

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**ANAEROBİK FUNGUSLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN
SEKONDER METABOLİTLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ**

Zehra GÜLER ÖKDİMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ANAEROBİK FUNGUSLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN
SEKONDER METABOLİTLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ**

Zehra GÜLER ÖKDEMİR
(190090006)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ANAEROBİK FUNGUSLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN
SEKONDER METABOLİTLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİ

Zehra GÜLER ÖKDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 10/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oy birliği/oy çokluğu** ile kabul edilmiştir.

İmza
Doç. Dr. Ahmet Yusuf
ŞENGÜL
Bingöl Üniversitesi
BAŞKAN

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Bülent
KAR
Munzur Üniversitesi
DANIŞMAN

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can
YAZDIÇ
Munzur Üniversitesi
ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Murat KORUNUR

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB021-33

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu”ndaki hükümlere tabidir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
Zehra GÜLER ÖKDEMİR

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam sürecinde desteklerini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR' a çalışmalarım süresince ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi, kaynak vb. durumlar için destek olan, gerek kişisel gerekse bilimsel tecrübeleriyle bana bakış açısı kazandıran değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ' a Sayın Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN' a ve sevgili eşim Güven Metin ÖKDEMİR' e çok teşekkür ederim.

Zehra GÜLER ÖKDEMİR
TUNCELİ - 2023



İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜRLER.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
RESİMLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Farmakognozi	1
1.2. Yeni Antibiyotiklerin Keşfi	1
1.3. Funguslarda Sekonder Metabolizması.....	2
1.4. SM' lerin Kimyasal Aileleri.....	2
1.4.1. Poliketidler	3
1.4.2. Ribozomal olmayan peptitler	5
1.4.3. Hibrit ribozomal olmayan peptid/ poliketidler	6
1.4.4. Terpenoidler.....	6
1.5. SM Genlerinin Genetik Organizasyonu ve Düzenlenmesi.....	7
1.6. Sekonder Metabolitlerin Fonksiyonları ve Uygulamaları	9
1.7. Anaerobik Gut Fungus Cinsleri ve Özellikleri	11
1.7.1. Caecomyces sp.	14
1.7.2. Neocallimastix sp.	14
1.7.3. Piromyces sp.....	14
1.7.4. Orpinomyces sp.	14
1.7.5. Anaeromyces sp.....	15
1.7.6. Cyllamyces sp.....	15
1.7.7. Feramyces sp.	15
1.7.8. Pecaromyces sp.	15
1.7.9. Oontomyces sp.	15
1.7.10. Buwchfawromyces sp.....	15
1.7.11. Liebetanzomyces sp.....	16
1.7.12. Ghazallomyces sp.	16
1.7.13. Aklioshbomyces sp.....	16
1.7.14. Agriosmyces sp.	16
1.7.15. Capellomyces sp.	16
1.7.16. Joblinomyces sp.....	16
1.7.17. Khoyollomyces sp.	17
1.7.18. Tahromyces sp.....	17
1.7.19. Aestipascumyces sp.....	17
1.7.20. Paucimyces sp.	17
2. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ	18
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Anaerobik Besiyeri	19
3.2. Anaerobik Fungusların İzolasyonu.....	19
3.3. Anaerobik Fungusların Saflaştırılması	20
3.4. Anaerobik Fungusların Tanımlanması	21

3.5. Anaerobik Fungusların Stoklarının Oluşturulması	21
3.6. Patojen Bakteriler İçin Kullanılacak Besiyerleri	22
3.7. Test Bakterileri	23
3.8. Anaerobik Fungusların Besiyerine Aşılması ve Metabolit Oluşumu	23
3.8.1. Ekstraksiyon	23
3.8.2. Buharlaştırma	25
3.8.3. Biyolojik ölçüm	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1. AGF İzolasyonu.....	26
4.2. Anaerobik Gut Fungusların Saflaştırılması	26
4.3. Anaerobik Gut Fungusların Tanımlanması	27
4.4. Anaerobik Fungusların Stoklarının Oluşturulması.....	28
4.5. AGF Sekonder Metabolit Üretimi	28
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
6. KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Açıklanan dört ana aileden temsili SM' lerin kimyasal yapıları	4
Şekil 3.1. Ekstraksiyon yöntemi şeması.....	24



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Rüminal anaerobik fungusların sınıflandırılması ve farklı morfolojik özellikleri gösterilmiştir	12
Tablo 3.1. Nutrientbuyyon (difco) içeriği	22
Tablo 3.2. Muellerhintonagar (mha-difco) içeriği	22
Tablo 4.1. <i>Neocallimastix</i> sp. MGLF-4'ün <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	31
Tablo 4.2. <i>Neocallimastix</i> sp. MGLF-4'ün <i>Escherichia coli</i> 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	32
Tablo 4.3. <i>Neocallimastix</i> sp. MGLF-4'ün <i>Enterococcus faecalis</i> 'ya karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	34
Tablo 4.4. <i>Neocallimastix</i> sp. MGLF-4'ün <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	36
Tablo 4.5. <i>Piromyces</i> sp. MGLF-4'ün <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	38
Tablo 4.6. <i>Piromyces</i> sp. MGLF-4'ün <i>Escherichia coli</i> 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	40
Tablo 4.7. <i>Piromyces</i> sp. MGLF-4'ün <i>Enterococcus faecalis</i> 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)	42
Tablo 4.8. <i>Piromyces</i> sp. MGLF-4'ün <i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i> 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite, tespit edilemedi (-*-*)	44
Tablo 4.9. Antimikrobiyal aktivite kontrol grubu (Ortalama değerler- mm).....	46

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. Dışkı örneklerinin alınması.....	19
Resim 3.2. Anaerobik gut funguslarının izolasyonu.....	20
Resim 3.3. Anaerobik fungusların saflaştırılması.....	21
Resim 3.4. Anaerobik fungusların muhafaza edildiği sıvı azot tankı.....	22
Resim 3.5. Ekstraksiyon.....	24
Resim 4.1. Rumen fungusları bitki hücre duvarlarını hızlı bir şekilde kolonize etmektedirler. Anaerobik fungus kültürü (A), monosentrik bir fungus (B) ve polisentrik bir fungusun kolonizasyonunun başlangıcı.....	27
Resim 4.2. Anaerobik fungusların tanımlanan cinsleri(A:Neocallimastix sp.B: Piromyces sp.).....	27
Resim 4.3. Petri Şekilleri.....	29

KISALTMALAR LİSTESİ

**	: Tespit Edilemedi
A	: Adenilasyon
ACP	: Asil Taşıyıcı Protein
AGF	: Aneorobik Gut Fungus
AT	: Asiltransferaz
C	: Yoğunlaştırma Alanları
DH	: Dehidrataz
DMAPP	: Dimetilallil Difosfat
E	: Epimerizasyona
ER	: Enol Redüktaz
FPP	: Farnesil Difosfat
GPP	: Difosfattır
HC	: Kondenzasyon / Heterosiklizasyon
IPP	: İzopentenil Difosfattan
KR	: Ketoredüktaz
KS	: Ketosentaz
M	: Metilasyona
MRSA	: Staphylococcus Aureus
MT	: Metil Transferaz
NRP'ler	: Ribozomal Olmayan Peptidler
PK'ler	: Poliketidler
PKS	: Poliketid Sentetaz
SM	: Sekonder Metabolitleri (İkincil Metabolitler)
T	: Tiyolasyon Alanı
TE	: Tioesteraz
VRE	: Vankomisine Dirençli Enterococcus

ÖZET

Anaerobik mikroorganizmalar en eski kara canlılarıdır. Toprakta ve yüksek organizmaların bağırsaklarında her yerde bulunurlar ve insan sağlığı, ekoloji ve endüstride önemli bir rol oynarlar. Bununla birlikte, yakın zamana kadar anaeroblardan hiçbir antibiyotik veya başka herhangi bir ikincil metabolitin varlığı ortaya çıkarılmamıştır. Mantar sekonder metabolitleri (SM' ler), geniş bir bileşik koleksiyonu içerir. Bu bakımdan Anaerobik gut fungusları hakkında yapılan herhangi bir antimikrobiyal etkinliklerinin belirlendiği bir araştırmanın olmayışı bu canlıların araştırılmasını önemli kılmaktadır. Bu çalışmada farklı AGF'ların farklı enerji kaynaklarındaki (glukoz, fruktoz ve sakkaroz) üretmiş oldukları sekonder metabolitlerin farklı günlerdeki antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) dahil olduğu 4 farklı patojene karşı antibakteriyel etkinlikleri belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan anaerobik gut fungus suşlarından elde edilen metabolitlerin biyolojik ölçüm yöntemi ile belirlenmesinde test mikroorganizması olarak *Pseudomonasaeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'nin kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca kültür ortamına katılan bazı sustratların farklı metabolit üretmesine neden olduğu için, çalışmada kullanılan diğer test bakterileri de AGF'lar tarafından üretilen metabolitlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Sekonder metabolitler, anaerobik gut funguslar, *Neocallimastix* sp., *Piromyces* sp.

ABSTRACT

Antimicrobial Effect of Secondary Metabolites Produced by Anaerobic Fungi

Anaerobic microorganisms are the oldest land creatures. They are found everywhere in the intestines of the soil and high organisms and play an important role in human health, ecology, and industry. However, the presence of any antibiotics or any other secondary metabolite has not been revealed until recently. Mushroom secondary metabolites (SMs) contain a wide collection of the compound. In this respect, the lack of a study of any antimicrobial activities of anaerobic gut fungi makes it important to investigate these creatures. In this opening, the antimicrobial effects of secondary metabolites produced by different AGFs in different energy sources (glucose, fructose, and sakarosis) were examined on different days. *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), including 4 different pathogen activities were determined. As a result, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* can be used as test microorganisms in the determination of metabolites obtained from the anaerobic gut fungus strains used in this study by biological measurement method. In addition, since some substrates participating in the cultural environment produce different metabolites, other test bacteria used in the study can be used to determine the metabolites produced by AGF.

Keywords: Secondary metabolites, Anaerobic Gut Fungi

1. GİRİŞ

1.1. Farmakognozi

Doğal ilaçlar, insan ve hayvan sağlığı tedavisinde geçmişten günümüze kadar kullanılmaktadır. İlaç olarak ya da tıbbi amaçlar için kullanılan doğal ürünleri inceleyen bilim dalına farmakognozi denir. Yunanca pharmakon (ilaç) ve gnosis (bilgi) kelimelerinden türetilen Pharmacognosy (farmakognozi) ilaçların üretimi ve keşfini kapsamaktadır. Son yıllarda kimya, mikrobiyolojik yetiştirme yöntemleri, tahliller ve genetik gibi modern analitik yöntemlerin gelişmesiyle doğal ürünleri bitkilerden ve mikroorganizmalardan izole etme yöntemleri de hızla geliştirilmiştir.

1.2. Yeni Antibiyotiklerin Keşfi

Yeni antibiyotik arayışı keşfedilmelerinden bu yana geçen on yıllarda, antibiyotikler aşırı ve yanlış kullanıldı, bu da karasal ve su ortamlarında artan antibiyotik seviyelerine yol açtı. Çevre, ilaç endüstrisi, et endüstrisi, tahıl üretimi ve sağlık hizmetlerinin tümü bu gelişmeye katkıda bulunmuştur. Alexander Fleming' in 1945 yılında Nobel Tıp Ödülü' nü aldığı tahmin ettiği gibi, antibiyotiklerin doğaya yayılması, bakterilerde direnç genlerinin gelişmesine ve yayılmasına neden olmuştur.

Günümüzde bulaşıcı hastalıkların tedavisi ile ilgili en büyük sorunlardan biri antibiyotiğe dirençli hastalıkların ortaya çıkmasıdır. Hastalığa neden olan bakteriler çoğalmaya devam ettikçe, yeni antibiyotik arayışı zorunlu hale geliyor.

Çalışma, endişe verici antibiyotik direnci sorununu ve hastanelerde gerçekten yaygın hale gelen ve dünya çapında bulaşıcı hastalıkların kontrolünü engelleme potansiyeline sahip çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkışını incelemek için tasarlandı. Bu fenomenlerin ve belirli bakterileri, aynı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde başlangıçta etkili olan belirli antibiyotiklere dirençli kılan çoklu mekanizmaların dikkatli bir incelemesinden sonra, antibiyotik direncini önlemeye yönelik olası stratejiler analiz edildi. Bu nedenle, bu makale, geleneksel antibiyotiklere kıyasla yenilikçi ve çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı aktif olan mevcut boru hattındaki en umut verici yeni bileşiklere odaklanmaktadır. İlk olarak, *Neisseria gonorrhoeae* (çok ilaca dirençli izolatlar ve

Clostridium dahil) ve ardından makaleler farmakolojik etkileri olan yeni ilaçlar lehine aynı dönemde onaylanmıştır.

Antibiyotik direncinin güçlü klinik ve ekonomik etkileri olan başlıca sağlık sorunlarından biri olduğu iyi bilinmektedir. Staphylococcus aureus (MRSA) ve vankomisine dirençli Enterococcus (VRE) gibi metisiline dirençli patojenlerin yok edilmesi son derece zor hale gelmiştir (Terreni ve ark., 2021).

1.3. Funguslarda Sekonder Metabolizması

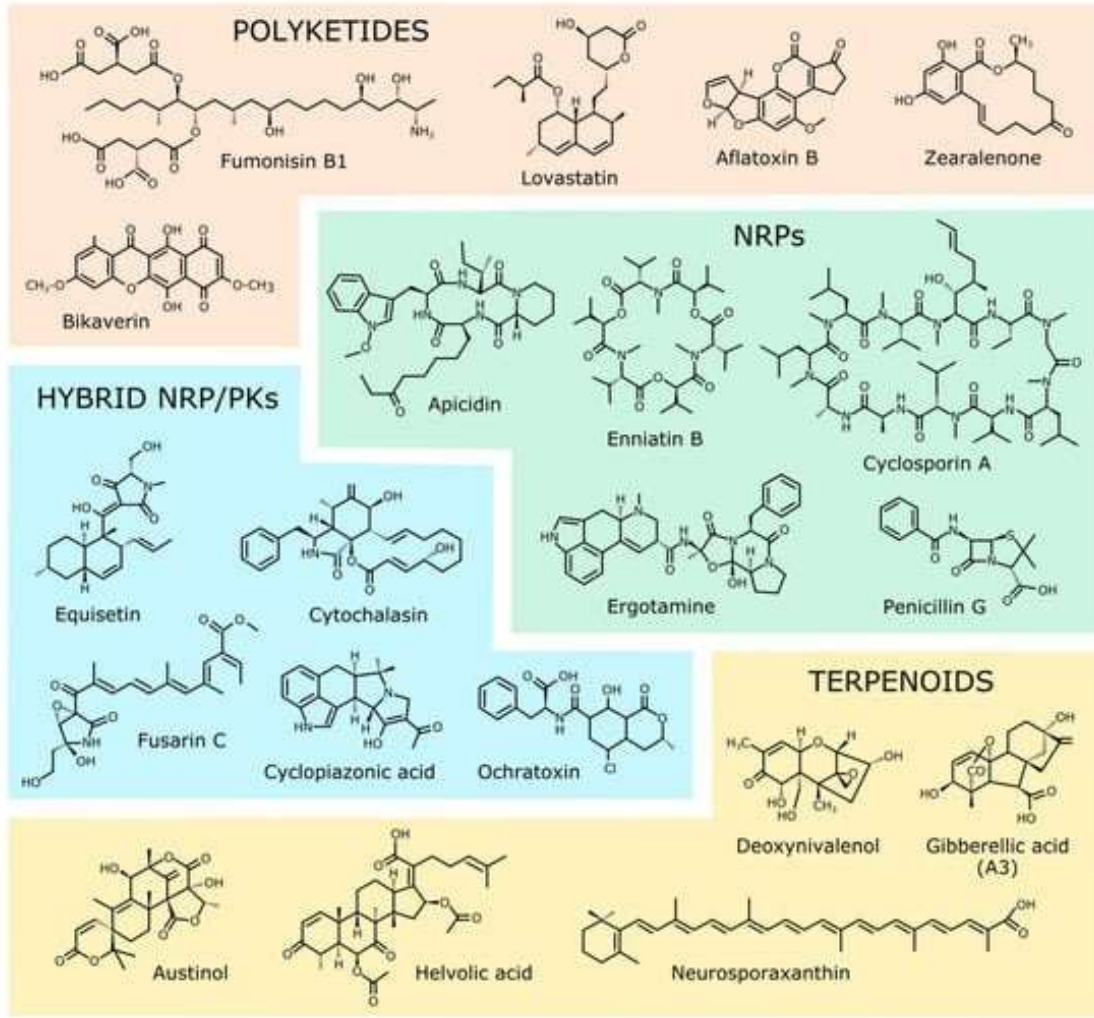
Mantarlar tarafından metabolit üretimi geçen yüzyılın ilk yarısında dikkat çekmeye başladı (Raistrick, 1950) ve antibiyotik çağını başlatan *Penicillium* mantarı tarafından üretilen bir metabolit olan penisilinin keşfinden sonra özel bir önem kazandı (Bennett, J.W ve ark., 2001). Günümüzde mantarların en karakteristik özelliklerinden biri, birçok türde ikincil metabolizmanın zenginliğine yansıyan muazzam metabolik çok yönlülüğüdür (Keller ve ark., 2005). İkincil metabolitler (SM'ler), mantarın laboratuvarında normal büyümesi ve gelişmesi için üretimi gerekli olmayan, spesifik biyosentetik yollardan kaynaklanan kimyasal bileşikler olarak tanımlanabilir. Bununla birlikte, çok sayıda türde bulunurlar ve bu nedenle evrimdeki ısrarları, doğada rekabetçi bir fayda anlamına gelir. Bu giriş, başlıca SM ailelerini gözden geçirmekte, üretimlerinde yer alan genetik temeli ve düzenleyici mekanizmaları özetlemekte ve seçilmiş örneklerle kimyasal çeşitlilikleri, mantar yaşamındaki olası rolleri ve insan yaşamındaki biyolojik etkileri ve uygulamaları hakkında genel bir bakış sunmaktadır.

1.4. SM' lerin Kimyasal Aileleri

Mantarlarda tanımlanan SM' lerin sayısı fazladır (Robey ve ark., 2021) ve şu anda doğada var olanların yalnızca küçük bir kısmının bilindiği varsayılmaktadır. En iyi bilinen SM' ler genellikle dört kimyasal aileye aittir: poliketitler (PK' ler), terpenoidler, ribozomal olmayan peptidler (NRP' ler) ve hibrit ribozomal olmayan peptid/poliketitler (NRP/PK' ler). SM'ler, asetil-CoA' nın poliketidlerin ve terpenoidlerin öncüsü olarak öne çıktığı birincil metabolizmadan substratlar kullanılarak sentezlenir. Her bir SM biyosentetik yolu, karakteristik bir enzim tipiyle başlar ve moleküllere ek modifikasyonlar getiren spesifik enzimlerinin aktivitesi ile tamamlanır.

1.4.1. Poliketidler

PK'ler, en bol ve çeşitli SM ailesini oluşturur. Biyokimyasal yolları, farklı yapılar oluşturmak için asetil-CoA birimlerinin eklenmesiyle başlar, ardından çok çeşitli kimyasal reaksiyonlar gelir (Staunton, J. ve ark., 2001) (Rawlings, 1997). Tüm poliketid biyosentetik yolları, başlangıçta bakterilerde keşfedilen poliketid sentetaz (PKS) olarak bilinen karakteristik bir enzim tarafından başlatılır. Yapılarına ve mekanizmalarına göre, PKS' ler tip I, II ve III olarak bilinen üç sınıfa ayrılır (Shen, 2003). Tip I PKS' ler, yağ asidi sentetazlarıyla yapısal olarak ilişkili çok işlevli enzimlerdir (Herbst, 2018). Genellikle, üç temel alan içeren bir dizi korunmuş alana sahiptirler: sentezde kullanılacak monomeri tanıyan asiltransferaz (AT); uzayan poliketit zincirine bağlayan ketosentaz (KS); ve sentezde oluşan ara ürün için bir kovalent bağlanma bölgesi olarak görev yapan prostetik fosfopantethein grubuna sahip asil taşıyıcı protein (ACP). Bunlara diğer isteğe bağlı alan adları eşlik eder. Uzatma işleminde oluşan keto grupları, söz konusu spesifik PK'ye bağlı olarak farklı modifikasyonlar üretmek için ketoredüktaz (KR), dehidrataz (DH) veya enol redüktaz (ER) alanları tarafından indirgenebilir. Ek değişiklikler getirebilecek başka olası alanlar, örneğin metil transferaz (MT) veya kondenzasyon/heterosiklizasyon (HC) vardır. PKS' ler yinelemeli veya yinelemesiz olabilir. Yinelemeli PKS' lerde makro enzim, ürünü ardışık reaktif döngülerde uzatan bir uzatma modülü olarak işlev görür. Bu PKS' ler, indirgeyici KR, DH ve ER alanlarının varlığına bağlı olarak indirgeyici olabilir veya indirgemeyebilir. Yinelemeli olmayan PKS' ler genellikle multi imodüler olup, her modülün tam bir uzama döngüsünden sorumlu kendi alan kombinasyonuna sahip olması ve tioesteraz (TE) salıcı bir alana sahip son bir modüle sahip olmasıdır (Weissman, 2015). PKS aktivitesinden kaynaklanan ürünler, bu aileyi karakterize eden geniş kimyasal çeşitliliğe yol açan diğer enzimler tarafından modifiye edilir. Tip I PKS' ler tarafından sentezlenen bazı iyi bilinen PK örnekleri Şekil 1'de açıklanmıştır. Bazı durumlarda, zearalenon (Nelson ve ark., 1993) ile olduğu gibi, iki farklı PKS aynı bileşiğin sentezine katılır.



Şekil 1.1. Açıklanan dört ana aileden temsili SM'lerin kimyasal yapıları (Avos ve Limon, 2021)

Tip II PKS' ler yinelemeli olarak hareket eden ve sıklıkla aromatik bileşikler üreten bir dizi katalitik aktiviteyi birleştiren büyük multi enzim atık komplekslerdir (Hertweck ve ark., 2007). Bu enzim sınıfı tipik olarak prokaryotlarda bulunur ve genom analizleri bunların mantarlarda bulunmadığını gösterir. Tip III PKS' ler, daha az farklı işleve sahip homodimerik enzimlerdir. Esas olarak savunma rolü oynadıkları bitkilerde kalkan biyosentezine katılmalarıyla bilinirler (Dao, T.T.H ve ark. 2011). Tip III PKS' ler, asil CoA substratları ile doğrudan etkileşime girebilmeleri bakımından tip I PKS' lerden farklılık gösterirken, tip I'de bu substrat bir asil taşıyıcı protein tarafından sağlanır. Tip III PKS' ler, tip I'den çok daha az bol olmalarına rağmen mantar genomlarında bulunur. PK' ler genellikle iyi tanımlanmış kimyasal yapılara sahip çözünür moleküllerdir. Ancak, istisnalar vardır. Melaninler, indol ve benzen halkaları olan polimerik pigmentlerdir ve çözünürlükleri

olmadığı için kimyasal yapıları halen araştırılmaktadır (Nosanchuk, ve ark., 2015). Biri tip I PKS tarafından başlatılan mantarlarda en sık görüleni olmak üzere iki alternatif yolla üretilbilirler (Eisenman ve ark., 2012).

1.4.2. Ribozomal olmayan peptitler

Ribozomal olmayan peptitler (NRP' ler), kapsamlı kimyasal çeşitliliğe sahip düşük moleküler ağırlıklı peptitlerdir (Süssmuth, R.D. Mainz, 2017). Adından da anlaşılacağı gibi, ribozomda protein sentezinden bağımsız bir mekanizma ile sentezlenirler. Çoğu proteine kıyasla daha küçük boyutlarına ek olarak, sıklıkla döngüsel olan yapıları ve hidroksile veya metillenmiş varyantlar veya bunların D formları gibi atipik amino asitlerin katılımıyla bunlardan farklıdır. Sadece sentezlendikten sonra modifikasyona uğrayan proteinlerin aksine, NRP' ler amino asitlerinde oluşumları sırasında veya serbest bırakıldıktan sonra diğer enzimler tarafından kimyasal değişikliklere uğrarlar.

PK'ler gibi, NRP' ler de NRP sentetazları (NRPS' ler) olarak bilinen devasa çoklu enzim kompleksleri tarafından üretilir. Genellikle, her biri koordineli bir şekilde işlev gören birkaç katalitik alandan oluşan modüller halinde düzenlenirler (Finking, R. ve Marahie 2014). Temel bir modül, bir adenilasyon (A) ve bir tiyolasyon alanı (T) içerir. Substratın seçimi ve aktivasyonu, A alanı tarafından gerçekleştirilir. Substrat daha sonra bir tiyodiester bağı ile bir fosfopantetein birimine kovalent olarak bağlandığı T alanına aktarılır. Her modül, nihai NRP'nin oluşumunda kullanılmak üzere bir aminoasil veya aril kalıntısına katkıda bulunur. Modüllerde isteğe bağlı olarak bulunan diğer enzimatik alanlar, kalıntılarda epimerizasyona (E) veya metilasyona (M) veya diğer kimyasal değişikliklere yol açabilen modifikasyonlar getirirken, yoğunlaştırma alanları (C) substratların peptit bağları ile birleşmeyi katalize eder. bitişik fosfopanteteine bağlıdır. Reaksiyonlar, tam NRP üretilene kadar devam eder. NRP' nin salınmasına genellikle multienzim kompleksinin karbon ucunda yer alan bir tioesteraz alanı tarafından gerçekleştirilen bir döngüsel reaksiyon eşlik eder. Çoğu durumda, NRP, diğerleri arasında oksidasyon, halojenasyon veya glikosilasyon reaksiyonları dahil olmak üzere diğer enzimler tarafından yeni kimyasal modifikasyonlara uğrar ve böylece ortaya çıkan NRP' lerin kimyasal çeşitliliğini artırır. Norine (Caboche ve ark., 2008) adlı bir NRP veri tabanı araştırmacıların kullanımına açıktır ve bu makalenin yazıldığı tarihte 544 farklı monomerden oluşan 1740 peptit içermektedir. Her bir NRP' deki monomer sayısı 2 ila 26 (Flissi ve ark., 2020) arasında değişir. Sayısız uygulamaları

nedeniyle, birçok NRP' nin biyoteknolojik üretimini iyileştirmek için farklı stratejiler kullanılmıştır (Süssmuth ve ark., 2017; Soukup ve ark., 2016; Walsh, 2016) Fungal NRP' lerin bazı temsili örnekleri Şekil 1' de açıklanmaktadır.

1.4.3. Hibrit ribozomal olmayan peptid/ poliketidler

Bazı SM' ler, PKS ve NRPS' nin (Boettger ve ark., 2013) ortak eyleminin sonucudur. Her iki enzimatik kompleks de aynı biyosentetik yola katılan bağımsız genler tarafından kodlanabilir. *Aspergillus* ve *Penicillium* sp.'deki okratoksin A biyosentetik kümelerinde durum budur (Gil-Serna ve ark., 2018). Diğer örnekler, *Fusarium graminearum*'da fusaristatin A lipopeptitlerinin ve *Fusarium psödograminearum*'da W493 A ve B' nin sentezinde yer alan PKS ve NRPS genleridir (Sorensen ve ark., 2014).

Tip I PKS ve NRPS' nin modüler yapıları arasındaki benzerlikler, PKS ve NRPS modüllerini birleştiren kimerik genlerin evrimini kolaylaştırmıştır (Du ve ark., 2001). Örnekler, amino-karboksil dağılımlarında, PKS–NRPS ve NRPS–PKS'de (Theobald ve ark., 2019). İki oryantasyonla bulunur. Genellikle bir veya daha fazla PKS modülüne sahip tek bir NRPS modülünden oluşan bu büyük çok işlevli komplekslerde, moleküle karşılık gelen PK veya NRP uzantısını tanıtmak için substratlar farklı modüller arasından geçirilir. Bu yeni kombinatoryal olasılık, elde edilen bileşiklere ek bir çeşitlilik kaynağı sağlar (Fisch, 2013). PKS-NRPS hibrit ürünlerinin örnekleri şekil 1'de gösterilmektedir.

1.4.4. Terpenoidler

Terpenoidler, beş karbon atomlu (5-C) bir molekül olan izopentenil difosfattan (IPP) türetilen geniş bir kimyasal ailesidir (Sacchettini ve ark., 1997). Bu bileşik iki farklı biyosentetik yolla üretilir: deoksiksülüz 5-fosfat yolu ve mevalonat yolu (Lange ve ark., 2000). İkincisi, şimdiye kadar mantarlarda tanımlanan tek kişidir. Bu yolun adı, hidroksimetil-glutaril CoA redüktaz tarafından üretilen bir bileşik olan mevalonattan IPP sentezinden gelir. IPP' nin fosforilasyonu, bitkiler tarafından salınması nedeniyle doğada bol miktarda bulunan uçucu bir molekül olan izopren verir. Buna karşılık, mantarlar tarafından üretilen birçok düşük moleküler ağırlıklı terpenoid uçucudur ve *Aspergillus fumigatus*' ta tarif edildiği gibi "uçucu madde" kavramına yol açar (Heddergott ve ark., 2014) ve difosfattır (GPP). Yeni IPP ilaveleri, seskiterpenoidlerin kaynağı olan 15-C farnesil difosfat

(FPP) ve diterpenoidlere yol açan 20-C geranilgeranil difosfat verir. İki FPP Tüm terpenoidlerin sentezi, IPP' nin bir IPP izomeri olan dimetilallil difosfat (DMAPP) ile füzyonu ile başlar (Kellogg ve ark., 1997). Bu reaksiyonun sonucu, monoterpenoidlerin öncüsü olan 10-C geranil molekülünün birleşmesi triterpenoidlere ve iki GGPP' nin birleşmesi tetraterpenoidlere yol açar. Genel olarak, sorumlu enzimler terpenoid sentazlar olarak bilinir (Christianson, 2008). Terpenoidler, bu dalların herhangi birinden türetilbilir ve bu da büyük bir kimyasal çeşitliliğe yol açar (Quin ve ark., 2014; Schmidt-Dannert, 2015). Bu nedenle, aşağıda da bahsedilen bazı iyi bilinen terpenoid ailelerinden alıntı yapmak gerekirse, giberellinler diterpenoidlerdir, trikotesenler seskiterpenoidlerdir ve karotenoidler tetraterpenoidlerdir.

İlk terpenoid iskeleti sentezlendikten sonra, farklı enzimler, olgun SM üretilene kadar çeşitli kimyasal modifikasyonlar uygular. Doğrusal zincirlere müdahale eden terpenoid sentazlar arasında, tanınabilir biyokimyasal ve yapısal özelliklere sahip, terpenoid siklazarlar olarak bilinen karakteristik bir tip vardır (Christianson, 2006). Bu enzimler, birçok mantar SM'si de dahil olmak üzere doğada bulunan muazzam terpenoid çeşitliliğinden büyük ölçüde sorumludur. Bazı durumlarda, yapıya terpenoid kökenli olmayan bir molekül eklenerek meroterpenoidlerin ortaya çıkmasına neden olur (Matsuda ve ark., 2016).

1.5. SM Genlerinin Genetik Organizasyonu ve Düzenlenmesi

SM sentezinden sorumlu genler genellikle aynı düzenlemeyi paylaşan mantar genomlarında kümelenir (Rokas ve ark., 2020). Tipik SM gen kümeleri, bir PKS 'yi, bir NRPS' yi veya bir terpen siklaza kodlayan ve genellikle daha büyük boyutuyla kolayca tanımlanan bir anahtar yol geni içerir. Bunlar aynı zamanda, kolaylıkla tanınabilir familyalara ait diğer modifiye edici enzimler için genler, örneğin P450 monooksijenazlar (Zhang ve ark., 2021) ve bazı durumlarda bunların atılımında yer alan permeazlar için genler içerirler. SM biyosentetik yolları, sıklıkla Zn küme ailesine ait olan ve normalde ilgili kümeye dahil olan spesifik düzenleyici genler (Yin ve ark., 2011) tarafından kontrol edilebilir. Prototip bir örnek olarak, *F. fujikuroi*'de Biki transkripsiyon faktörü, bikaverinin sentezi için gereklidir ve bu durumda ikinci bir düzenleyici protein olan biki tarafından desteklenir (Wiemann ve ark., 2009). Diğer durumlarda, aynı türdeki giberellin kümesinde (Tudzynski, 2005) veya diğer mantarlardaki penisilin ve sefalosporin kümelerinde (Brakhage, 1998) olduğu gibi düzenleyici genler kümede bulunmaz. SM üretimine olan ilgi

nedeniyle, düzenleyici mekanizmalarına büyük ilgi gösterilmiştir. SM kümeleri, çeşitli çevresel ipuçları tarafından düzenlenir ve sıklıkla daha genel düzenleyici ağlarda yer alan farklı düzenleyici proteinler tarafından kontrol edilir (Keller, 2019; Macheleidt ve ark., 2016). SM biyosentezini kontrol eden harici sinyaller, farklı SM kümelerinde ve diğer metabolik süreçlerde aynı anda hareket eden küresel düzenleme sistemlerinin aracılık ettiği nitrojen veya karbon kaynaklarının, pH'ın veya ışığın mevcudiyetini içerir (Brakhage, 2013). Azot tarafından SM üretiminin düzenlenmesi çok sıktır (Tudzynski, 2014) ve aralarında AreA benzeri proteinlerin önemli bir rol oynadığı farklı proteinler buna katılır. Karbon kaynağı mevcudiyeti genellikle CreA ailesinin bir katabolit baskılayıcısını içeren SM üretimi (Ruiz ve ark., 2010) dahil olmak üzere birçok metabolik süreci (Szilágyi ve ark., 2013) etkiler. pH ile SM düzenlemesi, farklı mantarlardaki örneklerle birlikte, genellikle PacC ailesinin proteinleri tarafından kontrol edilir (Li ve ark., 2021). Bir başka özel ilgi genel regülatörü, bir kompleks oluşturan Velvet proteinleri ile ışık regülasyonu ve gelişim kontrolü ile ilişkili olan LaeA' dır (Bok ve ark., 2004). Son zamanlarda *F. fujikuroi*' de ışığın ana düzenleyici olduğu gözlemlenmiştir. WcoA, bu mantardaki farklı SM kümelerini pozitif veya negatif olarak kontrol eder (Pardo-Medinave ark., 2021). Farklı yollar üzerindeki bu ikili pozitif/negatif rol, aynı sinyale yanıt verirken bile bu küresel düzenleyici sistemlerde sık görülür. Örneğin AreA mutasyonu, *F. fujikuroi*'de gibberellin biyosentezinin baskılanmasıyla sonuçlanır (Tudzynski ve ark., 1999) fakat *F. verticillioides*'de fumonisin üretiminin baskılanmasıyla sonuçlanır (Kim ve ark., 2008). Fungal SM üretimini etkileyen genlerdeki mutasyon örnekleri -bazı durumlarda *F. fujikuroi*'de (Wagner ve ark., 2013) glutamin sentetaz için bulunan enzimleri kodlayan-literatürde bol miktarda tarif edilmiştir.

SM kümeleri herhangi bir kromozomal bölgede olabilir, ancak birçok durumda subtelomerik bölgelerde bulunurlar (Palmer ve ark., 2013). Bu tür konumlar, heterokromatin formundaki epigenetik susturma ile ilişkilendirilebilir. Bunu destekleyen bazı düzenleyici proteinler, SM üretimini histon modifikasyonları ile kromatin yapısı seviyesinde modüle eder (Strauss ve ark., 2011); bu, *Fusarium* sp. (Studt ve ark., 2016; Adpressa ve ark., 2019). Bu düzenleme seviyesi, heterokromatinizasyon yoluyla bir yoldaki tüm genlerin aynı anda etkisizleştirilmesine izin verdiği için kümeler halinde genomik organizasyona seçici bir avantaj sağlar. Bu, LaeA' nın Velvet kompleksinde hareket ettiği yoldur, ancak AreA gibi diğer düzenleyici proteinler de bu kontrol mekanizmasına katılır (Pfannmüller ve ark., 2017). Düzenleme aynı zamanda hücre bölümlendirme seviyesinde de gerçekleşir: örneğin,

her bir metabolik yolun enzimlerini ve bunların peroksizomlar, vakuoller, endoplazmik retikulum ve Golgi veya sitozol gibi uygun hücresel bölmelerdeki lokalizasyonlarını kontrol etmek için düzenleyici sistemler vardır (Kistler ve ark., 2015).

1.6. Sekonder Metabolitlerin Fonksiyonları ve Uygulamaları

Daha önce belirtildiği gibi, SM' lerin ayırt edici bir özelliği, kontrollü büyüme koşulları altında mantar için vazgeçilebilir olmalarıdır, böylece onları üretemeyen mutantların laboratuvarındaki yaşayabilirlikleri etkilenmez. Bununla birlikte, bu biyosentetik süreçlerin mantarlarda kalıcılığı, doğal ortamlarında uyum sağlama avantajları anlamına gelir. Bazı durumlarda işlevler açıktır ve diğer durumlarda daha az açıktır. Bilinen SM fonksiyonlarının bazı açıklayıcı örnekleri aşağıda belirtilmiştir. Melanin, UV radyasyonuna karşı koruyarak mantarın güçlü güneşe maruz kalma altında hayatta kalmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte, mekanik hasarın yanı sıra oksidatif veya termal stres gibi diğer stres kaynaklarına karşı da koruyucu etkiler gösterir. SM' ler daha spesifik fizyolojik işlevleri yerine getirebilir. Sideroforlar, bazı mantarlar tarafından çevresel demiri temizlemek veya dahili reaktif demiri ayırmak için kullanılan, yüksek afiniteli demir şelatörleri olarak hareket eden NRP'lerdir (Bushley ve ark., 2008). Fusarubin ve 5-deoksibostrikoidin bazlı melanin, sırasıyla *F. fujikuroi* (Studt ve ark., 2012) ve *F. graminearum*'da (Frandsen ve ark., 2016) perithecia'ya koyu pigmentasyon sağlar. Diğer SM' ler birden fazla amaç için kullanılmaktadır. β -karoten, oksidatif strese karşı koruyucu bir ajan olarak yararlıdır (Avalos ve ark., 2016) fakat aynı zamanda daha spesifik fonksiyonlara sahip bir türev kaynağı olarak da kullanılır. *B. trispora* veya *P. blakesleeanus* gibi mukormikotina mantarlarında, β -karoten, cinsel döngüyü yürütmek için gerekli olan trisporik asitler adı verilen cinsel hormonları üretmek için bölünür (Medina ve ark., 2011; Tagua ve ark., 2012). Bununla birlikte, *F. fujikuroi* (Avalos ve ark., 2017) ve *Ustilago maydis* (Estrada ve ark., 20120)' de aynı karoten, rodopsinlerin prostetik grubu olan retinali üretmek için bölünür.

Pek çok sekonder metabolit, hem rekabet hem de patogeneze açısından mantarların diğer organizmalarla etkileşimlerinde rol oynar (Demain ve ark., 2000). Mantarların rekabeti önlemek için antibiyotik ürettiği birçok örnek vardır. Örneğin, *Beauveria bassiana*, parazitlenmiş böcekte bakteri üremesini sınırlamak için poliketid oosporeini üretir (Fan ve ark., 2017). Karşılıklı veya patojenik mantarlar ve bitkiler arasındaki etkileşimin, etkileşen türlerden moleküler sinyallerin eşzamanlı üretimini içerdiği iyi bilinmektedir (Pusztahelyi

ve ark., 2015; Kai, 2019). Ayrıca, bazı SM gen kümeleri konukçu bitkide ifade edilirken diğerlerinde ifade edilmez. *F. fujikuroi* FUB1 Toksin fusarik asidin sentezi için bir PKS' yi kodlayan gen, konakçısını enfekte ederken ifade edilir, ancak diğer bitkileri enfekte ederken ifade edilmez (Niehaus ve ark., 2014). SM' lerin patogenezdaki katılımı kolayca tahmin edilemez. Pirinç patlaması hastalığının nedensel ajanı olan *Pyricularia oryzae*' de, patogeneze için melaninler gereklidir, ancak bir hibrit NRP/PKS mikotoksini olan tenuazonik asit, nektriapironlar, antibakteriyel aktiviteye sahip poliketid bileşikler veya piriküloller, fitotoksik poliketid tarafından hiçbir rol oynamaz. Bileşikler (Motoyama ve ark., 2021). Ekolojik nişlerindeki özel ihtiyaçlara bağımlılık, birçok mantar SM kümesinin neden laboratuvar koşullarında ifade edilmediğini açıklar. Ancak, hedefli bir şekilde etkinleştirilerek işlevleri araştırılabilir (Brakhage ve ark., 2011; Scherlach ve ark., 2009).

SM' lerin patogeneze ile ilişkisi, sentezlerinde değişiklikler olan mutantların virülansları analiz edilerek araştırılmıştır. Bir örnek olarak, *F. oxysporum*' da fusarik asit üretiminin mutantları, bu SM' nin domates bitkilerinde ve bağışıklığı baskılanmış farelerde virülansa önemli ölçüde katkıda bulunduğunu ortaya çıkardı (López-Díaz ve ark., 2018). Başka bir ilginç örnek, bu mantarın neden olduğu "*bakanae*" hastalığı için fidelerin karakteristik aşırı uzaması nedeniyle pirincin enfeksiyonuna katıldığı varsayılan *F. fujikuroi*' deki giberellinlerin rolü üzerine yapılan bir çalışmadır. Üretmeyen bir *F. fujikuroi* ile pirincin enfeksiyonu mutant, enfekte fidelerde aşırı uzama eksikliği ve bitkideki hücre istila kapasitesinde azalma gösterdi (Wiemann ve ark., 2013).

İkincil metabolitler (SM' ler), yüksek derecede yapısal çeşitliliğe sahip bitkilerde bulunur. Farklı SM sınıfları ve bunların biyosentetik yolları bu özetle özetlenmiştir. SM' lerin tipik bir özelliği, nispeten yüksek konsantrasyonlarda, bazen onları üretmeyen organlarda birikmeleridir. Daha sonra floem veya ksilem yoluyla uzun mesafeli taşıma gereklidir. Hidrofilik maddeler vakuollerde depolanırken, lipofilik metabolitler latekte, reçine kanallarında, adipositlerde veya stratum korneumda bulunur. SM mutlaka son ürün değildir, bazıları, özellikle nitrojen içeriyorlarsa, metabolik olarak geri kazanılır. Biyosentez, ilgili genlerin taşınması ve depolanması, replikasyonu ve transkripsiyonu ve protein translasyonu için maliyetleri içeren enerjiye bağımlı bir süreçtir. Karmaşık biyokimyasal ve fizyolojik özellikler, SM işleviyle yakından ilişkilidir: SM, işe yaramaz bir atık üründen ziyade (daha önce varsayıldığı gibi), otçullara ve mikroplara karşı önemli bir araçtır.

1.7. Anaerobik Gut Fungus Cinsleri ve Özellikleri

Anaerobik bağırsak mantarları (Neocallimastigomycetes sınıfı), büyük otçulların sindirim kanallarında bir arkea , bakteri ve protozoa konsorsiyumunun üyeleri olarak gelişen, üzerinde yeterince çalışılmamış organizmalardır (10-12). Bu habitatlarda mantarlar, prokaryotik mikroorganizmalar tarafından birkaç büyüklük sırasına göre (10-12) büyük ölçüde sayıca fazladır. Örneğin, rumen bakterilerinin rumen içeriğinin gramı başına 10-10 hücre (10^{10}) olduğu tahmin edilirken, mantarların gram başına 10-6 hücre (10-12) olduğu tahmin edilmektedir). Bu mantarlar, biyokütleyi parçalayan enzim dizileri nedeniyle son zamanlarda biyoteknolojik ilgi görmektedir, ancak genom ve transkriptom dizilimi yoluyla, doğal ürünler için bir dizi biyosentetik enzime de sahip oldukları ortaya çıkmıştır (13-15). Anaerobik bağırsak mantarlarının, kendi doğal ortamlarında hayatta kalmak için diğer mikroplarla rekabet etmek için doğal ürünleri sentezlediklerini varsayıyoruz. Doğal ürünlerin, diğer ortamlarda üreticilerine oksidatif stres toleransı (16), mantar gelişimi (17) ve antibiyoz (18) dahil olmak üzere çeşitli işlevler sunduğu bilinmektedir. Benzer şekilde, anaerobik bağırsak mantarlarının doğal ürünleri, rumen topluluğunun diğer üyeleri tarafından sayıca az olmasına rağmen mantarların devam etmesine izin vermek için doğrudan (antibiyoz yoluyla) veya dolaylı olarak (çevresel stres toleransı sağlayarak) hizmet edebilir.

Orpin'in 1975'te bir mantar olarak tanımlamasından buyana 20 farklı cins tanımlanmıştır (*Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Piromyces*, *Buwchfawromyces eastonii*, *Oontomyces anksri*, *Pecoromyces ruminantium* , *Feromyces austinii* , *Liebetanzomyces polymorphus* , *Ghazallomyces constrictus* , *Aklioshbomyces papillarum* , *Agriosomyces longus*, *Capellomyces foraminis*, *Capellomyces elongatus*, *Joblinomyces apicalis*, *Khoyollomyces ramosus* ve *Tahromyces munnarensis*) (Callaghan ve ark., 2015; Koetschan ve ark., 2014; Dagar ve ark., 2015; Youssef ve ark., 2013; Hanafy ve ark., 2017, 2018, 2019; Joshi ve ark., 2018). Dahili kopyalanmış aralayıcı 1'in (ITS1) ve büyük ribozomal alt biriminin (28S rRNA D1-D2 alanları) rRNA lokus tabanlı bölgelerinin filogenetik analizleri, yakın zamanda açıklanan birçok cins ve tür örneğinde etkili olmuştur, Moleküler Veriler, cins- ve AGF'nin tür düzeyinde tanımlanması (Griffith ve diğerleri, 2010; Liggenstoffer ve diğerleri, 2010). Bununla birlikte, artan miktarda DNA barkodlama verisi (esas olarak ITS1 ve ITS2'ye dayalıdır), mevcut 18 suşun, saf kültür ve çevresel DNA dizileme çalışmaları nedeniyle

AGF çeşitliliğinin yalnızca bir alt kümesini temsil ettiğini göstermektedir.(Callaghan ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017).

Tablo 1.1. Ruminal anaerobik fungusların sınıflandırılması ve farklı morfolojik özellikleri gösterilmiştir.

Alem: Fungi					
Filum: Neocallimastigomycota					
Sınıf: Neocallimastigomycetes					
Takım: Neocallimastigales					
Aile: Neocallimastigaceae					
Cins	Tür	Kamçı Sayıları	Tallus Yapıları	Rizoid Şekilleri	Kaynak
<i>Agriosomyces</i>	<i>A. longus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2019
<i>Aklioshbomyces</i>	<i>A. papillarum</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	
<i>Buwchfawromyces</i>	<i>B. eastonii</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Callaghanve ark., 2015
<i>Capellomyces</i>	<i>C. elongates</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2019
	<i>C. foraminis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	
<i>Joblinomyces</i>	<i>J. apicalis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Dagar ve ark., 2015
<i>Khoyollomyes</i>	<i>K. ramosus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	
<i>Oontomyces</i>	<i>O. anksri</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2017
<i>Pecoramyces</i>	<i>P.ruminantium</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	
<i>Piromyces</i>	<i>P. citronii</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Gaillard-Martinie ve ark., 1995
	<i>P. communis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Gold ve ark., 1988
	<i>P. cryptodigmaticus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Kirk, 2012
	<i>P. dumbonicus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Li ve ark., 1990
	<i>P. finnis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Li ve ark., 2016
	<i>P. irregularis</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Ariyawansa ve ark., 2015
	<i>P. mae</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Li ve ark., 1990
	<i>P. minutus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Ho ve ark., 1993a
	<i>P. polycephalus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Chenve ark., 2002
	<i>P. rhizinflatus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Breton ve ark., 1991
<i>Tahromyces</i>	<i>P. spiralis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Ho ve ark., 1993b
	<i>T. munnarensis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2019

Tablo 1.1. Devamı

Cins	Tür	Kamçı Sayıları	Tallus Yapıları	Rizoid Şekilleri	Kaynak
<i>Liebetanzomyces</i>	<i>L. polymorphus</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Joshi ve ark., 2018
<i>Feromyces</i>	<i>F. austinii</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2018a
<i>Ghazallomyces</i>	<i>G. constrictus</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2019
<i>Neocallimastix</i>	<i>N. californiae</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Li ve ark., 2016
	<i>N. cameroonii</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Ariyawansa ve ark., 2015
	<i>N. frontalis</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Heath ve ark., 1983
	<i>N. hurleyensis</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Webb ve Theodorou, 1991
	<i>N. patriciarum</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Orpin ve Munn, 1986
	<i>N. variabilis</i>	Çok (>4)	Monosentrik	Dallanmış rizoid	Ho ve ark., 1993c
<i>Anaeromyces</i>	<i>A. contortus</i>	Tek (<4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Hanafy ve ark., 2018b
	<i>A. elegans</i>	Tek (<4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Ho ve ark., 1993d
	<i>A. mucronatus</i>	Tek (<4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Breton ve ark., 1990
	<i>A. polycephalus</i>	Tek (<4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Kirk, 2012
	<i>A. robustus</i>	Tek (<4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Li ve ark., 2016
<i>Orpinomyces</i>	<i>O. bovis</i>	Çok (>4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Barr ve ark., 1989
	<i>O. intercalaris</i>	Çok (>4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Ho ve ark., 1994
	<i>O. joyonii</i>	Çok (>4)	Polisentrik	Dallanmış rizoid	Li ve ark., 1991
<i>Caecomycetes</i>	<i>C. churrovii</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Küresel rizoid	Henske ve ark., 2017
	<i>C. communis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Küresel rizoid	Gold ve ark., 1988
	<i>C. equi</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Küresel rizoid	Kirk, 2012
	<i>C. hurleyensis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Küresel rizoid	Chenve ark., 2007
	<i>C. sympodialis</i>	Tek (<4)	Monosentrik	Küresel rizoid	
<i>Cyllamyces</i>	<i>C. aberensis</i>	Çok (>4)	Polisentrik	Küresel rizoid	Ozkose ve ark., 2001

1.7.1. Caecomycetes sp.

Caecomycetes, anaerobik mantarların hücre duvarını en az bozan türdür (Gordon ve Phillips, 1989). Bunun en önemli nedeni, bu mantarların küresel rizomları olması ve rizomlarının olmayışıdır. Ek olarak, Caecomycetes cinsinin zoosporları, tek merkezli mantarlardır, küresel, oval veya amip şeklindedir ve tek kamçılıdır. Organelleri hücre boyunca dağılır veya kamçılı kökler arasında toplanır (Gold ve ark., 1988).

1.7.2. Neocallimastix sp.

Neocallimastix sp., tek merkezli, nadiren eksojen, çoğunlukla endojen sporangia büyümesi sergiler (Barr ve diğerleri, 1989). Zoosporlar küresel ve belirgin şekilde oval, organeller bazen kümelenmiş, ekvatora yakın veya merkeze yakın çekirdekler ve 9-17 kamçılıdır (Orpin ve Munn, 1986). Neocallimastix sp.'nin zoosporlarının kist oluşturmadığı ve 30 o C ve 41 o C'nin üzerinde çimlendiği görülmüş ve zoospor gelişimi için optimum sıcaklığın 39 o C olduğu bildirilmiştir (Lowe ve ark., 1987b).

1.7.3. Piromyces sp.

Barr et al. (1989), sığır rumeninden izole edilmiş Piromyces Communis, monosentrik ve sporangia üzerinde endojen ve eksojen büyüme gösterir. Sporangia eliptik, ince, düzensiz, papillalı veya papillasız, geniş dallı rizomlar, kabarık sporokistli veya sporangiasız. Zoosporlar özellikle ovaldır, anafazda tek bir flagella, nadiren iki veya dördür (Gold ve diğerleri, 1988; Li ve diğerleri, 1990).

1.7.4. Orpinomyces sp.

Barr ve diğerleri, (1989) ilk olarak Orpinomyces sp. Çok merkezli thallusları, çok sayıda kamçılı zoosporları ve geniş ve kapsamlı polinükleer kök miselyumu vardır (Breton ve diğerleri, 1989). Barr et al. (1989) Orpinomyces sp. Orpinomyces joyonii olarak sınıflandırılır. Sonrasında, Ho ve diğerleri (1994), Orpinomyces intercalaris, Orpinomyces cinsinin ikinci bir türü olarak tanımladı.

1.7.5. Anaeromyces sp.

Breton et al. (1990) sığır işkembesinden yeni bir anaerobik bakteri izole etti. Bu mantar, çok merkezli thallus, çok çekirdekli kök miselyumu, kısa boynuzlu zoosporangium ve tek bir kamçılı zoospor ile karakterize edilir.

1.7.6. Cyllamyces sp.

Özköse ve ark. (2001), Cyllamyces sp.yi sığır dışkısından izole ederek, zoosporları tek kamçılı bazen iki kamçılı, küresel rizoiddillere sahip olduğunu göstermiştir. Caecomyces sp. Çoklu spor kesesi ve polisentrik yaşam döngüsüyle diğer anaerobik gut funguslardan ayrılmaktadır.

1.7.7. Feramycessp.

Hanafy ve ark. (2018) tarafından koyun dışkısından izole edilen monosentrik tallus ve çok kamçılı zoospora sahiptir.

1.7.8. Pecaromyces sp.

Hanafy ve ark. (2017) tarafından sığır ve koyun dışkısından izole edilmiş ve monosentrik vejajatif evresi ile tek kamçılı zoospora sahiptir.

1.7.9. Oontomyces sp.

Dagar ve ark. (2015) tarafından devenin n midesiden izole edilen bu cins monosentrik tallus ile tek kamçılı zoosporu bulunur.

1.7.10. Buwchfawromyces sp.

Callaghan ve ark. (2015) ile birlikte Buffolo dışkısından izole edilmiştir. Tallus yapısı monosentrik, zoospor olarak tek kamçılıdır.

1.7.11. Liebetanzomyces sp.

Joshi ve ark. (2018) tarafından keçi dışkısından izole edilmiş ve monosentrik tallus, tek kamçılı zoosporu bulunur.

1.7.12. Ghazallomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından geyik dışkısından izole edilen bu cins monosentrik tallus ile çok kamçılı zoospora sahiptir.

1.7.13. Aklisbomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) ile bir birlikte geyik dışkısından izole edilmiştir. Tallus yapısı monosentrik olup zoospor kamçısı ise tek olarak bilinir.

1.7.14. Agriosmyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından yaban domuzu ve keçi dışkısından izole edilen bu mikroorganizma monosentrik yapılı ve zoosporu tek kamçılıdır.

1.7.15. Capellomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafında keçi dışkısından izole edilmiştir. Monosentrik tallus ile tek kamçılı bir zoospora sahiptir.

1.7.16. Joblinomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından koyun ve keçi dışkılarından elde edilmiştir. Tek kamçılı zoospor ve monosentrik yapılı tallusa sahiptir.

1.7.17. Khoyollomyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) at ve zebra'ya ait dışkıdan izole etmişlerdir. Vejetatif safhası monosentrik tallus hareketli evresi ise tek kamçılı zoospor ile meydana gelir.

1.7.18. Tahromyces sp.

Hanafy ve ark. (2019) tarafından endemik bir tür olan *Nilgiritragus hylocrius*'dan (Ovis cinsine yakın bir tür) izole edilmiştir. Monosentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir.

1.7.19. Aestipascumyces sp.

Stabel ve ark. (2020) tarafından koyun rumeninden izole edilen filamentli yapıya sahip olan bu cins monosentrik tallus ve çok kamçılı zoospora sahiptir.

1.7.20. Paucimycessp.

Hanafy ve ark. (2021) tarafından antilop dışkısından izole edilmiştir. Monosentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir.

2. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

Daha öncesinden AGF' lar hakkında yapılan herhangi bir antimikrobiyal etkinliklerinin belirlendiği bir araştırmanın olmayışı bu çalışmanın en önemli kısımlarından birisini oluşturmaktadır. Bu çalışmanın amacı, farklı AGF' ların farklı enerji kaynaklarındaki (glukoz, fruktoz ve sakkaroz) üretmiş oldukları sekonder metabolitlerin farklı günlerdeki antimikrobiyal etkileri araştırılacaktır. *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) dahil olduğu 4 farklı patojene karşı etkinlikleri belirlenecektir, böylelikle farklı AGF türlerinin sekonder metabolitleri hakkında yapılan ve yapılacak olan çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Anaerobik Besiyeri

Anaerobik besiyeri Orpin (1976)'e göre hazırlanılacaktır. Besiyeri 150 ml/ltrumen sıvısı, 150 ml/l Mineral Solusyon I ve 150 ml/l Mineral solüsyon II, 6 g/l NaHCO_3 , 2.5 g/l maya özütü, 10 g/l peptone, 1 g/l L-sistein hidroklorür, ve 1 mg/l tresazurin içermektedir. Besiyerinde kullanılan mineral solusyonlar ayrı hazırlanacaktır ve 150 ml/l oranında ilave edilecektir. Mineral Solusyon I: “%0.3 K_2HPO_4 ; Mineral Solution II: %0.3 KH_2PO_4 , %0.6 NaCl , %0.6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %0.06 CaCl_2 , ve %0.06 MgSO_4 ” içermektedir. Besiyerindeki oksijenin uzaklaştırılmasına yardımcı olmak için CO_2 ile muamele edilirken aynı zamanda kaynama noktasına kadar ısıtılarak yine CO_2 (%99) gazı altında Hungate tüplerine transfer edilecek ve otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirilecektir. Antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesinde farklı karbon kaynakları kullanılacaktır (Glikoz, saman ve ksilan).



Resim. 3.1. Dışkı örneklerinin alınması

3.2. Anaerobik Fungusların İzolasyonu

Anaerobik mantar izolasyonu Theodorou ve ark. (1993)'e göre seyreltme yöntemiyle yapılacaktır. Bu nedenle, 10 g dışkı numunesini 100 ml bazal ortamda, CO_2 gazı altında eritin, buradan 10 ml alınır ve buğday samanı içeren boş bir Hungate tüpüne aktarılmıştır.

İlk seyreltilmiş numuneden 1 ml alın ve 9 ml'lik yeni bir besiyerinde seyreltilmiş, ardından buğday samanı içeren boş bir Hungate tüpüne aktarılmıştır. Bu şekilde gaita örnekleri 10-1, 10-2 ve 10-3 oranında dilüe edilerek pipetlerle Hungate tüplerine aktarıldı ve 39 °C'de 3-10 gün inkübe edildi. Anaerobik ortamda olası bakteri üremesini önlemek için antibiyotik kokteyli (Kloramfenikol: 100 µg/ml, Ampisilin: 100 µg/ml, Streptomisin: 140 µg/ml, Eritromisin: 200 µg/ml) kullanılacaktır.



Resim 3.2. Anaerobik gut funguslarının izolasyonu

3.3. Anaerobik Fungusların Saflaştırılması

Anaerobik mantarların saflaştırılması için Joblin'in (1981) Hungate'e (1969) dayanan RollTube yöntemi kullanılacaktır. %0,5 (w/v) glukoz ve %1,5 (w/v) agar içeren bazal anaerobik ortamı bir Hungate tüpünde eritilmiş ve yaklaşık 45 °C' ye soğutulmuştur. Steril bir ortamda bu besiyerine önceden üretilmiş mantar kültüründen 0,5 ml enjekte edilip ve besiyerini dondurmak için hemen soğuk su dolu bir kovaya koyuldu. Fungal gelişimi desteklemek için 3-4 gün 39 °C' de inkübe edilecektir. İnkübasyonun sonunda, gelişen mantar kolonileri koloni morfolojisine göre seçilecek ve glikoz ortamına aktarılacaktır. Bu işlemi 3 kez tekrarladıktan sonra saf kültür elde edilebilir.



Resim 3.3. Anaerobik fungusların saflaştırılması

3.4. Anaerobik Fungusların Tanımlanması

Saflaştırılması tamamlanan anaerobik gut fungusların cins düzeyinde tanımlanması Olympus BX53 ışık mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Rumen fungusları Orpin (1994)'e göre cins düzeyinde tanımlanmaları yapılmıştır.

3.5. Anaerobik Fungusların Stoklarının Oluşturulması

Saflaştırılan kültür, enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren Hungate tüplerinde büyütülecektir. Yeterli büyüme gösteren kültürlerden tüplere filizlenen mantarlar, tüplerle birlikte çıkarılacak ve anaerobik koşullar altında steril nükleer tüplere aktarılacaktır. Nükleer tüpe 1 mL %15 (v/v) gliserol eklendi. Çekirdek flakon portlarını kapattıktan sonra, önce -20 °C' 'de dondurup ve daha sonra uzun süreli saklama için sıvı nitrojene koyuldu. Sıvı nitrojende saklanan kültürleri canlandırmak için, sıvı nitrojenden ekstrakte edilen stok kültürler önce oda sıcaklığında çözündürülüp, ardından pipet ortamına aktarıldı ve 39 °C'de inkübe edildi.



Resim 3.4. Anaerobik fungusların muhafaza edildiği sıvı azot tankı

3.6. Patojen Bakteriler İçin Kullanılacak Besiyerleri

a. Nutrient Buyyon (Difco)

Tablo 3.1. Nutrient buyyon (difco) içeriği

Et Ekstraktı	1 gr
Kazainhirolizat	17,5 gr
Maya Ekstraktı	2 gr
Nişasta	1,5 gr
Pepton	5 gr
NaCl	5 gr
Distile su	1000,0 ml
Agar- agar	12,5 gr

Hazırlanan besiyeri 121 °C’ de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

b. Mueller Hinton Agar (MHA-Difco)

Tablo 3.2. Mueller hinton agar (mha-difco) içeriği

Et infüzyonu	5,0 gr
Distile su	1000,0 ml
pH:	7,4

Hazırlanan besiyeri 121 °C’ de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

3.7. Test Bakterileri

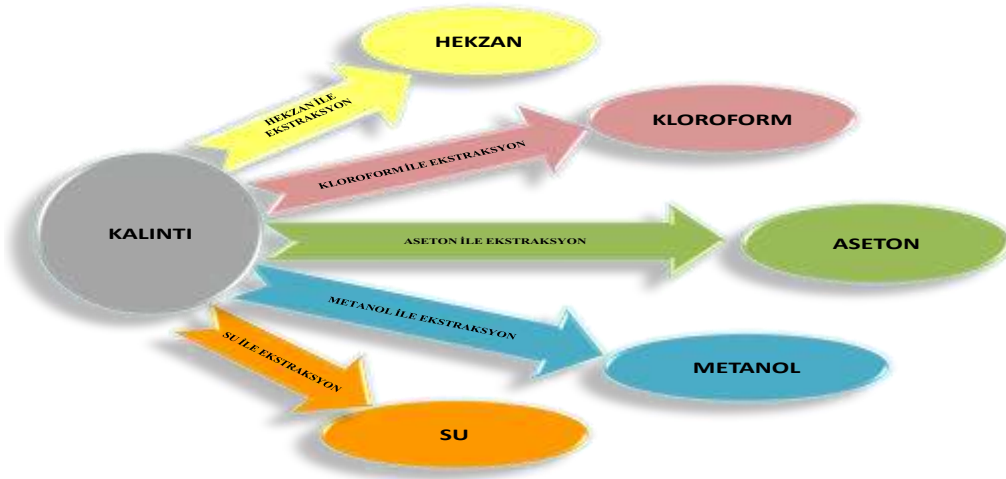
Yapılan bu çalışmada, AGF tarafından üretilmiş olan ve antibakteriyal etki gösterilen maddelerin belirlenmesinde (Biyolojik Ölçüm Metodu) test bakterisi olarak kullanılan mikroorganizma suşları Munzur Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan alınacaktır. *Pseudomonasaeruginosa* (DSM 50071), *Enterococcusfaecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichiacoli* (ATCC 25922) bakterileri kullanıldı.

3.8. Anaerobik Fungusların Besiyerine Aşılması ve Metabolit Oluşumu

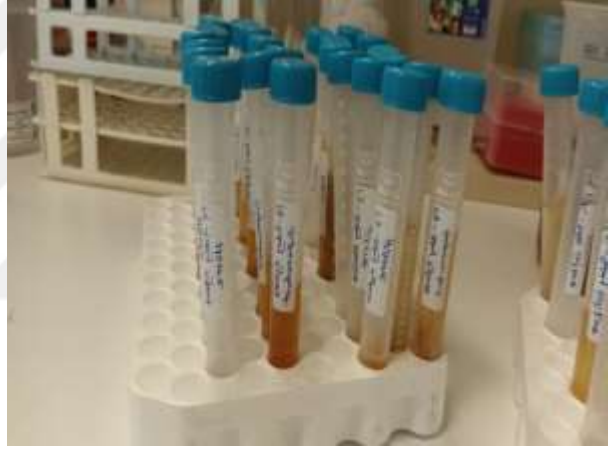
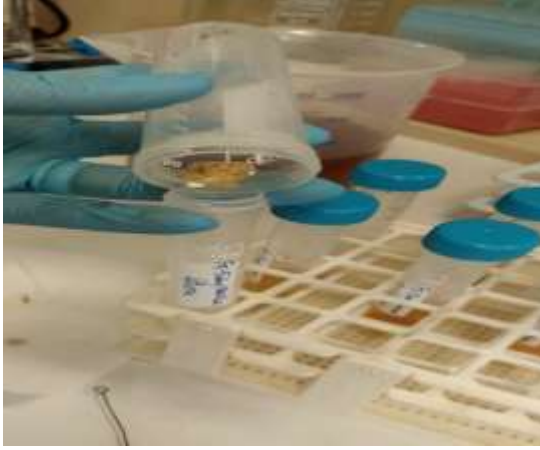
Dışkı örneklerinden izole edilip tanımlanan AGF'lar anaerobik besiyerine aşılanmış ve 39 °C' de 3, 5 ve 7 gün süre ile inkübe edilecektir. İlave olarak, kültür ortamına farklı karbon kaynakları (sakaroz, glukoz ve fruktoz,) katılarak metabolit üretim hacmi üzerine etkileri de test edilecektir. Bu amaçla 100 ml hazırlanan anaerobik besiyerine 5 gr karbon kaynağı (sakaroz, glukoz ve fruktoz) katılarak süspansiyonun % 5'lik olması sağlanacaktır.

3.8.1. Ekstraksiyon

Besiyerinde oluşan metabolitlerin ekstraksiyonu için öncelikle kültür ortamındaki AGF'ların aktivasyonu durdurulacaktır (Wei ve ark., 1985). Kültür süpernatantından 10 ml alınarak etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$), hekzan, kloroform, aseton, metanol ve su ile (1:1) ayırma hunisinde 3 defa metabolit ekstraksiyonu yapıldı (Seumitsu ve ark., 1990; Kuş ve ark., 2020) (Şekil 3.3). Toplanan ekstraktın içine 2,5 g Na_2SO_4 katılıp 3-5 dakika bekletilerek suyu alınıp ve süzölmüştür. Yukarıdaki işlemler aynı şekilde 3, 5 ve 7 gün arayla 39 °C' de bekletilen % 5'lik karbon kaynağı (glukoz, fruktoz, sakaroz) ihtiva eden buyyon kültürlerine de uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Ekstraksiyon yöntemi şeması



Resim 3.5. Ekstraksiyon

3.8.2. Buharlaştırma

Suyu alınan ekstrakt, 100 ml' lik cam balon içerisinde döner buharlaştırıcıda yaklaşık 1 ml kalıncaya kadar buharlaştırıldı. Aletten ıkarılan balona 4 ml etil asetat ilave edilerek çalkalanmış ve karışım biyolojik ölçümde kullanılmak üzere tüplere konularak 4 C' de muhafaza edilecektir (Frank ve ark., 1976).

3.8.3. Biyolojik lm

Biyolojik lm için test organizması olarak kullanılacak olan bakteri suşları Nutrient buyyona (Difco)'a aşılanarak 30 ± 0.1 C' de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha nceden Mueller Hinton Agar deney tüplerine 15'er ml konularak steril edilmiştir. Hazırlanan bu ortama 10 μ l test bakterisi aşılanarak Vortex tp karıştırıcıda iyice çalkalandıktan sonra 9,0 cm çapındaki steril petri kutularına steril 15' er ml dağıtılarak ve besiyerinin homojen bir şekilde petri kutusu içinde dağılması sağılanmıştır (Burmeister ve Hesseltine, 1970). Elde edilen ekstraktlardan, otomatik pipet ile 10 mm çapındaki steril boş antibiyotik disklere (Schleicher & Schll, Nr 2668, Almanya) 100 μ l ekstrakt emdirilmiştir. Katılaşan agar üzerine ekstrakt emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak yerleştirilmiş ve bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4 C' de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra plaklar 37 ± 0.1 C' de 16-18 saat süre ile inkübe edildikten sonra diskler etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek ve mm olarak kaydedilmiştir (Burmeister ve Hesseltine, 1970; Scott ve ark., 1980). Tüm lmler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

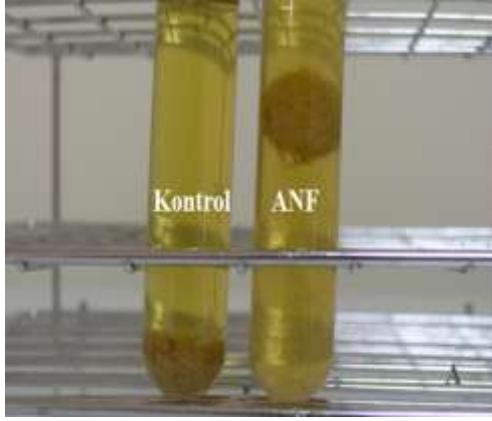
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. AGF İzolasyonu

Tunceli’de yayılış gösteren çeşitli ruminant (evcil koyun, keçi ve sığır) ve tek mideli (at, eşek) hayvanlardan toplanan taze dışkı örneklerinden AGF izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Anaerobik gut fungus izolasyonunda seyreltme yöntemi kullanılmıştır (Theodorou ve ark., 1993). Buna göre 10 gr dışkı örneği 100 ml bazal besiyeri içerisinde iyice çözülmüştür, CO₂ gazı altında ve buradan 10 ml alınarak içinde buğday samanı olan boş Hungate tüplerine taşınmıştır. İlk seyreltilen örnekten alınan 1 ml örnekler yeni 9 ml besiyeri içerisinde eklenerek seyreltme işlemi yapılmış ve buğday samanı içeren boş Hungate tüplerine aktarılmıştır. Bu şekilde 10-1, 10-2 ve 10-3 oranlarında seyreltilerek samanlı Hungate tüplerine aktarılan dışkı örnekleri 5-15 gün süre ile 39 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. Anaerobik kültür ortamındaki istenmeyen mikroorganizmalarının üremelerini engellemek için antibiyotiklerden oluşan özel bir karışım (Ampisilin: 100 µg/ml, Kloramfenikol: 100 µg/ml, Eritromisin: 200 µg/ml, Streptomisin: 140 µg/ml) kullanılmıştır.

4.2. Anaerobik Gut Fungusların Saflaştırılması

Anaerobik mantarların saflaştırılması için Joblin'in (1981) Hungate'e (1969) dayanan *RollTube* yöntemi kullanıldı. %0,5 (w/v) glukoz ve %1,5 (w/v) agar içeren bazal anaerobik ortamı bir Hungate tüpünde eritin ve yaklaşık 45 °C'ye soğutun. Bu besiyerine önceden yetiştirilen mantar kültüründen 0,5 ml steril bir ortamda enjekte edilir ve besiyeri soğuk su dolu bir kovada hemen döndürülerek dondurulur. Mantar gelişimini desteklemek için 39 °C' de 3-4 gün inkübe edin. İnkübasyonun sonunda gelişen mantar kolonileri koloni morfolojisine göre seçildi ve glukoz ortamına aktarıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra saf kültür elde edildi.



Resim 4.1. Rumen fungusları bitki hücre duvarlarını hızlı bir şekilde kolonize etmektedirler. Anaerobik fungus kültürü (A), monosentrik bir fungus (B) ve polisentrik bir fungusun kolonizasyonunun başlangıcı

4.3. Anaerobik Gut Fungusların Tanımlanması

Saflaştırılması tamamlanan anaerobik gut fungusların cins düzeyinde tanımlanması Olympus BX53 ışık mikroskobu kullanılarak yapılmış. Rumen fungusları Theodorou ve ark., (1993) ve Orpin (1994)'e göre tanımlanmıştır (Şekil 4.2).



Resim 4.2. Anaerobik fungusların tanımlanan cinsleri(A:Neocallimastixsp.B: Piromyces sp.)

4.4. Anaerobik Fungusların Stoklarının Oluşturulması

Saflaştırılmış kültürü, enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren Hungate tüplerine yerleştirin. Yeterli büyüme gösteren kültürlerden tübüllere çimlenen mantarlar, çıkarıldı ve anaerobik koşullar altında steril nükleer tüplere aktarıldı. Nükleer tüpe 1 mL %15 (v/v) gliserol ekleyin. Karyovialler ilk başta -20 °C’ de dondurulmuş daha sonra sıvı azot içerisine bırakılarak uzun süreli stoklarının oluşturulmasına katkı sağlamıştır. Sıvı azotta saklanan kültürlerin tekrar canlandırılmasındaki süreçte için sıvı azottan çıkarılan stok kültür önce oda sıcaklığında eritilmiş, akabinde samanlı besi yerlerine aktarılarak 39 °C’de inkübasyona bırakılarak canlılıkları kontrol edilmiştir. Ayrıca çalışmanın diğer basamaklarında kullanılacak olan patojen bakterilerin temini ve stoklarıda oluşturulmuştur.

4.5. AGF Sekonder Metabolit Üretimi

AGF *Necallimastix sp.* MGLF ve *Piromyces sp.* MGLF’den elde sekonder metabolitlerin antimikrobiyal aktivitelerinde daha önceleride kullanılan ve en yaygın yöntemlerden birisi olan disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar Tablo 1-8 da ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında çok çeşitli test yöntemlerinin ve test mikroorganizmalarının kullanılmakta olduğu, bu yöntemler arasında ise en uygun ve güvenilir olanının disk difüzyon metodu olduğu bildirilmektedir (Harper ve Coolins, 1989; Berdy, 1989). Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, *Necallimastix sp.* MGLF’ dan elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Pseudomonasaeruginosa* (DSM 50071)’a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’ un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktoz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hem de Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’ lerin antibakteriyel aktivitesi tablo 4.1 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon kaynağı ksiloz olarak bulunmuştur (10,983±0,829 mm) (Resim 4.3). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatantdan elde edilen ekstraskyonlardan sadece hekzan ile elde edilen örneklerde antibakteriyel aktivite görülmüştür. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.



Resim 4.3. Petri şekilleri

Pseudomonas, toprakta ve suda olduğu gibi çevrede yaygın olarak bulunan bir bakteridir. Birçok farklı *Pseudomonas* türünden insanlarda en sık enfeksiyonlara neden olan *Pseudomonasaeruginosa* olarak adlandırılır ve ameliyattan sonra kanda, akciğerlerde (pnömoni) veya vücudun diğer kısımlarında enfeksiyonlara neden olabilir (Mombeshora ve Mukanganyama, 2019). Bu bakteriler, neden oldukları enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklerin etkilerinden kaçınmak için sürekli olarak yeni yollar bulmaktadırlar. Antibiyotik direncinin bir sonucu olarak, mikroplar onları öldürmek için tasarlanan antibiyotiklere artık yanıt vermediğinde ortaya çıkmıştır. Birkaç tür antibiyotiğe direnç geliştirirlerse, bu mikroplar çoklu ilaca dirençli hale gelmiş bulunmaktadırlar (Mombeshora ve Mukanganyama, 2019). *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları genellikle antibiyotiklerle tedavi edilir. Ne yazık ki, hastaneler veya bakım evleri gibi sağlık bakımı ortamlarına maruz kalan kişilerde, artan antibiyotik direnci nedeniyle *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi daha zor hale gelmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle bağışıklığı zayıf olan hastalarda Gram negatif enfeksiyonun ana nedeni haline gelmiştir. Antibiyotiklere karşı yüksek direnç oranları, *P. Aeruginosa* suşlarının neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkilidir. Yeni antimikrobiyallerin araştırılması, bazı bakterilerde antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasıyla zorunlu hale gelmiştir. Fungal bazlı antimikrobiyaller, çeşitli mekanizmalar kullanarak mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadele etme konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. Çalışmamızın bu kısmında kullanılan AGF' lardanelde edilen ekstraksiyonların yüksek antibakteriyel etkinliği göz önüne alındığında yeni keşifler için bulunmaz bir kaynağı oluşturmaktadır. Sonuçlar hekzan, kloroform, aseton ve metanol ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa'* ya karşı güçlü bir antibakteriyel

aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Dört ekstraktın tümünde görülen antibakteriyel aktivitenin nükleik asit materyalinin sızmasından kaynaklandığı yani *P. aeruginosa'*nın zarının bozulmasına neden oldu şeklinde yorumlanmıştır (Mombeshora ve Mukanganyama, 2019). Gram negatifler lipopolisakkaritlerle kaplı dış zar ile birlikte hücresel bir zara sahiptirler, bu da onları moleküllerin nüfuz etmesi için zorlu bir bariyer haline getirir (Nikaido, 2003). Bu çalışmadaki ekstraktların zar bütünlüğünün bozulması şeklinde etkili olduğu bunun sonucunda zon çaplarının oluştuğu yorumu yapılmıştır. Antibakteriyel ajanlar, genellikle bozulma ve permeabilizasyona neden olarak bakteri membranları üzerinde etki gösterirler (Saritha ve ark., 2015).



Tablo 4. 1. *Neocallimastix* sp. MGLF-4'ün *Pseudomonasaeruginosa*'ya karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	-*-*	-*-*	7,096±0,264	8,09±0,266	-*-*	5,9±0,37	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	7,78±0,285	9,22±0,052	-*-*	6,16±0,27	-*-*	5,93±0,348	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	5,7±0,256	9,296±0,288	-*-*	6±0,34	-*-*	5,93±0,290	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	10,07±0,258	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	5,86±0,296	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	9,1±0,458	-*-*	-*-*	6,11±0,254	-*-*	5,91±0,305	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,01±0,332	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,02±0,326	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	7,33±0,669	-*-*	9,53±0,405	-*-*	-*-*	5,72±0,137	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	8,42±0,546	-*-*	8,98±0,323	-*-*	-*-*	5,86±0,271	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	9,06±0,404	-*-*	7,28±0,449	-*-*	-*-*	6,01±0,372	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	6,54±0,516	6,17±0,254	8,73±0,316	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,05±0,341	6,03±0,346	7,19±0,897	-*-*	6,58±0,564	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,87±0,454	6,04±0,468	7,34±0,456	-*-*	7,41±0,450	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	9,05±0,436	-*-*	10,983±0,829	9,046±0,508	8,35±0,573	6,22±0,13	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,61±0,391	6,08±0,380	10,203±0,427	10,023±0,470	8,296±0,555	6,05±0,33	-*-*	-*-*	-*-*	6,023±0,133
	7-Gün	6,07±0,412	6,04±0,283	9,546±0,456	7,84±0,508	9,223±0,537	5,95±0,26	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	9,67±0,66	-*-*	7,13±0,338	10,53±0,419	8,1±0,490	6,13±0,270	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	10,65±0,54	-*-*	-*-*	9,85±0,494	6,99±0,343	5,97±0,274	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	10,11±0,47	-*-*	-*-*	9,31±0,537	6,36±0,325	6,03±0,431	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.2. *Neocallimastix*sp. MGLF-4'ün *Escherichiacoli* 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	6,37±0,22	-*-*	6,63±0,536	-*-*	-*-*	5,86±0,268	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,8±0,30	-*-*	7,9±0,305	-*-*	-*-*	8,15±0,464	-*-*	5,85±0,337	-*-*	-*-*
	7-Gün	5,83±0,37	-*-*	7,33±0,47	-*-*	-*-*	7,61±0,369	-*-*	6,1±0,321	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	5,91±0,248	-*-*	6,03±0,462	-*-*	-*-*	6,05±0,246	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,9±0,35	-*-*	6,01±0,332	-*-*	-*-*	5,86±0,333	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	5,98±0,447	-*-*	5,99±0,207	-*-*	-*-*	5,89±0,401	-*-*	-*-*	-*-*	6±0,23
CMC	3-Gün	5,946±0,318	6,003±0,320	9,36±0,523	-*-*	-*-*	5,99±0,351	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,906±0,258	6,13±0,324	8,56±0,404	-*-*	-*-*	5,43±0,768	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,006±0,265	6,01±0,401	7,58±0,557	-*-*	-*-*	5,06±0,638	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	6,04±0,528	6,003±0,372	9,85±0,557	-*-*	-*-*	6,03±0,258	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,85±0,317	6,05±0,286	9,04±0,476	5,873±0,386	-*-*	5,92±0,440	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	5,93±0,261	6,11±0,349	8,43±0,546	6,106±0,175	-*-*	5,94±0,379	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	6,02±0,190	-*-*	6,456±0,356	-*-*	-*-*	6,33±0,348	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,156±0,214	-*-*	6,896±0,435	-*-*	-*-*	5,84±0,324	-*-*	6,08±0,335	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,023±0,436	-*-*	7,196±0,409	-*-*	-*-*	6,05±0,298	-*-*	8,6±0,55	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	8,53±0,404	-*-*	6,21±0,308	-*-*	-*-*	6,04±0,220	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,91±0,693	-*-*	5,97±0,190	-*-*	-*-*	5,73±0,196	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,46±0,491	-*-*	6,12±0,238	-*-*	-*-*	6,10±0,225	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, *Necallimastix sp. MGLF-4* den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Escherichiacoli*’a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. *Escherichiacoli* (*E. coli*), bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir (Lestari, 2004). Gram-negatif bakteri *E. coli* insan bağırsağında bulunur ve alt üriner sistem enfeksiyonu, koleosist veya sepsisemiye neden olur (Jose ve JojiReddy, 2010). Farklı çalışmalarda, *E. coli*’deki antibiyotiklere karşı artan direnç oranları gösterilmiştir (Hossain ve ark., 2008). Bu açıdan yeni antibakteriyel maddelere ihtiyaç duymaktadır. AGF’ lar bunu için ideal bir kaynak olabilirler. AGF’un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktöz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hemde Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’lerin antibakteriyel aktivitesi tablo 2 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton olarak bulunmuştur ($9,85 \pm 0,557$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde de artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatantdan elde edilen ekstraksiyonlardan sadece hekzan ile elde edilen örneklerde antibakteriyel aktivite görülmüştür. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.3. *Neocallimastix* sp. MGLF-4'ün *Enterococcus faecalis*'ya karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	9,303±0,748	-*-*	6,026±0,531	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	10,126±0,681	-*-*	5,976±0,424	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	11,353±0,519	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,2±0,557	6,61±0,654	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,09±0,386	6,33±0,525	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,39±0,773	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	-*-*	-*-*	7,71±0,447	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	6,56±0,64	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	6,09±0,386	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	-*-*	-*-*	6,23±0,731	-*-*	-*-*	9,16±0,55	-*-*	6,21±0,519	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	6,02±0,542	-*-*	-*-*	10,51±0,62	-*-*	6,14±0,536	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	7,62±0,701	-*-*	-*-*	9,3±0,55	-*-*	6,05±0,474	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	-*-*	6,43±0,606	-*-*	-*-*	8,50±0,576	6,01±0,505	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	6,45±0,65	-*-*	-*-*	7,86±0,578	6,16±0,554	-*-*	-*-*	-*-*	7,783±0,649
	7-Gün	-*-*	6,25±0,604	-*-*	-*-*	8,56±0,779	6,11±0,537	-*-*	-*-*	-*-*	7,65±0,678
Maltoz	3-Gün	-*-*	-*-*	6,15±0,59	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	6,11±0,42	6,15±0,51	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	6,31±0,69	6,28±0,69	-*-*	9,21±0,62	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi, *Necallimastix sp. MGLF-4* den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Enterococcus faecalis*’a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktöz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hemde Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’lerin antibakteriyel aktivitesi tablo 3 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Su olarak bulunmuştur ($8,56 \pm 0,779$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatant’ dan elde edilen ekstraksiyonlardan sadece hekzan ile elde edilen örneklerde antibakteriyel aktivite görülmüştür ve Supernatant SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Hekzan ($11,353 \pm 0,519$ mm) olarak bulunmuştur. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

AGF olan *Necallimastix sp. MGLF-4* den Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su ile elde edilen ekstraktlar *E. coli*’ye karşı değerlendirildi. Ekstraktlar, daha yüksek bir antibakteriyel etki değeri gösterdi. Sonuçlar, ekstraktların yalnızca bakteriyostatik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Dejoies ve ark., 2021). Önceki bir çalışmada, farklı aerobik fungusların ikincil metabolitlerin de önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Quintanilha-Peixoto ve ark., 2019). Bu çalışmada gözlemlenen antibakteriyel aktivitenin, AGF’ lardan elde edilen SM’ lerin patojenlere karşı korunmasında hayati bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, AGF’ ları SM’ lerinin, tıbbi ve biyoteknolojik öneme sahip bir antimikrobiyal ajan kaynağı olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.4. *Neocallimastix* sp. MGLF-4'ün *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*)

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	6,18±0,485	-*-*	6,45±0,562	-*-*	-*-*	6,1±0,608	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6±0,375	-*-*	6,75±0,526	-*-*	-*-*	6,16±0,585	-*-*	9,29±0,62	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,26±0,623	-*-*	6,03±0,369	-*-*	-*-*	6,22±0,662	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	6,28±0,634	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,14±0,384	-*-*	10,68±0,913	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,19±0,517	-*-*	9,83±0,806	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	6,51±0,268	-*-*	7,95±0,765	-*-*	-*-*	6,12±0,563	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,36±0,496	-*-*	9,18±0,584	-*-*	-*-*	6,35±0,667	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,05±0,413	-*-*	9,15±0,681	-*-*	-*-*	6,20±0,391	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	-*-*	6,23±0,617	6,13±0,457	-*-*	-*-*	6,01±0,447	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	5,96±0,433	6,133±0,523	-*-*	-*-*	6,06±0,434	-*-*	12,16±0,669	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	6,33±0,656	6,16±0,554	-*-*	-*-*	6,18±0,485	-*-*	10,2±0,557	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	-*-*	-*-*	8,75±0,592	-*-*	7,71±0,650	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	8,21±0,537	-*-*	7,21±0,537	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	7,81±0,594	-*-*	8,26±0,693	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	-*-*	-*-*	6,15±0,539	-*-*	-*-*	6,21±0,516	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	6,11±0,451	-*-*	-*-*	6,3±0,624	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	5,96±0,433	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.4’de görüldüğü gibi, *Necallimastix sp. MGLF-4* den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Staphylococcus aureus*’ a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktoz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hem de Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’ lerin antibakteriyel aktivitesi Tablo 4 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton olarak bulunmuştur ($10,68 \pm 0,913$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatantdan elde edilen ekstraksiyonlardan sadece hekzan ile elde edilen örneklerde antibakteriyel aktivite görülmüştür ve Supernatant SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton ($12,16 \pm 0,669$ mm) olarak bulunmuştur. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

Staphylococcus aureus, çok çeşitli klinik belirtilere neden olan önemli bir bakteriyel insan patojenidir (Lowy, 1998). Enfeksiyonlar hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı ortamlarda yaygındır ve MRSA (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*) gibi çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle tedavi yönetimi zor olmaya devam etmektedir (Boucher ve Corey, 2008). *S. aureus* çevrede yaygın olarak bulunur ve çoğu sağlıklı bireyin cilt ve mukoza zarlarında (çoğunlukla burun bölgesi) görülürken normal insan florasında da bulunmaktadır (Lowy, 1998). *S.aureus* normalde sağlıklı ciltte enfeksiyona neden olmaz; ancak, kan dolaşımına veya iç dokulara girmesine izin verilirse, bu bakteriler potansiyel olarak ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (Lowy, 1998). Birçok araştırmacı, farklı türdeki fungusların, çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler için bakteriyel aktivitenin inhibisyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. Bu çalışmalar, aerobik funguslardan elde edilen ekstraktların *S. aureus*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli* , *L. monocytogenes* , *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* gibi mikroorganizmaların büyümesini engellediğini göstermiştir (Kim ve ark., 2016). Biyoaktif maddelerin, organik asitlerin, etil alkol, hidrojen peroksit, diasetil, peptitler, muhtemelen bakteriyosinler ve diğer inhibitör bileşiklerin patojenik bakterilerin büyümesinin inhibisyonundan sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Bu açıdan AGF ‘ lar burdan yola çıkarak yeni antibakteriyel maddelerin kaynağını oluşturabilir.

Tablo 4.5. *Piromyces* sp. MGLF-4'ün *Pseudomonasaeruginosa* 'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	9,14±0,390	-*-*	7,96±0,650	6,71±0,320	6,61±0,513	6,04±0,413	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	9,88±0,449	-*-*	13,58±1,172	8,38±0,349	6,10±0,287	6,07±0,449	-*-*	6,05±0,471	-*-*	-*-*
	7-Gün	9,20±0,666	-*-*	10,51±0,604	8,42±0,260	7,12±0,557	6,13±0,438	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	7,12±0,606	-*-*	7,40±0,396	6,07±0,374	7,32±0,502	6,03±0,176	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	7,4±0,608	-*-*	8,31±0,342	8,54±0,393	7,10±0,502	5,85±0,390	-*-*	5,99±0,389	-*-*	-*-*
	7-Gün	9,61±0,699	-*-*	8,89±0,435	9,00±0,677	7,36±0,373	6,00±0,254	-*-*	6,07±0,374	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	7,11±0,353	5,97±0,286	7,55±0,514	6,31±0,383	-*-*	6,05±0,226	-*-*	-*-*	6,06±0,267	-*-*
	5-Gün	6,85±0,419	6,05±0,353	6,72±0,444	7,54±0,425	-*-*	6,12±0,210	-*-*	-*-*	6,06±0,347	-*-*
	7-Gün	6,13±0,324	6,11±0,232	6,28±0,365	8,4±0,579	-*-*	6,19±0,232	-*-*	-*-*	6,18±0,303	-*-*
Fruktoz	3-Gün	6,06±0,250	-*-*	6,07±0,334	7,19±0,551	-*-*	6,07±0,279	-*-*	6,58±0,541	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,03±0,401	-*-*	5,97±0,470	6,54±0,537	7,72±0,551	6,02±0,262	-*-*	6,02±0,202	-*-*	-*-*
	7-Gün	6±0,427	-*-*	6,07±0,259	6,93±0,479	7,59±0,545	6,08±0,263	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	6,06±0,422	5,97±0,418	7,24±0,635	10,23±0,519	-*-*	6,06±0,290	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,05±0,468	5,92±0,440	7,68±0,513	8,82±0,636	-*-*	5,96±0,260	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,10±0,339	5,93±0,390	6,33±0,440	7,04±0,399	-*-*	6,09±0,317	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	6,06±0,319	-*-*	5,95±0,349	6,14±0,328	-*-*	-*-*	-*-*	6,09±0,260	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,12±0,309	-*-*	6,00±0,329	6,34±0,208	-*-*	-*-*	-*-*	6,02±0,433	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	7,73±0,621	6,21±0,338	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.5’de görüldüğü gibi, *Piromyces sp. MGLF-5*den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Pseudomonas aeruginosa*’ a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’ un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktoz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hem de Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’ lerin antibakteriyel aktivitesi Tablo 5 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton olarak bulunmuştur ($13,58 \pm 1,172$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Supernatantdan elde edilen ekstraksiyonlardan SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton ($6,58 \pm 0,541$ mm) olarak bulunmuştur. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisi, bakterilerin antibakteriyel maddelere karşı direnç geliştirme yeteneği nedeniyle giderek daha karmaşık hale gelmektedir (Levy ve Marshall, 2004). Bu nedenle, yeni bir etki mekanizmasına sahip yeni antibakteriyel madde sınıflarından yararlanmaya acil bir ihtiyaç vardır. Ortaya çıkan hastalıkları veya dirençli bakteri türlerini kontrol edebilen yeni antibakteriyel ajanlara olan artan ihtiyaç, bir dizi araştırma grubuna yeni antibakteriyel bileşikler için karasal ve deniz ortamlarını keşfetme konusunda ilham verdi (Ng ve ark., 2015). Aerobik mantarlar, geleneksel olarak ikincil metabolitler veya doğal ürünler olarak adlandırılan çok çeşitli biyoaktif molekülleri sentezlediği bilinen önemli bir mikroorganizma grubunu temsil eder (Bills ve Stadler, 2014). İkincil metabolitler, normal büyüme, gelişme veya üreme için gerekli olmayan, ancak üretici organizmaya rekabet avantajı sağlayan biyolojik olarak aktif organik bileşiklerdir. Bu metabolitler için *Piromyces sp.* uygun bir kaynak olarak görülmektedir.

Tablo 4.6. *Piromyces sp.* MGLF-4'ün *Escherichiacoli*'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	7,38±0,521	-*-*	6,69±0,399	-*-*	-*-*	5,72±0,391	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	7,37±0,349	-*-*	6,46±0,456	-*-*	-*-*	6,61±0,499	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,70±0,406	-*-*	8,65±0,635	-*-*	-*-*	5,57±0,294	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	6,43±0,453	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,53±0,412	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	7,1±0,433	-*-*	6,18±0,296	-*-*	-*-*	7,33±0,465	-*-*	6,02±0,375	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,08±0,380	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,12±0,546	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	6,08±0,380	6,45±0,482	8,99±0,554	-*-*	-*-*	6,13±0,304	-*-*	6,1±0,241	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,01±0,384	6,20±0,464	8,6±0,407	-*-*	-*-*	6,02±0,404	-*-*	6,03±0,352	-*-*	-*-*
	7-Gün	5,99±0,262	7,42±0,450	6,16±0,364	-*-*	-*-*	5,96±0,355	-*-*	6,04±0,286	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	6,01±0,262	-*-*	5,98±0,441	-*-*	-*-*	5,93±0,264	-*-*	5,71±0,713	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,99±0,230	-*-*	5,91±0,300	-*-*	-*-*	6,18±0,251	-*-*	5,99±0,207	-*-*	-*-*
	7-Gün	5,9±0,361	-*-*	6,01±0,502	-*-*	-*-*	6,09±0,320	-*-*	6,10±0,222	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	6,08±0,380	-*-*	6,94±0,471	6,14±0,384	-*-*	-*-*	-*-*	6,09±0,317	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,03±0,395	-*-*	7,63±0,604	6,11±0,456	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,13±0,386	-*-*	8,58±0,561	5,98±0,438	-*-*	6,05±0,238	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	6,13±0,324	-*-*	8,66±0,606	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,97±0,300	-*-*	6,87±0,574	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	5,91±0,300	-*-*	6,53±0,655	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.6’de görüldüğü gibi, *Piromyces sp. MGLF-5*den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Escherichia coli*’ a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’ un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktöz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hem de Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’ lerin antibakteriyel aktivitesi Tablo 6 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton olarak bulunmuştur ($8,99 \pm 0,554$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatantdan elde edilen ekstraksiyonlardan sadece hekzan ile elde edilen örneklerde antibakteriyel aktivite görülmüştür ve Supernatant SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Hekzan ($7,33 \pm 0,465$ mm) olarak bulunmuştur. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.7. *Piromyces* sp. MGLF-4'ün *Enterococcus faecalis*'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	6,01±0,534	6,18±0,630	-*-*	6,35±0,642	6,20±0,637	8,11±0,649	5,92±0,452	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,16±0,523	6,19±0,582	-*-*	6,14±0,610	6,28±0,639	9,25±0,548	6,07±0,391	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,08±0,650	6,22±0,551	-*-*	6,03±0,491	6,14±0,373	8,71±0,678	6,08±0,504	-*-*	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	-*-*	-*-*	6,07±0,385	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	5,99±0,383	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	5,95±0,474	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	6,01±0,453	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,18±0,658	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	5,97±0,427	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,15±0,651	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,00±0,516	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,42±0,282	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	6,17±0,604	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	7,30±0,605	6,18±0,655	-*-*	-*-*	6,04±0,404
	5-Gün	6,20±0,697	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	7,41±0,565	6,17±0,609	-*-*	-*-*	6,13±0,457
	7-Gün	6,17±0,523	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	8,99±0,668	6,15±0,508	-*-*	-*-*	6,25±0,548
Ksiloz	3-Gün	6,04±0,462	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	7,51±0,537	-*-*	7,38±0,564	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,03±0,424	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	9,25±0,624	-*-*	6,72±0,629	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,02±0,366	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	10,46±0,779	-*-*	6,00±0,383	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	6,10±0,407	-*-*	7,68±0,646	-*-*	-*-*	8,53±0,661	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,16±0,669	-*-*	6,48±0,591	-*-*	-*-*	9,21±0,649	6,28±0,636	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,28±0,724	-*-*	6,03±0,493	-*-*	-*-*	8,38±0,598	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi, *Piromyces sp. MGLF-5*den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Enterococcus faecalis*’a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’ un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktöz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3,5 ve 7) hem hücre hem de Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’ lerin antibakteriyel aktivitesi Tablo 7 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton olarak bulunmuştur ($7,68 \pm 0,646$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatantdan elde edilen ekstraksiyonlardan sadece hekzan ile elde edilen örneklerde antibakteriyel aktivite görülmüştür. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.8. *Piromyces* sp. MGLF-4'ün *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*'ye karşı ürettiği antibakteriyel etki (Ortalama±St Hata, - Antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi (-*-*))

		Hücre					Supernatant				
		Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su	Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	Su
Glikoz	3-Gün	6,35±0,672	-*-*	6,94±0,374	6,42±0,598	-*-*	6,01±0,450	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,25±0,692	-*-*	9,41±0,623	6,00±0,430	-*-*	6,07±0,460	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,25±0,633	-*-*	10,11±0,594	6,08±0,389	-*-*	6,03±0,433	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Samanlı	3-Gün	-*-*	-*-*	8,11±0,542	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	9,23±0,696	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	9,38±0,678	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
CMC	3-Gün	5,95±0,448	6,13±0,466	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,00±0,458	6,06±0,463	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	6±0,519	6,05±0,505	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
Fruktoz	3-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,07±0,402	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	5,98±0,404	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,02±0,534	-*-*	-*-*
Ksiloz	3-Gün	6,15±0,539	-*-*	7,64±0,644	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	6,22±0,570	-*-*	-*-*
	5-Gün	6,20±0,637	-*-*	8,20±0,629	6,26±0,623	-*-*	-*-*	-*-*	6,04±0,361	-*-*	-*-*
	7-Gün	6,03±0,488	-*-*	7,15±0,625	-*-*	6,26±0,648	-*-*	-*-*	6,00±0,337	-*-*	-*-*
Maltoz	3-Gün	-*-*	-*-*	6,22±0,626	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	5-Gün	-*-*	-*-*	6,63±0,718	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*
	7-Gün	-*-*	-*-*	7,08±0,564	-*-*	-*-*	6,04±0,485	-*-*	-*-*	-*-*	-*-*

Tablo 4.8’de görüldüğü gibi, *Piromyces sp. MGLF-5*den elde edilen farklı metabolitlerin test mikroorganizmalarından *Enterococcus faecalis*’a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. AGF’ un farklı karbon kaynaklarındaki gelişimleri göz önüne alınarak (Glikoz, Samanlı, CMC, Fruktöz, Ksiloz ve Maltoz) farklı günlerdeki (3, 5 ve 7) hem hücre hem de Supernatant örneklerinden Hekzan, Kloroform, Aseton, Metanol ve Su gibi çözücüler kullanılarak elde edilen SM’ lerin antibakteriyel aktivitesi Tablo 8 de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Hücresel SM aktivitenin en yüksek olduğu karbon Aseton olarak bulunmuştur ($10,11 \pm 0,594$ mm). Elde edilen sonuçların fungusun gelişimine paralel olduğu görülmüştür. 3. günlerdeki ekstraksiyonların aktivitesindeki artış 5. ve 7. günlerde artmıştır. Dikkat çeken kısım supernatantdan elde edilen ekstraksiyonlardan Aseton ile elde edilen Ksiloz ve Fruktöz da antibakteriyel aktivite görülmüştür. Buradan çıkarılan sonuç antibakteriyel ürünlerin hücresel olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.9. Antimikrobiyal aktivite kontrol grubu (Ortalama değerler- mm)

Kontrol Grubu	Patojen Mikroorganizmalar			
	<i>Pseudomonasaeruginosa</i> (DSM 50071)	<i>Enterococcusfae</i> <i>calis</i> (ATCC 29212)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> (ATCC 25922)
Hekzan (%99)	0	0	0	0
Kloroform (%99,9)	0	0	0	0
Aseton (%99,5)	0	0	0	0
Metanol(%99,8)	0	0	0	0
Su	0	0	0	0
Nistatin (NY100)	0	0	0	0
Rifampin (RA5)	0	20,4 mm	15,2 mm	7 mm
Tetrasiklin (T30)	0	24,1 mm	26,2 mm	0
Eritromisin(E15)	0	20,1 mm	0	0
Vankomisin(VA 30)	0	14,4 mm	14,4 mm	0
Gentamisin(CN 10)	18 mm	18,7 mm	14,8 mm	13,5 mm
Penisilin(P10)	0	28 mm	16,3 mm	18,5 mm
Kanamisin(K30)	0	18,4 mm	0	0
Ampisilin(AM10)	0	18,3 mm	9,3 mm	9,8 mm
Streptomisin (S10)	11,7 mm	20 mm	0	7 mm
Tetrasiklin(TE3 0)	10,3 mm	35 mm	28,4 mm	7,6 mm
Kloramfenikol(C30)	36 mm	30 mm	23,7 mm	22 mm

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bakterilerde antibiyotik direncindeki hızlı gelişme, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için yeni tedavilerin geliştirilmesine yönelik artan bir talep yaratmıştır. Bu tez, AGF'lerden olan *Neocallimastix* sp. Ve *Piromyces* sp. örneklerinin antibakteriyel aktivitesine odaklanmaktadır. Dünyanın her yerinden karasal ortamdan izole edilmiş birçok yeni AGF türü bulunmaktadır. Bu çalışma AGF'lerin patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği ilk çalışmalardan bir tanesidir. Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan aneorobik gut fungus suşlarından elde edilen metabolitlerin biyolojik ölçüm yöntemi ile belirlenmesinde test mikroorganizması olarak *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'nin kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca kültür ortamına katılan bazı substratların farklı metabolit üretmesine neden olduğu için, çalışmada kullanılan diğer test bakterileri de AGF' lar tarafından üretilen metabolitlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR

- Adpressa, D. A., Connolly, L. R., Konkel, Z. M., Neuhaus, G. F., Chang, X. L., Pierce, B. R., Loesgen, S., 2019. A metabolomics-guided approach to discover *Fusarium graminearum* metabolites after removal of a repressive histone modification. *Fungal Genetics and Biology*, 132: 103256.
- Avalos, J., Limon, MC., 2021. Mantar Sekonder Metabolizması. *Ansiklopedi 2022*, 2:1–13.
- Avalos, J., Pardo-Medina, J., Parra-Rivero, O., Ruger-Herreros, M., Rodríguez-Ortiz, R., Hornero-Méndez, D., Limón, M.C., 2017. Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium*. *J. Fungi*, 3:39.
- Barr, D.J.S., Kudo, H., Jakober, K. D., Cheng, K.J., 1989. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp., *Piromyces communis*, and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. *Canadian journal of botany*, 67(9):2815-2824.
- Bennett, J.W., Chung, K.T., 2001. Alexander Fleming and the discovery of penicillin.
- Bills, G.F., Stadler, M., 2014. Editorialcomment discovery, distribution and biosynt hesis of Fungal secondary metabolites. *Mycology*, 5(3):99–101.
- Boettger, D., Hertweck, C., 2013. Molecular diversity sculpted by fungal PKS–NRPS hybrids. *Chem Bio Chem*, 14(1):28-42.
- Boucher, H.W, Corey, G.R., 2008. Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.*, 1(46):344-9.
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic cell*, 3(2):527-535.
- Brakhage, A.A., 1998. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):547-585.
- Brakhage, A.A., 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1):21-32.
- Breton, A., Bernalier, A., Dusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., 1990. *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS microbiology letters*, 70(2):177-182.
- Burmeister, H.R., Hesseltine, Ç.W., 1970. Biological assays for two mycotoxins produced by *fusarium tricinitum*. *Appl. Microbiol.*, 20(3):437-440.
- Callaghan, T.M., Podmirseg, S.M., Hohlweck, D., Edwards, J.E., Puniya, A.K., Dagar, S.S., Griffith, G.W., 2015. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycoKeys*, 9:11-28.

- Christianson, D.W.**, 2006. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 106(8):3412-3442.
- Christianson, D.W.**, 2008. Unearthing the roots of the terpenome. *Current opinion in chemical biology*, 12(2):141-150.
- Çömlekçioğlu, U., Akyol, İ., Bülent, K.A.R., Özköse, E., Ekinci, M.S.**, 2008. Anaerobik rumen funguslarının izolasyonu, tanımlanması ve kültür koleksiyonunun oluşturulması. *Hayvansal Üretim*, 49(2).
- Dagar, S.S., Kumar, S., Griffith, G.W., Edwards, J.E., Callaghan, T.M., Singh, R., Puniya, A.K.**, 2015. A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal biology*, 119(8):731-737.
- Dao, T.T.H., Linthorst, H.J.M., Verpoorte, R.**, 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10(3):397-412.
- Dejoies, L.; Le Neindre, K.; Reissier, S.; Felden, B.; Cattoir, V.**, 2021. Distinct expression profiles of regulatory RNAs in there sponseto biocides in staphyl ococcus aureus and enter ococcus faecium. *Sci.* 11:6892.
- Du, L., Sánchez, C., Shen, B.**, 2001. Hibrit peptit-poliketid doğal ürünler: Biyosentez ve yeni moleküllerin mühendisliğine yönelik beklentiler. *Metabolik mühendislik*, 3(1): 78-95.
- Kim, D.H.**, 2016. Antimicrobialactivity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, 36(6): 787
- Lowy, F.D.**, 1998. Staphylococcus aureus in fections. *N Engl J Med.* 20;339(8):520-32.
- Eisenman, H.C., Casadevall, A.**, 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3):931-940.
- Finking, R., Marahiel, M.A.**, 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual review of microbiology*, 58: 453.
- Fisch, K.M.**, 2013. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS-NRPS. *RSC advances*, 3(40):18228-18247.
- Flissi, A., Ricart, E., Campart, C., Chevalier, M., Dufresne, Y., Michalik, J., Pupin, M.**, 2020. Norine: Update of the nonribosomal peptide resource. *Nucleic Acids Research*, 48(1):465-469.
- Gold, J.J., Heath, I.B., Bauchop, T.**, 1988. Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the Neocallimasticaceae. *Biosystems*, 21(3-4):403-415.

- Gordon, G.L., Phillips, M.W.,** 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutrition Research Reviews*, 11(1):133-168.
- Griffith, G.W., Baker, S., Fliegerova, K., Liggenstoffer, A., Van Der Giezen, M., Voigt, K., Beakes, G.,** 2010. Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA fungus*, 1(2):181-185.
- Hanafy, R.A., Elshahed, M.S., Liggenstoffer, A.S., Griffith, G.W., Youssef, N.H.,** 2017. *Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep. *Mycologia*, 109(2):231-243.
- Hanafy, R.A., Elshahed, M.S., Youssef, N.H.,** 2018. *Feramyces austinii*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer. *Mycologia*, 110(3):513-525.
- Hanafy, R.A., Lanjekar, V.B., Dhakephalkar, P.K., Callaghan, T.M., Dagar, S.S., Griffith, G.W., Youssef, N.H.,** 2019. Seven new Neocallimastigomycota genera from fecal samples of wild, zoo-housed, and domesticated herbivores: Description of *Ghazallomyces constrictus* gen. nov., sp. nov., *Aklioshbomyces papillarum* gen. nov., sp. nov., *Agriosomyces longus* gen. nov., sp. nov., *Capellomyces foraminis* gen. nov., sp. nov. and *Capellomyces elongatus* sp. nov., *Joblinomyces apicalis* gen. nov., sp. nov., *Khoyollomyces ramosus* gen. nov., sp. nov., and *Tahromyces munnarensis* gen. nov., sp. nov. *Mycologia*, 1-28.
- Heddergott, C., Calvo, A.M., Latge, J.,** 2014. The volatome of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 13(8):1014-1025.
- Herbst, D.A., Townsend, C.A., Maier, T.,** 2018. The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Natural product reports*, 35(10):1046-1069.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., Bechthold, A.,** 2007. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural product reports*, 24(1):162-190.
- Ho, Y.W., Abdullah, N., Jalaludin, S.,** 1994. *Orpinomyces intercalaris*, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon*, 50:139-150.
- Hossain, M.T., Siddique, M.P., Hossain, F.M.A., Zinnah, M.A., Hossain, M.M., Alam, M.K.,** 2008. Isolation, identification, toxin profile and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from broilers and layers in Mymensingh district of Bangladesh. *Bangl J Vet Med*. 6(1):1-5.
- Hungate, R.E.,** 1969. Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In Methods in microbiology*, 3:117-132.
- İnci, H., Özköse, E., Ekinci, M.S., Kuzugüdenli, E., Kar, Ö.Ü.B., Yazdıç, Ö. Ü. F. C., Kaya, C.,** 2020. Ziraat Çalışmaları Ve Çiftlik Hayvanlarında İleri Biyoteknolojik Uygulamalar.

- Jiang, C., Lv, G., Tu, Y., Cheng, X., Duan, Y., Zeng, B., He, B.,** 2021. Applications of CRISPR/Cas9 in the synthesis of secondary metabolites in filamentous fungi. *Frontiers in Microbiology*, 12:638096.
- Joblin, K.N.,** 1981. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and environmental microbiology*, 42(6):1119- 1122.
- Joshi, A., Lanjekar, V.B., Dhakephalkar, P.K., Callaghan, T.M., Griffith, G.W., Dagar, S.S.,** 2018. Liebetanzomyces polymorphus gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from the rumen of a goat. *MycoKeys*, 40:89-110.
- Keller, N.P.,** 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3):167-180.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W.,** 2005. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12):937-947.
- Kellogg, B.A., Poulter, C.D.,** 1997, Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Current opinion in chemical biology*, 1(4):570-578.
- Kim, H., Woloshuk, C.P.,** 2008. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(6):947-953.
- Kistler, H.C., Broz, K.,** 2015. Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Frontiers in microbiology*, 6:68.
- Kuş, Ç.,** 2020. Picoa juniperi, picoa lefebvrei türlerinin sekonder metabolitlerinin saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi.
- Koetschan, C., Kittelmann, S., Lu, J., Al-Halbouni, D., Jarvis, G.N., Müller, T., Janssen, P.H.,** 2014. Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core throughout the anaerobic fungi (Neocallimastigomycota). *PloS one*, 9(3):91928.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., Croteau, R.,** 2000. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24):13172-13177.
- Lestari, E.S.,** 2004. Antimicrobial resistance among *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolates in the Indonesian population inside and outside hospitals. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Prague / Czech Republic, May 1-4.
- Levy, S.B., Marshall, B.,** 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenge and responses. *NatMed*. 10(12):122-129.

- Li, J., Heath, I.B., Bauchop, T.,** 1990. *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant. *Canadian journal of botany*, 68(5):1021-1033.
- Li, Z. B., Liu, L., Lu, X., Ji, J., Chen, J.,** 2021. Analysis of the *Talaromyces flavus* exometabolome reveals the complex responses of the fungus to minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 298:70-86.
- Macheleidt, J., Mattern, D.J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Brakhage, A.A.,** 2016. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annual review of genetics*, 50:371-392.
- Matsuda, Y., Awakawa, T., Mori, T., Abe, I.,** 2016. Unusual chemistries in fungal meroterpenoid biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31:1-7.
- Mombeshora, M., Mukanganyama, S.,** 2019. Antibacterial activities, proposed mode of action and cytotoxicity of leaf extracts from *Trium fectawelwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1):1-12.
- Motoyama, T., Yun, C.S., Osada, H.,** 2021. Biosynthesis and biological function of secondary metabolites of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 48:kuab058. doi: 10.1093/JIMB/KUAB058.
- Niehaus et al., Apicidin F.,** 2014. Characterization and genetic manipulation of a new secondary metabolite gene cluster in the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One* 9, e103336.
- Ng, T.B., Cheung, R.C.F., Wong, J.H., Bekhit, A.A., Bekhit, A.E.,** 2015. Antibacterial products of marine organisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(10):4145–4173.
- Nikaido, H.,** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:593–656.
- Nosanchuk, J.D., Stark, R.E., Casadevall, A.,** 2015. Fungal melanin: what do we know about structure?. *Frontiers in microbiology*, 6:1463.
- Orpin, C.G.,** 1975. Studies in the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.*, 91:249-262.
- Orpin, C.G.,** 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Microbiology*, 94(2):270-280.
- Orpin, C.G., Munn, E.A.,** 1986. *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the Neocallimasticaceae inhabiting the rumen of sheep. *Transactions of the British Mycological Society*, 86(1):178-181.

- Orpin, C.G.**, 1994. Anaerobic fungi: taxonomy, biology and distribution in nature, In: The anaerobic fungi. (Ed. C.G. Orpin ve D.O. Mountfort), Marcel Dekker, New York, 1-47s.
- Özköse, E., Thomas, B.J., Davies, D.R., Griffith, G.W., Theodorou, M.K.**, 2001. *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6):666-673.
- Pardo-Medina, J., Gutiérrez, G., Limón, M.C., Avalos, J.**, 2021. Impact of the White Collar photoreceptor WcoA on the *Fusarium fujikuroi* transcriptome. *Frontiers in microbiology*, 11:619474.
- Pfannmüller, A., Leufken, J., Studt, L., Michielse, C.B., Sieber, C.M., Güldener, U., Tudzynski, B.**, 2017. Comparative transcriptome and proteome analysis reveals a global impact of the nitrogen regulators AreA and AreB on secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One*, 12(4):0176194.
- Quin, M.B., Flynn, C.M., Schmidt-Dannert, C.**, 2014. Traversing the fungal terpenome. *Natural product reports*, 31(10):1449-1473.
- Quintanilha-Peixoto, G., Torres, R.O., Reis, I.M.A., Oliveira, T.A.S.d., Bortolini, D.E., Duarte, E.A.A., Ariston de CarvalhoAzevedo, V., Brenig, B., Aguiar, E.R.G.R., Soares, A.C.F.**, 2019. Calmbeforethestorm: A glimpseinto the secondary metabolism of *A spergilluswelwitschiae*, the etiologicagent of thesisal bole rot. 11, 631.
- Raistrick, H.**, 1950. Bakerian lecture-a region of biosynthesis. proceedings of the royal society of London. *Series B-Biological Sciences*, 136(885):481-508.
- Rawlings, B.J.**, 1997. Biosynthesis of polyketides. *Natural product reports*, 14(5):523-556.
- Robey, M.T., Caesar, L.K., Drott, M.T., Keller, N.P., Kelleher, N.L.**, 2021. An interpreted atlas of biosynthetic gene clusters from 1,000 fungal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(19):2020230118.
- Rokas, A., Mead, M.E., Steenwyk, J.L., Raja, H.A., Oberlies, N.H.**, 2020. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Natural product reports*, 37(7):868-878.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Langley, E.**, 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2):146-167.
- Sacchettini, J.C., Poulter, C.D.**, 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science*, 277(5333): 1788-1789.
- Saritha, K., Rajesh, A., Manjulatha, K., Setty, O.H., Yenugu, S.**, 2015. Mechanism of antibacterial action of the alcoholic extracts of *Hemidesmusindicus* (L.) R. Br. ExSchult, *Leucasaspera* (wild.), *Plumbagozeylanica* L.,and *Tridaxprocumbens* (L.)

RR. Br. *ExSchult. Front Microbiol.* 6:1–9.

Schmidt-Dannert, C., 2014. Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Biotechnology of Isoprenoids*, 19-61.

Scott, P.M., Kanhere, S.R., 1980. Liquid Chemotherapy Determination of Tenuazoic Acids in Tomato Paste, J. Assoc. Offic. Chemists, 63:612-621.

Sørensen, J.L., Sondergaard, T.E., Covarelli, L., Fuertes, P.R., Hansen, F.T., Frandsen, R.J.N., Giese, H., 2014. Identification of the biosynthetic gene clusters for the lipopeptides fusaristatin A and W493 B in *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Journal of natural products*, 77(12):2619-2625.

Soukup, A.A., Keller, N.P., Wiemann, P., 2016. Enhancing nonribosomal peptide biosynthesis in filamentous fungi. In nonribosomal peptide and polyketide biosynthesis. Humana Press, New York, NY., 149-160s.

Staunton, J., Weissman, K.J., 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural product reports*, 18(4):380-416.

Strauss, J., Reyes-Dominguez, Y., 2011. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1):62-69.

Studt, L., Wiemann, P., Kleigrew, K., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2012. Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4468–4480.

Studt, L., Rösler, S.M., Burkhardt, I., Arndt, B., Freitag, M., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2016. Metiltransferaz Kmt6'nın yıkılması, H3K27me3'ü rahatlatır ve *Fusarium fujikuroi*'de şifreli ve başka türlü sessiz ikincil metabolit gen kümelerinin indüklenmesine neden olur. *Çevresel Mikrobiyoloji*, 18(11):4037-4054.

Süssmuth, R.D., Mainz, A., 2017. Nonribosomal peptide synthesis principles and prospects. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(14):3770-3821.

Swift, C.L., 2020. Deciphering the functions of natural products from anaerobic fungi for applications in biotechnology. University of California, Santa Barbara.

Swift, C.L., Louie, K.B., Bowen, B.P., Hooker, C.A., Solomon, K.V., Singan, V., O'Malley, M.A., 2021. Cocultivation of Anaerobic Fungi with Rumen Bacteria Establishes an Antagonistic Relationship. *Mbio*, 12(4):01442-21.

Szilágyi, M., Miskei, M., Karányi, Z., Lenkey, B., Pócsi, I., Emri, T., 2013. Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 159(1):176-190.

Theobald, S., Vesth, T.C., Andersen, M.R., 2019. Genus level analysis of PKS-NRPS and NRPS-PKS hybrids reveals their origin in Aspergilli. *BMC genomics*, 20(1):1-12.

- Theodorou, M.K., Davies, D.R., Jordan, M.G., Trinci, A.P., Orpin, C.G., 1993.** Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants, *Mycological research*, 97(10):1245-1252.
- Tudzynski, B., 2014.** Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in microbiology*, 5:656.
- Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B., Marzluf, G. A., 1999.** Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1):106-114.
- Wagner, D., Wiemann, P., Huß, K., Brandt, U., Fleißner, A., Tudzynski, B., 2013.** A sensing role of the glutamine synthetase in the nitrogen regulation network in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS One*, 8(11):80740.
- Walsh, C.T., 2016.** Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Natural product reports*, 33(2):127-135.
- Wang, X., Liu, X., Groenewald, J.Z., 2017.** Phylogeny of anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota), with contributions from yak in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(1):87-103.
- Wang, G., Ran, H., Fan, J., Keller, N.P., Liu, Z., Wu, F., Yin, W.B., 2022.** Fungal fungal cocultivation leads to widespread secondary metabolite alteration requiring the partial loss-of-function *VeA1* protein. *Science advances*, 8(17):6094.
- Wei, C., Swartz, D.D., 1985.** Growth and Production of Mycotoxins by *Alternaria alternata* in Synthetic. Semi-synthetic Andrice Media. *J. Food Protec.*, 48:306-664.
- Weissman, K.J., 2015.** Uncovering the structures of modular polyketide synthases. *Natural product reports*, 32(3):436-453.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrew, K., Beyer, M., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2009.** Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Molecular microbiology*, 72(4):931-946.
- Wiemann, P., 2013.** Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110:17065-17070.
- Yazdıç, F.C., Karaman, A., Yazdıç, F., 2018.** Farklı Enerji Kaynaklarında Geliştirilen Bazı *Bacillus* Suşları Tarafından Üretilen Sekonder Metabolitlerin Antimikrobiyal Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture: Food Science and Technology*.
- Yin, W., Keller, N.P., 2011.** Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *The Journal of Microbiology*, 49(3):329-339.
- Youssef, N.H., Couger, M. B., Struchtemeyer, C.G., Liggenstoffer, A.S., Prade, R.A., Najar, F.Z., Elshahed, M.S., 2013.** The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history 47 of a

remarkable plant biomass degrader. *Applied and environmental microbiology*, 79(15):4620-4634.

Zhang, X., Guo, J., Cheng, F., Li, S., 2021. Cytochrome P450 enzymes in fungal natural product biosynthesis. *Natural Product Reports*, 38(6):1072-1099.

