

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fusarium oxysporum YP9B’NİN TANISI KARAKTERİZASYONU
VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

GÖKHAN VEYİSOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. NURETTİN YAYLI
DR. ÖĞR. ÜYESİ YEŞİM AKTÜRK DİZMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

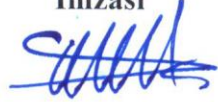


RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Fusarium oxysporum* YP9B'NİN TANISI KARAKTERİZASYONU VE
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ**

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında, Gökhan VEYİSOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 25/07/2019 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Nurettin YAYLI	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN	



Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Fusarium'ların tanısı, karakterizasyonu ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı bu çalışma Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmayı yapma olanağı sağlayan yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında öneri ve paylaşımıyla yardımını ve desteğinin esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Antioksidan aktivite çalışması konusunda yardımlarından dolayı Doç. Dr. Nimet BALTAŞ'a teşekkür ederim.

Fusarium türlerinin izolasyonunda ve tanımlanmasında yardımcı olan yüksek lisans arkadaşlarım Yaşar KASAP, Cemre TARAKÇI, Müberra PINARBAŞ ve Arif BOZDEVECİ'ye teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, verdiğim kararlarda desteklerini her zaman hissettiğim, maddi ve manevi her türlü desteği esirgemeyen ailem; babam Recep VEYİSOĞLU, annem Leyla VEYİSOĞLU ve kardeşlerim Gökçe ve Gökmen VEYİSOĞLU'na tüm kalbimle teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm Biyoloji Bölüm Başkanı Nurhayat ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından "117S937" nolu proje ile desteklenmiştir.

Gökhan VEYİSOĞLU

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Fusarium oxysporum* YP9B’nin Tanısı Karakterizasyonu Ve Antimikrobiyal Özellikleri” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 25/07/2019

Gökhan VEYİSOĞLU

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Fusarium oxysporum YP9B'nin TANISI KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİ

Gökhan VEYİSOĞLU

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Funguslar geniş bir biyoçeşitliliğe sahip olup uçucu metabolit, mikotoksin, nonribozomal peptitler, poliketidler, terpenler, diketopiperazinler ve alkaloid gibi çok sayıda sekonder bileşikler üretirler. *Fusarium* cinsinde, bitki patojeni olan ve olmayan çok sayıda tür tanımlanmıştır. Projenin amacı *Fusarium oxysporum* YP9B izolatu tarafından üretilen metabolit/metabolitlerin ilaç hammadde potansiyellerinin belirlenmesidir. Bu amaçla en uygun kültür şartları belirlendikten sonra üretilen kültürün etil asetat ekstraktları antimikrobiyal (agar kuyucuk difüzyon) ve antioksidan (CUPRAC, FRAP ve ABTS⁺ Yöntemleriyle) aktiviteleri incelendi. Antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan kültür filtratından elde edilen etil asetat ekstraktları antimikrobiyal aktivite belirlenmesi için kullanıldı. En yüksek antimikrobiyal aktivite gram pozitif ve negatif bakterilere karşı gözlenirken, antifungal aktivite ise düşük düzeyde olduğu belirlendi. Ekstraksiyon için *Fusarium oxysporum* YP9B'nin büyütüldüğü besi yeri ortamının ve ekstrakte edilen çözücünün antimikrobiyal aktivitesi üzerine etki ettiği belirlendi. Ekstraksiyon süresinin, karbon ve azot kaynağının değiştirilmesinin ve inkübasyon süresinin ise herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak *Fusarium oxysporum* YP9B'nin inkübasyon süresinin 7-10 gün PDA'da inkübe edildiğinde, katı ortamdan etil asetat ile ekstrakte edildiğinde ve yine aynı çözücü ile çözüldüğünde optimum antimikrobiyal etkinliğinin gözlemlendiği belirlendi.

2019, 88 sayfa

Anahtar kelimeler; Antikanser, Antimikrobiyal, Antioksidan, *Fusarium*.

ABSTRACT

IDENTIFICATION CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL PROPERTY OF *Fusarium oxysporum* YP9B

Gökhan VEYİSOĞLU

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Fungi have a broad biodiversity, they produce many secondary compounds, such as volatile metabolites, mycotoxins, non-ribosomal peptides, polyketides, terpenes, dicetopiperazines and alkaloids. A variety of *Fusarium* genus with and without plant pathogen was identified. The goal of the thesis is to determine the pharmaceutical raw material targets by the *Fusarium oxysporum* YP9B isolate. Antimicrobial (agar well diffusion) and antioxidant (CUPRAC, FRAP and ABTS^{•+} methods) activities of the extracts obtained from YP9B were determined. Ethyl acetate extracts from culture filtrate with high antimicrobial activity were used to determine antimicrobial activity. While highest antimicrobial activity was observed against gram positive and negative bacteria, antifungal activity was determined as lowest. It was determined that the medium of the *Fusarium oxysporum* YP9B to be extracted and the extract solvent had an effect on the antimicrobial activity. It was observed that extraction time, changing carbon and nitrogen source and incubation time had no effect. Consequently, optimum antimicrobial activity was observed when *Fusarium oxysporum* YP9B incubated in PDA 7-10 days, extracted with ethyl acetate from solid medium and dissolved with same solvent.

2019, 88 Pages

Key words; Anticancer, Antimicrobial, Antioxidant, *Fusarium*.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Fusarium</i> 'un Tanısı ve Karakterizasyonu	3
1.3. Sekonder Metabolitler	9
1.2.1. Mikotoksinler ve <i>Fusarium</i> Toksinleri	11
1.2.1.1. Triketesenler	14
1.2.1.2. Zearalenon	18
1.2.1.3. Fumonisinler	19
1.2.1.4. Moniliformin	21
1.2.2. <i>Fusarium</i> Metabolitlerinin Antimikrobiyal Etkinlikleri.....	22
1.3. Literatür Özeti.....	23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1. Materyal	28
2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	28
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	29
2.1.2.1. Patates Dekstroz Agar (PDA).....	29
2.1.2.2. Dikloran Rose Bengal Kloramfenikol (DRBC) Agar.....	30
2.1.2.3. Malt Yeast Ekstrakt Sıvı Besiyeri (MEB)	30
2.1.2.4. Yeast Pepton Dekstroz Sıvı Besiyeri (YPDB)	30
2.1.2.5. Su Agar Besiyeri.....	31
2.1.2.6. De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar	31
2.1.2.7. Karbon ve Azot Gereksiniminin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyerleri	32
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel ve Fungal Suşlar	33
2.2. Metod.....	33

2.2.1.	<i>Fusarium</i> sp. YP9B İzolatının Canlandırılması	33
2.2.2.	Tek Koloni Kültürü, DNA İzolasyonu ve PCR Analizi	34
2.2.3.	Sekans Analizi	36
2.2.4.	Antimikrobiyal Madde Üretimi ve Ekstraksiyonu	36
2.2.5.	Küf Mantarlarına Karşı Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi.....	37
2.2.6.	Uçucu Metabolit Üretiminin ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi.....	37
2.2.7.	Antimikrobiyal Aktivitenin Agar Kuyucuk Yöntemi ile Belirlenmesi	38
2.2.8.	Karbon ve Azot Gereksiniminin Belirlenmesi	39
2.2.9.	Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Farklı İnkübasyon Süresi, Sıcaklık, Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi	39
2.2.10.	Biyoaktif Bileşiklerin En Uygun Ekstraksiyon ve Çözücü Maddelerinin Belirlenmesi.....	40
2.2.11.	Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisit Konsantrasyon (MBK) Belirlenmesi	40
2.2.12.	Antioksidan Aktivite.....	41
2.2.13.	Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)	41
2.2.14.	Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Güç Tayini (FRAP)	42
2.2.15.	ABTS ⁺ Katyonik Radikal Temizleme Yöntemi	42
3.	BULGULAR	44
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	62
5.	ÖNERİLER	71
	KAYNAKLAR	72
	ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>Fusarium oxysporum</i> (yaşlı-epitip kültür CBS 144134)	7
Şekil 2.	Bazı mikotoksinlerin kimyasal yapıları.....	13
Şekil 3.	<i>Fusarium oxysporum</i> YP9B'nin Su agar besi ortamındaki hifa, konidium ve klamidosporelerini görünümüleri.....	45
Şekil 4.	<i>Fusarium spp.</i> YP9B'nin PDA besiyerinde makroskopik ve mikroskopik görünümü.	45
Şekil 5.	İkili kültür metodu ile <i>F. oxysporum</i> YP9B'nin bitki patojeni ve biyokontrol ajanlara karşı olan radyal gelişiminin yüzde (%) inhibisyon değerleri.....	47
Şekil 6.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin ikili kültür testiyle bitki patojeni türlere karşı antifungal aktiviteleri.	48
Şekil 7.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin ikili kültür testiyle biyokontrol ajan olan <i>T. harzianum</i> (sol) ve insan fırsatçı patojeni olan <i>Aspergillus flavus</i> (sağ) suşlarına karşı antifungal aktiviteleri.	48
Şekil 8.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin ikili petri yöntemi ile uçucu metabolitlerinin bakteriyel suşlara karşı etkinliği.....	49
Şekil 9.	<i>F. oxysporum</i> YP9B ekstraktların agar kuyucuk diffüzyon testinde sırasıyla <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ve <i>S. aureus</i> türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri.....	51
Şekil 10.	<i>F. oxysporum</i> YP9B klonlarının morfolojik görünümüleri.....	52
Şekil 11.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin farklı klonlarının PDA agarda görünümüleri.	52
Şekil 12.	<i>F. oxysporum</i> YP9B klonlarının MEA ve PDA besiyerlerindeki kültürlerin etil asetat ekstraktlarının görünümü.	54
Şekil 13.	<i>F. oxysporum</i> YP9B farklı karbon ve azot kaynaklarında yapılan 7 günlük kültürlerinin görünümüleri.	56
Şekil 14.	Agar kuyucuk yöntemi ile <i>F. oxysporum</i> YP9B kültür lizatının etil asetat ekstraktlarının (60 µl) sırasıyla <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 'a karşı etkinliği.....	58
Şekil 15.	FRAP yönteminde elde edilen FeSO ₄ .7H ₂ O standart grafiği.....	59
Şekil 16.	CUPRAC yönteminde elde edilen Troloks® standart grafiği.....	60

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Ekonomik öneme sahip bitki hastalıklarına neden olan bazı <i>Fusarium</i> lar. ...	6
Tablo 2.	Mikotoksinler ve Olası Sağlık Etkileri.	12
Tablo 3.	Trikotesen Üreten <i>Fusarium</i> Türleri.	14
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan cihazlar.	28
Tablo 5.	Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeler.	29
Tablo 6.	YP9B tarafından ekstrasellüler sekonder metabolit üretiminde karbon ve azot kaynaklarının test edilmesi.	32
Tablo 7.	ITS4- 5.8 – ITS5 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı.	35
Tablo 8.	ITS1- 5.8S- ITS2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR şartları.	36
Tablo 9.	rRNA ITS1- 5.8S – ITS2 analizine göre <i>Fusarium</i> YP9B izolatlarının moleküler tanısı.	46
Tablo 10.	<i>Fusarium oxysporum</i> YP9B izolatının kültür filtratının antimikrobiyal etkinliği.	50
Tablo 11.	Değişik sıcaklıklara maruz bırakılan <i>F. oxysporum</i> YP9B izolatının kültür lizatının bazı bakterilere karşı antibakteriyel etkinliği.	50
Tablo 12.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin klonlarının katı (6 mm'lik PDA kültür diski) ve PD sıvı besiyeri ortamlarında oluşturdukları zon çapı (mm).	53
Tablo 13.	İki farklı katı besiyerinde üretilerek etil asetat ekstraksiyonu yapılan lizatların agar kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi (80 µl).	55
Tablo 14.	Ham etil asetat ekstraksiyonların Minimal İnhibisyon Konsantrasyon değerleri.	55
Tablo 15.	Farklı karbon ve azot kaynaklarında <i>F. oxysporum</i> YP9B'nin 5., 7., 10. ve 15. gün kültür lizatlarının agar kuyucuk yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi.	57
Tablo 16.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin iki farklı klonda antimikrobiyal aktivite üzerine besiyeri, sıcaklık ve ekstraksiyon çözücüsünün etkinliği.	58
Tablo 17.	<i>F. oxysporum</i> YP9B'nin etilasetat ekstraktının antibakteriyel aktivitesi üzerine çözücülerin etkinliği.	59
Tablo 18.	Sentezlenen tüm bileşiklerin FRAP (bileşiğin her miligramı için µM FeSO ₄ .7H ₂ O) ve CUPRAC (µM Trolox/mg bileşik) test sonuçları.	60
Tablo 19.	% ABTS ⁺⁺ bileşiklerin çeşitli nihai konsantrasyonlardaki radikal temizleme aktivitelerinin ifade edilmesi.	61

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ZEA	Zearalenon
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NRP	Nonribozomal Peptit
WHO-IARC	Dünya Sağlık Örgütü- Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü
ZEA	Zearalenone
ELEM	Lökoensefalomalazi
NEO	Neosolaniol
DAS	Diasetoksisirpenol
DON	Deoksinivalenol
3-ADON	3-asetil-deoksinivalenol
15-ADON	15-asetil-deoksinivalenol
NIV	Nivalenol
PDT	Podofilotoksin
MON	Moniliformin
ERG	Ergosterol
PDA	Patates Dekstroz Agar
DRBC	Dikloran Rose Bengal Kloramfenikol
MEB	Malt Ekstrakt Sıvı Besiyeri
YPDB	Yeast Pepton Dekstroz Sıvı Besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MHB	Mueller Hinton Sıvı Besiyeri
MHA	Mueller Hinton Agar
BHIB	Beyin Kalp İnfüzyon Sıvı Besiyeri
BHIA	Beyin Kalp İnfüzyon Agar
THF	Tetrahidrofuran
DMF	Dimetilformamid
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
MBK	Minimum Bakterisit Konsantrasyon
CUPRAC	Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
FRAP	Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Güç Tayini
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen

MEB

Malt Ekstrakt Sıvı Kùltür



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Ekosistemin var olan besin zincirinde en alt sıralarda yer alan, ancak bu zincirin ayrılmaz bir parçası olarak görev yapan funguslar, bazen bitki patojeni olarak büyük ve önemli ekonomik kayıplara neden olurken, bazen de hastalıkların tedavisinde kaynak teşkil eden doğal antibiyotiklerin üreticisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Funguslar endofit, entomopatojen, bitki patojeni ve fırsatçı insan patojeni gibi hastalık yapıcı yönleri yanı sıra tedavide kullanılan antibiyotik, antimikotik, anti kanser vb. ekonomik öneme sahip bileşikler üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Bu bileşiklerden bazıları, tarım, endüstri ve tıp gibi alanlarda uygulama alanı bulmaktadır (Siddiquee vd., 2012). Funguslar tarafından üretilen antifungal, antibakteriyel ve antiviral aktiviteye sahip mikotoksinlerin yanı sıra bitki hastalıklarına karşı biyolojik kontrolde kullanılan, bazen de bitkinin vejetatif büyümesine etki eden kimyasal metabolitlerde üretmektedir. Ayrıca birçok fungus bazı bitkilerde tohum çimlenmesini ve büyümeyi inhibe eden, nekrozis ve solmaya neden olan fitotoksik sekonder metabolit üretme potansiyeline sahiptir. Bu bileşiklerden önemli bir kısmı olan mikotoksinler, besin ve yem zincirine ulaşırsa insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkilere de yol açabilirler. Bazıları da herbisit özellik göstermektedirler (Kokkonen vd., 2010; Meca vd., 2009).

Başlıca bitki hastalığı olarak damarsal solgunluk, devrilme, yaprak-başak yanıklığı ve koçan (dane) çürüklüğü gibi hastalık etkeni olabilir. Özellikle *Fusarium oxysporum*'un sayısız farklı bitkilerde solgunluk hastalığına neden olduğu bilinmektedir. Solgunluk, bitkinin ksilem damarlarında fungal hifanın varlığı ile ilişkilidir. *F. oxysporum*'un bilinen bir eşeyli üreme aşaması olmamasına rağmen, bu tür kompleksin suşları, transpoze edilebilir elementlerin (Daboussi ve Capy, 2003) ve paraseksüel döngüsünün (Teunissen vd., 2002) varlığıyla ortaya çıkabilen büyük genetik çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Büyük çoğunluğu saprofit mikrofungus olmasının yanısıra, bazıları biyokontrol ajan olarak kullanılır. Dünya çapında ciddi bitki hastalıklarına neden olan patojen *Fusarium* türleri, nekrotrofik, toprak kökenli bir patojen mantardır. *F. oxysporum* yaygın bir toprak florası üyesidir ve üç tip aseksüel spor; makrokonidia, mikrokonidia ve klamidyaspor oluşturur. *F. oxysporum* başta solgunluk olmak üzere, kök çürüklüğü hastalığına neden

olurken, *Fusarium solani* kök, kök-boğaz çürüklüğü ve tohum çürüklüğüne neden olmaktadır. Teleomof veya seksüel üreme formu bilinmese de çevresel koşullarda üremesi için 28 °C'lik toprak ve hava sıcaklıkları optimum seviyede üremeyi teşvik ederken, sıcak (34 °C) veya çok soğuk (17-20 °C) topraklarda da gelişebilmektedir.

Dünyanın özellikle sıcak bölgelerinde *Fusarium* türleri küçük tahıllı ürünlerin patojeni olarak sıklıkla karşılaşılmakta, ürünün kalitesini ve verimini ciddi boyutlarda etkileyerek ekonomik zararlara uğrattığı bildirilmektedir. Arazi şartlarında bitkilerde yaprak solgunluğu, kök, gövde veya meyvede çürümelere neden olurken, depo ve saklama koşullarında ise gıda (tahıl, meyve vb. zararlısı) yüzeylerinde üreyerek çürümeye sebebiyet verir. Yüzeyinde üredikleri tahılların, gıdaların veya meyvelerin üstünde ürettikleri metabolitler (mikotoksinler) ile son tüketiciye sağlık açısından önemli zararlara neden olmaktadır.

Dünyada yapılan araştırmalarda *Fusarium* türlerinin tahıllar üzerindeki toksijenitesine ve çeşitliliğine odaklanılmıştır (Logrieco vd., 2002; Chelkowski vd., 2012). Tahıllar üzerindeki bu çalışmalara rağmen, bitkileri enfekte eden *Fusarium* türleri tarafından üretilen sekonder metabolitler hakkındaki bilgi çok azdır (von Bargen vd., 2009, Stępień vd., 2012). *Fusarium* genusu birçok önemli bitki patojeni türler (*Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* ve *Fusarium oxysporum* gibi) içermesi yanı sıra çok sayıda sekonder metabolit üretme kapasitesine sahip türleri de içermektedir.

Yapılarına ve biyosentez yollarına göre sekonder metabolitler üç grup; aurofusarin, fumonisin ve zearalenone içeren poliketidler, trikotesen ve karotenoid içeren terpenler ve siderofor içeren non-ribozomal peptitler olarak sınıflandırılabilir. Bunların arasından fumosin ve trikotesen insan ve hayvan sağlığı üzerine etkili olan mikotoksinlerdir (Zhang ve Zang, 2013).

Toprak veya tarla küfleri olanlar düşük sıcaklıklarda da gelişebilirler. Bazıları 0 °C'nin altında gelişmelerini devam ettirirken, minimum sıcaklık istekleri -7 °C olan türlere rastlanabilmektedir. Bu türlerden biri olan *Fusarium poae* çok geniş sıcaklık aralığında mikotoksin oluştursada, optimum mikotoksin üretimi 5-8 °C'lerde gerçekleşir.

Dünyada yaklaşık 1,5 milyar mantar türünün bulunduğu bunlardan yalnızca 250 000'inin tanımlandığı ve yaklaşık 50 000 türün insan için patojen olduğu bilinmektedir. Mantarlar ekstraselüler enzim aktiviteleri yüksek olan güçlü metabolit üreten önemli canlı gruplarıdır. Günümüze kadar keşfedilen mantarların ancak %1 civarında türün metabolitleri incelenmiştir.

Çalışmamızda Pazar ilçesinde (Rize) sebze yetiştirilen bahçe toprağından izole edilen *Fusarium oxysporum* YP9B izolatının antimikrobiyal ve antioksidan aktivite içeren metabolitler ürettiğı belirlenen metabolitin ikili kültür tekniğinde bir dizi bitki ve insan patojeni küf mantarlarına karşı antifungal aktivitesi olduğu gözlenmiş olup önemli bulunmuş diğer insan patojenlerine karşı etkinliğinin araştırılması ve metabolitin kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır.

1.2. *Fusarium*'un Tanısı ve Karakterizasyonu

Alem:	Fungi
Şube:	Ascomycota
Alt Şube:	Pezizomycotina
Sınıf:	Sordariomycetes
Alt Sınıf:	Hypocreomycetidae
Takım:	Hypocreales
Familya:	Nectriaceae
Cins:	<i>Fusarium</i> (Anamorf)
Tür:	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.,

Çoğunlukla Hyphomycetes olarak anılan *Fusarium* türleri, toprakta yaygın olarak bulunan, bitkilerle ilişkili olan bir grubun parçası olan filamentli mantarların büyük bir cinsidir. *Fusarium*, Nectriaceae familyasının içinde yer alan kompleks bir cins olup 1000'den fazla tür içermektedir (URL-1).

Ascomycota mensubu mantarlar içinde yer alır. Bu bölüm mantarları eşeyli (perfekt safha) ve eşeysiz (imperfekt veya konidiyum safhası) üreme özelliğine sahiptirler.

Ascomycata Bölümü'nün esas özelliği, mayoz bölünme geçirdikten sonra içinde sporların meydana geldiği keseciklere yani askuslara sahip olmasıdır. Eşeyli üreme formu askus (kese) içerisinde belli sayıda aksospor içererek oluşur. Bu bölüm mensubu mantarlar 4500'e yakın tür içerdiği bilinmektedir. Çoğunlukla karada bazen suda olmak üzere geniş bir yayılışa sahiptirler. Karada yaşayanlar hayvanlarda, insanlarda deri ve solunum hastalıklarına, ayrıca bitkilerde hastalıklara sebep olurlar. Belirli büyüklüğü ve biçimi olan üreme yapılarına askokarp denir. *Morchella* (Kuzu göbeği) ve *Tüber* (Yeraltı mantarı) gibi askokarpları yenen türler de familya içinde bulunmaktadır. Ayrıca bu grup mantarlar içinde; maya mantarları (*Saccharomyces cerevisia*), mavi küf mantarları (*Penicillium*) ve yeşil-siyah küf mantarları (*Aspergillus, Fusarium*) yer almaktadır.

Kültür koşullarında makro ve mikro konidia üretirler, tekli veya yığın şeklinde klamidospor, monofiletik konidiofor oluştururlar. Farklı çevresel koşullarda rahatlıkla üreyebilmekte olup optimum üremeyi 28 °C'lik toprak ve hava sıcaklıkları teşvik ederken, yüksek (≥ 34 °C) veya düşük (17-20 °C) sıcaklıkaki topraklarda da sadece gelişimini devam ettirebilmektedir.

Spor morfolojisi *Fusarium*'un tanısındaki birincil karakterdir. Sporlar; polifialidik sümüksü sporlar, enteroblastik sporlar, dinlenme aşamasındaki birçok türe ait klamidyaspor veya basit olarak üretilen konidia bulunabilir. Konidya 0-1 septalı, armut biçimli, 1-10 ya da daha fazla septalı makrokonidya, fusoitten oval mikrokonidia, değişen düz ya da kavisli şekillerde olabilir.

Fusarium-tipi konidya birçok *Nectria* türünde ve aynı zamanda *Gibberella* cinsinde de bilinir (Samuels vd., 2001). Birçok *Fusarium* türü için henüz bir teleomorf (eşeyli üreme) bulunmamıştır. Saf kültürde morfolojik karakterlerle tanınan türlerin sayısı otoriteden otoriteye değişmektedir. Booth (1971) 44 tür ve 7 varyete; Gerlach ve Nirenberg (1982) 73 tür ve 26 varyete dahil ederken Nelson vd., (1983) 30 tür tanımlamıştır. Bununla birlikte, moleküler teknikler kullanılarak, morfolojik karakterlerle ayırt edilemeyen çok sayıda tür tanımlanmaktadır (O'Donnell, 1996). *Fusarium* türleri, Kuzey Kutbu'nun sürekli donuk topraklarından Sahra Çölü'ndeki kumlara kadar yayılan geniş bir coğrafyada üreyebilen kozmopolit bir türdür (Booth, 1971). Özellikle ekili

topraklarda yaygındır ve tablo 1'te belirtildiği gibi çok çeşitli bitki hastalıklarıyla ilişkilidir (Nelson vd., 1981; Webster ve Weber, 2007).

F. oxysporum bugüne kadar bilinen birçok sinonim türleri bulunmaktadır. Bunların bazıları, *F. bulbigenum* Cooke & Masee, *F. vasinfectum* G.F. Atk., Bull., *F. dianthi* Prill. & Delacr., *F. lini* Bolley, *F. orthoceras* Appel & Wollenw., *F. citrinum* Wollenw., *F. angustum* Sherb., *F. lutulatum* Sherb., *F. bostrycoides* Wollenw. & Reinking gibidir (Lombard vd., 2019).

F. oxysporum sınıflamasında alt-spesifik türler olarak özel form veya formların kullanılması, bu türlerin geniş morfolojik farklılıkları nedeniyle yaygın bir uygulama haline gelmiştir (Leslie ve Summerell, 2006).

F. oxysporum morfolojik özellikleri; havai miselleri 15–75 µm boyunda, dalsız veya seyrek dallı, taşıyıcı terminali veya ara sıra monofialidleri taşıyan, çoğunlukla tek fialidlere indirgenmiş ve üzerinde konidiyoforlar bulunur. Havai fialitleri, alt silindirik, pürüzsüz ve ince çeperli, 1-40 x 2–4 µm periklinal kalınlaşmaya ve göze çarpmayan veya yok olana kadar, subfialidlerin uçlarında küçük konidialar şeklinde bulunur. Bunlar ince cidarlı, 0-1 septat; 0-septatlı, ortalama 14 × 3 µm büyüklüğünde mikrokonidialardır (Lombard vd., 2019).

Sporodokial konidialar hilal şeklinde, her iki uca doğru hafifçe sivrilen neredeyse paralel taraflar ile dorsiventral olarak kavisli, pürüzlü künt, kavisli apikal hücre ve kundak benzeri bir bazal künt hücreye sahip olup genelde 3-5 septatlı, hiyalinsi, pürüzsüz ve ince duvarlıdır. Klamidosporları, 5-10 µm çapında, arada (interkalar) veya uçta (terminal) olarak oluşan, hafif eliptikten küre şekline kadar değişebilir (Lombard vd., 2019).

Kültürel özellikleri PDA besiyerinde 24 ° C'de ortalama radyal büyüme oranı 3.0-4.0 mm/gün olup, koloni yüzeyi soluk vinaceous, bol miktarda antelyum miselyum ile fokoz; koloni kenarları düzensiz, loblu, serrate veya filiformdur. Genellikle kokusuz, plakların alt kısmında kızıldan pembe gül rengine dönen genelde yaygın olmayan pigment bulunabilir. Sentetik besince fakir agar besiyerinde, hiphae hiyalin, pürüzsüz duvarlı, bol miktarda klamidosporlu, orta yüzeyde bol miktarda sporülasyon ile seyrek

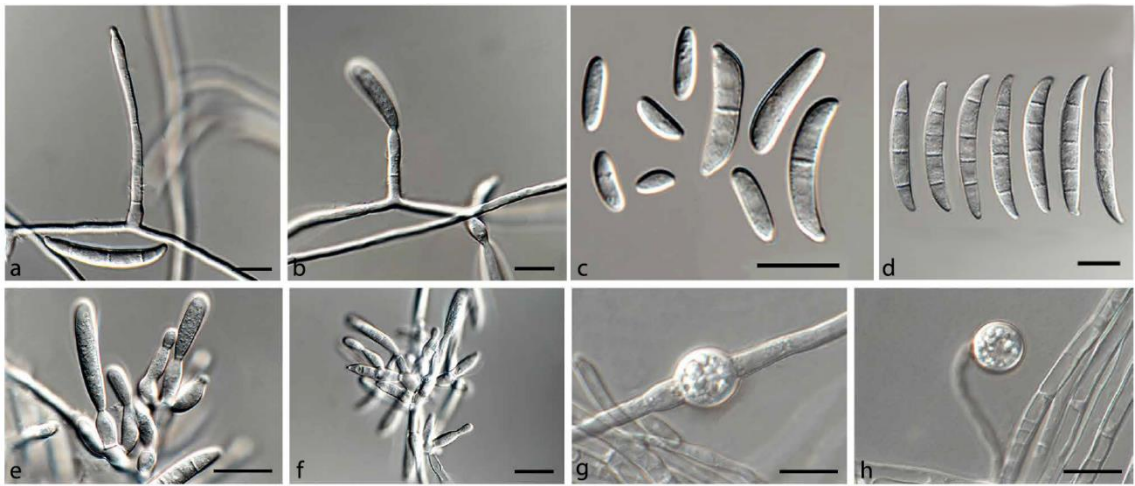
havai misel üretir. Karanfil yaprağı agarı besiyerinde ise bol miktarda karanfil ya da parlak turuncu sporodochia oluşumu ve seyrek havai misel oluşumu gözlenir (Lombard vd., 2019).

Tablo 1. Ekonomik öneme sahip bitki hastalıklarına neden olan bazı Fusariumlar (Holliday, 1998).

Anamorf isimleri	Teleomorf isimleri	Buldukları Konaklar ve Yaptıkları Hastalıklar
<i>F. culmorum</i>	Bilinmiyor	Kortikal çürüklük, Kök çürüklüğü ve ılıman tahılların filizlenme öncesi yanması; arpa, buğday ve çavdar başı yanıklığı
<i>F. oxysporum</i>	Bilinmiyor	Geniş bir yelpazede solgunluk, Sararma ve kök çürüklüğü
<i>F. oxysporum f. sp. apii</i>	Bilinmiyor	Kereviz sararması
<i>F. oxysporum f. sp. cepae</i>	Bilinmiyor	Bazal çürüme ve soğan depolama çürümesi
<i>F. oxysporum f. sp. cubense</i>	Bilinmiyor	Panama muz solgunluğu
<i>F. oxysporum f. sp. dianthi</i>	Bilinmiyor	Karanfil ve tavşanağzı solgunluğu
<i>F. oxysporum f. sp. elaeidis</i>	Bilinmiyor	Palmiye yağı solgunluğu
<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>	Bilinmiyor	Domates solgunluğu
<i>F. oxysporum f. sp. pisi</i>	Bilinmiyor	Bezelye solgunluğu
<i>F. oxysporum f. sp. vasinfectum</i>	Bilinmiyor	Pamuk solgunluğu
<i>F. solani</i>	<i>Nectria haematococa</i>	Birçok bitkinin kök ve yaka çürüğü; Odunsu bitki gövde hastalığı
<i>F. oxysporum f. sp. cucurbitae</i>	Bilinmiyor	Salatalık ve kavun kök çürüklüğü
<i>F. oxysporum f. sp. coeruleum</i>	Bilinmiyor	Patateste depo ve kuru çürüklüğü
<i>F. avenaceum</i>	<i>Gibberella avenacea</i>	Tahılların, iğne yapraklıların ve baklagillerin devrilme hastalığı ve kök hasarı
<i>F. sulphureum</i>	<i>G. cyanogena</i>	Patates yumrularının depolama çürüklüğü ve kuru çürüklüğü
<i>F. moniliforme</i>	<i>G. fujikuroi</i>	Birçok bitki hastalığı
<i>F. sambucinum</i>	<i>G. pulicaris</i>	Şerbetçiotu koçanı ve bitki kök çürüklüğü, Patates depo hastalığı
<i>F. graminearum</i>	<i>G. zae</i>	Ilıman ve tropik tahılların sayısız hastalıkları

Fusarium'un eşeysiz üremesindeki karakteristik bir özellik, bazal bir hücre üzerinde fusiform uzun ve enine bölünmüş makrokonidinin gelişmesidir (Şekil 1). Bazı türlerde de fialid kaynaklı mikrokonia'lar gelişir. Bitki konakçılarında makrokonidia genellikle

turuncu-pembe sporodokia'da (üreme hücre yığını) birikir. Makrokonidia, bu tür püstüllerden hafif fiziksel bir temasla yayılabilir. Kültürde, makrokonidia'nın yağlı birikimlerine piyonnot adı verilir. Toprakta hayatta kalma muhtemelen enerji yoksunluğu sonucu veya bakteri salgılarına tepki olarak oluşan vejetatif hücrelerin kalın çeperli morfolojiye dönüşmesiyle oluşan uyku durumundaki klamidospor sayesinde (Schippers ve van Eck, 1981; Webster ve Weber, 2007). Wollenweber (1931) tarafından mikrokonidya ve klamidospor'ların hem mikro hem de makrokonidya'nın şekli ile birlikte varlığı veya yokluğu cins düzeyinde sınıflandırmada önemli olduğu bildirilmektedir.



Şekil 1. *Fusarium oxysporum* (eski-epitip kültür CBS 144134). a–b. Havai Misel üzerinde Klamidosporlar; c. Havai konidia (mikrokonidia); d. Sporodochial konidia (makrokonidia). Konidioforlar ve fialidler; e–f. Sporodokia ve sporodochial konidioforlar; g–h.— Ölçek çizgisi = 10 µm (Lombard vd., 2019).

Topraktan en çok izole edilen türlerden biri olan ve bitki kökleri ile birlikte gelişen *F. oxysporum*'dur. Birçok izolat patojenik değildir, ancak bu mantar çok çeşitli bitki konaklarından bildirilen ciddi bir bitki patojeni olan türleri de içermektedir. Seksüel aşaması bilinmemekle birlikte, moleküler çalışmalar *Gibberella-Fusarium* kompleksi ile monofilik olduğunu ve aseksüel *Gibberella* olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Samuels vd., 2001). Bu türlerde 80'den fazla forma özgü, çok sayıda bitkisel benzer tipleri ve ırklarına ek olarak, farklı konakçı cinslerinin karakteristik özelliklerini almış alttürleri de tanınmıştır (Gordon, 1993; Gordon ve Martyn, 1997). Geleneksel eşeyli üremenin yokluğunda *F. oxysporum*'daki büyük miktarda genetik varyasyon muhtemelen farklı vejetatif uyumluluk gruplarının üyeleri arasında bile paraseksüel üreme sırasındaki

rekombinasyonun gözükmesiyle oluşabilmektedir (Molnár vd., 1990; Webster ve Weber, 2007).

Klamidiasporlar toprakta uzun süre kalabilir ve kök ucu yoluyla ksilem damarlarına doğrudan nüfuz etme ve hücreler arası büyüme ile konakçı köklerini etkiler (Bishop ve Cooper, 1983). Solgunluk, ksilenin mantar biyokütlesi tarafından tıkanması ve ayrıca bazı mantarlar pektinazları nedeniyle kahverengileşmesi şeklinde gözlenir (Pegg, 1985; Beckman, 1987). Konak bitki sonunda su kıtlığı (solma) nedeniyle ölür ve bu aşamadan sonra *F. oxysporum* saprofit gelişmeye başlar.

Bazı türler tahıl ve gıda ürünlerinde tüketim zincirine girerlerse üretmiş oldukları mikotoksinler ile insan ve hayvan sağlığını etkileyebilirler. Ekonomik zarara sebebiyet veren önemli bitki patojenlerin (*Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* vb.) yanında, nadiren de insan patojeni olan türleri de bulunabilmektedir. Bazı türlerin, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda onikomikoz (tırnak enfeksiyonları), korneanın keratomikozu, ülserler, nekrozlar, cilt enfeksiyonları ve iç organların ölümcül enfeksiyonları gibi insan hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir (Joffe, 1986; de Hoog vd., 2000).

Bazı *Fusarium* türleri (örneğin, *F. graminearum* ve *F. moniliforme*) tohum kaynaklı olup, miselum tahıl içinde bulunur ve sıklıkla yüzeyde makroconidia üretir. Enfekte olmuş tohum, hastalığın sadece sonraki mevsimlere taşınmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hayvan ve insan besin kaynaklarına karışarak direk toksik etki gösterir veya kontamine hayvansal gıdaların insanlar tarafından tüketilmesiyle dolaylı olarak mikotoksin zehirlenmelerine neden olabilir (Joffe, 1986; Moss, 2002).

F. oxysporum suşlarının, bazıları bilinmeyen fonksiyonlara ve toksisitelere sahip poliploid sekonder metabolit kokteyli ürettiği bilinmektedir (Marasas vd., 1984; Mirocha vd., 1989; Bell vd., 2003; Desjardins, 2006; Manici vd., 2017). *F. oxysporum* tarafından üretilen ve iyi bilinen toksinlerin bazıları arasında beauverisin (Marasas vd., 1984; López-Berges vd., 2013), fusarik asit (Marasas vd., 1984; López-Díaz vd., 2018) ve fumonisinler (Rheeder vd, 2002), Zearalenone, trichothecenes ve vomitoxin (Creppy, 2002; Moss, 2002) gibi mikotoksinlerdir. Bu toksinler hayvan ve insan besin hammaddesinde

bulunabilir. *F. graminearum* kaynaklı bir östrojenik hormon olan Zearalenone, sığırlarda ve domuzlarda vulvovajinite ve kısırılığa neden olur. Diğer bazı *Fusarium* türlerinden T-2 toksini, çiftlik hayvanlarında ve insanlarda toksik aleukiaya (beyaz kan hücre sayısında azalma) neden olur (Joffe, 1986; Moss, 2002).

1.3. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitlerin tanımlaması; genellikle büyüme, gelişme ve üreme için zorunlu olmayan, bir organizma tarafından üretilen küçük organik bileşiklerdir (Olmedo-Monfil ve Casas-Flores, 2014). Sekonder metabolitler aktif büyümeden durağan safaya geçiş sırasında yüksek seviyelerde üretilir. Sıklıkla bitki savunmasında önemli rol oynayan sekonder metabolitlerin eksiklikleri doğrudan ölümle sonuçlanmaz. Uzun dönemde organizmanın hayatta kalma becerisinde azalmaya sebep olur. İkinci bir bakış sekonder metabolizmaya dahil olan genlerin evrim yoluyla yeni yararlı özellikler geliştirmek için mutasyon ve doğal seçilime olanak veren "genetik oyun alanı" sağladığını öne sürer. Üçüncü bir bakış sekonder metabolizmayı hücrel metabolizma ve biyolojinin bütünsel bir parçası olarak tanımlar. Bu sekonder bileşikler bitkiler, mantarlar, bakteriler, algler ve hayvanlar tarafından sentezlenen doğal ürünlerin oldukça çeşitli bir grubudur (Agostini-Costa vd., 2012). Fungal sekonder metabolitler dört ana kimyasal sınıfa ayrılabilir: a) poliketitler, b) terpenoitler, c) şikimik asit türevi bileşikler ve d) non-ribozomal peptidler (Pusztahelyi vd., 2015).

Poliketitler bakteri, mantar ve bitkilerde bulunan doğal ürünlerin geniş bir ailesidir ve tetrasiklin, daunorubisin, eritromisin, rapamisin ve lovastatin gibi sağlık açısından önemli olan ilaçları içerirler. Poliketit sentetazlar tarafından açıl CoA öncüllerinden biyosentezlenir. Yeni ilaç keşfi için benzersiz biyolojik etkinlikleri ve muazzam ticari değeri bulunmaktadır. Enzim katalizi, moleküler tanıma ve protein-protein etkileşiminin moleküler mekanizmalarını araştırmak için olağanüstü yapıya, başka yollardan erişilmesi zor yeni bileşiklerin oluşumuna izin veren dikkat çekici molekülleri içermektedir (Shen, 2003).

Genel olarak terpenoid terimi ise, bütünleşik C₅ birimleri içeren bileşikleri belirtmek için kullanılır ve kimyasal olarak bütün terpenoidlerin, temel dallanmış C₅

birimi izopireninden türetildiği düşünülebilir. Molekülde bulunan C₅ birimlerinin sayısına göre terpen/terpenoidler hemi-, mono-, seski-, di-, sester-, tri- ve terpen/tetraterpenoid (karotenoid) olarak sınıflandırılır. Bu sınıflar sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 8 izopirenoid C₅ birimlerine sahiptirler. Genel olarak terpen/terpenoid terimi ise, bütünleşik C₅ birimleri içeren bileşikler için kullanılır ve kimyasal olarak bütün terpen/terpenoidlerin, temel dallanmış C₅ birimi izopireninden türetildiği düşünülebilir.

Şikimik asit, birçok bitki meyvesinin yapraklarında ve ayrıca mikroorganizmalarda (mantar ve bakteri) yaygın olarak, ancak sınırlı miktarlarda bulunur ve aromatik amino asit biyosentezinin ortak yolağındaki hidroaromatik bir ara üründür. Ayrıca, flavonlar, antosiyanidinler, flavonoller ve taninler gibi sinamik asitlerin ve flavonoidlerin öncüsü olarak da önemli bir rol oynar. Ayrıca, bu organizmalarda folik asit, alkaloidler ve vitaminlerin asimilasyonu için de gereklidir. Şikimik asit ve türevleri, birtakım ilginç biyolojik özellikler sergiler. Örneğin şikimik asit yüksek antioksidan aktivite gösterir. Diğer taraftan, şikimik asidin antipiretik (ateş düşürücü), antienflamatuar ve analjezik (ağrı kesici) aktivitenin yanı sıra antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Amalia vd., 2012).

Nonribozomal peptitler, toksin, pigment, antibiyotik, sitostatik, immünoşüpresan veya antikanser ajanları olarak görev alır ve özellikle sentezleri ribozomal mekanizmadan bağımsızdır. Çeşitli özellikleriyle sekonder metabolit sınıfında yer alan doğal ürünlerdir. Nonribozomal peptitlerin (NRP) sentezi ribozomdan bağımsız bir thiotemplate mekanizmasıyla kalıp ve biyosentetik düzenek olarak hizmet eden modüler organizasyonlu çoklu enzim kompleksleri olan NRP'ler tarafından yürütülür. Çoğunlukla nonribozomal peptitlerin üreticisi, *Actinomyces* sp. ve *Bacillus* sp. gibi toprakta yaşayan mikroorganizmalar ve ökaryotik filamentöz mantarlardır. Ancak deniz mikroorganizmaları da nonribozomal peptitlerin alternatif bir kaynağı olarak ortaya çıkmıştır. Bu peptitler, ornitin veya imino asitler gibi amino asitleri ihtiva eden yapısal özelliklere sahiptir ve yapıları, benzer yapısal elemanların makrosiklik, dallı makrosiklik, dimerleri veya trimerleridir. NRP sentezleyen enzimlerinin varlığı, yaşamın üç domaininde; bakterilerde yaygın, Eukarya'da daha az sıklıkta ve Archaea'da nadir olarak bildirilmiştir (Martinez-Nunez ve López, 2016).

1.2.1. Mikotoksinler ve Fusarium Toksinleri

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Fusarium* ve *Penicillium* gibi mantarların (küf) sekonder metabolizması sonucu ürettiği, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip ve molekül ağırlığı düşük olan doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluşturmaktadırlar. Ürünleri kurutma ve depolama sırasında çoğunlukla *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi küfler sorun yaratırken, hasat öncesi veya hasat sırasında ise *Fusarium* ve *Alternaria* türleri ile kontamine olan ürünlerde de sorun yaratabilmektedirler (Girgin vd., 2001).

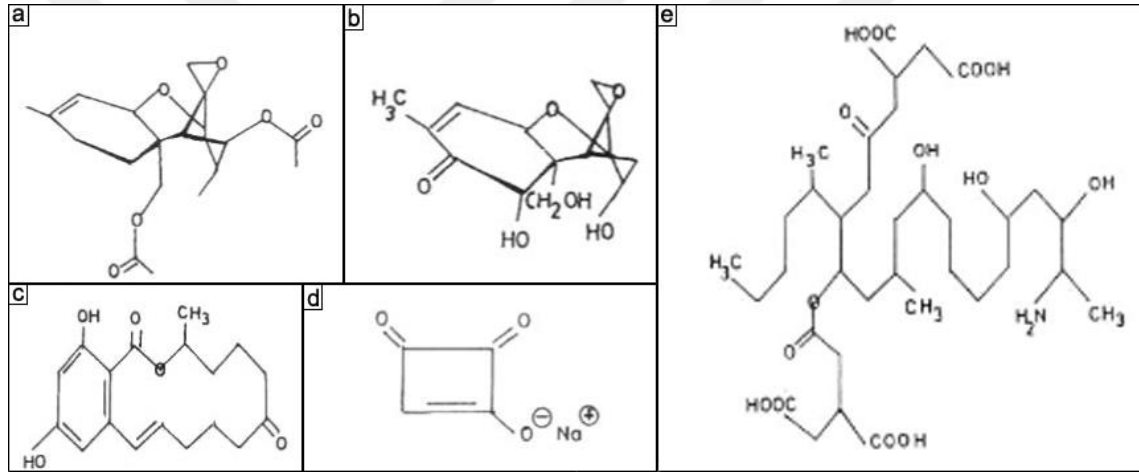
Mikotoksinler ilk olarak 1960'ların başlarında İngiltere'de meydana gelen hindi X salgını ile bildirildi. *Aspergillus flavus* ile kontamine olmuş yerfıstığı içeren yemler, yaklaşık 100000 hindinin ölümüne neden olmuştur. Yapılan araştırmalar 250'den fazla mantar türünün mikotoksin oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. En sık saptanan mikotoksinler: Aflatoksinler, Okratoksin, Sitrinin, Ergot alkaloidleri, Patulin, Fumonisin, Trikotesenler, Zaeralenon, Rubratoksin'dir (van Egmond ve Jonker, 2006). Bazı önemli mikotoksin türleri ve hastalık etkileri Tablo 2'de verilmiştir.

Bütün küf cins ve türleri mikotoksin üretmezler. Küflerin görünüşü, kokusu ve tatlarına bakılarak mikotoksin ürettiklerini söylemek olanaksızdır. Mikotoksinler bulaşıcı değildir. Salgın şeklinde görülmeleri kontamine olmuş bir besin veya yemle ilişkilidir. Mikotoksinlerin hayvanlar ve insan sağlığı üzerindeki toksik etkileri mikotoksikozis olarak tanımlanır. İlaç ve antibiyotik tedavisi mikotoksikozis üzerine çok az etkisi vardır veya hiç etkisi yoktur. Mikotoksikozislerin yaygın görülmeleri genelde mevsime bağlıdır. Toksisitenin derece ve şiddetini sık olarak konakçının yaş, cins ve beslenme durumu etkilemektedir. Duyarlı besin veya yemin incelenmesi ile küflerin bulunma durumu ve aktiviteleri açığa çıkarılabilir (Tayfur, 2002).

Tablo 2. Mikotoksinler ve Olası Sağlık Etkileri (Macher, 1999).

Fungus	Mikotoksin	Muhtemel Tıbbi Etkileri
<i>Acremonium spp.</i>	Cefalosporin	Antibiyotik
<i>Alternaria alternata</i>	Tenuazoik asit	Nefrotoksik, Hepatotoksik, Hemorajik
<i>Aspergillus clavatus</i>	Sitokalsin E, Patulin	Hücre Bölünmesi, Protein Sentezi İnhibitörü, Nefrotoksik, Kanserojen
<i>Aspergillus flavus,</i> <i>Aspergillus parasiticus,</i> <i>Aspergillus fumigatis</i>	Aflatoksinler Fumitremorjenler Gliotoksin	Mutajenik, Kanserojen, Hepatotoksik, Tremorjenik, Sitotoksik
<i>Aspergillus nidulans,</i> <i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatosistin	Hepatotoksik, Kanserojen
<i>Aspergillus ochraceus,</i> <i>Penicillium verrucosum,</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoksin A	Nefrotoksik, Hepatotoksik, Kanserojen
<i>Cladosporium spp.</i>	Epikladosporik asit	Bağışıklık Sistemi Baskılayıcı
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	Kladosporin, Emodin	Antibiyotik
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoksinivalenol Zearalenon	Emetik, Östrojenik
<i>Fusarium monoliforme</i>	Fumonisinler	Nörotoksik, Hepatotoksik, Nefrotoksik, Kanserojen
<i>Fusarium poae,</i> <i>Fusarium sporotrichoides</i>	T-2 toksin	Hemorrhagic, Hepatotoksik, Nefrotoksik, Kanserojen
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	Penicillin	Antibiyotik
<i>Penicillium crustosum</i>	Penitrem A, Rokuefortin C	Tremorjenik, Nörotoksik
<i>Penicillium expansum</i>	Sitrinin, Patulin, Rokuefortin C	Nefrotoksik, Kanserojen, Protein Sentezi İnhibitörü, Nörotoksik
<i>Penicillium</i> <i>griseofulvum,</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Griseofulvin	Tümör Oluşturucu, Teratojenik, Hepatotoksik
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Satratoksinler, Verrukarinler, Roridinler, Stakibosinler	Enflamasyon Ajanı, Bağışıklık Sistemi Baskılayıcı, Dermatit, Hemotoksin, Hemorajik

Tarla küflerine dâhil olan *Fusarium*'lar saprofit ve fitopatojen karakterli türleri içerirler. *Fusarium* türleri özellikle tropik ve subtropik bölgelerde yetişen tarım ürünlerinde farklı kimyasal yapıda çok sayıda mikotoksin (Şekil 2) sentezlemektedir (Schollenberger vd., 2004). Bitki patojeni olarak önemli rol oynamakta olup çeşitli tahıl ürünlerinde dip çürüklüğü, yaprak ve başak yanıklığı ve koçan (dane) çürüklüğü hastalıklarına neden olmaktadır (Uçkun ve Yıldız, 2003; Schollenberger vd., 2004). Bunlar arasında mikotoksinler yönüyle önemli olanları; buğdayda başak yanıklığı ve mısırdan koçan çürüklüğü hastalıklarıdır (Uçkun ve Yıldız, 2003). Tarımsal ürünlerde çürüme etmeni olan saprofitlere oranla fusarioza neden olan fitopatojen olanlar çok daha önemlidir.



Şekil 2. Bazı mikotoksinlerin kimyasal yapıları. a) Diasetoksisirpenol yapısı, b) Deoksinivalenol yapısı, c) Zearalenon yapısı, d) Moniliformin yapısı, e) Fumonisin yapısı (Tunail, 2000).

Dünya Sağlık Örgütü- Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (WHO-IARC) 1993 yılında mikotoksinleri insanlara karşı kanserojenik potansiyellerine göre sınıflandırmışlardır. Bu sınıflandırmaya göre; *Fusarium* türleri tarafından üretilen mikotoksinlerden fumonisinler "muhtemel kanserojenik mikotoksin" (Grup 2B) olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, trikotesen ve ZEA'un insanlara karşı kanserojenik potansiyelinin bulunmadığı belirtilmiş ve "3. Grup" da sınıflandırılmıştır (Hussein ve Brasel, 2001).

1.2.1.1. Trikotesenler

Trikoteseenler, *Fusarium* cinsi küfler tarafından hasat öncesi veya sonrasında 0-35 °C arasında ve %80-90 nispi nem değerlerinde üretilmekte olup, özellikle buğday, mısır, arpa ve pirinçte bulunmaktadır (Garda vd., 2005). Hücre zarı boyunca pasif olarak hareket edebilen küçük, amfipatik moleküllerdir (Alshannaq ve Yu, 2017; Cortinovis vd., 2013). Bu gruba ait metabolit ilk kez *Trichethecium roseum*'dan izole edildiği için trikoteseen adını almıştır. Trikoteseen üreten *Fusarium* türleri arasında en sık rastlanılanları; *F. equesiti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum* ve *F. sporotrichoides* türleridir (Sweeney ve Dobson, 1998).

Tablo 3. Trikoteseen Üreten *Fusarium* Türleri (Kabak ve Var, 2005).

<i>F. acuminatum</i>	<i>F. oxysporium</i>
<i>F. avenaceum</i>	<i>F. poae</i>
<i>F. camptoceras</i>	<i>F. proliferatum</i>
<i>F. chlamydosporium</i>	<i>F. sambucinum</i>
<i>F. compactum</i>	<i>F. scirpi</i>
<i>F. crookwellense</i>	<i>F. semitectum</i>
<i>F. culmorum</i>	<i>F. solani</i>
<i>F. equesiti</i>	<i>F. sporotrichoides</i>
<i>F. graminearum</i>	<i>F. subglutinans</i>
<i>F. moniliforme</i>	<i>F. tricinctum</i>
<i>F. nivale</i>	<i>F. tumidum</i>
<i>F. nygamai</i>	<i>F. veneatum</i>

Trikoteseenlerin karakterize edilen 80'in üzerinde türü bulunmakla birlikte (Deshpande, 2002), yalnızca birkaçı tahıl ve ürünlerinde doğal kontaminant olarak bulunmaktadır (Mateo vd., 2002). Trikoteseenler dört tipe ayrılabilir; A (T-2 ve HT-2 toksinler, diasetoksisirpenol), B (deoksinivalenol, nivalenol), C ve D ve bunlar, üç ana *Fusarium* mikotoksinlerinin ana ve en çeşitli kimyasal gruplarıdır (Summerell ve Leslie, 2011; Patriarca ve Pinto, 2017). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan sınıflandırmalarda bunlara E ve F tipi olmak üzere 2 grup daha eklenmiştir (Deshpande, 2002). Diğer yandan, doğal olarak en çok rastlanılanları A ve B tipidir. Tetrasiklik yapı göstermeleri hepsinin ortak özelliğidir. Bu denli fazla türevinin olmasına karşın tarım ürünlerinde doğal kontaminant olarak saptananlar 4 adedi geçmez. Bunlar; diasetoksisirpenol, T-2 toksin, nivalenol, deoksinivalenol ve T-2 toksinin parçalanma ürünü olan toksik metabolit HT-toksin' dir.

A tipi trikotesenler, B tipi trikotesenlerden farklı olarak 8. C atomunda karbonil fonksiyonel grubu bulundurmaması UV absorpsiyonu ile tespit edilememesine neden olmaktadır (Mateo vd., 2002). Ayrıca, A tipi trikotesenler etil asetat, aseton, kloroform ve dietil eterde yüksek oranda çözünürken, B tipi trikotesenler ise daha yüksek polariteye sahiptirler ve metanol, asetonitril ve etanolde iyi çözünmektedirler (Deshpande, 2002).

Fusarium'larda trikotesenler genellikle 15-20 °C arasında yüksek düzeyde sentezlenmekle birlikte birçok *Fusarium* türü yüksek sıcaklığa (22 °C) oranla düşük sıcaklıkta (8 °C) daha fazla trikotesen sentezler. Ayrıca soğuk şoklar toksin sentezini uyandır. Laboratuvar denemeleri 22 °C de 3 hafta süre ile inkübe edilen *Fusarium* kültürüne oranla 6. gün 8 °C'de bir süre tutulup soğutulan kültürde 3 misli fazla mikotoksin oluştuğunu ortaya koymuştur.

A tipi trikotesenlerin genellikle *F. sporotrichoides* seyrek olarak da *F. poae* tarafından üretildiği, B tipi trikotesenlerin ise spesifik olarak *F. culmorum* ve *F. graminearum* tarafından üretildiği bildirilmektedir (D'Mello ve Macdonald, 1997; Placinta vd., 1999). *F. sporotrichoides* -2 °C ile 35 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında gelişmesine karşın optimum gelişme sıcaklığı 22,5 – 27,5 °C aralığındadır. Benzer şekilde, *F. graminearum*'un optimum gelişme sıcaklığı 24-26 °C'dir. *F. graminearum*'un gelişimi için minimum su aktivitesi değeri 0,90, pH değeri ise sıcaklığa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Psikotrof bir tür olan *F. culmorum* ise 0-31 °C aralığında gelişmekle birlikte, optimum olarak 21 °C'de gelişim göstermektedir. Toksin üretimi için gerekli fizyolojik faktörlerin organizmanın gelişim koşulları ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sweeney ve Dobson, 1998). Diğer biyoaktif bileşikler gibi *Fusarium* mikotoksinleri de akut ve kronik toksik aktiviteye sahiptir. Trikotesenlerin bağışıklık sistemine karşı toksik aktivitede bulunduğu ve protein sentez inhibitörü olarak rol oynadığı üzerinde durulmaktadır. Bununla birlikte, trikotesenlere maruz kalmış hayvanların bağışıklık sisteminin zayıfladığı çeşitli hastalıklara ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı hassas hale geldikleri bildirilmektedir (Sweeney ve Dobson, 1998). Diğer yandan, trikotesen kalıntılarının et, süt ve yumurta gibi hayvansal kaynaklı ürünlere geçtiği ile ilgili olarak herhangi bir veriye rastlanılmamıştır (Deshpande, 2002).

Genellikle A tipi trikotesenlerin B tipi trikotesenlere oranla daha yüksek toksik aktivite gösterdiği belirtilmektedir (D'Mello vd., 1999; Placinta vd., 1999). Bu konuda tavuklarda yapılan bir çalışmada DAS ve T-2 toksin açısından LD₅₀ değerleri sırasıyla 2-5,9 mg kg⁻¹ ve 3,6-5,25 mg kg⁻¹ vücut ağırlığı olduğu bildirilirken, bu değer DON için 140 mg kg⁻¹ vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Placinta vd., 1999). A tipi trikotesenler içerisinde toksisiteleri bakımından en önemlileri T-2 ve HT-2 toksindir. *F. sporotrichoides* ve *F. poae* tarafından üretilen bu toksinlerin "alimentary toxic aleukia" hastalığına neden olduğu belirtilmektedir. Hastalığın belirtileri; boğazda ve ağızda yanma, kusma, diyare, karın ağrısı, kanama ve ölüm şeklinde kendini göstermektedir. Tarihte ilk "alimentary toxic aleukia" vakası Rusya'nın Orenburg bölgesinde ikinci dünya savaşı sırasında görülmüştür. Savaş nedeniyle hasat edilemeyen buğdaylar kış sezonu boyunca tarlada kalmıştır. Ertesi yıl açlık nedeniyle küflenmiş bu tahıl tanelerinden üretilen ekmeklerin tüketilmesi sonucu yukarıda belirtilen semptomlar görülmüştür (Bullerman, 1997). T-2 toksini ile kontamine olmuş gıda ve yem maddelerinin tüketilmesi sonucu insan ve hayvanlarda karaciğer ve böbrek hasarı, bağışıklık sisteminin zayıflaması, mukoza ve deri soyulması gibi çeşitli hastalıklara rastlandığı belirtilmektedir (Yazıcıoğlu ve Omurtag, 2003). T-2 toksini ayrıca, biyolojik silah ajanı olarak üzerinde durulması nedeniyle de önem taşımaktadır (Salem, 2003).

B tipi trikotesenlerden DON toksini (Vomitoksin, RD-toksin, C₁₅H₂₀O₆, MA=296,32), dünyada en yoğun olarak rastlanılan *Fusarium* toksinidir. Bu nedenle tarım ürünlerinde indikatör toksin olarak da adlandırılmaktadır. DON özellikle *F. graminearum* (seksual formu *Gibberella zeae*) ve *F. culmorum* küfleri tarafından üretilmekte olup, buğday başta olmak üzere mısır, arpa, yulaf, çavdar ve pirinç gibi çeşitli tahıl ürünlerinde sorun yaratmaktadır (EC, 1999; Creppy, 2002; Prange vd., 2005). Bu küflerin buğdayda "*Fusarium* başak yanıklığı" ve "*Gibberella* koçan çürüklüğü" hastalıklarına neden olduğu belirtilmektedir. Bu iki türün coğrafi dağılımı sıcaklığa bağlı olarak değişmekte olup, *F. graminearum*'un daha sıcak iklim koşullarında sorun yarattığı bildirilmektedir. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un optimum sıcaklık istekleri sırasıyla 25°C ve 21 °C'dir (Sweeney ve Dobson, 1998).

Tahıl ürünlerinde DON kontaminasyon riskini ortaya koymak amacıyla yapılan bir çalışmada, analiz edilen 11444 buğday örneğinin %57'sinde 1-5700 mg/kg oranında,

5349 mısır örneğinin %41'inde 3-3700 mg/kg, 834 yulaf örneğinin %68 'inde 4-760 mg/kg, 1662 arpa örneğinin %59'unda 4-9000 mg/kg, 295 çavdar örneğinin %49 'unda 13-240 mg/kg ve 154 pirinç örneğinin %27'sinde 6-5100 mg/kg arasında değişen miktarlarda DON tespit edilmiştir (JECFA, 2001). Diğer yandan, Almanya'da değirmenlerden ve gıda satış noktalarından toplanan toplam 60 adet buğday unu örneğinin %98'inde DON, %12 'sinde NIV, %2'sinde 3-ADON, %3'ünde 15-ADON, %7'sinde HT-2 toksin ve %38'inde ZEA tespit edilmiştir (Schollenberger vd., 2002). Bu konuda ülkemizde yapılan bir çalışmada, Çukurova bölgesinde 2002-2003 yılları arasında hasat edilen 73 mısır ve 43 buğday örneğinden oluşan toplam 116 örneğin 25'inde 20-2540 mg kg-1 DON, 31'inde 6,44 – 43,2 mg kg-1 T-2 toksin ve 37'sinde 36,2-627,6 mg kg-1 arasında değişen miktarlarda ZEA saptanmıştır (Gürsoy ve Biçici, 2003). Benzer şekilde, İstanbul'da market ve pazarlardan temin edilen toplam 83 hububat ve bakliyat örneğinde yapılan incelemede DON, bakliyat örneklerinde bulunamazken, hububat örneklerinin %8,8'inde tespit edilmiştir (Beyoğlu ve Omurtag, 2003).

DON'nun akut dozlarda alındığında kusmaya ve kilo kayıplarına, düşük dozlarda ise gelişimde ve yem tüketiminde azalmaya neden olduğu çeşitli deney havanları ve çiftlik hayvanları ile yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konmuştur.

Trikotesenlerin toksisiteleri yüksektir. Hücre içindeki etkisi protein sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Canlıya 30 µg/ml düzeyinde verildiğinde protein sentezi durur. Molekül spesifik olarak terminatör bölgeleri yakalar, aynı zamanda ribozomlarda polipeptid-transferaz enzimini bloke eder. Metabolizmada SH-grubu içeren önemli enzim veya koenzimlerle reaksiyona girerek reaksiyonları durdurur. DON'un DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ettiği bildirilmektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda DON'un kanserojenik ve mutajenik aktiviteye sahip olduğu ile ilgili bir bulguya rastlanılmamıştır. Buna karşın, nörotoksik ve immunotoksik etkileri rapor edilmiştir (EC, 1999). Asya'da yapılan bir çalışmada, 3-93 mg kg⁻¹ oranında DON ile kontamine olmuş tahılların tüketimi sonucu insanlarda mide bulantısı, kusma, diyare, baş ağrısı gibi akut vakalar görülmüştür (Creppy, 2002).

1.2.1.2. Zearalenon

ZEA ($C_{18}H_{22}O_5$, MA=31 8,36) diğer bilinen adıyla F-2 toksin, özellikle *F. graminearum* tarafından üretilmekte ve mısır başta olmak üzere, sorgum, buğday, yulaf ve diğer tahıl ürünlerinde ve ekmekte sorun yaratmaktadır (Ryu vd., 1999; Mateo vd., 2002; EFSA, 2004). Diğer ZEA üreticisi *Fusarium* türleri arasında *F. culmorum* ve *F. crookwellense* bulunmaktadır (Visconti ve Pascale, 1998).

ZEA oluşumu genellikle hasat öncesi tarla koşullarında gerçekleşmekte ve diğer *Fusarium* toksinleri ve özellikle de DON ile bir arada oluşmaktadır (EFSA, 2004). Östrojenik bir mikotoksin olan ZEA, endokrin hormonuna (östrojen) karşı aktivite göstermekte ve özellikle domuzlarda hiperöstrojeniz'e neden olmaktadır (Ryu vd., 1999; Mateo vd., 2002). Sindirim sonrası ZEA'un özellikle de karaciğer tarafından olmak üzere çeşitli dokularda cis ve trans formları olan a-zearalenol ve b-zearalenol'e dönüştüğü belirtilmektedir (EFSA, 2004). Bu konuda yapılan çalışmalarda trans-a-zearalenol'ün ZEA'a oranla 3-4 kat daha östrojenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (D'Mello vd., 1999). Diğer yandan, ZEA türevi olan zearaleonol'ün geviş getiren hayvanlarda gelişim destekleyicisi olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Deshpande, 2002).

ZEA'un çeşitli çiftlik hayvanlarında verim düşüklüğüne neden olduğu belirtilmektedir (Visconti ve Pascale, 1998). Domuzlarda kısırlık, yavru atma ve hormonal bozukluklar meydana getiren toksin en fazla serin-soğuk iklimde yetiştirilen tahıllarda görülür. Bunun yanı sıra, Çin ve Güney Kore'de ZEA ile kontamine olmuş tahıl tüketen insanlarda özofagus (yemek borusu) kanser vakaları rapor edilmiştir (Mateo vd., 2002). ZEA'un trikotesenlere oranla daha az toksik olduğu akut testler sonucu ortaya konmuştur. Farelerde yapılan çalışmalarda ZEA açısından LD₅₀ değerinin 2-10 g kg⁻¹ vücut ağırlığı olduğu belirlenmiştir (Placinta vd., 1999). Diğer yandan, domuz ve koyunların ZEA'a karşı en hassas hayvan türleri olduğu bildirilmektedir (EFSA, 2004). ZEA ve türevlerinin akut toksisitesinin düşük olması nedeniyle insanlara karşı olumsuz bir etkisi rapor edilmemiştir (Deshpande, 2002). Birçok mikotoksinde olduğu gibi mısır zearalenon oluşumu için en uygun substrattır. Buğday, pirinç, fasulye ve özellikle yem maddelerinde görülür. Yemlerde 0,12 mg/kg düzeyinde bulunduğu kronik toksik etki meydana gelir.

ZEA lakton halkasına sahip olmasına rağmen sıcaklığa karşı dayanıklıdır. Saf kristal formda ve gıdalarda doğal kontaminant halinde bulunan ZEA'un 150 °C'de 44 saat süreyle parçalanmadığı belirtilmektedir (Ryu vd., 1999). ZEA'un erime sıcaklığının 164-165 °C, maksimum UV absorpsiyonunun ise 235 nm olduğu rapor edilmiştir (EFSA, 2004).

Tahıl ürünlerinde ZEA kontaminasyon seviyesini ortaya koymak amacıyla çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Kanada'da 1978-1993 yılları arasında yapılan bir araştırmada analiz edilen 919 tahıl örneğinin %69'unu ZEA ile kontamine olmuş mısır örnekleri oluşturduğu ve yüksek miktarlarda (647 mg kg⁻¹) ZEA saptandığı bildirilmiştir (EFSA, 2004). Ülkemizde yapılan araştırmalara değinecek olursak; Karadeniz Bölgesi'nde yetiştirilen mısırlarda ZEA varlığını incelemek amacıyla 44 mısır örneği ile yapılan çalışmada, örneklerin 37'sinde iz miktarlarla 794 mg kg⁻¹ arasında değişen oranlarda (ortalama 199 mg kg⁻¹) ZEA tespit edilmiştir (Özkaya ve Aşkın, 1994).

Zearalenonun gıdalarda bulunabilecek miktarları bazı ülkeler tarafından belirlenmiştir. Macaristan tüm gıdalarda bulunabilecek miktarı 50 µg/kg olarak yasal düzenleme ile sınırlarken Avusturya buğday ve çavdar için 60 µg/kg değerini öneri olarak, Fransa tahıllar, mısır, darı ve bitkisel yağ için 200 µg/kg sınır değerini yasal düzenleme ile benimsenmiştir. Rusya'daki yasal sınır değeri tüm daneli ürünler ve yağlı tohumlar için 1000 µg/kg zearalenondur.

F. graminearum, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. oxysporium* türleri tarafından oluşturulan zearalenon ölümlü sonuçlanan zehirlenmeler yerine östrojenik etkisiyle karakterizedir. Bu mikotoksine en fazla domuzlar duyarlıdır. Sığırlar da zaman zaman etkilenirler ancak kanatlılar üzerinde etkisi belirlenmemiştir.

1.2.1.3. Fumonisinler

Fusarium türleri tarafından üretilen mikotoksinlerin diğer önemli bir grubunu oluşturan fumonisinler, ilk olarak 1988 yılında Güney Afrika'da keşfedilmiştir (Bankole ve Adebajo, 2003; Arranz vd., 2004). Fumonisinler özellikle *F. moniliforme* (*F.*

verticilloides) ve *F. proliferatum* tarafından üretilmektedir. Diğer yandan, *F. nygamai* ve *F. nagiforme* küflerinin de fumonisin sentezledikleri bildirilmektedir. *F. moniliforme*'nin minimum 2-5 °C, maksimum 32-37 °C ve optimum olarak 22,5-27,5 °C aralığında geliştiği belirtilmekle birlikte optimum fumonisin oluşumunun 20 °C'de meydana geldiği saptanmıştır. *F. moniliforme* gelişiminin ve toksin üretiminin 0,90 aw (su aktivitesi) değerinin altında durduğu belirtilmektedir. Diğer önemli fumonisin üreticilerinden olan *F. proliferatum* ise *F. moniliforme* ile benzer gelişim koşulları göstermektedir (Sweeney ve Dobson, 1998). Bu küfler mısırdaki yaygın olarak görülmekte ve "*Fusarium* dane çürüklüğü" olarak nitelendirilen hastalığa neden olmaktadır. *F. moniliforme* ve *F. proliferatum* geniş bir sıcaklık aralığında ve 0,90 aw'nin üzerindeki değerlerde geliştiğinden, mısırdaki fumonisin oluşumu yalnızca hasat öncesi veya kurumanın başlangıcında meydana gelmektedir. Fumonisinler mısırın yanı sıra seyyrek olarak, sorgum, kuşkonmaz, pirinç ve birada da sorun yaratmaktadır (JECFA, 2001; Creppy, 2002).

Fumonisinler, uzun zincirli hidrokarbon ünitesine sahip olup, 13 gruptan oluşmaktadır. Bunlardan yalnızca B grubu olan fumonisinlerin, fumonisin B1(FB₁), FB₂ ve FB₃'ün mısır ve mısır bazlı ürünlerde doğal olarak bulunduğu belirtilmektedir (Mateo vd., 2002). Diğer mikotoksinler gibi fumonisinlerin de sıcaklığa karşı dayanıklı olduğu ve 150 °C'nin altındaki değerlerde kısmi parçalanmanın görüldüğü bildirilmektedir (Arranz vd., 2004).

Nijerya'da analiz edilen 108 mısır örneğinin 55'inde 65-1830 mg kg⁻¹ oranında değişen miktarlarda FB₁ tespit edilmiştir (Bankole ve Adebajo, 2003). Benzer şekilde, Marmara Bölgesindeki market ve pazarlardan temin edilen 110 adet hububat ürünü örneğinin %20'sinde 250-2660 mg kg⁻¹ arasında değişen miktarlarda FB₁ ve örneklerin yalnızca birinde 550 mg kg⁻¹ FB₂ bulunmuştur (Beyoğlu ve Omurtag, 2003).

Fumonisinler içerisinde doğal olarak en çok üretilen bileşiğin FB₁ olması nedeniyle toksikolojik çalışmalar genelde bu toksin üzerine yoğunlaşmıştır. FB₁'in yapısında bulunan serbest amino grubu, biyolojik aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Diğer fumonisin türlerine göre daha toksik olan FB₁'in farelere karşı hepatoksik ve hepatokanserojenik aktivite, tavuk ve farelere karşı teratojenik etki, domuz, fare ve

tavşanlarda böbreklere karşı toksik aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Bunun yanı sıra, FB1'in atlarda, "çılgın at hastalığı" olarak da bilinen ve öldürücü nörolojik bir hastalık olan lökoensefalomalazi (ELEM) sendromuna ve domuzlarda beyin ve akciğerde ödemlere yol açtığı görülmüştür. Ayrıca, FB1'in sfingolipit biyosentezini inhibe ettiği de ileri sürülmektedir (EC, 1999; Bankole ve Adebajo, 2003; Creppy vd., 2004). FB1'in sitotoksik aktivite gösterdiği, protein ve DNA sentezini inhibe ettiği belirtilmektedir (Creppy vd., 2004). Diğer yandan, fumonisinlerin et, süt ve yumurta gibi hayvansal ürünlere iz miktarlarda geçtiği ve bu ürünlerde önemli bir sorun oluşturmadığı belirlenmiştir (Arranz vd., 2004). Fumonisinlerin insan sağlığı üzerine etkisine yönelik yeterli çalışma bulunmamasına karşın, Güney Afrika ve Çin'de yapılan araştırmalarda, yüksek oranda fumonisin ile kontamine olmuş mısır tüketimi ile insanlarda özofagus kanseri arasında yakın bir ilişki bulunmuştur (Pitt, 2000; Bankole ve Adebajo, 2003; Özyaral, 2003).

1.2.1.4. Moniliformin

Moniliformin ($C_4H_2O_3$, MA= 121), ilk olarak Kuzey Amerika'da *F. moniliforme* ile kontamine olmuş mısırlardan izole edilmiştir (Rabie vd., 1982). Diğer moniliformin üreticisi türler arasında *F. proliferatum*, *F. subglutinans* ve *F. avenaceum* yer almaktadır (Hussein ve Brasel, 2001; Leoni ve Soares, 2003). Moniliforminin mısırın yanı sıra pirinç ve buğday gibi tahıl ürünlerinde de sorun yarattığı belirtilmektedir (Deshpande, 2002; Abramson vd., 2001) Kanada'da *Fusarium* türleri ile kontamine olmuş buğday örneklerinden izole ettikleri 42 *F. avenaceum* izolatından 40 tanesinin 1,3-138,1 mg kg⁻¹ arasında değişen miktarlarda moniliformin ürettiğini tespit etmişlerdir. Diğer yandan, İngiltere'de yapılan çalışmalarda düşük miktarlarda (<0,25 mg kg⁻¹) moniliformin tespit edilmiştir. Bu konuda Brezilya'da 90 mısır örneği ile yapılan bir çalışmada ise örneklerin hiçbirinde tespit edilebilir miktarda moniliformin bulunamamıştır (Leoni ve Soares, 2003). Diğer *Fusarium* mikotoksinlerine oranla moniliformin ile ilgili sınırlı düzeyde bilgi bulunmaktadır bununla birlikte gıda ve yem maddelerinde bulunmasıyla ilgili olarak yasal limit belirlenmemiştir.

LD₅₀ değerinin farelerde 25-50 mg kg⁻¹, ördeklerde (7 günlük) ise 3,68 mg kg⁻¹ vücut ağırlığı olduğu belirtilmektedir. Moniliforminin akut dozlarda alındığında bağırsak

kanama (hemorrhagia)'ya neden olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte kuşlarda kilo kayıplarına neden olduğu ileri sürülmektedir.

Moniliforminin stabilitesi sıcaklık, pH ve süreye bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, 175°C'de (pH=10) tamamının parçalandığı ileri sürülmektedir (EMAN).

1.2.2. *Fusarium* Metabolitlerinin Antimikrobiyal Etkinlikleri

Doğal kaynaklı ilaçlar, anti-efektif ilaç araştırmalarında önemlidir ve günümüzde mevcut klinikte kullanılan birçok antibakteriyel ilaçların yarı sentetik doğal ya da doğal ürünlerin taslaklarından dizayn edilerek kullanılmaktadır. Mikrobiyal fermentlerden elde edilen sıvı ya da ekstratların agar kuyucuk yöntemiyle bakteriyel inhibisyon zonları ölçülerek çeşitli antibiyotikler basitçe keşfedilebilir. Bakteriyel direncin yaygınlığından dolayı yan etkileri az, yeni antibakteriyel ajanların keşfi tıbbi uygulama sahasında önemli hedefler arasında yer almaktadır (Kishore vd., 2009). Ticari ürünlerin üretimi için fungusların kullanımı çok eskiye dayanmakta ve bu üretim son 50 yıldır hızla artmış durumdadır. Fungusların uçucu metabolit, mikotoksin, nonribozomal peptitler, poliketidler, terpenler, diketopiperazinler ve alkaloid gibi sekonder bileşiklerin üretimi için geniş bir biyoçeşitliliğe sahip olduğu bilinmektedir (Mohamed, 2004; Mohamed 2012). *Fusarium* sp. türlerinin salgılamış oldukları sekonder metabolitleri türden türe değişmekte olup türün patojen veya nonpatojen olması üzerinede etkili olmaktadır.

Fleming'in 1929'da *Penicillium notatum* tarafından üretilen güçlü antibiyotik penisilinin keşfinden sonra doğal ürünlerin araştırılmasında yeni bir alan ortaya çıktı. Mantarlar çeşitli biyolojik aktiviteye sahip kimyasal yeni bileşiklerin kaynağı olarak dikkat çekti.

Bitki ve mantarlar, tıbbi bitkiler ve endofitlerin çok çeşitli biyoaktif metabolitleri için büyük ilgi duyulan tıpta kullanılan doğal bileşiklerin ana kaynağıdır. Demain ve Sanchez (2009), şifalı bitkiler ve endofitleri tarafından biyoaktif ikincil metabolitlerin üretilmesinin terapötik uygulamalar için sayısız olanak sağladığını bildirdi. Endofitlerden yeni antimikrobiyal metabolitlerin keşfi, bitki ve insan patojenlerinin artan direnç

düzelelerini aşmak için önemli bir alternatiftir. Antimikrobiyal bileşikler, yiyecek bozulması ve gıda kaynaklı hastalıkların kontrolünde ilaç olarak ve gıda koruyucuları olarak kullanılabilir.

Bacon ve White (2000), endofitlerin canlı, bitki iç dokularını ani, belirgin negatif etkiye neden olmadan kolonileştiren mikroplar olduğunu belirtti. Gezegenimizde 1,5 milyon farklı mantar türünün bulunabileceği tahmin ediliyor. Bunların sadece yaklaşık %10'u keşfedildi ve yaklaşık %1'i sekonder metabolitlerin üretimi açısından incelendi. Endofitik mantarlar, tahminen en az 1 milyon tür ile mantar çeşitliliğinin önemli ve niceliksel bir bileşenini temsil eder. Neredeyse tüm bitki familyalarında bulunurlar ve antibiyotikler, antimikotikler, immünosupresanlar ve antikanser bileşikleri gibi yeni biyolojik aktif sekonder metabolitlerin zengin bir kaynağı olduğu araştırılmıştır. Bu bileşiklerin modern tıpta, tarımda ve sanayide kullanım potansiyeli olabilir. Dolayısıyla endofitik mantarlar, yeni ve tarif edilmeyen türler ile zengin ve güvenilir genetik çeşitlilik kaynağı olarak düşünülmektedir.

1.3. Literatür Özeti

Endofit fungus türlerinin ürettiği podofilotoksin (PDT), ariltetralin lignan olup antikanser, antiviral, antioksidan, antibakteriyel, immün-düzenleyici ve anti-romatizmal özellikleri çok yüksek olup *Alternaria* sp., *Sinopodophyllum*, *Fusarium oxysporum*, *Sabirna recurva* tarafından üretildiği bildirilmiştir (Gao vd., 2007; Kour vd., 2008). Kusari vd., (2009b) tarafından yapılan çalışmada kamptotesin ve iki analogu (9-metoksikamptotesin ve 10-hidrosikamptotesin) antikanser özellikli mikrobiyal ürün olarak rapor edilmiştir. Bu mikrobiyal ürünler ise *Camptotheca acuminata*'den izole edilen endofit fungus *Fusarium solani* tarafından üretildiği belirlenmiştir. Diğer kamptotesin ve analoglarının endofitler tarafından üretimiyle ilgili çalışmalar devam etmekte ve yeni ilaç keşifleri için yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (Puri, 2005; Amna vd., 2006; Rehman vd., 2008; Shweta vd., 2010). Aril tetralin lignanları olan podofilotoksin ve analogları anti-viral ve sitotoksik aktivite gösterdiği, viral enfeksiyonlar ve kanser tedavi çalışmaları için birçok ilacın ilk formu olarak kullanılmıştır. Podofilotoksin birçok endofit fungus (*Trametes hirsute*, *Aspergillus fumigates*, *Phialocephala fortinii* ve *Fusarium oxysporum* gibi) tarafından üretildiği,

yapılan çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Eyberger vd., 2006; Puri vd., 2006; Kour vd., 2008; Kusari vd., 2009a).

F. proliferatum izolatları arasında %57'sinde fumonisin 1000 µg/g miktarlarının üzerinde biyosentezlenirken, diğer *Fusarium* türlerinde (*F. verticillioides*, *F. lactis*, *F. polyphialydicum*, *F. concentricum*, *F. temperatum* ve *F. fujikuroi* gibi) oluşan fumonisin çok az seviyelerdedir. *F. ananatum* ve *F. oxysporum* türlerinin toksin ürettiği belirlenememiştir. Fumonisin analogları dört ana grupta (FA, FB, FC ve FP) sınıflandırılmıştır (Rheeder vd., 1992; Rheeder vd., 2002). Bu sınıflandırmada *Fusarium verticillioides* ve *F. proliferatum* tarafından üretilen, toksikolojik olarak en önemli olan FB analoglarıdır. Yeni birçok fumonisinler (Bartók vd., 2006; Bartók vd., 2010) LC-(ESI-MS) *Fusarium* türlerinde araştırılarak belirlenmeye çalışılmaktadır (Waśkiewicz vd., 2012). Fumonisinler (FBs) yapısal olarak sfinganin benzeridir ve fumonisinle alakalı hastalıkların patojenitesinde ve toksisite mekanizmasının temelindeki süreçte seramid sentezi inhibe ederek sfingozin metabolizmasını bozarlar (Brown vd., 2007). Waśkiewicz vd., (2010) tarafından yapılan çalışmada *Fusarium oxysporum* ve *F. proliferatum* tarafından fumosin (FB1 ve FB2), moniliformin (MON) ve ergosterol (ERG) oluşturulurken, *F. proliferatum* tarafından sadece beauverisin üretildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca mikotoksin biyosentezi üzerinede sıcaklık etkisini de araştırmışlardır.

Birçok biyoaktif sekonder metabolitler, funguslar tarafından üretilmekte olup bunların en önemlileri dış ortama salınan antimikrobiyal metabolitlerdir (Strobel ve Daisy, 2003; Keller vd., 2005). Fungusların metabolit üretimi çevresel faktörlere bağlı olduğu kadar besin faktörleri tarafından da büyük ölçüde etkilendiği bilinmektedir. Bu besinsel faktörler karbon kaynağı ve azot kaynağı içerirken, çevresel faktörler olarak pH, sıcaklık, inkubasyon süresi gibi faktörleri içermektedir (Thakur vd., 2009). Çevresel ve besinsel faktörler koşulların gerekliliği, ait oldukları türe bağlı olarak fungustan fungusa değişmektedir (Stanbury vd., 1995; Tejesvi vd., 2007). Sekonder metabolitlerin en yüksek verimde ve en ucuz elde edilmesi için etki eden faktörler optimize edilmelidir.

Fungal toksinler hayvan ve bitkisel sistemler üzerine toksin olarak bilinmesine rağmen, hala terapötik uygulamalarda kullanımına devam edilmektedir. İn vivo şartlarda

ve farklı tip kanser hücreleri üzerine mikofenolik asit, penisillik asit, 5-metoksi-sterigmatosistin (Essery vd., 1976), bir dizi analog olan anguidine (Claridge vd., 1979, Kaneko vd., 1982), triasetoksisirpenol içeren, üç diasetoksisirpenoller, üç monoasetoksisirpenol ve scirrrpenol, T-2 toksin ve alakalı trikosetenler (Ramu vd., 1989), sitokalazin B (Bousquet vd., 1990), patulin (Seigle-Murandi vd., 1992), aflastatin A (Ono vd., 1997), 14'-Hidromitoksin B ve 16-Hidroksioridin E (Alvi vd., 2002), tenuazonik asit (Antony vd., 2002), 4- beta- asetoksisirpendiol (Han vd., 2004), gliotoksin (Vigushin vd., 2004), florinli pseurotin A, synerazol (Igarashi vd., 2004), rubratoksin B, beauverisin vb. Metabolitler anti-tümör aktivitesi göstermektedir.

Brezilya'daki Orchidaceae familyasının tropikal ekosistemiyle bağlantılı olan endofit fungusların biyoaktif molekülleri, potansiyel bakımından tarama yapılmıştır. Brezilya tropikal ekosisteminden 54 Orchidaceae türünün yaprak, gövde ve köklerinden izole edilmiş endofitik fungusların antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Toplam 382 filamentöz fungi ve 13 maya izole edilerek saf ekstratları üretilmiş ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. İzolatlardan %33'ü hedef mikroorganizmalardan en azından birine karşı antimikrobiyal özellik gösterdiği bildirilmiştir. Yaprak döken orman bölgelerindeki orkidelerin yapraklarından izole edilen endofit fungusların *Escherichia coli* karşı daha aktif antimikrobiyal etki gösterirken, kayalık alanlardan toplanan orkidelerin köklerinden izole edilen endofit fungus ekstratlarının *Candida krusei* ve *Candida albicans* karşı daha etkili olduğu çoklu değişken istatistikler sonucunda gösterilmiştir. Belirtilen çalışmadaki 22 izolatin MİK değerleri araştırılmış, bakteriler için 62,5-250 µg/mL, funguslar için 8-250 µg/mL aralığında olduğu bildirilmiştir (Vaz vd., 1999).

Patojenik mikroorganizmalarda ilaç direncinin artması ve bu kimyasal ilaçların yan etkilerinin varlığı, doğal kaynaklı yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. Bitkiler, bakteriler ve funguslar, en yaygın terapötik kaynaklar olarak bilinmekte ve bu organizmalar üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Ancak bu maddelerin üretimi pH, sıcaklık, besiyeri içeriği gibi parametreler tarafından büyük oranda etkilenmekte olup ekonomik değeri olabilecek maddelerin, maksimum verimde üretimleri için optimum şartları araştırılmaktadır (Shukla vd., 2014). Fitopatojenik funguslar özellikle bilinmeyen zengin bir biyoaktif sekonder metabolit kaynaklarıdır.

Bitki orjinli funguslar tarafından üretilen biyoaktif bileşiklerin üretimi için çeşitli fizyolojik faktörlerin optimizasyonu yapılmakta ve birçok araştırmacı tarafından önemli çalışmalar bildirilmektedir (Merlin vd., 2013; Shukla vd., 2014).

Fathima vd., (2014)'de yaptıkları çalışmada Hindistan'daki Agumbe Ormanından elde edilen NFX 06 olarak adlandırılan *Fusarium oxysporum* suşunun antimikrobiyal aktivitesinin değişik besi yerlerinden nasıl etkilendiğini test etmişlerdir. Normal gece-gündüz şartlarında 14 gün boyunca $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve 120 rpm çalkalamada çeşitli besi yerlerinde inkübe edildi. Besi yerlerinden M4 besi yeri (4% dekstroza, 1% pepton, 0,06 % ZnSO_4 , 0,035 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0,04% KH_2PO_4) en iyi antimikrobiyal aktivitenin gözlemlendiği besi yeri olduğu bildirilmiştir.

Zhang vd., (2016) yaptıkları çalışmada ise Hanımeli bitkisinin yapraklarından elde edilen endofit *Fusarium sp* türünün antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve 1% Streptomisin sülfat ile karşılaştırılmıştır. Gram pozitif bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* ve α -hemolitik streptococcus) de, gram negatif bakterilere (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus proteus*, *Salmonellae enteriti*, *Eberthella typhi*, *Shigella dysenteriae* ve *Helicobacter pylori*) de test edilmiş güçlü (13 – 35 mm zon çap) antimikrobiyal aktivite belirlenmiş, en güçlü aktivite gram negatiflere karşı var olduğu gözlenmiştir.

Swathi vd., (2013) yaptıkları çalışmada; denizden izole edilen bir *Fusarium* türü üzerinde çalışmışlardır. H. L. Barnett ve Barry B. Hunter'ın "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" adlı referans kitabı kullanılarak, miselyum ve spor morfolojisi incelenmiş ve *Fusarium* olarak tanımlanmıştır. *Fusarium* olarak tanımlanan suşun ham ekstraktının, antibakteriyel (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*) ve antifungal (*Candida rugosa*, *Fusarium oxysporium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oryzae* ve *Aspergillus flavus*) aktivitelerine bakıldığında dikkate değer bir aktivite gözlenmiştir. En iyi aktivite *E. coli*'ye karşı 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda gözlenmiştir. Aktivitenin *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Rhizopus oryzae* hariç genel olarak konsantrasyona bağlı olarak artmadığı gözlenmiştir.

Tayung vd., (2011)'de yaptığı araştırmada *Taxus baccata*'dan (Porsuk ağacı) izole edilen endofit tür *Fusarium solani*'nin bir dizi mikroorganizmaya (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis*) karşı dikkate değer derecede antimikrobiyal aktivitesi gözleendiği bildirilmiştir. Genel olarak geniş spektrumlu aktivite gösterdiği hem bakterilere hem de maya mantarlarına karşı 1 mg/ml konsantrasyonun benzer düzeyde etkinlik gösterdiği (10-27 mm zon çapı) bildirilmiştir. En iyi aktivite *Klebsiella pneumonia* en düşük aktivite ise *Candida tropicalis*'e karşı gözlenmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar Tablo 4’de ve kimyasal sarf maddeler Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz adı	Model	Firma
UV-Vis Spektrometre	M5	SPECTRAMAX
Soğutmalı Santrifüj	2-16PK	SİGMA
pH metre	HI3220	HANNA
Çalkalayıcı	3005	GFL
Thermoblok	MS-100	NOSHENG
İnkübatör	Model 600	MEMMERT
Jel Görüntüleme Sistemi	Digi-Doc It	UVP
Mini Santrifüj	Sartorius	SİGMA
Bidistile Su Cihazı	2108	GFL
Güvenlik kabini	MN-20	NÜVE
Işık mikroskobu	E100	NİKON
Otoklav	OT-40L	NÜVE
Hassas Terazı	PL-214	DENVER
Vorteks	REAX TOP	HEİDOLPH

Çalışmada kullanılan Nucleospin Plant kit (50 preps) (Clontech), DNA polimeraz enzimi, sıvı azot ve dNTP kimyasal sarf malzemeleri ticari olarak Sigma’dan temin edilmiştir. Cam ve plastik malzemeler Merck ve Sigma'dan temin edilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal sarf maddeler.

Kimyasal Adı	Firma	Katalog No
Agar	FLUKA	05039
PDA	MERCK	1.10130
Maya Ekstresi	MERCK	1.03753
Müller Hilton Agar	MERCK	1.05437
Müller Hilton Broth	MERCK	1.10293
Pepton	FLUKA	68971
Corn Meal	SIGMA	C6304
Malt Eksrat Agar	MERCK	1.05398
Mg ₂ SO ₄	SIGMA	M7506
Na ₂ SO ₄	MERCK	8.22286
NaCl	MERCK	1.06404
Sodyum asetat	KİMETSAN	KİM-SAT/01CP
Asetik asit	SIGMA	27225
NaOH	MERCK	1.06494
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	MERCK	1.12040
K ₂ HPO ₄	MERCK	1.05101
Glukoz	MERCK	1.08342
DRBC	MERCK	1.00466
HCl	FLUKA	84434
Gliserol	MERCK	1.04092
Etanol	Merko Kimya	-----
Etil asetat	SIGMA	27227

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.2.1. Patates Dekstroz Agar (PDA)

Ticari firmanın önerisi doğrultusunda litrede 39 gram tartılarak otoklavda 121 °C’de 20 dakika steril edildikten sonra steril petrilere tevzi edildi. Kullanılan süreye kadar +4 °C’de bekletildi. Genel üretim besi yeri olarak kullanıldı.

Patates infüzyonu	4 g
Glukoz	20 g
Agar	15 g
Ultra Saf-H ₂ O	1000 mL, pH: 5,6± 0,2

2.1.2.2. Dikloran Rose Bengal Kloramfenikol (DRBC) Agar

Mikolojik Pepton	5,0 g
Dekstroz	10,0 g
Mono Potasyum Fosfat	1,0 g
Magnezyum Sülfat	0,5 g
Kloramfenikol	0,10 g
Rose Bengal	0,05
Agar	15,5 g
Ultra Saf-H ₂ O	1000 ml

Ticari olarak temin edildi. *Fusarium* YP9B'nin tek koloni izolasyonu için kullanıldı. Ticari firmanın önerisi doğrultusunda 32,15 g olacak şekilde tartıldı ve 1000 ml distile suda çözüldü. Otoklavda steril edildikten sonra steril petrilere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4 °C de bekletildi.

2.1.2.3. Malt Yeast Ekstrakt Sıvı Besiyeri (MEB)

Malt Ekstrat	6,0 g
Maltoz	1,8 g
Glukoz	6,0 g
Maya Ekstrat	1,2 g
Ultra Saf-H ₂ O	1000 mL, pH: 4,7 ± 0,2

Besiyeri, ticari olarak temin edilen maddelerden yukarıda verilen oranlarda karıştırılarak hazırlandı. Genel fungus üretim besiyeri ve DNA izolasyonu için kullanıldı. Bu besi yeri 121 °C'de 1,1 atmosfer basıncında 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.

2.1.2.4. Yeast Pepton Dekstroz Sıvı Besiyeri (YPDB)

Ticari firmanın önerisi doğrultusunda litrede 50 gram tartılarak otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Fungal toprak inokülüm preparatı hazırlamada kullanıldı.

Maya ekstraktı	10 g
Glukoz	20 g
Peptone	20 g
Ultra Saf-H ₂ O	1000 mL, pH: 6,0- 7,0

2.1.2.5. Su Agar Besiyeri

1 litre distile suya 15 gram agar (Merck) ilave edildi ve otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra 90 mm çaplı steril petrilere 20 ml olacak şekilde dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında muhafaza edildi. *Fusarium* YP9B suşunun hifa ve misel yapılarının belirlenmesi ve ön patojenite testinde domates tohumlarının çimlendirilmesi amacıyla bu besiyeri kullanıldı.

2.1.2.6. De Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar

Dehidre besiyeri 68,2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 oC'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 45-50 °C'a soğutulup, steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür (URL-2).

Kazein'den Pepton	10 g
Meat ekstrakt	10 g
Mya ekstraktı	4 g
D(+) Glikoz	20 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Tween 80	1 g
di-Amonyum hidrojen sitrat	2 g
Sodyum asetat	5 g
MgSO ₄	0,2 g
MnSO ₄	0,04 g
Agar	14 g
Ultra Saf-H ₂ O	1000 mL, pH: 5,6± 0,2

2.1.2.7. Karbon ve Azot Gereksiniminin Belirlenmesinde Kullanılan Besiyerleri

Ekstraselüler metabolitin karbon ve azot kaynaklarına gereksinimlerinin belirlenmesinde bir dizi besiyeri kombinasyonu kullanıldı (Tablo 6). Bu amaçla tek karbon (Yeast karbon base) ve tek azot (Yeast Nitrojen base) kaynağı içeren temel besiyerlerine hedeflenen karbon ve azot kaynakları uygun oranlarda karıştırılarak sıvı besiyerleri hazırlandı. Tüm besiyerleri cam erlende (250 ml) çözüldü, HCl ve NaOH yardımıyla pH 5,8'e ayarlanarak otoklavda steril edildi (Shukla vd., 2014a). Kullanılacağı süreye kadar buzdolabında bekletildi (Shukla vd., 2014a).

Tablo 6. YP9B kültürü ve ekstraselüler sekonder metabolit üretiminde karbon ve azot kaynaklarının etkinliğinin belirlenmesi için kullanılan besiyerleri.

Besiyeri Kodu	Besi Yeri İçeriği	gr/100 ml
C1	Yeast Nitrojen Base, Maltoz	6,7 2
C2	Yeast Nitrojen Base, Glukoz	6,7 1,5
C3	Yeast Nitrojen Base, Sükroz	6,7 1,5
C4	Yeast Nitrojen Base, Nişasta	6,7 1,5
C5	Yeast Nitrojen Base	6,7
P1	Yeast Carbon Base, KNO ₃ (potasyum nitrat)	11,7 0,78
P2	Yeast Carbon Base, NaNO ₃ (Sodyum Nitrat)	11,7 0,78
P3	Yeast Carbon Base, Pepton	11,7 0,78
P4	Yeast Carbon Base, Yeast Ekstrakt	11,7 0,78
Astana-Howker	Glukoz MgSO ₄ , 7H ₂ O KNO ₃	0,5 0,5 0,35
Richard	KH ₂ PO ₄ Sukroz MgSO ₄ , 7H ₂ O KNO ₃	0,1 3,5 0,25 1
Malt Yeast Ekstrakt	KH ₂ PO ₄ FeCl ₃ Malt Ekstrakt Maltoz Glukoz Yeast Ekstrakt	0,25 0,04 0,6 0,18 0,6 0,12

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel ve Fungal Suşlar

Test edilen bakteri ve funguslar Refik Saydam Hifzissihha Enstitüsü (Ankara)'den temin edilmiştir. Kullanılan suşlar: *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC35218, *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y. pseudotuberculosis*) ATCC911, *Klebsiella pneumonia* ATCC13883 (*K. pneumonia*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC43288, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC25923, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC29212, *Bacillus cereus* (*B. cereus*) 709 Roma, *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *L. casei*, *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) ATCC607, *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC60193 ve *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) RSKK 251. *Trichoderma atroviride* YP2A, *T. hamatum* YP18c, *T. harzianum* YP17a, *Fusarium solani* YP1C, *F. oxysporum* YP18B ve *F. oxysporum* YP19 suşları Kasap (2018) tez çalışmasından, *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) Ankara Üniversitesinden (Karakaya, A.), *Rhizoctonia solani* AG4 (*R. solani*) Karadeniz Teknik Üniversitesinden (Demirci, E.) ve *Sclerotinia sclerotiorum* (*S. sclerotiorum*) ise Gazi Osmanpaşa Üniversitesinden (Yaşar, Y.) temin edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. *Fusarium* sp. YP9B İzolatının Canlandırılması

Çalışmada 2014 yılında Pazar-Rize bahçe toprağından izole edilip mikroskopik ve makroskopik metodlara göre tanımlanarak -20 °C'de %20 gliserol ile saklanan *Fusarium* sp. YP9B izolatı kullanıldı (Kasap, 2018). Derin dondurucudan (-20 °C'de) çıkarılan YP9B izolatı Patates dekstroza agar (PDA) besiyerine 100 µL ekim yapılarak 28 °C'de bir hafta inkübe edilerek canlandırıldı. Tekrar deneyleri için aynı koşullarda (-20 ve -80 °C) saklamaları yapıldı. Çalışmalarda suşun canlandırılmasında, spor üretiminde ve ekstrasellüler metabolit üretiminde PDA kullanıldı.

PDA besiyerinde 28 °C'de 7-15 gün kültür edildi. Petrinin alt ve üst tarafının koloni rengi misel gelişim şekli, radyal büyüme, spor oluşumu, makrokonidia, mikrokonidia ve kalmidiasporların büyüklüğü gözlemlendi. Buna göre yukarıdaki morfolojik özelliklere dayanılarak morfolojik olarak tanımlanması yapıldı (Burgess vd., 1994).

2.2.2. Tek Koloni Kültürü, DNA İzolasyonu ve PCR Analizi

Fusarium sp. YP9B izolatının saf kültüründen deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonu için, PDA besiyerindeki taze (3-4 günlük) kültürden öze ile spor alındı ve tekrar DRBC besiyerine tek koloni düşürme tekniğiyle ekim yapıldı. Ekimler 3 gün 28 °C'de inkübe edildikten sonra oluşan tek bir spor kolonisi alınıp yeni PDA besiyerinde saf kültür olarak çoğaltıldı. Alınan tek koloni izolatlarının kültürlerinde renk değişimi dikkate alındı ve en koyu mor-kırmızı renkli koloni klonları çalışma amacıyla seçildi. Klonların aynı suş olduğunun teyid etmek amacıyla hem makroskobik hem de mikroskobik olarak incelendi. Moleküler olarak da test edildi.

DNA izolasyonu yapmak için seçilen klonun (YP9B-6), taze PDA kültüründe elde edilen sporlarıyla ME sıvı besiyerinde süspansiyonu hazırlandı. Elde edilen spor süspansiyondan 10^6 cfu/ml spor solüsyonunu hazırlandı ve 250 ml ME sıvı besiyerine yaklaşık 2,5 ml ekim yapıldıktan sonra 28 °C' de 7-10 gün inkübe edildi. Sıvı kültür inkübasyondan sonra miselyum hasatı için önceden steril edilmiş iki katlı tülbentten geçirilerek süzüldü, fazlalık besiyeri kısmı sıkılarak ve kâğıt havluyla kurularak tamamen arındırıldı. Misel kısmı temiz bir havana alındı ve sıvı azot uygulayarak ezme işlemi ile miseller mekanik olarak parçalandı. Misel hasatı -20 °C'de ependorf içerisinde kullanılmak üzere stoklandı.

Modifiye CTAB metodu (Moller vd., 1992) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı (Reader ve Broda, 1985; Freeman vd., 2000; Hermosa vd., 2000). Bu metod gereği her örnek üzerine 500 µl CTAB, 0,02 gr PUPP ve 2,5 µl β-mercaptoethanol eklendi. Örnekler 4 saat 65 °C'ye ayarlanmış çalkalamalı thermoshaker'da bekletildi. Ardından 1 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 1 dakika 10000 – 14000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, örneklere 500 µl kloroform eklendi ve tüp içindeki örnekler homojen olana kadar alt-üst edildi. Örnekler 5 dakika 10000 – 14000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. Ardından örnekler 30 dk buzda bekletildi. Sonrasında tüp içindeki hacmin %8'i kadar amonyum asetat (7,5 M) ilave edildi. Oluşan hacmin %54'ü kadar isopropanol ilave edildi. İyice karıştırılan süspansiyon +4 °C'de 1 gece bekletildikten sonra 10000 – 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant döküldü ve şeffaf pellet üzerine 1 ml -20 °C'de bekletilen hacimce %70'lik

alkol ilave edildi. Alt-üst edilerek pelletin hareket etmesi sağlandı. 10000 – 14000 rpm’de tekrar santrüfjü edildikten sonra sıvı etanol kısım pipetler yardımıyla uzaklaştırıldı. Örnekler vakumda 30 – 45 dk kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler üzerine 50 µl 1x TE Buffer ilave edildip 65 °C’de 15 dk su banyosunda bekletildi. Elde edilen örnekler +4 °C’de saklandı.

Fusarium sp. YP9B klonlarının filogenetik analizi ve moleküler karakterizasyon için nükleer rDNA’nın ITS1-5.8S-ITS2 intragenik gen bölgelerine ait (White vd., 1990; Kinderman vd., 1998; Maymon, 2004; Siddiquee, 2009) spesifik primerler kullanıldı. PCR karışımı tablo 7’deki gibi taze hazırlandı ve steril ependorf tüplerine 49 µl olacak şekilde dağıtıldı. *Fusarium sp.* YP9B suşlarından izole edilen DNA’dan 1 µl miktarında ilave edildikten sonra ITS5 (F): 5’-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3’ ve ITS4 (R): 5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3’ şeklinde oligopirimerler kullanılarak PCR (Tablo 8) çoğaltıldı. Sonra %1’lik agaroz jelde, moleküler ağırlık standardı kullanılarak 60 volta yürütüldü ve UV transiluminatörde jel görüntüleme sisteminde fotoğraflandı.

Tablo 7. ITS4- 5.8 – ITS5 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR karışımı.

PCR karışımı	1X (µl)	10x (µl)
10X PCR buffer	5	50
25 mM MgCl ₂	3	30
2,5 mM dNTP mix	5	50
P4 10 pmol/ µl	1,5	15
P5 10 pmol/ µl	1,5	15
DNA polimeraz	0,4	4
DNA	1	10
Ultra Saf-H ₂ O	23,6	236
Toplam	50	500

Tablo 8. ITS1- 5.8S- ITS2 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan PCR şartları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyon	95	2	1
Bozunma (Denaturation)	95	1	
Bağlanma (Annealing)	42-55	1	35
Uzama (Extention)	72	1	
Son uzama	72	5	1
Tamamlanma	4	Net ürün	1

2.2.3. Sekans Analizi

Fusarium sp. YP9B izolatu klonlarından elde edilen bütün DNA dizileri BioEdit programı ile düzenlendi, NCBI GenBank'a girilerek nükleotidler (A, G, C, T ve boşluklar) taranarak ve GenBank'ta yer alan diğer DNA dizileri ile benzerlikleri karşılaştırıldı. Buradan elde edilen verilerle izolatların morfolojik tanımlamaları doğrulandı (Hermosa vd., 2004).

2.2.4. Antimikrobiyal Madde Üretimi ve Ekstraksiyonu

Fusarium sp. YP9B izolatu klonlarının uçucu olmayan ekstrasellüler antimikrobiyal madde üretip üretmediklerinin test edilmesi amacıyla, taze kültürden PDA besiyerine disk ekim yöntemi ile pasaj yapıldı ve 26 °C'de 7-10 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında katı besiyeri steril erlenlere bloklar şeklinde parçalanarak alındı. Her bir erlene ekstre edilen kütlenin iki katı (1:2 oranında) kadar çözücü ilave edildi. Erlenler 26°C'de 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 24 ve 48 saat çalkalamaya bırakılarak ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Ekstraksiyon yapılması için hekzan, su, etil asetat ve metanol çözücüler kullanıldı. Daha sonra ekstraksiyon sıvısı, steril filtre kağıdıyla süzüldü ve süzüntü kullanılacağı süreye kadar -20 °C'de bekletildi (Musavi vd., 2014).

2.2.5. Kf Mantarlarına Karşı Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Antagonist alışmalar “İkili ekim tekniği” ile biyokontrol ajan olan *Trichoderma* spp. test edilmiş, aktivite belirlenmiştir. Bu etkinliğin diğer insan patojeni (*Aspergillus paraziticus*) bitki patojeni funguslara (*Rhizoctonia* sp. *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotium sclerotinia*) karşı var olup olmadığı da test edilmiştir. Bu suşlar niversitemiz Biyoloji bölümünde daha önceki yıllarda izole edilen suşlar olup -80 °C stoklarından yeniden canlandırıldı.

Fungusların 7-10 günlük kültürlerinden alınan diskler (5 mm çapında), steril koşullarda hazırlanmış PDA besiyerlerine 4 cm uzaklıklarda iki köşeye karşılıklı olarak yerleştirildi. Bunun için karşılıklı 2 tane kuyucuk açılarak, kuyucuklardan birine 4-5 günlük *Fusarium* sp. YP9B yerleştirildi. Diğer kuyucuğa her bir petride diğer funguslar yerleştirildi. Kültürlerin tümü 28 °C'de inkübasyona bırakılarak 4., 7. ve 10. günlerinde, antagonist ve patojenlerin büyüme zon çapları ölçüldü. Kaynaktaki formüle göre inhibisyon yüzdesi hesaplandı (Royse ve Ries, 1978).

2.2.6. Uçucu Metabolit üretiminin ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi

YP9B suşunun uçucu antimikrobiyal madde üretilip üretilmediğinin test edilmesi amacıyla iki petri kültürü (bakteri ve kf) birleştirilerek ikili (dual) kültür yapıldı. Dual kültür için PDA besiyerinde 2-3 gün 28°C’de üretilen kültürlerden steril şartlarda 5 mm çaplı bloklar kesildi. PDA besiyerinin ortasında da aynı büyüklükte blok kesilip çıkarıldı ve yerine kültürden kesilen disk yerleştirildi. 3 gün 28°C’de inkübasyona bırakılarak *Fusarium*’un 25- 30 mm zon çapına ulaşana kadar büyümesine müsaade edildi.

Test edilecek bakterilerden *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis* ve *E. coli* suşlarının bir gecelik taze kültürden, dörde bölünmüş MHA plağına yoğun çizgi ekimi yapıldı. Petri kabının alt kısmına  günlük kültür yapılan YP9B suşu, üst kapak olacak kısmına bakteri ekimi yapılmış MHA plağı yerleştirilip etrafı parafilm ile kapatıldı. Petriler YP9B suşu alta gelecek şekilde 2-3 gün 30 °C’de inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak sadece bakterilerin ekimi yapıldığı petri kullanıldı. Petriler 3 gün inkubasyon sonrasında kapakları açılarak; bakterilerin gelişme hızları, üreme yoğunlukları, pigment üretimleri

açısından kontrole göre farklılıklar gözlemlendi (Siddiquee, 2009). Testler 3 tekerrürlü olarak yapıldı.

2.2.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Agar Kuyucuk Yöntemi ile Belirlenmesi

Antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesinde Refik Saydam Kültür koleksiyonundan temin edilen *E. coli*, *K. pneumonia*, *Y. pseudotuberculosis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis* ve *M. smegmatis* vb. suşlar kullanıldı. Antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde *C. albicans*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* mayaları kullanıldı. Çalışmada bakterilerin test edilmesinde Mueller Hinton agar-sıvı (MHB, MHA), *M. smegmatis* için Beyin kalp infüzyon agar-sıvı (BHIB, BHIA) besiyerleri, funguslar için ise Patates dekstroz agar ve Malt ekstrat sıvı (PDA, MEB) besiyerleri, *Lactobacillus acidophilus* ve *L. casei* için MRI agar ve sıvı besiyerleri kullanıldı. Ekstraktlar agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinlik yönünden mikroorganizmalara karşı test edildi (Perez vd., 1992; Vizcaíno vd., 2005; CLSI M24-A, 2003; Renda, vd., 2017). Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden MHB içinde yaklaşık olarak McFarland 0,5 bulanıklıkta (yaklaşık 10^{6-7} kob/ml bakteri) (kob: koloni oluşturan birim) dilüsyonları hazırlandı ve önceden hazırlanmış MHA plakları üzerine steril eküvyon çubuğu ile yaygın ekimleri yapıldı.

Maya ve küf mantarları için MEB sıvı besiyeri kullanılarak McFarland 2,0 dilüsyonları yapılarak önceden hazırlanmış PDA besiyerleri yüzeyine steril eküvyonla yayma ekim yapıldı. Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa kontrolleriyle birlikte metabolitlerin ekstraksiyonlarından 50-70 µL filtrat damlatıldı. Bakteri ihtiva eden petriyeler 24 saat, maya ve *M. smegmatis* ihtiva eden petriyeler 48 saat 35 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zon çapları ölçülerek etkinlikleri belirlendi. Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), Streptomisin (10 µg) ve mantarlar için flukonazol (5 µg) kullanıldı. Standart çözücüler de kontrol olarak kullanıldı.

2.2.8. Karbon ve Azot Gereksiniminin Belirlenmesi

YP9B'nin daha yüksek kontrasyonlarında antimikrobiyal madde üretmesi için besi yeri optimizasyonu çalışmaları yapıldı. Bu amaçla azot kaynağı sabit tutularak farklı karbon kaynakları (maltoz, glukoz, sukroz ve çözümlü nişasta) kullanıldı. Aynı şekilde karbon kaynağı sabit tutularak farklı azot kaynakları (Pepton, sodium nitrat, potasyum nitrat, maya ekstresi) test edildi (Shukla vd., 2014b).

Kültürü yapılacak YP9B izolatı PDA besi yerinde 28 °C'de yedi günlük kültürleri hazırlandı. Kültürlerden sporlar steril şartlarda steril su ile yıkanarak falkon tüpe alındı. Spor sulandırılması steril distile su kullanılarak hazırlandı, spor sayısı Neubauer lamı ve ışık mikroskobu (40X) kullanılarak sayıldı, spor sayısı yaklaşık 6×10^7 olarak ayarlandı.

Taze hazırlanmış besi yerlerine (C1, C2, C3, C4, C5, P1, P2, P3, P4, Astana ve Richard medium) 1 ml (1/100 oranında) ekimleri yapıldı (Tablo 5). Spor sayısının son konsantrasyonu yaklaşık 3×10^7 olacak şekilde ekimleri yapıldı. Kontrol ekimi MEB besi yerine yapıldı. Ekimden sonra örnekler 28 °C'de 120 rpm'de karanlık ortamda 7-10 gün inkübasyona bırakıldı.

2.2.9. Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Farklı İnkübasyon Süresi, Sıcaklık, Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi

Optimum besiyeri belirlendikten sonra bu besi ortamında inkübasyon şartlarının antimikrobiyal etki üzerine olan etkinliği araştırıldı. Bunun için farklı inkübasyon sürelerinde (7, 10 ve 15. gün) ve farklı sıcaklıklarda (20, 26 ve 30 °C'de), antimikrobiyal aktivite varlığı araştırıldı. İnkübasyon süreleri ve sıcaklıkları farklı olan katı besiyerlerinde hazırlanan ekstraksiyonlar tekrar antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırılarak en iyi inkübasyon sıcaklığı ve süresi belirlendi. Antimikrobiyal aktivite düzeyi en iyi olan kültür şartları belirlendikten sonra büyük ölçekte kültürleri hazırlandı (Harley, 1934; Li vd., 2008; Merlin vd., 2013). Kültür filtratının sıcaklığa maruz kaldığındaki aktivitenin kararlılığını belirlemek amacıyla steril tüplere 5 ml ekstraksiyon sıvısı konularak farklı sıcaklıklarda (50, 60, 70, 80 ve 90°C'de) ve farklı sürelerde (10, 30 ve 60 dk) bekleterek ısıya maruz bırakıldıktan sonra antimikrobiyal aktivite bakıldı.

Aktivitenin kaybolduğu sıcaklık derecesi ya da ısıya maruz kalma süresinin etkinliği beklendikten sonra aktivitelerinin tekrar mikroorganizmalara karşı agar kuyucuk yöntemi ile test edilerek belirlendi.

2.2.10. Biyoaktif Bileşiklerin En Uygun Ekstraksiyon ve Çözücü Maddelerinin Belirlenmesi

Ekstraselüler biyoaktif bileşikler eldesi için farklı yöntemler test edildi. Sıvı kültürleri yoğunlaştırmak için evaporatör ile 45°C’de konsantre edildi. Katı kültürde üretilen *Fusarium oxysporum* YP9B kültürü, en uygun ekstraksiyon için farklı bir dizi polar ve apolar organik çözücüler (Kloroform, Etil asetat, etanol, metanol ve su) ile 1:1 oranda karıştırılarak oda ısısında 200 rpm’de 24 – 48 saat çalkalamaya tabii tutularak ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ham ekstrakt 55 °C’de uçurulduktan sonra aynı çözücüler kullanılarak 1 ml’de çözüldü ve test edilerek en uygun ekstraksiyon çözücüsü belirlendi.

En uygun ekstraksiyon çözücüsü (Etil Asetat) belirlendikten sonra biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu sonrası farklı polar ve apolar organik çözücüler kullanılarak (Hekzan, Dietileter, Kloroform, Etil asetat, Tetrahidrofuran (THF), n-butanol, etanol, metanol, Dimetilformamid (DMF) ve su) tekrar antimikrobiyal aktiviteleri test edildi. Antimikrobiyal aktivite üzerine çözücü etkisinin varlığı test edildi. En uygun ekstraksiyon ve çözücü belirlendi (Kwon vd., 2007).

2.2.11. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisit Konsantrasyon (MBK) Belirlenmesi

Fusarium sp. YP9B’in metabolit ekstraktı evaporasyonla yoğunlaştırılıp uygun olan çözücüde ($\mu\text{g} / \text{ml}$) çözüldü. Yoğunlaştırılan bu ekstraktlar öncelikle agar kuyucuk yöntemi mikroorganizmalar üzerine (Gram pozitif, negatif ve değişken bakteriler ile mayalara karşı) test edildi. Aktivite belirlenen ekstraktlarda aktivitenin kantitatif değerinin belirlenmesi için MİK ve MBK testi kullanıldı. Testler için Mueller hinton (MHB), Beyin kalp infuzyon (BHI) ve Malt ekstrakt (MEB) sıvı besiyerleri kullanılarak dilüsyon yöntemiyle (96 kuyucuklu mikrolatelerde) MİK ve MBK değerleri belirlendi.

Bakteriyel süspansiyon McFarland=0,5, mayalarda McFarland=1,0 olarak ayarlandı (Bauer vd., 1966, Wiegand vd., 2008; EUCAST, 2014; Tatar vd., 2016).

Ekstraktların MİK değeri kuyucuklarda yapılan dilüsyonlarda üremenin olmadığı ilk kuyucuklardaki ekstrakt yoğunluğu ($\mu\text{g/ml}$) alındı. MBK değeri ise üremenin olmadığı dilüsyonların 100 μl 'si alınarak uygun besi yerlerine ekimleri yapıldı. Üremenin olmadığı dilüsyonun değeri MBK olarak belirlendi.

2.2.12. Antioksidan Aktivite

Elde edilen etil asetat antioksidan kapasitelerini değerlendirmek amacıyla; bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve demir indirgeme antioksidant güç yöntemleri kullanıldı. Radikal temizleme aktiviteleri ABTS⁺ (2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal temizleme metodu kullanılarak incelendi (Apak vd., 2004; Benzie ve Strain, 1999; Re vd., 1999).

2.2.13. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini (CUPRAC)

Metod, bakır (II)-neokuproin kompleksinin ortama antioksidan çözeltisi ilave edilmesi sonucunda bakır(I)-neokuproine indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Benzie ve Strain, 1999; Re vd., 1999; Apak vd., 2004, Mentеше vd., 2015). Deney tüpü içerisine, 10 mM Cu (II) klorür (Sigma Chemical Co, USA), 7,5 mM neokuproin (Sigma Chemical Co, USA), ve 1 M pH' sı 7,0 olan amonyum asetat tamponu çözeltilerinin herbirinden 1'er mL pipetlendi. Her bir maddenin çözeltisinden kendi deney tüpüne uygun miktarda (x μL) ilave edilerek vortekslendi. Son hacmi 4,1 mL' ye tamamlamak için yeteri miktarda (1100 μL -x μL) saf su ilave edilerek tekrar vortekslendi. Aynı işlemler Trolox[®] standardı içinde gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 50 dakika inkübasyona bırakılan deney tüplerinin absorbansı 450 nm'de (1601UV-Shimadzu, Australia) ölçülerek, standart Trolox[®] eğrisinden her bir madde için mg madde başına düşen mM Trolox[®] eşdeğeri antioksidan kapasite (mM TEAC/mg madde) hesaplandı.

2.2.14. Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Güç Tayini (FRAP)

Yöntemin esası spektrofotometrede 593 nm'de Fe^{2+} – TPTZ kompleksinin oluşturduğu absorbanın ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Benzie ve Strain 1999, Can ve Baltas, 2016). Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan güç tayini yöntemi total antioksidan kapasitenin belirlenmesinde sıkça kullanılan bir metottür. Öncelikle, 300 mM ve pH'sı 3,6 olan asetat tamponu, 40 mM HCl içerisinde çözünmüş 10 mM TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine ve 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ çözeltileri hazırlandı. Taze olarak hazırlanan bu çözeltiler 10:1:1 oranında karıştırılarak FRAP reaktifi elde edildi. Deney tüplerine antioksidan aktivitesi belirlenecek örneklerden 100' er μ L aktararak her bir örnek tüpüne 3000 μ L FRAP reaktifi ilave edildi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilen eaksiyon karışımlarının 593 nm'de absorbanları okundu. Aynı işlemler bir seri değişen konsantrasyonlar da hazırlanan $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ standardı içinde gerçekleştirildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılan deney tüplerinin absorbanı 593 nm'de (1601UV-Shimadzu, Australia) ölçülerek, standart $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ eğrisinden her bir madde için mg madde başına düşen mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ eşdeğeri antioksidan kapasite (mM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ / mg madde) hesaplandı.

2.2.15. ABTS^{•+} Katyonik Radikal Temizleme Yöntemi

Sentezlenen bileşiklerin ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)] radikal temizleme aktivitesi literatürde varolan metoda göre çalışıldı (Re vd., 1999; Yılmaz vd., 2017). ABTS nin su içerisinde 7 mM' lık çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltinin 10 mL' si 2,45 mM 5 mL potasyum persülfat çözeltisi ile karıştırıldı ve ABTS^{•+} katyonik radikalın oluşumu için 18 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Oluşan radikal çözeltisi 734 nm'de $0,700 \pm 0,020$ absorban verecek şekilde, pH'sı 7,4 fosfat tamponu ile seyreltildi. 200 μ L madde çözeltisi (DMSO içerisinde çözünmüş) 1800 μ L radikal çözeltisine eklendi, vortekslendi ve 5 dakika sonra UV-Visible spektrofotometrede (1601UV-Shimadzu, Australia) 734 nm dalga boyunda absorbanları okundu. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve Askorbik asit standart olarak kullanıldı. Çalışma her bir madde ve standart için üç tekrarlı yapıldı. Bileşiklerin ve standartların radikal temizleme (scavenge) değeri aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\% \text{ Radikal S\u00fcp\u00fcrme} = [(OD_{\text{kontrol}} - OD_{\text{test}}) / (OD_{\text{kontrol}}) \times 100].$$

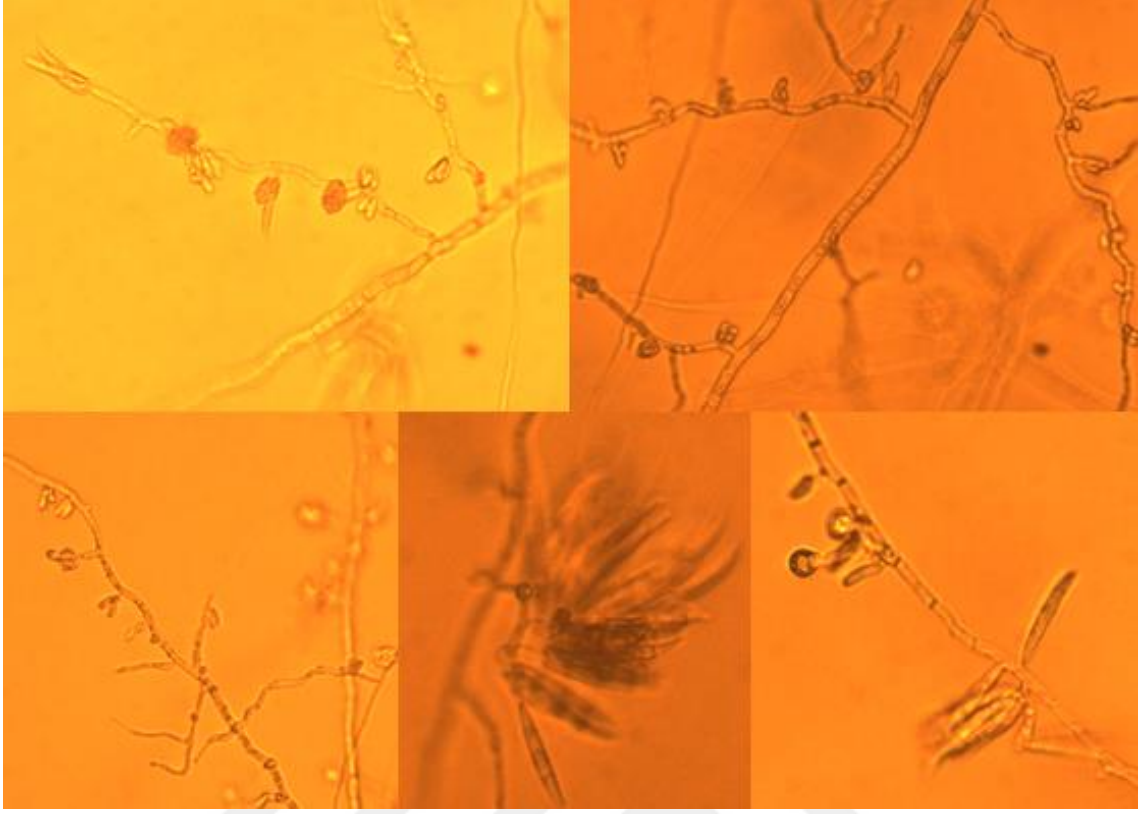


3. BULGULAR

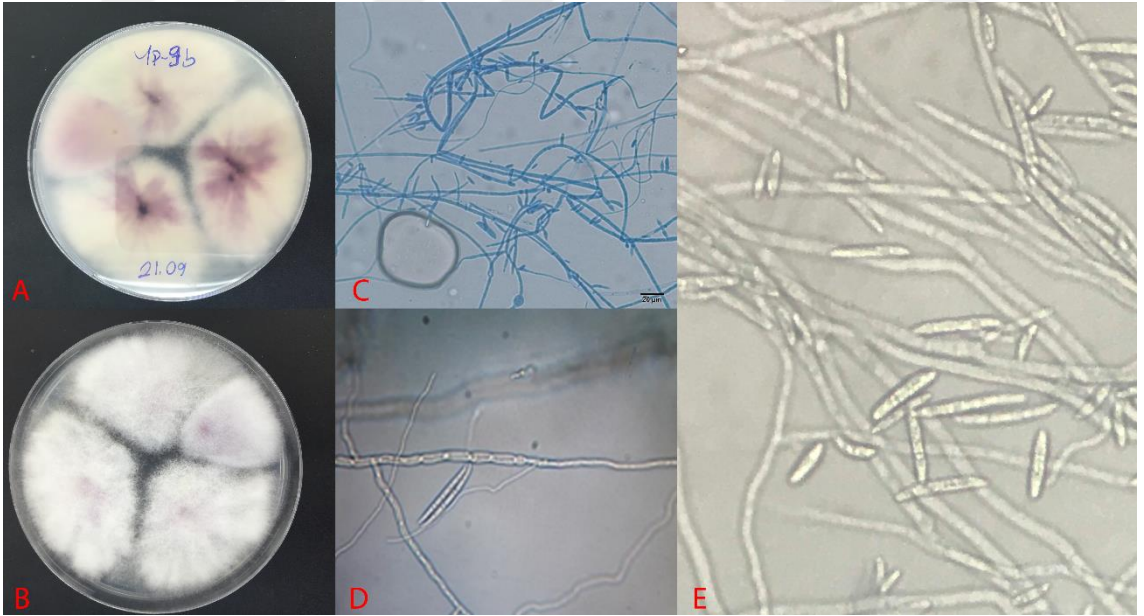
Bu çalışmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan Yüksek lisans tezi kapsamında (Kasap, 2018) izole edilen YP9B mikrofungus izolatının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi ve kısmi karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Bu nedenle antimikrobiyal etkili maddeyi üreten fungusun moleküler yöntemlerle tanımlanması, etkili olan maddenin üretiminin optimizasyonu ve kısmi karakterize edilmesi, antifungal, antibakteriyel ve antioksidan etki değerinin belirlenmesi hedeflendi.

Çalışma için *Fusarium* sp. YP9B izolatu derin dondurucudan çıkarılarak PDA besiyerinde canlandırıldı. Makroskobik ve mikroskobik özellikleri PDA, MEA ve su agarı besiyerlerinde incelendi. YP9B izolatu PDA besiyerinde hızlı büyüme özelliği gösterdiği, miselyumları genellikle beyaz, bazen turuncu-mor kırmızı alanlar geliştirdiği gözlemlendi. Fialidleri *Fusarium solani* fialidlerine kıyaslandığında kısa olduğu bilinmektedir. *Microconidia* bol ve karakteristik (fasulye şekli), olup asla zincir oluşturmadığı belirlendi. Macroconidia fusiform ve biraz eğri olduğu, bazen demetler halinde bazen de tek ya da ikili tutam şeklinde olduğu gözlemlendi. Klamidosporları çoğunlukla terminal veya interkalar olduğu belirlendi (Şekil 3).

Geleneksel yöntemle yapılan incelemede *Fusarium* YP9B'nin PDA agarda taze kültürlerinde önce beyaz miseller geliştirdiği, kültürün 3. gününden sonra farklı klonlarında ya da aynı plakta petrinin alt ve üst tarafının koloni rengi misel gelişim şekli, radyal büyüme, spor oluşumu, makrokonidia, mikrokonidia ve kalmidiasporların büyüklüğü gözlemlendi. Klonların kültür süresi uzadıkça beyazdan turuncu, mor – kırmızı renkte pigmentasyonlar oluşturduğu gözlemlendi. Koton mavisi ile boyalı preparatlarda da suşun bolca makro, mikro konidia ve klamidiospor oluşturduğu belirlendi (Şekil 4).



Şekil 3. *Fusarium oxysporum* YP9B'nin Su agar besiyerindeki hifa, konidium ve klamidosporlarını görünümüleri.



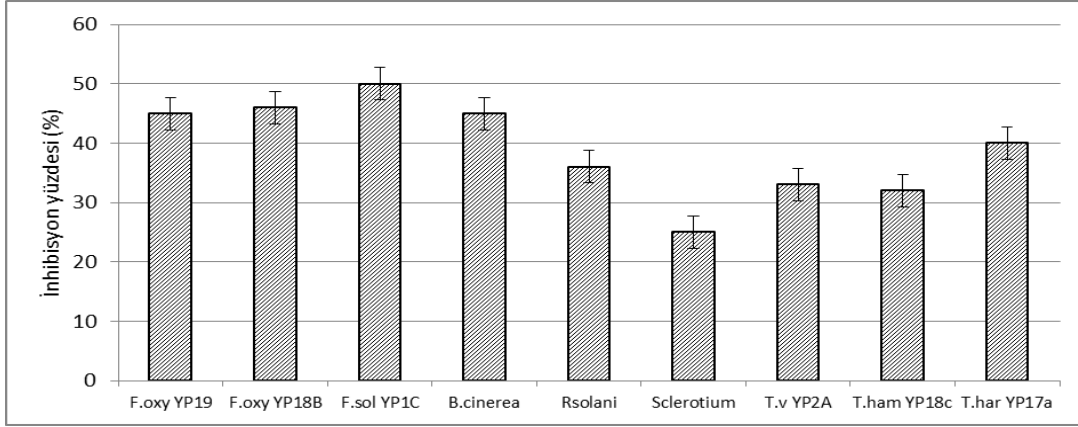
Şekil 4. *Fusarium* spp. YP9B'nin PDA besiyerinde makroskobik ve mikroskobik görünümü. A; PDA'da alttan görünüm. B; PDA'da üstten görünüm. C; 10x mikroskobik görüntü. D; 40x mikroskobik görüntü. E; 100x mikroskobik görüntü.

Geleneksel yöntemle *Fusarium* sp. olarak tanımlanan YP9B suşu moleküler yöntemlerle de tanımlanması hedeflendi. DNA izolasyonu yapılarak ITS1- 5.8S – ITS2 gen bölgesinin çoğaltıldı ve elde edilen baz dizisi GenBank'ta var olan dizilimlerle kıyaslanarak %99 benzerlikle *Fusarium oxysporum* YP9B olduğu belirlendi (Tablo 9). Bu pasajlarda farklılık gözlenen izolatlardan yapılan DNA analizinde de aynı sekans sonucu çıkmıştır.

Tablo 9. rRNA ITS1- 5.8S – ITS2 analizine göre *Fusarium* YP9B izolatlarının moleküler tanısı.

İzolat	ITS 1- 5.8- ITS 2	Covarage (%)	Benzerlik (%)	GenBank. No
YP9B	<i>F. oxysporum</i> 107	94%	99%	KU847855.1
	<i>F. oxysporum</i> EECC-643	93%	99%	KP942940.1
	<i>Fusarium</i> sp. P1704	93%	99%	KT268977.1
ITS Bölgesi	TGAGGAGTATGACTACCTCGCAACGCTCGCGTTATGCTACCTGATCCGAGGTCACA TTCAGAAGTTGGGGTTTACGGCGTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTT CTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAATTTGAGGAACGCGAATTA ACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCA TGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCCTG AATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAA CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACA TATAGAAACAGAGTTTAGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGG GCTGATCCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACT CGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCC TCTAAAATGACCAAGA			

Rize'nin Pazar ilçesinde bahçe toprağından izole edilen ve geleneksel yöntemlerle *Fusarium* sp. moleküler yöntemle *Fusarium oxysporum* olarak tanımlanan YP9B suşunun (Kasap, 2018), biyolojik mücadele için kullanılan antagonistik fungus türlerine karşı etkili bir metabolit ürettiği gözlenmiş, domates tohumlarının çimlenmesi üzerine ve sebze bitkilerinin (domates, biber vb.) gelişimi üzerine patojenik özellik taşımadığı belirlenmiştir (Kasap, 2018). Çalışmada bitki patojeni funguslara ve biyokontrol ajanı olarak kullanılan *Trichoderma* sp. suşlarına karşı ikili kültür tekniği ile antifungal aktivitesi araştırıldı (Şekil 5, 6 ve 7).



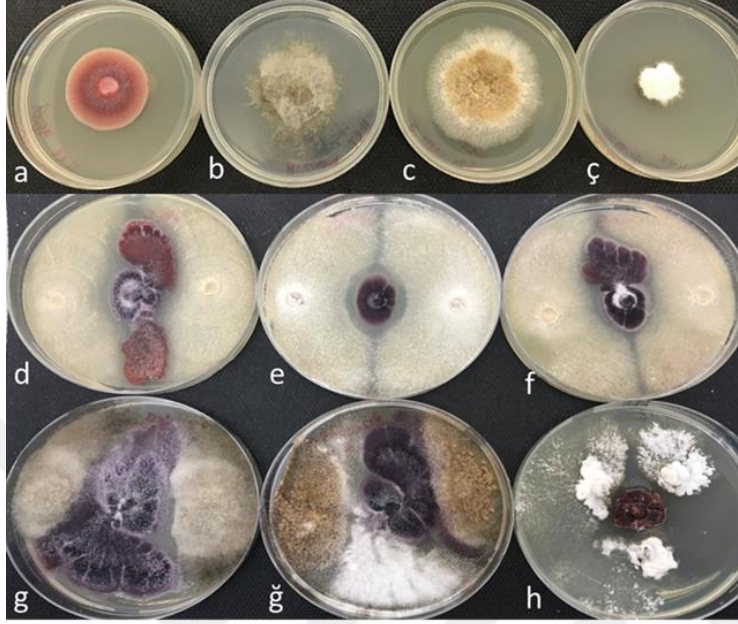
Şekil 5. İkili kültür metodu ile *F. oxysporum* YP9B'nin bitki patojeni ve biyokontrol ajanlara karşı olan radyal gelişiminin yüzde (%) inhibisyon değerleri. F.oxy; *F. oxysporum*, F.sol; *F. solani*, T.v; *Trichoderma virens*, T.ham; *T. hamatum*, T.har; *T. Harzianum*

Bitki köklerinin çürümesine ve özellikle sebze (domates, biber vb. gibi) tohumlarının çimlenmesini engel olan fungus türlerine karşı (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* ve *F. solani*) antagonistik aktiviteleri ikili kültür tekniği ile araştırıldı. Test edilen bitki patojeni fungusların misel gelişimlerini %25-50 oranında engellediği belirlendi (Şekil 5). Salgılanan metabolite ya da YP9B'nin fiziksel gelişimine karşı en duyarlı bitki patojeni türünün sırasıyla *B. cinera*, *R. solani* ve *S. sclerotiorum* türleri, en az duyarlılık ise *S. sclerotium*'a karşı olduğu gözlemlendi (Şekil 5 ve 6).

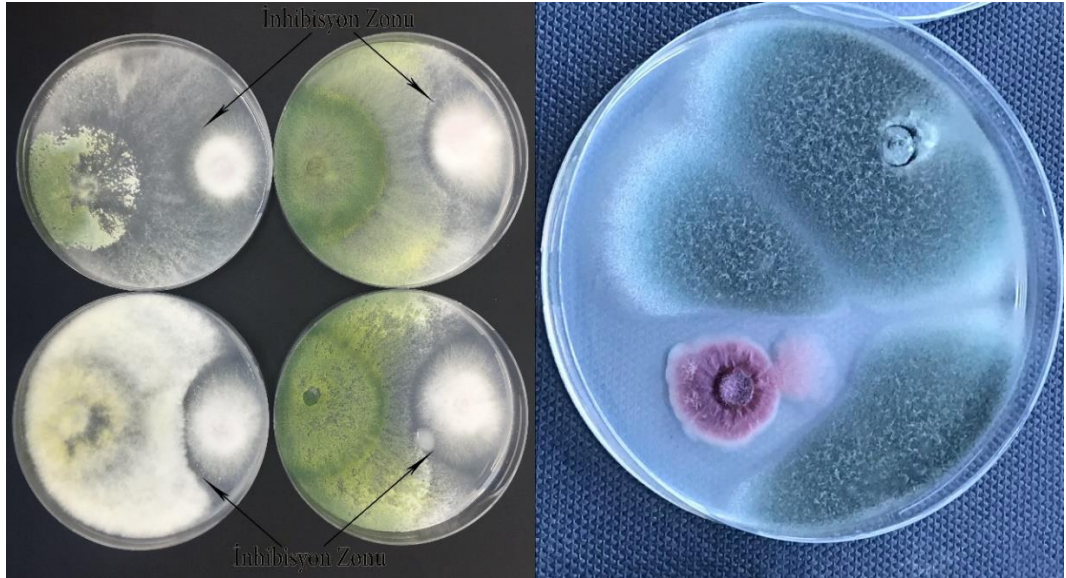
Fusarium oxysporum YP9B suşunun biyolojik mücadele için kullanılan antagonistik fungus cinsi olan *Trichoderma* sp.'nin üç ayrı türüne karşı (*T. atroviride*, *T. hamatum* ve *T. harzianum*) duyarlılığı PDA besi ortamında ikili kültür tekniği ile incelendi. *Fusarium oxysporum* YP9B'nin antagonist bir ya da daha fazla metabolit ürettiği, *Trichoderma* türlerinin gelişimini %30-40'e varan oranlarda engellediği belirlendi (Şekil 5 ve 7).

Çalışmada doğada yaygın bulunan ancak insanlar için fırsatçı patojen olan *Penicillium* sp. ve *Aspergillus flavus* türlerine karşı *F. oxysporum* YP9B etkiliği yine ikili kültür yöntemi ile araştırıldı, fakat bu türlerde sporlanma yoğun olduğundan dolayı radyal gelişim açısından değerlendirilemedi. Bununla birlikte *F. oxysporum* YP9B'nin her iki

insan patojeninin gelişimini engelleyen kimyasal madde ürettiği belirlendi (veriler tabloda gösterilmedi).

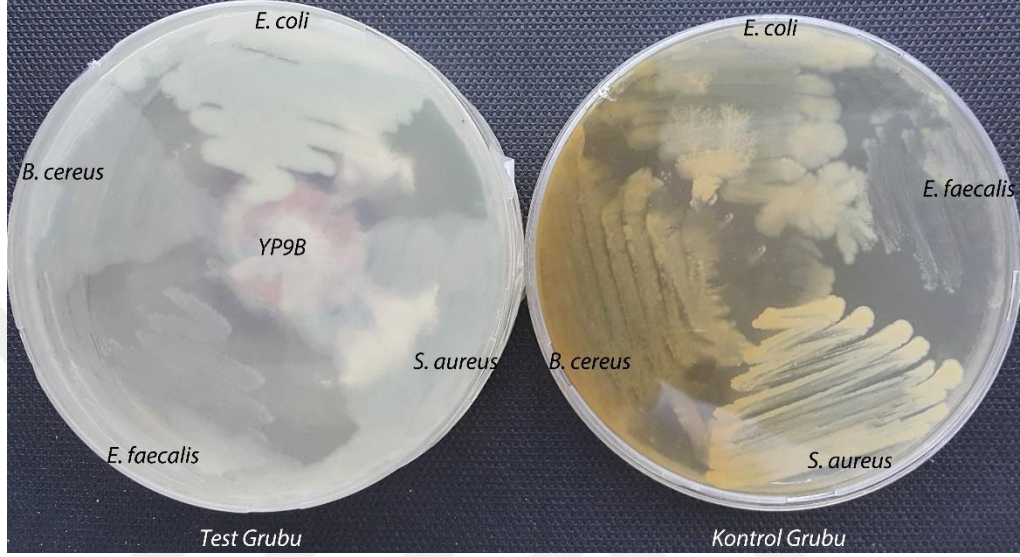


Şekil 6. *F. oxysporum* YP9B'nin ikili kültür testiyle bitki patojeni türlerine karşı antifungal aktiviteleri. a, b, c, ç; kontrol grubu, d; *F. solani* YP1c, e; *F. oxysporum* YP18b, f; *F. oxysporum* YP19, g; *B. cinerea*, ğ; *R. solani* AG4, h; *S. sclerotiorum*.



Şekil 7. *F. oxysporum* YP9B'nin ikili kültür testiyle biyokontrol ajan olan *T. harzianum* (sol) ve insan fırsatçı patojeni olan *Aspergillus flavus* (sağ) suşlarına karşı antifungal aktiviteleri.

YP9B suşunun uçucu metabolit ürettiği ikili petri yöntemiyle dört ayrı mikroorganizmaya karşı test edildi. Etkinliğinin mikroorganizmaların üremesini durdurucu değil ancak üremeyi azaltıcı ve pigment oluşumunu önleyici etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *F. oxysporum* YP9B'nin ikili petri yöntemi ile uçucu metabolitlerinin bakteriyel suşlara karşı etkinliği.

Antifungal aktiviteye sahip olduğu gözlenen *F. oxysporum* YP9B'nin antibakteriyel aktivitesinin var olup olmadığının araştırılması amacıyla agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı. *F. oxysporum* YP9B'nin on günlük malt ekstrakt sıvı kültür (MEB) filtratının süzüntüsü, insan patojeni kültür koleksiyonu suşlarına (bir dizi Gram negatif/pozitif bakterilere ve maya mantarı) karşı test edildi ve güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Tablo 10). Antimikrobiyal etkinliğin belirlenmesi potansiyel antimikrobiyal ajan/ajanları üretebileceğini düşündürdü ve çalışma kapsamına alındı. *F. oxysporum* YP9B, MEB filtratının yoğunlaştırılmamış halinin 50 µl'si incelendi ve bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, maya mantarlarına ise etkinliğinin olmadığı gözlemlendi (Tablo 10).

Tablo 10. *F. oxysporum* YP9B kültür filtratının antimikrobiyal etkinliği.

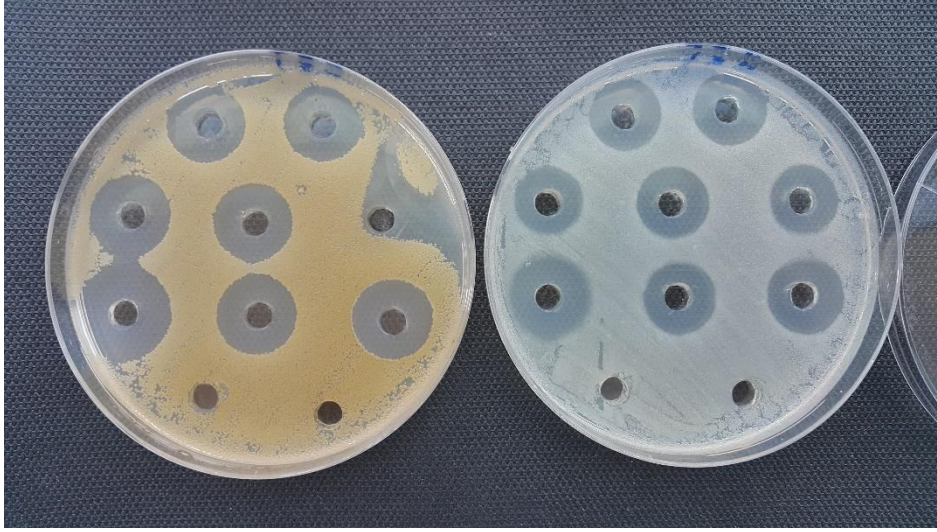
Ham Lizat	Test miktarı (µL)	Mikroorganizmalar ve İnhibisyon Zon Çapları (mm)									
		Gram (-)				Gram (+)			Maya mantarları		
		Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Bc	Sm	Ca	Ct	Sc
MEB - YP9B	50	20	20	15	18	20	20	10	-	-	-
MEB kont.	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDB-YP9B	50	22	21	16	19	22	22	12	8	8	8
PDB	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amp.	10	10	10	18	35	10	15	NT			
Flu.	5								25	25	25

Ec: *E. coli* ATCC 25922, Yp: *Y. pseudotuberculosis* ATCC 911, Pa: *P. aeruginosa* ATCC27853, Ef: *E. faecalis* ATCC 29212, Sa: *S. aureus* ATCC 25923, Bc: *B. cereus* 702 Roma, Sm *S. mutances* RSKK07038, Ca: *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. tropicalis* ATCC13803, *S. cerevisiae* RSKK 251, Amp.: Ampisilin, Flu.: Flukonazol, (—): aktivite yok, MEB; Funguslar için sıvı besiyeri, YP9B; *Fusarium oxysporum* YP9B kültürü.

Çalışmada elde edilen MEB lizatının antimikrobiyal aktivitesi gözlenmiş, bu aktivitenin ısı kararlılığının araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla pH'ı 7,0 ile 6,8'e ayarlanmış ve 500 mikrolitre miktarında steril ependorf tüplerine dağıtılmış lizatlar, farklı sıcaklıkta (40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C'de) ısıtıcı blok üzerinde 10 dakika ısıya maruz bırakıldıktan sonra antimikrobiyal aktiviteleri (50 µl) agar kuyucuk metodu ile tekrar test edildi. Antimikrobiyal aktivite testi için daha önce etkinliği gözlenmiş olan Gram negatif bakteri grubundan *E. coli* ve *P. aeruginosa*, Gram pozitif gruptan *S. aureus* kullanıldı (Tablo 11 ve Şekil 9). Gram (-)'lerde etkinliğin olmadığı ancak Gram (+)'lerde etkinliğin varlığı ve ısı ile etkilenmediği gözlemlendi. Aktivitenin 90 °C'de 30 dakika bekletildiğinde ise çok az azaldığı belirlendi. Bu sonuç aktiviteye neden olan etkenin inorganik bir bileşik olduğunu düşündürdü.

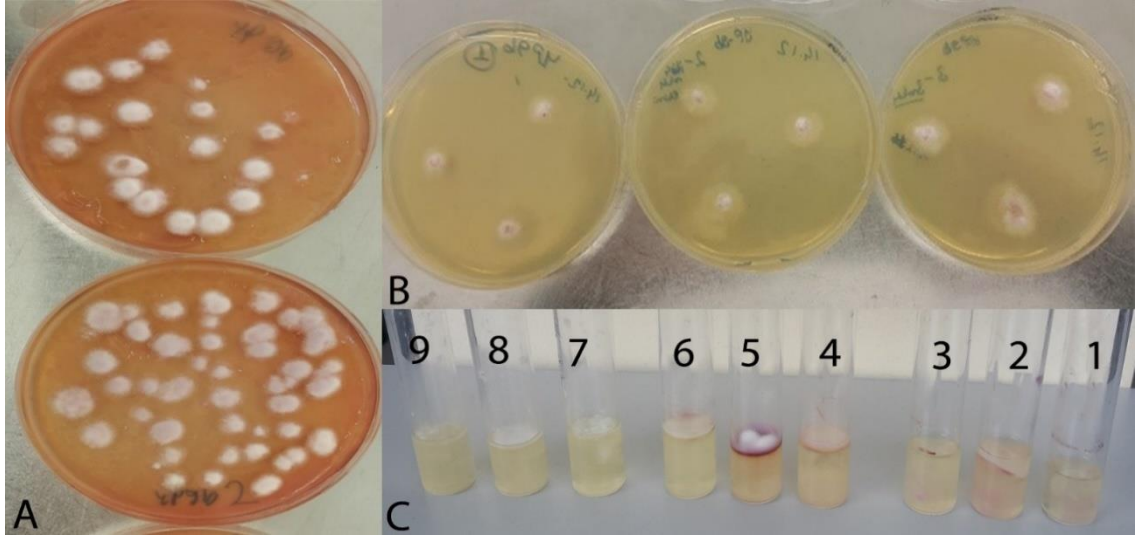
Tablo 11. Değişik sıcaklıklara maruz bırakılan *F. oxysporum* YP9B izolatının kültür lizatının bazı bakterilere karşı antibakteriyel etkinliği.

Sıcaklık ve süre	Agar kuyucuk metoduyla antibakteriyel aktivite zon çapı (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. auroginosa</i>	<i>S. aureus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
40 °C 10 dk.	-	-	10	10
50 °C 10 dk.	-	-	10	10
60 °C 10 dk.	-	-	10	10
70 °C 10 dk.	-	-	10	10
80 °C 10 dk.	-	-	10	10
90 °C 10 dk.	-	-	9	9
90 °C 30 dk.	-	-	8	8
Kontrol lizat			10	10

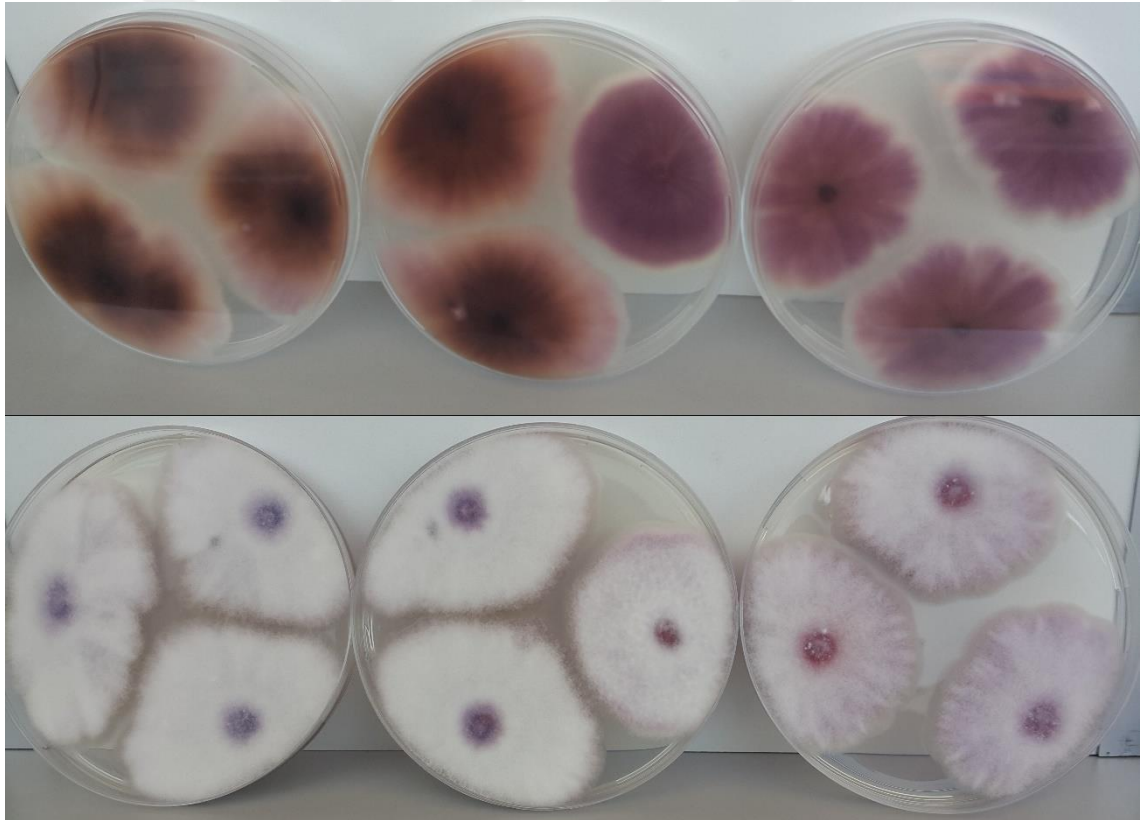


Şekil 9. *F. oxysporum* YP9B ekstraktların agar kuyucuk diffüzyon testinde sırasıyla *S. aureus* subsp. *aureus* ve *S. aureus* türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

Fusariumlar hem eşeyli hem eşeysiz (hifa, makroconidium ve mikrokonidium) üreme gösteren bir fungustur. Her pasajda üreyen kültürlerde belirli oranda fenotipik ve biyotipik morfoloji değişimi gösterdiği bilinmekte olup çalışmamızda da bu durum gözlenmiştir (Şekil 10). Aynı kültürden ekilen kolonilerin hem yüzeysel hem de dipten görünümünde renk ve hifa farklılığı gözlenmektedir. Bu değişimin mikrobiyal aktivite üzerinde etkinliğinin var olup olmadığının belirlenmesi amacıyla *F. oxysporum* YP9B'nin DRBC besiyerine tek koloni düşürme yöntemiyle spor ekimi yapıldı (Şekil 10A). İnkübasyonun 3-5. günü (28 °C'de) elde edilen farklı görünüme sahip toplam 9 farklı koloni benzer ya da farklı etkinlik gösterip göstermediğinin belirlenmesi ve bundan sonraki çalışmalarda aktivitesi en iyi olan klon olarak seçilmesi için tek koloni yöntemiyle petri ve tüpte hazırlanan PDA besiyerine pasaj yapıldı (Şekil 10B ve C). Kültürün 28 °C'de 7-10 gün inkübasyonundan sonra koloni şekilleri ve renk özellikleri incelendi (Şekil 11).



Şekil 10. *F. oxysporum* YP9B klonlarının morfolojik görünüşleri. A) DRBC’de 5. gün tek koloni görüntüleri. B) DRBC’den PDA’ya alınan tek kolonilerin 3. gün görünüşleri. C) PDB’de saf kolonilerin pigmentleri (mor - kırmızı renkli).



Şekil 11. *F. oxysporum* YP9B’nin farklı klonlarının PDA agarda görünüşleri. Üst sırada PDA besi yerinin alttan görünüm, alt sırada koloninin yüzeysel görünümü.

Klonların hem tüpte hem petride üremiş kolonilerde morfolojik farklılıkların var olduğu belirlendi. Klon 5’in en koyu mor renkli, klon 7-9’un en az renk oluşturdukları gözlemlendi. Morfolojik farklılık içeren 9 adet klon seçildi, sıvı ve katı patates dekstroz

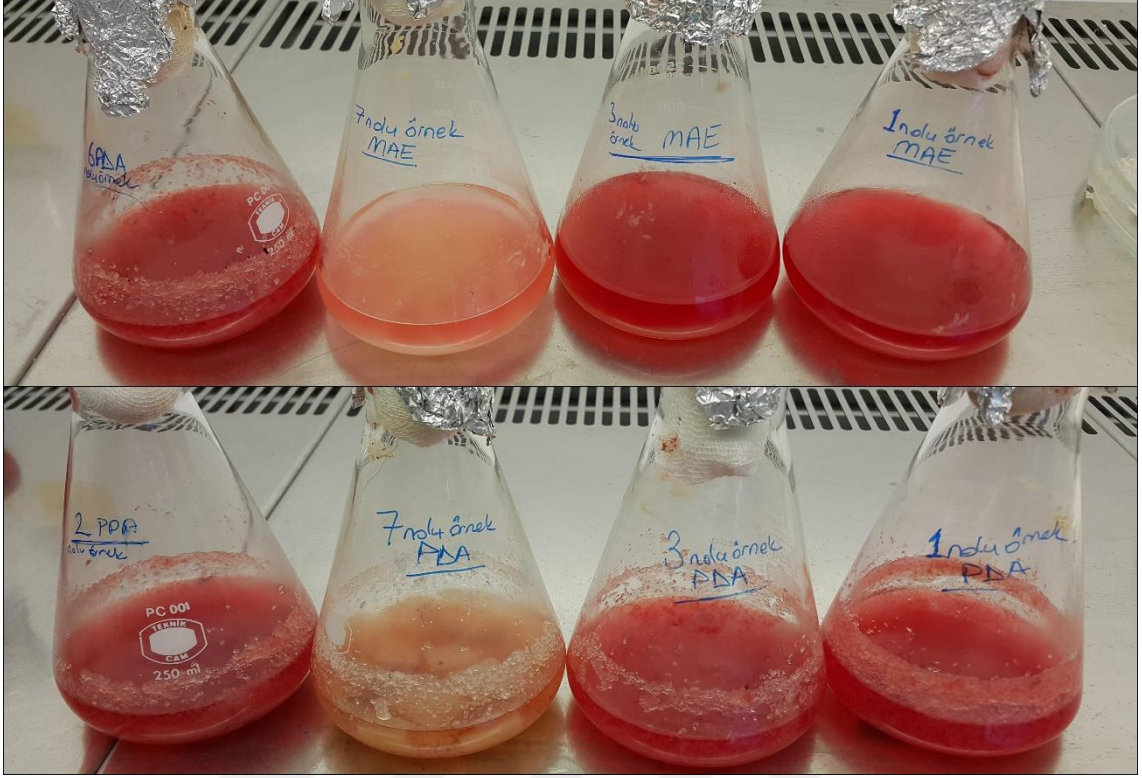
besiyerleri kültürleri arasında antimikrobiyal etkinlikleri açısından fark olup olmadığı araştırıldı. Sıvı kültürler hem çalkalamalı hem de çalkalamasız ortamda test edildi, ancak farklılığın olmadığı belirlendi ve tabloda bu değerler gösterilmedi. Bu amaçla 10 günlük sıvı kültür filtre edildi. Agar kuyucuk (70 µl'de) yöntemiyle, katı kültürden 0,6 mm disk alınarak disk difüzyon yöntemiyle üç ayrı bakteriye karşı test edildi (Tablo 12). Katı agar ortamında daha iyi antimikrobiyal madde ürettiği belirlendi ve daha sonraki süreçlerde katı agar ortamı kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

Tablo 12. *F. oxysporum* YP9B klonlarının Patates dekstroz katı ve sıvı kültürlerin antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırılması (mm).

Klon No	10 günlük PD Sıvı Besiyeri filtratı (50 µl)			10 günlük PDA kültürünün 6 mm'lik diski		
	Ec	Sa	Saa	Ec	Sa	Saa
1	7	-	6	-	10	12
2	7	-	10	10	8	12
3	7	-	6	6	8	12
4	7	-	8	6	8	10
5	7	-	10	7	6	6
6	7	-	-	10	10	0
7	7	-	-	8	6	8
8	6	-	10	8	-	6
9	6	-	6	6	-	6

Ec: *E. coli* ATCC25922, Sa: *S. aureus* ATCC25923, Saa: *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC33862

Klonlardan 7, 8 ve 9 nolu kültür lizatlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve morfolojik özellikleri benzer olduğu gözlemlendiğinden dolayı sadece 7. klon dikkate alındı. Klonların morfolojik özelliklerinin farklılığını teyit etmek amacıyla PDA ve MEA besiyerlerine pasaj yapılarak beyaz dan mor rengine kadar değişen renk tonları iki farklı besiyerinde de test edildi ve sonra en uygun olabilecek klonların seçimi yapıldı. Kültürlerin renk değişimleri bariz olarak farklılık içerdiği gözlemlendi. Seçilen 7 klonun, inkübasyonu sonucunda hasatları yapıldı ve 250 ml'lik erlen içinde hacmin 1:2 oranında etil asetat ilave edilerek, oda sıcaklığında 150 rpm de 24 saat boyunca ekstraksiyonları yapıldı (Şekil 12). Daha sonra kâğıt filtreden geçirilerek süzülen ham ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile test edildi.



Şekil 12. *F. oxysporum* YP9B klonlarının MEA ve PDA besiyerlerindeki kültürlerin etil asetat ekstraktlarının görünümü.

Test edilen ekstraktların tümünde farklı düzeylerde ve güçlü antimikrobiyal aktivite belirlendi. Patates dekstroz ve Malt yeast ekstrakt içeren katı ve sıvı besiyerinden yapılan kültürler test edildiğinde sıvı ortamda istenilen düzeyde antimikrobiyal etkinlik gözlemlenemedi. Katı agar ortamında yapılan kültürlerde daha yüksek etkinlik belirlendi ve bu nedenle deneylerin bundan sonraki aşamalarında agar ortamı kullanıldı. PDA ve MEA besiyeri arasındaki kıyaslama yapıldığında az da olsa farklılıkların varlığı ve PDA'nın daha uygun besiyeri olduğu belirlendi (Tablo 13). Bu çalışma sonucunda PDA besiyerinin antimikrobiyal maddenin kitlesel üretimde kullanılması sonucuna varıldı.

Tablo 13. İki farklı katı besiyerinde üretilerek etil asetat ekstraksiyonu yapılan lizatların agar kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi (80 µl).

YP9B klonlarının etil asetat ekstraktları	Test miktarı (mg/2 ml)	Mikroorganizmalar ve İnhibisyon Zonu Çapları (mm)										
		Bakteriler						Maya Mantarları				
		Gram- Negatif			Gram-Pozitif							
		Ec	Yp	Pa	Sa	Sm	Ef	Bc	Lc	Ct	Ca	Sc
1 nolu PDA	4,7	24	>20	>25	>25	16	22	20	13	18	18	12
1 nolu MEA	4,0	24	14	>25	14	16	18	18	13	18	12	12
2 nolu PDA	7,0	14	14	>25	15	16	16	14	13	16	13	12
2 nolu MEA	7,2	14	12	>25	12	16	15	14	13	16	13	12
3 nolu PDA	5,4	24	>20	>25	>25	16	20	20	13	20	13	12
3 nolu MEA	5,6	24	22	>25	25	16	24	20	13	20	12	12
4 nolu PDA	5,5	22	18	>25	20	15	18	18	12	18	12	12
4 nolu MEA	5,3	22	17	>25	18	15	16	16	12	18	12	12
5 nolu PDA	5,2	18	14	>25	18	14	12	12	11	18	12	12
5 nolu MEA	5,1	18	13	>25	16	16	14	12	11	18	12	12
6 nolu PDA	6,8	22	14	>25	15	16	16	15	13	20	14	12
6 nolu MEA	6,6	22	13	>25	14	16	18	15	13	20	14	12
7 nolu PDA	7,9	18	15	>25	16	15	16	15	11	15	12	12
7 nolu MEA	6,7	>20	30	>25	30	15	>20	>20	11	20	12	13
Etil Asetat		-	-	-	-	12	-	-	11	20	15	13
Amp	10	10	10	18	35	NT	10	15	NT			
Flu	5									25	25	25

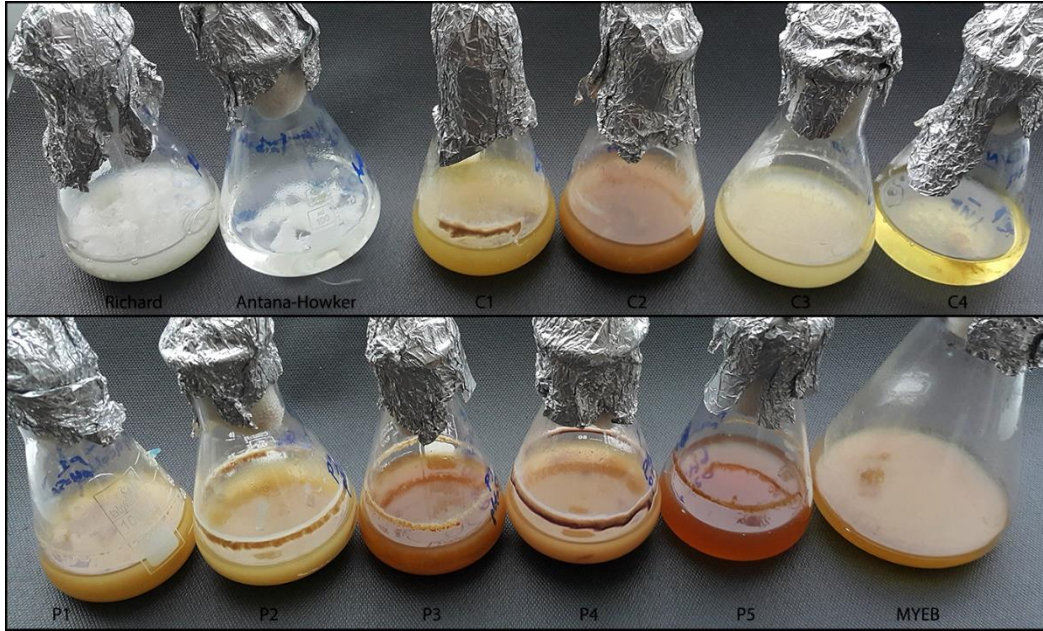
Test edilen klonların ekstraktlarından PDA agarda üretilenlerden 4 tanesinin (1, 5, 6 ve 7 nolu klon) minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri araştırıldı. Tüm ekstraktların benzer ve güçlü (0,73-4,94 µg/ml) antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, antibakteriyel aktivitenin genel olarak antifungal aktiviteden (2,94-17 µg/ml) daha yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 14). En iyi MİK değeri 1 ve 5 nolu klonların ekstratlarında gözlemlendiği belirlendi.

Tablo 14. Ham etil asetat ekstraksiyonların Minimal İnhibisyon Konsantrasyon değerleri.

Klon No	µg/ml	Mikroorganizmalar ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerleri (µg/ml)													
		Gram (-)				Gram (+)				ARB+			Maya mantarları		
		Ec	Yp	Kp	Pa	Sa	Sm	Ef	Bc	La	Lc	Ms	Ct	Ca	Sc
1	4700	1,5	2,9	2,9	1,5	2,9	2,9	2,9	1,5	0,7	2,9	0,4	2,9	2,9	5,9
5	5400	1,7	3,4	3,4	1,7	1,7	3,4	3,4	1,7	0,8	1,7	0,4	3,4	3,4	6,3
6	6800	4,3	4,3	4,3	2,1	2,1	4,3	2,1	2,1	2,1	4,3	0,5	8,5	8,5	17
7	7900	2,5	4,9	4,9	2,5	4,9	4,9	2,5	2,5	2,5	4,9	0,6	4,9	4,9	19,8
Amp	10	8	32	32	>128	2	NT	2	<1	NT	NT				
Strep	10											<1			
Flu	5												<8	<8	<8

Ec: *Escherichia coli*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Kp: *K. pneumonia*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sm: *Streptococcus mutans*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Bc: *Bacillus cereus*, La: *L. acidophilus*, Lc: *L. casei*, Ms: *M. smegmatis*, Ca: *Candida albicans*, Ct: *C. tropicalis*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Amp.: Ampisilin, Flu.: Flukonazol, (—): aktivite yok, EA; Etil asetat kontrol, NT: Test edilmedi.

Çalışmada farklı karbon ve azot kaynaklarının antimikrobiyal aktiviteye olan etkinliğini belirlemek amacıyla hazırlanan 12 farklı besiyeri test edildi (Tablo 15, Şekil 13). Besiyerlerinde, karbon kaynağı sabit tutularak azot kaynağı, azot kaynağı sabit tutularak karbon kaynağı değiştirildi. Ayrıca bu kültür ortamlarında inkübasyon süresi uzatıldığında antimikrobiyal aktivite açısından değişip değişmediği incelendi. Kültür süresi de 5, 7, 10 ve 15. gün arasında değiştirilerek incelendiğinde aktivitenin karbon ve azot kaynağına göre kısmen değiştiği, en yüksek aktivitenin 5-10. günler arasında olduğu, 10. günden sonra aktivitede önemli bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Çalışmada belirtilen ortamların tümü hem katı hem de sıvı besiyeri olarak test edildi. Katı ortamda test edildiğinde etkinliğin üç mikroorganizmaya karşı da var olduğu ancak daha objektif olması açısından sıvı ortamda ölçülen değerler tabloda verildi. Bu sonuçlar, önceki veriler ile değerlendirildiğinde en uygun besi ortamının PDA, en uygun kültür süresinin 10 günlük inkübasyon süresi olduğu belirlendi ve çalışmanın sonraki aşamalarında PDA ortamı kullanıldı.



Şekil 13. *F. oxysporum* YP9B farklı karbon ve azot kaynaklarında yapılan 7 günlük kültürlerinin görünüşleri.

Etil asetat ekstraksiyonu yapılmamış ham lizatların antimikrobiyal aktiviteleri doğal olarak düşük olduğu ve Gram (-)'lere etkili olmadığı belirlendi. Bu sonuç genel

olarak çalışmanın tüm aşamalarında gözlenmiş bir durumdur. Bunun birçok nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 15. Farklı karbon ve azot kaynaklarında *F. oxysporum* YP9B'nin 5., 7., 10. ve 15. gün kültür lizatlarının agar kuyucuk yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi.

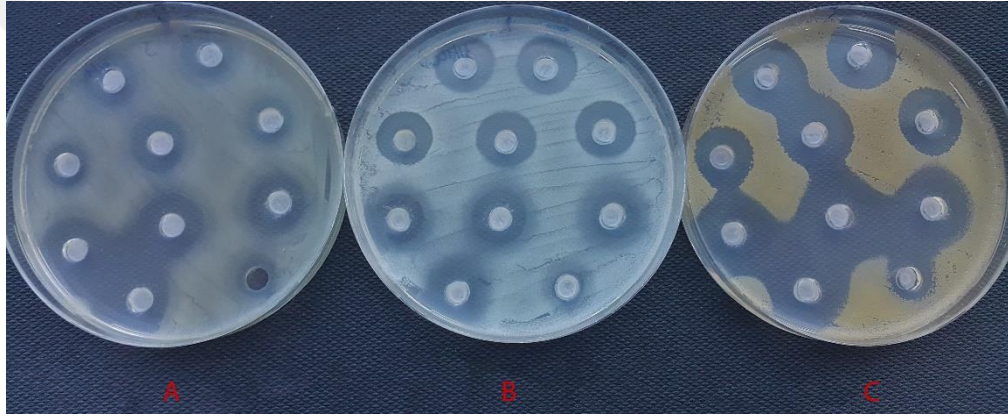
Besiyeri (80 µl)	Mikroorganizmalar ve YP9B'nin farklı günlerdeki kültür lizatları (mm)											
	<i>E. coli</i> ATCC25922				<i>S. aureus</i> ATCC25923				<i>C.albicans</i> ATCC66032			
	5 G.	7 G.	10 G.	15 G.	5 G.	7 G.	10 G.	15 G.	5 G.	7 G.	10 G.	15 G.
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	6	-
C4	-	-	-	-	-	10	10	10	-	6	8	8
C5	-	-	-	-	-	10	12	10	-	6	8	8
P1	-	-	-	-	-	8	8	-	-	-	6	6
P2	-	-	-	-	-	-	10	-	-	6	8	8
P3	-	-	-	-	-	10	8	10	-	6	8	8
P4	-	-	-	-	-	8	8	-	-	-	6	6
AHB	-	-	-	-	-	8	8	-	-	-	6	6
RB	-	-	-	-	-	8	8	-	-	-	6	6
MYE	-	-	-	-	-	8	8	8	-	-	6	6

AHB; Astana-Howker Besi Yeri, RB; Richard Besi Yeri, MYE; Malt Yeast Ekstrakt, G; Gün

Çalışmada aktivitenin iyi olduğu diğer klonlar (4 ve 5), besiyeri (PDA ve MEA) ve farklı ekstraksiyon (etil asetat, etanol, metanol ve su) çözücüleri ve ekstraksiyon süresinin (24 ve 48 saat) belirlenmesi için deney dizayn edildi (Tablo 16, Şekil 14). Bu amaçla öncelikle etil asetat ile birlikte 4 farklı çözücü kullanıldı. Ekstraksiyon oda ısısında 150 rpm'de 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı sürelerde yapıldı. Ancak su ile yapılan ekstraksiyonda düşük düzeyde (6-10 mm zon çaplı) Gram pozitif bakterisi olan *S. aureusa* karşı antimikrobiyal aktivite belirlendi. Etanol ekstraksiyonunda fraksiyon oluşmadığından dolayı test edilemedi, metanol ekstraksiyonunda her iki besiyeri ortamında da aktivite belirlenemedi. Etil asetat çözücü olarak kullanıldığında test edilen tüm mikroorganizmalara karşı etkinlik gözlemlendi.

Tablo 16. *F. oxysporum* YP9B'nin iki farklı klonda antimikrobiyal aktivite üzerine besiyeri, sıcaklık ve ekstraksiyon çözücüsünün etkinliği.

Klon no	Besiyeri	Çözücüler	Agar kuyucuk yöntemiyle antimikrobiyal aktivite (mm)					
			24 saat Ekstraksiyon			48 saat Ekstraksiyon		
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
4	MEA	Metanol	-	-	-	-	-	-
4	MEA	Su	-	-	-	-	-	-
4	MEA	Etil asetat	8	13	6	10	14	6
4	PDA	Metanol	-	-	-	-	-	-
4	PDA	Su	-	8	-	-	8	6
4	PDA	Etil asetat	7	14	6	10	14	6
5	MEA	Metanol	-	-	-	-	-	-
5	MEA	Su	-	-	-	-	7	6
5	MEA	Etil asetat	8	14	-	10	14	6
5	PDA	Metanol	-	-	-	-	-	-
5	PDA	Su	-	8	-	-	8	6
5	PDA	Etil asetat	8	14	-	10	14	8



Şekil 14. Agar kuyucuk yöntemi ile *F. oxysporum* YP9B kültür lizatının etil asetat ekstraktlarının (60 µl) sırasıyla *E. coli*, *S. aureus* ve *S. aureus* subsp. *aureus*'a karşı etkinliği.

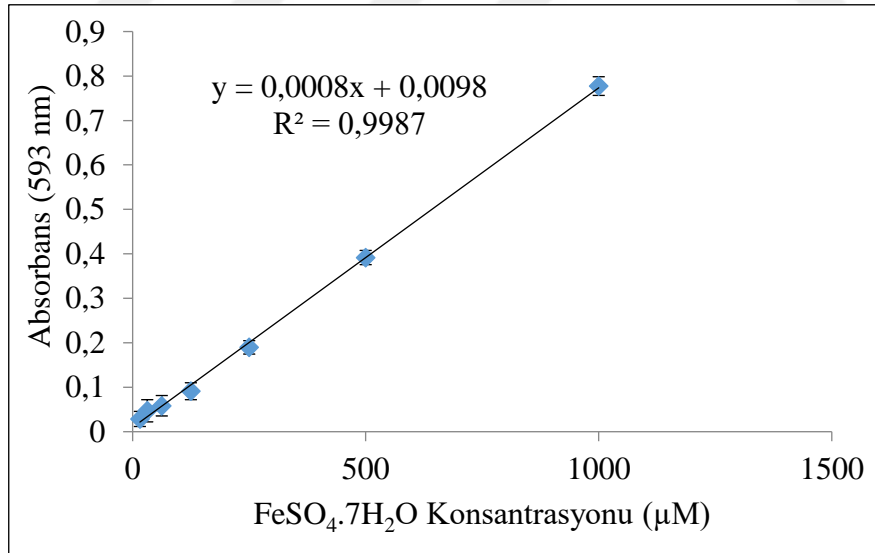
Çalışmada etil asetat ekstraksiyonunun en iyi yöntem olduğu belirlendikten sonra polar ve apolar aralıkta yer alan 10 farklı çözücünün etkinliği incelendi (Tablo 17). Klonlar arasında renk farkının olmasına rağmen antimikrobiyal aktivitede küçük değişikliklerin bulunduğu gözlenmiş, besiyeri olarak PDA'nın MEA'dan daha iyi olduğu belirlenmiş ve sonrasında tek bir klon alınıp çalışmalar bu klon üzerinden yürütülmüştür.

Tablo 17. *F. oxysporum* YP9B'nin etilasetat ekstraktının (80 µl) antibakteriyel aktivitesi üzerine çözücülerin etkinliği (URL-3).

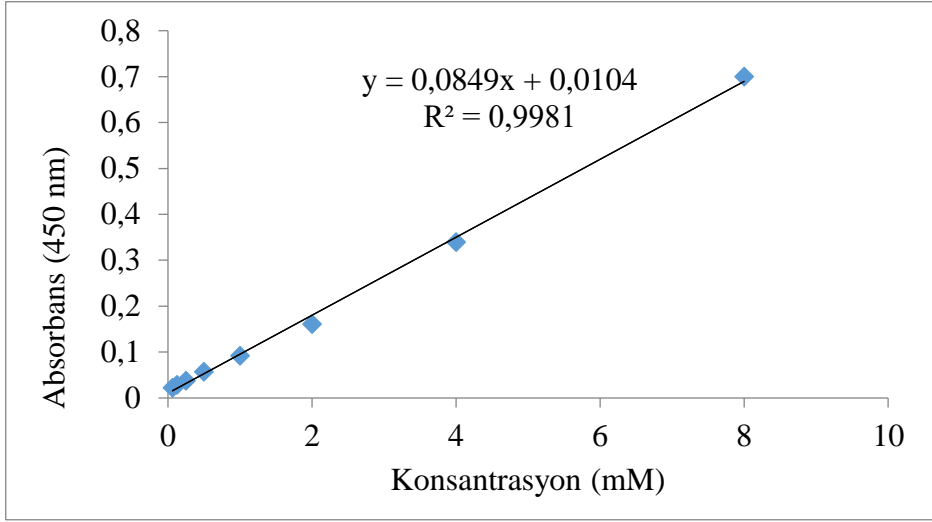
Agar kuyucuk yöntemiyle ekstraktın antimikrobiyal aktivite (mm)				
Sayı	Çözücü	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	Hekzan*	-	-	-
2	Dietil Eter*	-	-	6
3	Kloroform	6	8	6
4	Etil Asetat Orijinal Ext.	14	6	12
5	Tetrahidrofur (THF)	8	6	9
6	1-bütanol	10	12	15
7	Etanol	9	6	10
8	Metanol	11	6	13
9	N,N-Dimethylmethanamide (DMF)	7	6	15
10	Su	-	-	8

*Çözünmedi

Çalışmada elde edilen klonlardan (1, 2, 3, 5, 6 ve 7) PDA ve MEB besiyerlerinde hazırlanan etil asetat ekstraktlarının anti oksidan aktivite değerleri demir (III) indirgeme antioksidant güç (FRAP) ve bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) olmak üzere 2 farklı yöntem kullanılarak belirlendi. Her iki yöntemin standart grafikleri sırasıyla şekil 15 ve 16'de verilmiştir.



Şekil 15. FRAP yönteminde elde edilen FeSO₄.7H₂O standart grafiği



Şekil 16. CUPRAC yönteminde elde edilen Troloks® standart grafiği

FRAP yöntemi sonuçları şekil 15'deki standart grafikten mg bileşik başına düşen $\mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Çalışılan bileşiklerin Tablo 18'de verilen FRAP değerlerine baktığımızda en aktif olandan en az aktif olana doğru $1 > 5 > 6 > 3 > 2 > 7$ şeklinde sıralayabiliriz. Şekil 16'deki standart grafikten elde ettiğimiz Tablo 18'de verilen CUPRAC antioksidan yöntemi sonuçlarına baktığımızda 1 numaralı örneğin Troloks eşdeğeri olarak en aktif olduğu görülmektedir. Yine 1, 2, 3, 5 ve 6 numaralı örneklerin iyi derecede aktivite, 7 numaralı örneğin orta derecede aktivite gösterdiği belirlendi (Tablo 18).

Tablo 18. Sentezlenen tüm bileşiklerin FRAP (bileşiğin her miligramı için $\mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ve CUPRAC ($\mu\text{M Trolox/mg}$ bileşik) test sonuçları.

Klon ekstrakt ve Besiyeri	FRAP Değerleri ($\mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} / \text{mg}$)	TEAC Değerleri ($\mu\text{M Trolox} / \text{mg}$)
1 nolu- PDA	125,638±4,507	157,716±1,774
1 nolu- MEB	155,125±2,500	177,464±1,327
2 nolu- PDA	81,381±4,390	111,504±2,949
3 nolu- MEB	114,077±6,884	105,727±1,725
5 nolu- PDA	101,173±8,780	117,640±3,400
6 nolu- PDA	91,985±3,750	129,795±2,287
7 nolu- PDA	33,713±3,819	66,000±2,572
7 nolu- MEB	41,493±3,307	35,043±1,034

Etil asetat ekstraktların ABTS⁺ radikali temizleme aktivitesi 1600, 400, 100, 25 ve 6,25 µg/mL son konsantrasyonlarda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar Tablo 19’de % radikal temizleme cinsinden verildi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında 1600 µg/mL son konsantrasyonda en iyi radikal temizleme aktivitesini sırasıyla 5 ve 1 numaralı örneklerin gösterdiği bulundu. Diğer konsantrasyonlarda aynı örneklerin iyi derecede radikal temizleme aktivitesi gösterdiğini söyleyebiliriz.

Tablo 19. % ABTS⁺ bileşiklerin çeşitli nihai konsantrasyonlardaki radikal süpürme aktivitelerinin ifade edilmesi.

Klon no ve Besiyerleri	ABTS ⁺ Metodu % Radikal yakalama				
	1600 µg/mL	400 µg/mL	100 µg/mL	25 µg/mL	6,25 µg/mL
1 nolu- PDA	91,45	59,29	25,86	17,71	12,00
1 nolu- MEB	91,33	47,86	28,86	17,57	12,57
2 nolu- PDA	82,57	48,00	22,57	15,14	9,29
3 nolu- MEB	86,19	45,71	33,14	16,00	11,71
5 nolu- PDA	91,45	61,14	24,29	17,14	11,14
6 nolu- PDA	89,98	55,29	16,14	16,14	11,71
7 nolu- PDA	51,23	27,71	20,14	12,71	10,43
7 nolu- MEB	56,38	26,43	15,86	12,29	10,57

Hem FRAP yöntemi hem de ABTS⁺ radikali temizleme aktivitesi açısından incelendiğinde katı agar ortamının antioksidan aktivitesi sıvı ortamda üretilenden daha yüksek olduğu gözlemlenmektedir. YP9B suşunun antioksidan aktivite değerlerine bakıldığında antimikrobiyal aktivite değerlerine benzer şekilde farklı klonların az da olsa aktivite değerlerinin de farklı olduğu gözlemlendi. Klon 5’in antioksidan aktivite açısından en uygun klon olduğu belirlendi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Rize'nin Pazar ilçesinde bahçe toprağından izole edilen ve geleneksel yöntemlerle *Fusarium oxysporum* olarak tanımlanan YP9B suşunun (yüksek lisans tez çalışması), biyolojik mücadele için kullanılan antagonistik fungus türlerine duyarlı bir metabolit ürettiğı gözlenmiş, domates tohumlarının çimlenmesi üzerine ve sebze bitkilerine (domates, biber vb.) patojenite taşımadığı belirlenmiştir. *Fusarium oxysporum* YP9B'nin kültürel özellikleri geleneksel yöntemlerle belirlenerek mikroskopik ve makroskopik görünümüleri alındı (Şekil 3 ve 4). Bu verilere göre incelenen suşun geleneksel olarak *Fusarium* olduğu literatür kaynaklarına bakılarak teyit edildi (Lombard vd., 2019).

Tez kapsamında domates bitkisi kök toprağından yapılan PDA ve DRBC besiyerlerindeki ekim sonucunda izole edilen, farklı besi ortamlarında (PDA, MEA ve Su agar) kültür edilerek geleneksel (koloni morfolojisine ve mikroskopik görünümüne) (Kasap, 2018) ve moleküler yöntemlere göre *F. oxysporum* YP9B olarak tanımlanmıştır (Tablo 7, 8 ve 9). *Fusarium* türlerinin tanımlanması geleneksel olarak zaman alıcı ve taksonomik uzmanlık gerektiren morfolojiye dayalı bir metottür. Moleküler tanıma korunan ribozomal DNA'nın ITS transkripsiyon aralığının pirimer 1 ve 4 kullanılarak tanımlanması sık kullanılan bir yöntemdir. Ancak biyotiplerinin belirlenmesinde yeterli olmadığı bilinmektedir (Singha vd., 2016). Bunun için farklı yöntemlerin de kullanılması gereklidir ancak çalışmamız filogenetik bir çalışma olmayıp *Fusarium*'un ekstraksiyonunun karakterizasyonu ön planda tutulduğu için geleneksel yöntem ve ITS ile tanımlama yeterli bulunmuştur. Morfolojik koloni farklılığının fenotipik değişim olduğu, genotipik olarak ITS dizileri ile bu farklılığın gözlenemediğı belirlendi. Kolonilerdeki morfolojik değişimin genotipten kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için başka gen bölgeleri ya da tam genom analizi yapılması gerekmektedir.

Mikrobiyal fermentlerden elde edilen kültür filtratı ya da ekstratların agar kuyucuk yöntemiyle bakteriyel inhibisyon zonları ölçülerek çeşitli antimikrobiyaller basitçe keşfedilebilir. Bakteriyel direncin yaygınlığından dolayı yan etkileri az yeni antibakteriyel ajanların keşfi tıbbi uygulama sahasında önemli hedefler arasında yer almaktadır (Kishore vd., 2009). Ticari ürünlerin üretimi için fungusların kullanımı çok eskiye dayanmakta ve bu üretim son 50 yıldır hızla artmış durumdadır. Fungusların uçucu

metabolit, mikotoksin, nonribozomal peptitler, poliketidler, terpenler, diketopiperazinler ve alkaloid gibi sekonder bileşiklerin üretimi için geniş bir biyoçeşitliliğe sahip olduğu bilinmektedir (Mohamed, 2004). *Fusarium* sp. türlerinin salgılamış oldukları sekonder metabolitleri türden türe değişmekte olup türün patojen veya non-patojen olması üzerinde etkili olmaktadır. Çalışmamızda potansiyel antimikrobiyal ajan olabileceği düşünülen *F. oxysporum* YP9B'nin çeşitli kültür şartlarında üretildiğinde elde edilen kültür filtratlarının ve kültür filtratlarının uygun çözücüler ile ekstre edilmiş ekstralarının yaygın bilinen bir dizi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin belirlendi.

Çalışmada öncelikle *F. oxysporum* YP9B'nin ikili kültür testiyle fungal patojenlere karşı biyokontrol ajan olabilme ya da bitki patojeni funguslara karşı kullanılan biyokontrol ajanı funguslar ile insan patojeni funguslara karşı etkinliklerinin belirlenmesi için ikili kültür tekniği ile antifungal aktivitesi ölçüldü (Şekil 5, 6 ve 7). Bitki patojeni *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* ve *F. solani* suşlarına karşı %25-50 oranında antagonistik etkinliğe sahip olduğu ve gelişimlerini engellediği belirlendi (Şekil 5). En yüksek etkinlik *Fusarium* sp. türleri ile *B. cinerea*'ya karşı gözlenirken en düşük etkinlik *S. sclerotium*'a karşı belirlendi. Özellikle *R. solani* ve *B. cinera* türlerine karşı öncelikle kimyasal madde salgılayarak üremeyi engellediği, daha sonra ise üzerine doğru yayılım göstererek fiziksel olarak gelişimini bloke ettiği gözlemlendi. *S. sclerotiorum*'un ise tamamen kimyasal etkinlik göstererek radyal gelişimini engellediği belirlendi. Bu etkinlik önemli bulunmuş olup potansiyel antifungal olabileceğini göstermektedir. *Fusarium oxysporum* ve *F. solani* türlerine karşı etkinliğe bakıldığında ise hem kimyasal madde ile hem de fiziksel olarak gelişimlerini engellediği gözlemlendi (Şekil 7). Literatürlerde *Fusarium*'a karşı çeşitli bitki ekstraktlarının antifungal aktivite varlığı bildirilmektedir ancak bitki patojeni olan *Fusarium*'ların ürettiği metabolitlerin antifungal etkinliği ile ilgili fazlaca bir makalelere rastlanılamamıştır (Tayung vd., 2011).

Çalışmamızda *F. oxysporum* YP9B metabolitlerinin yararlı ya da zararlı diğer mantar türlerine karşı olan etkinlikleri araştırıldı (Şekil 5, 6 ve 7), hem biyolojik mücadelede kullanılan *Trichoderma* sp. türlerine hem de insan ve bitki patojeni mantarlara karşı ikili kültür metodu ile yapılan incelemede geniş spektrumlu ve güçlü antifungal aktiviteye sahip metabolit ya da metabolitler içerdiği gözlemlendi. *Fusarium*

oxysporum YP9B suşunun biyolojik mücadele için kullanılan antagonistik fungus olan *T. atroviride*, *T. hamatum* ve *T. harzianum* türlerine karşı etkinlik test edilmiş %30-40'e varan oranlarda engellediği belirlenmiştir (Şekil 5 ve 7). Birçok çalışmada *Trichoderma* suşları demir şelatlayıcı bileşikler olan siderofor da üreteği, *Trichoderma*'nın nişlerden ferrik iyonlarını yakalayarak, *Botrytis cinerea* gibi toprak kaynaklı bitki patojenlerin büyümesini ve aktivitesini engellediği bildirilmektedir (Chet ve Inbar, 1994; Harman vd., 2004). *T. harzianum* türlerinin güçlü biyokontrol aktivitesi olduğu (Alpay Karaoğlu, 2018; Talla vd., 2015) bilinmektedir ancak bu çalışmada *Fusarium*'da *Trichoderma*'nın gelişimini kısmen engelleyebildiği (iki kültürün birbirine karışmayıp bir kesişme zonu oluşturduğu) dolayısıyla *F. oxysporum* YP9B'nin güçlü antifungal aktiviteli metabolitler içerdiğini göstermektedir.

İnsan patojeni *Penicillium* sp. ve *Aspergillus flavus* türlerine karşı *F. oxysporum* YP9B etkiliği belirlenmiş (Şekil 6), bu sonuç önemli bulunmuş olup metabolitlerin saflaştırılması etken maddelerin belirlenmesi antifungal ajan geliştirmede katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Endofitik mantarlar, yüksek bir biyolojik çeşitliliğe sahip olmasının yanı sıra, ilginç biyolojik aktiviteleri olan zengin ve yeni organik bileşik kaynaklarıdır.

Keşfedilmemiş ekolojik kaynakları temsil ederler ve ikincil metabolitlerin, konakçılarıyla etkileşimleri nedeniyle özellikle aktif bileşikler üretmektedirler (Shihabudeen vd., 2010). Pek çok çalışmada *Fusarium* sp. türlerinin ürettiği metabolitlerin antifungal aktivitelerinin olduğu bildirilmekte (Swathi vd., 2013; Manon Mani vd., 2015) olup sonuçlarımızın bu çalışmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

F. oxysporum YP9B'nin uçucu metabolit üretimi *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve sporlu basil olan *B. cereus*'a karşı test edilmiş olup antibakteriyel aktivite gözlenmiş, çalışmanın bu yönden de araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Şekil 8). Ektomikorizal funguslarda antibiyozis; antibiyotiklerin, uçucu ve uçucu olmayan bileşiklerin ve hücre duvarını parçalayan enzimlerin sentez ettiği bildirilmektedir (Mohan vd., 2015). Muhtemelen YP9B suşunun bu metabolitlere benzer uçucu metabolit üretmekte olup üremeyi yavaşlattığı/azalttığı ve pigment oluşumunu engellediği belirlenmiştir. Dolayısıyla bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılarak uçucu metabolit

veya metabolitlerin saflaştırılması ve de karakterize edilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

YP9B suşunun sıvı kültür süzöntüsü insan patojeni kültür koleksiyonu suşlarına karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 10). Değişen kültür koşullarında (farklı karbon ve azot kaynaklarınının kullanımı (Tablo 6), inkubasyon süresi, sıcaklığı, kültürün pH'sı, sıvı ya da katı besiyerleri gibi) elde edilen filtratların insan patojeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermesi YP9B kültür filtratının güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolitler içerdiğini ve çalışmaya değer olduğunu ortaya koymuştur.

F. oxysporum YP9B kültür filtratının ısıya duyarlılığı araştırılmış, antimikrobiyal aktivitenin sıcaklığa (60-90 °C'de) duyarlı olmadığı, dolayısıyla etken ya da etken maddelerin inorganik maddeleri de içerdiği sonucuna varıldı (Tablo 11, Şekil 9). Isı öncesi tüm mikroorganizmalara etki ederken ısı sonrası Gram (+) bakterilere etkili olması bu sonucu düşündürdü.

Küf mantarları ya da funguslar ökaryotik mikroorganizmalar oldukları, hem eşeyli hem de eşeysiz üreme yapılarına sahip olmalarından dolayı kültürleri her pasaj yapıldığında küçük değişiklikler gözlenebilir. Bu değişiklikler çoğalan sporun genetik yapısındaki minör değişimlere veya çevresel faktörlerin etkinliğine bağlı olabilmektedir. Çalışmamızda farklı klonlar pasaj yapıp PDA'nın katı ve sıvı ortamında çoğaltılıp, kültür diskleriyle test edildiğinde her iki ortamda da antimikrobiyal aktivitenin var olduğu, ancak katı ortamda test edilen her üç bakteriye (*E. coli*, *S. aureus* ve *S. aureus* subsp. *aureus*) karşı daha güçlü antimikrobiyal aktive gösterdiği belirlendi (Şekil 10 ve 11, Tablo 12). Aktivitenin test edilen 9 klonda da az çok var oldu ve birbirinden kısmen farklılıklar içerdiği gözlemlendi. Bu sonuç klonlar arasında küçük farklılıkların olabileceğini doğrulamıştır. En güçlü klonların ilk 6 klonun antimikrobiyal aktivitesinin daha iyi olduğu 7, 8 ve 9'un aktivitelerinin birbirine yakın olduğu belirlendi. Klonların bu ayrımı besiyerinde oluşturdukları koloni şekli ve pigment yoğunluğuna göre belirlenmişti. Pigmentin kısmen antimikrobiyal etkinlikle ilişkili olduğu ancak pigmentsiz olan klonların da antimikrobiyal etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

İki farklı katı besiyerinde (PDA ve MEA) üretilerek etil asetat ekstraksiyonu yapılan lizatların hem kalitatif (agar kuyucuk) hem de kantitatif (MİK) değerlere bakıldığında antimikrobiyal etkinlik açısından klonlarda küçük değişikliklerin olduğu gözlenmektedir (Şekil 12). Bütün bu çalışmalar sonucunda klonların genelde benzer olmasına rağmen, antimikrobiyal aktivite açısından küçük de olsa farklılıklar içerdiği kanısına varıldı. Antimikrobiyal aktivite üretimi üzerine besiyeri türünün (karbon, azot ve minimal madde içeriği) etkili olduğu en uygun ortamların PDA katı besiyeri olduğu bulundu (Tablo 13). Dört klondan elde edilen etil asetat ekstraktının geniş spektrumlu ve güçlü antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Tablo 13 ve 14). Agar kuyucuk yöntemine göre Gram (-) bakteriler en duyarlı mikroorganizmalar olduğu ve özellikle *P. aeruginosa*'ya karşı güçlü antipseudomonal aktivitenin varlığı belirlendi. Tayung vd., (2011) *Fusarium solani*'nin bir dizi Gram (+) / (-) bakterilere ve maya mantarlarına karşı 1 mg/ml konsantrasyonun 10-27 mm çapında zon oluşturan metabolitleri ürettiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer sonuçlar alınmış olup en düşük zon çapı 12 mm ile maya mantarlarına, en yüksek zon çapı >25 olarak bakterilere karşı gözlenmiştir.

Klonların MİK değerine bakıldığında en düşük MİK değeri 0,4 ile *M. smegmatis*'te, en yüksek konsantrasyonda (2,9-19,8 µg/ml) ise maya mantarlarında etkinlik belirlendi. Düşük madde konsantrasyonlarında güçlü antimikrobiyal aktivite potansiyel antimikrobiyal madde açısından önemli bulunmuştur. Klon 5'in fiziksel ve kimyasal içerik açısından daha güçlü olduğu sonucuna varıldı ve çalışmanın devamında bu klonla devam edilmesi planlandı. Ayrıca *F. oxysporum* YP9B'nin her bir klonlarının ya da yeni pasaj ile elde edilen kültürlerinin güçlü antimikrobiyal madde ürettikleri, ancak her bir pasajında nispeten küçük de olsa bir değişimin söz konusu olacağı kanısına varılmış olup bu sonuç biyolojik materyallerde olabilecek bir durum olarak kabul edilmektedir.

Sıcaklık mantar büyümesi ve pigmentasyonu için önemli bir özelliktir. *Fusarium* sp. FC1-3 suşu 45 °C'de bile canlılığını koruyabildiği bildirilmektedir. *Fusarium* sp. polar çözücü etil asetat ile ekstrakte edildiğinde kırmızımsı bir pigment oluşturduğu, birçok fungal metabolit/pigmentler polar çözücü etil asetat ile ekstrakte edilebildiği ve en az miktarda ümit verici şekilde antimikrobiyal aktivite göstermiş olması, medikal alanlarda ve quorum sensing aktivite çalışmaları içinde değer taşıyabileceği

bildirilmektedir (Manon Mani vd., 2015). Shihabudeen vd., (2010) yaptıkları çalışmada sıvı besiyerinde 14 gün inkube edilen *F. solani* kültürü etil asetat ile (1;1) ekstrakte edilmiş, içerdiği tanninlerin *E. coli* ve *S. aureus* büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir.

Fusarium spp. cinsi içinde, tüm iklim koşullarında çoğalabilen ve farklı karbon/azot kaynaklarını kullanabilen çok sayıda türü bulunmaktadır. Bazı türleri tarımsal açıdan önemli mahsullere karşı patojenik özellik gösterirken, bazıları da bitki, hayvan ve insan için toksik olan sekonder metabolitler ürettiği bilinmektedir. Funguslar doğada en önemli ayrıştırıcı grup olmaları çok geniş habitatlarda yaşayabilmeleri, farklı karbon ve azot kaynaklarını enerji kaynağı olarak kullanabilmeleri, farklı fiziksel ve kimyasal koşullara kolay adapte olmaları gösterebilmektedir. Çalışmamızda farklı karbon ve azot kaynakları ile kültür edildiğinde (Şekil 13) antimikrobiyal aktivitenin varlığı araştırılmış, karbon azot kaynaklarındaki farklılığın antimikrobiyal aktiviteyi etkilediği sonucuna varılmıştır (Tablo 15). Kültürlerin Şekil 13’de görüldüğü gibi genel olarak iyi üremiş olmasına rağmen aktivitenin düşük olması tartışılabilir bir sonuçtur. Bununla birlikte en uygun besi ortamının mantar kültürleri için ticari hazırlanmış patates dekstrozu besi ortamı olduğu belirlenmiştir. Funguslar doğada sonsuz kaynaklardan dolayı sonsuz büyüme yeteneğine sahipken laboratuvar şartlarında kaynak kısıtlılığı nedeniyle üremelerinin durakladığı bilinen bir gerçektir. *F. oxysporum* YP9B laboratuvar koşullarında optimum üreme süresi 7-10 gün olup antimikrobiyal aktivitenin de bu süre içinde üretildiği, stasyonel (üremenin durduğu) fazda antimikrobiyal aktivitenin artmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç antimikrobiyal etken maddenin kültürün logaritmik üreme fazında oluşturulduğunu göstermektedir.

Tüm denemelerin kültür filtratı antimikrobiyal aktivite testinde kullanılmıştır. Lizatın aslında etil asetat ile ekstre edilip fraksiyonlanmış olsa muhtemelen daha farklı sonuçların alınmış olacağı düşünülmektedir. Ancak çalışmanın bu kısmı iş yükü ve mali külfet nedeniyle ham ekstrakt ya da etil asetat ekstraktı yönünden incelenmiş, bu sonuçlara göre değerlendirme yapılmıştır.

Fathima vd., (2014)’de yaptıkları çalışmada *Fusarium oxysporum* NFX 06 gram pozitif (*S. aureus*) gram negatif bakteri (*E. coli* ve *P. aeruginosa*), küf ve maya mantarları test edilmiş ve hepsine karşı etkinlik gözlenmiştir. Çözücü etkinliğini belirlemek için

yaptıkları çalışmada metanol, etil asetat, aseton ve hekzan kullanılmış, tümünde etkinlik belirlenmesine rağmen en etkili çözücünün etil asetat olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda YP9B'nin kültür filtratının polardan apolara değişen farklı ekstraksiyon kimyasalları (Tablo 17) kullanılarak en uygun ekstraksiyon ve en uygun çözücü kimyasallarının belirlenmesi hedeflendi (Şekil 12). Dolayısıyla etil asetat iyi bir ekstraksiyon kimyasalı olmasıyla birlikte iyi bir çözücü olduğu da belirlendi. Ekstraksiyon süresi açısından bakıldığında ise 24 saat yeterli olabileceği ancak 48 saatin ise daha iyi olduğu gözlemlendi. (Tablo 16, Şekil 14).

Çalışmalarda antimikrobiyal madde üretiminde ve ekstraksiyonunda en uygun koşullar (PDA besiyeri, oda ısısında 48 saat etil asetat ekstraksiyonu) belirlendikten sonra en uygun çözücü araştırıldı (Tablo 17). Antimikrobiyal aktivitenin en uygun olduğu çözücülerin sırasıyla 1-bütanol, etil asetat, metanol ve DMSO olduğu gözlemlendi. Bu sonuç üretilen antimikrobiyal maddelerin polar ve apolar aralıkta birden fazla farklı maddelerin olabileceğini düşündürdü.

Seçilen klonların antioksidan aktiviteleri FRAP ile CUPRAC, radikali temizleme aktivitesi ABTS^{•+} yöntemleriyle incelendiğinde antibakteriyel aktivite gibi klonlarda değişikliğin olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak hem en güçlü antioksidan aktivite hem de en yüksek radikal temizleme gücü sırasıyla 1, 5 ve 6 nolu klonlarda belirlendi (Tablo 18 ve 19, Şekil 15 ve 16). Serbest radikaller oksidatif stres nedeniyle lipidler, proteinler, enzimler, DNA ve membran zararına neden olur. Diyabet, Alzheimer's, Parkinson's, yaşlanma, atherosklerozosis ve inflammatory hastalıklar gibi birçok dejeneratif insan hastalıklarından da sorumludur (Jayanthi vd., 2011; Yadav vd., 2014). Primer ve sekonder metabolit antioksidanların fenolik ve flavonoid bileşikleri, lipid peroksidasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Pawle vd., 2014). Pek çok çalışmada *Fusarium* sp. ve diğer mantar türlerinin anti oksidan aktiviteli madde ürettikleri, etil asetat ile sekonder metabolitlerin ekstraksiyonlarının etkili bir şekilde yapılabildiği bildirilmektedir (Manon Mani vd., 2015; Yadav vd., 2014; Gunasekaran vd., 2017). Çalışmamızda gözlenen antioksidan aktivite değerinin bildirilen çalışmalardaki değerlerle uyumlu olduğu, seçilen klonun 101,173±8,780 µM FeSO₄.7H₂O / mg FRAP değerlerine, 117,640±3,400 µM Trolox / mg TEAC değerleri ve 25 µg/mL ABTS^{•+} de %7,14 µg/mL radikal süpürebilme değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir.

Son 20 yıldır endofit funguslardan antimikrobiyal, insektisidal, sitotoksik ve antikanser gibi biyoaktif özelliği olan birçok değerli bileşikler başarıyla keşfedilmiştir. Bu biyoaktif bileşikler alkaloidler, terpenoidler, steroidler, kinonlar, lignanlar, fenoller ve laktonlar olarak sınıflandırılmıştır (Zhang vd., 2006; Xu vd., 2008). Endofitikler, birçok yeni biyolojik aktif kimyasal yapıların çok amaçlı kaynak olarak görülmektedir. Her yıl birçok endofit değerli ilaç adayı üreten suşlar olarak listeye eklenmektedir. Toprak, mikroorganizmalar için en geniş habitat olmanın yansısı, bunlardan bazıları kültüre edildiğinde kemoterapötik ilaçlarının örneğin; doksorubisin hidroklorür, bleomisin, daunorubisin ve mitomisin üretimi için inanılmaz bir kaynak oluşturduğu görülmüştür (Huang vd., 2006).

Doğal kaynaklı ilaçlar, anti-enfektif ilaç araştırmalarında önemlidir ve günümüzde mevcut klinikte kullanılan birçok antibakteriyel ilaçların yarı sentetik doğal ya da doğal ürünlerin taslaklarından dizayn edilerek kullanılmaktadır. Ticari ürünlerin üretimi için fungusların kullanımı çok eskiye dayanmakta ve bu üretim son 50 yıldır hızla artmış durumdadır. Fungusların uçucu metabolit, mikotoksin, nonribozomal peptitler, poliketidler, terpenler, diketopiperazinler ve alkaloid gibi sekonder bileşiklerin üretimi için geniş bir biyoçeşitliliğe sahip oldukları bilinmektedir (Mohamed, 2004).

Doğal kimyasal maddeler, terapötik ajan kaynağıdır, dolayısıyla sentetik metodolojilerdeki ilerlemeye ve gelişmiş farmakolojik veya farmasötik özelliklere sahip orijinal öncü bileşiklerin analoglarını yapma olasılığına ilham kaynağı olmaktadır. Endofitik mantarlar, yüksek bir biyolojik çeşitliliğe sahip olmasının yanı sıra, ilginç biyolojik aktiviteleri olan zengin ve yeni organik bileşiklerin kaynağıdır. Keşfedilmemiş ekolojik kaynakları temsil ederler ve ikincil metabolitleri, konakçılarıyla etkileşimleri nedeniyle özellikle aktif biyolojik bileşiklerdir.

Birçok *Fusarium* türünün ürettiği çok sayıda sekonder metabolitlerin, bitkilerde ve hayvanlarda farklı fizyolojik ve farmakolojik cevaplara neden olmaktadır. *Fusarium* türlerinin trikotesen mikotoksinlerini ürettiği çok iyi bilinmektedir, ancak bu türler aynı zamanda diğer bileşikleri; pigmentler, antibiyotikler fitotoksinler vb. gibi toksinleri de üretmektedirler (Vesonder ve Hesseltine, 1981).

Doğada aralarında yeni antibiyotikleri üretme potansiyeli bulunan milyonlarca mikroorganizma bulunmaktadır. Klasik tarama yöntemleri ve bilinen antimikrobiyal ajanların kimyasal modifikasyonu, yeni antimikrobiyal ajanlar için potansiyel kaynak oluşturmaktadır. Dirençli mikroorganizmalara karşı aktif olacak yeni antibakteriyel ajanların keşfi ve geliştirilmesi için potansiyel hedeflerin tanımlanması, onaylanması ve kullanılması önemli bir yaklaşımdır. Pratikte kullanılan çok sayıda ajan olmasına rağmen inhibe ettikleri hedeflerin çeşitliliği sınırlıdır. Mevcut antibiyotiklere direnç gelişiminin yaygınlığı yeni ve etkili antimikrobiyal ajanların bulunmasına büyük ölçüde devam edilmektedir. Bu bağlamda hızlı sentez prosesleri ve çok çeşitli biyolojik aktiviteler içeren farklı fito bileşikler içeren polisakkarit bazlı nükleoproteinler de önemle ilgi görmektedir. Yeni kemoterapötik ajanlar bulmak için çeşitli mikrobiyal kökenli kaynakların taranması hâla büyük önem taşımaktadır. Yeni antibiyotik geliştirme sürecinde, laboratuvarında çok sayıda küçük moleküller taranmaktadır. Bu çalışmalar geçmişte çok yoğun olmakla birlikte günümüzde de yeni biyoaktif moleküllerin bulunması için hâlâ önemini korumaktadır. Bizlerin bu çalışmalarda yer alması ve ülkemizdeki biyoçeşitliliğin ekonomiye kazandırılması gibi nedenlerden dolayı benzer çalışmaların yapılması zorunluk arz etmektedir.

Çalışmamızda da YP9B suşu kültür edildiğinde mor turuncu pigment oluşturduğu, uçucu metabolit ve antimikrobiyal aktivite oluşturduğu, antimikrobiyal etkinliğin geniş spektrumlu olduğu ve her bir etkinliğin farklı bir metabolitten kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5. ÖNERİLER

Çalışmamızda izole ve karakterize edilerek *Fusarium oxysporum* YP9B suşunun antimikrobiyal aktivite etkeni madde veya bileşiklerinin yapıları farklı karakterizasyon yöntemleri kullanılarak aydınlatılmalıdır. Etken maddenin kromatografik yöntemlerle saflaştırılarak ve karakterizasyonu yapılmalıdır.

Çalışmamızda Pazar ilçesinde (Rize) sebze yetiştirilen bahçe toprağından izole edilen *Fusarium oxysporum* YP9B izolatının saflaştırılan metabolitlerin antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan aktivite içereğı belirlenmelidir.

Antimikrobiyal etkinlik dozları, sitotoksik, anti-kanser ve anti-viral aktiviteleri belirlenmelidir. Bu çalışmadaki öneriler doğrultusunda, geliştirilerek ilaç olma potansiyeli taşıyan ürünlerinin klinik araştırmalarının bir ön çalışması olabilir.

Bu öneriler dahilinde yeni doğal kaynaklı (antibiyotik vb. etkinlikli) ilaç çalışmalarının AR-GE üretiminde ve yönetiminde ülkemizi uluslararası rekabet gücüne sahip, dünya ihracatından daha fazla pay alan ve dünya ilaç endüstrisinde küresel bir oyuncu haline getirmede küçük de olsa katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Mantarlar ekosistemde dünya çapında dağılan ve hayati bir rol oynayan ve biyoteknolojideki en önemli araçlardan biri olan en büyük mikroorganizma grubudur. Pek çok uygulamada (sanayide, tıpta, tarımda ve çevrede) kullanılabilirler. İkincil metabolit üretme gibi özellikleri medikal tedavi için büyük önem taşımaktadır.

Sekonder metabolitler, bir organizma tarafından üretilen, büyüme, gelişme ve üremeleri için gerekli olan küçük organik moleküllerdir. Organizmanın nişi işğâl etmesine veya yiyecekleri kullanmasına izin vermek için diğer canlı organizmalara karşı çıkma, düşmanlık ve kendini savunma mekanizmalarında rol oynar. Bu amaçla üretilen metabolitlerin potansiyel ilaç kaynağı olabileceğı ve bu nedenle çeşitli türlerde bu ve benzeri metabolitlerin araştırılması ve bilimsel kullanıma sunulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramson, D., Clear, R.M., Gaba, D., Smith, D.M., Patrick, S.K., and Saydak, D., 2001.** Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from Western Canadian wheat. *Journal of Food Production*, 64, 1220-1225.
- Agostini-Costa T.S., Vieira R.F., Bizzo H.R., Silveira D. and Gimenes M.A., 2012.** Secondary Metabolites. 8. *Cilt*, 131-164.
- Alpay Karaoğlu, Ş., Bozdeveci, A., Pehlivan, N., 2018.** Characterization of Local *Trichoderma* spp. as Potential Biocontrol Agents, Screening of in-vitro Antagonistic Activities and Fungisit Tolerance. *Hacettepe Journal of Biology & Chemistry*, 46(2), 247-261.
- Alshannaq A. and Yu J.H., 2017.** Occurrence toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(6), 632-652.
- Alvi, K.A., Rabenstein, J., Woodard, J., Baker, D.D., Bergthold, J.D., Lynch, J., and Braude, I. A., 2002.** 14'-Hydroxymyotoxin B and 16-Hydroxyroridin E, Two New Cytotoxic Trichothecenes from *Myrothecium roridum*. *Journal of Natural Products*, 65(5), 742-744.
- Amalia M.E. and Ramon J.E., 2012.** The Medicinal Chemistry Of (-)-Shikimic Acid. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 1443-1454.
- Amna, T., Puri, S.C., Sharma, J.P., Khajuria, R.K., Musarrat, J., Spitteller, M., and Qazi, G.N., 2006.** Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(3), 189-196.
- Antony, M., Shukla, Y., and Janardhanan, K.K., 2002.** Protective effect of tenuazonic acid against dimethyl benz(a)anthracene-induced skin carcinogenesis in mice. *Teratog Carcinog Mutagen*, 22, 309-314.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E., 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arranz, I., Baeyens, W.R., Weken, G.V., Saeger, S.D., and Peteghem, C.V., 2004.** Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 195-203.
- Bankole, S.A., and Adebajo, A., 2003.** Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology*, 2, 254-263.

- Bargen, S.V., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A.M., Gossmann, M., and Büttner, C., 2009.** Genetic Variability of Phytopathogenic *Fusarium proliferatum* Associated with Crown Rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology*, 157, 446–456.
- Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á., and Bartók, M., 2006.** Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(16), 2447-2462.
- Bartók, T., Tölgyesi, L., Szekeres, A., Varga, M., Bartha, R., Szécsi, A., and Mesterházy, A., 2010.** Detection and characterization of twenty-eight isomers of fumonisin B1 (FB1) mycotoxin in a solid rice culture infected with *Fusarium verticillioides* by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight and ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (1), 35-42.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., and Turck, M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496.
- Beckman, C.H., 1987.** The nature of wilt diseases of plants. APS Press, 175 s.
- Bell, A.A., Wheeler, M.H., Liu, J., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S. and Orta, H., 2003.** United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*: Potential targets for disease control. *Pest Management Science* 59: 736–747.
- Benzie, I.F., and Strain, J.J., 1999.** Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, 15-27.
- Beyoğlu, A.D., ve Omurtag, G.Z., 2003.** Hububat ve bakliyat örneklerinde deoksinivalenol (vomitoksin)'ün yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, İstanbul, 18-19 Eylül 2003.
- Bishop, C.D. and Cooper, R.M., 1983.** An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiological Plant Pathology*, 22, 15-27.
- Bousquet, P.F., Palsen, L.A., Fondy, C., Lipski, K.M., Loucy, K.J., and Fondy, T. P., 1990.** Effects of cytochalasin B in culture and in vivo on murine Madison 109 lung carcinoma and on B16 melanoma. *Cancer Research*, 50(5), 1431-1439.
- Brooth, C., 1971.** The Genus *Fusarium*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Brown, D.W., Butchko, R.A., Busman, M., and Proctor, R.H., 2007.** The *Fusarium verticillioides* FUM Gene Cluster Encodes a Zn(II)₂Cys₆ Protein That Affects

- FUM Gene Expression and Fumonisin Production. *Eukaryotic Cell*, 6(7), 1210-1218.
- Bullerman, L.L., 1997.** *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, 768 s., 419-434.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. and Jensen, R.E., 1994.** MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *The Journal of cell biology*, 126(6), 1375–1391.
- Can, Z., ve Baltas, N., 2016.** Bioactivity and Enzyme Inhibition Properties of *Stevia rebaudiana*. *Current Enzyme Inhibition*, 12, 188-194.
- Chelkowski, J., Gromadzka, K., Wollenweber, Ł., Lenc, L., Kostecki, M., and Berthiller, F., 2012.** Fusarium species, zearalenone and deoxynivalenol content in preharvest scabby wheat heads from Poland. *World Mycotoxin Journal*, 5, 133-41.
- Chet, I. and Inbar, J., 1994.** Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 41(1), 37-43.
- Claridge, C.A., Schmitz, H., and Bradner, W.T., 1979.** Antitumor activity of some microbial and chemical transformation products of anguidine (4,15 diacetoxyscirpene-3-ol. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2, 181-182.
- CLSI M24-A, 2003.** Susceptibility testing of *Mycobacteria nocardiae*, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard. CLSI., Pennsylvania, 1. edition, 61 s.
- Cortinovis C., Pizzo F., Spicer L.J. and Caloni F., 2013.** Fusarium mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals—A review. *Theriogenology* 80(6), 557-564.
- Creppy, E.E., 2002.** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19-28.
- D’Mello, J.P., Macdonald, A.M., Postel, D., and Hunter, E.A., 1997.** 3-Acetyl deoxynivalenol production in a strain of *Fusarium culmorum* insensitive to the fungicide difenoconazole. *Mycotoxin Research*, 13, 73–80.
- D’Mello, J., Placinta, C., and Macdonald, A., 1999.** Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 183–205.
- Daboussi, M.J. and Capy, P., 2003.** Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology*, 57, 275-299.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. and Figueras, M.J., 2000.** *Atlas of Clinical Fungi*. Amer Society for Microbiology, 1160 s.

- Demain, A.L., and Sanchez, S., 2009.** Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62, 5-16.
- Deshpande, S.S., 2002.** Handbook of Food Toxicology. New York: Marcel Dekker, 920 s.
- Desjardins A.E., 2006.** Fusarium mycotoxins chemistry, genetics and biology. APS Press, 260 s.
- EC, 1999.** Opinion on the relationship between the use of plant protection products on food plants and the occurrence of mycotoxins in foods. Scientific committee on plants. Brussel.
- EFSA., 2004.** Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA Journal*, 89, 1-35.
- Essery, J.M., O'Herron, F.A., McGregor, D.N., and Bradner, W.T., 1976.** Preparation and antitumor activities of some derivatives of 5-methoxysterigmatocystin. *Journal of Medicinal Chemistry*, 19, 1339-1342.
- EUCAST., 2014.** Disk Difüzyon Yöntemi. Sürüm 5.
- Eyberger, A.L., Dondapati, R., and Porter, J.R., 2006.** Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*, 69(8), 1121-1124.
- Fleming, A., 1929.** On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226-236.
- Freeman, S., M. Maimon and Y. Pinkas, 2000.** Etiology of mango malformation disease using GUS transformants of *Fusarium subglutinans*. *Acta Horticulturae*, 509, 751-758.
- Gao, L., Huang, J., and Li, J., 2007.** Fermentation conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* endophytic fungus on production of podophyllotoxin. *Food and Fermentation Industries*, 33, 28-32.
- Garda J., Macedo R.M., Faria R., Bernd L., Dors G.C. and Badiale-Furlong E., 2005.** Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. *Food Control*, 16(5), 423-428.
- Gerlach, W. and Nirenberg, H., 1982.** The genus *Fusarium*-a pictorial atlas. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, 209, 1-406

- Girgin, G., Başaran, N., ve şahin, G., 2001.** Dũnyada ve Tũrkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. Tũrkiye Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 58, 97 - 118.
- Gordon, T.R., 1993.** The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International, 350 s., 217-224.
- Gordon, T.R. and Martyn, R.D., 1997.** The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Review of Phytopathology, 35, 112-128.
- Gunasekaran, S., Sathiavelu, M., and Arunachalam, S., 2017.** In vitro antioxidant and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Mussaenda luteola*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 7(8), 234-238.
- Gũrsoy, N., ve Biçici, M., 2003.** ukurova’da buğday ve mısır őrũnlerinde saptanan fungal infeksiyonlar ve sonulanan bazı mikotoksinler. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, İstanbul, 18-19 Eylũl 2003.
- Han, H.C., Lindequist, U., Hyun, J.W., Kim, Y.H., An, H.S., and Lee, D.H., 2004.** Apoptosis induction by 4beta-acetoxyscirpentiol from *Paecilomyces tenuipes* in human leukaemia cell lines. Pharmazie, 59, 42-49.
- Harley, J.L., 1934.** Some critical experiments upon culture methods used for fungi. New Phytol, 33, 372-385.
- Harman, G., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., 2004.** *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2(1), 43-56
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E. and Garcia-Acha, I., 2000.** Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology, 1890-1898.
- Hermosa, M.R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaıno, J.A., Grondona I. and Monte, E., 2004.** Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycological Research 108, 897-906.
- Holliday, P., 1998.** A Dictionary of Plant Pathology, Cambridge University Press, 560 s.
- Huang, Y.J., Wang, J.F., Li, G.L., Zheng, Z.H., and Su, W.J., 2006.** Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 31(2), 85-167.
- Hussein, H.S., and Brasel, J.M., 2001.** Toxicity metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167, 101-134.

- Igarashi, Y., Yabuta, Y., Sekine A., Fujii, K., Harada, K., and Oikawa, T., 2004.** Directed Biosynthesis of Fluorinated Pseurotin A, Synerazol and Gliotoxin. *The Journal of Antibiotics*, 57, 748-754.
- Jayanthi, G., Kamalraj, S., Karthikeyan, K., and Muthumary, J., 2011.** Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. GJJM07 isolated from *Mesua ferrea*. *International Journal of Current Science*, 1, 85-90.
- JECFA, 2001.** Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth meeting, Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives, Geneva, 6-15 Şubat 2001.
- Joffe, A.Z., 1986.** *Fusarium Species: Their Biology and Toxicology*. John Wiley & Sons Inc., 588 s.
- Kabak, B., and VAR, I., 2005.** *Fusarium Toksinleri*. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi*, 8, 30-42.
- Kaneko, T., Schmitz, H., Essery, J.M., Rose, W., Howell, H.G., and O'Herron, F.A., 1982.** Structural modifications of anguidin and antitumor activities of its analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25, 579-589.
- Kasap, Y., 2018.** Rize'de domates fideleri ve topraklarından *Fusarium* ile *Trichoderma* spp. suşlarının izolasyonu ve biyokontrol aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Feb Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 132 s.
- Keller, N.P., Turner, G., and Bennett, J.W., 2005.** Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937-947.
- Kinderman, P., Dunbar, R., and Bentall, R.P., 1998.** Theory-of-mind deficits and causal attributions. *British Journal of Psychology*, 89(2), 191-204.
- Kishore, R., Pandey, M., Dubey, K., and Kumar, Y., 2009.** Effect of Temperature and pH on Growth and Sporulation of *Fusarium moniliforme* V. *subglutinans* Wr. and Rg., The Causal Organism of Wilt of Maize. *Biology Journal*, 4, 75-78.
- Kokkonen, M., Olaja, L., Parikka, P., and Jestoi, M., 2010.** Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 17-25.
- Kour, A., Shawl, A.S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P.H., Suden, P., and Verma, V., 2008.** Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1115-1121.
- Kusari, S., Lamshoft, M., and Spitter, M., 2009a.** *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of

- the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1019-1030.
- Kusari, S., Zuhlke, S., Kosuth, J., Cellarova, E., and Spittler, M., 2009b.** Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 72, 1825-1835.
- Leoni, L.A., and Soares, L.M., 2003.** Survey of moniliformin in corn cultivated in the State of Sao Paulo and in corn products commercialized in the city of Campinas. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 13 -15.
- Leslie, J.F., and Summerell, B.A., 2006.** *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, 388 s.
- Logrieco, A., Moretti, A., Ritieni, A., Caiaffa, M.F., and Macchia, L., 2002.** Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation. Springer, 280 s., 23-30.
- Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Lamprecht, S. C. and Crous P.W., 2019.** Epitypification of *Fusarium oxysporum*- clearing the taxonomic chaos. *Persoonia*, 43, 1 - 47.
- López-Berges M.S., Hera C., Sulyok M., Schäfer, K., Capilla, J., Guarro, J, and Di Pietro, A., 2013.** The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Microbiology*, 87, 49–65.
- López-Díaz, C., Rahjoo, V., Sulyok, M., Ghionna, V., Martín-Vicente, A., Capilla, J., Di Pietro, A. and López-Berges M.S., 2018.** Fusaric acid contributes to virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Plant Pathology*, 19, 440–453.
- Macher J., 1999.** *Bioaerosols: assessment and control*. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 322 s.
- Manici L.M. Caputo F. and Saccà M.L., 2017.** Secondary metabolites released into the rhizosphere by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium* spp., as underestimated component of nonspecific replant disease. *Plant and Soil*, 415, 85–98.
- Manon Mani, V., Shanmuga, P., Dhaylini, M.S. and Preethi, K., 2015.** Antioxidant and Antimicrobial Evaluation of Bioactive Pigment from *Fusarium* sp Isolated from Stressed Environment. *International Journey of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(6), 1147-1158.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A., 1984.** *Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press, 328 s.

- Martinez-Nunez M.A. and López V.E.L., 2016.** Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*, 4(13), 1-8.
- Mateo, J.J., Mateo, R., Hinojo, M.J., Llorens, A. and Jimenez, M., 2002.** Liquid chromatographic determination of toxicogenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *Journal of Chromatography A*, 955, 245-256.
- Mateoa, J., Mateob, R., and Jiménez, M., 2002.** Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 115–123.
- Maymon, M., Minz, D., Barbul, O., Zveibil, A., Elad, Y., & Freeman, S., 2004.** Note: Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica*, 32(4), 370-375.
- Meca, G., Sospedra, I., Soriano, J. M., Ritieni, A., Valero, M. A., and Manes, J., 2009.** Isolation, purification and antibacterial effects of fusaproliferin produced by *Fusarium subglutinans* in submerged culture. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2539-2543.
- Meca, G., Zinedine, A., Blesaa, J., Fonta, G., and Mañesa, J., 2010.** Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1412–1416.
- Menteşe, E., Yılmaz, F., Baltaş, N., Bekircan, O., and Kahveci, B., 2015.** Synthesis and antioxidant activities of some new triheterocyclic compounds containing benzimidazole, thiophene, and 1,2,4-triazole rings. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(3), 435-441.
- Merlin, J.N., Nimal, I. V., Christhuda, S., Praveen, K.P., and Agastian, P., 2013.** Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(3), 98-103.
- Mestichelli, P., Scott, M.J., Galloway, W.R., Selwyn, J., Parker, J.S., and Spring, D. R., 2013.** Concise Copper-Catalyzed Synthesis of Tricyclic Biaryl Ether-Linked Aza-Heterocyclic Ring Systems. *Organic Letters*, 15, 5448-5454.
- Mirocha C.J., Abbas H.K., Kommedahl T. and Jarvis B.B., 1989.** Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 254-255.
- Mohamed, H.F., 2004.** Exploiting genomics to identify secondary metabolic pathways in *Aspergillus fumigatus*. *Doktora Tezi*. University of Sheffield.
- Mohamed, H.F., 2012.** Molecular analysis and anticancer properties of two identified isolates, *Fusarium solani* and *Emericella nidulans* isolated from Wady El-Natron

- soil in Egypt against Caco-2 (ATCC) cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(11), 863-869.
- Mohan, V., Nivea, R. and Menon, S., 2015.** Evaluation of ectomycorrhizal fungi as potential biocontrol agents against selected plant pathogenic fungi. *Journal of Artificial Intelligence Research*, 3(9), 408-412.
- Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., and Geiger, H.H., 1992.** A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115-6116.
- Molnár, A., Sulyok, L. and Hornok, L., 1990.** Parasexual recombination between vegetatively incompatible strains in *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research*, 94, 393-398.
- Moss, M.O., 2002.** Mycotoxin review: 2. *Fusarium Mycologist*, 16, 158-161.
- Muller, P., Buu-Hoi, N., and Rips, R., 1959.** β -Cyanoethylation of phenoxazine and 7H-benzo[c]phenothiazine. *Journal of Organic Chemistry*, 24, 1699-1701.
- Musavi, S.F., and Balakrishnan, R.M., 2014.** A Study on the Antimicrobial Potentials of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *Journal of Medical and Bioengineering*, 3, 162-166.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J., (1981).** *Fusarium Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, 474 s.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. (1983).** *Fusarium Species, An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, 206 s.
- O'Donnell, K., 1996.** Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. *Sydowia*, 48, 57-70.
- Olmedo-Monfil, V. and Casas-Flores, S., 2014.** *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, ISBN: 9780444595768, 549 s., 429-453.
- Ono, M., Sakuda, S., Suzuki, A., and Isogai, A., 1997.** Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production by aflatoxigenic fungi. *The Journal of Antibiotics*, 50(2), 111-118.
- Özen, H.Ç., ve Başhan, M., 2003.** The composition of fatty acids in *Hypericum scabrum*, *H. scabroides* and *H. amblysepalum*. *Turkish Journal Of Chemistry*, 27, 723-725.
- Özkaya, Ş., ve Aşkın, O., 1994.** Mısırdaki zearalenone oluşumu üzerine araştırmalar. *Gıda*, 19, 339-344.

- Pagnussatt, F.A., Ponte, E.M., Garda-Buffon, J., and Badiale-Furlong, E., 2014.** Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* spp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 108, 21–26.
- Patriarca A. and Pinto V.F., 2017.** Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14(1), 50-60.
- Pawle, G., and Singh, S.K., 2014.** Antioxidant potential of endophytic fungus *Colletotrichum* species isolated from *Polygala elongate*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(3), 313-319.
- Pegg, G.F., 1985.** Presidential address. Life in a black hole- the micro-environment of the vascular pathogen. *Transactions of the British Mycological Society*, 85, 1-20.
- Perez, C., Suarez, C. and Castro, G.R., 1992.** Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. *Journal of Biotechnology*, 26(2-3), 331-336.
- Pitt, J. I., 2000.** Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 1, 17-22.
- Placinta, C., D’Mello, J., and Macdonald, A., 1999.** *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 183–205.
- Prange, A., Biezelle, B., Kramer, J., Meier, H., Modrow, H., and Köhler, P., 2005.** *Fusarium*-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control*, 16, 739-745.
- Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Riyaz-Ul-Hasan, S., Amna, T., and Sagar, R., 2006.** The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, 122, 494-510.
- Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., and Spiteller, M., 2005.** An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products*, 68, 1717-1719.
- Pusztahelyi, T., Holb, I.J. and Pócsi, I., 2015.** Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-573.
- Rabie, C.J., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Lubben, A., and Vleggaar, R., 1982.** Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 517-521.
- Ramu, A., Yagen, B., and Ramu, N., 1989.** The cytotoxicity of T-2 toxin and related 12,13-epoxytrichothecenes to Adriamycin-sensitive and resistant P388 leukemia cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 24, 264-267.

- Re, R., Pellegrini, N., Prolegente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reader, U., and Broda, P., 1985.** Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17-20.
- Rehman, S., Shawl, A.S., Kour, A., Andrabi, R., Sudan, P., Sultan, P., and Qazi, G. N., 2008.** An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 203-209.
- Renda, G., Kalaycı, Y., Korkmaz, B., Alpay Karaoğlu, Ş., ve Yaylı, Y., 2017.** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five *Scrophularia* L. Species from Turkey. *Records of Natural Products*, 11(6), 521-531.
- Rheeder, J.P., Marasas, F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., and Van Schalkwyk, D.J., 1992.** *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82, 353-357.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F., and Vismer, H.F., 2002.** Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2101-2105.
- Royse, D.J., and Ries, S.M., 1978.** Detection of *Cytospora* species in twig elements of peach and its relation to the incidence of perennial canker. *Phytopathology*, 68, 663-667.
- Ryu, D., Hanna, M.A., and Bullerman, L.B., 1999.** Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection*, 62, 1482-1484.
- Salem, H., 2003.** Issues in chemical and biological terrorism. *International Journal of Toxicology*, 22, 465-471.
- Samuels, G.J., Nirenberg, H.I. and Seifert, K.A., 2001.** *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, 408 s., 1-14.
- Schippers, B. and van Eck, W.H., 1981.** *Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy. Pennsylvania State University Press, 457 s., 250-260.
- Schollenberger, M., Jara, H.T., Suchy, S., Drochner, W. and Müller, H.M., 2002.** *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 85-89.
- Schollenberger, M., Müller, H.M., Ruffle, M., Suchy, S., Planck, S., and Drochner, W., 2004.** Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 317-326.

- Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Krivobok, S., Beriel, H., and Benoit-Guyod, J.L., 1992.** Antitumor activity of patulin and structural analogs. *Pharmazie*, 288-291.
- Shen B., 2003.** Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285-295.
- Shihabudeen, M.S., Priscilla, H.B., and Thirumurugan, B.K., 2010.** Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(10), 430-434.
- Shukla, S., Harshita, S., and Pandey, A.K., 2014a.** Screening of some Phytopathogenic fungi for their antimicrobial potential. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 2478-2494.
- Shukla, S., Shukla, H., and Pandey, A.K., 2014b.** Optimization of various parameters for production of antimicrobial compounds by *Fusarium roseum* FGCC61. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(12), 890-905.
- Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B.T., Priti, V., Mohana, K.P., Ravikanth, G., and Uma, S.R., 2010.** Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, 71(1), 117-122.
- Siddiquee, S., Cheong, B.E., Taslima, K., Kausar, H., and Hasan, M.M., 2012.** Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science*, 50(4), 358-367.
- Siddiquee, S., Yusuf, U.K., Hossain, K., and Jahan, S., 2009.** In vitro studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 7(3-4), 970-976.
- Singha, I.M., Kakoty, Y., Unni, B.G., Das, J. and Kalita, M.C., 2016.** Identification and characterization of *Fusarium* spp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 14(1), 99-105.
- Srobarova, A., Moretti, A., Ferracane, R., Ritieni, A., and Logrieco, A., 2002.** Toxigenic *Fusarium* species of *Liseola* section in pre-harvest ear rot and associated mycotoxins in Slovakia. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 299-306.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S.J., 1995.** Principles of Fermentation Technology. Elsevier Science Ltd., 803 s., 93-122.
- Stępień, Ł., Gromadzka, K., and Chelkowski, J., 2012.** Polymorphism of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. *Journal of Applied Genetics*, 53, 227-236.

- Stillings, M.R., Freeman, S., Myers, P.L., Readhead, M.J., Welbourn, A.P., Rance, M.J., and Atkinson, D.C., 1985.** Substituted 5H-dibenz[b,g]-1,4-oxazocines and related amino acids with antiinflammatory activity. *Journal of Medical Chemistry*, 25 (2), 225-233.
- Strobel, G.A., and Daisy, B., 2003.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67, 491-502.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., and Govindarajulu, M.B., 2009.** Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Review*, 23, 9-19.
- Summerell B.A. and Leslie J.F., 2011.** Fifty years of fusarium: How could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*, 50(1), 135-144.
- Swathi, J., Sowjanya, K.M., Narendra, K., and Satya, A.K., 2013.** Bioactivity Assay of an Isolated Marine Fusarium sps. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 5, 179-186.
- Sweeney, M.J., and Dobson, A.D., 1998.** Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158.
- Talla, S.G., Raju, A.S.R., Karri, S. and Kumar, Y.S., 2015.** Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on pathogenic microorganisms (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium*, *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*). *African Journal of Biotechnology*, 14, 668-675.
- Tatar, E., Şenkardeş, S., Sellitepe, H.E., Küçükgül, Ş.G., Alpay Karaoğlu, Ş., Bozdeveci, A., ve Küçükgül, İ., 2016.** Synthesis, and prediction of molecular properties and antimicrobial activity of some acylhydrazones derived from N-(arylsulfonyl) methionine. *Turkish Journal Of Chemistry*, 40, 510-534.
- Tayfur, M., 2002.** Mikotoksinler ve Karsinojenik Etkileri. Mikotoksinler ve Karsinojenik Etkileri, Ankara, 31 Mart 2002.
- Tayung, K., Barik, B., Jha, D., and Deka, D., 2011.** Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*, 2, 203-213.
- Tejesvi, M.V., Kini, K.R., Prakash, H.S., Subbiah, V., and Shetty, H.S., 2007.** Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity*, 24, 37-54.
- Teunissen, H.A.S., Verkooijen, J., Cornelissen, B.J.C. and Haring, M.A., 2002.** Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268, 298-310.

- Thakur, D.B., Bora, T.C., Bordoloi, G.N., and Mazumdar, S., 2009.** Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal de Mycologie Médicale*, 19(3), 161-167.
- Tunail, N., 2000.** *Funguslar ve Mikotoksinler*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, 522 s.
- Uçkun, Z., and Yıldız, M., 2003.** Hububatta *Fusarium* spp.'nin neden olduğu sorunlar; buğdayda başak yanıklığı mısırdaki koçan çürüklüğü. *Mikotoksinler Biyoteknolojisi; Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı*, İzmir, 17-20 Haziran 2003.
- URL-1, 2016.** <https://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium> (2 Şubat 2016)
- URL-2, 2019.** <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF546964A517F1BA6F> (7 Ağustos 2019)
- URL-3, 2018.** <https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table> (10 Eylül 2018)
- van Egmond, H.P., and Jonker, H.P., 2006.** Regulations for mycotoxins in food: focus on the European Union and Turkey. *Arı Special Issue*, 54, 1-17.
- Vaz, A., Mota, R., Bomfim, M., Vieira, M., Zani, C., and Rosa, L., 2009.** Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(12), 1381-1391.
- Vesonder, R. F., Hesseltine, C. W., 1981.** *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press., 027100293X, 457 s., 350-364.
- Vigushin, D.M., Mirsaidi, N., Brooke, G., Sun, C., Pace, P., and Inman, L., 2004.** Gliotoxin is a dual inhibitor of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I with antitumor activity against breast cancer in vivo. *Medical Oncology*, 21, 23-30.
- Visconti, A., and Pascale, M., 1998.** Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 815, 133-140.
- Vizcaíno, J.A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutiérrez, S., Hermosa, R. and Monte, E., 2005.** Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*, 109(12), 1397-1406
- von Bargen, S.V., Martinez, O., Schadock, I., Eisold, A. M., Gossmann, M., and Büttner, C., 2009.** Genetic Variability of Phytopathogenic *Fusarium proliferatum* Associated with Crown Rot in *Asparagus officinalis*. *Journal of Phytopathology*, 157, 446-456.

- Waškiewicz, A., Golinski, P., Karolewski, Z., Irzykowska, L., Bocianowski, J., Kostecki, M., and Weber, Z., 2010.** Formation of fumonisins and other secondary metabolites by *Fusarium oxysporum* and *F. proliferatum*: a comparative study. *Food Additives and Contaminants*, 27(5), 608-615.
- Waškiewicz A., Stępień Ł., 2012.** Mycotoxins Biosynthesized By Plant-Derived *Fusarium* Isolates. *Arh Hig Rada Toksikol*, 63, 437-446.
- Webster, J., and Weber, R.W., 2007.** *Introduction of Fungi*. Cambridge University Press, 841 s., 343-348.
- White, J.F., and Bacon, C.W., 2000.** *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, 500 s.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W., 1990.** *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, 482 s., 315-322.
- Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E., 2008.** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.
- Wollenweber, H.W., 1931.** *Fusarium-Monographie. Fungi parasitici et saprophytici*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 260-516.
- World Health Organization-International Agency For Research On Cancer (WHO-IARC), 1993.** *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, 9-16 Şubat 1993.
- Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., and Jiang, W., 2008.** Recent studies on the antimicrobial compounds produced by plant endophytic fungi. *Natural Product Research and Development*, 20, 731-740.
- Yadav, M., Yadav, A., and Yadav, J.P., 2014.** In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 256-261.
- Yazıcıoğlu, D. ve Omurtag, G.Z., 2003.** Hububat ve bakliyat ürünlerinde T-2 toksinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile araştırılması. *Ulusal Mikotokin Sempozyumu*, İstanbul, 18-19 Eylül 2003.
- Yılmaz, F., Mentşe, E. ve Baltaş, N., 2017.** Synthesis and Antioxidant Evaluation of Some Novel Benzimidazole Derivatives Containing a Triazole Nucleus. *Letters in Drug Design & Discovery*, 14(2), 201-208.
- Zhang, H., Song, Y., and Tan, R., 2006.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 23 (5), 753–771.
- Zhang, H., Sun, X., and Xu, C., 2016.** Antimicrobial Activity of Endophytic Fungus *Fusarium* sp. *Archives of Biological Sciences*, 68, 25-30.

Zhang, W., and Zang, D., 2013. Recent advances of secondary metabolites in genus *Fusarium*. *Plant Physiology Journal*, 49(3), 201-216.



ÖZGEÇMİŞ

Gökhan Veyisoğlu, 10/02/1992 tarihinde Çayeli’de doğdu. İlköğretimini 2006 yılında Rize ilinin Pazar ilçesinde Yaşar Medine Haberal İlköğretim Okulu’nda ve Ortaöğretimini 2010 yılında Rize ilinin Pazar ilçesinde Necat Sağbaş Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 18/06/2010 tarihinde başladığı lisans eğitimini 11/06/2014 tarihinde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde 2,40 derecesi ile tamamladı. 2014 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. 2017 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesinde Bilgisayar Mühendisliği Bölümü’nde başladığı lisans öğrenimi halen devam ettirmektedir.