

Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinin Biyoaktif Metabolitleri Açısından  
Taranması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Elif Özlü Namlı

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2018

Screening of Bioactive Metabolites on *Aspergillus spp.* from Hypersaline Environments and  
Optimization of Production Conditions

Elif Özlü Namlı

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Biology

Aug. 2018

Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinin Biyoaktif Metabolitleri Açısından  
Taranması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Elif Özlü Namlı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Semra İlhan

Ağustos 2018

## ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Elif Özlü Namlı'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinin Biyoaktif Metabolitleri Açısından Taranması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca oybirliği ile değerlendirilerek kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Semra İlhan

**İkinci Danışman:** -

**Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:**

**Üye:** Prof. Dr. Semra İlhan

**Üye:** Prof. Dr. Cansu Filik İşçen

**Üye:** Doç. Dr. Rasime Demirel

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN

Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Semra İLHAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Tuzlu Ortamlardan İzole Edilen *Aspergillus* Türlerinin Biyoaktif Metabolitleri Açısından Taranması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 09/08/2018

Elif Özlü Namlı

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, hipersalin ortamlara adapte olmuş mikrofungus izolatlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi açısından taranarak etkin metabolit üreticileri belirlemek ve üretim koşullarını istatistiksel tasarım yöntemleriyle ortaya koymaktır.

İlk olarak 300 fungal izolat in vitro antioksidan ve antimikrobiyal aktivite açısından basit yöntemlerle taranmıştır. Antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteyi değerlendirmek için DPPH serbest radikal süpürücü aktivite tayin yöntemi ve agar blok difüzyon testi kullanılmıştır.

*Aspergillus* izolatlarının sıvı kültürde 27°C'de 7 günlük inkübasyon sonucunda elde edilen filtratların etil asetat özütlerine antioksidan ve antimikrobiyal aktivite testleri uygulanarak ikinci defa taranmıştır. Bulgular, denenmiş diğer cinslere göre daha fazla oranda *Aspergillus* ve *Penicillium* türünün etkili metabolitler ürettiğini destekleyici yöndedir.

Tarama sonuçlarına göre seçilen CT 4.24 kodlu *Aspergillus clavatus* izolatının etkin metabolit üretim koşulları istatistiksel yöntemlerden sırasıyla Plackett Burman ve Full faktöriyel tasarım kullanılarak optimize edilmiştir. *A. clavatus* ile metabolit üretiminde sükroz ve peptonun önemli besiyeri bileşenleri olduğu, sükrozun denenen 30 ve 50 g/l konsantrasyonlarının etken madde üretimini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda yapılan üretim sonucu elde edilen etil asetat özütünün serbest radikal süpürücü aktivitesi %94,40 (DPPH) ve minimum inhibisyon konsantrasyonları ise *S. aureus* ATTC 29213 için 62,5 µg/ml, *E. coli* ATTC 25922 için 125 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Sonuçlar hipersalin ortamlardan izole edilen halotolerant/halofilik funguslar tarafından üretilen metabolitlerin yeni doğal antioksidan ve antimikrobiyal bileşiklerin potansiyel kaynağı olabileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan aktivite, antibakteriyel aktivite, antifungal aktivite, funguslar, MİK.

## SUMMARY

The purpose this study is to identify the producers of effective metabolites by screening antioxidant and antimicrobial activities of microfungi isolates adjusted to hypersaline media and to reveal production conditions by statistical design methods.

Firstly, 300 fungal isolates were screened in vitro for antioxidant and antimicrobial activity by simple methods. DPPH free radical scavenging activity determination assay and agar block diffusion assay were used to evaluate antioxidant and antimicrobial activity.

*Aspergillus* isolates were screened twice by applying antioxidant and antimicrobial activity tests on ethyl acetate extracts of filtrates obtained in liquid culture at 27° C for 7 days as a result of incubation. The findings support the more effective metabolites of *Aspergillus* and *Penicillium* species compared to other genus tested.

The effective metabolite production conditions of CT 4.24 coded *Aspergillus clavatus* isolates selected by screening results were optimized using statistical methods, Plackett Burman and Full factorial design, respectively. It has been understood that sucrose and peptone are important nutrient components in the production of metabolites by *A. clavatus*, and sucrose concentrations of 30 and 50 g/l are effective in the production of active ingredients positively. The minimum inhibitory concentrations of the ethyl acetate extract obtained from the determined optimum conditions were 62.5 µg / ml for *S. aureus* ATTC 29213, and 125 µg / ml for *E. coli* ATTC 25922.

The results reveal that metabolites produced by halotolerant/halophilic fungi isolated from hypersaline environments can be a potential source of novel natural antioxidant and antimicrobial compounds.

**Keywords:** Antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity, fungi, MIC.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresinde bilgi ve deneyimi ile her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semra İLHAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca destek ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Cansu FİLİK İŞCEN'e, Doç. Dr. Arzu ALTIN YAVUZ'a ve Öğr. Gör. Dr.Bükay YENİCE GÜRSU'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan ve çalışmalarımın tüm aşamalarında emeği geçen Yunus Emre ELMA, Gamze TUNCA, Çağla UYGUN ve Kübra KOÇ'a teşekkür ederim.

Bana olan inançları ve destekleriyle her zaman yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren sevgili aileme, eşime ve bir tanecik oğluma sonsuz teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiv
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	3
2.1. Fungusların genel özellikleri .....	3
2.1.1. Fungusların ekolojisi .....	4
2.1.2. Fungusların sınıflandırılması .....	6
2.2. Esktrem ortamlarda bulunan funguslar .....	7
2.3. Halotolerant ve Halofilik funguslar .....	9
2.4. Antioksidanlar bileşikler.....	10
2.4.1. Antioksidanların sınıflandırılması .....	11
2.4.1.1. <u>Doğal antioksidanlar</u> .....	11
2.4.1.2. <u>Sentetik antioksidanlar</u> .....	12
2.5. Antimikrobiyal bileşikler .....	13
2.5.1. Antimikrobiyal aktivite belirleme yöntemleri .....	13
2.5.1.1. <u>Agar disk difüzyon yöntemi</u> .....	13
2.5.1.2. <u>Antimikrobiyal gradyan yöntemi (E-test)</u> .....	13
2.5.1.3. <u>Diğer difüzyon yöntemleri</u> .....	14
2.6. Deneysel tasarım .....	15
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	18
3.1. Materyal .....	18
3.1.1. Fungal kültürler ve test organizmaları .....	18
3.1.2. Besiyerleri.....	19
3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler .....	23

**İÇİNDEKİLER (devam)****Sayfa**

3.2. Yöntem .....	24
3.2.1. Antioksidan aktivite tarama testi .....	24
3.2.2. Antimikrobiyal aktivite testi .....	25
3.2.3. Fungal metabolitlerin ekstraksiyonu .....	26
3.2.4. Mikrofungus izolatlarının morfolojik özelliklerine göre tanımlanması.....	26
3.2.5. Deneysel tasarım .....	27
3.2.6. MİK (Minimum inhibisyon değeri) .....	29
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
4.1. Antioksidan aktivite açısından izolatların taranması.....	32
4.2. Antimikrobiyal aktivite açısından izolatların taranması.....	34
4.3. Fungus izolatlarının tanımlanması .....	37
4.4. Kısmi saflaştırma ve değerlendirme.....	43
4.5. Deneysel tasarım bulgularının değerlendirilmesi. ....	49
4.6. Çok etmenli (full faktöriyel) değerleri .....	54
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>64</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. 96 kuyucuklu mikrolaka .....	30
4.1. <i>Aspergillus versicolor</i> , MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27°C'deki ve CYA37 besiyerinde 37°C'deki 7 günlük koloni görüntüleri .....	37
4.2. <i>Aspergillus terreus</i> , MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27°C'deki ve CYA37 besiyerinde 37°C'deki 7 günlük koloni görüntüleri .....	38
4.3. <i>Aspergillus clavatus</i> , MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27°C'deki ve CYA37 besiyerinde 37°C'deki 7 günlük koloni görüntüleri .....	39
4.4. <i>Aspergillus fumigatus</i> , MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27°C'deki ve CYA37 besiyerinde 37°C'deki 7 günlük koloni görüntüleri .....	40
4.5. <i>Aspergillus sydowii</i> , MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27°C'deki ve CYA37 besiyerinde 37°C'deki 7 günlük koloni görüntüleri .....	41
4.6. <i>Aspergillus awamori</i> , MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27°C'deki ve CYA37 besiyerinde 37°C'deki 7 günlük koloni görüntüleri .....	42
4.7. <i>Aspergillus</i> türlerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	46
4.8. <i>Aspergillus</i> türlerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	46
4.9. <i>Aspergillus</i> türlerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	47
4.10. <i>Aspergillus</i> türlerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	47
4.11. <i>Aspergillus</i> türlerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	48
4.12. <i>Aspergillus</i> türlerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	48
4.13. Vancomycin, cephalothin, flukanazol kontrol antibiyotiklerinin <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> ve <i>C.albicans</i> 'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki .....	49
4.14. Plackett- Burman deneysel tasarımındaki filtratların DPPH radikalini süpürücü etkisi .....	55
4.15. Plackett-Burman deney tasarımındaki standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği ....	53
4.16. Sukroz – Pepton konsantrasyonu etkileşim profil grafiği .....	56
4.17. Sukroz – NaCl konsantrasyonu etkileşim profil grafiği .....	57
4.18. Pepton –NaCl konsantrasyonu etkileşim profil grafiği .....	58

**ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.19. <i>S. aureus</i> ile yapılan MİK belirleme plağı görüntüsü.....	59
4.20. <i>E. coli</i> ile yapılan MİK belirleme plağı görüntüsü .....	60
4.21. <i>C. albicans</i> ile yapılan MİK belirleme plağı görüntüsü .....	61

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. $3^k$ çok etmenli deney sayısı tablosu .....	16
2.2. $3^3$ çok etmen deneme bileşimleri .....	16
3.1. Çalışmalarda kullanılan standart bakteri ve maya suşu .....	18
3.2. Plackett – Burman deney tasarımı ile seçilen değişkenler ve seviyeleri .....	27
3.3. Plackett – Burman’da matriks tarama deneyleri .....	28
3.4. Full faktöriyel deney tasarımında kullanılacak değişken ve seviyeleri .....	29
3.5. Full faktöriyel deney tasarımındaki tarama deneyleri .....	29
4.1. 300 izolattan %60’ın üzerinde inhibisyon gösteren izolatlar ve antioksidan aktiviteleri .....	33
4.2. İncelenen izolatların antimikrobiyal aktivite potansiyellerinde zon çapları değerleri .....	34
4.3. Tür isimleri ve kısmi saflaştırılma sonucu elde edilen özütlerin antioksidan aktiviteleri.....	43
4.4. Tür isimleri ve kısmi saflaştırılma sonucu elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri .....	44
4.5. Plackett – Burman deneysel tasarımı .....	50
4.6. Plackett – Burman deneysel tasarımındaki varyans analizi sonuçları .....	51
4.7. Plackett – Burman deneysel tasarımındaki regresyon analizi sonuçları .....	51
4.8. Kodlanmış katsayılar .....	52
4.9. Full faktöriyel deney tasarımının uygulandığı kesitli kültür sonuçları .....	54
4.10. Antioksidan aktivite için varyans analizi tablosu .....	55
4.11. <i>S. aureus</i> MİK değerinin belirlenmesi .....	59
4.12. <i>E. coli</i> MİK değerinin belirlenmesi .....	60
4.13. <i>C. albicans</i> MİK değerinin belirlenmesi .....	61

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ****Simgeler**

$\mu$ l	mikrolitre
nm	nanometre
mm	milimetre
g	gram
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
$\delta$	sigma

**Açıklama****Kısaltmalar**

BHT	Bütıl Hidroksil Toluen
CY20S	Czapek Yeast Agar with %20 Sucrose
CYA	Czapek Yeast Agar
CZ	Czapek Dox Agar
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
MEA	Malt Extract Agar
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NA	Nütrient Agar

**Açıklama**

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda birçok çalışma yapılmaktadır. Funguslar bu mikroorganizmalar arasında önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda endüstriyel mikrobiyoloji dalında funguslar üzerinde yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Bunun yanı sıra funguslardan elde edilen metabolitler de endüstriyel proseslerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Akkara ve Tosun, 2014).

Funguslar doğal çevrelerde yaygın olarak bulunan, endüstriyel olarak önemli organizmalardır. Saprotik olan fungusların doğada en önemli rolleri organik maddeleri parçalamaları ve besinlerin döngüye katılmalarını sağlamalarıdır. Hayvan ve bitkilerin simbiyontları ve patojenleri olarak buldukları gibi tahta, boya, gıda gibi doğal ve sentetik materyalleri bozucu organizmalardır. Ayrıca etanol, sitrik asit, antibiyotikler, polisakkaritler, enzimler ve vitaminler gibi ekonomik açıdan önemli maddelerin üreticileri olarak kullanılırlar (Gadd, 1993).

Son yıllarda araştırmacılar mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoaktif metabolitlerin özellikle antioksidan ve antimikrobiyal etki gösterdiği konusunda çalışmalar yayınlamışlardır (Malpure vd., 2006; Yadav vd., 2014; Avcı vd., 2014; Arora ve Chandra 2010; Chandra ve Arora 2014a; 2014b). Funguslar, hayat kurtarıcı birçok ilaç ve yüksek oranda toksik mikotoksin içeren sekonder metabolitlerinin geniş çeşitliliği açısından çok iyi tanınmaktadır. Malpure vd. yayınladıkları çalışmada *Aspergillus candidus* metabolitlerinden fenolik bileşiklerin yüksek antioksidan özellik gösterdiğini rapor etmiştir (Malpure vd., 2006). Ayrıca deniz fungusları olarak tanımlanan denizde yaşayan organizmalar üzerinden izole edilen funguslar ve hipersalin ortamların yerleşikleri olan halotolerant/halofilik funguslar ve diğer organizmalar da son zamanlarda ilgi çekmektedir. Halotolerant/ halofilik funguslar gibi ekstrem koşullara adapte olmuş mikroorganizmalarda oluşan metabolik farklılıklar, yeni metabolitlerin ya da genlerin varlığı açısından ya da bilinen metabolitlerin daha yüksek verim ile üretilebilmeleri açısından önemli doğal kaynaklar olarak görülmektedir (Gunde- Cimerman, Ramos vd., 2009).

UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, bağışıklık sistemi reaksiyonları, radyasyon, stres, sigara, alkol gibi pek çok nedenle serbest radikaller oluşabilir. Mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemediği durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres kontrol edilemezse pek çok hastalığa neden olabilir. Oluşan serbest radikaller aralarında kalp damar hastalıkları, diyabet, kanser, ani gelişen böbrek yetmezliği, akciğer hastalıkları ve alkolik karaciğer hastalıkları gibi çok sayıda rahatsızlığa zemin hazırlar (Süleyman vd., 2018). Geçmişten günümüze mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklar ve ölüm oranları da dikkate alındığında antioksidan ve antimikrobiyal etki gösteren yeni moleküllere olan gereksinim çok daha iyi anlaşılmaktadır.

Çamaltı Tuzlası ve Tuz Gölü ülkemizde bulunan hipersalin çevrelerdir. Son yıllarda bu ortamların prokaryotik ve ökaryotik çeşitliliğini aydınlatıcı çalışmalar artış göstermektedir (Birbir ve Sesal 2003; Mutlu, 2011; Kocabıyık 2014; İrdem 2014; Özgök 2014). Bu tip hipersalin çevrelerden izole edilen mikroorganizmalar endüstriyel ve biyoteknolojik öneme sahiptir. Bu nedenle vakit kaybetmeden kültür koleksiyonlarında muhafaza edilen çok sayıda prokaryotik ya da ökaryotik mikrobiyal izolatların biyolojik aktiviteleri ayrıntılı olarak ele alınmalıdır.

Bu çalışmada hipersalin ortamlardan izole edilmiş olan filamentli fungusların bazı biyoaktif metabolitleri açısından taranarak potansiyellerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. ESOGÜ Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda muhafaza edilen filamentli fungus izolatları antimikrobiyal ve antioksidan etkileri açısından basit bir yöntemle taranarak öne çıkan *Aspergillus* izolatlarıyla çalışmaya devam edilmiş ve seçilen bir izolat ile üretim koşulları iki deneysel tasarım yöntemi Plackett Burman ve Full Faktöriyel Tasarım ile optimize edilmiştir.



## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Fungusların Genel Özellikleri

Funguslar, kök, gövde, yaprak, çiçek ve klorofile sahip olmayan ökaryotik, heterotrofik çok hücreli organizmalardır (Samanta, 2015). Klorofil bulunmadığından dolayı fotosentez olayına rastlanmaz. Çok hücreli olmaları, üreme tarzları, yaşam siklusları, çekirdek etrafında bir zarın bulunması, çok kromozoma sahip olması, nukleolus içermeleri ve hücre içi organellerinin bulunması gibi nedenlerle prokaryotiklerden ayrılırlar (Kaşık, 2010).

Günümüze kadar 110.000'den fazla fungus türüne (bunun 30.000'den fazlası *Basidiomycetes*, 30.000'den fazlası *Deuteromycetes*, 30.000'den fazlası *Ascomycetes* sınıflarına aittir) saptanmış olup bazılarının da karakterleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Funguslar, karada ve suda çok yaygın bir yaşam spektrumu gösterirler. Büyük bir çoğunluğu saprofitik bir yaşantıya sahip olup kendilerine gerekli gıda maddelerini cansız materyallerden ve basit organiklerden temin ederler. Bir kısım mantarlar da, insan ve hayvanların yanı sıra, bitki, balık, kerevit, algler, insektler vs. canlılar üzerinde parazitik, sembiyotik veya komensal bir yaşam içinde bulunurlar (Samanta, 2015).

Funguslar doğal çevrelerde yaygın olarak bulunup, endüstriyel olarak önemli organizmalardır. İnsanlar için yararlı olan birçok fungus türü endüstriyel ve ticari olarak üretilmektedir. Bunların yanında funguslardan elde edilen metabolitler de endüstriyel proseslerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Akkara, 2014). Fungusların organik maddeleri parçalama ve besinlerin döngüye katılmasını sağlamaları en önemli rolleridir. Bunun yanı sıra etanol, sitrik asit, antibiyotikler, polisakkaritler, enzimler ve vitaminler gibi ekonomik olarak önemli maddelerin üreticileri olarak da kullanılırlar (Gadd, 1993).

Fungus hücre duvarları tipik olarak %80-90 oranında polisakkarit olup proteinler, lipitler, polifosfatlar ve inorganik iyonlar hücre duvarının çimento makriksini yaparlar. Fungusların biyoteknolojik kullanımlarının yaygınlığından dolayı fungusların hücre duvarı

kimyasının anlaşılması önemlidir. Fungusların araştırma ve endüstriyel amaçlar için sınıflandırılmasında fungus hücre duvarının kimyasal yapısı kullanılmaktadır (Madigan, 2012).

Funguslar eşeyli bir üremenin sonucu olarak spor oluştururlar. Bu sporlar, bir hücreli gametlerin ya da **gametangiyum** olarak isimlendirilen özelleşmiş hiflerin birleşmesi ile oluşurlar. Alternatif olarak eşeyli sporlar, iki haploit hücrenin birleşip bir diploit hücre oluşturmalarından ve daha sonra onun mayoz ve mitozu uğrayarak bireysel sporu oluşturmalarından da orijin alabilirler. Gruba bağlı olarak farklı eşeyli sporlarda üretilir. Kapalı bir kese içinde oluşan sporlara askosporlar, çomak şekilli bir yapının ucunda oluşanlara ise bazidiyosporlar adı verilir. Zigosporlar ise, makroskopik, görünür yapılar olup hiflerin füzyonu ve genetik değiş-tokuştan ortaya çıkarlar. Sonuçta zigosporolgunlaşır ve eşeysiz sporlar üretirler. Sporlar havada dağılıp düştükleri yerde çimlenir ve yeni fungal miseller oluştururlar (Madigan, 2012).

Fungusların eşeyli sporları tipik olarak kuraklığa, ısıya, donmaya ve bazı kimyasal ajanlara dirençlidir. Ancak fungal eşeyli sporlar ısıya bakteriyel endosporlar kadar dirençli değildir. Eşeyli ve eşeysiz olsun bir fungus sporu çimlenebilir ve yeni bir hif ve miselyuma gelişebilir (Madigan, 2012).

Hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalma durumunda da son yapı olarak spor üretilir. Bu yapılar şekil ve büyüklük bakımından oldukça farklıdır, fakat sporlar preformed bir embriyo içermemeleri nedeniyle yüksek bitkilerin tohumlarından farklıdır (Sümer, 2006).

### **2.1.1. Fungusların ekolojisi**

Funguslar doğal çevrelerin hemen hemen her ortamında bulunmaktadır (Kantarcıoğlu, 2003). Bununla birlikte fungusların yayılışını etkileyen bazı faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler sıcaklık, pH, ozmotik basınç, ışık, karbon, kükürt, fosfor, oksijen gibi fiziksel ve kimyasal faktörlerdir (Kayış, 2015). Hücre çeperinde kitin ve selüloz karakterinde maddelerin bulunması, mantarların, devamlı değişen ve çok değişik olan çevre şartlarına uymalarında büyük yardımcı olurlar. Örneğin bir kısım mantarlar, bakterilerin dayanamayacakları kadar yüksek konsantrasyondaki (%50) şeker

solüsyonlarına direnç gösterirler ve bazı türler de bu yoğunlukta kolayca üreyebilirler (Yılmaz, 2015).

Funguslar gelişimini ve aktivitesini belirleyen önemli faktörlerden biri pH' dır. Funguslar genellikle düşük pH derecelerinde bile kolayca üreyebilir ve böyle ortamlara adapte olabilirler. Bu sebeple, mantarların minimal ve maksimal pH limitleri 2-11 arasında değişebilir. Fungusların türlerine göre değişmek üzere, optimal pH'ları, üreme ve çeşitli metabolit sentezi ile paralellik göstermeyebilir. Buna, diğer çevresel koşulların ve üreme ortamının yapısının da büyük etkisi bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan mantarlar (patojenik mantarlar), üredikleri bölgelere ait pH limitleri, genellikle, kendileri için optimal bulunmaktadır (Kayış, 2015).

Nem, fungusların üremelerinde çok önemli faktörlerden biridir. Yüksek orandaki nem genellikle üreme üzerine olumlu etki eder. Nem azaldıkça fungusların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Nem ihtiyaçları da türlere göre değişir (Yılmaz, 2015).

Funguslar çok geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilirler. Bu sınırlar, 0°C ile 60°C arasında değişebilmektedir. Mikroorganizmalar, psikrofilikler, mezofilik ve termofilik olarak düşük, orta veya yüksek sıcaklıkta yetişme yeteneklerine göre kategorize edilebilirler. Fungusların üreme ısıları dereceleri göre; 0°C ile 15°C arasında düşük sıcaklıkta üreyebilen funguslar (psikrofilikler), 15°C ile 40°C arasında normal sıcaklıkta üreyebilen funguslar (mesofilikler), 40°C arasında yüksek sıcaklıkta üreyebilen funguslar (termofilikler) dır (Ashbell, 2002; Aka, 2007). Bunların dışında her mikroorganizmanın kendine has en yüksek, en düşük ve en uygun sıcaklık derecesi mevcuttur. Mezofilik fungus olup psikrofilik fungus sıcaklığında gelişme gösterenlere **fakültatif psikrofilik** adı verilir (Kayış, 2015). Bazı mantarlar termotolerantdır ve bu nedenle üreme ısıları farklılıklar gösterir. Üreme ısı aralığı geniş olup 12-45°C arasında üreyebilir (Aka, 2007).

Funguslar, genellikle havada bulunan oksijen miktarında büyüme gösterir ve ürerler. Ortamdaki oksijen miktarında azalma olduğunda büyüme ve üremelerini sınırlamaktadır Patojenik mantarların çoğu da aerobik şartlarda ürerler (Yılmaz, 2015).

Fungusların gelişmesinde ışık önemli bir faktör değildir. Çok sayıda fungus ışık olmadan da gelişimlerini gösterebilmektedir. Funguslar sahip oldukları hücre duvarı (kitin ve selüloz) yapısından dolayı sürekli değişim gösteren çevre koşullarına uyum sağlama konusunda oldukça yardımcı olmaktadır (Kaşık, 2010).

Fungusların gelişimi için yüksek su aktivitesine (en az 0,65 civarında) ihtiyaç duyulmaktadır. 'Su potansiyeli' suyun potansiyel enerjisine karşılık gelmektedir ve fungal gelişim besiyerindeki osmatik basınç ile yakından ilgilidir. Bazı fungus türleri düşük su potansiyeli koşullarında gelişim göstermektedirler, bu duruma **ozmotolerant** veya **zerotolerant** olarak adlandırılır (Pitt ve Hocking, 2009)

### 2.1.2. Fungusların sınıflandırılması

Funguslara ait ilk sınıflandırma Linnaeus tarafından yapılmıştır. "Species Plantarum" adlı kitabında mantarları Cryptogamia Fungi sınıfında toplamıştır. Mantarların sınıflandırılması çoğunlukla pigmentasyon, hiflerin şekli, septanın varlığı veya yokluğu ve spor türleri gibi morfolojik kriterlere dayanır 110.000 türden daha fazla teşhisi yapılan mantarlar 5 ana dala ayrılmaktadır. Bunlar; Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota (askuslu funguslar), Basidiomycota (bazidili funguslar) ve Deuteromycetes dir (Yılmaz, 2015)

**Chytridiomycota:** Chytridler olarak isimlendirilen Chytridiomycota şubesi içerisinde sınıflandırılan funguslar göllere ve toprağa özgüdür. Yaklaşık 1.000 chytrid türünün bazıları ayrıştırıcı iken, diğerleri protista, başka fungus, bitki ya da hayvan parazitleridir (Yılmaz, 2015).

**Zygomycota:** Zygomycetes üyelerinin yaşamımızda önemli rolleri vardır. İnsanlarda bazı hastalıklara sebep olurlar, gıda ürünlerinin hazırlanmasında fermentasyonun başlatıcısı olarak rol oynarlar ve gıda bozulmasında öncü parçalayıcılar olabilirler. Birçoğu saf kültürde kolaylıkla çoğalır (Yılmaz, 2015).

**Ascomycota:** Çoğunlukla karada bazen suda olmak üzere geniş bir yayılışa sahiptir. Suda yaşayanlar; tatlı sudaki ve deniz suyundaki organik maddelerde saprofit olurlar veya su

algleri ve ileri bitkilerde parazit olurlar. Hayvanda ve insanda deri ve solunum hastalıklarına sebep olurlar, ayrıca çeşitli bitkilerde parazittirler. Bununla birlikte insana faydalı türleri de vardır. Bu funguslar tüm hayat safhalarında parazit ve saprofit olabilirler veya parazit olarak gelişmeye başlar ve konukçu kısmı öldükten sonra saprofit olarak yaşamaya devam ederler (Yılmaz, 2015).

**Basidiomycota:** Bu bölümün fungusları tek bir spor çeşidi olan basidiospor oluşturur, bu sporlarbasidium adlı tek bir çeşit sporangium üzerinde taşınır. Gelişmiş fungus türleri bu bölüme girer. Fungus sayısı oldukça fazladır ve üçte biri bu bölümdedir. Hücre çeperleri çok tabakalı olup yapısında kitin ve glukun vardır (Yılmaz, 2015).

**Deuteromycetes(Mitosporik Funguslar):** Eşeyli üreme evreleri henüz bilinmeyen septalı miselyuma sahip ve konidyoforlar üzerinde konidyumlar meydana getirerek eşeysiz çoğalabilen funguslar bu sınıfta toplanmaktadır. Çoğunlukla konidyumlar aracılığıyla ürerler (Turancı, 2013).

## 2.2. Ekstrem ortamlarda bulunan funguslar

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyal yaşamın spesifik çevrelerle sınırlı olmadığını, mikrobiyal komünitelerin yüksek sıcaklık, yüksek tuz, düşük sıcaklık, asidik ve alkali pH, yüksek basınç gibi ekstrem olarak bahsedilen çevrelerde de bulunabileceğini ortaya koymuştur. Bu ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalara **ekstremofiller** olarak adlandırılırlar (Van den Burg, 2003). Ekstremofil kelimesinin extreme aşırı, uç anlamında, phile ise sevmek anlamında; aşırı, uç noktaları sevmek anlamında ilk olarak 1974 yılında MacElroy tarafından kullanılmıştır. Ekstrem ortamlar su, hava ve toprak dışında karşımıza çıkan, hidrotermal bacalar, buzullar, yüksek ve alçak basınca sahip ortamlar, ağır metal içeren ortamlar, nükleer reaktörler, tuzlalar, anaerobik çevreler olarak sıralanabilir. Ekstremofiller bu zor ortamlara moleküler ve yapısal düzeyde adapte olmuşlardır (Kocabıyık, 2014).

Fungusların dağılımlarına ve aktivitelerine etki eden önemli abiyotik faktörlerden biri sıcaklıktır. Funguslar ise mezofilik ve termofilik ortamlarda yaşayabilmektedir. 20°C altındaki sıcaklıklarda gelişebilen, aynı zamanda 40-50°C ve üzeri sıcaklıklarda da

büyüyebilen fungus türlerine **termotolerant** denir. Bu fungus türleri genelde nemli ve büyük yağınların bulunduğu ortamlardan izole edilmektedir (Bills vd., 2004).

Psikrotrofik mikroorganizmalar 7°C veya daha düşük sıcaklıklarda gelişebilen farklı tür bakteri grubu olarak tanımlanmaktadır. Psikrotrofik mikroorganizmalar doğada öncelikle su, toprak ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunur. Çok küçük bir kısmı ise hava da bulunabilir (Akan, 2014). Doğal çevrelerde de sık sık karşımıza çıkmakla birlikte gıda kaynaklı olarak da karşımıza çıkmaktadırlar (Kocabıyık, 2014). Psikrotolerant fungusların ise en yüksek büyüme sıcaklığı 20°C'nin üzerindedir fakat 10°C'de de gelişme yeteneğine sahiptirler. İyi bilinen psikrofilik ve psikrotolerant funguslar *Alternaria*, *Cladosporium*, *Leptomitus*, *Penicillium*, *Rhizopus* gibi cinslerin üyeleridir (Gounot, 1986).

Kserotolerant ve kserofilik funguslar, substratlarda düşük su aktivitesinden sorumlu olan şeker ve tuzlardan gelen osmotik stresten ziyade düşük matriks potansiyeline sahip substratlar üzerinde gelişebilirler. Kserofilik bir fungusun en çevresel koşullar altında su aktivitesinin değeri 0,85'in altında büyüme gösteren fungus olarak tanımlanmıştır. Bu ekolojik grupta bulunan fungus türleri genellikle kurak ya da yarı kurak ekosistemlerden izole edilir ve kurutulmuş gıda türlerinde ve depolanmış tahıllarda karşılaşılır. *Aspergillus* türleri ise bu ekolojik grupta en çok görülen ksrotolerant olarak değerlendirilmektedir. Kurak ve yarı kurak çevrelerden en çok izole edilen kserotolerant ve kserofilik funguslar *Aspergillus*, *Wallemia*, *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, *Xeromyces*, *Eremascus* ve *Penicillium*'dur (Kocabıyık, 2014).

Besin maddeleri bakımından yoksun olan çevrelerde gelişme gösteren mikroorganizmalar oligotrofturlar. Bu çevre ortamında fungusların gelişimleri oldukça fazladır. Yüksek güneş ışığına, düşük besin varlığına, yüksek elektrolit konsantrasyonuna, yüksek sıcaklığa, ve nemin sadece rastgele bulunduğu yerde düşük nispi neme maruz kalan kayalar da ekstrem çevreler olarak nitelendirilebilir ve az rastlanan stres tolerant funguslar tarafından kolonize edilir. Siyah mayalar ve "*Dematiaceae*" familyasına ait miselyal funguslar çeşitli kaya yüzeylerinden ve taş heykellerden izole edilmişlerdir. Bu funguslar çiplak yüzeylerde bulunan filogenetik olarak çeşitli ve liken oluşturmazlar. UV ışığına ve yüksek sıcaklıklara direnmek için çok miktarda melanin üretirler ve düzenli olarak büyüme gösterirler. Bundan dolayıda mikrokoloniyal fungus olarak da söylenmektedir. Yapılan

çalışmalarda eşsiz habitatlarından dolayı pek çok yeni fungus türü tanımlanmıştır (Kocabıyık, 2014).

Foenikoid funguslar ise yangın felaketlerinden sonra bitkiler ve topraklar üzerinde gelişebilen fungus türleridir. Bunlara başlıca örnek *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes* sınıflarında rastlanmaktadır. Yangının verdiği hasar bitkilerin çeşitliliği ve yangın derecesi, yangından sonra gelişecek fungusların çeşitliliğini belirlemede oldukça önemli rol oynar (Bills, Foster vd., 2004).

### 2.3. Halotolerant ve Halofilik Funguslar

Mikroorganizmlar büyüme ortamlarında NaCl ihtiyaçlarına dayalı olarak halofilik olarak gruplandırılmaktadır. Yüksek sodyum konsantrasyonları osmotik etkiden başka enzim fonksiyonunu ve protein yapısını da etkilemektedir. Halotolerant mikroorganizmalar ise çevrenin doygunluk noktasına kadar tuzu tolere edebilirler (Özgök, 2014).

Büyüme ortamına %50 glikoz veya %17 NaCl eklenerek su aktivitesinin 0,85 ve altına düşürüldüğü durumlarda gelişebilen funguslar kserofilik olarak sınıflandırılırlar. Halofilik fungus türleri canlılık için tuza gereksinim duymamaktadır ve tatlı sudan NaCl'ün doygun çözeltilerine kadar olan tüm tuzluluk aralığında gelişebilirler. Bu türler dinlenme fazında çevresel streslere karşı direnerek hayatta kalabilmektedirler. Fakat olumsuz şartlar ortadan kalktığında, elverişli suyu kullanarak, büyüme ve üreme için metabolik aktiviteyi yükseltirler. Bu uyarlayıcı halofilik davranış, poikilofilik halofili olarak söylenmektedir ve hipersalin çevrelerde sürekli kolonizasyona imkan sağlamaktadır (Özgök, 2014).

Fungi aleminde gelişimleri için tuza zorunluluk duyan bir tür olmadığı görüşüne rağmen, obligat halofilik funguslar ile ilgili yeni kayıtlara rastlanılmaktadır. Son yapılan çalışmalara göre hipersalin sularda aktif komüniteleri oluşturan, başlıca %17-32 NaCl içeren tuzlu seçici besiyerleri üzerinde sıklıkla izole edilebilen ve %17 NaCl'de in vitro gelişme yeteneğinde olan funguslar halofilik olarak tanımlanmaktadır. %17 NaCl içeren besiyerinde gelişme gösteremeyenler ise halotolerant olarak adlandırılmaktadırlar (Özgök, 2014).

*Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Penicillium* ve *Alternaria* cinslerindeki türleri kapsayan halotolerant funguslar çorak (arid) topraklardan yaygın olarak izole edilmiştir. *Hortaea werneckii*, *Aspergillus penicilloides*, *Basipetospora halophila* gibi funguslar kurutulmuş ya da tuzlanmış balıktan izole edilmiştir. Bu türler optimum olarak 2,5M NaCl tuzlulukta geliştiği belirlenmiştir. *Basipetospora halophila* ve *H. werneckii*, glikoz, gliserol gibi su aktivitesini düşüren osmotiklere nazaran NaCl içeren ortamlarda daha bir hızlı şekilde geliştiği için halofilik olarak değerlendirilir. Gerçek halofilik funguslarda olduğu gibi, hipersalin substratlar üzerinde gelişen fungusların büyük çoğunluğu, çözünen maddenin kimyasal yapısından bağımsız olarak ve düşük su aktivitesinde büyüebilme özelliklerinden kaynaklanan, kseroofilik fenotip gösterirler (Özgök, 2014).

#### **2.4. Antioksidan Bileşikler**

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (Doğmuş ve Durucasu, 2013).

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara oranla daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu önemli derecede engeller ya da geciktirirler. Prooksidanlar (serbest radikaller, reaktif oksijen ve azot türleri) ise proteinler, nükleik asitle ve lipidlerde oksidatif zararlara yol açan ve bu durumun sonucunda çeşitli hastalıklara veya patolojik olaylara yol açan toksik maddelerdir. Bu tehlikeli yapıların var oluşu, sağlıklı bir insan için antioksidanları oldukça önemli yapmaktadır. Çünkü antioksidanlar, prooksidanları indigeyerek toksik olmayan ve düşük toksisitel, ürünlere dönüştürürler (Yavaşer, 2011).

Antioksidanlar gıda yolu ile dışarıdan da alınabilen, insanları zararlı serbest radikallerden koruyan doğal antioksidanlardır. Bunlar; flavonoidler, vitaminler, polifenoller ve karotenoidlerdir (Yavaşer, 2011). Mantarlarda bulunan antioksidanlar özellikle fenolik asitler ve flavonoitlerdir (Erdoğan, 2017).



Antioksidanlar yükseltgenebilen maddelerdir. Zincir reaksiyonlarının kırılması sırasında ise antioksidanlar yükseltgenerek bozunurlar. Bundan dolayı da antioksidanlar yükseltgenebilen maddeyi belirli bir zaman için koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder (Yavaşer, 2011).

Bir antioksidanın aktivitesi şu faktörler ile belirlenir:

1. Hidrojen veya elektron donör aracı olarak gösterebildiği reaktivite (Genelde indirgeme potansiyeline bağlıdır).
2. Antioksidandan türeyen radikalın akıbeti.
3. Diğer antioksidanlarla etkileşim yeteneği.
4. Geçiş metali şelatlama potansiyeli (Yavaşer, 2011).

#### **2.4.1. Antioksidanların sınıflandırılması**

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler aşağıda gösterildiği gibi doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar (Yavaşer, 2011).

##### **2.4.1.1. Doğal antioksidanlar**

Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan dokularında bulunan ve ekstrakte edilebilen ya da gıdanın işlenmesi sırasında açığa çıkan bileşenlerdir (Yavaşer, 2011). En önemli doğal antioksidanlar, tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C, karotenoidler, polifenoller ve selenyumdur (Moharram, 2014). Son zamanlarda gıda kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni sentetik antioksidanların (BHA, BHT, gibi) kanserojen olduklarının düşünülmesidir (Doğmuş ve Durucasu, 2013). Doğal antioksidanlar kendi aralarında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir.

**Enzimatik antioksidanlar:** Hücre içinde çeşitli mekanizmalarla oluşan radikaller bazı enzimler tarafından giderilir. Pek çok enzim doğrudan veya dolaylı olarak serbest radikalleri giderme mekanizmasına katkıda bulunabilir (Yavaşer, 2011). Bu mekanizma

için önemli olan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) birincil enzimler; glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-6-fosfat dehidrogenaz ikincil enzimlerdir (Moharram, 2014).

**Non-Enzimatik (Enzimatik Olmayan) antioksidanlar:** Enzim yapısında olmayan doğal antioksidanlar, bitki veya hayvan dokularında bulunan ya da bitkisel veya hayvansal kaynaklı bileşiklerin pişirilmesi veya işlem görmesi sonucu oluşan maddelerdir. Hemen hemen tüm bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunurlar (Yavaşer, 2011). Non-Enzimatik enzimler ise vitaminler ve türevleri, flavonoidler, kofaktörler ve fenolik asitlerdir (Moharram, 2014).

#### **2.4.1.2. Sentetik antioksidanlar**

Biyomolekülleri oksidatif hasardan koruyan ve organizmanın kendisinin sentezlediği ya da dışarıdan alınan antioksidanlara olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Birçok araştırmacı antioksidan aktivitesi yüksek ve organizmaya zararı olmayan sentetik bileşiklerin arayışı içerisinde.

Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte oksidasyonu önlemek amacıyla antioksidan üretimi konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tokoferoller ve askorbik asidin doğala özdeş formları veya türevleri laboratuvarında sentezlendiği gibi doğal yapı ile ilgisi olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'lı yıllardan beri yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlenmesine karşın, bunların ancak bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır (Yavaşer, 2011).

Sentetik antioksidanlar doğal antioksidanların sadece bir analogunu (tipini) oluştururlar ve doğal antioksidanın en etkin analogunu taklit edecek şekilde geliştirilirler. Örneğin E vitamininin doğada 4 adet analogunun bulunduğu bilinmektedir. Bunlar  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  formlarıdır. Tüm izomerlerin birlikte bulunması E vitamininin çözünürlüğünü artırır ve daha fazla antioksidan aktivitenin gerçekleşmesini sağlar. Bu olaya 'sinerjizm' adı verilmektedir. Bu yüzden doğal antioksidanlar analog ya da izomerler grubu olarak bulunmaktadır (Yavaşer, 2011).

## **2.5. Antimikrobiyal Bileşikler**

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir (Reller, 2009). Antimikrobiyal duyarlılık testi, ilaç keşfi, epidemiyoloji ve terapötik sonuçların tahmininde kullanılabilir (Balouiri, 2016).

Yeni antibiyotiklerin keşfi oldukça önemlidir. Doğal ürünler günümüzde yeni ilaç moleküllerinin en önemli kaynaklarından biridir. Bakteriler ve mikroorganizmalar, bitkiler ve çeşitli hayvan organizmalarından üretilmektedirler (Balouiri, 2016).

### **2.5.1. Antimikrobiyal aktivite belirleme yöntemleri**

#### **2.5.1.1. Agar disk-difüzyon yöntemi**

Genellikle laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp agara doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra ilacın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı (mm) şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlenir (Balouiri, 2016).

#### **2.5.1.2. Antimikrobiyal gradyan yöntemi (E-test)**

Günümüzde katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK değerlerinin saptanmasına olanak sağlayan yöntemler de bulunmaktadır. E-test bu prensibe dayanan bir yöntemdir.

MİK bir mikroorganizmanın üremesini önleyen en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Balouiri, 2016).

Antimikrobiyal maddenin bir uçtan diğerine artan bir konsantrasyon gradyanı ile aşılama yapılmış bir şerit, önceden test edilen mikroorganizma ile inoküle edilen agar yüzeyi üzerine ekilir. Bu yöntem, antibiyotik, antifungal ve antimikrobakterilerin MİK tayininde kullanılır. Uygulanması oldukça basittir, bu nedenle kliniklerde kullanılır (Balouiri, 2016).

### **2.5.1.3. Diğer difüzyon yöntemleri**

**Agar kuyu difüzyon yöntemi:** Yaygın olarak bitkilerin veya mikrobiyal özütlerin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için kullanılır. Agar plakası yüzeyi mikrobiyal inokulum hacmi tüm agar yüzeyine yayarak aşılır. 6 ile 8 mm çapında kuyucuklar açılır. İstenilen konsantrasyonda bir antimikrobiyal madde veya ekstrakt çözeltisinin bir hacmi kuyuya girer. Test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe edilir. Antimikrobiyal ajan, agar ortamında yayılır ve test edilen mikrobiyal suşun büyümesini engeller (Balouiri, 2016).

**Agar blok difüzyon yöntemi:** Genellikle mikroorganizmalar arasındaki zıtlığı vurgulamak için kullanılır. İlgili suşun uygun kültür ortamı üzerine sık çizgiler ile ekim yapılır. Büyüme sırasında mikrobiyal hücreler, agar ortamında dağılmış molekülleri salgılar. İnkübasyondan sonra, aseptik olarak kesilir ve önceden test mikroorganizması tarafından inoküle edilen bir başka plakanın agar yüzeyinde biriktirilir. Maddeler fişten agar ortamına yayılır. Daha sonra, mikrobiyal salgılanan moleküllerin antimikrobiyal aktivitesi, agar fişinin etrafındaki engelleme bölgesinin ortaya çıkışı ile saptanır (Balouiri, 2016).

## 2.6. Deneysel Tasarım

Deneysel tasarım, bir sürecin performansını iyileştirmek amacıyla, süreci etkileyen değişkenler üzerinde değişiklikler yaparak, sürecin çıktısı üzerindeki değişkenliklerin gözlemlenmesi ve yorumlanmasıdır.

Deney tasarımındaki amaç; önemli olan değişkenlerden önemsiz olan değişkenlerin ayrılması ve önemli parametreler için optimum değerlerin elde edilmesidir. Aynı zamanda birçok değişkenin etkisinin görülmesinde, değişkenlerin arasındaki etkileşimin araştırılmasında, deneylerden elde edilen bilgilerin arttırılmasında rahatlıkla kullanılabilir. Deneysel tasarımın en önemli amacı, maliyeti ve zamanı en aza indirmektir.

Bu durum göz önüne alındığında deney tasarımda endüstriyel uygulamalarda yarar sağlamaktadır. Gelişen biyoteknolojide maliyeti ve zamanı aza indirmek için deneysel tasarımı kullanımı oldukça artmıştır (Çömlekçi, 2003).

**Plackett- Burman deneysel tasarım:** Plackett-Burman deney tasarımı bağımsız değişkenlerin anlamlılık derecelerine göre elenmesini sağlayan etkili ve sık kullanılan bir deney tasarımıdır. Sadece doğrusal modeller oluşturulabilir. Dolayısıyla ikili faktör etkileşimleri hakkında kestirimde bulunulamaz. Bu tasarımda toplam deney sayısı dördün katı olmakla birlikte ikinin kuvveti olmayan bir sayıdır (ör; 12, 20, 28, ...) ve incelenen maksimum faktör sayısı toplam deney sayısından bir azdır (11, 19, 27, ...). Sadece faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde Plackett-Burman deney tasarımı son derece etkin bir yaklaşımdır. Deney tasarımının en büyük avantajı, deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir. Yapılan doğrulama deneyleri kabul edilebilir güven aralıkları ile sistemin kendi içindeki tutarlılığını ve güvenilirliğini de test etmektedir (Aytar, 2013).

**Çok etmenli (Full faktöriyel) deney tasarım:** Full faktöriyel deney tasarımı verileri toplamadan önce hangi parametre ayarlarında deney yapılacağına karar verir ve deney sayısını azaltarak edinilen bilgi miktarını arttırır. Çok sayıda faktör ve faktörlerin farklı düzeyleri bir arada incelenebilir. Bu deney tasarımını, performansa etki eden faktör sayısının 1-5 olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Çok etmenli bir deneyde faktörlerin tek

başına ve birlikte ürün performansına olan etkilerini belirlemek için gerekli deney sayısı  $a^k$  'dır.

a: faktörün düzey sayısı (2,3,4)

k: ilgilenilen faktör sayısı

Çizelge 2. 1.  $3^k$  çok etmenli deney sayısı tablosu

Faktör Sayısı	Deney Sayısı
2	9
3	27
4	81
5	243

$3^3$  çok etmenli deney tasarımının doğrusal modeli aşağıdaki gibidir:

$$\gamma = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

X'ler ana etken değerlerdir. Deneysel veriler analiz edildiğinde tüm bilinmeyen ' $\beta$ ' parametreleri değerlendirilir (Çömlekçi, 2003).

Çizelge 2.2.3<sup>3</sup> çok etmen deneme bileşimleri

Etmen B	Etmen C	Etmen A		
		0	1	2
0	0	000	100	200
	1	001	101	201
	2	002	102	202
1	0	010	110	210
	1	011	111	211
	2	012	112	212
2	0	020	120	220
	1	021	121	221
	2	022	122	222

3 faktörün 3 farklı düzeylerinin eşleştirilmesi ile 27 farklı deneme birleşimi oluşmaktadır (Muluk vd., 2009). Birçok araştırmacı ise deneylerinde full faktöriyel deney tasarımı kullanmıştır (Chavez, 2005; Li ve Wrenn, 2004).

A, B ve C ana etkiler;  
AB, AC ve BC birinci derece etkileşimler;  
ABC ikinci derece etkileşimler

Fisher ayrıca tasarlanmış deneyler için varyans analizi yöntemini geliştirmiştir. Varyans analizi toplam değişkenliği bu değişkenliğe neden olan bileşenlere ayırabilmektedir. İstatistikte kullanılan varyans analizi ve regresyon analizi süreçlerdeki faktörler ve seviyeler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için kullanılan önemli araçlardır. Varyans analizi tablasındaki p değerleri faktörler ve etkileşimlerin etkisinin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını test edilmesi için hesaplanır. Eğer bir süreçte güvenilirlik düzeyi %95 olarak belirlenmişse anlamlılık düzeyi 0,05 (1-0,95=0,05)'tir. Analiz sonucunda çıkan her bir p değeri anlamlılık düzeyi olan 0,05 değeri ile karşılaştırılır. Eğer;  
p değeri  $\leq 0,05$  ise etki anlamlı,  
p değeri  $>$  ise etki anlamlı değildir denir.

Deneysel tasarımdan elde edilen sonuçlar SPSS 18 gibi bazı hazır yazılım programları ile hesaplanabilmektedir. Hesaplamalar sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda ana etkiler, birinci ve ikinci derece etkileşimler incelenir. İşleyim toplamlarına veya ortalamalarına dayanılarak ana etkilerin anlamsız olarak değerlendirilmesine karşın, bu durum etmenlerin etkisiz olduğunu açıklamaz. Bu bakımdan etkileşimler anlamlı ise, bir etmenin farklı düzeylerindeki etkiler ayrı ayrı incelenmelidir (Çömlekçi, 2003).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Fungal kültürler ve test mikroorganizmaları

ESOGÜ FBE Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı kapsamında tamamlanan Y. Erçin KOCABIYIK'ın "Tuz Gölü Mikrofungus Çeşitliliğinin Belirlenmesi" başlıklı doktora tezi 201219A204 no'lu projesinden, Emine İRDEM'in "İzmir Çamaltı Tuzlası Mikobiyotasının Belirlenmesi (Monaliaceae ve Teleomorfları)" başlıklı yüksek lisans tezinden ve Özden ÖZGÖK'ün "İzmir Çamaltı Tuzlası Mikobiyotasının Belirlenmesi (Dematiaceae)" başlıklı yüksek lisans tezi 201319A101 no'lu projesinden elde edilen izolatlardan yararlanılmıştır. Tuz Gölü ve İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilen ve laboratuvarımızda muhafaza edilen 300 adet halotolerant/halofilik fungus izolatu çalışmamızın ana kaynağını oluşturmaktadır.

Tez çalışmalarında kullanılmak için temin edilen bakteriler (Çizelge 3.1) Nutrient Agar (NA) besiyerinde, 37°C'de 24 saatlik; maya kültürleri (Çizelge 3.1) ise, Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde 27°C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda canlandırılmıştır. Canlandırılan kültürler yatık nutrient agar ve malt ekstrakt agar içeren tüplere alınarak, antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmak üzere +4°C' de saklanmıştır.

Çizelge 3.1 Çalışmalarda kullanılan standart bakteri ve maya suşları

<b>Tür Adı</b>	<b>Kod</b>	<b>Temin edildiği yer</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	Şeyh Edebalı Üniversitesi
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Şeyh Edebalı Üniversitesi
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu



### 3.1.2. Besiyerleri

#### Besiyeri 1. Malt Ektrakt Agar (MEA)

Maya ekstraktı	20,0 g
Peptone	1,0 g
Glukoz	20,0 g
Agar	20,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Atlas, 2006).

#### Besiyeri 2. Nütrient Agar (NA)

Pepton	5,0 g
Maya Ekstraktı	3,0 g
Agar	12,0 g
Distile Su	1000 ml

1000 ml distile su içine 20 g hazır besiyeri çözüldürülerek 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir

**Besiyeri 3. Czapek Yeast Agar (CYA)**

Czapek Konsantresi	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Maya Ekstraktı	5,0 g
Sükroz	30,0 g
Agar	15,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Pitt ve Hocking, 2009).

**Besiyeri 4. Czapek Yeast Agar with %20 Sucrose (CY20S)**

Czapek Konsantresi	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Maya Ekstraktı	5,0 g
Sukroz	200,0 g
Agar	15,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Pitt ve Hocking, 2009).

**Besiyeri 5. Czapek Dox Agar (CZ)**

Czapek Konsantresi	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Sukroz	30,0 g
Agar	17,5 g
Distile Su	1000 ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Pitt ve Hocking, 2009).

**Besiyeri 6. Müller Hilton Agar (MHA)**

Et infüzyonu	2,0 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nişasta	1,5 g

1000 ml distile su içine 34 g hazır besiyeri çözümlenerek 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

**Besiyeri 7. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)**

Kazein	5,0 g
Hayvan Dokusu	5,0 g
Glukoz	40,0 g
Agar	15,0 g
Distile Su	1000 ml

1000 ml distile su içine 65 g hazır besiyeri çözümlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

**Besiyeri 8. Sabouraud Dextrose Broth (SDB)**

Glukoz	20.0 g
Peptone	10,0 g
Distile su	1000 ml

1000 ml distile su içine 30 g hazır besiyeri çözümlenerek 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

**Besiyeri 9. Müller Hilton Broth (MHB)**

Et infüzyonu	4,0 g
Nisařta	1,5 g
Kazein Hidrolizat	17,5 g
Distile Su	1000 ml

1000 ml distile su içine 23 g hazır besiyeri çözüdürülerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

**Besiyeri 10. Antioksidan aktivite için kullanılan sıvı besiyeri**

Sükroz	30,0 g
Maya Ekstraktı	1,0 g
Polipepton	1,0 g
KCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Distile Su	1000 ml

121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Bu besiyeri fungus izolatlarının antioksidan aktivite tarama testinde kullanılmıştır (Malpure vd., 2006)

### 3.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler

#### Çözelti 1. Czapek Konsantresi

NaNO <sub>3</sub>	30,0g
KCl	5,0g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	5,0g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Cu SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Distile Su	100 ml

Stok olarak hazırlanıp CYA, CZ ve CY20S gibi besiyerlerine ilave edilmiştir (Pitt and Hocking, 2009).

#### Çözelti 2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

50 ml metanole 0,001 g DPPH ilave edilerek karıştırılmış ve 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir.

#### Çözelti 3. BHT (Bütil Hidroksi Toluen)

10 ml metanol ile 5 mg BHT karıştırılır ve elde edilen çözeltilerden 750 µl alınarak metanol ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

#### Çözelti 4. Askorbik Asit

10 ml su ile 5 mg askorbik asit karıştırılır ve elde edilen çözeltilerden 750 µl alınarak su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

### Çözelti 5. Fizyolojik Tuzlu Su

NaCl	9,0 g
Distile Su	1000ml

121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

### Çözelti 6. Mc Farland No:0,5 Bulanıklık Standardı

BaCl <sub>2</sub> (% 1,175)	0,5 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,36 N)	9,5 ml

%1,175 BaCl<sub>2</sub> ve 0,36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinden karıştırılarak 10 ml’lik steril kapaklı tüpe doldurulmuş. 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş ve karanlıkta buzdolabında saklanmıştır.,

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Antioksidan aktivite tarama testi

Antioksidan aktivite 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH) üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayin edilerek belirlenmiştir. Bunun için antioksidan sıvı besiyerinde fungal izolatlar, 27°C’de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Yedinci günün sonunda kültür sıvısı Whatman No:1 kağıdından süzülerek misellerinden ayrılmıştır. 100 µl filtrat üzerine 2,9 ml DPPH ( $2 \times 10^{-2}$  g/l) çözeltisi ilave edilerek, karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometreyi metanol ile sıfırlayarak 517 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur. Kontrol grubu olarak da BHT ve Askorbik Asit kullanılmıştır. Serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan İndeks) % inhibisyon açısından aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Öztürk vd., 2007)

$$\text{İnhibisyon (\%)} = (\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örneğin absorbansı} / \text{Kontrol abasorbansı}) \times 100$$

Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır ve referans madde olarak butil-hidroksi-toluen (BHT) ve askorbik asit kullanılmıştır.

### 3.2.2. Antimikrobiyal aktivite testleri

Kullanılan antimikrobiyal aktivite testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları esas alınarak çalışmaya göre modifiye edilmiş testlerdir (CLSI, 2012a; CLSI, 2012b).

**Agar blok difüzyon yöntemi:** Fungus izolatları antimikrobiyal aktivite açısından taramak için agar blok difüzyon yöntemi kullanılmıştır. 37°C'de inkübe edilmiş 16-18 saatlik test mikroorganizmaları steril fizyolojik tuzlu suya aktararak 0,5 Mc Farland standardına göre seyreltilmiştir. Fizyolojik tuzlu suda seyreltilen test organizmaları eküvyon yardımı ile önceden hazırlanmış ilgili besiyerini içeren petri plaklarının tüm yüzeyine yayılarak ekilmiştir. İlgili besiyerini içeren petri plaklarının tüm yüzeyinde büyümüş 5 günlük fungus kültürlerinden aseptik olarak fungus izolatları 6 mm çaplı delici (cork borer) yardımıyla agar bloklar alınarak test mikroorganizması ile inoküle edilen agar plakaların yüzeyine yerleştirilmiştir. 16-18 saatlik inkübasyondan sonra oluşan zon çapları kumpas yardımı ile ölçülerek not edilmiştir. Oluşan zon çaplarına göre fungus izolatlarında eleme yapılarak bir sonraki çukur agar difüzyon yöntemine geçilmiştir.

**Çukur agar difüzyon yöntemi:** Test mikroorganizmalarının NA ya da MAE da 16-18 saatlik kültürlerinden alınan koloniler fizyolojik tuzlu suya aktararak 0,5 Mc Farland standardına göre seyreltilmiştir. Fizyolojik tuzlu suda seyreltilen test organizmaları steril eküvyon yardımı ile önceden hazırlanmış ilgili besiyerini içeren petri plaklarının SDA ve MHA besiyerlerinin tüm yüzeyine ekilmiştir. Ekim gerçekleştirildikten sonra 6 mm çaplı delici (cork borer) yardımıyla, eşit aralıklarda olmak koşuluyla, kuyucuklar açılmıştır. Her bir kuyucuğa bir fungusdan elde edilen filtrat (20 µl) doldurulmuştur. Filtratın agar içine difüze olması için 15-20 dakika boyunca 4°C 'de buzdolabında bekletilmiştir. Daha sonra petriler test mikroorganizmalarının sıcaklık isteklerine göre inkübe edilmiştir.

Petri plakları üzerinde aktif antimikrobiyal metabolitlere bağlı oluşan inhibisyon zonları 16 -18 saatlik inkübasyon süresinden sonra kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak bakteriler için vancomycin ve sefalotin, mayalar içinde flukonazol

kullanılmıştır. Bu yöntemde antifungal ve antibakteriyal aktivitelerin sonuçları oluşan inhibisyon zonlarının çapı (mm) olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.3. Fungal metabolitlerin ekstraksiyonu

Fungal izolatlar antioksidan sıvı besiyerinde (Besiyeri 8) durgun halde, 27°C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Yedinci günün sonunda kültür sıvısını misellerinden ayırmak için Whatman No:1 kağıdından filtre edilmiştir. Elde edilen kültür sıvısı 1:1 oranında etil asetat ile ard arda 3 kez ayırma hunisi yardımı ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiştir. Organik faz rotavaporda (HeidalpH Almanya) uçurulup, yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen özütler biyolojik aktivite tarama testlerinde kullanılmak için -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.4. Mikrofungus izolatlarının morfolojik özelliklerine göre tanımlanması

Mikrofungusların cins ve tür düzeylerinde identifikasyonları için; “Identification of Common *Aspergillus* Species” (Klich, 2002), “The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*” (Pitt, 1979), The Genus *Fusarium*- A Pictorial Atlas” (Gerlach ve Nirenberg, 1982), eserlerinden yararlanılmıştır.

*Aspergillus* türlerinin identifikasyonu “The Genus *Aspergillus*” (Raper ve Fennell, 1965), “Fungi and Food Spoilage” (Pitt ve Hocking, 2009), ve “Identification of Common *Aspergillus* Species” (Klich, 2002) adlı kaynaklardan yararlanılarak yapılmıştır. *Aspergillus* cinsine ait türlerin identifikasyonunda MEA, CYA (25°C, 37°C), CY20S, CZ besiyerleri kullanılmıştır (sırasıyla Besiyeri 1,3,4,5).

Mikrofungusların koloniyal, kültürel ve morfolojik özelliklerini belirlemek üzere; stok kültürlerden cinslere özgü besiyerlerine ekimleri yapılarak uygun sıcaklık ve sürelerde inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda petri plaklarındaki mikrofungus kolonilerinin makroskobik (koloni çapı, yapısı, alttan üsten rengi, sporlanma, eksuda ve pigment oluşumu vb.) ve mikroskobik (konidi ve konidioforların şekli, ölçümleri, çeper özellikleri, renkleri, konidilerin çıkış şekli vb.) olarak incelenmesi ile teşhis işlemleri gerçekleştirilmiştir.



### 3.2.5. Deneysel Tasarım

**Plackett-Burman Deney Tasarımı:** Plackett–Burman deney tasarımı, seçilen fungus izolatının etken madde üretimini olumlu yönde etkileyen besinsel ve çevresel değişken(ler)i seçmek amacı ile uygulanmıştır. Nişasta, Sükroz, Glukoz ve Gliserol olmak üzere 4 farklı karbon kaynağı, Maya Özütü, Pepton, Soya Unu ve Kazein olmak üzere 4 farklı azot kaynağı ile NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> olmak üzere diğer besiyeri bileşenlerinin etken madde üretimi için gerekliliği ve önemini belirlemek üzere deney tasarımı yapılmıştır. Plackett – Burman deney tasarımı her değişkenin 2 farklı seviyesinin kullanıldığı bir deney tasarım desenidir. Bu amaçla seçilen izolat için belirlenen değişkenler ile en düşük ve en yüksek değerleri literatüre dayanarak belirlenmiş ve Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Etken maddenin üretimi üzerine etkisi olduğu öngörülen 12 değişkenin Plackett–Burman tasarımı 20 deneyden oluşmaktadır. Her bir deney için belirtilen koşullar sağlanarak 250 ml’lik erlenlerde 100 ml hacim olacak şekilde 27°C’de 150 rpm çalkalama hızında 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen filtratlar için antioksidan aktivite (DPPH-%inhibisyon) ölçülmüştür.

Çizelge 3.2. Plackett – Burman deney tasarımı ile seçilen değişkenler ve seviyeleri

DEĞİŞKEN KODU	DEĞİŞKENLER	DÜŞÜK DEĞER(-)	YÜKSEK DEĞER(+)
A	Nişasta	5,00	25,0
B	Sükroz	5,00	25,0
C	Glukoz	5,00	25,0
D	Gliserol	5,00	25,0
E	Maya Özütü	0,50	3,00
F	Pepton	0,10	0,50
G	Soya Unu	10,0	30,0
H	Kazein	0,50	2,00
J	NaCl	0,75	5,00
K	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0	1,00
L	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	0,60
M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0,60

Çizelge 3.3. Plackett – Burman’da matris tarama deneyleri

Değişken Deneme	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
4	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
5	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
6	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
9	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
10	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
11	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
12	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
13	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
14	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
15	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
16	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
17	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
18	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
19	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Full faktöriyel deney tasarımı:** Full faktöriyel deney tasarımı, her faktör düzeyinin her bir kombinasyonunu test eder (Kennedy ve Krouse 1999). Bu çalışmada, Plackett-Burman deney tasarımı sonuçlarına göre etken madde üretim verimini olumlu yönde etkileyen üç faktörün sükröz, pepton ve NaCl olduğu anlaşılmıştır. Bu faktör arasındaki etkileşimi araştırmak için  $3^3$  faktöriyel deneysel tasarım kullanılmıştır. Bu amaçla sükröz, pepton ve NaCl için üç düzey konsantrasyon belirlenmiştir. Bu amaçla seçilen fungal izolatin etken madde üretimi üzerinde değişkenlerin etkisini belirlemek için yapılan deney tasarımı, Çizelge 3.4’de sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Full faktöriyel deney tasarımında kullanılacak değişkenler ve düzeyleri

		-1	0	1
A	Sukroz	10	30	50
B	Pepton	0,5	1,0	1,5
C	NaCl	1,0	3,0	5,0

3 faktörün, 3 farklı düzeyinin eşleştirilmesi ile  $3^3$  adet farklı deneme oluşturulmuştur. Bu nedenle seçilen 3 değişkenin ve düzeyler arası etkileşimi ortaya çıkaracak tasarım Çizelge 3.4’de sunulmaktadır. 27 denemeden oluşan deney seti Çizelge 3.4’de belirtilen koşulların sağlandığı 250 ml lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Erlenler 150 rpm çalkalama hızı ve 27 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen filtratlar için antioksidan aktivite (DPPH-% inhibisyon) ölçülmüştür.

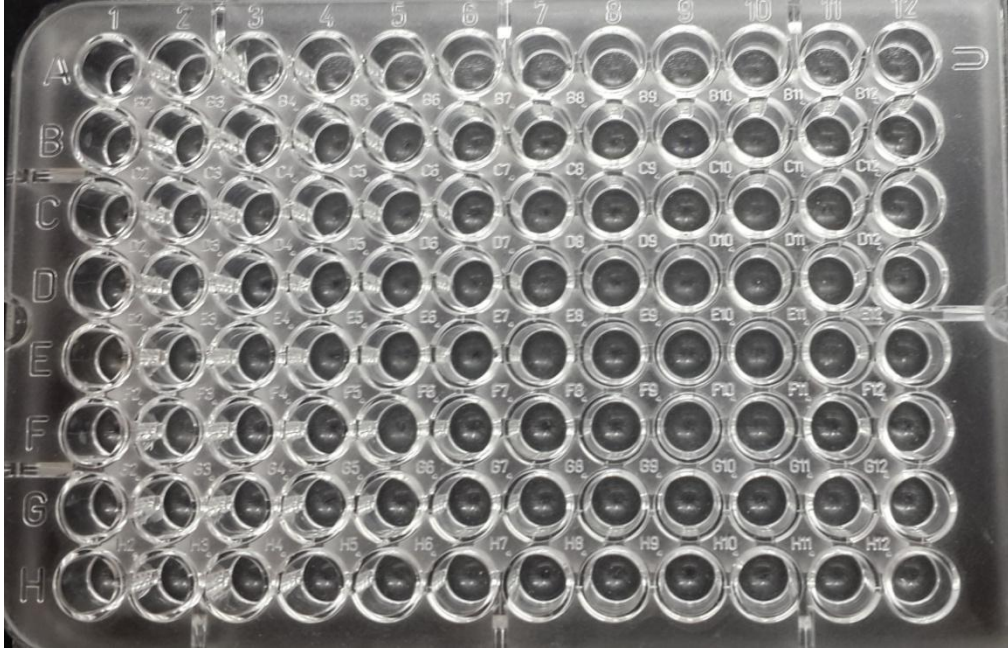
Çizelge 3.5. Full faktöriyel deney tasarımındaki tarama deneyleri

Kodlar	Sukroz	Pepton	NaCl	Kodlar	Sukroz	Pepton	NaCl
1	-1	-1	-1	15	0	0	1
2	-1	-1	0	16	0	1	-1
3	-1	-1	1	17	0	1	0
4	-1	0	-1	18	0	1	1
5	-1	0	0	19	1	-1	-1
6	-1	0	1	20	1	-1	0
7	-1	1	-1	21	1	-1	1
8	-1	1	0	22	1	0	-1
9	-1	1	1	23	1	0	0
10	0	-1	-1	24	1	0	1
11	0	-1	0	25	1	1	-1
12	0	-1	1	26	1	1	0
13	0	0	-1	27	1	1	1
14	0	0	0				

### 3.2.6. MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu)

Bu yöntemde, mikroorganizmaların test edilen kültür sıvısı özütlerine karşı hassasiyetinin belirlenmesinde tek kullanımlık “U” tipi çukurlara sahip 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Kullanılacak bakteri ve maya kültürleri sırasıyla Müller Hilton Broth ve SDB besiyerine inokule edilmiş, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Mikroplaktaki A1-A12 kuyucukların her birine 100 µL uygun besiyerleri ilave edildikten sonra A1 kuyucuğuna ilave edilen 100 µL özüt pipet ucuyla iyice karışması sağlanmıştır.

Daha sonra A1 den A2 kuyucuğuna 100  $\mu$ L aktararak aynı işleme 10. kuyucuğa kadar devam edilmiştir. Böylece 20000, 10000, 5000...  $\mu$ l/ml şeklinde devam eden seyreltme işlemi tamamlanmıştır. Her bir özüt ve antibiyotikler için üç ayrı bağımsız set düzenlenmiştir. Her bir plakada bakteri süspansiyonu içermeyen, özüt için kontrol kuyucuğu ve özüt içermeyen bakteriyal süspansiyon kuyucuğu da bulunmaktadır. A1-A10 kuyucukları McFarland (0,5) standardına göre hazırlanmış 100  $\mu$ l bakteri süspansiyonu ile inoküle edilmiştir. Plakalar 24 saat 27°C ve 37°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 50 $\mu$ L rezazurin çözeltisinden kuyucuklara ilave edilerek üreme olup olmadığı gözlenmiştir. Üremenin olduğu kuyucuklarda kırmızı ve tonları şeklinde renklenmeler olmaktadır. Üremenin olmadığı en son kuyucuktaki konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. 96 kuyucuklu mikroplaka

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Uzun yıllar toprak ve hava kaynaklı funguslar üzerine çalışmalar yapılmış ve izole edilen küflerin biyolojik aktiviteleri araştırılarak yeni etken moleküller keşfedilmiştir. Bu çalışmalar A. Fleming ve arkadaşlarının *P. notatum*'dan Penisilin antibiyotiğini üretip uygulamaya başladığı 1934 yıllarına kadar geçmişe gider. Günümüzde ise ekstrem koşullarda yaşamını sürdüren organizmaların bu sert ortam koşullarına dayanmak için farklı mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir (Rothschild ve Mancinelli, 2001). Buna dayanarak araştırmacılar daha çok deniz kaynaklı funguslar ve hipersalin ortamlarda yaşayan funguslara yönelmişlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar arasında *Aspergillus* cinsi türlerin biyolojik aktivite gösteren yeni moleküller açısından önemli bir potansiyel kaynak olduğunu desteklemektedir (Butinar, 2005). Çalışmamızın konusu ve kapsamı hipersalin ortamlardan izole edilen halotolerant/halofilik fungus izolatlarının bazı biyolojik aktiviteleri olarak belirlenmiş ve sınırlandırılmıştır.

ESOGÜ FBE Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı kapsamında tamamlanan önceki tez çalışmalarında Tuz Gölü ve İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole edilen ve laboratuvarımızda muhafaza edilen 300 adet halotolerant/halofilik fungus izolatu çalışmamızın ana kaynağını oluşturmaktadır.

İlk olarak laboratuvarında 80°C'de muhafaza edilen küf izolatları MEA besiyerinde aktiflenerek çalışmaya başlanmıştır. Diğer aşamalar ise şöyle planlanmıştır.

- ✓ İzolat sayısının çokluğu nedeniyle izolatların kendi arasında yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterenlerin basit ve ekonomik yöntemlerle belirlenmesi,
- ✓ Antioksidan ya da antimikrobiyal aktivite açısından kayda değer etkinlik gösteren izolatlar arasından *Aspergillus* cinsine ait türlerin belirlenmesi,
- ✓ Seçilen *Aspergillus* cinsi izolatların daha hassas yöntemlerle antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi,
- ✓ Biyolojik aktivite açısından en etkili olduğu düşünülen bir *Aspergillus* sp. izolatının seçilerek etken madde üretiminin optimizasyonu,
- ✓ Belirlenen optimum koşullarda üretim ve etken maddenin varlığı ve etkisi üzerine çalışmalar.

İzolatların kendi arasında antioksidan etkileri DPPH ile serbest radikal süpürücü özelliğine göre değerlendirilirken, antimikrobiyal aktivite açısından taramak için basit ve ekonomik yöntemlerden birisi olan agar blok difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

#### **4.1. Antioksidan aktivite açısından izolatların taranması**

Çalışma kapsamında incelenen 300 fungal izolat sıvı besiyerinde durgun olarak inkübe edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar çalkalamanın antioksidan aktiviteyi olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bu durum, antioksidan aktiviteden sorumlu fenolik bileşiklerin çalkalamalı koşullarda düşük miktarda oluşturulduğu şeklinde açıklanmaktadır (Arora ve Chandra, 2010). Fungal izolatların antioksidan kapasiteleri DPPH radikali süpürücü aktivite tayini ölçülmüştür. Bu yöntem gıdalarda ve birçok bitki drogunun antioksidan aktivitesinin taranması için en basit ve en yaygın olarak rapor edilen yöntemdir (Boligon, 2014). Antioksidan ile DPPH'in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorban ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir. İzolatların antioksidan aktivitelerinin kendi içinde karşılaştırılması açısından yöntemde verilen formül ile % inhibisyon hesaplanmıştır. Tüm izolatlar dikkate alındığında % inhibisyon değerlerinin 20 ile 96,06 arasında değiştiği görülmüştür. İnhibisyon yüzdesi 60'ın üzerinde olan seçilmiş 32 izolata ait antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.1'de verilmektedir. Otuz iki izolatdan 13'ünün % 80 nin üzerinde inhibisyon göstermesi onların antioksidan aktivite açısından potansiyel kaynaklar olduğunu ve araştırılması gerekliliğini ifade etmektedir. Arora vd. yaptıkları çalışmada 113 fungal izolatın antioksidan kapasitelerini yarı kantitatif olarak hızlı DPPH boyama yöntemi ile belirlemişler ve izolatların %45'inin antioksidan aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir (Arora ve Chandra, 2010). Çalışmamızda kullanılan yöntemin çok daha hassas olması nedeniyle izolatların neredeyse tamamında antioksidan aktivite tespit edilmiş ancak kayda değer olması açısından %60'ın üzerinde inhibisyona sahip izolatlar daha ileri aşamalara alınmıştır.

Çizelge 4.1. 300 izolattan %60'ın üzerinde inhibisyon gösteren izolatlar ve antioksidan aktiviteleri (Kontrol değeri; 0,601: BHT; %74,30: Askorbik Asit; %76,72)

	Kodları	Cins	DPPH absorbans (% inhibisyon)
1	1S 28	<i>Penicillium</i> sp.	0,129(78,47)±0,39
2	1S 300	<i>Aspergillus</i> sp.	0,117(80,47)±0,28
3	1S 335	<i>Aspergillus</i> sp.	0,116(80,58)±0,22
4	1S 408	<i>Penicillium</i> sp.	0,118(80,41)±0,38
5	1S 429	<i>Penicillium</i> sp.	0,171(71,43)±0,22
6	1S 450	<i>Penicillium</i> sp.	0,024(95,89)±0,22
7	1S 63	<i>Aspergillus</i> sp.	0,110(81,58)±0,39
8	1T 111	-	0,194(67,71)±0,16
9	1T 115	<i>Aspergillus</i> sp.	0,128(78,58)±0,22
10	1T 28	-	0,166(72,26)±0,22
11	1T 4	-	0,070(88,23)±0,28
12	1T 401	<i>Aspergillus</i> sp.	0,051(91,51)±0,17
13	1T 411	-	0,197(67,10)±0,28
14	1T 412	-	0,201(65,44)±0,39
15	2S 144	<i>Aspergillus</i> sp.	0,137(77,14)±0,06
16	2S 302	<i>Aspergillus</i> sp.	0,067(89,73)±0,45
17	2S 317	-	0,198(66,99)±0,39
18	2S 336	<i>Aspergillus</i> sp.	0,197(67,16)±0,28
19	2S 421	<i>Aspergillus</i> sp.	0,087(85,46)±0,44
20	2S 427	-	0,194(67,60)±0,78
21	2T 126	<i>Aspergillus</i> sp.	0,144(75,92)±0,38
22	2T 32	-	0,182(69,71)±0,50
23	3S 105	-	0,186(68,93)±0,28
24	3S 114	-	0,083(86,12)±0,60
25	3S 312	<i>Penicillium</i> sp.	0,070(88,40)±0,39
26	3S 325	<i>Aspergillus</i> sp.	0,102(83,02)±0,50
27	3S 436	-	0,165(72,48)±0,27
28	CT 6.1	<i>Penicillium</i> sp.	0,116(80,58)±0,28
29	CT 8.12	<i>Aspergillus</i> sp.	0,163(72,81)±0,44
30	CT 5.4	<i>Aspergillus</i> sp.	0,142(76,31)±0,61
31	CT 9.13	<i>Aspergillus</i> sp.	0,053(91,12)±0,56
32	CT 10.22	<i>Penicillium</i> sp.	0,115(80,80)±0,77

(-) İşaretili olan kısımlar *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri dışında olan izolatlardır.

Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere, 32 fungus izolatının DPPH radikali süpürücü aktiviteleri kayda değer bulunmuştur. Yapılan bu tür çalışmalarda DPPH radikali süpürücü

aktivitesi funguslar için geniş bir aralıktadır. Fungal izolatların söz konusu yöntemle belirlenen birçok çalışmada *Aspergillus* PR78 için %82,77, PR66 için %68,26 (Arora ve Chandra, 2010), *Aspergillus wentii* 1 için %72,06, *A. wentii* için %62,82 (Chandra ve Arora, 2014b). Yine aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında *A. terreus* 1, *A. terreus* 2 ve *A. fumigatus* için radikal süpürücü aktiviteyi sırasıyla %85,2, %68,2 ve %68,9 inhibisyon oranıyla ifade etmişlerdir (Chandra ve Arora 2014a). Bir başka çalışmada, *A. peyronelii* ve *A. niger* strainlerinin ise sırasıyla %71 ve %72 radikal süpürücü etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Yadav, 2014).

#### 4.2. Antimikrobiyal aktivite açısından izolatların taranması

Çalışma kapsamında incelenen 300 fungal izolatın antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri belirlenmiştir. Antibakteriyal aktivitenin belirlenmesinde biri Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) diğeri Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) iki bakteri straini, antifungal aktivitenin belirlenmesinde ise bir fungus (maya) olan *Candida albicans* ATCC 14053 kullanılmıştır. İki tekrar halinde gerçekleştirilen uygulamanın ortalama değerleri çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. İncelenen izolatların antimikrobiyal aktivite potansiyellerinde zon çapları değerleri(mm)

	İzolat Kodları	Cins	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1	1S.300	<i>Aspergillus</i> sp.	-	21	15
2	1S.335	<i>Aspergillus</i> sp.	-	29	16
3	1S.410	-	20	-	18
4	1S.419	-	-	20	18
5	1S.434	-	-	22	21
6	1S.441	-	-	20	25
7	1S.448	<i>Penicillium</i> sp.	12	25	20
8	1S.12	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	30
9	1S.57	<i>Penicillium</i> sp.	-	23	20
10	1T.115	<i>Aspergillus</i> sp.	-	15	20
11	1T.128	-	20	15	20
12	1T.136	-	20	26	31
13	1T.32	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	23
14	1T.39	-	-	20	23
15	1T.401	<i>Aspergillus</i> sp.	18	24	24



Çizelge 4.2. İncelenen izolatların antimikrobiyal aktivite potansiyellerinde zon çapları değerleri (devam)

	İzolat Kodları	Cins	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
16	1T.402	-	-	-	27
17	1T.411	-	22	-	30
18	1T.412	-	-	21	30
19	2S.162	<i>Penicillium</i> sp.	25	22	30
20	2S.302	<i>Aspergillus</i> sp.	-	20	31
21	2S.336	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	32
22	2S.358	-	-	-	34
23	2S.361	<i>Aspergillus</i> sp.	-	23	44
24	2S.406	-	-	20	10
25	2S.416	<i>Aspergillus</i> sp.	-	30	10
26	2S.434	-	-	22	20
27	2S.435	<i>Penicillium</i> sp.	20	23	20
28	2S.437	-	-	30	20
29	2S.445	-	-	23	-
30	2T.27	-	20	15	-
31	2T.31	-	22	10	-
32	3T 335	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	30
33	3S.124	<i>Aspergillus</i> sp.	-	26	14
34	3S.138	<i>Penicillium</i> sp.	13	25	-
35	3S.156	<i>Penicillium</i> sp.	44	42	-
36	3S.304	<i>Penicillium</i> sp.	28	24	-
37	3S.325	<i>Aspergillus</i> sp.	20	16	-
38	3S 323	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	23
39	CT 7.43	<i>Aspergillus</i> sp.	29	36	-
40	CT 7.44	<i>Aspergillus</i> sp.	13	20	-
41	CT 7.13	<i>Aspergillus</i> sp.	25	20	-
42	CT 1.1	-	11	25	-
43	CT 15.6	-	-	26	-
44	CT 4.10	-	30	23	-
45	CT 4.14	-	31	34	-
46	CT 4.3	-	25	25	-
47	CT 4.5	<i>Aspergillus</i> sp.	36	33	-
48	CT 4.8	<i>Aspergillus</i> sp.	22	25	-
49	CT 4.9	-	16	21	-
50	CT 4.3	-	11	23	-
51	CT 6.14	<i>Aspergillus</i> sp.	32	13	-
52	CT 10.22	<i>Penicillium</i> sp.	-	16	25
53	CT 11.17	<i>Aspergillus</i> sp.	17	30	-

Çizelge 4.2. İncelenen izolatların antimikrobiyal aktivite potansiyellerinde zon çapları değerleri (devam)

	<b>İzolat Kodları</b>	<b>Cins</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S.aureus</i></b>	<b><i>C.albicans</i></b>
<b>54</b>	CT 4.21	-	30	32	-
<b>55</b>	CT 4.22	<i>Aspergillus</i> sp.	34	30	-
<b>56</b>	CT 4.24	<i>Aspergillus</i> sp.	26	28	-
<b>57</b>	CT 9.13	<i>Aspergillus</i> sp.	-	26	-
<b>58</b>	CT 7.25	<i>Penicillium</i> sp.	39	42	-
<b>59</b>	TG.2S.189	-	-	27	-
<b>60</b>	TG2S.119	-	17	27	-

(-) İşaretli olan kısımlar *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri dışında olan izolatlardır.

Bu aşamadan sonra tarama sonuçlarının değerlendirilmesi üç kriter dikkate alınarak yapılmıştır. Öncelikle seçilen izolatlar cins düzeyinde tanılanarak *Aspergillus* cinsi üyeleri belirlenmiştir. Daha sonra *Aspergillus* izolatları antioksidan ve antimikrobiyal etki düzeylerine göre değerlendirilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite açısından etkili olduğu düşünülen 60 izolat arasından Gram negatif bakterilere 32 izolatın, gram pozitif bakterilere 51 izolatın ve maya suşlarına ise 32 izolat filtratının etkili olduğu gözlemlenmiştir. Gram negatif bakterilerde 32 izolat arasından 11'i *Aspergillus* üyeleri olduğu dikkate alınırsa %34,4 oranında *Aspergillus* türleri Gram negatif bakterilere etki göstermiştir. Gram pozitif bakterilerde 51 izolat arasından 19'u *Aspergillus* üyeleri olduğu dikkate alınırsa %37,3 oranında *Aspergillus* türleri Gram pozitif bakterilere etki göstermiştir. Maya suşlarında 32 izolat arasından ise 10'u *Aspergillus* üyeleri olduğu dikkate alınırsa %31,3 oranında *Aspergillus* türleri maya suşlarına etki göstermiştir.

Çizelge 4.1 ve 4.2'deki bulgular değerlendirildikten sonra seçilen 24 *Aspergillus* izolatından elde edilen filtrata kısmi saflaştırma uygulanarak biyoaktivite testleri tekrarlanmış ve bu sonuçlara göre izolatlardan birisi seçilerek devam edilmiştir.

### 4.3.Fungus izolatlarının tanımlanması

#### *Aspergillus versicolor*

Fungi

Ascomycota

Eurotiomycetes

Eurotiales

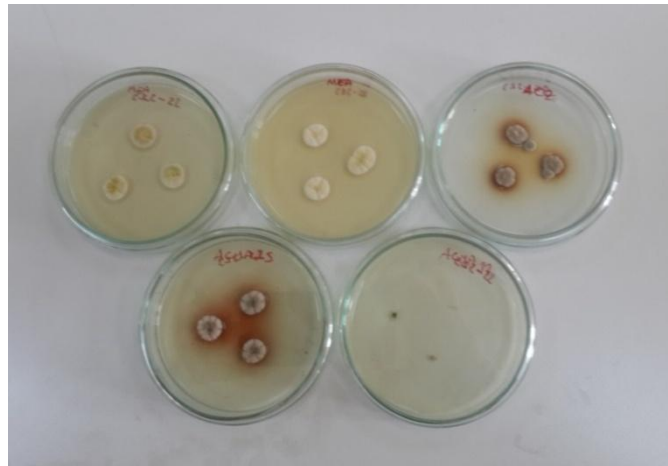
Trichocomaceae

*Aspergillus* P. Micheli, 1729

*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab.1908

**Koloni Özellikleri:** CYA25’de koloniler 15 -25 mm donuk yeşilli gri yeşil, miseller beyaz, donuk pembe, donuk pembe, deve tüyü rengi ve turuncudur. Ters kahverengi veya kırmızımsı mor tonlarındadır. MEA’da koloniler 12 -26 mm, miseller deve tüyü rengide beyaz, tersi sarı kahve, turuncu kahvedir. CYA20S’de koloniler 14–30 mm, ters ve çözünür pigment renkleri kırmızı-kahverengidir. CYA27’de 0-10 mm, renkleri CYA25 gibidir. CZ’de 15-19 mm, CYA25 ile benzer özelliktedir.

**Mikroskopik Özellikleri:** Konodial başlar ışınımsıdır. Veziküller 9-16  $\mu\text{m}$  biserialdır, metula 4-8x2-5  $\mu\text{m}$ , konidia 2-3.5  $\mu\text{m}$  ve çaplar 200-400 x 4-7  $\mu\text{m}$ ’dir (Klich, 2002).



Şekil 4.1. *Aspergillus versicolor*, MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27 °C’deki ve CYA37 besiyerinde 37 °C’deki 7 günlük koloni görüntüleri

***Aspergillus terreus***

Fungi

Ascomycota

Eurotiomycetes

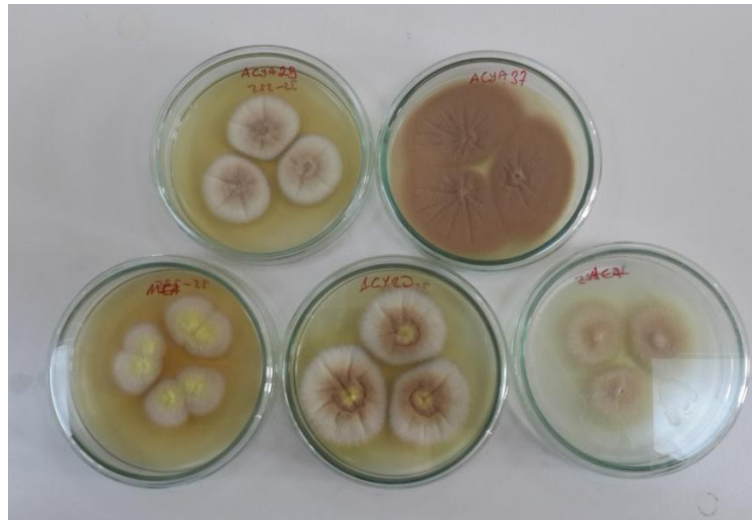
Eurotiales

Trichocomaceae

***Aspergillus*** P. Micheli, 1729***Aspergillus terreus*** Thom, 1918

**Koloni özellikleri:** CYA 25°C’de koloniler 40-80 mm, deve tüyü rengi, miseller krem si sarı renk arası, sporlandıkça kahverengileşen, düz ya da ışınsal yarıklıdır. Tersisi sarı, yaşlandıkça koyu sarıdır. MEA’da koloniler 40-60 mm, açık deve tüyü, yünümsü, ışınsal yarıklanmalar yoktur. Tersisi açık sarıdan kahverengiye doğru değişir. CY20S’de 65-70 mm koloni özelliği CYA 25 ile benzer özelliktedir. CYA37’de 65-70 mm koyu deve tüyü ve sarı değişen bir renktedir. CZ’de 30-48 mm CYA 25 ile benzer özelliktedir.

**Mikroskobik özellikleri:** Konidial başlar yoğun kolumnardır. Konidiyoforlar 100-250x4-7 µm, düz duvarlıdır. Veziküller 12-20 µm, küreselden priforma değişir. Biseriattır. Metula 5-7x2-3 µm, fiyalidler 5-7x 1,5-2-5 µm, konidium 2-2,5 µm, düz duvarlı, globozdan elipsoide değişir (Klich, 2002).



Şekil 4.2. *Aspergillus terreus*, MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27 °C’deki ve CYA37 besiyerinde 37 °C’deki 7 günlük koloni görüntüleri

*Aspergillus clavatus*

Fungi

Ascomycota

Eurotiomycetes

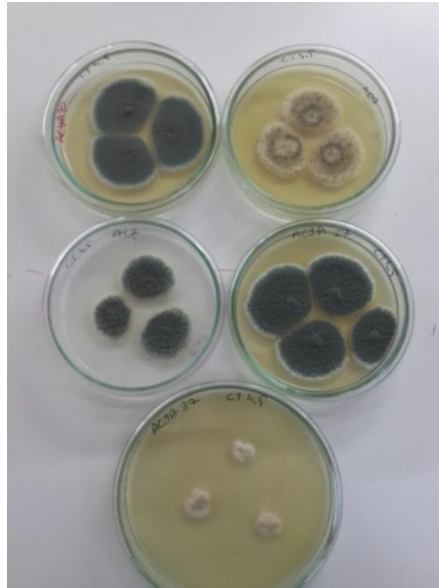
Eurotiales

Trichocomaceae

*Aspergillus* P. Micheli, 1729*Aspergillus clavatus* Desm. 1834

**Koloni Özellikleri:** CYA25’de koloniler 37-48 mm, konidia donuk yeşil, grimsi turkuaz ve koyu turkuaz, miseller beyaz, ters rengi renksiz veya kahverengimsi donuk sarıdır. MEA’da koloniler 35-45 mm, donuk yeşil, gri yeşil veya grimsi turkuaz, miseller beyazdır. CYA20S’de koloniler 35-54 mm, koloni renkleri ve dokuları CYA25 ile benzer özelliktedir. CYA37’de koloniler 8-30 mm, konidialar CYA25’e göre daha az, bazı izolatlarda yoktur. CZ ‘de koloniler 25-35 mm, CYA25 ile benzer özelliktedir.

**Mikroskobik Özellikleri:** Konidial başlar radiatdır. Stipe 500-3000x10-30 µm, düz duvarlı, veziküller 10-75 µm, conidialar 3-6x2.5-4 µm duvarlı, elipsoidal, bazen de piriformdur (Klich, 2002).



Şekil 4.3. *Aspergillus clavatus*, MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27 °C’deki ve CYA37 besiyerinde 37 °C’deki 7 günlük koloni görüntüleri

## *Aspergillus fumigatus*

Fungi

Ascomycota

Eurotiomycetes

Eurotiales

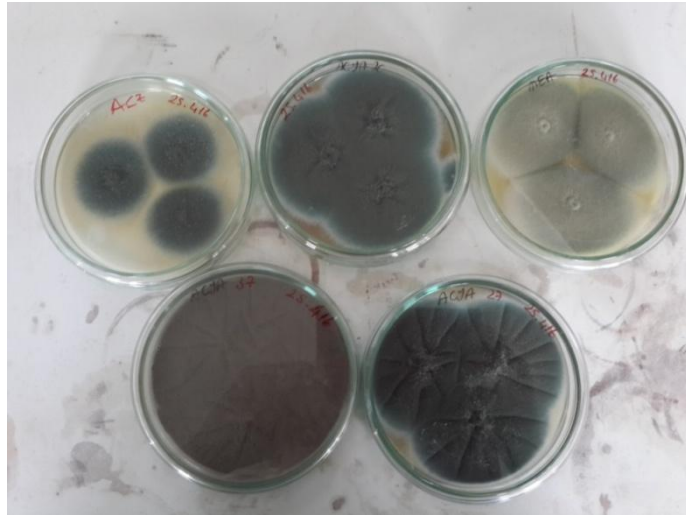
Trichocomaceae

*Aspergillus* P. Micheli, 1729

*Aspergillus fumigatus* Fresen, 1863

**Koloni Özellikleri:** CYA25’de koloniler 30-70 mm, konidialar grimsi turkuaz veya koyu turkuaz, koyu yeşil veya donuk yeşil, miseller beyaz, ters rengi renksiz, sarımsı kırmızı kahverengi veya yeşildir. MEA’da koloniler 45-70 mm, CYA25 gibi konidialar var, miseller beyaz, ters rengi renksiz, donuk sarı ve gridir. CYA20S’de koloniler 40-70 mm, renkleri ve dokuları CYA25 ile benzer özelliktedir. CYA37’de koloniler 60-70 mm, konidialar grimsi kahverengi, diğer özellikleri CYA25 ile benzer özelliktedir. CZ’de koloniler 45-60 mm koloni karakterleri CYA25 ile benzer özelliktedir.

**Mikroskopi Özellikleri:** Konidial başlar ağırlıklı olarak sütunlu, başlar düz duvarlı 200-400x5-11 µm, vezikül 15-30 µm çapında, uniseriat, fiyalitler 5-9x2-3 µm, konidialar 2-3 µm’dir (Klich, 2002).



Şekil 4.4. *Aspergillus fumigatus*, MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27 °C’deki ve CYA37 besiyerinde 37 °C’deki 7 günlük koloni görüntüleri

***Aspergillus sydowii***

Fungi

Ascomycota

Eurotiomycetes

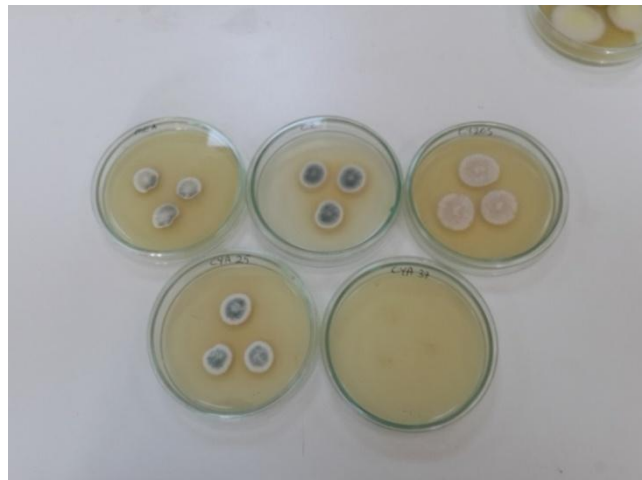
Eurotiales

Trichocomaceae

***Aspergillus*** P. Micheli, 1729***Aspergillus sydowii*** Thom & Church, 1926

**Koloni Özellikleri:** CYA25’de koloniler 20-30 mm, koyu yeşile doğru grimsi turkuaz veya koyu turkuaz, miseller beyaz, ters rengi turuncu kahve veya kestane rengidir. MEA’da koloniler 22-30 mm, grimsi turkuaz, koyu turkuaz veya koyu yeşil, miseller göze çarpmayacak şekilde beyaz, ters rengi genellikle renksiz, bazende donuk yeşil veya koyu kırmızı kahverengidir. CYA20S’de koloniler 24-35mm, excuda hariç CYA25’e benzer görünümde, doku flaccosedur. CYA37’de koloniler 2-10 mm CYA25ile benzer özellikte koloniler bazende biraz flaccose yapıdadır. CZ’de koloniler 20-27 mm, CYA25’e göre konidial renkler daha az yoğunudur.

**Mikroskobi Özellikleri:** Saplar 35-200x3-8 µm, pürüzsüz, vesikül 7-17 µm genişliğinde, genellikle biseriata, metula 4-6x2-3.5 µm, fiyalidler 5-7x2-3 µm’dir. Konidialar küresel, spinoselar pürüzlü 3-4 µm çapındadır (Klich, 2002).



Şekil 4.5. *Aspergillus sydowii*, MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27 °C’deki ve CYA37 besiyerinde 37 °C’deki 7 günlük koloni görüntüleri

*Aspergillus awamori*

Fungi

Ascomycota

Eurotiomycetes

Eurotiales

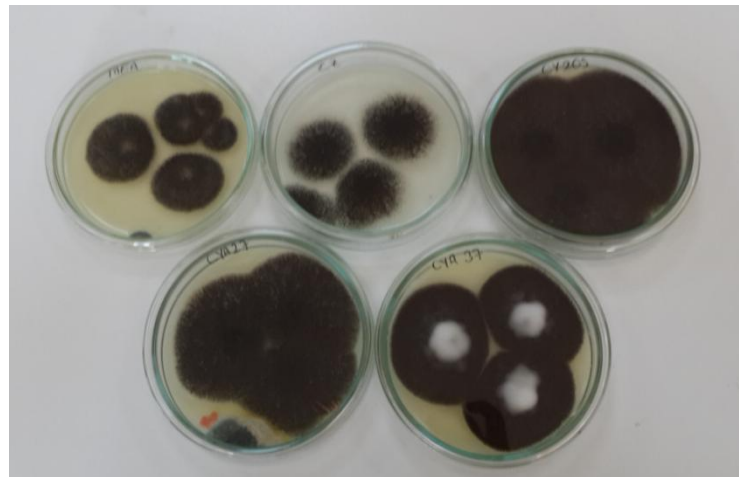
Trichocomaceae

*Aspergillus* P. Micheli, 1729

*Aspergillus awamori* Nakaz,1907

**Koloni Özellikleri:** CYA25’de koloniler 60-70 mm, konidia koyu kahverengi neredeyse siyah, miseller sarıdan beyaza, genellikle fark edilmez, bazen flaccose, ters rengi donuk kahve, donuk sarı, yoğun sarı ve gri kahverengi, mevcut olduğunda çözünür pigment donuk sarı, koloni zayıftır. MEA’da koloniler 60-70 mm, konidia koyu kahverengi neredeyse siyah, miseller genellikle fark edilmez. CYA20S (60-70 mm), CYA37 (65-75 mm) ve CZ (30-60 mm) morfolojisi ile CYA25 ile benzer özelliktedir. CYA37’nin ters rengi koyu kahve neredeyse siyahtır.

**Mikroskopi Özellikleri:** Konidial başlar radiat, başlar 300-1500x7-17 µm, düz duvarlı, vezikül globose, 20-40 µm, ağırlıklı olarak biseriata, metula 10-20x4-8 µm, en azından vezikülün üst yarısında, fiyalid 6-9x2,5-4 µm, konidia 4-5 µm çapında, küresel ve pürüzsüzdür (Klich, 2002).



Şekil 4.6. *Aspergillus awamori*, MEA, CYA27, CY20S, CZ besiyerlerinde 27 °C’deki ve CYA37 besiyerinde 37 °C’deki 7 günlük koloni görüntüleri



#### 4.4. Kısmi saflaştırma ve değerlendirme

Serbest radikal süpürücü etkisi ve antimikrobiyal aktivite açısından en iyi sonuç veren 24 *Aspergillus* izolatu için filtrata kısmi saflaştırılma uygulanmıştır. Filtrat hacmi 1:1 etil asetat ile ekstrakte edilip organik faz uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen özüt ile çalışılmıştır. Serbest radikal süpürücü etkisi yine DPPH ile 3 tekrar, antimikrobiyal aktivite testi ise 2 tekrar yapılmıştır. Elde edilen serbest radikal süpürücü etki verileri çizelge 4.3’de, antimikrobiyal aktivite verileri ise çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Tür isimleri ve kısmi saflaştırılma sonucu elde edilen özütlerin antioksidan aktivitesi (Kontrol değeri; 0,633: BHT; %76,30: Askorbik Asit; %74,72)

	Tür Kodları	Tür Adı	DPPH absorbans (% inhibisyon)
<b>1</b>	<b>CT 4.24</b>	<i>Aspergillus clavatus</i>	<b>0,077( 88,77) ±0,48</b>
<b>2</b>	CT 9.13	<i>A. clavatus</i>	0,149(76,45)±0,64
<b>3</b>	CT 4.5	<i>A. clavatus</i>	0,255(59,65)±0,85
<b>4</b>	CT 11.17	<i>A. clavatus</i>	0,086(86,35)±1,01
<b>5</b>	CT 4.22	<i>A. clavatus</i>	0,229(63,82)±0,16
<b>6</b>	CT 4.8	<i>A. clavatus</i>	0,107(83,04)±0,37
<b>7</b>	CT 8.12	<i>A. fumigatus</i>	0,087(86,14) ±0,43
<b>8</b>	1S 300	<i>A. fumigatus</i>	0,117(81,40) ±0,43
<b>9</b>	1S 335	<i>A. fumigatus</i>	0,112(82,19) ±0,68
<b>10</b>	2S 144	<i>A. fumigatus</i>	0,233(63,08) ±0,58
<b>11</b>	CT 5.4	<i>A. fumigatus</i>	0,177(71,98) ±0,53
<b>12</b>	CT 6.14	<i>A. fumigatus</i>	0,089(85,93) ±0,16
<b>13</b>	2S 416	<i>A. fumigatus</i>	0,105(83,35) ±0,53
<b>14</b>	3S 124	<i>A. fumigatus</i>	0,351(44,54) ±0,32
<b>15</b>	2S 336	<i>A. fumigatus</i>	0,057(90,88) ±0,43
<b>16</b>	2S 361	<i>A. fumigatus</i>	0,087(86,24) ±0,33
<b>17</b>	2S 302	<i>A. fumigatus</i>	0,243(61,55) ±0,69
<b>18</b>	2T 126	<i>A. terreus</i>	0,071(88,67) ±0,27
<b>19</b>	3S 325	<i>A. terreus</i>	0,194(69,24) ±0,27
<b>20</b>	1T 115	<i>A. terreus</i>	0,213(66,34) ±0,48
<b>21</b>	1T 401	<i>A. terreus</i>	0,215(65,97) ±0,22
<b>22</b>	2S 421	<i>A. awamori</i>	0,114(81,88) ±0,42
<b>23</b>	1S 63	<i>A. sydowii</i>	0,172(72,82) ±0,32
<b>24</b>	3S 323	<i>A. versicolor</i>	0,059(90,62) ±0,37

Fungal izolatların DPPH radikaline göstermiş olduğu absorbands ne kadar düşük ise serbest radikal süpürücü etkisi o kadar yüksek demektir. Bu absorbands değerlerinin % inhibisyon cinsinden hesaplanarak ifade edilmesi aktivitelerin karşılaştırılması ve yorumlanması açısından kolaylık sağlamaktadır. % inhibisyon sonuçları 44,70 ile 90,99 arasında değişiklik göstermektedir. CT 4.24 kodlu *Aspergillus clavatus* (88,78), 2S 336 kodlu *A. fumigatus* (90,99), 2T 126 kodlu *A. terreus* (88,94), 3S 323 kodlu *A. versicolor* (90,52) en yüksek inhibisyon yüzdesine sahip izolatlar olarak öne çıkmaktadır. Antimikrobiyal aktivite sonuçları da dikkate alınarak çalışmaya hangi izolat ile devam edileceğine karar verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tür isimleri ve kısmi saflaştırılma sonucu elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri(zon çapları, mm)

	<b>Tür Kodları</b>	<b>Tür Adı</b>	<b><i>E.coli</i></b>	<b><i>S.aureus</i></b>	<b><i>C.albicans</i></b>
<b>1</b>	<b>CT 4.24</b>	<b><i>Aspergillus clavatus</i></b>	<b>38</b>	<b>34</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	CT 9.13	<i>A. clavatus</i>	x	x	x
<b>3</b>	CT 4.5	<i>A. clavatus</i>	x	x	x
<b>4</b>	CT 11.17	<i>A. clavatus</i>	x	x	x
<b>5</b>	CT 4.22	<i>A. clavatus</i>	x	x	x
<b>6</b>	CT 4.8	<i>A. clavatus</i>	x	x	22
<b>7</b>	CT 8.12	<i>A. fumigatus</i>	18	31	16
<b>8</b>	1S 300	<i>A. fumigatus</i>	x	x	x
<b>9</b>	1S 335	<i>A. fumigatus</i>	x	20	x
<b>10</b>	2S 144	<i>A. fumigatus</i>	x	16	x
<b>11</b>	CT 5.4	<i>A. fumigatus</i>	x	x	x
<b>12</b>	CT 6.14	<i>A. fumigatus</i>	14	21	x
<b>13</b>	2S 416	<i>A. fumigatus</i>	x	20	x
<b>14</b>	3S 124	<i>A.fumigatus</i>	31	34	40
<b>15</b>	2S 336	<i>A. fumigatus</i>	x	25	22
<b>16</b>	2S 361	<i>A. fumigatus</i>	17	24	20
<b>17</b>	2S 302	<i>A. fumigatus</i>	x	x	x
<b>18</b>	2T 126	<i>A. terreus</i>	17	23	x
<b>19</b>	3S 325	<i>A. terreus</i>	34	35	37
<b>20</b>	1T 115	<i>A. terreus</i>	33	35	34
<b>21</b>	1T 401	<i>A. terreus</i>	30	20	40
<b>22</b>	2S 421	<i>A. awamori</i>	x	x	x
<b>23</b>	1S 63	<i>A. sydowii</i>	39	32	39
<b>24</b>	3S 323	<i>A versicolor</i>	x	x	x

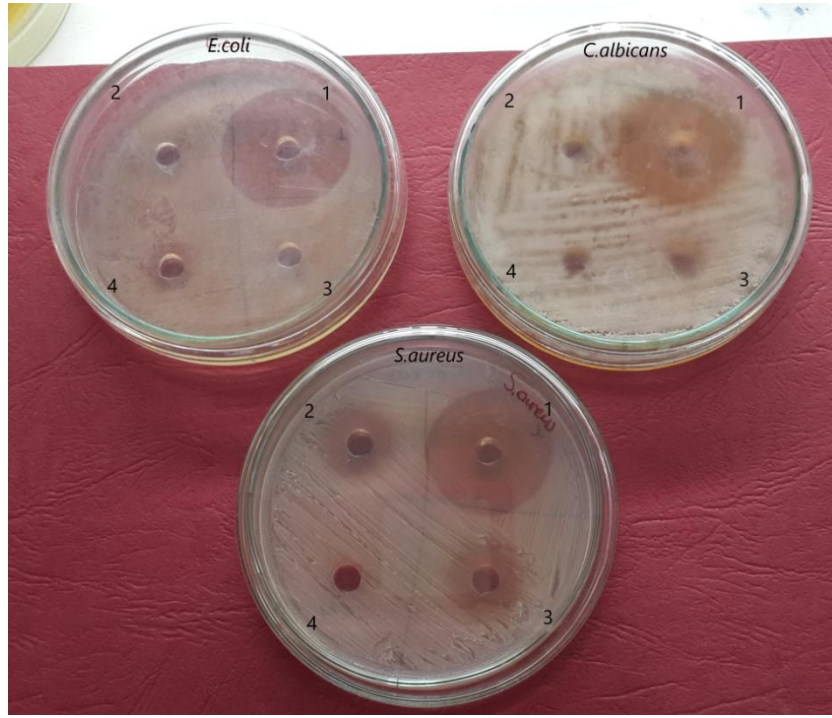
Çizelge 4.4. Tür isimleri ve kısmi saflaştırılma sonucu elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri (devam)

	<b>Tür Kodları</b>	<b>Tür Adı</b>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
<b>Pozitif kontrol</b>	Vancomycin		12	25	x
<b>Pozitif kontrol</b>	Cephalothin		23	45	x
<b>Pozitif kontrol</b>	Flukonazol		x	x	30

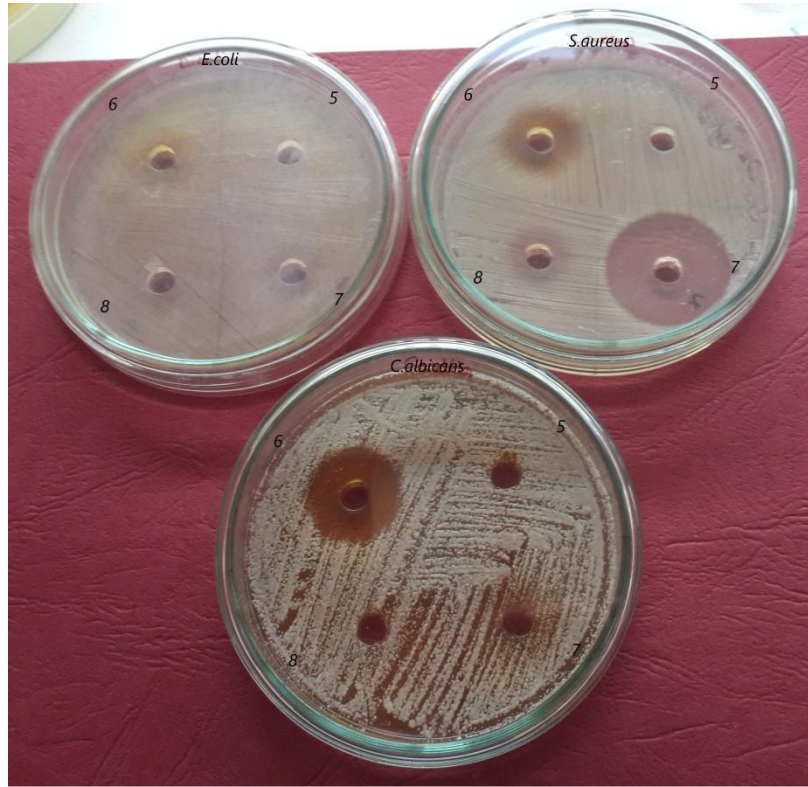
Çizelge 4.4’de verilen her bir fungal izolata ait kısmi saflaştırılmış özütün *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*’a etkisi plaklarda oluşturdukları zon çaplarına (mm) göre karşılaştırılmıştır. 24 özütten 10’unun gram negatif bir bakteri olan *E. coli* üzerine oluşturduğu antibakteriyal etkiyi ifade eden zon çapı 14-39 mm arasında değişiklik gösterirken 13 özütün *S. aureus*’a karşı oluşturduğu zon çapı 16-35 mm arasında değişiklik göstermektedir. *C. albicans*’a karşı 10 izolat tarafından oluşturulan zon çapları ise 16-40 mm arasında değişiklik göstermektedir. *A. clavatus*, *A. fumigatus* ve *A. sydowii* arasında üç test organizmasına da etki gösteren izolatların olduğu görülmektedir. Bu durum izolatların ya geniş spektrumlu etken maddeler oluşturduğunu ya da ham özüt içinde üç grup organizmaya etki eden ayrı etken maddelerin varlığına işaret etmektedir.

Antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi kayda değer oranda yüksek etkiye sahip izolat sayısının fazla olması, çalışmanın devamında yapılacak olan optimizasyon sürecinde kullanılacak fungal izolatin seçimini zorlaştırmıştır. En yüksek etki gösteren izolatla devam etmek yerine hem antioksidan hem de antimikrobiyal etki açısından güçlü olan izolatin seçimine gidilmiş ve CT 4.24 kodlu *A. clavatus*’da karar kılınmıştır. Ayrıca literatür taramalarında bu tür ile yapılan benzer çalışmaların az olması bu yönde karar almamızda etkili olmuştur.

CT 4.24. kodlu izolat 2014 yılında İzmir Çamaltı Tuzlasından izole edilmiştir.



Şekil 4.7. *Aspergillus* türlerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki



Şekil 4.8. *Aspergillus* türlerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki



Şekil 4.9. *Aspergillus* türlerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki

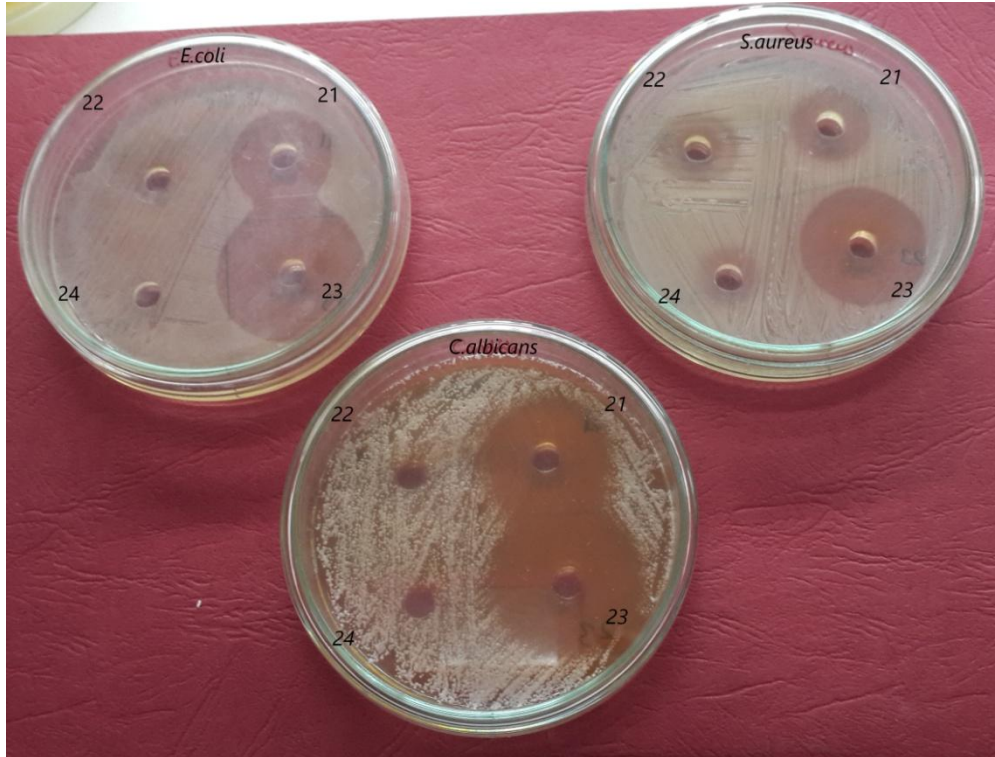


Şekil 4.10. *Aspergillus* türlerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki

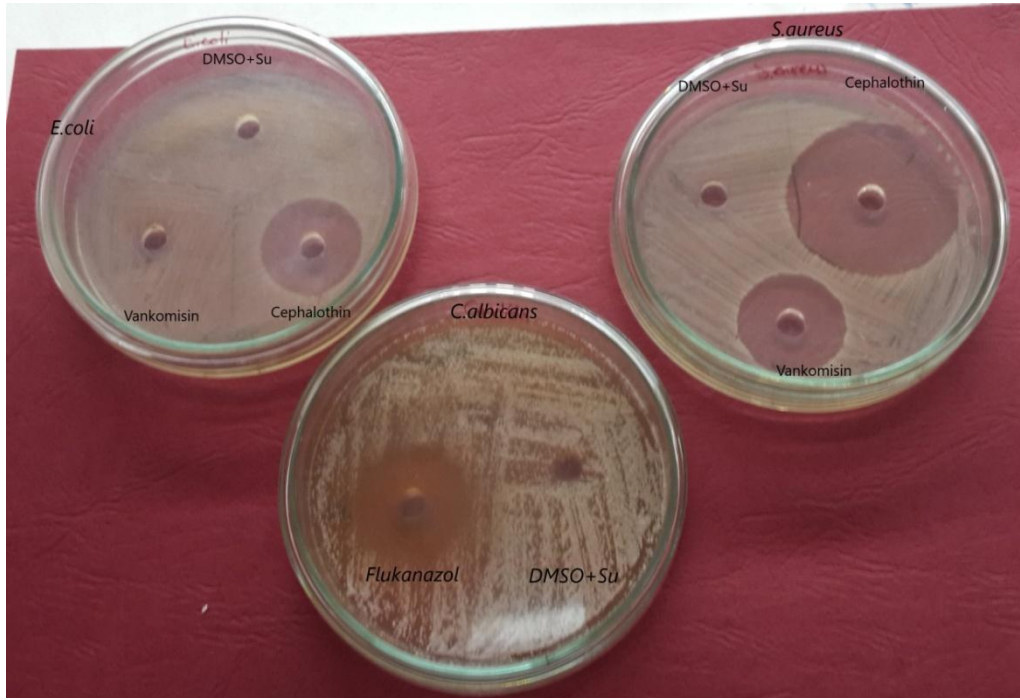




Şekil 4.11. *Aspergillus* türlerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki



Şekil 4.12. *Aspergillus* türlerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki



Şekil 4.13. Vancomycin, cephalothin, flukanazol kontrol antibiyotiklerinin *E.coli*, *S.aureus* ve *C.albicans*'ın antimikrobiyal aktivitede test organizmalarına gösterdikleri etki

Yukarıda belirtilen değerlendirmeler sonucunda yüksek antibakteriyal ve antifungal etki gösteren fungal izolat *Aspergillus clavatus* ile çalışılmaya devam edilmiştir.

#### 4.5.Deneysel tasarım bulgularının değerlendirilmesi

Son olarak seçilen *Aspergillus clavatus* CT 4.24 izolatının etken madde üretim koşullarını optimize etmek üzere istatistiksel deneysel tasarım modelleri uygulanmıştır. Öncelikle literatüre dayalı olarak *A. clavatus* tarafından etken madde üretiminde kullanılacak karbon kaynağı, azot kaynağı vb. gibi besiyeri ortamı bileşenlerinin seçimini yapmak üzere Plackett-Burman deney tasarımı kullanılmıştır. Nişasta, Sükroz, Glukoz ve Gliserol olmak üzere 4 farklı karbon kaynağı, Maya Özütü, Pepton, Soya Unu ve Kazein olmak üzere 4 farklı azot kaynağı ile NaCl, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> olmak üzere diğer besiyeri bileşenlerinin etken madde üretimi için gerekliliği ve önemini belirlemek üzere deney tasarımı bulguları değerlendirilmiştir.

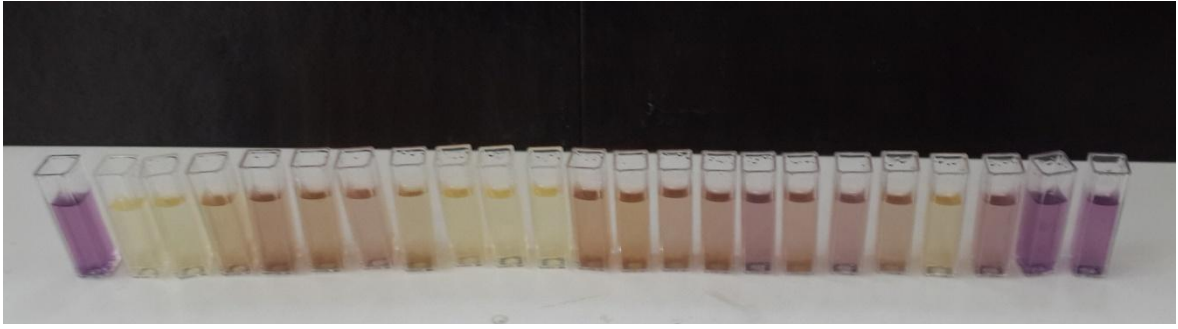
Plackett–Burman deney tasarımı kullanılarak 12 değişkenin etkisinin araştırılması için kurulan 20 tasarımın sonunda serbest radikal süpürücü etkileri % inhibisyon cinsinden Çizelge 4.5’de verilmiştir

Çizelge 4.5. Plackett- Burman deneysel tasarımı

Değişken Deneme	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	% İnhibisyon
1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	<b>87,38</b>
2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	<b>86,10</b>
3	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	62,30
4	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	38,65
5	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	53,35
6	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	58,46
7	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	70,60
8	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	<b>83,22</b>
9	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	<b>86,26</b>
10	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<b>86,58</b>
11	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	47,76
12	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	49,68
13	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	53,03
14	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	45,20
15	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	27,95
16	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	49,52
17	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	40,25
18	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	55,27
19	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	72,04
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,85

(A;Nişasta, B;Sükroz, C; Glukoz, D; Gliserol, E; Maya Özütü, F; Pepton, G; Soya Unu, H; Kazein, J; NaCl, K; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)





Şekil 4.14. Plackett- Burman deneysel tasarımındaki filtratların DPPH radikalini süpürücü etkisi

Çizelge 4.6. Plackett-Burman deney tasarımındaki varyans analizi sonuçları

Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	12	6221,31	92,97%	6221,31	518,44	7,72	0,006
Linear	12	6221,31	92,97%	6221,31	518,44	7,72	0,006
A(Nişasta)	1	1129,96	16,89%	1119,07	1119,07	16,66	<b>0,005</b>
B(Sükroz)	1	1258,17	18,80%	1245,03	1245,03	18,53	<b>0,004</b>
C(Glukoz)	1	1485,57	22,20%	1428,67	1428,67	21,27	<b>0,002</b>
D(Gliserol)	1	595,25	8,90%	592,99	592,99	8,83	<b>0,021</b>
E(Maya Özütü)	1	173,87	2,60%	162,81	162,81	2,42	0,163
F(Pepton)	1	731,20	10,93%	699,08	699,08	10,41	<b>0,015</b>
G(Soya Unu)	1	488,96	7,31%	488,18	488,18	7,27	<b>0,031</b>
H(Kazein)	1	88,24	1,32%	64,34	64,34	0,96	0,360
J(NaCl)	1	100,87	1,51%	111,71	111,71	1,66	0,238
K(MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	1	26,98	0,40%	32,48	32,48	0,48	0,509
L(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1	45,75	0,68%	30,82	30,82	0,46	0,520
M(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1	96,49	1,44%	96,49	96,49	1,44	0,270
Error	7	470,22	7,03%	470,22	67,17		
Total	19	6691,53	100,00%				

Çizelge 4.6’da verilen varyans analizi tablosuna göre, model ve doğrusal etki anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). İnhibisyon üzerinde doğrusal etki gösterdiği görülen A(Nişasta), B(Sükroz), C(Glukoz), D(Gliserol), F(Pepton) ve G(Soya unu) etkileri anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Diğer etkiler anlamsızdır.

Çizelge 4.7. Plackett-Burman deney tasarımındaki regresyon analizi sonuçları

S	R-sq	R-sq(adj)	PRESS	R-sq(pred)
8,19598	92,97%	80,93%	3546,40	47,00%

Şekil 4.7’de yapılan regresyon analizi sonuçlarına göre, bağımsız değişkenlerin (A,B,C, ... ,M) bağımlı değişkeni (inhibisyon) açıklama oranı %93 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8. Kodlanmış katsayılar

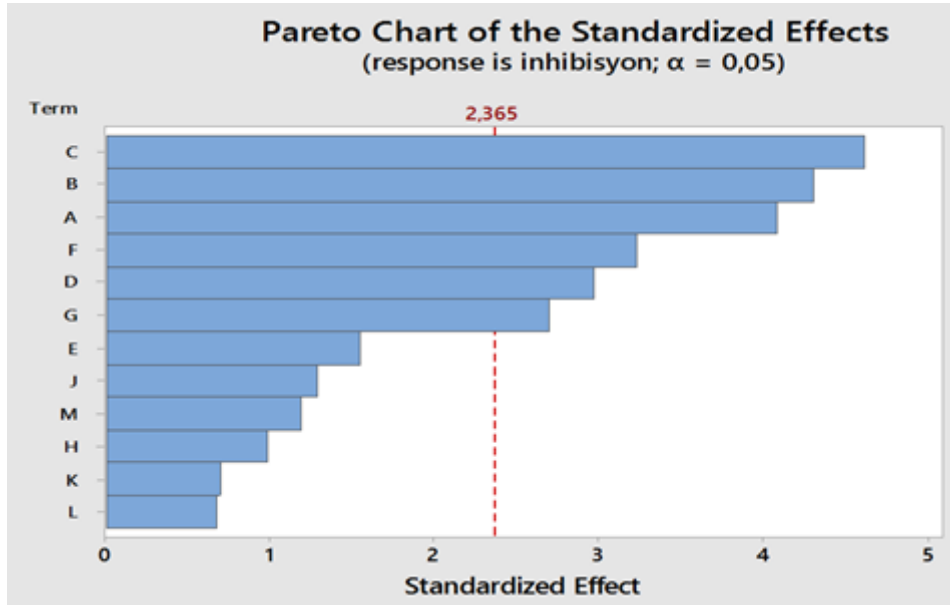
Term	Effect	Coef	SE Coef	95% CI	T-Value	P-Value	VIF
Constant		59,51	1,86	(55,12;63,90)	32,07	0,000	
A	15,15	7,58	1,86	(3,19; 11,96)	4,08	0,005	1,03
B	15,98	7,99	1,86	( 3,60; 12,38)	4,31	0,004	1,03
C	17,12	8,56	1,86	(4,17; 12,95)	4,61	0,002	1,03
D	11,03	5,51	1,86	( 1,13; 9,90)	2,97	0,021	1,03
E	5,78	2,89	1,86	(-1,50; 7,28)	1,56	0,163	1,03
F	-11,98	-5,99	1,86	(-10,38;-1,60)	-3,23	0,015	1,03
G	-10,01	-5,00	1,86	(-9,39;-0,61)	-2,70	0,031	1,03
H	-3,83	-1,92	1,86	( -6,55; 2,71)	-0,98	0,360	1,13
J	4,79	2,39	1,86	( -2,00; 6,78)	1,29	0,238	1,03
K	2,58	1,29	1,86	(-3,10; 5,68)	0,70	0,509	1,03
L	-2,65	-1,33	1,86	( -5,96; 3,30)	-0,68	0,520	1,13
M	4,45	2,22	1,86	(-2,16;6,61)	1,20	0,270	1,03

Bağımsız değişkenlerden A(Nişasta), B(Sükroz), C(Glukoz), D(Gliserol), F(Pepton) ve G(Soya unu) değişkenleri anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Diğer değişkenler anlamsızdır.

Şekil 4.8'deki coefficient sütunundaki değerler alınarak aşağıda verilen regresyon denklemi bulunmuştur. .

$$\text{inhibisyon} = 59,51 + 7,58 A + 7,99 B + 8,56 C + 5,51 D + 2,89 E - 5,99 F - 5,00 G - 1,92 H + 2,39 J + 1,29 K - 1,33 L + 2,22 M$$

Şekil 4.15'de verilen pareto grafiğinden görüleceği üzere, referans çizgisinin sağında kalan etkilerin anlamlı olduğu sonucuna ulaşılır. Buna göre, A (Nişasta), B (Sükroz), C (Glukoz), D (Gliserol), F (Pepton) ve G (Soya unu) etkileri anlamlıdır.



Şekil 4.15 Plackett- Burman deney tasarımındaki standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği (A;Nişasta, B;Sükroz, C; Glukoz, D; Gliserol, E; Maya Özütü, F; Pepton, G; Soya Unu, H; Kazein, J; NaCl, K; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Plackett–Burman deney tasarımı sonucu denen karbon kaynaklarından üçünün de antioksidan aktiviteyi olumlu yönde etkilediği (C,B,A ve D)görülmektedir (Şekil 4.15) Bu durumda glukozun maliyeti ile nişasta ve gliserolün daha düşük etkisi dikkate alınarak karbon kaynaklarından sükroza öncelik verilmiştir. Chandra ve Arora (2014b), Hindistan'ın farklı bölgelerinden izole edilen iki *Aspergillus* straininin antioksidan potansiyellerini araştırmışlar ve farklı istatistiksel yaklaşımlar kullanarak üretim şartlarını değerlendirmişlerdir. Öncelikle klasik yöntemlerle, farklı karbon ve azot kaynaklarını denemişler, antioksidan aktivite için en uygun karbon kaynağının sükroz, olduğunu ileri sürmüşlerdir. Azot kaynaklarından sodyum nitrat, maya özütü ve peptonun önemli olduğunu belirtmişler ancak sodyum nitratın verimi en fazla etkileyen azot kaynağı olduğunu rapor etmişlerdir (Chandra ve Arora 2014b). Çalışmamızda ise azot kaynaklarından pepton (F) soya unundan (G) daha etkili olması nedeniyle önemli bulunmuştur.

#### 4.6. Çok etmenli ( Full faktöriyel) değerleri

Full Faktöriyel denemelerinde değişkenler olarak (i) sukrozun üç farklı konsantrasyonu, (ii) peptonun üç farklı konsantrasyonu ve (iii) NaCl'ün üç farklı konsantrasyonu esas alınmıştır. Full faktöriyel deney tasarımında kullanılan 3 farklı değişkenin etkisinin araştırılması 2 tekrarlı 27 deney ile gerçekleştirilmiştir.

Full faktöriyel deney tasarımında kullanılan 3 farklı değişkenin (Sukroz, Pepton ve NaCl) farklı konsantrasyonları esas alındığı 27 deneyin sonuçları serbest radikal süpürücü etki cinsinden (% inhibisyon) ifade edilmiş olup Çizelge 4.9 verilmiştir.

Çizelge 4.9. Full faktöriyel deney tasarımının uygulandığı kesikli kültür sonuçları

Deneyler	Sukroz (g/l)		Pepton (g/l)		NaCl (g/l)		Antioksidan aktivite
	Gerçek	Kod	Gerçek	Kod	Gerçek	Kod	(% inhibisyon)
<b>1</b>	<b>50</b>	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>94.40</b>
2	50	1	1,5	1	3	0	94.06
3	50	1	1,5	1	1	-1	90.00
4	50	1	1,0	0	5	1	93.72
5	50	1	1,0	0	3	0	91.69
6	50	1	1	0	1	-1	90.00
7	50	1	0,5	-1	5	1	22.88
8	50	1	0,5	-1	3	0	43.38
9	50	1	0,5	-1	1	-1	47.96
10	30	0	1,5	1	5	1	92.20
11	30	0	1,5	1	3	0	93.38
12	30	0	1,5	1	1	-1	92.20
13	30	0	1	0	5	1	92.88
14	30	0	1	0	3	0	92.71
15	30	0	1	0	1	-1	92.37
16	30	0	0,5	-1	5	1	93.55
17	30	0	0,5	-1	3	0	90.00
18	30	0	0,5	-1	1	-1	92.03
19	10	-1	1,5	1	5	1	93.22
20	10	-1	1,5	1	3	0	93.72
21	10	-1	1,5	1	1	-1	93.89
22	10	-1	1	0	5	1	93.22
23	10	-1	1	0	3	0	93.72
24	10	-1	1	0	1	-1	91.18
25	10	-1	0,5	-1	5	1	90.84

Çizelge 4.9. Full faktöriyel deney tasarımının uygulandığı kesikli kültür sonuçları (devam)

Deneyle	Sukroz (g/l)		Pepton (g/l)		NaCl (g/l)		Antioksidan aktivite
	Gerçek	Kod	Gerçek	Kod	Gerçek	Kod	(% inhibisyon)
26	10	-1	0,5	-1	3	0	91.69
27	10	-1	0,5	-1	1	-1	91.01

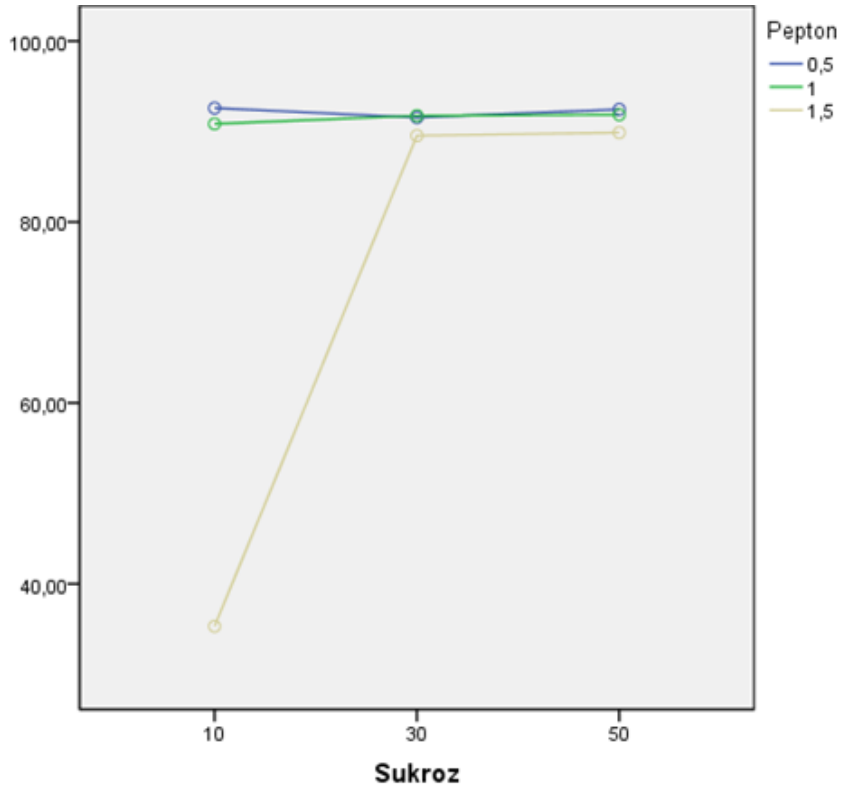
Bu sonuçlar doğrultusunda varyans analizleri, faktörlerin tek başına, ikili ve üçlü etkileşimi analizleri yapılmıştır. Deneysel tasarım sonuçları SPSS 18 yazılımı ile hesaplanmıştır. İstatistiksel temelli çalışma sonucunda antioksidan aktivite açısından elde edilen varyans analizi Çizelge 4.10'da verilmiştir. Sonuçlara göre sukroz ve pepton konsantrasyonlarının antioksidan aktiviteye neden olan etken maddelerin üretiminde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ).

Çizelge 4.10. Antioksidan aktivite için Varyans Analizi Tablosu

Kaynak	Kareler toplamı	df	Kareler Ortalaması	F	Sig.
Corrected Model	16980,907 <sup>a</sup>	26	653,112	45,572	,000
Intercept	390937,497	1	390937,497	27278,152	,000
Sukroz	4001,989	2	2000,994	139,622	,000
Pepton	4931,968	2	2465,984	172,067	,000
NaCl	9,785	2	4,893	,341	,714
Sukroz * Pepton	7847,738	4	1961,935	136,896	,000
Sukroz * NaCl	58,152	4	14,538	1,014	,417
Pepton * NaCl	26,165	4	6,541	,456	,767
Sukroz * Pepton * NaCl	105,109	8	13,139	,917	,518
Error	386,951	27	14,332		
Total	408305,355	54			
Corrected Total	17367,858	53			

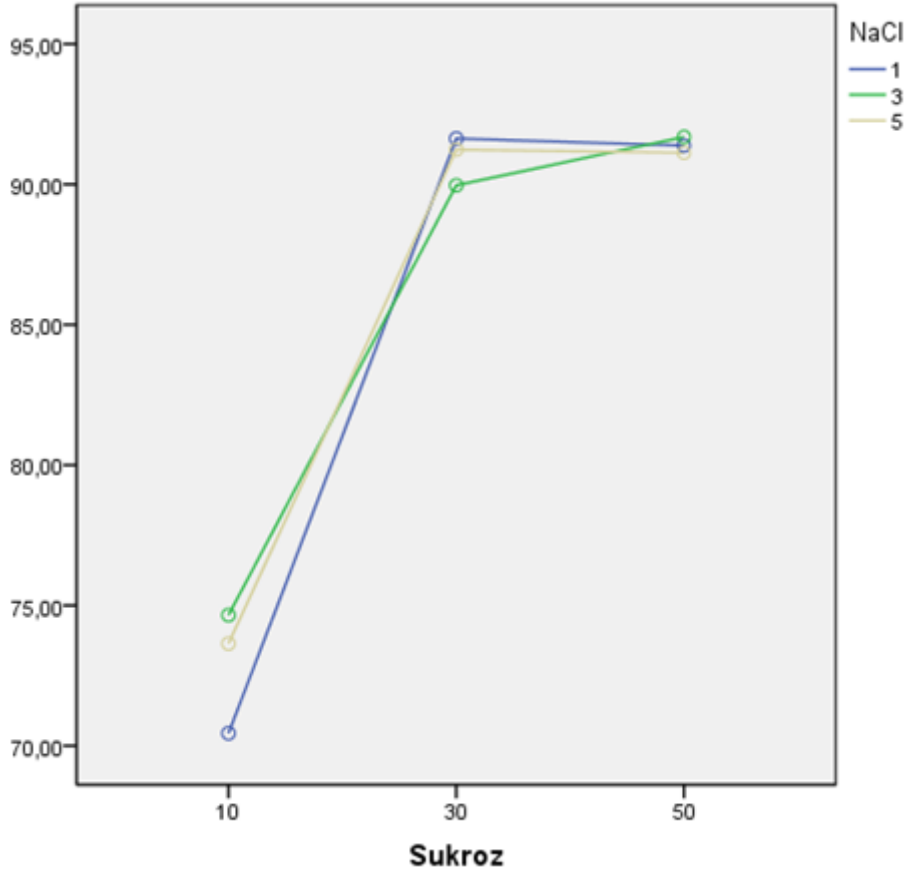
$R^2 = ,978$  (Düzeltilmiş  $R^2 = ,956$ )

Faktörler arasındaki ikili etkileşimler arasında da sukroz ve pepton birlikteliğinin, etken madde/lerin üretilmesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir (Sig. < 0,05).



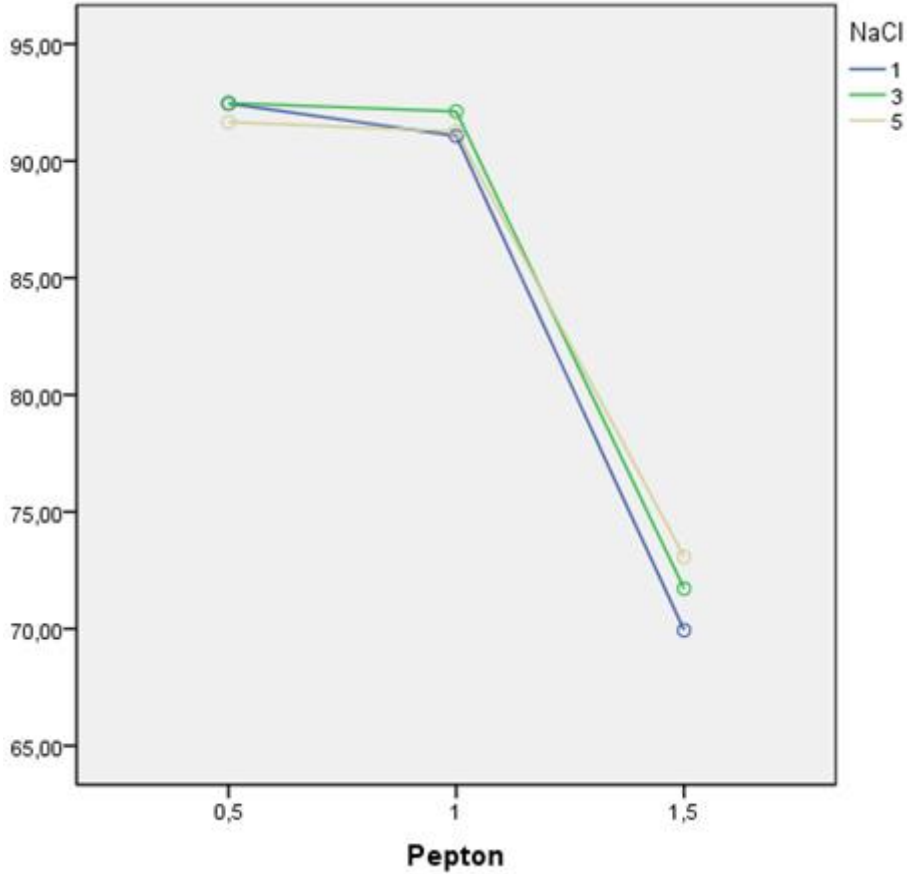
Şekil 4.16. Sukroz – Pepton konsantrasyonu etkileşim profili grafiği

Şekil 4.16’da verilen Sukroz–Pepton konsantrasyonu etkileşiminin profil grafiğine göre sukrozun her 3 konsantrasyonunda da peptonun 0,5 ve 1,0 g/l kullanıldığı konsantrasyonlarda yüksek inhibisyon yüzdesi yani yüksek oranda etken maddeler üretildiği görülmektedir.



Şekil 4.17. Sukroz–NaCl konsantrasyonu etkileşim profili grafiği

Şekil 4.17’de verilen Sukroz ve NaCl etkileşimi grafiğine göre, sukrozun 30 ve 50 g/l olduğu durumlarda üç NaCl konsantrasyonunda yüksek oranda etken madde üretimini desteklediği görülmektedir.



Şekil 4.18.Pepton–NaCl konsantrasyonu etkileşiminin profil grafiği

Şekil 4.18’de verilen Pepton ve NaCl etkileşimi grafiğine göre pepton konsantrasyonu 1,5 g/l olduğunda her 3 NaCl konsantrasyonu için de etken madde üretiminin az olduğu görülmektedir.

Pepton ve NaCl’ün Sukroz ile etkileşim grafiklerinde sukrozun 30 ve 50 g/l konsantrasyonlarında pepton ve NaCl’ün konsantrasyonuna bağlı olmaksızın üretimin yüksek olduğu dikkatini çekmektedir. Ayrıca varyans analizi sonuçları da sukroz konsantrasyonunun önemli olduğunu göstermektedir. Bu bilgiler ışığında, hipersalin sulardan izole edilmiş olması nedeniyle *A. clavatus*’un osmofilik karakterde olduğu buna bağlı olarak da su aktivitesinin düşmesiyle birlikte büyümesinin arttığı ve metabolizmaya bağlı olarak etken metabolit üretiminin de arttığını akla getirmektedir.



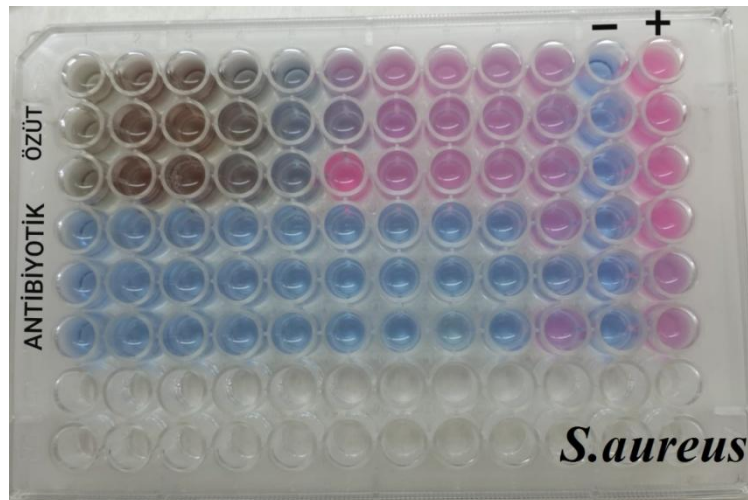
Optimizasyon çalışmaları sonrası *A. clavatus* CT 4.24'ün kültür sıvısından elde edilen etil asetat özütünün antioksidan aktivite % 88,78 olarak belirlenmiştir.

*A. clavatus* CT 4.24'ün kültür sıvısından elde edilen etil asetat özütünün antimikrobiyal aktivitesi minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) tespit edilerek değerlendirilmiştir. Test organizmaları *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* için MİK tespiti 96 kuyucuklu mikropiplaklarda gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de üç test organizması için mikropiplakların görüntüsü verilmiştir.

Çizelge 4.11. *S. aureus* MİK değerinin belirlenmesi

Kuyucuk no ve konsantrasyon serisi. µg/ml (w/v)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Başlangıç özüt konsantrasyonu 20 000 µg/ml (w/v)									
1000	500	250	125	<b>62,5</b>	31,25	15,625	7,813	3,907	1,953
Başlangıç vankomisin konsantrasyonu 15 000 µg/ml (w/v)									
750	375	187,5	93,75	46,88	23,44	11,72	5,86	<b>2,93</b>	1,46

Seri halinde oluşturulan kuyucuklara *S. aureus* inoküle edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda özütün ve Vankomisin MİK'ları *S. aureus* ATCC 29213 için sırasıyla **62,5 µg/ml** ve **2,93 µg/ml** olarak tespit edilmiştir.

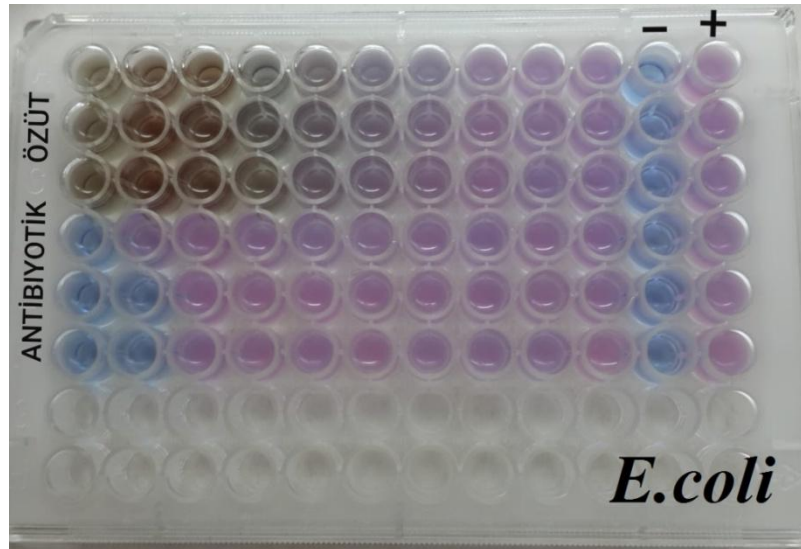


Şekil 4.19. *S. aureus* ile yapılan MİK belirleme plağı görüntüsü. Pozitif kontrol Vankomisin 1,5 mg/l

Çizelge 4.12. *E. coli* MİK değerinin belirlenmesi

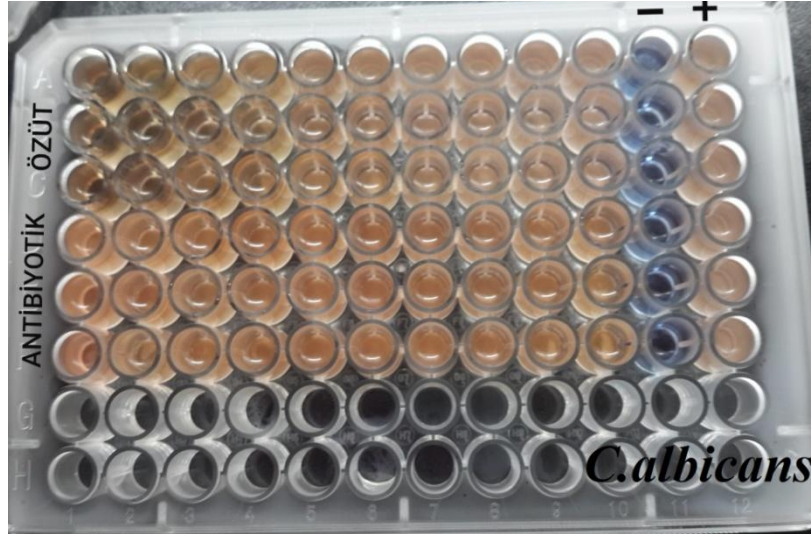
Kuyucuk no ve konsantrasyon serisi. µg/ml (w/v)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Başlangıç özüt konsantrasyonu 20 000 µg/ml (w/v)									
1000	500	250	<b>125</b>	62,5	31,25	15,625	7,813	3,907	1,953
Başlangıç vankomisin konsantrasyonu 15 000 µg/ml (w/v)									
750	<b>375</b>	187,5	93,75	46,88	23,44	11,72	5,86	2,93	1,46

Seri halinde oluşturulan kuyucuklara *E. coli* inoküle edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda özütün ve Sefalotinin MİK'ları *E. coli* ATCC 25922 için sırasıyla **125 µg/ml ve 375 µg/ml** olarak tespit edilmiştir.

Şekil 4.20. *E. coli* ile yapılan MİK belirleme plağı görüntüsü Pozitif kontrol Sefalotin 1,5 mg/lÇizelge 4.13. *C. albicans* MİK değerinin belirlenmesi

Kuyucuk no ve konsantrasyon serisi. µg/ml (w/v)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Başlangıç özüt konsantrasyonu 20 000 µg/ml (w/v)									
1000	500	250	<b>125</b>	62,5	31,25	15,625	7,813	3,907	1,953
Başlangıç vankomisin konsantrasyonu 12 500 µg/ml (w/v)									
625	312,5	156,25	78,13	39,07	19,53	9,077	4,89	2,45	1,22

Her kuyucuğa *C. albicans* inokülasyonu ve inkübasyonu sonunda özütün ve Flukanazolun MİK'ları *C. albicans* ATCC 14053 için tespit edilememiştir. MİK'in belirlenememiş olması uygun konsantrasyon aralığının belirlenememiş olması ya da maya süspansiyonunun konsantrasyonunun yüksek olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.21. *C. albicans* ile yapılan MİK belirleme plağı görüntüsü Pozitif kontrol Flukanazol 1,25 mg/l

Çizelge 4.14. MİK konsantrasyonunun değerleri( $\mu\text{g/ml}$ )

	<b>MİK değerleri</b>
<i>S.aureus</i>	62,5
<b>Vankomisin</b>	2,93
<i>E.coli</i>	125
<b>Sefalotin</b>	375
<i>C.albicans</i>	-
<b>Flukanazol</b>	-

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde azalan doğal kaynaklar sebebiyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konu üzerinde oldukça fazla çalışmalar yapılmaktadır. Mikroorganizmalar arasında funguslar önemli bir yere sahiptir. Dünya’da endüstriyel potansiyelin ortaya çıkartılması ve fungal biyoçeşitliliğin ortaya konulması için oldukça fazla çalışmalar yapılmaktadır. Bu zaman diliminde her laboratuarlarda yapılan çalışmalar sebebiyle izolat sayısı ve çeşitliliği oldukça artmaktadır. Bu izolatlar, laboratuvar ortamında bulunan personel durumu, ve laboratuvarın amacı ve işlevi vb. gibi faktörlere bağlı olarak değişik şekillerde, kapasitelerde ve seviyelerde düzenlenmektedir.

Bu çalışma kapsamında tuzlu ortamlardan izole edilmiş ve ESOGÜ Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında muhafaza edilen 300 fungal izolat arasından antimikrobiyal etki ve serbest radikal süpürücü etki gösteren türler seçilmiştir. Birinci tarama sürecinden geçen *Aspergillus*, *Penicillium* ve diğer türler olmak üzere 42 türün serbest radikal süpürücü etkileri ve antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda;

- ✓ Halofilik/halotolerant *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri biyolojik aktivite açısından önemli doğal kaynaklar olduğu,
- ✓ Aynı özütün hem güçlü antioksidan hem de antimikrobiyal aktivite gösteren etken madde/lere üretebildiği,
- ✓ *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* ve *A. sydowii* metabolitlerinin daha ileri düzeyde araştırılması gerektiği,
- ✓ CT 4.24 kodlu *A. clavatus* izolatının etken madde üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve sükrozun, azot kaynağı olarak peptonun önemli olduğu,
- ✓ CT 4.24 kodlu *A. clavatus* izolatının besiyeri bileşeni sükrozun yüksek konsantrasyonlarının etken madde üretiminde etkili olduğu,
- ✓ Peptonun düşük konsantrasyonları etkili olurken NaCl’ün yüksek konsantrasyonlarının etkili olduğu anlaşılmaktadır.

Funguslar üzerinde yapılan serbest radikal süpürücü etkisi bu çalışmanın doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin kullanımına yönelik araştırmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Daha etkin ve daha düşük yan etkiye sahip doğal antioksidanların ve antimikrobiyal maddelerin tespit edilmesi, etkilerinin ortaya konulması önde gelen beklentiler arasında yer almaktadır.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada hipersalin ortamlarından izole edilen halotolerant / halofilik fungusların yeni bir doğal antioksidan ve antimikrobiyal bileşiklerin potansiyel kaynağı olabileceğini ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aka, Y., 2007, Adana'daki Ev Dışı (Outdoor) Fungusların İzolasyonu, İdentifikasyonu, Mevsimsel Dağılımı ve Alerjik Hastalıklarla İlişkilendirilmesi, Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 13.
- Akan, E., Yerlikaya, O., Kınık, Ö., 2014, Psikrotrof Bakterilerin Çiğ Süt ve Süt Ürünleri Kalitesine Etkisi, E. Akan (Derl.), Akademik Gıda Dergisi, 12(4), 68-78 .
- Akkara, M., Tosun, H., 2014, Funguslardan Elde Edilen Endüstriyel Ürünler, M. Akkara (Derl.), Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, Cilt: 9, No: 2, (46-53).
- Arora, D.S., Chandra, P., 2010, Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions, Brazilian Journal of Microbiology, No:3, 765-777.
- Ashbell, G., Weinberg, Z.G., Hen, Y., Filya, I., 2002, The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, s. 261–263.
- Atlas, R. M., 2006, The handbook of microbiological media for the examination of food, CRC Press.
- Avcı, E., Avcı, G.A., Kose, D.A., Emniyet, A.A., Suicmez, M., 2014, *Rumex crispus* ve *Rumex crispatus*'un uçucu yağlarının in vitro antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ile GC/MS analizi, Hacettepe J. Biol. and Chem., 42 (2), 197-203.
- Aytar, P., Buruk, Y., Çabuk, A., 2013, *Streptococcus equi* ile hyaluronik asit üretiminde optimum koşulların plakett burman yöntemi ile belirlenmesi, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 11 Sayı: 1, s. 28:35.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity, Journal of Pharmaceutical Analysis, Volume 6, Issue 2, s. 71-79.
- Bills, G.F., Foster M.S., Mueller G.M., 2004, Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Elsevier Science and Technology, s. 217-343.
- Birbir, M., C. Sesal., 2003, "Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey, Turk. J. Biol, s. 7-22.
- Boligon, A.A., Machado, M.M., Athayde, M.L., 2014, Technical Evaluation of Antioxidant Activity, Medicinal chemistry, 4-7, 517-522.
- Butinar, L., Santos, S., Spencer, M.I., vd., 2005, Yeast diversity in hypersaline habitats, FEMS Microbiology Letters, s. 229–234.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chandra, P., Arora, D.S., 2014b, Antioxidant potential of two strains of *Aspergillus wentii* isolated from soil of different areas of Punjab, India and its optimization using different statistical approaches, Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 4 (4):31-41
- Chandra, P., Arora, D.S., Antioxidant potential of fungal isolates assayed through various procedures, screening of functional compounds and their purification from *Aspergillus terreus* Journal of Microbiology and Biotechnology Research., 2014, 4 (3):15-24
- Chavez, P., 2005, Poultry slaughter wastewater treatment with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, Bioresource Technology, s. 1730-1736.
- CLSI (2012a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard. CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA.
- CLSI (2012b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA.
- Çömlekçi, N., 2003, Deney Tasarımı İlke ve Teknikleri, Alfa Basım Yayım Dağıtım Ltd. Şti., s. 465.
- Doğmuş, D., Durucasu, İ., 2013, Keten Tohumu Çeşitlerinin N-Bütanol Fraksiyonlarının Fenolik Bileşenlerinin Antioksidan Aktivitesi, C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, cilt 9, sayı 1, s. 47-56.
- Erdoğan, S.S., Soylu, M.K., Başer, K.H.C., 2017, Bazı Yabani Mantarların Antioksidan Özellikleri, Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, cilt 6, s. 254-260.
- Gadd G.M., 1993, Interactions of Fungi with Toxics Metals, New Phytol, s. 25-60.
- Gerlach, W., Nirenberg, H., 1982, The genus *Fusarium*-A Pistorial Atlas Kommissionsverlag P. Parey.
- Gounot, A.M., 1986, Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms, Experientia, s. 1192-1197.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., Plemenitaš, A., 2009, Halotolerant and halophilic fungi, Mycological Research, s. 1231-1241.
- İrdem, E., 2014, İzmir Çamaltı Tuzlası Mikobiyotasının Belirlenmesi, Monaliaceae ve Teleomorfları, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kantarcıoğlu, A.S., Yücel, A., 2003, *Aspergillus* species and invasive aspergillosis: Mycology, pathogenesis, laboratory diagnosis, resistance of antifungal agents and susceptibility tests, Cerrahpaşa J Med, s. 140-157.
- Kaşık, G., 2010, Mantar Bilimi, Selçuk Üniversitesi yayınları, s. 15-432.
- Kayış, O., 2015, Çamaltı Tuzlasından İzole Edilen Mikrofungusların Karakterizasyonu, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kennedy, M., Krouse, D.J., 1999, Strategies for improving fermentation medium performance: a review, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Volume 23, Issue 6, s 456–475.
- Klich, M., 2002, Identification of Common *Aspergillus* Species, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, s. 122.
- Kocabıyık, Y.E., 2014, Tuz Gölü Mikrofungus Çeşitliliğinin Belirlenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Li, Z., Wrenn, B.A., 2004, Effects of ferric hydroxide on the anaerobic biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil in freshwater sediments, Water Research, s. 3859-3868.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker J., 2012, Brock Biology of Microorganisms, NJ, Pearson Education International, s.469-472.
- Malpure, P.P., Shah, A.S., Juvekar, A.R., 2006, Antioksidant and anti-inflammatory activity of extract obtained from *Aspergillus candidus* MTC 2002 broth filtrate, Indian Journal of Experimental Biology, s. 468-73.
- Moharram, H.A., Youssef, M.M., 2014, Methods for Determining the Antioxidant Activity, H.A. Moharram (Derl.), Alex. J. Food Science and Technology, s. 31-42.
- Muluk, Z., Kurt, S., Karağaoğlu, E., Toktamış, Ö., 2009, Deney düzenlemede istatistiksel yöntemler, Gazi Kitabevi, s. 363.
- Mutlu, M. B., Güven K., 2011, Detection of prokaryotic microbial communities of Çamaltı Saltern, Turkey, by fluorescein in situ hybridization and real-time PCR, Turk J Biol, s.687-695.
- Özgök, Ö., 2014, İzmir Çamaltı Tuzlası Mikobiyotasının Belirlenmesi, Dematiaceae, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Öztürk, N., Tunçel M., Tunçel, N.B., 2007, Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its application to Various Plant Materials, J Liq Chromatogr 30, s. 587-596.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Pitt, J.,1979, The Genus Penicillium and Its Telemorphic States Eupenicillium and Talaromyces, Academic Press Inc. Ltd., s. 634.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009, The Ecology of Fungal Food Spoilage. In: Fungi and Food Spoilage. Springer, Boston, MA, s.3-9.
- Raper, K., Fennell, D., 1965, The Genus Aspergillus, Baltimore, USA, The Williams and Wilkins Comp.
- Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., 2009, Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, Clinical Infectious Diseases, s. 1749–1755.
- Rothschild, L.J., ve Mancinelli, R.L., 2001, Life in extreme environments nature international journal of science, Nature International Journal of Science, volume 409, s.1092–1101.
- Samanta, I., 2015, General Characteristics of Fungi, In: Veterinary Mycology, Springer, New Delhi, s. 3-8.
- Süleyman, H., Gül, V., Erhan, E., 2018, Oksidatif Stres ve Doku Hasarı, H. Süleyman (Derl.), Erzincan Tıp Dergisi, Cilt:1 Sayı:1.
- Sümer, S., 2006, Genel Mikoloji, 1. Baskı, Nobel yayın, Ankara.
- Van Den Burg, B., 2003, Extremophiles as a source for novel enzymes, Currents Opinion in Microbiology, s.213-218
- Yadav, M., Yadav, A., Yadav, J.P., 2014, In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from Eugenia jambolana Lam, Asian Pac J Trop Med, s.256-261
- Yavaşer, R., 2011, Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yılmaz, A., 2015, Bazı Doğa ve Kültür Mantarı Türlerinin Biyoaktif Özelliklerinin ve Radyoaktif Element Miktarlarının Belirlenmesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.