve 29° 57′ 18.9468".D) Fasülye Tarlası Çevresinden Toplanan Boncuk Fasülye Türlerinin Yetiştirildiği Tarla Çevresinden Toplanan Fasülye Atıkları Üzerinde Gelişmiş Mantar Miselyumu

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Mantar özütlerinin elde edilmesi amacıyla etanol, metanol, aseton ve kloroform kullanılmıştır. Elde edilen mantar özütlerinin çözdürülmesi amacıyla Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Antioksidan aktivite deneylerinde serbest radikal bileşik olarak 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH), standart madde olarak ise Bütil hidroksi tolüen (BHT) kullanılmıştır. DPPH'ın çözdürülmesi için de etanol kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Antimikrobiyal aktivite testlerinde Nutrient Agar (NA) - Merck, Nutrient Broth (NB) - Merck, Potato Dextrose Agar (PDA) - Merck, Potato Dextrose Broth (PDB) - Neogen, Mueller-Hinton Agar (MHA) - Merck, Mueller-Hinton Broth (MHB) - Merck, Malt Extract Agar (MEA) - Merck, Malt Extract Broth (MEB) - Merck besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan Test Antibiyotikleri

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde pozitif kontrol amacıyla gentamisin (Bioanalyse) ve vankomisin (Bioanalyse) antibiyotikleri kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Tablo 3.1'de isimleri ve özellikleri sunulmuş ve çalışma grubumuz kültür koleksiyonunda mevcut bulunan suşlar antimikrobiyal aktivite testleri için kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Test Mikroorganizmaları ve Özellikleri

Test Mikroorganizması	Özellikleri
Esherichia coli ATCC 35200	Gram negatif, basil
Staphylococcus aureus ATCC 29213	Gram pozitif, kok
Candida albicans ATCC 24433	Maya mantarı
Enterococcus faecalis ATCC 29042	Gram pozitif, kok

3.1.6. Kullanılan Biyogüvenlik Kabini

Steril ortamda yapılması gereken çalışmalar Blulab Class II kabinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.7. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre: Agile-Spec model spektrofotometre antioksidan aktivite deneyinde absorbans ölçümlerinde kullanılmıştır.

Hassas terazi: Çalışmalar sırasında gereken tartım işlemleri Shimadzu TW423L model hassas terazi ile yapılmıştır.

Çalkalamalı su banyosu: Mantarların çeşitli çözgenlerle özütleme işleminde Tekon OC21 model çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır.

Etüv: Çalışmalar sırasında inkübasyon içim Nüve EN 120 model inkübatör kullanılmıştır.

Öğütücü: Mantarları öğütmek amacıyla Arzum Clipper AR1034 öğütücü kullanılmıştır.

Diğer malzemeler: Deneylerde çeşitli boyutlarda beher, erlen, mezür, petri gibi cam malzemeler ve çeşitli pipet, pipet uçları kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Makromantarın Öğütülmesi ve Mikromantarların İzolasyonu

2019 Eylül ayında Sivas (Merkez) (Koordinat: 39° 75' 05" K ve 37° 01' 50" D) yöresinden toplanan makromantar türü laboratuvarda kuruduktan sonra öğütülerek toz haline getirilmiştir. Peynir ve fasülye atıkları üzerinden alınan mantar miseli örnekleri ise içinde Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri bulunan petrilere ekilmiş ve 25 ± 2 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petri plakalarında gelişen farklı morfolojideki mantar türleri saf kültür elde etmek için arka arkaya pasajlanmıştır. Petri kabında morfolojik olarak saf kültür olduğu gözlemlenen örnekler mikroskop altında incelemeye tabii tutularak saflıklarından emin olunmuştur. Petri plaklarında saf kültür olarak izole edilen mikromantar türlerinin petrideki agar (PDA) plak üzerindeki morfolojilerine ait görüntüler Şekil 3.4. ve Şekil 3.5.'te verilmiştir.

Şekil 3.4. Peynir Atığı Üzerinden İzole Edilmiş ve Patates Dekstroz Agar (PDA)'da Gelişmiş İzolat 1'e Ait Görüntü

Şekil 3.5. Bilecik, Pazaryeri (Koordinat: 39° 58´ 12.2664" K ve 29° 57´ 18.9468".D) Fasülye Tarlası Çevresinden Toplanan Boncuk Fasülye Türlerinin Yetiştirildiği Tarla Çevresinden Toplanan Fasülye Atıklarından İzole Edilmiş ve Patates Dekstroz Agar (PDA)'da Gelişmiş İzolat 2'ye Ait Görüntü

3.2.2. Mantarların Moleküler Tür Tanımlaması

Mantarların tür tanımlama deneyleri Ankara'da BM Laboratuvarında yapılmıştır. Makro ve mikro mantar türlerinin idendifikasyonunda moleküler düzeyde analizleri yapılmıştır. PCR ve sekanslama işlemi logaritmik gelişme fazındaki kültürlerden yapılmıştır. İzole edilmiş suşlardan genomik DNA ekstraksiyonunda mış olup, ektraksiyonda üreticinin protokolü takip edilmiştir. 18S rRNA geninin amplifikasyonu, Tablo3.2'de verilen evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) 200 ng DNA şablonu, 12,5 uL 2 X iProof HF Master Mix (BioRad, ABD), 20 pmol/uL ileri primer ve 20 pmol/uL ters primer içeren 20 µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleşmiştir. PCR amplifikasyonunda aşağıdaki koşullar altında bir PCR System TC-300 (Techne, Cambridge, Birleşik Krallık) kullanılarak 0.2 µl tüplerde gerçekleştirilmiştir. İlk ısı aktivasyonu için 94 ° C'de 5 dakika, 94 ° C'de 30 saniye 30 döngü denatürasyon, tavlama için 50 ° C'de 30 saniye, uzatma için 72 ° C'de 45 saniye ve son uzatma için 72 ° C'de 10 dakika. Amplifiye edilmiş 18S rRNA genleri, ABI 3130XL Genetic Analyzer ile her primer için Bigdye Cycle Sekanslama Kiti v3.1 kullanılarak sekanslanmıştır.

Tablo 3.2. PCR'da Kullanılan Primerler

Sıra No	Primer	Kaynak
1	27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Lane, 1991: 115)
2	907R CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	(Rudi vd., 1997: 2593)

İzolatların türlerini belirlemek için, elde edilen diziler NCBI referans dizileri ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla bir program olan Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) programı kullanılmıştır.

3.2.3. Mantarlardan Özüt Elde Edilmesi

Kurutulduktan sonra toz haline getirilmiş mantar biyokütlelerinden 5 g tartılarak, 80 ml etanol, metanol, aseton ve kloroform olmak üzere 4 farklı çözücü içinde 25 ˚C'de 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda 24 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen karışım süzülüp, çözücüler rotary evaporatör cihazı kullanılarak 40 ˚C'de uçurulmuştur. Kalan özütler antimikrobiyal ve antioksidan aktivite deneylerinde kullanılmak üzere 2 ml %20'lik DMSO'da çözündürülerek ependorfa alınmış ve buzdolabında saklanmıştır. Süzme işlemi sonrasında kalan mantar atıkları ise kurulup toz haline getirilerek ilaç etken maddesi giderimi deneylerinde biyosorbent olarak kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Deneyi

Mantar özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Hudzicki, 2016: 7). Deneylerde kontrol amacıyla gentamisin (Bioanalyse) ve vankomisin (Bioanalyse) antibiyotikleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan tüm besiyerleri (Nutrient Agar-Merck, Nutrient Broth-Merck, Potato Dextrose Agar-Merck, Potato Dextrose Broth-Neogen, Muller Hinton Agar-Merck, Muller Hinton Broth-Merck, Malt Extract Agar-Merck, Malt Extract Broth-Merck) temin edilmiştir. Kullanılan standart mikroorganizma suşları Muller Hinton Broth (MHB) besiyerinde 37 ℃'de iki kez aktifleştirildikten sonra 1'er ml alınıp steril bir eküvyon yardımıyla Muller Hinton Agar (MHA) besiyeri içeren petrilere inoküle edilmiştir. Takiben 20 µl özüt emdirilmiş disk, %20'lik DMSO emdirilmiş disk, gentamisin ve vankomisin antibiyotiklerini içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Daha sonra besiyerleri 35 ℃'de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonucu oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür.

Disk difüzyon deneyleri sonucunda antimikrobiyal aktivitesi en yüksek olan özüt seçilmiş ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) deneyi yapılmıştır. MİK testi mikrodilüsyon metodu ile 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanarak gerçekleştirilmiştir (Zgoda ve Porter, 2001: 223). Deneyde kullanılacak bakteriler Muller Hinton Broth besiyerinde, maya ise Sabouraud Dextrose Broth besiyerinde etüvde 33 ℃'de 120 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Mikroplakadaki kuyucuklara da bakteriler için Muller Hinton Broth, maya için Sabouraud Dextrose Broth besiyeri koyulmuştur. Kuyucuklardaki son hacim 100 µl olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. 1 mg/ml'lik stok mantar özütü kullanılarak ilk kuyucuktaki özüt konsantrasyonun 250 µg/ml olması sağlanmıştır. 1:2 oranında seri dilüsyonlar yapılarak sonraki kuyucukların konsantrasyonu sırasıyla 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,625 µg/ml, 7,8125 µg/ml, 3,906 µg/ml, 1,953 µg/ml, 0,976 µg/ml'ye ayarlanmıştır. Mikroorganizmaların OD (optik yoğunluk) değeri 600 nm'de spektrofotometrede ölçülerek 0,1'e ayarlanmıştır (Mc Farland 0,5). Bakteriler 1/10 dilüe edilerek, maya ise direk kullanılmıştır. 11. Kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 5 µl mikroorganizma inoküle edilmiştir. 10. kuyucuğa mikroorganizma üreme kontrolü amacıyla sadece besiyeri ve mikroorganizma koyulmuştur. 11. kuyucuğa kontaminasyon kontrolü amacıyla sadece besiyeri ve özüt çözeltisi koyulmuştur. 12. kuyucuğa ise çözücü kontrolü amacıyla besiyeri, % 20'lik DMSO ve mikroorganizma koyulmuştur. Hazırlanan mikroplaka 24 saat inkübe edildikten sonra üremenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Antioksidan Aktivite Deneyi

Farklı mantar türlerinden elde edilen özütlerin serbest radikal giderim aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemine göre belirlenmiştir (Kirby ve Schmidt, 1997: 105). Bu yöntem redoks reaksiyonlarına dayanmaktadır. DPPH radikali eşleşmemiş nitrojenlerinden dolayı mor renge sahiptir. Mantarlardan elde edilen özütlerdeki radikal tutucu atomlar DPPH radikalini indirgeyerek mor rengin açılmasını sağlar. Örneklerin serbest radikal giderme potansiyelleri bu renk açılımının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlenebilmektedir. Bu yöntemde 1 ml etanolik DPPH (TCI) çözeltisi (1 mM'lık) ile %1'lik etanolik özüt çözeltileri karıştırılmıştır. Kontrol amacıyla bilinen bir antioksidan olan Butil Hidroksi Toluen (BHT) (Tekkim) kullanılmıştır. Hazırlanan karışım 30 dakika karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçülmüştür. Özütlerin absorbans değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri Eşitlik 1 (E. 1) kullanılarak hesaplanmıştır.

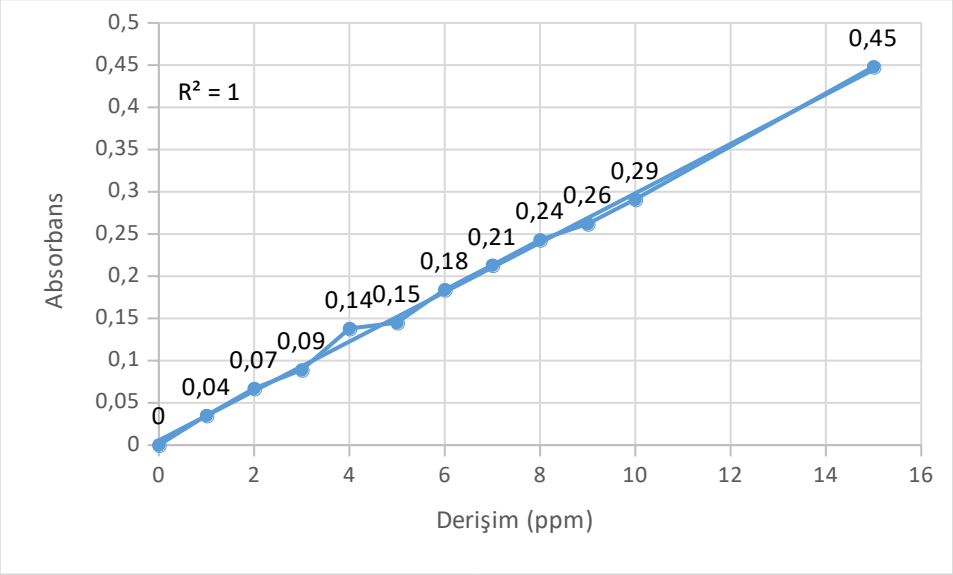
$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol}] \times 100 \qquad \text{E.1}$$

3.2.6. Tetrasiklin Giderimi Deneyleri

Antimikrobiyal ve antioksidan aktivite deneyleri için mantar türlerinden farklı 4 farklı çözücü (etanol, metanol, kloroform ve aseton) kullanılarak özüt hazırlanmış ve özütleme sonrası açığa çıkan mantar atıkları kurutularak saklanmıştır.

3.2.6.1. Tetrasiklin Analiz Yöntemi

Tetrasiklin analizi için öncelikle tetrasiklinin spektrofotometrik yöntemle kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Stok tetrasiklin çözeltisi 1000 mg/L derişimde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden hesaplana miktarlar alınarak her biri 10 ml olan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 15 ppm derişimlerde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. 15 mg/L'lik çözeltinin 300-600 nm aralığında değişik dalga boylarındaki absorbans değeri ölçülmüş ve en yüksek absorbans 357 nm'de görülmüştür. Bu dalga boyunun literatürdeki tetrasiklin analizine yönelik çalışmalardaki yöntemlerde kullanılan dalgaboyu ile örtüştüğü görülmüştür (Ersan vd., 2015: 24; Huízar-Félix vd., 2019: 3; Parolo vd., 2008: 181). Kalibrasyon çözeltilerinin 357 nm'de absorbansları ölçülerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Tetrasiklin Kalibrasyon Grafiği

Tetrasiklin giderim yüzdesinin hesaplanması için Eşitlik 2 (E.2) kullanılmıştır.

E.2: % Tetrasiklin Giderimi= $[(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$

Bu eşitlikte; A_0 değeri başlangıç tetrasiklin derişiminin adsorbansını ve A_s değeri ise inkübasyon süresi sonundaki tetrasiklin derişiminin adsorbansını ifade etmektedir.

3.2.6.2. Biyosorbentlerin Hazırlanması

Kurutulup toz haline getirilmiş *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* mantar türlerinden 5'er g tartılarak, 250 ml'lik erlenler içinde 80 ml etanol, metanol, aseton ve kloroform olmak üzere 4 farklı çözücü kullanarak 25℃'de 120 rpm'de 24 saat çalkalamalı su banyosunda bırakılmıştır. Özütleme sonunda süzme işlemi yapılmış ve kalan mantar atıkları etüvde kurutulup toz haline getirilmiştir.

Hegzadesiltrimetil amonyum bromür (HTAB) ile modifikasyon işlemi için toz halindeki 1 g mantar atığı 20 ml %70'lik etanol solüsyonunda 150 rpm'de 15 dk çalkalanmıştır. Daha sonra mantar süzülerek iki kere distile su ile yıkanmıştır. Yıkanan mantar 20 ml 1 M NaOH çözeltisinde 50 ℃'de 150 rpm'de 30 dakika çalkalanmıştır. Mantar süzülüp distile su ile yıkandıktan sonra 10 ml 1 mM HTAB çözeltisi eklenerek 100 rpm'de 24 saat çalkalanmıştır. Sürenin sonunda süzülüp kurularak modifikasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.2.6.3. Biyosorbent Karakterizasyonu

3.2.6.3.1. SEM Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmış olup, analizde SEM, Supra 40VP, Zeiss cihazı kullanılmıştır.

3.2.6.3.2. FT-IR Analizi

FTIR analizinde Agilent Technologies Cary 630 FTIR spektrofotometresi kullanılmıştır. Biyosorbent örneklerinin kurutulmuş biyokütlelerinin biyosorpsiyondan önce ve sonra 400–4000 cm^{-1} tarama aralığında FTIR ölçümleri yapılmıştır (Bayazıt vd., 2019: 610).

3.3. Mantar İzolatlarından Elde Edilen Özütlerin Analitik Kimyasal Yöntemlerle İncelenmesi

Antimikrobiyal aktivite yönünden etkin sonuçlar veren *Penicillium chrysogenum* türünün sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi yöntemi ile biyolojik etkinliğinde rol alan maddelerin araştırılması çalışmaları Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. *Penicillium chrysogenum*'un 4 farklı özüt numunesinde sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi ile *Penicillium chrysogenum'un* aktivitesini sağlayan maddelerin bulunması için çalışılmış olup, bu çalışmalar doğrultusunda LC-MS/MS 8040: Nexera XR serisi Shimadzu (Japonya) marka cihaz kullanılmıştır. LC-MS/MS sistemindeki kütle spektrometrisi, pozitif modda (ESI+) ve negatif modda (ESI-) elektrosprey iyonizasyonu kullanarak, m/z 100 ile m/z 1000 arasında kütle aralığı taranmıştır.

Bu çalışma yapılırken mobil fazın akış hızı 0,25 mL/dk, kolon sıcaklığı 30,0 ± 0,1 °C'ye ve otomatik örnekleyici termostat sıcaklığı 15 ± 0,1 °C'ye ayarlanmıştır. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL olarak seçilmiştir. Tüm çözeltiler enjeksiyondan önce 0,22 µm PVDF filtrelerden süzüldükten sonra LC-MS/MS cihazına enjeksiyonları yapılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan LC-MS/MS koşulları aşağıdaki gibidir:

• Hareketli faz: Su (%0,1 formik asit)/Asetonitril (%0,1 formik asit) (50:50, hacim:hacim)

• Akış Hızı: 0,250 mL/dakika

• Enjeksiyon hacmi: 10 µL

MS koşulları aşağıdaki gibi optimize edilmiştir:

• Kurutma gazı (azot) akış hızı: 15 L/dk

• Nebülize edici gaz (azot) akış hızı: 3,0 L/dk

• Çarpışma gazı: Argon

• CDL sıcaklığı: 250 °C

• Isı bloğu sıcaklığı: 450 °C

4. BULGULAR

4.1. Mantarların Moleküler Tür Tanımlaması

Toplanan ve izole edilen mantar türlerinin idendifikasyonunda moleküler düzeyde analizleri yapılmıştır. Toplanan mantar türlerinin kaynağı ve tespit edilen tür adı Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. İzolatların Kaynağı ve Tür Adı

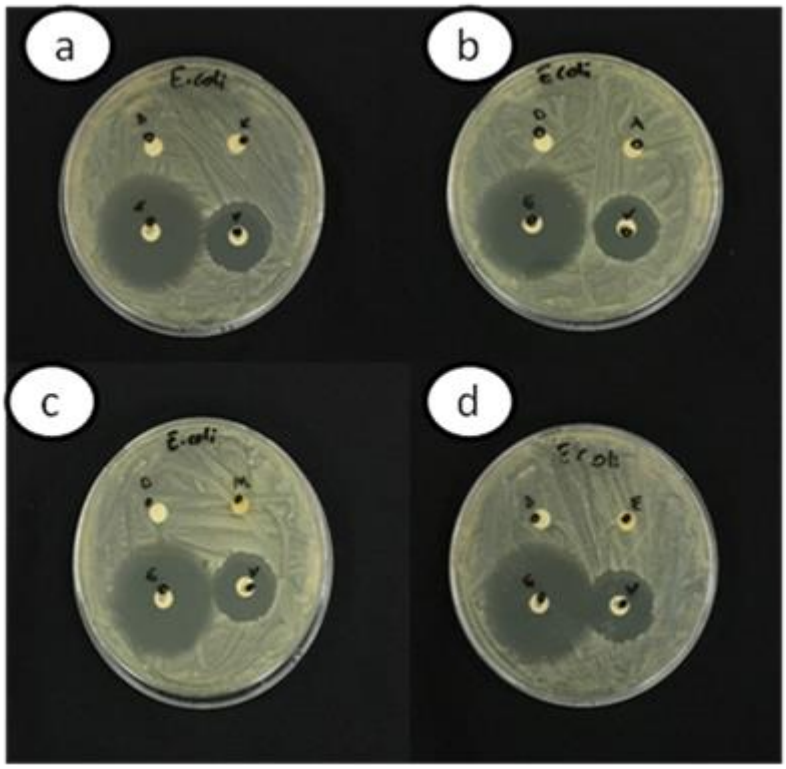
Sıra No	İzolat No	İzole edildiği kaynak	Tür adı
1	İzolat 1	Peynir atığı üzerinden izole edilmiş	*Penicillium chrysogenum*
2	İzolat 2	Bilecik, Pazaryeri (Koordinat: 39° 58′ 12.2664" K ve 29° 57′ 18.9468" D) fasülye tarlası çevresinden toplanan boncuk fasülye türlerinin yetiştirildiği tarla çevresinden toplanan fasülye atıklarından izole edilmiş	*Fusarium oxysporum*
3	İzolat 3	Sivas, Merkez (Koordinat: 39° 75' 05" K ve 37° 01' 50" D) toplanan makromantar türü	*Suillus collinitus*

4.2. Mantarlardan Özüt Elde Edilmesi

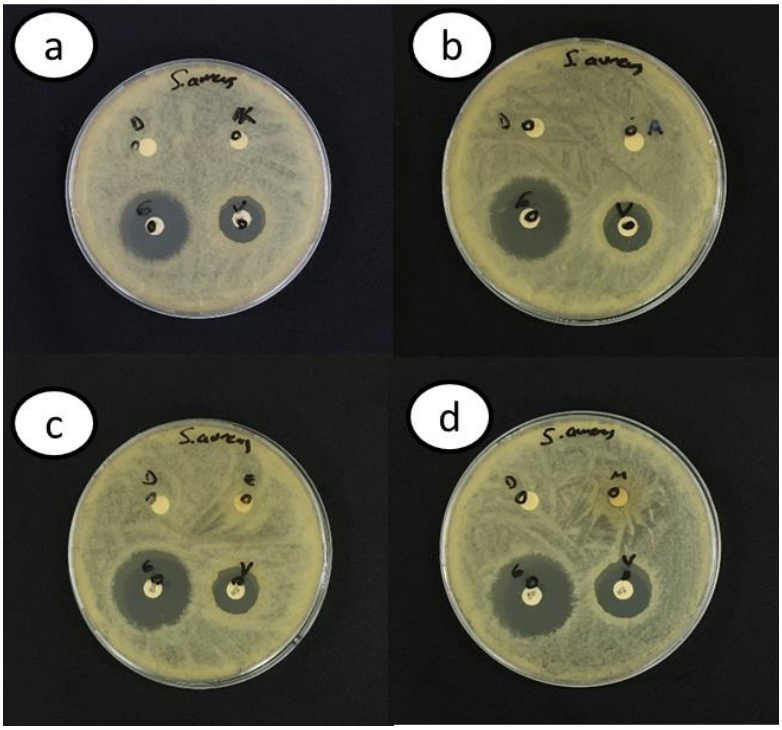
Etanol, metanol, aseton ve kloroform çözücüleri ile elde edilen 4 farklı özütün her biri % 20'lik DMSO ile çözdürülmüş ve stok özütler etiketlenerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Oluşan mantar atıkları ise kurulup toz haline getirilerek ilaç etken maddesi giderimi deneylerinde biyosorbent olarak kullanılmak üzere saklanmıştır.

4.3. Mantarların Antimikrobiyal Aktivitesi

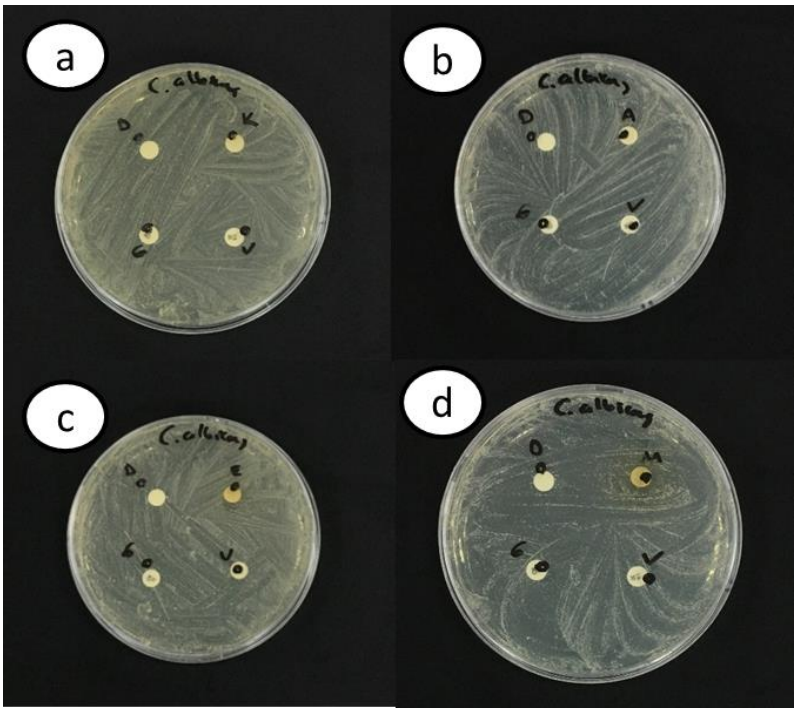
Çalışma kapsamında izolasyonu ve tanımlaması yapılan 3 tür arasında yer alan *Fusarium oxysporum*'un patojen olduğuna dair kaynaklar (Cumagun vd., 2010: 52; Dignani ve Anaissie, 2004: 67; Edel-Hermann ve Lecomte, 2019: 512) göz önünde bulundurulmuş, bu nedenle bu tür antimikrobiyal aktivite deneyleri için seçilmemiştir. İzolasyonu ve tanımlaması yapılan mikromantar türü *Penicillium chrysogenum* ve makromantar türü *Suillus collinitus* türleri ile antimikrobiyal aktivite testleri yapılmıştır. *Suillus collinitus* ile yapılan disk difüzyon testi sonucunda mantar özütlerinin çevresinde belirgin bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir (Şekil 4.1.-4.4.).



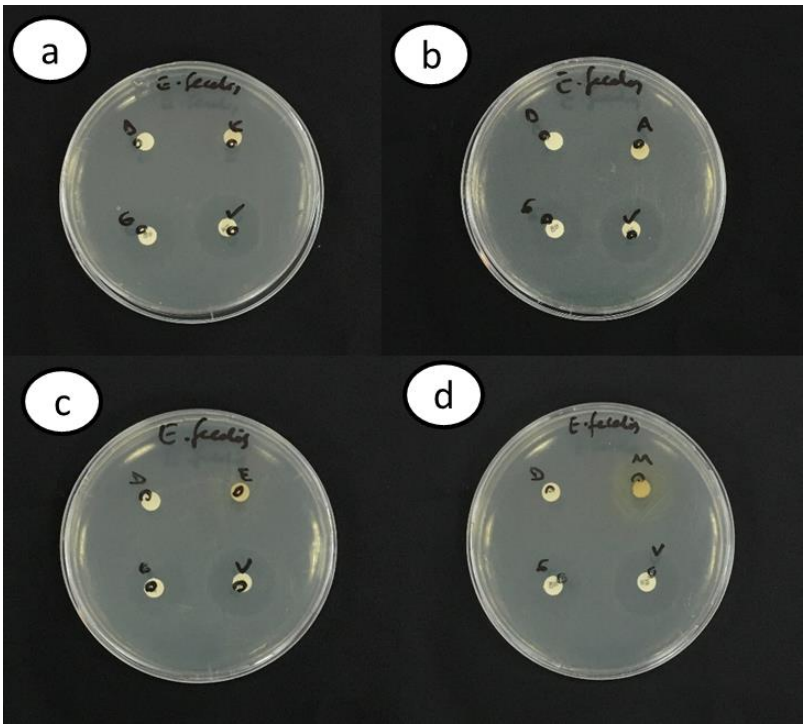
Şekil 4.1. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Esherichia coli* ATCC 35200 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri (D: %20'lik DMSO, G: Gentamisin, V: Vankomisin , K: Kloroform özütü (a), A: Aseton özütü (b), M: Metanol özütü (c), E: Etanol özütü (d)



Şekil 4.2. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri (D: %20'lik DMSO, G: Gentamisin, V: Vankomisin , K: Kloroform özütü (a), A: Aseton özütü (b), E: Etanol özütü (c), M: Metanol özütü (d)



Şekil 4.3. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Candida albicans* ATCC 24433 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri (D: %20'lik DMSO, G: Gentamisin, V: Vankomisin , K: Kloroform özütü (a), A: Aseton özütü (b), E: Etanol özütü (c), M: Metanol özütü (d)



Şekil 4.4. Farklı Çözücüler Kullanılarak *Suillus collinitus* Türünden Elde Edilen Özütün *Enterococcus faecalis* ATCC 29042 Test Mikroorganizması Kullanılarak Yapılan Antimikrobiyal Aktivite Deneyi Sonucunda Elde Edilen Petri Görüntüleri (D: %20'lik DMSO, G: Gentamisin, V: Vankomisin , K: Kloroform özütü (a), A: Aseton özütü (b), E: Etanol özütü (c), M: Metanol özütü (d)

Penicillium chrysogenum mantar türünün 4 farklı çözücü kullanılarak elde edilen özütleri kullanılarak yapılan disk difüzyon testi sonucunda mantar özütleri emdirilmiş disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. incelendiğinde *P. chrysogenum* mantar türünden etanol kullanılarak elde edilen özütlerin gram negatif bir bakteri türü olan *E. coli* ile bir maya türü olan *C. albicans* üzerinde en iyi antimikrobiyal etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan *E. faecalis* üzerindeki animikrobiyal etkisi düşük olmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *Penicillium chrysogenum* Etanol Özütüne Ait İnhibisyon Zonları

Mantar Özütü	**Mikroorganizma adı**	**Deney sonunda ölçülen inhibisyon zonu (mm)**
***Penicillium chrysogenum* etanol özütü**	*Esherichia coli* ATCC 35200	20 ± 0
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	14,5 ± 0,7
	Candida albicans ATCC 24433	19,5 ± 0,7
	Enterococcus faecalis ATCC 29042	10 ± 0

Tablo 4.3 incelendiğinde *P. chrysogenum* mantar türünden metanol kullanılarak elde edilen özütlerin bir maya türü olan *C. albicans* üzerinde en iyi antimikrobiyal etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Gram negatif bir bakteri türü olan *E. coli* ve gram pozitif bir bakteri türü olan *S. aureus* üzeride de antimikrobiyal etkileri olduğu görülürken *E. faecalis* üzerinde animikrobiyal etkisi oldukça düşüktür (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *Penicillium chrysogenum* Metanol Özütüne Ait İnhibisyon Zonları

Mantar Özütü	**Mikroorganizma adı**	**Deney sonunda ölçülen inhibisyon zonu (mm)**
***Penicillium chrysogenum* metanol özütü**	*Esherichia coli* ATCC 35200	17 ± 0
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	17 ± 0
	Candida albicans ATCC 24433	27,5 ± 0,7
	Enterococcus faecalis ATCC 29042	7 ± 0

Tablo 4.4 incelendiğinde *P. chrysogenum* mantar türünden aseton kullanılarak elde edilen özütün *C. albicans* üzerinde en iyi antimikrobiyal etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Gram negatif bir bakteri türü olan *E. coli* ve gram pozitif bir bakteri türü olan *S. aureus* üzeride de antimikrobiyal etkileri olduğu görülürken *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı değerlendirilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *Penicillium chrysogenum* Aseton Özütüne Ait İnhibisyon Zonları

Mantar Özütü	**Mikroorganizma adı**	**Deney sonunda ölçülen inhibisyon zonu (mm)**
***Penicillium chrysogenum* aseton özütü**	*Escherichia coli* ATCC 35200	21 ± 0
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	17 ± 0
	Candida albicans ATCC 24433	29,5 ± 0,7
	Enterococcus faecalis ATCC 29042	-

Tablo 4.5 incelendiğinde *P. chrysogenum* mantar türünden kloroform kullanılarak elde edilen özütün de *C. albicans* üzerinde en iyi antimikrobiyal etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Gram pozitif bir bakteri türü olan *S. aureus* üzerinde de antimikrobiyal etkisi olduğu görülürken *E. coli* ve *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkisi zayıftır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *Penicillium chrysogenum* Kloroform Özütüne Ait İnhibisyon Zonları

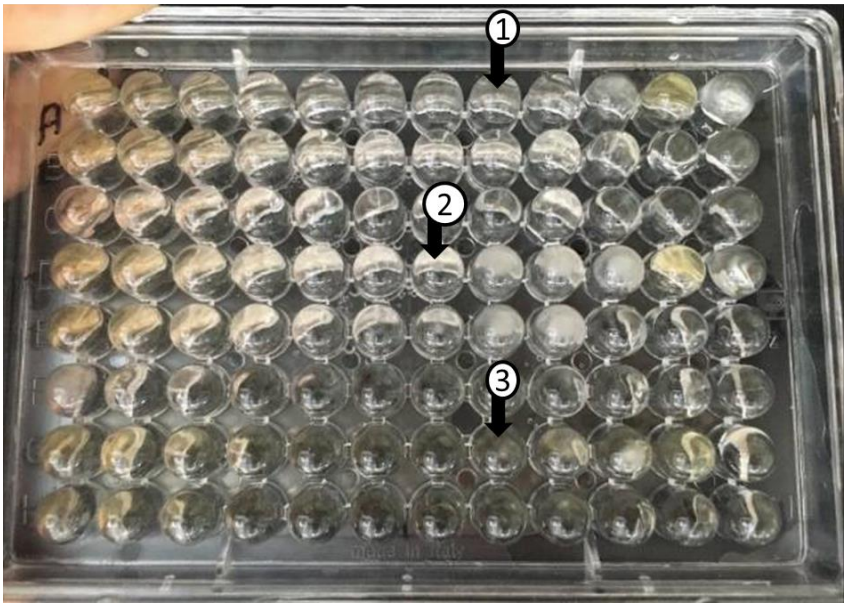
Mantar Özütü	**Mikroorganizma adı**	**Deney sonunda ölçülen inhibisyon zonu (mm)**
***Penicillium chrysogenum* kloroform özütü**	*Escherichia coli* ATCC 35200	10,5 ± 0,7
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	15 ± 0
	Candida albicans ATCC 24433	18 ± 1,4
	Enterococcus faecalis ATCC 29042	8 ± 0

Sonuç olarak *Penicillium chrysogenum* mantar türünden etanol, metanol, aseton ve kloroform olmak üzere dört farklı çözücü kullanılarak elde edilen özütlerin *Enterococcus faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkisi çok düşük olmuştur. *Staphylococcus aureus* üzerinde dört özütün oluşturduğu zon çapları birbirine yakın görülürken, tüm özütler en çok *Candida albicans* üzerinde etkili olmuştur. Genel olarak en etkili özütün ise aseton özütü olduğu görülmüştür.

Disk difüzyon deneyi sonucunda en etkili özüt olan *Penicillium chrysogenum*'un aseton özütü için minimum inhibisyon konsantrasyunu (MİK) deneyi yapılmıştır. Disk difüzyon deneyi sonucunda *Enterococcus faecalis* üzerindeki antibikrobiyal etki çok düşük olduğundan MİK deneyinde bu mikroorganizma kullanılmamıştır. Deney sonucunda *E.coli* için en son üremenin 8. kuyucukta, *S. aureus* için en son üremenin 7. kuyucukta, *Candida albicans* için en son üremenin 8. kuyucukta olduğu görülmüştür. Buna göre MİK değerleri Tablo 4.6'da, mikroplaka görüntüsü Şekil 4.5'te verilmiştir. Tablo 4.6 incelendiğinde *S. aureus* için MİK değerinin daha yüksek olduğu yani *Penicillium chrysogenum* aseton özütünün *E.coli* ve *C. albicans*'a daha etkili olduğu görülmektedir. Bu sonuç aynı özüt ile yapılan disk difüzyon deneyi sonucu ile de uyumludur.

Tablo 4.6. *Penicillium chrysogenum* Aseton Özütünün MİK Değerleri

Mantar Özütü	**Test Mikroorganizması**	**MİK değeri (µg/ml)**
***Penicillium chrysogenum* aseton özütü**	*Esherichia coli* ATCC 35200	3,906 µg/ml
	Staphylococcus aureus ATCC 29213	7,8125 µg/ml
	Candida albicans ATCC 24433	3,906 µg/ml



Şekil 4.5. MİK Deneyi Sonucunda Mikroplakanın Görüntüsü (1: *Esherichia coli* ATCC 35200 Üremesinin Son Görüldüğü 8. Kuyucuk, 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Üremesinin Son Görüldüğü 7. Kuyucuk, 3: *Candida albicans* ATCC 24433 Üremesinin Son Görüldüğü 8. Kuyucuk

4.4. Mantarların Antioksidan Aktivitesi

Antioksidan aktivite tayini için DPPH (Kirby ve Schmidt, 1997: 105) yöntemi kullanılmıştır. Mantar özütlerinin üzerine DPPH çözeltisi eklenerek 30 dakika 25℃'de karanlık ortamda inkübe edildikten sonra örneklerin absorbansı spektrofotometrede 517 nm'de ölçülmüş ve hesaplanan yüzde inhibisyon değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Mantar Özütlerinin Yüzde DPPH İnhibisyonu

Örnek	**Yüzde inhibisyon değerleri**
Penicillium chrysogenum etanol özütü	44,32
Penicillium chrysogenum metanol özütü	-
Penicillium chrysogenum aseton özütü	-
Penicillium chrysogenum kloroform özütü	-
Suillus collinitus etanol özütü	40,66
Suillus collinitus metanol özütü	35,87
Suillus collinitus aseton özütü	25,48
Suillus collinitus kloroform özütü	3,57

Deney sonucunda *Penicillium chrysogenum*'un sadece etanol özütünde antioksidan aktivite görülmüştür. *Suillus collinitus*'un ise etanol ve metanol özütleri, aseton ve kloroform özütlerine göre daha iyi antioksidan aktivite göstermiştir.

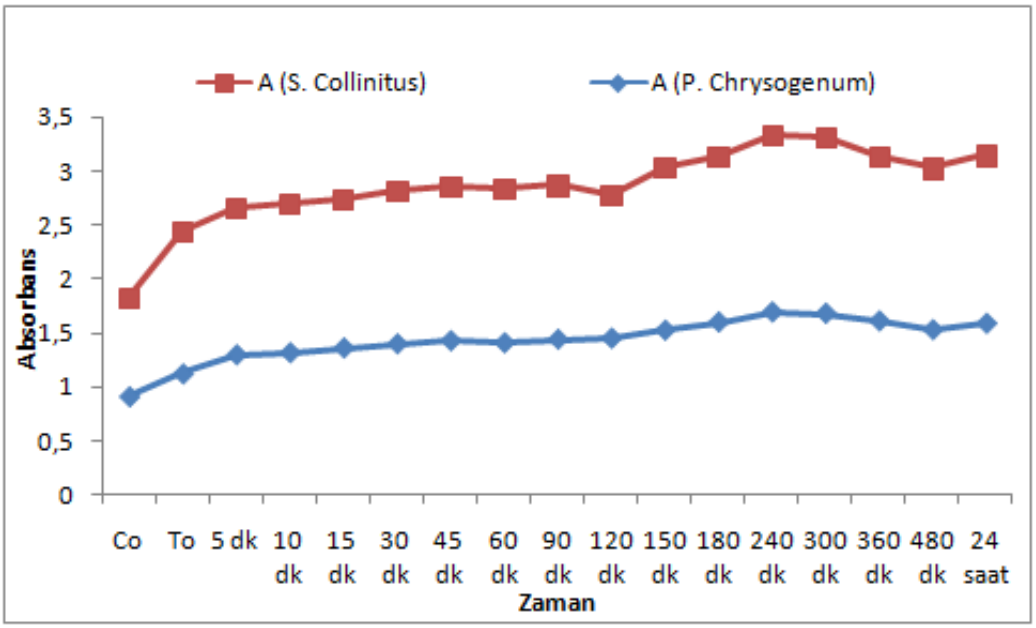
4.5. Tetrasiklin Giderimi Deneyleri

Antimikrobiyal ve antioksidan aktivite deneyleri için mantar türlerinden farklı 4 farklı çözücü (etanol, metanol, kloroform ve asetat) kullanılarak özüt hazırlanmış ve özütleme sonrası açığa çıkan mantar atıkları kurutularak saklanmıştır. Özütleme neticesinde elde edilen kurutulmuş mantar atıklarından elde edilen biyosorbentlerin tetrasiklin giderim potansiyelini araştırmak amacıyla toplam hacmi 10 ml olan biyosorpsiyon deney düzenekleri hazırlanmıştır. Distile su pH sında (6.10) hazırlanan sıvı ortamlara 10 g/L biyosorbent ve 10 mg/L tetrasiklin eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında numuneler 10000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendikten sonra ortamdaki tetrasiklin miktarının tayini için spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Farklı Çözücüler Kullanılarak Hazırlanan Özütlerin Biyosorbent Olarak Kullanıldığı Tetrasiklin Çözeltilerinin Başlangıç (A_0) ve 24 Saat Sonundaki (A_s) Absorbans Değerleri

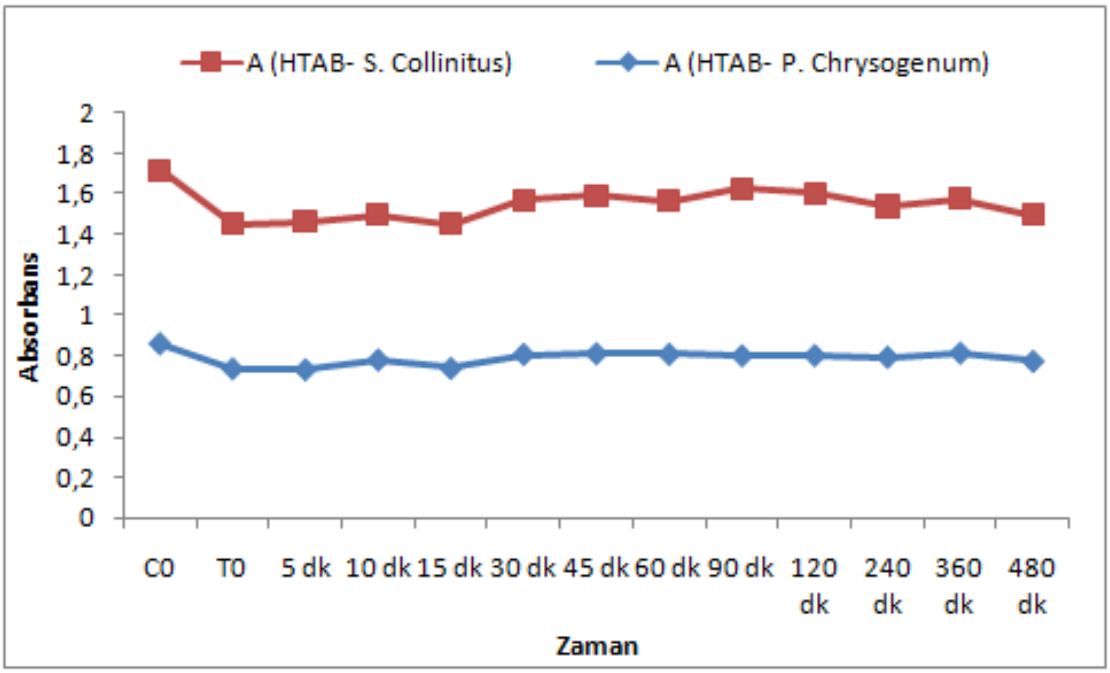
Tetrasiklin Çözeltisine Eklenen Adsorban	**A_0**	**A_s**
S. collinitus etanol özütü atığı	0,2535	1,4015
S. collinitus metanol özütü atığı	0,2515	1,3705
S. collinitus aseton özütü atığı	0,243	1,244
S. collinitus kloroform özütü atığı	0,2405	1,7795
S. collinitus	0,230	1,9045
P. chrysogenum etanol özütü atığı	0,2585	0,5005
P. chrysogenum metanol özütü atığı	0,22675	0,440
P. chrysogenum aseton özütü atığı	0,235	1,1715
P. chrysogenum kloroform özütü atığı	0,237	1,269
P. chrysogenum	0,253	1,7625
Kontrol (adsorban içermeyen tetrasiklin çözeltisi)	0,234	0,234

Farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan özütlerin atığından elde edilen biyosorbentlerin tetrasiklin giderimi deneyleri sonucuna göre tüm biyosorbentlerde son absorbans değerlerinin (A_s) başlangıç değerlerinden (A_o) yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.8). Tablo 4.8 incelendiğinde, sadece tetrasiklin içeren kontrol düzeneğinin ise başlangıç ve son absorbans değerlerinde değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu sonuçlar neticesinde 24 saatlik sürenin tetrasiklin takibini etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle benzer şekilde 50 ml'lik deney düzenekleri hazırlanmış ve sadece *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* mantar türlerinin metanol özütü sonrası elde edilen kurtulmuş biyosorbentleri kullanılarak 25 mg/L tetrasiklin giderimi incelenmiştir.



Şekil 4.6. *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* Mantar Türlerinin Kurutulmuş Biyosorbentleri Kullanılarak 25 mg/L Tetrasiklin Gideriminin Zamana Bağlı Adsorbans Değerleri (C_0: başlangıç tetrasiklin; T_0: Biyosorbent eklendikten sonra okunan absorbans değeri)

Şekil 4.6 incelendiğinde; her iki mantar türünün bulunduğu çözeltinin 300. dakikadan sonra absorbans değerinin düştüğü 480. dakikadan sonra belirgin bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Öte yandan elde edilen sonuçlara göre biyosorpsiyon düzenekleri içerisinde mantar ve tetrasiklinin etkileştiği ve bunun sonucu oluşan maddelerin çözeltinin absorbans değerini etkilediği belirlenmiştir. Mantar ve tetrasiklin etkileşimini en aza indirmek ya da engellemek amacıyla mantar biyosorbentlerin yüzeyi yüzey aktif madde ile kaplanmıştır. Çeşitli adsorbanlara uygulanan kimyasal modifikasyonun adsorban verimliliğini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Belachew ve Hinsene, 2020: 2; Mohamed Pauzan ve Ahad, 2018: 1). Bu nedenle kullanılacak adsorbanlar katyonik bir yüzey aktif madde olan Hegzadesiltrimetil Amonyum Bromür (HTAB) ile modifiye edilerek deney tekrarlanmıştır.

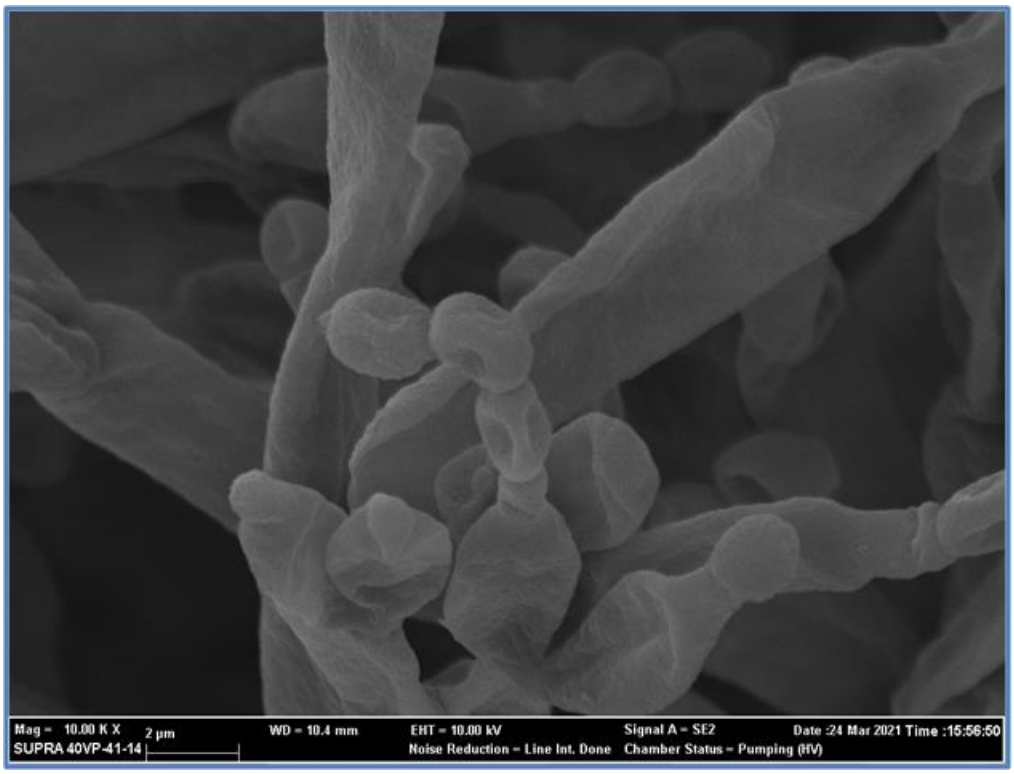


Şekil 4.7. *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* Mantar Türlerinin Kurutulmuş ve HTAB ile Modifiye Edilmiş Biyosorbentleri Kullanılarak 25 mg/L Tetrasiklin Gideriminin Zamana Bağlı Adsorbans Değerleri (C_0: başlangıç tetrasiklin; T_0: Biyosorbent eklendikten sonra okunan absorbans değeri)

Şekil 4.7 incelendiğinde modifiye biyosorbentlerle tetrasiklin giderimine ait absorbans değerlerinin düştüğü ve tetrasiklin mantar etkileşiminin sonucu oluşan maddelerden kaynaklı absorbansta artış olmadığı belirlenmiştir. Kullanılan katyonik yüzey aktif madde olan HTAB ile kaplanan biyosorbentin tetrasiklin giderimini gerçekleştirdiği saptanmıştır. Kontrol olarak kullanılan sadece tetrasiklin ve HTAB bulunan deney düzeneklerinin absorbans değerlerinde belirgin bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Öte yandan HTAB modifiye *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* mantar türlerinin tetrasiklin giderimleri sırasıyla % 9,90 ve % 15,03 olarak hesaplanmıştır. Tetrasiklin giderim yüzdeleri oldukça düşük olduğu için optimizasyon deneylerine devam edilmemiştir. Bunun yerine hem antimikrobiyal etki gösteren hem de çok az da olsa tetrasiklin giderimi yapabilen *P. chrysogenum* türünden elde edilen biyosorbent yüzeyi ile yüzey aktif madde ve tetrasiklin etkileşimlerini incelemek amacıyla SEM ve FTIR analizleri yapılmıştır.

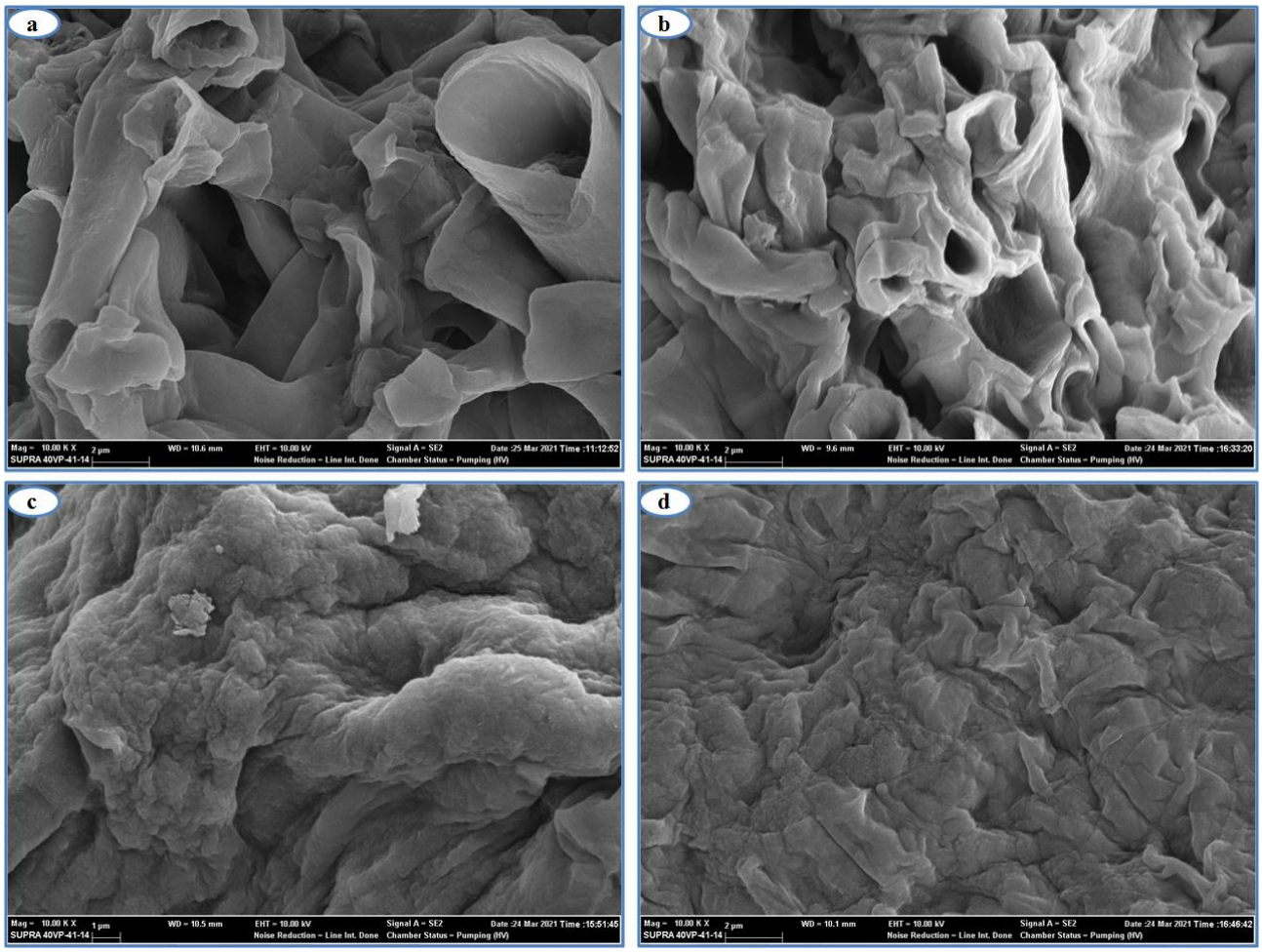
4.6. SEM Analizi

Çalışmada antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenen *P. chrysogenum* mantar türüne ait SEM görüntüsü Şekil 4.8.'de verilmiş olup, şekil incelendiğinde mantar türüne ait hif yapısı ve türe özel tipik konidiospor yapıları belirgin bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.8. Çalışmada İzole Edilen *P. chrysogenum* Mantar Türüne Ait SEM Görüntüsü (Büyütme: 10000 X)

P. chrysogenum mantar türünün metanol özütü sonrası elde edilen kurutulmuş biyosorbentinin ve aynı türe ait HTAB ile modifiye edilmiş biyosorbentinin tetrasiklin (25 mg/L) giderimi öncesi ve sonrası SEM görüntüleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

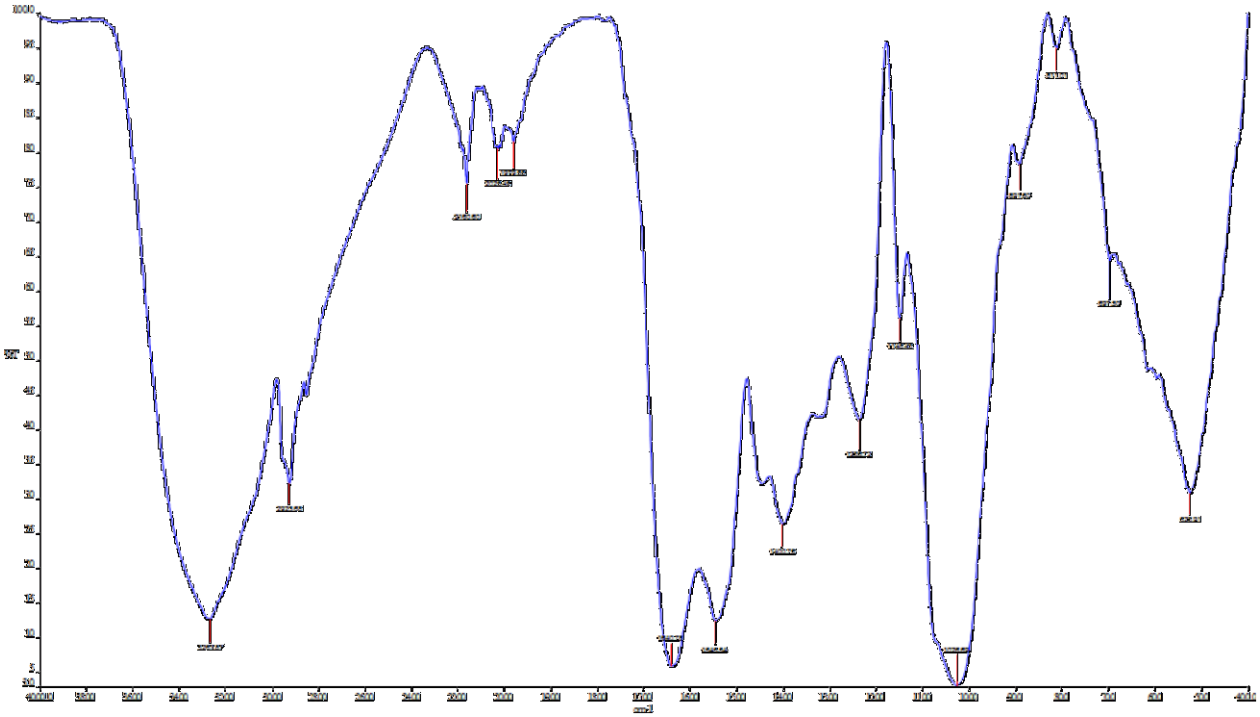


Şekil 4.9. *P. chrysogenum* Mantar Türüne Ait Biyosorbentin SEM Görüntüleri (a: *P. chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbent; b: Tetrasiklin Giderimi Sonrası *P. Chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbent; c: HTAB ile Modifiye Edilmiş *P. Chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbent; d: Tetrasiklin Giderimi Sonrası HTAB ile Modifiye Edilmiş *P. chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbent; Büyütme: 10000 X)

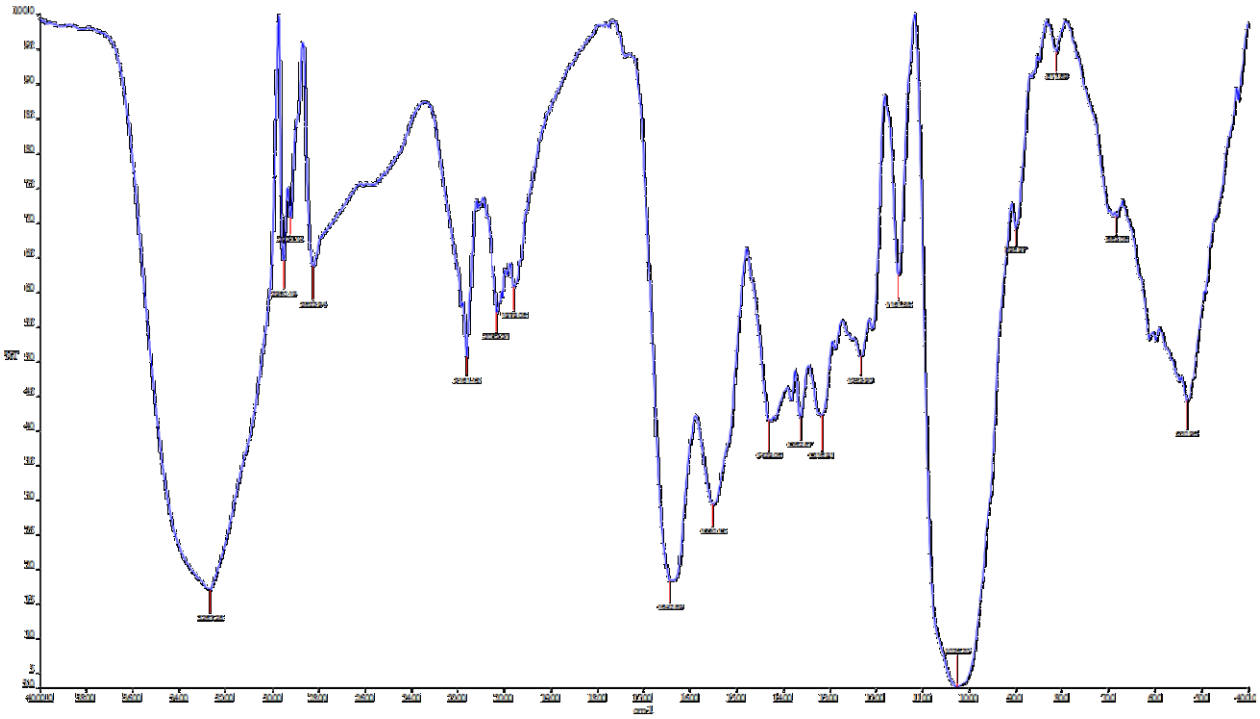
Şekil 4.9. incelendiğinde metanol ekstraksiyonu sonrası elde edilen biyosorbentin (a) hif yapılarının parçalandığı görülmektedir. Aynı biyosorbentin tetrasiklin muamelesi sonrasında (b) hif yapısının daha fazla parçalandığı ve hatta hiflerin büzüştüğü görülmektedir. Aynı biyosorbentin HTAB modifikasyonu sonrasında (c) hif yapılarının korunduğu, hiflerin arasındaki boşlukların kaplandığı ve yüzeydeki girinti çıkıntıların artarak yüzeyin genişlediği görülmüştür. HTAB ile modifiye biyosorbentin (d) tetrasiklin muamelesi sonrasında hifsel yapıların ayırt edilemediği ancak yüzey girinti çıkıntılarının azaldığı görülmüştür. Bu durum da tetrasiklinin yüzeye adsorbe olduğunu kanıtlamaktadır (Cai vd., 2019: 13).

4.7. FT-IR Analizi

Metanol özütü sonrası elde edilmiş *P. chrysogenum* örneklerinin tetrasiklin giderimi öncesi ve sonrasında elde edilen FT-IR analizi sonuçları sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. İki şekil incelendiğinde bazı bantlarda kayma olduğu, bazılarının ise tetrasiklin muamelesi sonucu yeni oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). FT-IR analizindeki değişiklikler Tablo 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.10. *P. chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbentinin FTIR Analizi



Şekil 4.11. Tetrasiklin Giderimi Sonrasında *P. chrysogenum* Türünün Metanol Özütü Sonrası Elde Edilen Biyosorbentin FT-IR Analizi

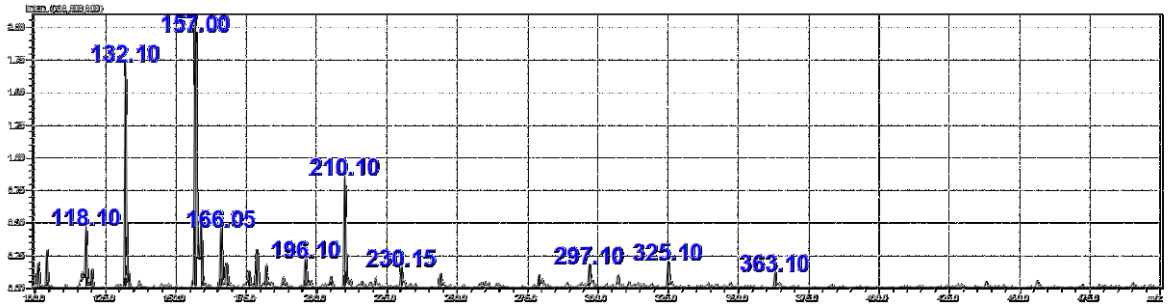
Tablo 4.9. Tetrasiklin Muamelesi Öncesi Ve Sonrasındaki FT-IR Analizindeki Değişiklikler

Dalgaboyundaki değişiklik	**İlgili Molekül** (Dzurendova vd., 2020; Salman vd., 2010)
Tetrasiklin öncesinde var olan 2950,191 cm^{-1}'deki bant Tetrasiklin muamelesi sonrası kaybolmuş.	-C-H (C) bağ gerilmesi (lipitler)
Tetrasiklin öncesinde var olan 2921,14 cm^{-1}'deki bant 2923,12 cm^{-1}'ye kaymış	>CH_2 açil zinciri (lipitler)
Tetrasiklin öncesinde var olan 2822,94 cm^{-1}'deki bant 2852,38 cm^{-1}'ye kaymış	-C-H (CH_2) bağ gerilmesi (lipitler)
Tetrasiklin öncesinde var olan 1979,08 cm^{-1}'deki bant 1743,19 cm^{-1}'ye kaymış	-C=O esterlerde bağ gerilmesi (lipitler)
Tetrasiklin öncesinde var olan 1642,89 cm^{-1}'deki bant 1629,96 cm^{-1}'ye kaymış	-C=O bağ gerilmesi, amit I (proteinler, kitin)
Tetrasiklin öncesinde var olan 1550,13 cm^{-1}'deki bant 1566,21 cm^{-1}'ye kaymış	-C-N-H deformasyonu amit II (proteinler, kitin)
Tetrasiklin muamelesi sonrasında 11077,87 cm^{-1}'de yeni bir bant oluşmuş	C-O ve C-O-C bağ gerilmesi (karbonhidratlar)

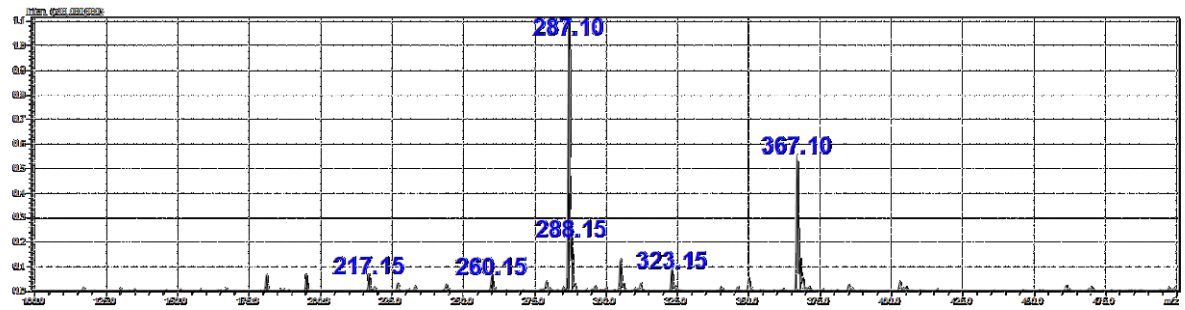
Tablo 4.9 incelendiğinde tetrasiklin muamelesi sonrasında hücre yüzeyindeki lipit, protein ve karbohidrat moleküllerinin yapısına katılan bağlarda değişiklikle olduğu görülmektedir. Bu değişikler tetrasiklin molekülü ile biyosorbent yüzeyinin etkleşime girdiği ve hatta bazı bağları deforme ettiğini kanıtlamaktadır. Tetrasiklin antibiyotiğinin etki mekanizmasını bakterilerde ribozoma bağlanarak protein sentezini inhibe etme suretiyle gerçekleştirdiği bilinmektedir (Dürckheimer, 1975: 232). Bu çalışma sonuçlarına göre tetrasiklin mantar hücre yüzeyindeki moleküllerle de etkileşim göstermekte ve yüzey yapısında değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler sonucu açığa çıkan moleküller spektral analiz sonuçlarını etkilemekte ve tetrasiklinin spektral takibini engellemektedir.

4.8. LC-MS/MS Çalışmaları

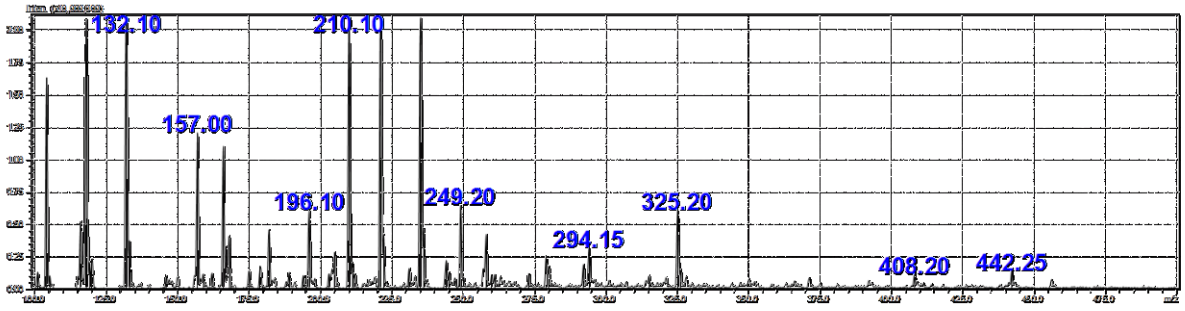
Çalışma sonucunda *Penicillium chrysogenum*'un aseton, etanol, metanol ve kloroform özütlerinde LC-MS/MS yöntemi ile pozitif ve negatif iyonlaşma modlarında m/z taramaları sonucu spektrumlar elde edilmiştir (Şekil 4.12- 4.19).



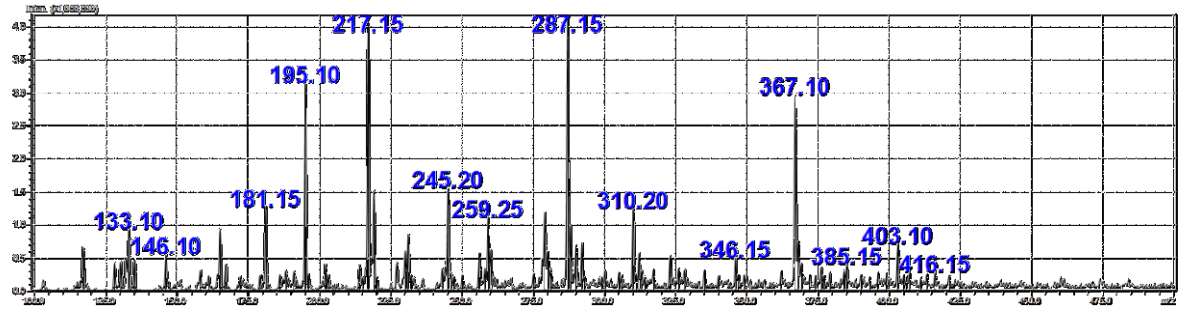
Şekil 4.12. Aseton Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)



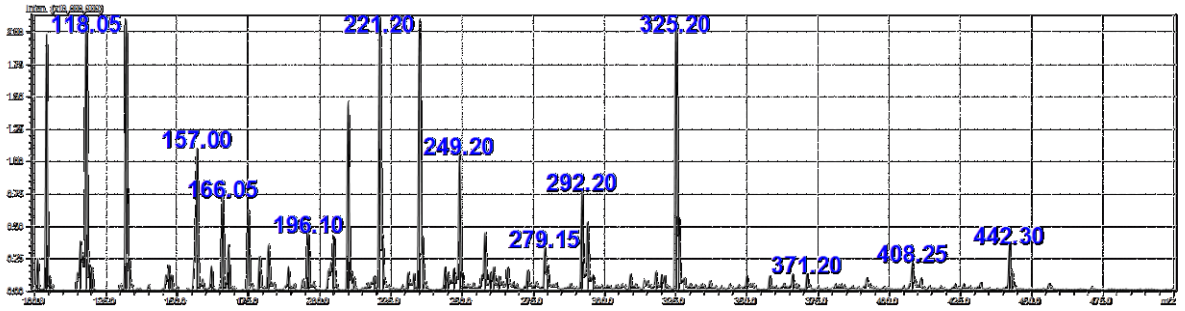
Şekil 4.13. Aseton Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)



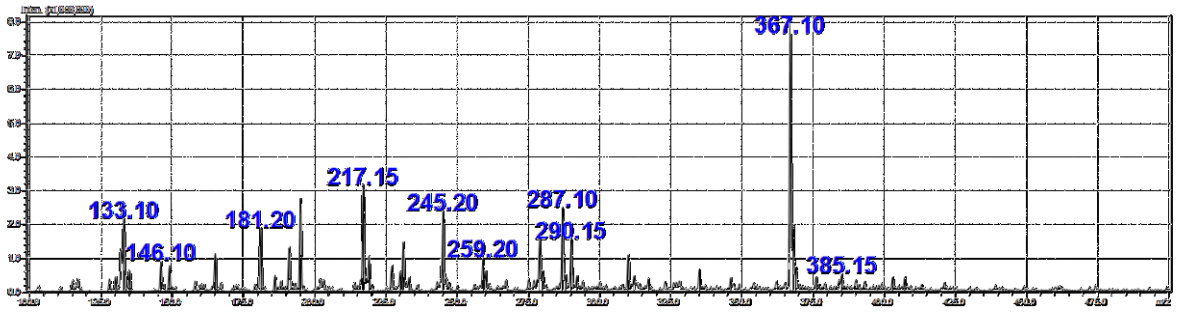
Şekil 4.14. Etanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)



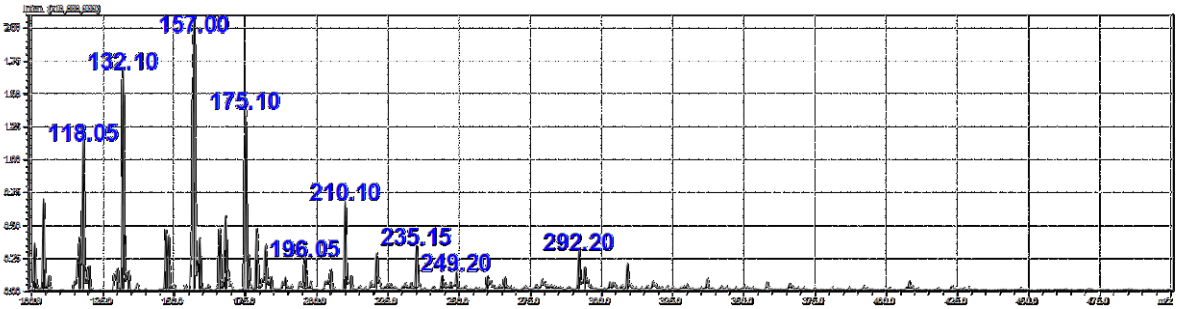
Şekil 4.15. Etanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)



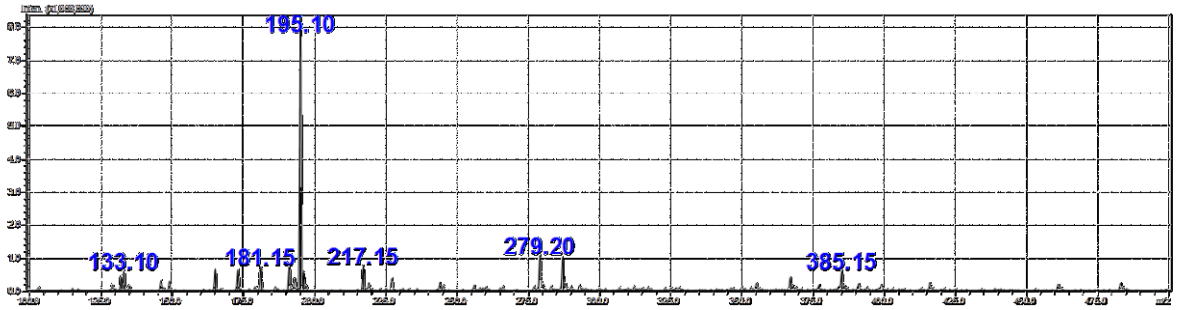
Şekil 4.16. Metanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)



Şekil 4.17. Metanol Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)



Şekil 4.18. Kloroform Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI +) Modu)



Şekil 4.19. Kloroform Özütü LC-MS/MS Yöntemi Spektrumu ((ESI -) Modu)

Penicillium chrysogenum'un 4 farklı özütünde aynı m/z değerleri gözlemlenmiştir. Tüm spektrumlar incelendiğinde kloroform özütü hariç tüm özütlerde özellikle 367.10 değeri dikkat çekmektedir (Şekil 4.12-4.19).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda kullanılan mantar türünün, moleküler tanımlanması sonucunda, *Penicillium chrysogenum* ve *Suillus collinitus* olduğu belirlenmiştir.

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre, *Penicillium chrysogenum* türünün aseton özütünün en yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları arasında karşılaştırma yapıldığında, gram negatif bakterinin gram pozitif bakterilerden daha duyarlı olduğu, maya mantarının ise bakterilerden daha duyarlı olduğu söylenebilir. Bakteriler arasında en dirençli türün *E. faecalis,* en duyarlı türün ise *E.coli* olduğu görülmektedir.

Disk difüzyon testinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösteren *Penicillium chrysogenum* aseton özütü ile yapılan MİK belirleme testinde *Penicillium chrysogenum* aseton özütünün *E. coli* ve *C. albicans*'a daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuç aynı özüt ile yapılan disk difüzyon testi sonucu ile uyumludur.

Penicillium cinsinin mantarlarının biyolojik olarak aktif ikincil metabolitler ürettiği bilinmektedir. Tarımsal-endüstriyel atıklar kullanılarak *Penicillium chrysogenum* IFL1 tarafından antimikrobiyal metabolitlerin üretildiğini doğrulamak amacıyla yapılan bir çalışmada *P. chrysogenum* IFL1, üzüm artığı ve peynir altı suyunda 7 günlük kültüre alındıktan sonra antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Üzüm artığı ve peynir altı suyu kültürlerinden elde edilen her iki süzüntü de gram pozitif bakteriler olan *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'un büyümesini inhibe ederken *E. coli* ve *Candida tropicalis*'e etkileri olmamıştır (Lopes vd., 2013: 773). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmada olduğu gibi *Staphylococcus aureus*'a etkili olmasının yanında *E. coli* ve *C. albicans*'a da etkili olduğu görülmüştür. Özütleme işlemindeki farklılık çalışma sonuçlarında farklılığa neden olmuş olabilir.

Yumuşak mercan örneğinden izole edilen *P. chrysogenum* 045-357-2 fungal suşunun *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecalis, Listeria monocytogenices* ve *Candida albicans* gibi patojenik mikroorganizmlara karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Mantar izolatının etil asetat özütleri ile yapılan disk difüzyon deneyi sonucunda *C. albicans* dışındaki mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite görülmüştür. En yüksek antimikrobiyal aktivite *S. aureus* üzerinde görülürken, en düşük antimikrobiyal aktivite ise *E. coli*'ye karşı görülmüştür (Thi vd., 2016: 730). *S. aureus*'a ve *E. coli*'ye karşı görülen antimikrobiyal aktivite yönüyle bizim çalışmamızla benzerken, *C. albicans*'a etkisiz olması bakımından farklı sonuç görülmüştür. Bu farklılığın özütleme sırasında kullanılan çözücüden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

20 mantar türünün hücre içi ve/veya hücre dışı metabolitlerinin iki maya ve yedi bakteriye (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* NRRL-B-3567, *Salmonella typhimurium* NRRL-B-4440, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* NRRL-B-4377, *Bacillus subtilis* NRRL-B-558, *Candida albicans* ATCC 10259, *Saccharomyces cerevisiae* NRRL-Y-2034) karşı antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada *Hygrophorus agathosmus*'un kloroform özütünün ve *Suillus collinitus*'un diklorometan özütünün, hem maya hem de bakterilere karşı en aktif özütler olduğu görülmüştür. *Suillus collinitus*'un diklorometan özütünün, *P. aeruginosa* hariç tüm test mikroorganizmalarına karşı etkin olduğu çalışmada *Suillus collinitus*'un etil asetat ve etanol özütleri de test edilmiştir. Disk difüzyon testinde etil asetat özütü *Salmonella typhimurium, Staphylococcus epidermidis* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı 10-15 mm inhibisyon zonu oluşturken, diğer mikroorganizmalara etkisi olmamıştır. Etanol özütünde ise sadece *Staphylococcus aureus*'un etrafında 10 mm'den az inhibisyon zonu oluşmuştur (Yamaç ve Bilgili, 2006: 663). Etanol özütünün aktivitesi bizim çalışmamızla kıyaslandığında, çalışmalarımızda ortak mikroorganizmalar olan *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite görülmemesi yönüyle benzer sonuca ulaşılmıştır.

Literatürde *Suillus collinitus*'un antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır. Başka bir Suillus türü olan *Suillus luteus*'un çeşitli özütlerinin antioksidan, antimikrobiyal ve anti-proliferatif aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada *S. luteus*'un metanol ve etanol özütlerinin, DPPH radikaline karşı antioksidan aktivitelerinin olduğu görülürken, test edilen mantar özütlerinin test edilen mikroorganizmalara karşı nispeten düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip (9 ve 10 mm zonçapı) olduğu görülmüştür (Aytar vd., 2020: 380). *Lactarius deterrimus, Suillus collinitus, Boletus edulis, Xerocomus chrysenteron*'un metanolik özütlerinin antioksidan aktiviteleri açısından analiz edildiği bir çalışmada *L. deterrimus* ve *B. edulis* en güçlü antioksidan aktivite gösteren türler olmuştur. *S. collinitus*'un toplam flavonoid içeriğinin ise diğer mantarlardan üstün olduğu bulunmuştur. DPPH metodu ile yapılan antioksidan aktivite testinde BHT'nin DPPH inhibisyonu % 92,26 iken *S. collinitus*'un DPPH inhibisyonu % 88,27 bulunmuştur (Sarikurkcu vd., 2008: 6654). Bizim çalışmamızda ise BHT'nin DPPH inhibisyonu % 39,36 iken *S. collinitus*'un DPPH inhibisyonu etanol özütü için % 40,66, metanol özütü için % 35,87 bulunmuştur. Her iki çalışmada da *S. collinitus*'un metanol özütünün antioksidan aktivitesinin olduğu görülmüştür.

Suillus collinitus (Fr.) Kuntze mantarının etanol özütünün element içeriğinin, toplam antioksidan durumunun, toplam oksidan durumunun ve oksidatif stres indeksinin belirlenmesini amaçlayan çalışmanın sonucunda *S. collinitus* mantarının doğal bir antioksidan kaynağı olabileceği belirtilmiştir (Bal, 2021: 353). Bizim çalışmamızda da *S. collinitus*'un etanol özütünün antioksidan aktivitesinin olduğu görülmüştür.

Penicillium suşları, antibakteriyel madde ve antioksidanlar üretme konusunda muazzam bir potansiyele sahiptir. Antioksidan bir madde olan 2,3-dihidroksi benzoik asit, *P. roquefortii*'den izole edilmiş, *P. citrinum*'un kültür suyunda ise yeni tip antioksidanların üretildiği bildirilmiştir (Sharaf vd., 2016: 204).

Atık sudan izole edilen Penicillium cinsi iki mantar türünün biyolojik ve kimyasal aktivitesinin incelendiği bir çalışmada seçilen mantar türleri için DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi, toplam antioksidan aktivite, Fe2 + -şelasyon kabiliyeti ve Fe3 +-düşürme gücü gibi, farklı antioksidan aktivite deneyleri kullanılmıştır. *Penicillium chrysogenum* etanolik özütünün, toplam fenolik içeriğinin daha yüksek olduğu ve ve toplam antioksidan kapasitesi ile demir iyonu şelatlama yeteneğinin daha iyi olduğu bulunmuştur. *Penicillium fumiculosum* etanolik özütü ise, daha yüksek DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi göstermiştir (Jakovljević vd., 2014: 43). Bizim çalışmamızda da *Penicillium chrysogenum*'un diğer özütlerinde antioksidan aktivite görülmezken etanolik özütünün antioksidan aktivitesinin olduğu görülmüştür.

Tuz Gölü'nün farklı bölgelerinden izole edilen *Penicillium* cinsine ait 38 izolatın serbest radikal süpürücü etkisinin incelendiği çalışmada %70'in üzerinde (%72) serbest radikal süpürücü aktivite gösteren bir mantar seçilmiş ve toplam fenolik madde içeriğinin de oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Antioksidan ve toplam fenol miktarları yüksek olan türün klasik ve moleküler tanımlaması sonucunda *Penicillium chrsogenum var. chrsogenum* olduğu belirlenmiştir (Canturk vd., 2013: 3). Çalışmamızda *Penicillium chrysogenum*'un etanol özütünde antioksidan aktivite görülürken diğer özütlerinde antioksidan aktivite görülmemesinin nedeni kullanılan çözücüler olabilir.

Çalışmamızda katyonik yüzey aktif madde olan HTAB ile kaplanan *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* mantarlarının atıklarının tetrasiklin giderimini gerçekleştirdiği ancak bu oranın oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedenleri mantar ile tetrasiklinin etkileşimleri ve mantarların direkt olarak kendilerinin kullanılmaması olabilir.

Literatürde tetrasiklin grubu antibiyotiklerin gideriminde çeşitli mantarların kullanıldığı görülmektedir. Wen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Phanerochaete chrysosporium* tarafından üretilen lignin peroksidaz (LiP)'ın tetrasiklin (TC) ve oksetetrasiklin (OTC)'i in vitro olarak parçalama konusunda güçlü bir yeteneğe sahip olduğu görülmüştür (Wen vd., 2009: 1006).

Tetrasiklin gideriminde etkili olduğu görülen *Bacillus cereus*'un, *Penicillium chrysogenum* Y5 ile immobilize edilmesiyle oluşan kombinasyonun tetrasiklin giderme yüzdesini yükselttiği görülmüştür. SEM analizi sonuçları, birçok *Bacillus cereus* suşu hücresinin mantar yüzeyinde başarılı bir şekilde adsorbe edilebileceğini doğrularken, FT-IR spektroskopi analizinden, hidroksil, karbonil, karboksil ve amino gruplarının immobilizasyon topakları açısından zengin olduğu ve bunun atık sudaki tetrasiklinin gideriminde fayda sağlayacağı belirtilmiştir (Wu vd., 2020: 471).

Penicillium commune, Epicoccum nigrum, Trichoderma harzianum, Aspergillus terreus ve *Beauveria bassiana* mantarlarının oksitetrasiklin (OTC)'in bozunmasına etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada maruziyetin üçüncü gününden sonra miselyumda adsorbe edildiği için kültür ortamındaki OTC miktarının azaldığı görülmüştür. Mantar suşlarının, 15. günde OTC'yi %78'e varan oranlarda parçalayabilmesi nedeniyle biyoremediasyon potansiyeline sahip oldukları belirtilmiştir (Ahumada-Rudolph vd., 2021: 5).

Bir veteriner hastanesinin atık suyundaki yedi farklı gruba (b-laktamlar, florokinolonlar, makrolidler, metronidazoller, sülfonamidler, tetrasiklinler ve trimetoprim) ait kırk yedi antibiyotiğin giderimi için alternatif bir atık su arıtımı olarak mantar (*Trametes versicolor* ATCC 42530) kullanılmıştır (Lucas vd., 2016: 301). Antibiyotiklerin % 77'sinin fungal arıtımdan sonra giderildiğinin görülmesi, geleneksel arıtım tesislerine oranla yüksek bir oran olarak ifade edilmiştir.

Suda ve arkadaşları redoks mediatörü 1-hidroksibenzotriazol (HBT) varlığında beyaz çürüklük mantar *Trametes versicolor*'dan lakkaz ile tetrasiklin (TC), klortetrasiklin (CTC), doksisiklin (DC) ve oksetetrasiklin (OTC) giderimi yapmışlardır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, DC ve CTC'nin 15 dakika sonra tamamen ortadan kaldırıldığını, TC ve CTC'nin 1 saat sonra ortadan kaldırıldığını göstermiştir. Bu sonuçlar, tetrasiklin antibiyotiklerin (TC, CTC, DC ve OTC) redoks mediatör HBT varlığında ligninolitik enzim olan lakkazla etkili bir şekilde elimine edildiğini ve ekotoksisitelerinin giderilmesinde etkili olduğunu göstermektedir (Suda vd., 2012: 498).

Kip ve Açikel ise Candida türü (*Candida lipolytica, Candida membranaefaciens, Candida tropicalis, Candida utilis*) mayaların ve *Rhizopus delemar* mantarının kitosana tutuklanması ile hazırlanan biyokompozitlerle tetrasiklin adsorpsiyonunu incelemişlerdir (Kip ve Açikel, 2019: 1417). Kitosan-mikroorganizma biyokompozitleri için TC giderimi sadece kitosana göre daha yüksek bulunmuş ve bu çalışma ile yeni kitosan-mikroorganizma biyokompozitlerinin tetrasiklin giderimi için alternatif olacağı düşünülmüştür.

Yukarıdaki çalışmalarda genel olarak mantarların enzimatik aktivitelerinden yararlanıldığı görülmektedir. Bunlardan farklı olarak Menk ve arkadaşları ise parasetamol ve 17 a-etinil estradiol (EE2) giderimi için *Agaricus bisporus, Lentinula edodes* mantarlarından elde edilen atıkları kullanmışlardır. Çalışmada EE2 ve parasetamol adsorpsiyonunda iyi sonuçlar alınması mantar üretiminden kaynaklanan atıkların biyosorbent olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Menk vd., 2019: 7).

Literatürde *P. chrysogenum* ve *S. collinitus* mantarlarının kendileri veya atıklarıyla yapılmış tetrasiklin giderimi çalışmalarına rastlanmamıştır. Çeşitli mantarlarla ve mantarlardan elde atıklarla yapılan ilaç etken maddeleri giderimi çalışmaları göz önüne alınarak tez çalışması sırasında oluşan mantar atıklarının bu şekilde değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Çalışma sonucunda tetrasiklin giderimi az bulunduğundan kullandığımız mantar atıklarının biyosorbent olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği yönünde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yaptığımız çalışma ve literatür çalışmaları arasındaki benzer ve farklı sonuçlar değerlendirildiğinde mantarların biyolojik aktivitelerinin çeşitli değişkenlerden etkilenebildiği görülmektedir. Mantar türünün temel değişken olmasının yanında aynı mantar türünden farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütler de farklı aktiviteler göstermektedir. Bunlara ilaveten biyolojik aktivitesi baskın olan *P. chrysogenum* türünden elde edilen özütlerdeki maddeler LC-MS/MS yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Özellikle m/z değerlerinden bu mantar türünün metabolitleri literatürde aranmış ancak eşleştirme yapılamamıştır. Literatür bilgisine göre biyolojik aktiviteye sahip mantar metabolitlerinin belirlenmesi için bu analizin yanı sıra başka analizlere de ihtiyaç duyulmaktadır (Liu vd., 2021: 12). Yapılan analiz sonucuna göre *Penicillium chrysogenum* türünün 4 farklı özütünde aynı m/z değerleri gözlemlenmiş ve bunların biyolojik aktiviteden sorumlu maddeler olabileceği düşünülmüştür. Metabolitlerin aydınlatılması üzerine ve yeni analizlerin yapılması üzerine çalışmalar bu tez çalışması sonrasında devam edecektir.

Mantarların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinde mantar türüne, özütlemede kullanılan çözücüye, deneysel yöntemlere göre farklılıklar görülebilmektedir. Tez çalışması kapsamında toplanıp tanımlamaları yapılan *Penicillium chrysogenum* ve *Suillus collinitus* mantarlarından çeşitli çözücülerle elde edilen özütlerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. *P. chrysogenum* mantar türünde antimikrobiyal aktivite görülürken, *S. collinitus* mantar türünde antimikrobiyal aktivite görülmemiştir. Antioksidan aktivite ise *P. chrysogenum*'un etanol özütünde ve *S. collinitus*'un etanol, metanol ve aseton özütlerinde görülmüştür. Oluşan mantar atıklarının tetrasiklin giderim yüzdeleri ise düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak tez çalışmamız kapsamında mantar özütlerinin biyolojik aktiviteleri olduğu görülmüştür. *P. chrysogenum* ile ilgili çalışmaların yanında *S. collinitus* ile yapılan çalışmaların az olması ve bu mantarların ilaç etken maddesi gideriminde biyosorbent olarak kullanım potansiyelleri ile ilgili yeterli çalışmanın olmaması nedeniyle tez çalışmamızın literatüre katkı sunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

Adetunji, M. C., Aroyeun, S. O., Osho, M. B., Sulyok, M., Krska, R., & Mwanza, M. (2019). Fungal metabolite and mycotoxins profile of cashew nut from selected locations in two African countries. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *36*(12), 1847–1859.

Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, *6*(3), 191–199.

Ahumada-Rudolph, R., Novoa, V., Becerra, J., Cespedes, C., & Cabrera-Pardo, J. R. (2021). Mycoremediation of oxytetracycline by marine fungi mycelium isolated from salmon farming areas in the south of Chile. *Food and Chemical Toxicology*, *152*(April).

Al-Fakih, A. A., & Almaqtri, W. Q. A. (2019). Overview on antibacterial metabolites from terrestrial Aspergillus spp. *Mycology*, *10*(4), 191–209.

Alsohaili, S. A., & Bani-Hasan, B. M. (2018). Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the northern eastern Desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, *11*(3), 329–337.

Altuner, E. M., & Akata, I. (2010). Antimicrobial Activity of Some Macrofungi Extracts. *Sakarya University Journal of Science*, *14*(1).

Arora, DS., Chandra, P. (2010). Assay of Antioxidant Potential of Two Aspergillus Isolates By Different Methods Under. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(91), 765–777.

Awa, O. C., & Oguntade, O. (2015). Molecular Identification of Fungal Species Associated With Mango Anthracnose in Southwest Nigeria. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, *4*(2), 99–103.

Aytar, E. C., Akata, I., & Açik, L. (2020). Suillus Luteus (L).Roussel Ekstresi'Nin Antioksidan, Antimikrobiyal Ve Anti-Proliferatif Aktivites. *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, *44*(3), 373–387.

Bailey, A. M., Alberti, F., Kilaru, S., Collins, C. M., De Mattos-Shipley, K., Hartley, A. J., … Foster, G. D. (2016). Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from Clitopilus passeckerianus for increased rapid antibiotic production. *Scientific Reports*, *6*(May), 1–11.

Banos, S., Lentendu, G., Kopf, A., Wubet, T., Glöckner, F. O., & Reich, M. (2018). A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. *BMC Microbiology*, *18*(1), 1–15.

Bastert, J., Korting, H. C., Traenkle, P., & Schmalreck, A. F. (1999). Identification of dermatophytes by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *Mycoses*, *42*(9–10), 525–528.

Bayazıt, G., Gül, Ü. D., & Ünal, D. (2019). Biosorption of Acid Red P-2BX by lichens as low-cost biosorbents. *International Journal of Environmental Studies*, *76*(4), 608–615.

Bekçi, H., Altinsoy, B., Sarikaya, S., Onbaşili, D., Çelik, G. Y., & Tarihi, G. (2011). Kastamonu Yöresinden Toplanan Bazı Makrofungusların Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kastamonu Univ. Journal of Forestry Faculty*, *11*(2), 187–190.

Belachew, N., & Hinsene, H. (2020). Preparation of cationic surfactant-modified kaolin for enhanced adsorption of hexavalent chromium from aqueous solution. *Applied Water Science*, *10*(1), 1–8.

Benila Smily, J. R. M., & Sumithra, P. A. (2017). Optimization of Chromium Biosorption by Fungal Adsorbent, Trichoderma sp. BSCR02 and its Desorption Studies. *HAYATI Journal of Biosciences*, *24*(2), 65–71.

Beram, R. C., Beram, A., & Lehtİjarvİ, H. T. D. (2016). Fungal Endofitler ve Etkileşimleri Fungal Endophytes and Their Interactions, *7*(2), 161–166.

Bhat, R. (2013). Potential use of fourier transform infrared spectroscopy for identification of molds capable of producing mycotoxins. *International Journal of Food Properties*, *16*(8), 1819–1829.

Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2017). Biologically active secondary metabolites from the fungi. *The Fungal Kingdom*, (May 2021), 1087–1119.

Bocks, S. M. (1967). Fungal metabolism—II. *Phytochemistry*, *6*(6), 777–783.

Bombalska, A., Kaliszewski, M., Kwaśny, M., Mularczyk-Oliwa, M., Kopczyński, K., Szpakowska, M., … Włodarski, M. (2013). Rapid discrimination of several fungus species with FTIR spectroscopy and statistical analysis. *Biuletyn Wojskowej Akademii Technicznej*, *62*(3), 71–80.

Bozok, F., Eker, T., Sezer, G., Bozdoğan, A., Doğan, H. H., & Büyükalaca, S. (2016). Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Ganoderma lucidum Metanolik Ekstraktının Fitotoksik Etkilerinin ve, *4*(3), 163–170.

Bozok, F., Kafkas, E., & Büyükalaca, S. (2018). Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi Türkiye ' nin Adana İlinden Toplanan Suillus collinitus (Fr .)' un Uçucu, *6*(4), 486–489.

Bulam, S., & Peksen, A. (2019). Yenebilir ve Tıbbi Mantarların Gıda Ürünlerinde Kullanım Potansiyeli (The Utilization Potential of Edible and Medicinal Mushrooms in Food Products). *MANTAR DERGİSİ/The Journal of Fungus* , (10), 137–151.

B**ungtongdee, N., Sopalun, K., Laosripaiboon, W., & Iamtham, S.** (2019). The chemical composition, antifungal, antioxidant and antimutagenicity properties of bioactive compounds from fungal endophytes associated with Thai orchids. *Journal of Phytopathology*, *167*(1), 56–64.

Cai, Y., Liu, L., Tian, H., Yang, Z., & Luo, X. (2019). Mechanism of Tetracycline Hydrochloride by. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*.

Canli, K., Benek, A., Şenturan, M., Akata, I., & Altuner, E. M. (2019). In vitro Antimicrobial Activity of Morchella esculenta and Trametes versicolor, *10*, 28–33.

Canturk, Z., Dikmen, M., Ozturk, N., Kocabiyik, E., & Ilhan, S. (2013). Antioxidant properties of halotolerant Penicillium chrysogenum var. chrysogenum secondary metabolites. *2013 E-Health and Bioengineering Conference, EHB 2013*, 1–4.

Chambergo, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(6), 2567–2577.

Chandra, P., & Arora, D. S. (2009). Antioxidant activity of fungi isolated from soil of different areas of Punjab,India. *Journal of Applied and Natural Science*, *1*(2), 123–128.

Córdoba M, K. A., & Ríos H, A. (2012). Biotechnological applications and potential uses of the mushroom Tramestes versicolor. *Vitae*, *19*(1), 70–76.

Cumagun, C. J. R., Aguirre, J. A., Relevante, C. A., & Balatero, C. H. (2010). Pathogenicity and aggressiveness of Fusarium oxysporum Schl. in bottle gourd and bitter gourd. *Plant Protection Science*, *46*(2), 51–58.

Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, *56*(3), 247–264.

Dhar, S., Jindal, V., Jariyal, M., & Gupta, V. K. (2019). Molecular characterization of new isolates of the entomopathogenic fungus beauveria bassiana and their efficacy against the tobacco caterpillar, spodoptera litura (Fabricius) (lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *29*(1), 1–9.

Dignani, M. C., & Anaissie, E. (2004). Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*, *10*(SUPPL. 1), 67–75.

Dominguete, L. C. B., & Takahashi, J. A. (2018). Filamentous fungi as source of biotechnologically useful metabolites and natural supplements for neurodegenerative diseases treatment. *Chemical Engineering Transactions*, *64*(2014), 295–300.

Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S. A. S., & Sutthiwong, N. (2014). Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 56–61.

Dürckheimer, W. (1975). Tetracyclines: Chemistry, Biochemistry, and Structure-Activity Relations. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *14*(11), 721–734.

Dzurendova, S., Zimmermann, B., Kohler, A., Tafintseva, V., Slany, O., Certik, M., & Shapaval, V. (2020). *Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced co-production of high-value metabolites in oleaginous Mucoromycota fungi*. *PLoS ONE* (Vol. 15).

Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of fusarium oxysporum formae speciales and races. *Phytopathology*, *109*(4), 512–530.

Elkhateeb, W., Daba, G., Thomas, P., & Wen, T.-C. (2019). Medicinal mushrooms as a new source of natural therapeutic bioactive compounds. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, *18*(2), 88–101.

Elsayed, E. A., El Enshasy, H., Wadaan, M. A. M., & Aziz, R. (2014). Mushrooms: A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators of Inflammation*, *2014*.

Ersan, M., Guler, U. A., Acikel, U., & Sarioglu, M. (2015). Synthesis of hydroxyapatite/clay and hydroxyapatite/pumice composites for tetracycline removal from aqueous solutions. *Process Safety and Environmental Protection*, *96*, 22–32.

Erukhimovitch, V., Tsror (Lahkim), L., Hazanovsky, M., & Huleihel, M. (2010). Direct identification of potato's fungal phyto-pathogens by Fourier-transform infrared (FTIR) microscopy. *Spectroscopy*, *24*(6), 609–619.

Ferreira, J. A., Mahboubi, A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresource Technology*, *215*, 334–345.

Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., & Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, *64*(1), 63–77.

Freitas-silva, O., Gualtar, C. De, & Janeiro, R. De. (2009). Screening of Fungal Metabolites in Brazil Nuts Using Lc / Ms / Ms, (2), 2–3.

Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., & Sbhatu, D. B. (2019). Investigation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Different Extracts of Auricularia and Termitomyces Species of Mushrooms. *Scientific World Journal*, *2019*.

George, T. K., Devadasan, D., & Jisha, M. S. (2019). Chemotaxonomic profiling of Penicillium setosum using high-resolution mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS). *Heliyon*, *5*(9), e02484.

Gmoser, R., Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and Biotechnology*, *4*(1), 1–25.

Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., & Bačkor, M. (2018). *Lichen Metabolites: An Overview of Some Secondary Metabolites and Their Biological Potential*.

Gonçalves Tavares, D., Viana Lessa Barbosa, B., Lopes Ferreira, R., Ferreira Duarte, W., & Gomes Cardoso, P. (2018). Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *16*, 148–154.

Gupta, A., & Tuohy, M. G. (2019). Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Volume 2: Perspective for Value-Added Products and Environments, *2*(October), 517.

Hameed, A., Hussain, S. A., Yang, J., Ijaz, M. U., Liu, Q., Suleria, H. A. R., & Song, Y. (2017). Antioxidants potential of the filamentous fungi (Mucor circinelloides). *Nutrients*, *9*(10), 1–20.

Herrera, O., Zheng, E., & Wang, Y. (2002). Investigating the over sporulation effect of A . fumigatus induced by P . aeruginosa. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(3), 51.

Hoai Trinh, P. T., Duy Ngoc, N. T., Dieu Trang, V. T., Tien, P. Q., Ly, B. M., Thanh Van, T. T., … San, P. T. (2018). Effect of Culture Conditions for Antimicrobial Activity of Marine - Derived Fungus Aspergillus Flocculosus 01Nt.1.1.5. *Vietnam Journal of Biotechnology*, *15*(4), 721–728.

Hudzicki, J. (2016). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility. *American Society For Microbiology*, *3*(2), 6–13.

Huízar-Félix, A. M., Aguilar-Flores, C., Martínez-De-La Cruz, A., Barandiarán, J. M., Sepúlveda-Guzmán, S., & Cruz-Silva, R. (2019). Removal of tetracycline pollutants by adsorption and magnetic separation using reduced graphene oxide decorated with α-Fe 2 O 3 nanoparticles. *Nanomaterials*, *9*(3).

Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., … Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, *97*(1), 1–136.

İnci, Ş., Dalkılıç, L., Dalkılıç, S., & Kırbağ, S. (2019). Helvella leucomelaena (Pers.) nannf.'ın antimikrobiyal ve antioksidan etkisi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, *20*(2), 249–253.

Ismael, H. M., & Ramadan, N. (2011). Isolation of Fungi Seasonally from Soil , Air and Water in Villages in " Binary Isolation of Fungi Seasonally from Soil , Air and Water in V illages in " Binary Safeen ." *The 4th International Scientific Conference of Salahaddin University-Erbil*, (October).

Jagels, A., Lindemann, V., Ulrich, S., Gottschalk, C., Cramer, B., Hübner, F., … Humpf, H. U. (2019). Exploring secondary metabolite profiles of stachybotrys spp. By LC-MS/MS. *Toxins*, *11*(3), 1–22.

Jakovljević, V. D., Milićević, J. M., Stojanović, J. D., Solujić, S. R., & Vrvić, M. M. (2014). Antioksidativna aktivnost etanolnog ekstrakta Penicillium chrysogenum i Penicillium fumiculosum. *Hemijska Industrija*, *68*(1), 43–49.

Kalyoncu, F., Oskay, M., Kalmiş, E. (2010). Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *The Journal of Fungus*, *1*(1), 1–8.

Kaminskyj, S. G. W., & Dahms, T. E. S. (2008). High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. *Micron*, *39*(4), 349–361.

Kang, D., Kim, J., Choi, J. N., Liu, K. H., & Lee, C. H. (2011). Chemotaxonomy of Trichoderma spp. using mass spectrometry-based metabolite profiling. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(1), 5–13.

Kip, F., & Açikel, Ü. (2019). Removal of tetraclycine by biocomposites synthesized with immobilization of Rhizopus delamar and Candida types. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, *34*(3), 1417–1426.

Kirby, A. J., & Schmidt, R. J. (1997). The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs - I. *Journal of Ethnopharmacology*, *56*(2), 103–108.

Knežević, A., Stajić, M., Sofrenić, I., Stanojković, T., Milovanović, I., Tešević, V., & Vukojević, J. (2018). Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected Trametes species from Serbia. *PLoS ONE*, *13*(8), 1–18.

Lagashetti, A. C., Dufossé, L., Singh, S. K., & Singh, P. N. (2019). Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms*, *7*(12), 1–36.

Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., … Sockalingum, G. D. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of Food Microbiology*, *168–169*, 32–41.

Leitão, A. L. (2009). Potential of penicillium species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *6*(4), 1393–1417.

Li, X. D., Li, X. M., Yin, X. L., Li, X., & Wang, B. G. (2019). Antimicrobial sesquiterpenoid derivatives and monoterpenoids from the deep-sea sediment-derived fungus aspergillus versicolor SD-330. *Marine Drugs*, *17*(10).

Liu, R., Bao, Z. X., Zhao, P. J., & Li, G. H. (2021). Advances in the study of metabolomics and metabolites in some species interactions. *Molecules*, *26*(11).

Lopes, F. C., Tichota, D. M., Sauter, I. P., Meira, S. M. M., Segalin, J., Rott, M. B., … Brandelli, A. (2013). Active metabolites produced by Penicillium chrysogenum IFL1 growing on agro-industrial residues. *Annals of Microbiology*, *63*(2), 771–778.

Lu, Q. Y., Jin, Y. S., Zhang, Q., Zhang, Z., Heber, D., Go, V. L. W., … Rao, J. Y. (2004). Ganoderma lucidum extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, *216*(1), 9–20.

Lucas, D., Badia-Fabregat, M., Vicent, T., Caminal, G., Rodríguez-Mozaz, S., Balcázar, J. L., & Barceló, D. (2016). Fungal treatment for the removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in veterinary hospital wastewater. *Chemosphere*, *152*, 301–308.

Lucas, D., Castellet-Rovira, F., Villagrasa, M., Badia-Fabregat, M., Barceló, D., Vicent, T., … Rodríguez-Mozaz, S. (2018). The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater. *Science of The Total Environment*, *610–611*, 1147–1153.

Matuszewska, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., & Matuszewski, Ł. (2018). Anticancer, antioxidant, and antibacterial activities of low molecular weight bioactive subfractions isolated from cultures of wood degrading fungus Cerrena unicolor. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–14.

Menk, J. de J., do Nascimento, A. I. S., Leite, F. G., de Oliveira, R. A., Jozala, A. F., de Oliveira Junior, J. M., … Grotto, D. (2019). Biosorption of pharmaceutical products by mushroom stem waste. *Chemosphere*, *237*, 124515.

Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., … Head, R. M. (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*, *3*(1), 1–17.

Mohamed Pauzan, A. S., & Ahad, N. (2018). Biomass Modification Using Cationic Surfactant Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) to Remove Palm-Based Cooking Oil. *Journal of Chemistry*, *2018*.

Moore, D., & Ahmadjian, V. (2019). Form and function of fungi. *Encyclopædia Britannica, Inc.*, 1–16.

Mukherjee, D., Singh, S., Kumar, M., Kumar, V., Datta, S., & Dhanjal, D. S. (2018). Fungal biotechnology: Role and aspects. *Fungi and Their Role in Sustainable Development: Current Perspective*, (January 2019), 91–103.

Mulder, K. C. L., Mulinari, F., Franco, O. L., Soares, M. S. F., Magalhães, B. S., & Parachin, N. S. (2015). Lovastatin production: From molecular basis to industrial process optimization. *Biotechnology Advances*, *33*(6), 648–665.

Narsing Rao, M. P., Xiao, M., & Li, W. J. (2017). Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN), 1–13.

Nie, M., Zhang, W. Q., Xiao, M., Luo, J. L., Bao, K., Chen, J. K., & Li, B. (2007). FT-IR spectroscopy and artificial neural network identification of Fusarium species. *Journal of Phytopathology*, *155*(6), 364–367.

Nwakanma, C., EN, N., & T, P. (2016). Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites of Fungi Isolated from Leaves of Bush Mango. *Journal of Next Generation Sequencing & Applications*, *3*(2), 1–6.

Özdal, M., Gülmez, Ö., Gür Özdal, Ö., & Algur, Ö. F. (2019). Antibacterial and Antioxidant Activity of Mycelial Extracts of Different Pleurotus Species. *Food and Health*, *5*(1), 12–18.

Paranjape, S. R., Chiang, Y. M., Sanchez, J. F., Entwistle, R., Wang, C. C. C., Oakley, B. R., & Gamblin, T. C. (2014). Inhibition of tau aggregation by three aspergillus nidulans secondary metabolites: 2, ω -dihydroxyemodin, asperthecin, and asperbenzaldehyde. *Planta Medica*, *80*(1), 77–85.

Parolo, M. E., Savini, M. C., Vallés, J. M., Baschini, M. T., & Avena, M. J. (2008). Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. *Applied Clay Science*, *40*(1–4), 179–186.

Patil, R. H., Patil, M. P., & Maheshwari, V. L. (2016). Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic Fungi, 189–205.

Pinto, F. C. J., de Lima, D. B., Agustini, B. C., Dallagassa, C. B., Shimabukuro, M. F., Chimelli, M., … Bonfim, T. M. B. (2012). Morphological and molecular identification of filamentous fungi isolated from cosmetic powders. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *55*(6), 897–901.

Pop, R. M., Puia, I. C., Puia, A., Chedea, V. S., Leopold, N., Bocsan, I. C., & Buzoianu, A. D. (2018). Characterization of Trametes versicolor: Medicinal mushroom with important health benefits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *46*(2), 343–349.

Preeti, A., Pushpa, S., Sakshi, S., Jyoti, A., Chemistry, P., & Pharmacy, M. M. C. O. (2012). Antioxidant Mushrooms: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, *3*(6), 65–70.

Rachmania, M. K., Oetari, A., Rahmadewi, M., & Sjamsuridzal, W. (2018). Molecular phylogenetic analyses of filamentous fungi from deteriorated old Chinese manuscripts in Central Library Universitas Indonesia. *AIP Conference Proceedings*, *2023*(October).

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, *80*(3), 756–770.

Renaud, J. B., Hoogstra, S., Quilliam, M. A., & Sumarah, M. W. (2021). Normalization of LC-MS mycotoxin determination using the N-alkylpyridinium-3-sulfonates (NAPS) retention index system. *Journal of Chromatography A*, *1639*, 461901.

Sajid, S. (2018). Applications of fungal pigments in Biotechnology. *Pure and Applied Biology*, *7*(2).

Salman, A., Tsror, L., Pomerantz, A., Moreh, R., Mordechai, S., & Huleihel, M. (2010). FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy*, *24*(3–4), 261–267.

Samarghandi, M. R., Asgari, G., Shokoohi, R., Dargahi, A., & Arabkouhsar, A. (2019). Removing amoxicillin antibiotic from aqueous solutions by Saccharomyces cerevisiae bioadsorbent: Kinetic, thermodynamic and isotherm studies. *Desalination and Water Treatment*, *152*, 306–315.

Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *2*(1), 13–22.

Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, *161*(2), 168–175.

Saremi, F., Miroliaei, M. R., Shahabi Nejad, M., & Sheibani, H. (2020). Adsorption of tetracycline antibiotic from aqueous solutions onto vitamin B6-upgraded biochar derived from date palm leaves. *Journal of Molecular Liquids*, *318*(April 2021), 114126.

Sarikurkcu, C., Tepe, B., & Yamac, M. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir – Turkey: Lactarius deterrimus, Suillus collitinus, Boletus edulis, Xerocomus chrysenteron. *Bioresource Technology*, *99*(14), 6651–6655.

Shapaval, V., Møretrø, T., Suso, H. P., Åsli, A. W., Schmitt, J., Lillehaug, D., … Kohler, A. (2010). A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *Journal of Biophotonics*, *3*(8–9), 512–521.

Sharaf, A. F., Khalid, M., Muhammad, A., & Ali, A. (2016). Biotechnology of Penicillium Genus. *Lasbela, U. J.Sci.Techl*, *5*(January), 201–207.

Shawky, B. T., Nagah, M., Ghareeb, M. A., El-Sherbiny, G. M., Moghannem, S. A. M., & Abdel-Aziz, M. S. (2019). Evaluation of antioxidants, total phenolics and antimicrobial activities of ethyl acetate extracts from fungi grown on rice straw. *Journal of Renewable Materials*, *7*(7), 667–682.

Silva, A., Delerue-Matos, C., Figueiredo, S. A., & Freitas, O. M. (2019). The use of algae and fungi for removal of pharmaceuticals by bioremediation and biosorption processes: A review. *Water (Switzerland)*, *11*(8).

Singh, S. P., Pandey, S., Shukla, R., & Singh, P. C. (2014). Title : Systematics and Applications of Fungi, (August 2016).

Smith, H., Doyle, S., & Murphy, R. (2015). Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, *185*, 389–397.

Suda, T., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., & Nishida, T. (2012). Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource Technology*, *103*(1), 498–501.

Sugiharto, S., Yudiarti, T., & Isroli, I. (2016). Assay of antioxidant potential of two filamentous fungi isolated from the Indonesian fermented dried cassava. *Antioxidants*, *5*(1), 2–7.

Sulyok, M., Krska, R., & Senyuva, H. (2020). Profiles of fungal metabolites including regulated mycotoxins in individual dried Turkish figs by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research*, *36*(4), 381–387.

Tang, L., Shang, J., Song, C., Yang, R., Shang, X., Mao, W., … Tan, Q. (2020). Untargeted Metabolite Profiling of Antimicrobial Compounds in the Brown Film of Lentinula edodes Mycelium via LC-MS/MS Analysis. *ACS Omega*, *5*(13), 7567–7575.

Thi, P., Trinh, H., Thi, N., Ngoc, D., Tien, P. Q., Ly, B. M., & Thanh, T. T. (2016). MARINE-DERIVED FUNGUS PENICILLIUM CHRYSOGENUM, *14*(4), 727–733.

Ulusoy, M., Çelebier, İ., Yıldız, S. S., Keskin, N., & Özgör, E. (2016). Investigation of Antimicrobial Activity of Different Trametes versicolor Extracts on Some Clinical Isolates. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, *3*(44), 267–267.

Venil, C. K., Velmurugan, P., Dufossé, L., Devi, P. R., & Ravi, A. V. (2020). Fungal pigments: Potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. *Journal of Fungi*, *6*(2).

Venkatesh Babu, G., Perumal, P., Muthu, S., Pichai, S., Sankar Narayan, K., & Malairaj, S. (2018). Enhanced method for High Spatial Resolution surface imaging and analysis of fungal spores using Scanning Electron Microscopy. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10.

Waing, K. G. D., Gutierrez, J. M., Galvez, C. T., & Undan, J. R. (2015). Molecular identification of leaf litter fungi potential for cellulose degradation. *Mycosphere*, *6*(2), 139–144.

Wang, W., Liao, Y., Tang, C., Huang, X., Luo, Z., Chen, J., & Cai, P. (2017). Cytotoxic and antibacterial compounds from the coral-derived fungus Aspergillus tritici SP2-8-1. *Marine Drugs*, *15*(11), 1–10.

Wen, X., Jia, Y., & Li, J. (2009). Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from Phanerochaete chrysosporium – A white rot fungus. *Chemosphere*, *75*(8), 1003–1007.

Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G., & Wang, X. R. (2003). 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(9), 5389–5397.

Yamaç, M., & Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*, *44*(9), 660–667.

Zgoda, J. R., & Porter, J. R. (2001). A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceutical Biology*, *39*(3), 221–225.