

**T.C.  
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**BAZI MANTAR EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTESİ VE ZAMAN-ÖLDÜRME KİNETİKLERİNİN  
GÖZLEMLENMESİ**

**NAHLAH ABRAHEEM SAED ALALAQI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER**

**ARALIK - 2020  
KASTAMONU**



## TAAHHÜTNAME

*Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.*

Nahlah Abraheem Saed ALALAQI



## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### BAZI MANTAR EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ VE ZAMAN-ÖLDÜRME KİNETİKLERİNİN GÖZLEMLENMESİ

NAHLAH ABRAHEEM SAED ALALAQI

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

Doğal ürünler, çeşitli hastalıklara karşı kullanılabilen bileşikler üretme potansiyeline sahiptir. Yaygın bakteriyel ilaç direnci göz önüne alındığında yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması önemlidir. Bu çalışmada, *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat. ve *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., adlı üç makromantarın, altı farklı çözücü (su, metanol, kloroform, aseton, petrol eteri ve n-hekzan) kullanılarak elde edilen ekstraktlarının biri adet standart suş (*E. coli* ATCC 25922) ve on biri farklı direnç profiline sahip klinik izolat olan toplam on iki farklı *Escherichia coli* suşuna karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testleri kullanılmıştır. Ayrıca, seçilen ekstraktlar için zaman öldürme kinetiği testi yapılmıştır. Sonuç olarak, ekstraktların *E. coli* suşlarına karşı hem bakteriyostatik, hem de bakteriyosidal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ekstraktların kimyasal bileşimini ve etki şeklini belirlemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Antimikrobiyal aktivite, *Fomes fomentarius*, *Phellinus hartigii*, *Fomitopsis pinicola*, minimum inhibisyon konsantrasyonu, MİK, minimum bakterisidal konsantrasyon, MBK, zaman öldürme kinetiği

Aralık 2020, 65 Sayfa

## ABSTRACT

### MSC THESIS

#### INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF SOME PLANT EXTRACTS IN INHIBITION OF SOME IMPORTANT ENZYMES IN METABOLIC DISEASES

AHMED MUFTAH OMAR MENSHAZ

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR: PROF. DR. ERGİN MURAT ALTUNER

Natural products have potential to produce compounds, which can be used against various diseases. While taking into account widespread drug resistance it is important to investigate new antimicrobial substances. In this study, the antimicrobial activities of the extracts of three macrofungi, namely *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat. and *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., which were extracted by using six different solvents (water, methanol, chloroform, acetone, petroleum ether and n-hexane), were examined against twelve different *Escherichia coli* strains, where one of these strains was a standard strain (*E. coli* ATCC 25922) and eleven strain were clinical isolates presenting different resistance profiles. For determining the antimicrobial activity of the extracts minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests were used. In addition, time-kill kinetics test was conducted for selected extracts. As a result it was observed that extracts have both bacteriostatic or bacteriocidal activity against *E. coli* strains. Further researched should be conducted to determine the chemical composition of the extracts and the mode of action.

**KEYWORDS:** Antimicrobial activity, *Fomes fomentarius*, *Phellinus hartigii*, *Fomitopsis pinicola*, minimum inhibition concentration, MIC, minimum bactericidal concentration, MBC, time-kill kinetics

December 2020, 65 Page

## TEŞEKKÜR

Danışmanımın bana verdiği bu tezi nihayet tamamlayabildiğim için başta Allah'a şükürler olsun. Tez çalışmalarım sırasında pek çok sorun çıkmasına rağmen, birlikte çalıştığım arkadaşlarımın destekleriyle nihayet tezimi tamamlayabildim.

Öncelikle danışmanım Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER'e teşekkür ederim, çünkü bu dönemde onun yönlendirmeleri olmasaydı tezimi tamamlamam mümkün olamazdı. Yaptığım deneylerde güzel sonuçlar alabilmem için çalışmalarım sırasında beni teşvik ettiği ve bana yol gösterdiği için kendisine minnettarım.

Danışmanımın yanı sıra, bu çalışmada kullanılan mantar örneklerini Ankara Üniversitesi'ndeki kişisel koleksiyonundan sağlayan Doç. Dr. Ilgaz AKATA'ya, mantar örneklerimin su ile elde edilen ekstraktlarının liyofilize edilmesinde yardımcı olan Dokuz Eylül Üniversitesi'nden Doç. Dr. Kerem CANLI ve Atakan BENEK'e, laboratuvarındaki yardımlarından dolayı Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine ve bu çalışmada kullanılan bakterilerin sağlanmasındaki yardımlarından dolayı Eda ALTINÖZ'e teşekkür ederim.

Her zaman yardımcı olan ve aynı zamanda iyi bir iş çıkarmam için beni sıkı çalışmaya teşvik eden aileme ve sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim. Umarım tüm bu çabalar bana ve birlikte çalıştığım diğer arkadaşlar için çeşitli faydalar sağlar.

Son olarak, çalışmalarına ve bu tezin araştırma ve yazma sürecine her zaman katkıda bulunan ve destek veren aileme ve eşime içten teşekkürlerimi sunuyorum. Onlar olmasaydı başarı mümkün olamazdı..

Nahlah Abraheem Saed ALALAQI

Kastamonu, 2020

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>TEZ ONAYI</b> .....	<b>ii</b>
<b>TAAHHÜTNAME</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Doğal İlaç Olarak Makrofunguslar.....	2
1.2 Mikroorganizmalara Karşı Makrofunguslar.....	3
1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	4
1.4 Antimikrobiyallere Karşı Bakteri Direnci .....	5
1.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Makrofunguslar.....	6
1.5.1 <i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr. ....	6
1.5.2 <i>Phellinus hartigii</i> (Allesch. & Schnabl) Pat. ....	7
1.5.3 <i>Fomitopsis pinicola</i> (Sw.) P. Karst.....	8
1.6 Antimikrobiyal Aktiviteyi Belirlemek İçin Kullanılabilecek Yöntemler .....	9
1.6.1 Agar Disk Difüzyon Yöntemi.....	9
1.6.2 Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi.....	10
1.6.3 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi .....	11
1.6.4 Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) Testi .....	12
1.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Ekstraksiyon Çözücüleri .....	12
1.7.1 Petrol eteri.....	13
1.7.2 n-Hekzan.....	13
1.7.3 Kloroform .....	14
1.7.4 Aseton .....	15
1.7.5 Metanol .....	15
1.7.6 Distile su .....	16
<b>2. KAYNAK TARAMASI</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERYALLER VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>21</b>
3.1 Materyaller .....	21
3.1.1 Petri Kapları.....	21
3.1.2 Plastik Falkon Tüpleri.....	21
3.1.3 Filtre Kâğıdı.....	21
3.1.4 Steril Öze .....	22
3.1.5 Mueller Hinton Broth.....	22
3.1.6 Ekstraksiyon Çözücüleri ve Dimetil Sülfoksit (DMSO) .....	22
3.1.7 Buharlaştırma Balonları .....	22
3.1.8 Nutrient Agar Besiyeri.....	22
3.1.9 96 Kuyucuklu Mikroplaka.....	23
3.1.10 Şırınga Ucu Filtre.....	23

3.2	Cihazlar .....	23
3.2.1	Otoklav.....	23
3.2.2	Distile Su.....	23
3.2.3	İnkübatör .....	23
3.2.4	Pipetler .....	23
3.2.5	Döner Buharlaştırıcı.....	24
3.2.6	Çalkalayıcı .....	24
3.2.7	Terazi .....	24
3.2.8	Mikroplaka Okuyucu .....	24
3.2.9	Liyofilizatör .....	24
3.3	Araştırmada Kullanılan Makrofungus Örnekleri.....	24
3.4	Araştırmada Kullanılan Mikroorganizmalar .....	25
3.5	Ekstraksiyon İşlemi .....	25
3.6	İnokulum Hazırlanması .....	28
3.7	Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	29
3.8	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon Tayini .....	30
3.9	Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği Deneyi.....	31
3.10	İstatistiksel Analiz .....	31
<b>4.</b>	<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>32</b>
4.1	MİK Testi Sonuçları .....	32
4.1.1	<i>P. hartigii</i> Ekstraktlarının MİK Değerleri .....	32
4.1.2	<i>F. pinicola</i> Ekstraktlarının MİK Değerleri .....	33
4.1.3	<i>F. fomentarius</i> Ekstraktlarının MİK Değerleri .....	35
4.2	MBK Testi Sonuçları.....	37
4.2.1	<i>P. hartigii</i> Ekstraktının MBK Değerleri .....	37
4.2.2	<i>F. pinicola</i> Ekstraktlarının MBK Değerleri.....	38
4.2.3	<i>F. fomentarius</i> Ekstraktlarının MBK Değerleri.....	40
4.3	Ekstraktların Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği Sonuçları .....	41
4.4	İstatistiksel Analiz Sonuçları .....	42
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>43</b>
5.1	MİK ve MBK Değerlerinin Yorumlanması .....	45
5.2	Zamana Bağlı Öldürme Kinetik Testinin Yorumlanması .....	48
<b>6.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>ÖNERİLER.....</b>	<b>50</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>	
<b>EKLER.....</b>	<b>60</b>	
EK A - İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI .....	60	
EK B - KLİNİK İZOLATLARIN DİRENÇ PROFİLLERİ.....	64	
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>65</b>	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 <i>Fomes fomentarius</i> (Chernilevsky, 2010).....	7
Şekil 1.2 <i>Phellinus hartigii</i> (Vlkov, 2017).....	8
Şekil 1.3 <i>Fomitopsis pinicola</i> (Jenshn, 2006) .....	9
Şekil 1.4 Örnek inhibisyon zonları .....	10
Şekil 1.5 MİK (Altuner, 2019).....	12
Şekil 1.6 Petrol eteri.....	13
Şekil 1.7 n-Hekzan .....	14
Şekil 1.8 Kloroform .....	14
Şekil 1.9 Aseton .....	15
Şekil 1.10 Metanol .....	16
Şekil 1.11 Distile su cihazı.....	16
Şekil 3.1 Örneklerin öğütülmesi .....	25
Şekil 3.2 Çalkalama işlemi.....	26
Şekil 3.3 Filtre kâğıdı ile filtreleme işlemi.....	26
Şekil 3.4 Döner buharlaştırıcı .....	27
Şekil 3.5 Şırınga ucu filtre ile filtreleme işlemi .....	28
Şekil 3.6 Örnek MİK testi .....	29
Şekil 3.7 İnkübasyon.....	30
Şekil 3.8 Örnek MBK testi.....	30
Şekil 3.9 Mikroplaka okuyucu .....	31
Şekil 4.1 <i>P. hartigii</i> ekstraktlarının MİK test sonuçları .....	33
Şekil 4.2 <i>F. pinicola</i> ekstraktlarının MİK değerleri.....	35
Şekil 4.3 <i>F. fomentarius</i> ekstraktının MİK değerleri .....	36
Şekil 4.4 <i>P. hartigii</i> ekstraktlarının MBK değerleri.....	38
Şekil 4.5 <i>F. pinicola</i> ekstraktlarının MBK testi sonuçları .....	39
Şekil 4.6 <i>F. fomentarius</i> ekstraktlarının MBK testi sonuçları .....	41
Şekil 4.7 <i>F. fomentarius</i> 'un metanol ekstraktının B9'a karşı zamana bağlı öldürme kinetik testi sonuçları .....	42

## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 10 mL DMSO içinde çözülen ekstrakt ağırlığı (gram) .....	27
Tablo 4.1 <i>P. hartigii</i> ekstraktlarının MİK değerleri .....	32
Tablo 4.2 <i>F. pinicola</i> ekstraktlarının MİK değerleri .....	34
Tablo 4.3 <i>F. fomentarius</i> ekstraktının MİK değerleri .....	36
Tablo 4.4 <i>P. hartigii</i> ekstraktlarının MBK değerleri .....	37
Tablo 4.5 <i>F. pinicola</i> ekstraktlarının MBK değerleri .....	39
Tablo 4.6 <i>F. fomentarius</i> ekstraktlarının MBK değerleri .....	40
Tablo 5.1 <i>E. coli</i> türlerine karşı <i>F. fomentarius</i> ekstraktlarının MBK/MİK oranı .....	43
Tablo 5.2 <i>E. coli</i> türlerine karşı <i>P. hartigii</i> ekstraktlarının MBK/MİK oranı .....	44
Tablo 5.3 <i>E. coli</i> türlerine karşı <i>F. pinicola</i> ekstraktlarının MBK/MİK oranı .....	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gama

### Kısaltmalar

<b>ADT</b>	: Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
<b>CLSI</b>	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute)
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EC</b>	: <i>Escherichia coli</i>
<b>HÜS</b>	: Hemolitik Üremik Sendrom
<b>İYE</b>	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
<b>KOB</b>	: Koloni Oluşturan Birim
<b>MBK</b>	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MHB</b>	: Mueller Hinton Broth
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>SCOP</b>	: Proteinlerin Yapısal Sınıflandırılması (Structural Classification of Proteins)
<b>STEC</b>	: Shiga Toksin Üreten <i>E. coli</i>
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ

Mantarlar, besleyici ve ekonomik değerleri ve tıbbi özellikleri nedeniyle hem gelişmekte olan, hem de gelişmiş ülkelerde yaygın şekilde kabul görmektedir. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar, özellikle pazar zincirinin en altındaki paydaşlar için, en önemli odun dışı orman ürünleri arasında yer alan yabancı mantarların ekonomik önemine dair net kanıtlar sunmaktadır (De Roman, 2010). Dünyada 3000'den fazla mantar türü gıda olarak tüketilmektedir (Garibay-Orijel vd., 2009).

Bununla birlikte, yenilebilir yabancı mantarlar, potansiyel pazarları hala tam olarak gelişmediği için, yeterince kullanılmayan genetik kaynaklar olarak değerlendirilebilir. Diğer gıda ürünlerinin kalitesi ile ilgili bildirilen kriterlerden bazıları, olağanüstü organoleptik özelliklere ve ticari değere sahip olan yenilebilir mantarlar için de geçerlidir (Padulosi vd., 2002). Örneğin, *Amanita caesarea* (Scop.) Pers, *Cantharellus cibarius* Fr. ve *Boletus edulis* Bull bunlara örnek olarak verilebilir. Bu mantar türleri ödüllü yenilebilir mantarlar olarak kabul edilirler ve gıda olarak kullanılan mantar pazar taleplerinin büyük bir kısmını karşılarlar. Ayrıca bu mantarlar benzeyen zehirli türlerden kolayca ayırtedilebildiği için kırsal kesimdeki uzman olmayan kişiler tarafından da toplanmaya elverişlidirler (Padulosi vd., 2002).

Makrofunguslar ayrıca insan beslenmesinin çeşitlenmesine ve gelişmesine de katkıda bulunur ve bu sebepler insanlar tarafından tercih edilirler (Palazzolo vd., 2012). Bu durum, ekonomik değeri düşük tarım ürünleri üreten ve bireysel olarak tüketen kişiler için hem besin değeri yüksek gıda tüketme, hem de bu mantarları tolayıp satarak ek bir gelir kaynağı sağlama potansiyeli doğurur (Zervakis ve Venturella, 2002). Ancak, bu durum özellikle mantarların gereğinden fazla talan edilmesine sebep olmakta, bu sebeple makrofungus biyoçeşitliliğini korumak amacıyla, gereğinden fazla mantar hasadı, mantarların kontrolsüz ticareti ve modern, ancak uygun olmayan ormancılık uygulamaları gibi çeşitli faaliyetlerin, kontrol altında tutulması gerektiği aşikârdır. Diğer bir deyişle, özellikle mantar biyolojik çeşitliliği açısından zengin alanların koruma altına alınması büyük önem taşımaktadır (Zotti vd., 2013).

## 1.1 Doğal İlaç Olarak Makrofunguslar

Makrofungusların tedavi edici özellikleri uzun yıllardan beri bilinmektedir ve bu sebeple mantarlar insanlar tarafından çağlar boyunca ilaç olarak kullanılmıştır. Mantarlar veya mantarlardan elde edilmiş bazı ekstraktlar Japonya, Çin ve Uzak Doğu'daki birçok ülkede oldukça eski zamanlardan beri bağışıklık sistemi uyarıcı, anti-enflamatuvar ve anti-kanser etkileri sebebiyle geleneksel tıpta kullanılmıştır (Hobbs, 2002). Amerika Birleşik Devletleri ve İsrail gibi birçok ülkede, mantarlar ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bilimsel veriler, tamamlayıcı tedavi yöntemlerinin uygulanmasında kullanılmaktadır. Farmakolojik özellikler gösteren mantarlarda, özellikle anti-kanser ve immünolojik aktiviteyi ortaya koyan maddelerin ağırlıklı olarak polisakkarit ve polisakkarit tabanlı bileşikler olduğu bilinmektedir (Wasser, 2002). Bu sebeple, yapılan araştırmalar özellikle mantarlarda bulunan polisakkarit ve polisakkarit-protein kompleksleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bilim insanları bu bileşiklerin, tümör gelişimini engellemenin yanı sıra, organizmanın kendini savunma yeteneğini de güçlendirdiğini düşünmektedir ve bu durumu, canlının kendini savunma potansiyelinin yanı sıra, biyolojik tepkileri değiştiren bazı bileşiklere bağlamaktadır (Leung vd., 2006). Ayrıca yapılan çalışmalar bu biyomakromoleküllerin, karsinogenez ve tümör metastazını önleme kabiliyetine de sahip olduğunu göstermiştir (Guterres vd., 2005). Polisakkaritlerin anti-kanser etkisinin mekanizması hâlâ tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bunların bağışıklık hücrelerini aktive edebildikleri gösterilmiştir. Literatürde bu bileşiklerin lenfosit ve makrofaj bölünmesini ve kanser antijenlerine yönelik interlökinler, interferonlar ve immünoglobulinler dahil olmak üzere sitokinlerin sentezini uyardığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Moradali vd., 2007).

1970'ler ve 1980'lerde bir çok anti-kanser polisakkarit, örneğin lentinan, şizofilan ve PSK, PSP gibi Uzakdoğu ülkelerinde çok popüler olan polisakkarit-protein kompleksleri *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* ve *Trametes versicolor*'dan izole edilmiştir (Mizuno vd., 1995). Ayrıca *Grifola frondosa*, *Sparassis crispa*, *Agaricus blazei* ve *Phellinus linteus*'ta kanser tedavisini desteklemek üzere yaygın olarak besin ve tedavi takviyesi olarak kullanılan poli-β-D-glukanlar bulunmuştur. Özellikle son yıllarda, polisakkaritlerin anti-kanser özellikleri, özellikle izolasyonları

ve biyolojik aktiviteleri ile ilgili konulara yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Hilszczańska, 2012).

## 1.2 Mikroorganizmalara Karşı Makrofunguslar

Daha önce de bahsedildiği gibi makrofunguslar yüksek kaliteli proteine sahiptir ve aynı zamanda önemli bir vitamin ve mineral kaynağıdır. Ayrıca, makrofungusların hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve kanser gibi hastalıkların önlenmesi için yararlı terapötik besinler olduğu da bildirilmektedir. *Trametes versicolor* (anti-kanser), *Ganoderma lucidum* (anti-kanser), *Schizophyllum commune* (antimikrobiyal ve anti-kanser), *Auricularia auricula-judae* (anti-tümör, anti-diyabetik, antibakteriyel) bu amaçla kullanılan mantarlara örnek olarak verilebilir (Deka vd., 2017). Farklı geleneksel tıp uygulamalarında çeşitli mantar türleri kullanılmaktadır. Doğal antimikrobiyal bileşiklerin keşfi amacıyla başlatılmış antimikrobiyal etki taramalarında makro mantarların eskiden beri kullanılmış olması ve elde edilen sonuçlara göre mantarların antimikrobiyal potansiyel taşıdığına kanıtlanması sebebiyle, makrofunguslar antibakteriyel ilaçlar için potansiyel kaynak olarak görülmeye başlamıştır (Opige vd., 2006).

Son yıllarda tıp alanında büyük ilerleme kaydedilmiş olmasına rağmen, özellikle gelişmekte olan ülkelerde mikroorganizmalarda ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle bakteriyel, fungal ve viral hastalıklar halk sağlığını tehdit eden en önemli faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Okeke vd., 2005). Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ilaçların keyfi veya yanlış kullanımı nedeniyle insan patojeni olan birçok mikroorganizmanın çoklu ilaç direnci geliştirmesine sebep olmuştur. İnsan bulaşıcı patojenleri arasında yaygın olan çoklu ilaç direnci, yeni ve etkili bir alternatif antimikrobiyal ajan konusunda sürekli araştırma yapılmasını gerektirmiştir (Wachtel-Galor vd., 2004). Bazı makromantar türlerinin zengin doğal antibiyotik kaynağı olduğu ve güçlü antioksidan özelliklere sahip çeşitli kimyasalları içerdiği gösterilmiştir (Keleş vd., 2011). Bu işlevsel özellikler, esasen polisakkaritlerin, diyet lifinin ve özellikle kitin ve beta glukanların varlığından kaynaklanmaktadır (Reshetnikov ve Tan, 2001). Çoğu makrofungusa ait sekonder metabolitler anti-tümöral, antibiyotik, anti-viral (Bandara vd., 2015), anti-trombotik

ve immünomodülatör etki (Mau vd., 2002) gösterdiği için ve çeşitli doğal ilaçlarda önemli bir rol oynamaktadır. Bazı bilim insanları, farklı makrofungusların antimikrobiyal aktivitelerini incelemiş ve bu makrofunguslara ait aktiviteleri kompozisyonlarında bulunan peptidler, tanenler, terpenoidler, fenoller ve flavonoidler gibi sekonder metabolitlerin varlığıyla ilişkilendirmişlerdir (Alves vd., 2013).

Sekonder metabolitler, çeşitli bulaşıcı hastalıklar için terapötik maddeler olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Clardy vd., 2004). Son yıllarda doğal biyo kaynaklar dünyanın farklı yerlerinde, farklı amaçlarla kullanılmaktadır ve makrofunguslar, yeni antimikrobiyal üretilebilmesi için alternatif bir kaynak olma potansiyeli taşımaktadır. Gerek primer, gerekse sekonder metabolitler, yeni ilaç öncü maddeleri olarak sınırsız fırsatlar sunma potansiyeline sahip olmasına rağmen, mantar türlerinin sadece küçük bir kısmı bu amaçlar için araştırılmıştır (Cos vd., 2006). Mantarlar, yeni antimikrobiyal bileşik araştırmalarında araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Mantarlardan bugüne kadar bazı antimikrobiyal bileşikler izole edilmiştir. Ancak, bugüne kadar antibiyotik etki gösteren ve izole edilerek piyasaya sürülen metabolitler sadece mikromantarlardan elde edilmiş bileşiklerdir (Wong vd., 2009). Makromantarların bu potansiyeli ne yazık ki göz ardı edilmektedir.

### 1.3 *Escherichia coli*

*Escherichia*, adını Dr. Theodor Escherich'ten almıştır. *Escherichia coli* genellikle kalın bağırsakta yaşayan ve dışkı ile doğal olarak dışarı atılan çubuk şeklindeki Gram-negatif basillerdir. *E. coli* enfeksiyonunun en yaygın görüldüğü yer idrar yoludur ve özellikle üretranın anüse yakın olması nedeniyle, kadınlarda görülen tüm basit idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) %90'ından fazlasının nedenidir. İdrar yolu *E. coli* enfeksiyonlarına *E. coli*'nin üropatojenik suşları neden olmaktadır (Scheutz ve Strockbine, 2015). *E. coli* insan kalın bağırsağının normal florası arasındadır. Suşların çoğu zararsızdır, ancak bazı suşları enterotoksinleri veya istila etmeye yönelik faktörlerini kodlayan bakteriyofaj veya plazmit DNA alır ve patojenik hale gelir. Bu virülen suşlar, dünya çapında ishal enfeksiyonlarının yanı sıra neonatal menenjit, septisemi ve İYE'ye neden olmaktadır (Makvana ve Krilov, 2015). Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC)'nin neden olduğu hastalıkların semptomları arasında bazı

durumlarda kanlı ishale (hemorajik kolit) ilerleyebilen karın krampları ve ishal vardır. Ateş ve kusma da olabilir. Kuluçka süresi 3 ila 8 gün arasında değişebilir ve bu sürenin ortalaması 3 ila 4 gündür. Çoğu hasta 10 gün içinde iyileşir, ancak hastaların küçük bir kısmında, özellikle küçük çocuklar ve yaşlılarda enfeksiyon, hemolitik üremik sendrom (HÜS) gibi yaşamı tehdit eden bir hastalığa yol açabilir. HÜS, akut böbrek yetmezliği, hemolitik anemi ve trombositopeni (kanda düşük sayıda trombosit olması) ile karakterizedir (WHO, 2017).

#### **1.4 Antimikrobiyallere Karşı Bakteri Direnci**

Antibiyotiklerin aşırı kullanımı, yetersiz kullanımı ve gereksiz kullanımı ilaç direncinin ortaya çıkmasında ve yayılmasında ana faktörlerdir. Aslında, bulaşıcı hastalıklar en yaygın görülen hastalıklardır ve hâlâ insan ölümlerinin önemli nedenidir (WHO, 2011). İlaç direnci kavramı görüldüğünden daha karmaşıktır. Mikrobiyal duyarlılık, doğal mikrobiyal popülasyonlardaki fenotipik ve genotipik varyasyonları yansıtan bir süreçtir. Popülasyonda seçilen dirençli varyantları, patojen ve antibiyotiklerin etki düzeyinin yanı sıra, antibiyotiğin farmakokinetiği ve farmakodinamiği ile belirlenmektedir (Andersson ve Hughes, 2010). Antimikrobiyallere karşı mikrobiyal direnç, dirençli fenotipler aracılığıyla veya genel adaptif süreçlerde antibiyotiklere hassasiyet sebebiyle değil, popülasyon içinde hali hazırda direnci taşıyan mikroorganizmaların seçilmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkar. Bununla birlikte, en yaygın bakteriyel direnç formu, mutasyon yoluyla genomik olarak veya direnç elementleri için gerekli bilgiyi kodlayacak yeni genetik materyalin kazanılması aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Antimikrobiyal ajanlara kazanılan direncin ve ilaç inaktivasyonunun ana mekanizmaları bakteri direncinin ve ilaç inaktivasyonuna ana mekanizmaları, hedef modifikasyonu ve ilaç salınımı ve azalan alım yoluyla hedefe ulaşılabilirlikte değişikliği hedeflemektedir (Brehm-Stecher, 2003). Direnç genlerinin ve mutasyonlarının ekolojik etkileri ve rolleri tam olarak anlaşılmamıştır ve bazı istisnalar dışında, çoğu antibiyotik sınıfına karşı biyokimyasal direnç mekanizmaları gelişmiştir (Chopra vd., 1997).

## 1.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Makrofunguslar

Bu tez çalışmasında aşağıdaki makrofungus türleri kullanılmıştır.

### 1.5.1 *Fomes fomentarius* (L.) Fr.

Genellikle kav mantarı olarak da bilinen *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika'da bulunan bir bitki parazittir. Bu tür, normalde kahverengi olmasına rağmen, rengi gümüşü griden neredeyse siyaha doğru değişen renkte ve at toynağına benzer bir şekildeki çok büyük polipor fruktifikasyon organı üretir (Vyas vd., 2014).

*F. fomentarius* kuzey yarımküredeki ormanlarda yaşayan bir tür beyaz çürükçül mantarıdır. *F. fomentarius*, bir ksilem endofiti olarak, canlı ve ölü ağaçların odununa sızar ve burada hem parazit, hem de ayrıştırıcı rolü oynar. Kayın (*Fagus* sp.) ve huş (*Betula* sp.) ağaçları tercih edilen konaklardır, ancak *F. fomentarius* başka türlerin bulunduğu yerlerde de bulunabilir (Wasko vd., 2014). *F. fomentarius*'un kullanımı, ekolojik nişinin hemen ötesine geçer. Mantarın sert fruktifikasyon organları binlerce yıldır insanlar tarafından kullanılmaktadır, bunların kullanımına yönelik arkeolojik izler  $11,555 \pm 100$  yıl öncesine kadar uzanmaktadır (Peintner vd., 1998). Antik çağlardan beri, *F. fomentarius*'un fruktifikasyon organının yapısında bulunan sert lifler, közün ömrünü uzatmak için kullanılmıştır (Pegler, 2001). Aynı lifler geleneksel olarak, yaralara uygulandığında yüksek düzeyde kan emici görevi gören keçe ve kompres malzemesi üretimi için de işlenmiştir (Stamets, 2002). *F. fomentarius* geleneksel Doğu Asya ve Slav tıbbında, tıbbi özellikleriyle bilinmektedir (Hearst vd., 2009). Ağız ülserleri, gastroenterik bozukluklar, hepatosiroz, iltihaplanma ve çeşitli kanserlerin tedavisinde farklı mantar preparatlarının kullanıldığı bilinmektedir ve yapılan araştırmalar bunların ayrıca antibiyotik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Chen vd., 2008). *F. fomentarius* hakkında ortaya çıkan bu aktivite kanıtları ışığında klinik vaka çalışmalarını da görmek mümkündür. Bununla birlikte, hâlâ tedavilerde gözlemlenen etkilerinin arkasındaki *F. fomentarius* aktif bileşiklerinin ve mekanizmalarının tanımlanması gerekmektedir (Seniuk vd., 2011).



Şekil 1.1 *Fomes fomentarius* (Chernilevsky, 2010)

### 1.5.2 *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat.

*Phellinus* cinsi, Hymenochaetaceae familyasına ait 41 polipor cinsinden biridir. Index Fungorum'a göre dünyada 138 *Phellinus* türü vardır. Diğer çoğu polipor gibi *Phellinus* mantarları da saprotrofik beslenmeyle yaşarlar. *Phellinus igniarius*, *Phellinus linteus*, *Phellinus gilvus*, *Phellinus pini* ve *P. hartigii* gibi bu tür mantarlar, sağlığa çeşitli yararları ile bilinir ve genellikle geleneksel Asya tıbbında kullanılmaktadırlar (Zapora vd., 2016). *P. hartigii* sadece çok yıllık bitkilerin dağınık olduğu yayıldığı yerlerde nadir olarak görünür. Genellikle, yaşlı köknar ağaçlarında oldukça fazla bulunurlar, ancak ladinler üzerinde daha az yaygın görünürler. Canlı ve ölü ağaçlarda meyve veren saproparazit çürümeye neden olur (Zibarová, 2016). *P. hartigii*'nin çam, köknar ve porsuk ağacında yetiştiği bildirilmiştir.

*P. hartigii*'nin fruktifikasyon organları çok yıllıktır ve şekil olarak değişiklik gösterir. Gövde üzerinde oluştuğlarında, 45°'lik açılı üst ve alt yüzeylere sahip uzunlamasına üçgen ana hatları vardır ve 5-15 cm genişliğinde olabilirler. Ana şekli açısından toynak şeklinde görüldüğü söylenebilir. Üst yüzey koyu kahverengi ile siyah arasında, alt yüzey ise kahverengi ve poroiddir. Dalların alt yüzeyinde oluştuğunda, fruktifikasyon organları genellikle resupinatır. Tüm fruktifikasyon organlarındaki porlar mm başına 5-7 adet olacak şekilde küçük ve dairesel ana hatlara sahiptir.

Çürüme bazen, öz odundan yayılan enfekte ağaç alanı şeklinde ortaya çıkmaktadır. Çürüme genellikle kambiyumun bir bölümünü öldüren yara veya ölü dallar ve bodur ökseotu enfeksiyonları ile birlikte görülür. Bozulmanın ilk aşamaları, saman rengiyle mor arasında ve düzensiz bir şekilde görülmektedir. Daha sonraki aşamalarda ağaç beyaz bir görünüm alır ve bazen bölgesel veya açık kahverengi çizgiler halinde bulunur. Çürüyen ağaçlarda genellikle çok sayıda çizgi vardır (Forestry Development, 2011).



Şekil 1.2 *Phellinus hartigii* (Vlkov, 2017)

### 1.5.3 *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst

*Fomitopsis*, P. Karsten tarafından 1881’de önerilen kozmopolit bir cinstir ve şimdiye kadar yaklaşık 29 türü bildirilmiştir (Gomes-Silva vd., 2015). *Fomitopsis* türleri, canlı veya ölü iğne yapraklılarda ve sert ağaçlarda kahverengi çürümeye neden olur (Ryvarden ve Johansen, 1980). Cins, efüze refleksli, beyaz ila pembemsi veya kahverengi ila koyu kahverengi bazidiyuma sahip, poroid, yuvarlak, köşeli ila düzensiz porlu, dimitik veya trimitik hif sistemli, sistidin bulunduran veya bulundurmeyen ve Melzer reaktifinde negatif, silindirik, hiyalin, pürüzsüz bazidiosporları bulunmaktadır (Ryvarden ve Johansen, 1980; Carranza-Velázquez ve Gilbertson, 1986). Birçok *Trametes* Fr. türleri morfolojik olarak *Fomitopsis*’e benzerdir, ama beyaz çürümeye neden olurlar. Cinsin, türleri birkaç zayıf ilişkili soya yayılmış polifiletik bir cins olduğu gösterilmiştir (Kim vd., 2005).



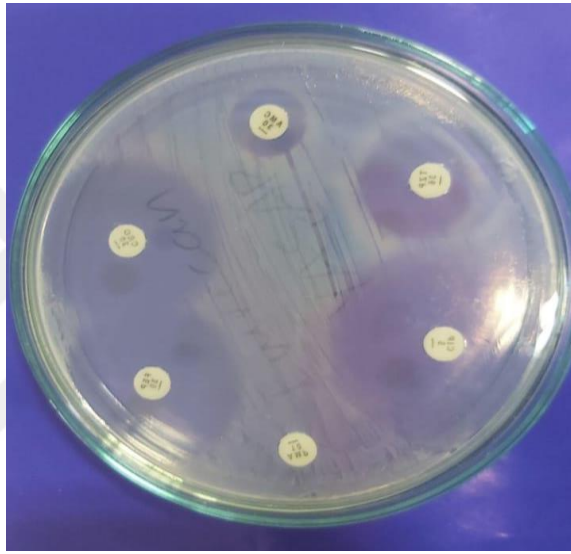
Şekil 1.3 *Fomitopsis pinicola* (Jenshn, 2006)

## 1.6 Antimikrobiyal Aktiviteyi Belirlemek İçin Kullanılabilecek Yöntemler

### 1.6.1 Agar Disk Difüzyon Yöntemi

1940 yılında geliştirilen agar disk difüzyon testi, birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin antimikrobiyal duyarlılık testi için kullanılan yöntemdir. Günümüzde, bakteri ve maya testlerinde kullanılması kabul edilmiş ve onaylanmış birçok standart Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından yayınlanmaktadır. Zor üreyen bakterilerin tümü bu yöntemle doğru bir şekilde test edilemese de, Streptokoklar, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* gibi bazı güç üreyen bakteriyel patojenleri, spesifik kültür ortamları, çeşitli inkübasyon koşulları ve inhibisyon bölgeleri için yorumlayıcı kriterler kullanarak test etmek için standardize edilmiştir. Yaygın olarak kullanılan bu yöntemde, agar plakaları, test mikroorganizmasının standart bir inokulumu ile aşılır. Ardından, istenen konsantrasyonda test bileşiklerini içeren yaklaşık 6 mm çapında kâğıt diskler agar yüzeyine yerleştirilir. Petri kapları uygun koşullar altında inkübe edilir. Genel olarak, antimikrobiyal ajan agara yayılır ve test mikroorganizmasının üremesi ve çoğalmasını inhibe eder ve ardından inhibisyon zon çapları ölçülür (Balouiri vd., 2016). Bu difüzyon teknikleriyle genellikle bakterisidal ve bakteriyostatik etkiler ayırt edilemez. Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK'ler) belirlenemez ve bunlar genellikle ön tarama için kullanılır, yani diske

yüklenen ekstrakt miktarı kantitatif olarak belirlenmediğinden kalitatif bir test olarak kullanılır. Bazı araştırmacılar, agar difüzyon yöntemiyle elde ettikleri MİK değerlerini rapor etmişlerdir, ancak disk difüzyon analizinde belirlenen yüksek aktivite ile mikropalak yöntemindeki düşük MİK değerleri arasında mutlaka korelasyon olması gerekmez. Agar disk difüzyon tekniği yalnızca saf maddelerin antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT) için kullanılabilir, çünkü farklı difüzyon oranları sergileyen bileşenlere sahip karışımlara uygulandığında güvenilir sonuç vermeme riski bulunmaktadır (Ncube vd., 2008).



Şekil 1.4 Örnek inhibisyon zonları

### 1.6.2 Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

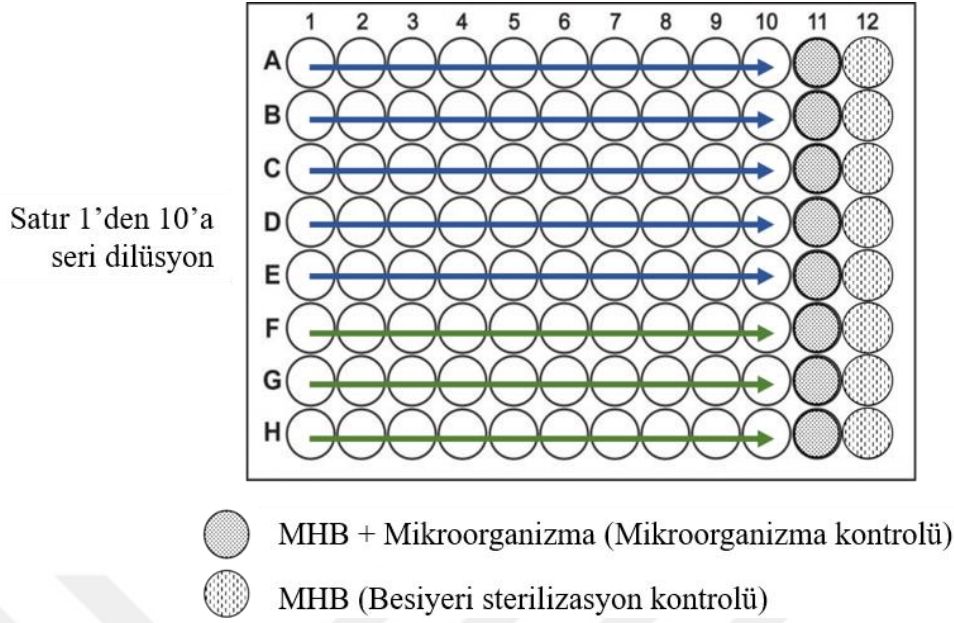
Agar kuyucuk difüzyon yönteminin ilkesi agar disk difüzyon yöntemindekine benzerdir (Das vd., 2010). Bitkilerin veya mikrobiyal ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmaktadır. Disk difüzyon yönteminde kullanılan prosedüre benzer şekilde, agar plakası yüzeyi, tüm agar yüzeyine bir miktar mikrobiyal inokulum yayarak inoküle edilir. Daha sonra, steril bir mantar delici veya bir uç kullanılarak aseptik olarak 6 ila 8 mm çapında bir delik delinir ve istenen konsantrasyonda ve belirli bir hacimdeki (20 -100 µL) antimikrobiyal ajan veya ekstrakt çözeltisi kuyucuğa aktarılır. Daha sonra agar plakaları, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe

edilir. Antimikrobiyal ajan, agar ortamında yayılır ve test edilen mikrobiyal suşun büyümesini inhibe eder (Mayrhofer vd., 2008).

### 1.6.3 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi

Minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK'ler), 18 - 24 saatlik inkübasyon sonrasında bir mikroorganizmanın görünür büyümesini engelleyecek en düşük antimikrobiyal konsantrasyon olarak tanımlanır. MİK değeri, tanılama laboratuvarları tarafından, mikroorganizmalarda var olan mikrobiyal direnci doğrulamak için kullanılır. Bunun yanı sıra yeni antimikrobiyallerin *in vitro* aktivitesinin belirlenmesi amacıyla da aracı kullanılmaktadır ve bu tür çalışmalardan elde edilen veriler, MİK sınır değerlerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Andrews, 2001).

MİK, üremeyi gözle görünür şekilde tamamen inhibe eden en düşük ajan konsantrasyonudur; çıplak gözle değerlendirildiğinden, tek bir koloni veya inokülasyon noktasındaki ince bir bulanıklık göz ardı edilir. Bir seri konsantrasyon yelpazesinde minimum mikroorganizma gelişmesinin olduğu konsantrasyon ve bu konsantrasyonun üzerinde mikroorganizmayı inhibe eden daha yüksek konsantrasyonlar uygun besi yerlerine alt kültürler yapılarak ve yeniden test edilerek araştırılır. Bu şekilde değişen konsantrasyon serisinin denenmesi, kontaminasyon, dirençli suş veya  $\beta$ -laktamaz üreten organizmaların gözlenmesini sağlayabilir veya inkübasyon süresi uzatılırsa, kullanılan etken maddenin bozulmasının ardından duyarlı mikroorganizmaların yeniden büyümesini gösterebilir. Sülfonamid ve trimetoprimli uç noktalarda büyümede bir azalma görülebilir ve gerçek MİK'in üzerindeki birkaç seyreltmede bir büyüme bulanıklığı görülebilir (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2000).



Şekil 1.5 MİK (Altuner, 2019)

#### 1.6.4 Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu (MBK) Testi

MBK, belirli bir bakteriyi öldürmek için gereken en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, kültürlerin MİK değeri bulunur ve daha sonra çıplak gözle berrak görülen kuyucuklar agar besiyerine pasajlanarak üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MBK olarak belirlenir (Yılmaz, 2012).

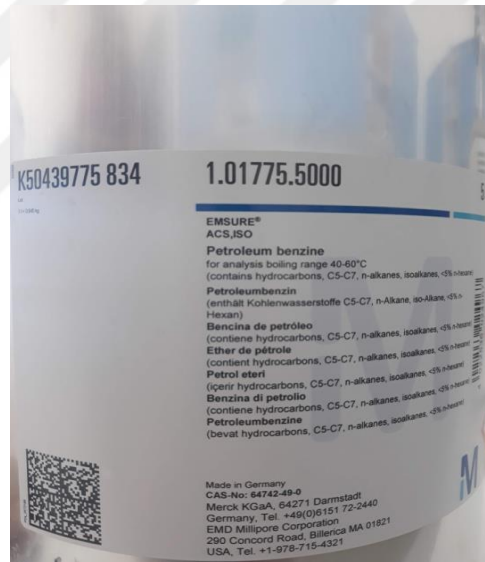
#### 1.7 Tez Çalışmasında Kullanılan Ekstraksiyon Çözücüler

Yapılan çalışmalar çözücü etkileri nedeniyle, kloroform, aseton ve metanolün, sıcak su ekstraksiyon yöntemine göre daha iyi ekstraksiyon sağladığını göstermiştir; bu nedenle çalışmalarda genellikle ekstraksiyon için temel çözücü olarak bu çözücüler kullanılmıştır (Doğan vd., 2013). Bu tez çalışmasında kullanılan ekstraksiyon çözücüler polaritelerine ve kaynama noktalarına göre seçilmiştir. Petrol eteri, n-hekzan, kloroform, aseton, metanol ve su kullanılarak, olabildiğince fazla bileşiğin ekstraksiyonu için bir dizi polarite oluşturulmuştur. Farklı polariteye sahip çözücüler sayesinde, farklı polaritedeki bileşikler ekstrakte edilebilmiştir. Kaynama noktaları ise sıcaklığı çok yükseltmeden buharlaşabilen çözücülere göre seçilmiştir, çünkü yüksek sıcaklıkta çözücünün buharlaştırılarak uzaklaştırılması ekstrakte edilen ısıya duyarlı

bileşiklerin aktivitesini etkileyebilir. Ekstraksiyon prosedürlerinde kullanılan ekstraksiyon çözücülerini aşağıda listelenmiştir.

### 1.7.1 Petrol eteri

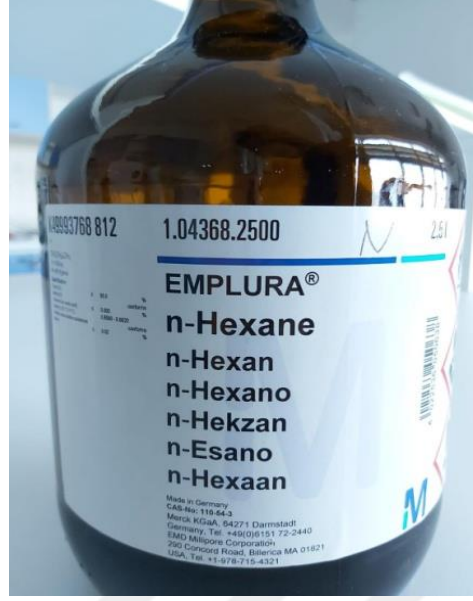
Petrol eteri, kimya ve farmasötik kimya laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan laboratuvar çözücülerinden biridir. Kimyasal çözücülerin çoğu, kronik maruziyet durumunda açıkça tanımlanamayan gecikmiş toksik maruziyet etkilerine neden olur. Petrol eteri, farmakognostik çalışmalarda bitkisel ve biyolojik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılan bir çözücüdür. Bazı çalışmalarda, bilim insanları, bitkisel ekstrakt veya eser miktarda kalan çözücü etkisiyle ilişkili olabilecek petrol eteri kaynaklı piloereksiyon gözlemlemiştir (Parasuraman vd., 2019).



Şekil 1.6 Petrol eteri

### 1.7.2 n-Hekzan

Günümüzde, uzaklaştırma kolaylığı veya düşük kaynama noktası gibi çeşitli avantajları nedeniyle yağların ekstraksiyonunda en çok kullanılan çözücü, hekzandır. Ayrıca, lipit çözünürlüğü açısından da ideal işlevsellikler sunmaktadır. Bununla birlikte, n-hekzan fosil yakıtlardan üretilir ve endüstriyel hekzanın ana bileşenlerinden biri olan n-hekzanın reprotoksik olduğundan şüphelenilmektedir, bu da endüstriyel ölçekte kullanımını tartışmalı hale getirmektedir (Sicaire vd., 2015).



Şekil 1.7 n-Hekzan

### 1.7.3 Kloroform

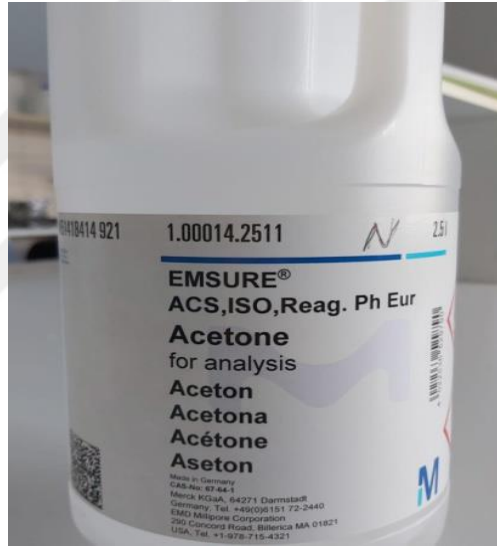
Verimliliği nedeniyle en çok kullanılan çözücülerden biri de kloroformdur. Triklorometan ( $\text{CHCl}_3$ ) olarak da bilinir. Hızlı etki, kullanım kolaylığı, düşük maliyet gibi özellikleri nedeniyle diş hekimliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kloroform sitotoksik etkiler oluşturabilir ve potansiyel olarak kanserojendir (Poggio, 2017).



Şekil 1.8 Kloroform

#### 1.7.4 Aseton

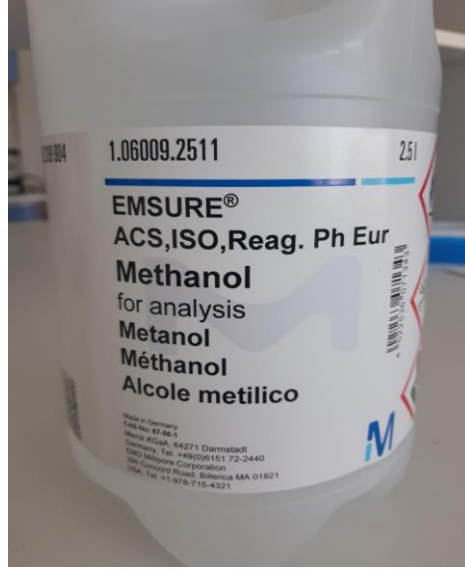
Aseton, bitki numunelerindeki birçok hidrofilik ve lipofilik bileşeni çözer. Su ile karışabilir, uçucudur ve kullanılacak biyolojik aktivite testlerinde düşük toksisiteye sahiptir. Özellikle daha fazla fenolik bileşik ekstrakte edilmesi gereken antimikrobiyal çalışmalar için çok faydalı bir ekstraksiyon çözücüsüdür. Daha önce yapılan bir çalışmada, sulu asetonla tanenlerin ve diğer fenoliklerin ekstraksiyonunun sulu metanolden daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Hem asetonun, hem de metanolün, antimikrobiyal aktiviteye sahip olan saponinleri ekstrakte ettiği bulunmuştur (Tiwari ve Sharma, 2011).



Şekil 1.9 Aseton

#### 1.7.5 Metanol

Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) çoğu alanda yaygın olarak uygulanan temel bir kimyasal üründür (Liu vd., 1998). Metanol, kimya endüstrisinde yaygın olarak hem çözücü, hem de reaktif olarak kullanılmaktadır. Ancak birçok maddeyle, özellikle de esterlerle azeotropolar oluşturmaktadır. Metanol, genellikle kullanılmış çözücülerden veya basit damıtma ile reaksiyon karışımlarından çıkarılamaz. Bu problemin çözümü için oldukça karmaşık süreçler geliştirilmiştir (Brüschke ve Wynn., 2000).



Şekil 1.10 Metanol

### 1.7.6 Distile su

Distile su, antimikrobiyal aktiviteye sahip bitki ürünlerini ekstrakte etmek için kullanılan evrensel bir çözücüdür. Geleneksel şifacılar esas olarak su kullansa da, organik çözücülerden elde edilen bitki ekstraktlarının, su ekstraktlarına kıyasla daha tutarlı antimikrobiyal aktivite sağladığı bulunmuştur. Ayrıca distile suda çözünen flavonoidlerin (çoğunlukla antosiyaninler) antimikrobiyal önemi yoktur ve suda çözünen fenolikler yalnızca antioksidan bileşik olarak önemlidir (Tiwari ve Sharma, 2011).



Şekil 1.11 Distile su cihazı

## 2. KAYNAK TARAMASI

Kolundžić vd. (2016), *F. fomentarius* (L.) Fr (Polyporaceae) (kav mantarı)'un sikloheksan, diklorometan, metanol ve sulu ekstraktının dokuz bakteri suşu (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella abony*) ile birlikte 10 farklı klinik izolata ve bir *Helicobacter pylori* referans suşuna karşı antibakteriyel aktivitesini incelemiştir. Ekstraktların 9 bakteri suşuna karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) 125-250 g/mL aralığında bulunmuştur. MİK değerleri 4-32 g/mL arasında olan metanol ve su ekstraktları *H. pylori*'ye karşı önemli aktivite göstermiştir. Ayrıca, test edilen ekstraktların sitotoksikite testlerinin sonuçları anlamlı bulunmuştur. Su ekstraktının en yüksek aktivitesi HeLa hücrelerine karşı  $8,31 \pm 1,18$  g/mL IC<sub>50</sub> değeri ile etki ederken, N87 hücrelerine karşı aktivitesi  $64,46 \pm 3,13$  g/mL IC<sub>50</sub> değeri ile olmuş, ancak normal MRC5 hücre hattına karşı herhangi bir aktivitesi olmadığı görülmüştür (>200 g/mL).

Başka bir çalışmada Nowacka vd. (2015), Polonya'da bulunan *F. fomentarius* ve *F. pinicola* dâhil otuz mantar türünden ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin anti-radikal potansiyelini test etmişler ve ayrıca Gram pozitif (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *M. luteus*) ve Gram-negatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) suşlarına karşı antibakteriyel aktiviteyi analiz etmişlerdir. Mantarlar, yüksek derecede aktivite gösteren *F. fomentarius*'tan, zayıf derecede aktivite gösterdikleri *Russula fragilis*'e kadar oldukça farklılaşmış anti-radikal aktivite göstermiş olup, bunların IC<sub>50</sub> konsantrasyonları mg DPPH başına sırasıyla 1,39 mg ila 120,54 mg arasında bulunmuştur. Fenolik içerik ile anti-radikal aktivite arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Mantarların antimikrobiyal potansiyelleri farklılık göstermektedir (MİK, 0,156 - 5 mg/mL). Genel olarak, Gram pozitif suşlara karşı aktivitenin Gram-negatif suşlara karşı aktiviteden biraz daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu, araştırılan türlerin çoğunun kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivitesiyle ilgili ilk çalışmadır.

Dundar vd. (2016), *Agaricus arvensis*, *Agaricus campestris*, *Armillaria mellea*, *F. fomentarius*, *Coprinus micaceus*, *Coriolus versicolor* ve *Lactarius deliciosus* gibi çeşitli yenilebilir mantar türünün metanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. Yaptıkları çalışmada ekstraktların altı adet mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Ek olarak, mantarlar sitotoksik, anti-kolinesteraz ve antioksidan kapasiteleri açısından incelenmiştir. Mantarların fenolik asit bileşimleri de analiz edilmiştir. Genellikle *L. deliciosus* ve *F. fomentarius* metal şelatlama, anyonik süperoksit radikallerinin temizlenmesi, toplam antioksidan, DPPH radikallerinin temizlenmesi ve indirgen güç aktivitesi testleri gibi antioksidan test sistemlerinde en yüksek aktiviteleri göstermişlerdir. *F. fomentarius* ekstraktının *S. aureus* ( $4 \pm 0,3$  mm), *M. luteus* ( $13 \pm 0,5$  mm), *Enterococcus hirae* ( $6 \pm 0,7$  mm) ve *P. aeruginosa* ( $8 \pm 0,7$  mm)'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, ancak *E. coli* ve *B. subtilis*'e karşı hiçbir aktivite göstermediği ortaya konmuştur. Ayrıca *F. fomentarius* içerisindeki toplam fenolik asit miktarı 986,23 mg/kg olarak bulunmuştur.

Altuner ve Akata (2010) *Infundibulicybe geotropa*, *Lactarius controversus*, *L. deliciosus* ve *P. hartigii* gibi bazı makrofungus ekstraktlarının *Candida albicans* ATCC 26555, *E. coli* ETEC LM 63083, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SL 1344 ve *Shigella flexneri* (klinik izolat)'a karşı antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon testi ile incelemiştir. *P. hartigii*'nin 20-23 mm arasında değişen bir inhibisyon zonu ile *S. flexneri*'ye karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, *P. hartigii* ekstraktının *E. coli*'ye karşı inaktif olduğu bulunmuştur.

Dresch vd. (2015) çalışmalarında, geleneksel Avrupa tıbbında bilinen *F. fomentarius*, *F. pinicola* ve *Piptoporus betulinus* olmak üzere üç farklı tıbbi mantar kullanmıştır. Etanol ekstraktlarının antimikrobiyal ve antifungal özellikleri toplam 22 suşla karşılaştırılmıştır. Hiçbir *F. fomentarius* ekstraktı *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiş, ancak MİK değerleri 250 veya 500 µg/mL olan bazı ekstraktlar *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Tüm *F. pinicola* ekstraktları ise hem MİK değeri 31 - 125 µg/mL ile *B. subtilis*'e, hem de MİK değeri 31 - 500 µg/mL ile *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Bala vd. (2011) su, etanol ve hekzan ile ekstrakte edilen *Fomitopsis* dâhil kırk yedi makrofungus örneğinin antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. Toplam su ve etanol ekstraktları, *S. aureus*'a karşı *E. coli*'ye kıyasla daha etkili olurken, hekzan ekstraktları sadece daha yüksek konsantrasyonlarda *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal potansiyelleri bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir. Aynı zamanda, *Agaricus* (Agaricaceae), *Amanita* (Amanitaceae), *Boletus* (Boletaceae), *Cantharellus* (Cantharellaceae), *Fomitopsis* (Fomitopsidaceae), *Hohenbuehelia* (Pleurotaceae), *Lentinus* (Polyporaceae), *Ramaria* (Gomphaceae) ve *Strobilomyces* (Boletaceae) cinsleri içindeki bazı makrofungus için bulunan sonuçlar, test edilen patojenlerin gelişmesini etkili bir şekilde engellediğini göstermiştir.

Khadhri vd. (2017), *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr., *F. pinicola* (Sw.) P. Karst, *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst ve *Ramaria formosa* (Pers.) ekstraktlarının hem gram pozitif (*B. subtilis* ve *S. aureus*), hem de gram negatif (*E. coli*, *Proteus vulgaris*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*) bakterilere karşı antimikrobiyal potansiyelini belirlemişlerdir. Agar seyreltme yöntemiyle bulunan sonuçlar, MİK değerlerinin *F. pinicola* ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerine etkisinin ekstraktan ekstrakta değişim gösterdiğini gözlenmiştir. Metanol ve etil asetat ekstraktlarının *E. coli*'ye karşı MİK değerleri sırasıyla 0,8 ve 1,6 mg/mL olarak bulunmuştur. En yüksek inhibisyon zonu ve en düşük MİK değerini *F. pinicola*'nın sergilediği gözlenmiştir. Sonuçlardan, *F. pinicola*'nın metanol ekstraktının, *E. coli*'ye karşı etil asetat ekstraktından daha iyi antimikrobiyal aktivite sergilediği açıkça görülmüştür. Dört mantar türünün hepsinin hem etil asetat, hem de metanol ekstraktlarının tüm bakteri suşlarının büyümesini farklı derecelerde etkilediği bulunmuştur. Genellikle mantar ekstraktlarının, gram-negatif bakterilere kıyasla gram-pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Jiang ve Bao (2011) *F. fomentarius* fruktifikasyon organının su, metanol, aseton, etil asetat, kloroform ve petrol eteri ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemi ve plaka kaplama yöntemi ile incelemişlerdir. Sonuçlar, *F. fomentarius*'un tüm ekstraktlarının, *Candida albicans* JLC 31680, *C. albicans* JLC 31681, *E. coli* ATTC 8099 ve *S. aureus* ATCC 6538 üzerinde farklı derecelerde inhibitör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Su ekstraktları, sırasıyla 50 mg/mL

ve 25 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ile *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde belirgin inhibe edici aktivite göstermiştir. Öte yandan metanol ekstraktlarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı MİK değeri 12,5 mg/mL olarak gözlenmiştir.

Pala vd. (2019), bazı mantar ekstraktlarının antimikrobiyal potansiyelini, yaygın olarak bulunan bazı patojenik bakteri ve mantarlara karşı test etmiştir. Çalışmada, *L. tigrinus* (Bull.) Fr., *F. pinicola* (Sw.) P. Karst, *I. hispidus* (Bull.) P. Karst ve *R. formosa* (Pers.) Quel. olmak üzere dört mantar türü agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile hem gram-pozitif (*B. subtilis* ve *S. aureus*) hem de gram-negatif (*E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*) ve mantarlara (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. chrysogenum* ve *A. fumigates*) karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tüm mantar ekstraktlarının etil asetat ve metanol ekstraktlarının, bakteri ve mantarların çoğuna karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, bu mantarların sulu ekstraktlarının ya hiç etki etmediği, ya da önemsiz antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. *F. pinicola*'nın hem etil asetat, hem de metanol ekstraktları seçilen mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. *F. pinicola*'nın 150 mg/mL konsantrasyonda neredeyse 10 µg gentamisin ve 50 µg nistatine paralel antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermiştir. Bu sonuç, *F. pinicola*'nın geniş mikroorganizma yelpazesine karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösteren ve gelecek vaat eden mantar türlerinden biri olduğu anlamına gelmektedir.

### **3. MATERYALLER VE YÖNTEMLER**

#### **3.1 Materyaller**

Bu tezde aşağıda belirtilen materyal ve cihazlar kullanılmıştır:

##### **3.1.1 Petri Kapları**

Çalışmada polistirenden yapılmış 94 x 16 mm boyutlarında plastik Petri kapları kullanılmıştır. Bu Petri kapları yaklaşık 80°C'ye kadar ısıya dayanıklıdırlar. Bakteri, maya ve küf gibi mikroorganizmaları kültüre etmek için biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Katı veya yarı katı yüzeylerde büyüyen organizmalar için en uygun malzemedir. Çalışmada kullanılan Petri kapları, Fıratmed (Ankara) firmasından temin edilmiştir.

##### **3.1.2 Plastik Falkon Tüpleri**

20 x 100 mm boyutlarında olan ve inokulum hazırlamak plastik falkon deney tüpleri kullanılmıştır. Çalışmada, steril ve tek kullanımlık plastik falkon tüpleri (Tarsons, Hindistan) tercih edilmiştir.

##### **3.1.3 Filtre Kâğıdı**

Çalışmada 125 milimetre çapında filtre kâğıdı (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Filtre kâğıdı, filtreleme işlemi sırasında ekstraktlarda bulunan kaba partikülleri ayırmak için kullanılan yarı geçirgen bir kâğıttır. Filtre kâğıdı cam huniye yerleştirildikten sonra filtre edilecek ekstraktlar filtre kâğıdı üzerine dökülmüştür. Çözücü içinde çözünmeyen kaba partiküller filtre kâğıdında kalarak çözüldükten ayrılmış ve çözücü içinde çözülmüş daha ince ekstrakt buharlaştırma balonlarına aktarılmıştır.

### **3.1.4 Steril Öze**

Microloop, (Birleşik Krallık) marka steril tek kullanımlık özeler mikroorganizmaların ekiminde ve transferinde kullanılmıştır.

### **3.1.5 Mueller Hinton Broth**

Mikroorganizmaları büyütülmesi ve mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığını belirlenmesi için Mueller Hinton Broth (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Mueller Hinton Broth (MHB), antimikrobiyal duyarlılık testi için standart kültür besiyeri olarak kullanılmaktadır. Besiyerinin performansı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü ile uyumludur ve DSÖ şartlarını karşılamaktadır.

### **3.1.6 Ekstraksiyon Çözücüleri ve Dimetil Sülfoksit (DMSO)**

Makrofungus örneklerinden aktif bileşikleri ekstrakte etmek için kullanılan tüm ekstraksiyon çözücüleri ve ekstrakt stoklarını hazırlamak için kullanılan %2'lik dimetil sülfoksit (DMSO), Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

### **3.1.7 Buharlaştırma Balonları**

S&H Labware (ABD) marka satın alınan buharlaşma balonları ekstraksiyon çözücülerinin buharlaştırılmasında kullanılmıştır.

### **3.1.8 Nutrient Agar Besiyeri**

Çok çeşitli mikroorganizmanın gelişmesini destekleyen ve mikroorganizmaları büyütülmesinde kullanılan etkili bir besiyeri olan nutrient agar besiyeri, çalışmada Merck (Almanya) marka olarak tercih edilmiştir.

### **3.1.9 96 Kuyucuklu Mikroplaka**

Tez çalışmasında ekstraktların MİK değerlerinin belirlenmesi için Citotest (Çin) marka mikroplaklar kullanılmıştır. Plakadaki kuyucuklar sayı ve harflerle etiketlenmiş olup; sağ üst köşedeki çentik, plaka yönünün doğru belirlenmesini sağlamaktadır.

### **3.1.10 Şırınga Ucu Filtre**

Tez çalışmasında Sartorius (Almanya) marka şırınga ucu filtre (0,45 µm) %2'lik DMSO çözeltisinde çözülmüş ekstrakt stoğunu sterilize etmek için kullanılmıştır.

## **3.2 Cihazlar**

### **3.2.1 Otoklav**

Çalışmada kullanılan hem besiyerini, hem de diğer ekipmanları sterilize etmek için otoklav (Daihan, Wiseclave, Kore) kullanılmıştır.

### **3.2.2 Distile Su**

Araştırmada kullanılan distile su, Human Corporation (Kore) tarafından üretilen Laboratuvar Tipi Su Distilasyon cihazı kullanılarak üretilmiştir.

### **3.2.3 İnkübatör**

Sabit sıcaklıkta bakteri ve mantar yetiştirmek için Selecta (İspanya) firması tarafından üretilen inkübatör kullanılmıştır.

### **3.2.4 Pipetler**

Çalışmada, çözücülerini, ekstraktları ve kültür ortamını aktarmak için Microlit (Hindistan) firması tarafından üretilen pipetler (10 - 100 µL) kullanılmıştır.

### **3.2.5 Döner Buharlaştırıcı**

Ekstraktların içindeki çözücülerin buharlaştırılması için döner buharlaştırıcı (Heidolph, Almanya) kullanılmıştır.

### **3.2.6 Çalkalayıcı**

Ekstraksiyon işleminde, ekstraksiyon çözücülerinde makrofungus örneklerini çalkalamak için standart bir laboratuvar çalkalayıcısı (Daihan, WiseShake, Kore) kullanılmıştır.

### **3.2.7 Terazi**

Yapılan deneylerde tartılması gereken bütün kimyasallar Precisa (İsviçre) firmasından alınan terazi ile tartılmıştır.

### **3.2.8 Mikroplaka Okuyucu**

Zamana bağlı öldürme (time-kill) kinetiği deneyinde mikroplaka okuyucu (EPOCH 2 BIO-TEK) kullanılmıştır. Cihaz üzerinde bulunan Epoch 2 programı, tek ve çift dalga boyu absorpsiyonları ve kinetik ölçümler dâhil olmak üzere çeşitli okuma modlarına izin vermektedir. Spektral tarama ile tanımlanan tüm numunelerin uygun ve hızlı bir spektrumu belirlenir. Kuyucukların absorbansının taranması güçlü veri analizi sunan Gen5 programının kontrolü altındadır.

### **3.2.9 Liyofilizatör**

Su ekstraktlarından suyun uzaklaştırılması için bir liyofilizatör (Hanil, Kore) kullanılmıştır.

## **3.3 Araştırmada Kullanılan Makrofungus Örnekleri**

Bu çalışmada, *Fomes fomentarius* (L.) Fr., *Phellinus hartigii* (Allesch. & Schnabl) Pat. ve *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst örnekleri kullanılmıştır. Mantar örnekleri Doç

Dr. Ilgaz AKATA'nın kişisel koleksiyonundan temin edilmiş olup, sırasıyla İstanbul Belgrad Ormanı, Ilgaz Dağı Milli Parkı ve İzmit Yuvacık'tan toplanmış ve Doç Dr. Ilgaz AKATA tarafından teşhis edilmiştir.

### 3.4 Araştırmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında, ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi on bir adet farklı derecede antibiyotik direnci gösteren klinik *E. coli* izolatları (B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11) ile *E. coli* ATCC 25922 (B1), standart suşuna karşı test edilmiştir. Klinik izolatların direnç profilleri ile ilgili detaylar Ekler Bölümünde verilmiştir.

### 3.5 Ekstraksiyon İşlemi

Mantar örnekleri, laboratuvar tipi bir öğütme makinesi (Christy ve Norris, Chelmsford, İngiltere) kullanılarak ince toz haline getirilmiştir (Şekil 3.1).



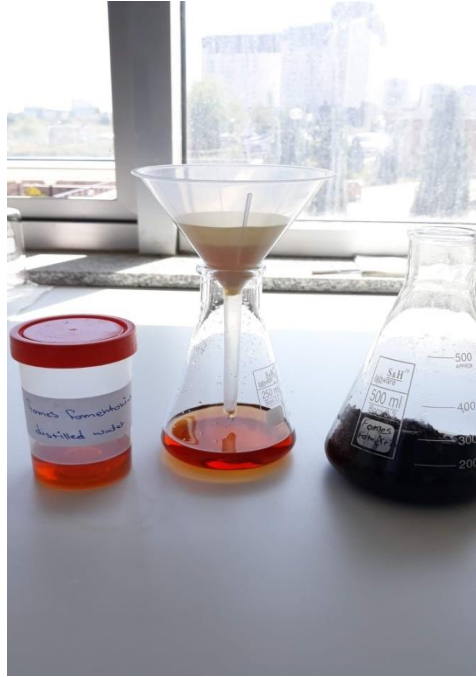
Şekil 3.1 Örneklerin öğütülmesi

Daha sonra, 20 g mantar örneği tartılarak bir erlen içine konulmuş ve erlene 200 mL çözücü ilave edilmiştir. Erlen çalkalayıcıya (WiseShake, Kore) yerleştirilerek oda sıcaklığında 100 rpm hızında 3 gün boyunca çalkalanmıştır (Şekil 3.2) (Cowan, 1999).



Şekil 3.2 Çalkalama işlemi

Üç gün sonra karışım, buharlaşma balonlarına filtre ile süzümüştür (Şekil 3.3). Bu şişeler bir döner buharlaştırıcıya (Heidolph, Almanya) takılmış ve ekstraktın içindeki çözücüler, ısıya hassas bileşiklerin bozulmasını engellemek için 35 - 45°C'de döndürerek buharlaştırılmıştır (Şekil 3.4) (Canli vd., 2017).



Şekil 3.3 Filtre kâğıdı ile filtreleme işlemi



Şekil 3.4 Döner buharlaştırıcı

Distile su ile elde edilen ekstraktlar içindeki su, 35 - 45°C’de döner buharlaştırıcıda buharlaştırılmadığından, Dokuz Eylül Üniversitesi’nde bulunan bir liyofilizatör (Hanil, Kore) kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Altuner vd., 2012).

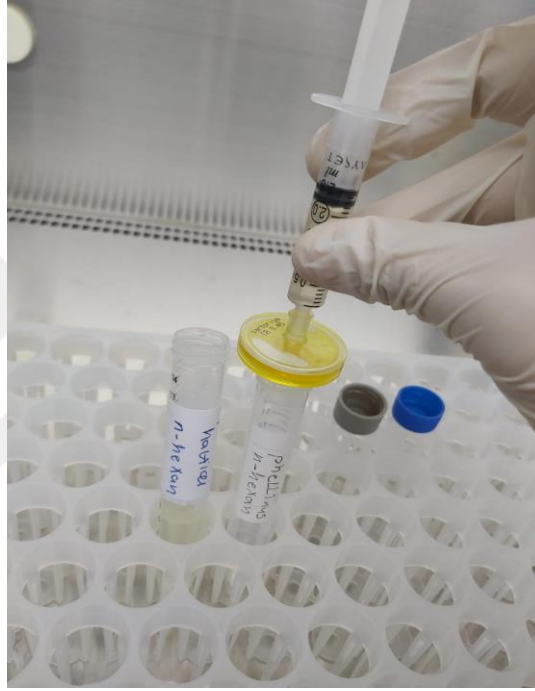
Ekstraktlardaki tüm çözücüler buharlaştırıldıktan sonra ekstrakt veriminin *F. fomentarius*, *P. hartigii* ve *F. pinicola* için sırasıyla (%0,103 - %3,325), (%0,560 - %7,246) ve (%0,900 - %8,500) arasında olduğu görülmüştür.

Tablo 3.1 10 mL DMSO içinde çözülen ekstrakt ağırlığı (gram)

Çözücüler	Mantarlar		
	<i>F. fomentarius</i>	<i>P. hartigii</i>	<i>F. pinicola</i>
Petrol Eteri	0,4047	0,1949	0,9950
n-Hekzan	0,0076	0,1224	1,0509
Kloroform	0,1691	0,1387	1,0005
Aseton	0,1336	0,0991	1,1191
Metanol	0,2507	1,0894	1,0602
dH <sub>2</sub> O	0,1880	0,6630	0,1800

Buharlaştırma sonrasında buharlaştırma balonunda kalan toz ekstrakt 10 mL DMSO içinde çözümlenerek ekstrakt stokları elde edilmiştir. DMSO içinde çözülmüş ekstrakt miktarları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Ekstraktlar %2'lik DMSO içinde çözüldüğü için kuyucuklardaki final DMSO konsantrasyonu  $\leq$  %1 şeklinde olmuştur. Buna dikkat edilmiş olmasının sebebi, DMSO'nun %1'den yüksek konsantrasyonunun bakteriler için toksik olduğu bilinmesidir. Stok ekstraktları, MİK testinden önce şırınga ucu filtresi kullanılarak aseptik çalışma tekniğine dikkat edilerek sterilize edilmiştir (Şekil 3.5). Ekstraktlar steril ve hava geçirmez kaplara konulmuş, etiketlenmiş ve kullanılabildiği kadar  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuştur (Altuner, 2008).



Şekil 3.5 Şırınga ucu filtre ile filtreleme işlemi

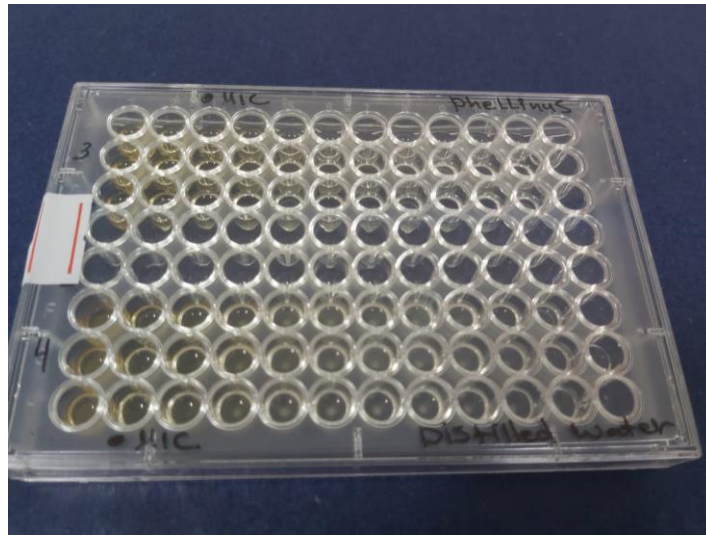
### 3.6 İnokulum Hazırlanması

Çalışmada on iki *E. coli* şusu kullanılmıştır. Her bir bakterinin inokulumu hazırlanırken bakterilere ait morfolojik olarak benzer koloniler, %0,9 steril serum fizyolojik içine aktarılmış ve inokulumun bulanıklığı 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır (Canli vd., 2016).

### 3.7 Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Başlangıçta, 96 kuyucuklu mikroplağın 1 - 12 numaralı sıralardaki tüm kuyucuklarına 100 µL MHB aktarılmıştır. 100 µL ekstrakt stok solüsyonundan birinci kuyucuğa aktararak tamamen ve dikkatlice karıştırılmış, 1 numaralı kuyucuğun içeriğinin 100 µL'si 2 numaralı kuyucuğa aktarılmış, daha sonra 2 numaralı kuyucuğun içeriği tamamen ve dikkatlice karıştırılmış, 2 numaralı kuyucuğun içeriğinin 100 µL'si 3 numaralı kuyucuğa aktarılmıştır. Bu seri mikrodilüsyon, 10 numaralı kuyucuğa kadar uygulanmış ve 10 numaralı kuyucuğun içeriğinin 100 µL'si dışarı atılmıştır. Seri dilüsyon tamamlandıktan sonra 50 µL inokulum, 12 numaralı kuyucuk dışındaki tüm kuyucuklara pipetlenmiştir. Bu nedenle, bitki ekstraktlarının aktivitesini test etmek için 1 - 10 numaralı kuyucuklar kullanılmış; 11 numaralı kuyucuk mikroorganizma için pozitif kontrol ve 12 numaralı kuyucuk MHB kültür ortamının sterilliğini kontrol etmek için negatif kontrol kutucuğu olarak ayrılmıştır (Şekil 3.6) (Canlı vd., 2019).

Plakanın üzerindeki her bir kuyucuk, mikroorganizmanın bir kuyucuktan diğerine sıçramayacak şekilde dikkatle aşılmalıdır. 96 kuyucuklu plakalar, 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. MİK, mikroorganizmanın görsel büyümesini tamamen inhibe eden en düşük ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır (Baldas ve Altuner, 2018).



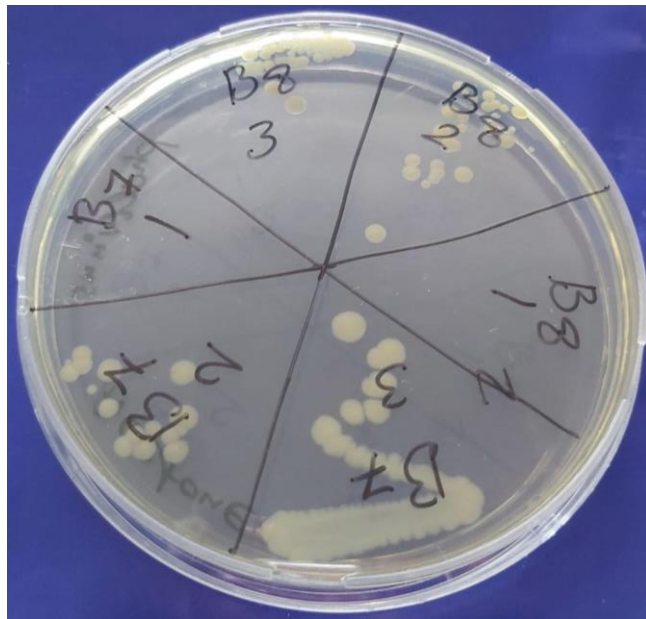
Şekil 3.6 Örnek MİK testi

### 3.8 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon Tayini

MİK testinde, plakalar 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiş (Şekil 3.7) ve ardından büyüme veya bulanıklık açısından gözlemlenmiştir. Daha sonra, 96 kuyucuklu mikroplakanın her bir kuyucuğunda üreme göstermeyen bir öze dolusu sıvı, nutrient agar plakalarına pasajlanmış ve 37°C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir (Şekil 3.8). Daha sonra, agar plakalarındaki büyüme durumu incelenmiştir. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testi ile, ekstraktlar için bakteriyostatik ve bakterisidal konsantrasyonları belirlenmiştir (Altuner ve Çetin, 2018).



Şekil 3.7 İnkübasyon

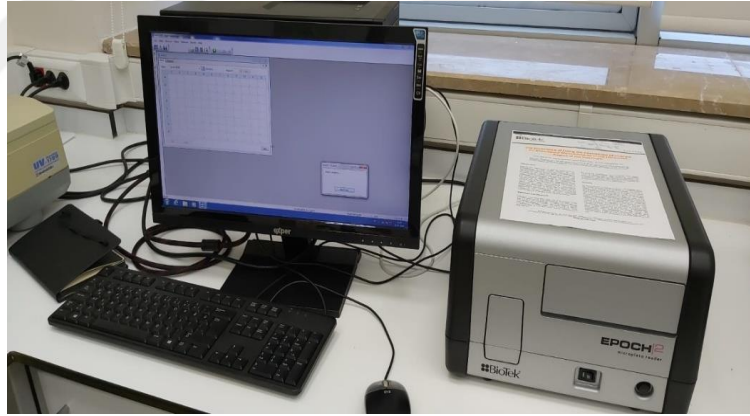


Şekil 3.8 Örnek MBK testi

### 3.9 Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği Deneyi

Bir bakteri suşuna karşı bir antimikrobiyal ajanın aktivitesini incelemek için zamana bağlı öldürme (time-kill) kinetik analizi kullanılır ve böylece bir ajanın zaman içindeki bakterisidal veya bakteriyostatik aktivitesi belirlenebilir. Ekstraktların zamana bağlı öldürme kinetiği, Tsuji vd. (2008) tarafından önerilen prosedür izlenerek gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların MİK, 2 x MİK ve 4 x MİK'e karşılık gelecek konsantrasyonları hazırlanmıştır ve bunların üzerine  $1,0 \times 10^6$  CFU/mL'lik bir inokulum eklenmiş ve 37°C'de inkübe edilmiştir.

Her kuyucuğun absorbansı, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 ve 24 saatlik zaman aralıklarında 600 nm'de kaydedilmiştir (Şekil 3.9). Ekstrakt içermeyen organizmalar için bir kontrol testi yapılmıştır. Prosedür üç kez gerçekleştirilmiş (üç bağımsız deney) ve absorbans-zaman grafiği çizilmiştir (Appiah vd., 2017).



Şekil 3.9 Mikroplaka okuyucu

### 3.10 İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Ortalamalar, SPSS (v.25) yazılımı kullanılarak, Duncan veya Kruskal-Wallis normallik testlerine bağlı olarak ayrılmıştır. Değerler,  $P < 0,05$ 'te anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizin detayları Ekler bölümünde verilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

Bu çalışmada yapılan deneylerin sonuçları aşağıda verilmiştir. Bu bölümde gösterilen tüm sonuçlar, üç tekrarlı sonucun ortalaması şeklinde belirtilmiştir.

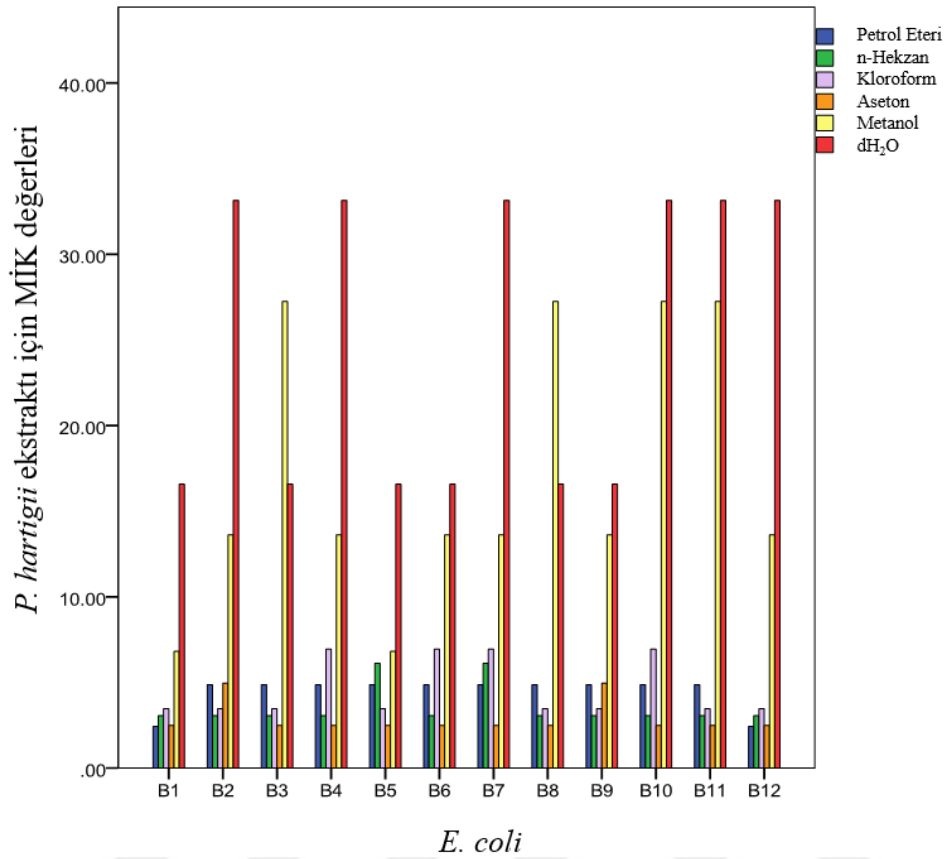
### 4.1 MİK Testi Sonuçları

#### 4.1.1 *P. hartigii* Ekstraktlarının MİK Değerleri

*P. hartigii* ekstraktlarına ait MİK testi sonuçları aşağıdaki Tablo 4.1 ve Grafik 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 *P. hartigii* ekstraktlarının MİK değerleri

	MİK değeri (mg/mL)					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	2,43	3,06	3,47	2,48	6,81	16,58
<i>Bakteri 2</i>	4,87	3,06	3,47	4,96	13,62	33,15
<i>Bakteri 3</i>	4,87	3,06	3,47	2,48	27,24	16,58
<i>Bakteri 4</i>	4,87	3,06	6,94	2,48	13,62	33,15
<i>Bakteri 5</i>	4,87	6,12	3,47	2,48	6,81	16,58
<i>Bakteri 6</i>	4,87	3,06	6,94	2,48	13,62	16,58
<i>Bakteri 7</i>	4,87	6,12	6,94	2,48	13,62	33,15
<i>Bakteri 8</i>	4,87	3,06	3,47	2,48	27,24	16,58
<i>Bakteri 9</i>	4,87	3,06	3,47	4,96	13,62	16,58
<i>Bakteri 10</i>	4,87	3,06	6,94	2,48	27,24	33,15
<i>Bakteri 11</i>	4,87	3,06	3,47	2,48	27,24	33,15
<i>Bakteri 12</i>	2,43	3,06	3,47	2,48	13,62	33,15



Şekil 4.1 *P. hartigii* ekstraktlarının MİK test sonuçları

Verilere göre, *P. hartigii*'nin petrol eteri ekstraktının, 2,43 - 4,87 mg/mL arasında değişen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ile tüm *E. coli* suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 3,06 - 6,12 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, kloroform 3,47 - 6,94 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, aseton 2,48 - 4,96 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, metanol 6,81 - 27,24 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 16,58 - 33,15 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

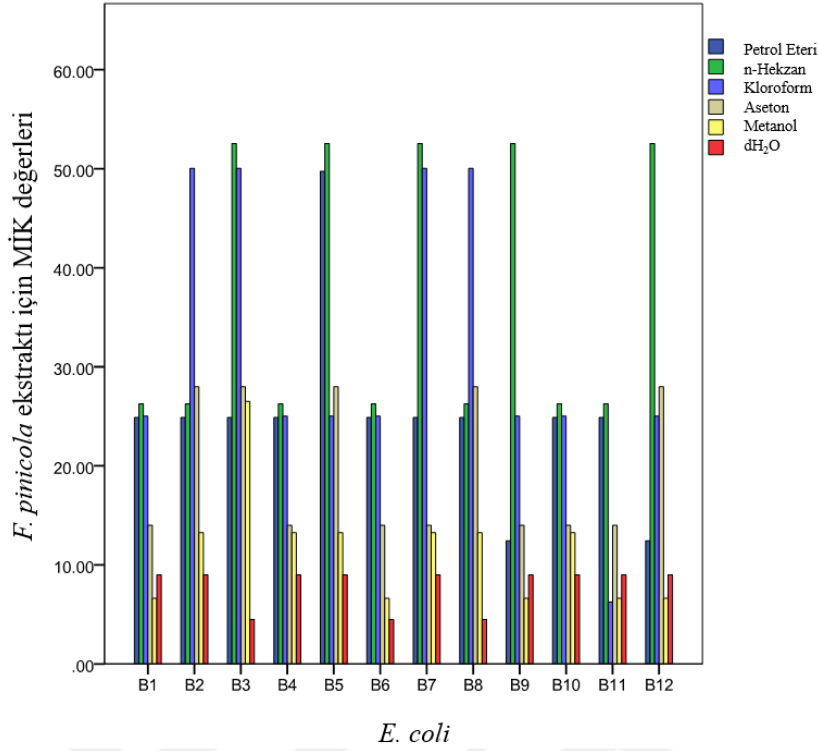
#### 4.1.2 *F. pinicola* Ekstraktlarının MİK Değerleri

*F. pinicola* ekstraktlarının MİK testi sonuçları aşağıdaki Tablo 4.2 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Verilere göre, *F. pinicola*'nin petrol eteri ekstraktlarının, tüm *E. coli* suşlarına karşı 12,44 - 49,75 mg/mL arasında değişen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 26,27 - 52,55 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, kloroform 6,25 - 50,03 mg/mL arasında

değişen MİK değeri ile, aseton 13,99 - 27,98 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, metanol 6,63 - 26,51 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,50 - 9,00 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2 *F. pinicola* ekstraktlarının MİK değerleri

	MİK değeri (mg/mL)					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	24,88	26,27	25,01	13,99	6,63	9,00
<i>Bakteri 2</i>	24,88	26,27	50,03	27,98	13,25	9,00
<i>Bakteri 3</i>	24,88	52,55	50,03	27,98	26,51	4,50
<i>Bakteri 4</i>	24,88	26,27	25,01	13,99	13,25	9,00
<i>Bakteri 5</i>	49,75	52,55	25,01	27,98	13,25	9,00
<i>Bakteri 6</i>	24,88	26,27	25,01	13,99	6,63	4,50
<i>Bakteri 7</i>	24,88	52,55	50,03	13,99	13,25	9,00
<i>Bakteri 8</i>	24,88	26,27	50,03	27,98	13,25	4,50
<i>Bakteri 9</i>	12,44	52,55	25,01	13,99	6,63	9,00
<i>Bakteri 10</i>	24,88	26,27	25,01	13,99	13,25	9,00
<i>Bakteri 11</i>	24,88	26,27	6,25	13,99	6,63	9,00
<i>Bakteri 12</i>	12,44	52,55	25,01	27,98	6,63	9,00



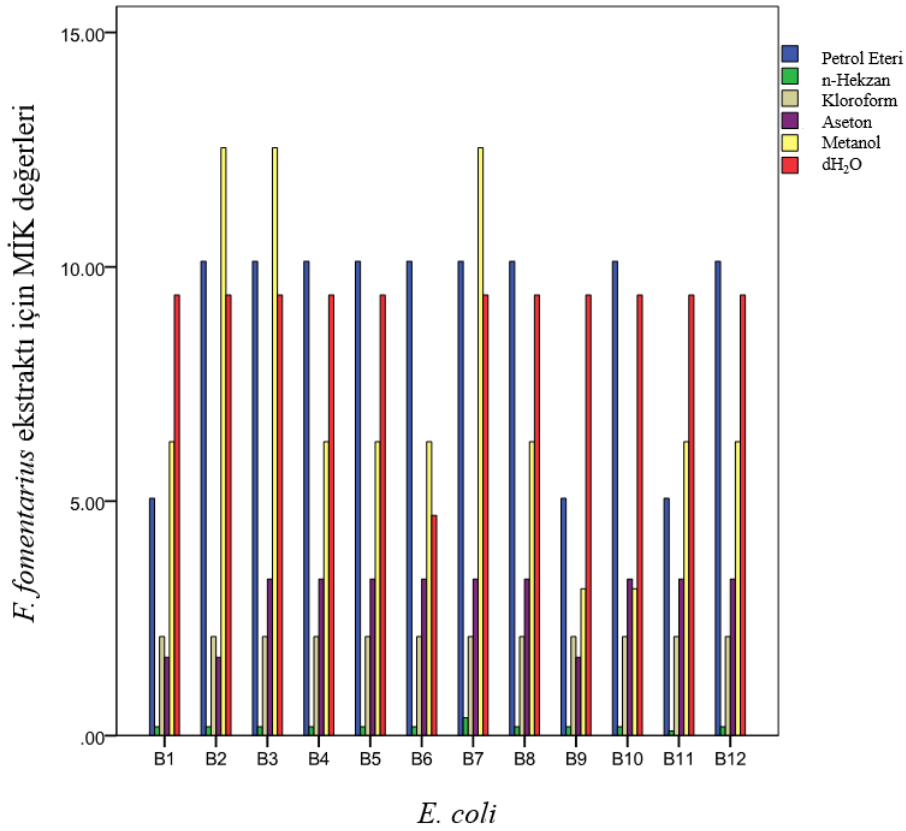
Şekil 4.2 *F. pinicola* ekstraktlarının MİK değerleri

#### 4.1.3 *F. fomentarius* Ekstraktlarının MİK Değerleri

*F. fomentarius* ekstraktlarının MİK testi sonuçları aşağıdaki Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Verilere göre, *F. fomentarius*'un petrol eteri ekstraktının, tüm *E. coli* suşlarına karşı 5,06 - 10,12 mg/mL arasında değişen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 0,10 - 0,38 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, kloroform 2,11 mg/mL MİK değeri ile, aseton 1,67 - 3,34 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, metanol 3,13 - 12,54 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,70 - 9,40 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.3 *F. fomentarius* ekstraktının MİK değerleri

	MİK değeri (mg/mL)					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	5,06	0,19	2,11	1,67	6,27	9,40
<i>Bakteri 2</i>	10,12	0,19	2,11	1,67	12,54	9,40
<i>Bakteri 3</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	12,54	4,70
<i>Bakteri 4</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	6,27	9,40
<i>Bakteri 5</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	6,27	9,40
<i>Bakteri 6</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	6,27	4,70
<i>Bakteri 7</i>	10,12	0,38	2,11	3,34	12,54	9,40
<i>Bakteri 8</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	6,27	9,40
<i>Bakteri 9</i>	5,06	0,19	2,11	1,67	3,13	9,40
<i>Bakteri 10</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	3,13	9,40
<i>Bakteri 11</i>	5,06	0,10	2,11	3,34	6,27	9,40
<i>Bakteri 12</i>	10,12	0,19	2,11	3,34	6,27	9,40



Şekil 4.3 *F. fomentarius* ekstraktının MİK değerleri

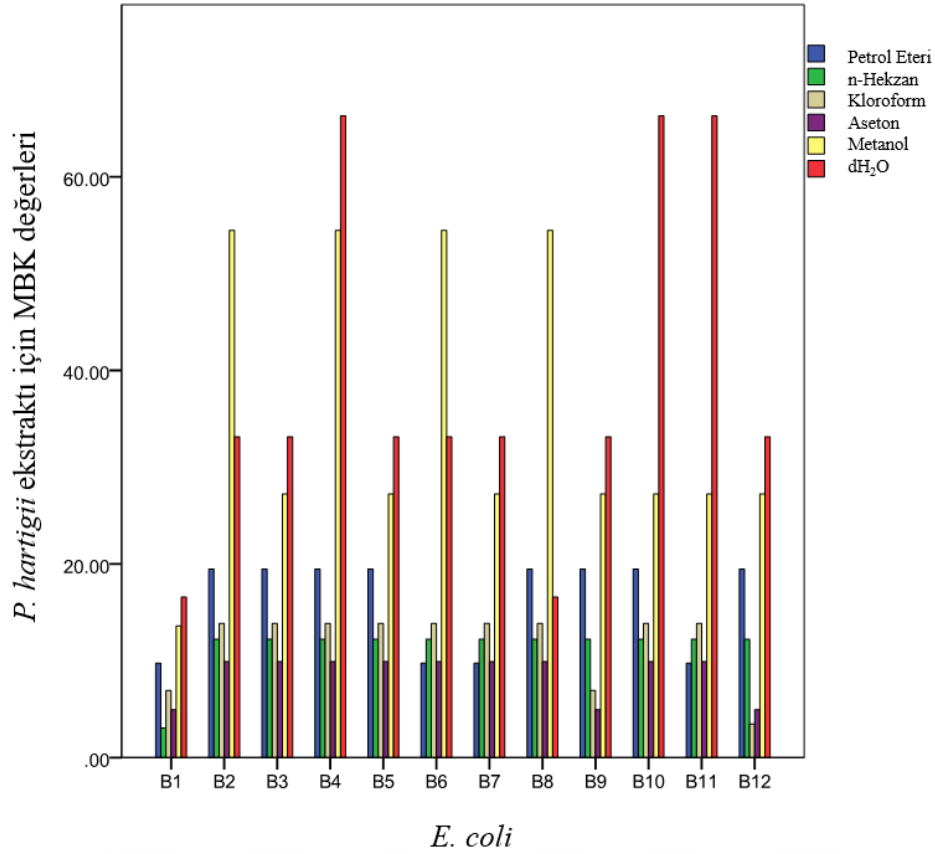
## 4.2 MBK Testi Sonuçları

### 4.2.1 *P. hartigii* Ekstraktının MBK Değerleri

*P. hartigii* ekstraktlarının MBK testi sonuçları aşağıdaki Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'te verilmiştir. Verilere göre, *P. hartigii*'nin petrol eteri ekstraktlarının, tüm *E. coli* suşlarına karşı 9,75 - 19,49 mg/mL arasında değişen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 3,06 - 12,24 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, kloroform 3,47 - 13,87 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, aseton 4,96 - 9,91 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, metanol 13,62 - 54,47 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 16,58 - 66,30 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.4 *P. hartigii* ekstraktlarının MBK değerleri

	MBK değeri (mg/mL)					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	9,75	3,06	6,94	4,96	13,62	16,58
<i>Bakteri 2</i>	19,49	12,24	13,87	9,91	54,47	33,15
<i>Bakteri 3</i>	19,49	12,24	13,87	9,91	27,24	33,15
<i>Bakteri 4</i>	19,49	12,24	13,87	9,91	54,47	66,30
<i>Bakteri 5</i>	19,49	12,24	13,87	9,91	27,24	33,15
<i>Bakteri 6</i>	9,75	12,24	13,87	9,91	54,47	33,15
<i>Bakteri 7</i>	9,75	12,24	13,87	9,91	27,24	33,15
<i>Bakteri 8</i>	19,49	12,24	13,87	9,91	54,47	16,58
<i>Bakteri 9</i>	19,49	12,24	6,94	4,96	27,24	33,15
<i>Bakteri 10</i>	19,49	12,24	13,87	9,91	27,24	66,30
<i>Bakteri 11</i>	9,75	12,24	13,87	9,91	27,24	66,30
<i>Bakteri 12</i>	19,49	12,24	3,47	4,96	27,24	33,15



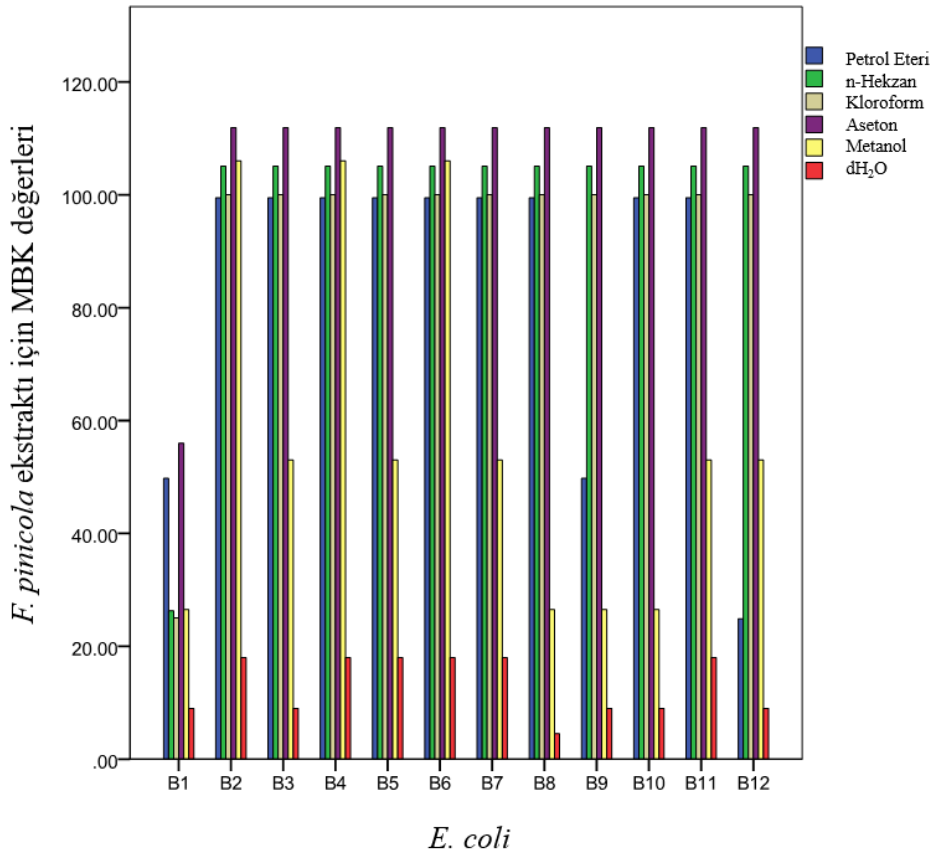
Şekil 4.4 *P. hartigii* ekstraktlarının MBK değerleri

#### 4.2.2 *F. pinicola* Ekstraktlarının MBK Değerleri

*F. pinicola* ekstraktlarının MBK testi sonuçları aşağıdaki Tablo 4.5 ve Grafik 4.5'te verilmiştir. Verilere göre, *F. pinicola*'nın petrol eteri ekstraktının, tüm *E. coli* suşlarına karşı 24,88 - 99,50 mg/mL, arasında değişen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 26,27 - 105,09 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, kloroform 25,01 - 100,05 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, aseton 55,96 - 111,91 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, metanol 26,51 - 106,02 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,50 - 18,00 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.5 *F. pinicola* ekstraktlarının MBK değerleri

	MBK değeri (mg/mL)					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	49,75	26,27	25,01	55,96	26,51	9,00
<i>Bakteri 2</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	106,02	18,00
<i>Bakteri 3</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	53,01	9,00
<i>Bakteri 4</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	106,02	18,00
<i>Bakteri 5</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	53,01	18,00
<i>Bakteri 6</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	106,02	18,00
<i>Bakteri 7</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	53,01	18,00
<i>Bakteri 8</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	26,51	4,50
<i>Bakteri 9</i>	49,75	105,09	100,05	111,91	26,51	9,00
<i>Bakteri 10</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	26,51	9,00
<i>Bakteri 11</i>	99,50	105,09	100,05	111,91	53,01	18,00
<i>Bakteri 12</i>	24,88	105,09	100,05	111,91	53,01	9,00



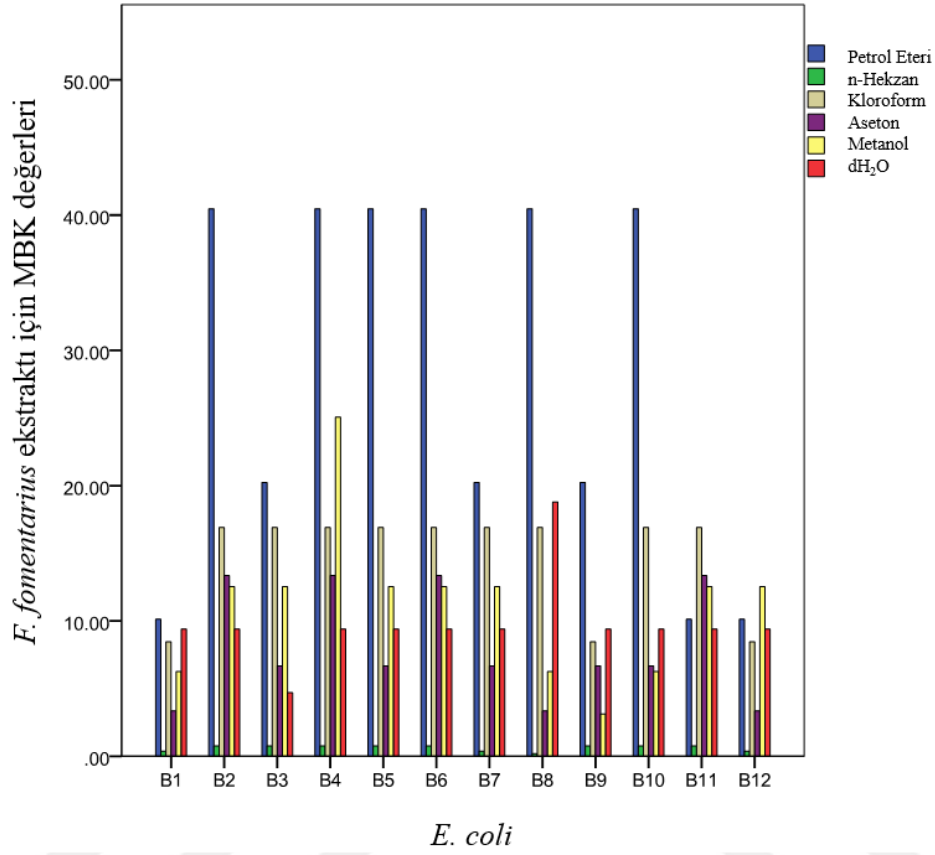
Şekil 4.5 *F. pinicola* ekstraktlarının MBK testi sonuçları

#### 4.2.3 *F. fomentarius* Ekstraktlarının MBK Değerleri

*F. fomentarius* ekstraktlarının MBK testi sonuçları aşağıdaki Tablo 4.6 ve Grafik 4.6'da verilmiştir. Verilere göre, *F. fomentarius*'un petrol eteri ekstraktının, tüm *E. coli* suşlarına karşı 10,12 - 40,47 mg/mL arasında değişen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 0,38 - 0,76 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, kloroform 8,46 - 16,91 mg/mL MBK değeri ile, aseton 3,34 - 13,36 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, metanol 3,13 - 25,07 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,70 - 18,80 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 4.6 *F. fomentarius* ekstraktlarının MBK değerleri

	MBK değeri (mg/mL)					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	10,12	0,38	8,46	3,34	6,27	9,40
<i>Bakteri 2</i>	40,47	0,76	16,91	13,36	12,54	9,40
<i>Bakteri 3</i>	20,24	0,76	16,91	6,68	12,54	4,70
<i>Bakteri 4</i>	40,47	0,76	16,91	13,36	25,07	9,40
<i>Bakteri 5</i>	40,47	0,76	16,91	6,68	12,54	9,40
<i>Bakteri 6</i>	40,47	0,76	16,91	13,36	12,54	9,40
<i>Bakteri 7</i>	20,24	0,38	16,91	6,68	12,54	9,40
<i>Bakteri 8</i>	40,47	0,19	16,91	3,34	6,27	18,80
<i>Bakteri 9</i>	20,24	0,76	8,46	6,68	3,13	9,40
<i>Bakteri 10</i>	40,47	0,76	16,91	6,68	6,27	9,40
<i>Bakteri 11</i>	10,12	0,76	16,91	13,36	12,54	9,40
<i>Bakteri 12</i>	10,12	0,38	8,46	3,34	12,54	9,40



Şekil 4.6 *F. fomentarius* ekstraktlarının MBK testi sonuçları

### 4.3 Ekstraktların Zamana Bağlı Öldürme Kinetiği Sonuçları

Zamana bağlı öldürme kinetik testi için Bakteri 1'e karşı *P. hartigii*'nin metanol ekstraktı ve Bakteri 9'a karşı *F. fomentarius*'un metanol ekstraktı seçilmiştir.

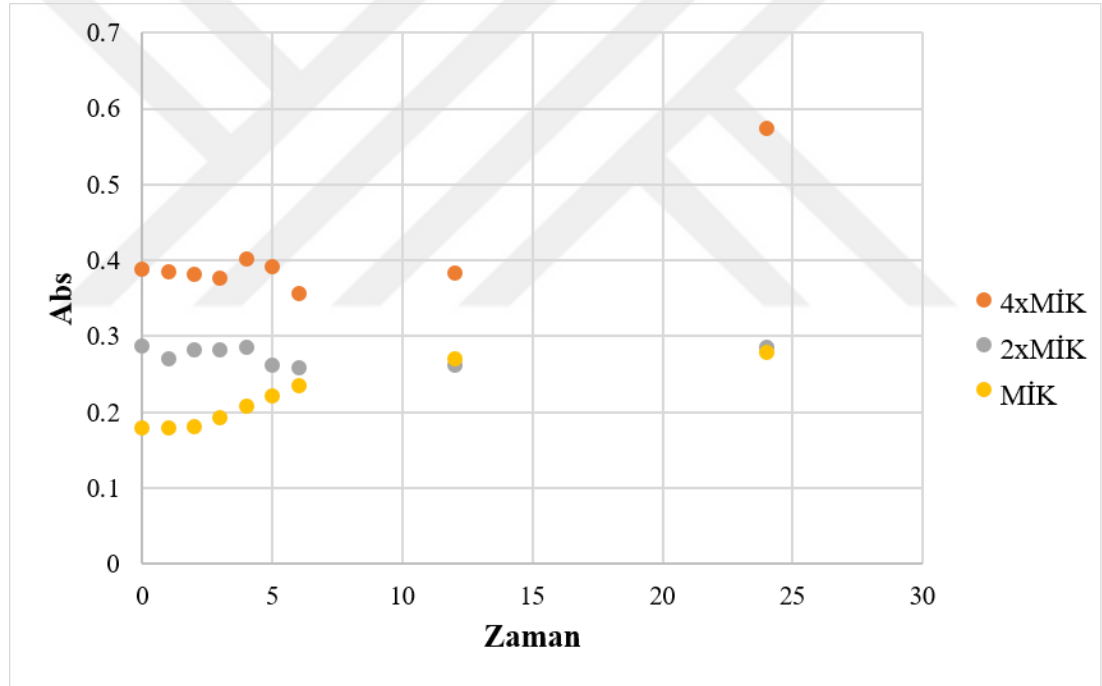
Ancak zamana bağlı öldürme kinetik çalışmasının sonuçları beklendiği gibi çıkmamış ve güvenilir de bulunmamıştır. Bu nedenle, *P. hartigii* ekstraktının zamana bağlı öldürme kinetik testi ile ilgili elde edilmiş veriler çalışmadan çıkarılmıştır. Sonuçların güvenilir olmamasının nedeni, muhtemelen *P. hartigii* ekstraktının saklama koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir, çünkü bu ekstrakt bir yanlışlık sebebiyle diğer ekstraktlar gibi stoklanmamıştır.

*F. fomentarius*'un metanol ekstraktının B9'a karşı 1 x MİK, 2 x MİK ve 4 x MİK test konsantrasyonları zamana bağlı öldürme kinetik profiline göre şu sonuçlar elde

edilmiştir: 2 x MİK ve 4 x MİK’de, ilk 6 saat boyunca absorbans biriminde bir azalma gözlemlenmiş, ardından 24. saate kadar sırasıyla yaklaşık 0,3 ve 0,6 birime kadar kademeli bir artış gözlenmiştir. İlk saat boyunca absorbans değeri 1x MİK’de göreceli olarak düşük iken 24. saatte absorbansın arttığı ve 0,28 değerini aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).

#### 4.4 İstatistiksel Analiz Sonuçları

Yapılan araştırma, B9’a karşı *F. fomentarius* için test konsantrasyonlarında çalışılmış ve *F. fomentarius*’un farklı konsantrasyonlarının etkisi arasındaki farkın absorpsiyon yüzdesini anlamlı derecede yüksek olduğunu ( $p=0,000$ ) ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.7 *F. fomentarius*’un metanol ekstraktının B9’a karşı zamana bağlı öldürme kinetik testi sonuçları

## 5. TARTIŞMA

$\alpha$ - Keepers vd. (2014) MBK/MİK oranının 4'e eşit ve 4'den büyük olduğu durumdaki antibakteriyel ajanın bakteriyostatik olduğunu, bu oranın 4'den küçük olduğu durumda ise ajanın bakterisidal olduğunu kabul etmektedir.

Buna göre *F. fomentarius* ekstraktlarının MBK/MİK oranı Tablo 5.1'de, *P. hartigii* ekstraktlarının MBK/MİK oranı Tablo 5.2'de ve *F. pinicola* ekstraktlarının MBK/MİK oranı ise Tablo 5.3'de verilmiştir.

Tablo 5.1 *E. coli* türlerine karşı *F. fomentarius* ekstraktlarının MBK/MİK oranı

	MBK/MİK oranı					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	2	2	4	2	1	1
<i>Bakteri 2</i>	4	4	8	8	1	1
<i>Bakteri 3</i>	2	4	8	2	1	1
<i>Bakteri 4</i>	4	4	8	4	4	1
<i>Bakteri 5</i>	4	4	8	2	2	1
<i>Bakteri 6</i>	4	4	8	2	2	1
<i>Bakteri 7</i>	2	1	8	1	1	1
<i>Bakteri 8</i>	4	1	8	2	1	2
<i>Bakteri 9</i>	4	4	4	2	1	1
<i>Bakteri 10</i>	4	4	8	2	2	1
<i>Bakteri 11</i>	2	8	8	4	2	1
<i>Bakteri 12</i>	1	2	4	1	2	1

Bu sonuçlara göre *F. fomentarius*'un distile su ekstraktı bütün bakterilere karşı bakteriosidal etki gösterirken, petrol eteri ekstraktı B1, B3, B7, B11 ve B12 bakterilerine karşı, n-hekzan ekstraktı B1, B7, B8 ve B12 bakterilerine, aseton ekstraktı B1, B3, B5, B6, B7, B8, B9, B10 ve B12 bakterilerine karşı ve metanol ekstraktı B4 hariç bütün bakterilere karşı bakteriosidal etki göstermiştir. Diğer ekstrakt çözeltileri ise bakteriyostatik etki ortaya koymuştur.

Tablo 5.2 *E. coli* türlerine karşı *P. hartigii* ekstraktlarının MBK/MİK oranı

	MBK/MİK oranı					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	4	1	2	2	2	1
<i>Bakteri 2</i>	4	4	4	2	4	1
<i>Bakteri 3</i>	4	4	4	4	1	2
<i>Bakteri 4</i>	4	4	2	4	4	2
<i>Bakteri 5</i>	4	2	4	4	4	2
<i>Bakteri 6</i>	2	4	2	4	4	2
<i>Bakteri 7</i>	2	2	2	4	2	1
<i>Bakteri 8</i>	4	4	4	4	2	1
<i>Bakteri 9</i>	4	4	2	1	2	2
<i>Bakteri 10</i>	4	4	2	4	1	2
<i>Bakteri 11</i>	2	4	4	4	1	2
<i>Bakteri 12</i>	8	4	1	2	2	1

Tablo 5.3 *E. coli* türlerine karşı *F. pinicola* ekstraktlarının MBK/MİK oranı

	MBK/MİK oranı					
	Petrol Eteri	n-Hekzan	Kloroform	Aseton	Metanol	dH <sub>2</sub> O
<i>Bakteri 1</i>	2	1	1	4	4	1
<i>Bakteri 2</i>	4	4	2	4	8	2
<i>Bakteri 3</i>	4	2	2	4	2	1
<i>Bakteri 4</i>	4	4	4	8	8	2
<i>Bakteri 5</i>	2	2	4	4	4	2
<i>Bakteri 6</i>	4	4	4	8	16	4
<i>Bakteri 7</i>	4	2	2	8	4	2
<i>Bakteri 8</i>	4	4	2	4	2	1
<i>Bakteri 9</i>	4	2	4	8	4	1
<i>Bakteri 10</i>	4	4	4	8	2	1
<i>Bakteri 11</i>	4	4	16	8	8	2
<i>Bakteri 12</i>	2	2	4	4	8	1

*P. hartigii*'nin distile su ekstraktı bütün bakterilere karşı bakteriosidal etki gösterirken, petrol eteri ekstraktı B6, B7 ve B11 bakterilerine karşı, n-hekzan ekstraktı B1, B5 ve B7 bakterilerine, kloroform ekstraktı B1, B4, B6, B7, B9, B10 ve B12, aseton ekstraktı

B1, B2, B9 ve B12 ve metanol ekstraktı B1, B3, B7, B8, B9, B10, B11 ve B12 bakterilerine karşı bakteriosidal etki göstermiştir. Diğer ekstrakt çözelti kombinasyonları ise bakteriostatik etki ortaya koymuştur.

Aynı şekilde *F. pinicola*'nın distile su ekstraktı B6 hariç bütün bakterilere karşı bakteriosidal etki gösterirken, petrol eteri ekstraktı B1, B5 ve B12 bakterilerine karşı, n-hekzan ekstraktı B1, B3, B5, B7, B9 ve B12 bakterilerine, kloroform ekstraktı B1, B2, B3, B7 ve B8 ve B12 ve metanol ekstraktı B3, B8 ve B10 bakterilerine karşı bakteriosidal etki göstermiştir. Diğer ekstrakt çözelti kombinasyonları ise bakteriostatik etki ortaya koymuştur.

### 5.1 MİK ve MBK Değerlerinin Yorumlanması

Bu çalışmada, her üç mantarın da seçilen *E. coli* suşlarına karşı farklı derecelerde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. *E. coli* suşlarına karşı MİK ve MBK değerlerinin ekstrakttan ekstrakta farklılık gösterdiği bulunmuştur. B8'e karşı 0,19 mg/mL MİK ve MBK değerlerine sahip olan *F. fomentarius*'un n-hekzan ekstraktı, diğer ekstraktlara kıyasla en anlamlı antimikrobiyal aktiviteyi sergilemiştir.

Sonuçlara göre, *F. fomentarius*'un petrol eteri ekstraktı, tüm *E. coli* suşlarına karşı 5,06 - 10,12 mg/mL arasında değişen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 0,10 - 0,38 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, kloroform 2,11 mg/mL MİK değeri ile, aseton 1,67 - 3,34 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, metanol 3,13 - 12,54 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,70 - 9,40 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Ayrıca, *F. fomentarius*'un petrol eteri ekstraktı, tüm *E. coli* suşlarına karşı 10,12 - 40,47 mg/mL arasında değişen minimum bakteriosidal konsantrasyon (MBK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 0,38 - 0,76 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, kloroform 8,46 - 16,91 mg/mL MBK değeri ile, aseton 3,34 - 13,36 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, metanol 3,13 - 25,07 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,70 - 18,80 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahiptir.

*F. fomentarius*'un MİK değerlerine göre tüm ekstraktları tüm bakterilere karşı iyi antibakteriyel aktiviteyi gösterir, ancak özellikle n-hekzan ekstraktı tüm bakterilere karşı çok iyi aktivite göstermektedir. Öte yandan, MİK değerlerine göre, metanol ekstraktı B2, B3 ve B7'ye karşı düşük antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Jiang ve Bao (2011), *F. fomentarius*'un su, metanol, aseton, etil asetat, kloroform ve petrol eteri ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. Su ekstraktları, sırasıyla 50 mg/mL ve 25 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ile *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde belirgin inhibe edici aktivite göstermiştir. Öte yandan, metanol ekstraktlarının *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı MİK değeri 12,5 mg/mL olarak gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında, *F. fomentarius*'un su ekstraktının MİK değerinin 4,70 - 9,40 mg/mL arasında olduğu gözlenmiştir. Öte yandan, metanol ekstraktının MİK değeri 3,13 - 12,54 mg/mL arasında bulunmuştur. Sonuçlara göre, bu tez çalışmasında elde edilen *F. fomentarius*'un su ekstraktının *E. coli* suşlarına karşı daha iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlenmiştir. *F. fomentarius*'un metanol ekstraktının *E. coli* suşlarına karşı Kolundžić vd. (2016)'nin çalışmasındaki sonuçlara benzer şekilde ve Jiang ve Bao (2011) ile Dundar vd. (2016)'nin çalışmalarında belirtilen değerlerle kıyaslandığında eşit veya daha iyi antibakteriyel aktivite gösterdiği de görülmüştür. Sonuçlar arasındaki farklılığın ana nedeni muhtemelen bu iki çalışmada kullanılan ve birbirinden farklı olan *E. coli* suşlarından kaynaklanmaktadır. Öte yandan sekonder metabolitler ve bunların mantarlardaki konsantrasyonları, toplama yeri ve ekstrakt içindeki sekonder metabolit kompozisyonunu etkileyebilecek toplama zamanı da bunların aktivite değerlerinde önemli rol oynamaktadır.

Altuner ve Akata (2010) çalışmalarında, çeşitli makromantarların *C. albicans* ATCC 26555, *E. coli* ETEC LM 63083, *P. aeruginosa*, *S. enterica* serotype Typhimurium SL 1344 ve *S. flexneri* (klinik izolat)'a karşı antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon testi ile incelemişlerdir. Tüm ekstraktların *S. flexneri*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ve *P. hartigii* dışındaki tüm ekstraktların *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, *P. hartigii* ekstraktının *E. coli*'ye karşı aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir. Sonuçlardaki bu farklılığın temel nedeni, bu iki çalışmada kullanılan *E. coli* suşlarının farklı olmasıdır. Öte

yandan, yine yukarıda belirtildiği gibi sekonder metabolitler ve bunların mantarlardaki konsantrasyonları, toplama yeri ve ekstrakt içindeki sekonder metabolit bileşimini etkileyebilecek toplama zamanı da tespit edilen aktivitedeki farklılığın temel sebeplerindendir.

Verilere göre, *F. pinicola*'nın petrol eteri ekstraktının tüm *E. coli* suşlarına karşı 12,44 - 49,75 mg/mL arasında değişen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 26,27 - 52,55 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, kloroform 6,25 - 50,03 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, aseton 13,99 - 27,98 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile, metanol 6,63 - 26,51 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,50 - 9,00 mg/mL arasında değişen MİK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Ayrıca, *F. pinicola*'nın petrol eteri ekstraktının tüm *E. coli* suşlarına karşı 24,88 - 99,50mg/mL arasında değişen minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ile antimikrobiyal aktiviteye sahipken, n-hekzan 26,27 - 105,09 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, kloroform 25,01 - 100,05 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, aseton 55,96 - 111,91 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile, metanol 26,51 - 106,02 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile ve dH<sub>2</sub>O ekstraktları ise 4,50 - 18,00 mg/mL arasında değişen MBK değeri ile antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bu tezin sonucu, n-hekzan ekstraktlarının *E. coli*'ye karşı yalnızca daha yüksek konsantrasyonlarda daha iyi antimikrobiyal potansiyele sahip olduğunu belirten Bala vd. (2011)'nin çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, metanol ekstraktlarının diğerine kıyasla ikinci düşük MİK değerine sahip olduğu görülmüştür, bu sonuç Khadhri vd. (2017)'nin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Daha önce de belirtildiği gibi, Pala vd. (2019), *F. pinicola*'nın antimikrobiyal potansiyelini hem gram-pozitif (*B. subtilis* ve *S. aureus*), hem de gram-negatif (*E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*) ve mantarlara (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *P. chrysogenum* ve *A. fumigates*) karşı agar kuyucuk difüzyonu yöntemi ile test etmiştir. Çalışmanın sonuçları, *F. pinicola*'nın 150 mg/mL konsantrasyonda neredeyse 10 µg gentamisin ve 50 µg nistatine paralel antibakteriyel ve antifungal aktivite sergilediğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre bu tez çalışmasında elde edilen *F. pinicola* ekstraktları daha iyi antibakteriyel aktivite göstermiştir. Sonuçlardaki bu

farklılığın temel nedeni, yine *E. coli* suşlarından ve ekstraktlar içindeki etken madde kompozisyonundan kaynaklanmaktadır.

## 5.2 Zamana Bağlı Öldürme Kinetik Testinin Yorumlanması

Zamana bağlı öldürme kinetik testlerine göre, *F. fomentarius*'un metanol ekstraktının antibakteriyel analizinin, Grafik 4.7'de görüldüğü gibi B9'a karşı değişken kinetik değerler vermektedir. Ekstrakt, konsantrasyona bağlı bir öldürme davranışı gösterdiği için hem bakteriyostatik, hem de bakterisidal etkiler sergilemiştir.

Bu çalışmada, ekstraktın 2 x MİK ve 4 x MİK'de bakterisidal etki gösterdiği ve 6 saat etki öncesinde test organizmalarının tamamen yok edildiği ortaya konulmuştur.

Literatürdeki veriler incelendiğinde bu çalışma *F. fomentarius* mantarı üzerinde zamana bağlı öldürme kinetiği kullanılarak yapılmış ilk çalışmadır.

*F. fomentarius* mantarının sergilediği bu antibakteriyel aktiviteler, antimikrobiyal ilaçlar konusunda yapılan biyolojik araştırmalar için potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir ve *F. fomentarius*'un izolasyonu ve aktivite yönteminin tanımlanması ilaç keşfinde ileri bir adım olacaktır.

## 6. SONUÇ

Son yıllarda tıbbi mantarlar bulaşıcı hastalıkların tedavisindeki alternatiflerinden biri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca birçok patojen suşuna karşı iyi bir yeni anti-enfektif ajan kaynağıdır. Mantarların antimikrobiyal aktivitesini sınıflandırılmasına yönelik araştırmalar, hastalıkların tedavisi için yeni yöntemlerin bulunması maksadıyla yapılan kilit araştırma alanlarından biridir. Bu tez, tıbbi makrofungusların analizine ilişkin bazı bilgilere katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. Elde edilen bulgulara göre, bu çalışmada kullanılan mantarların doğal ilaç olarak kullanılmaya aday olarak önerilebilmesi için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmadaki tüm mantar ekstraktları mikroorganizmalara karşı aktivite göstermiştir, ancak *F. fomentarius* ve *P. hartigii*'nin metanol ekstraktları MİK ve MBK değerleri açısından aktivitesi en yüksek ekstraktlardır.

*F. fomentarius* ve *F. pinicola*'nın metanol ekstraktları muhtemelen potansiyel antibakteriyel ve antifungal ajanlar olarak görev yapan biyoaktif bileşikler içermektedir. Bu nedenle, bu makrofunguslardan biyoaktif bileşiklerin izole edilmesi ve tanımlanması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

## 7. ÖNERİLER

Mantarlar, anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-viral ve immüno-güçlendirici dâhil olmak üzere geniş bir biyoaktivite yelpazesi sergilemektedirler. Bu güçlü mantar bileşiklerinin daha yoğun şekilde izole edilmesinin, mikrobiyal ilişkili hastalıkların ortadan kaldırılması ve insanlığın yararına diğer farmakolojik aktivitelere yönelik yeni bir etkin madde ile sonuçlanabileceği önerilebilir.

Mevcut araştırmadan, *F. pinicola* ekstraktlarının şimdiye kadar detaylı bir şekilde analiz edilmediği anlaşılmaktadır. *F. pinicola*'dan elde edilebilecek bileşikler hakkında ayrıntılı bir araştırma yapılması önerilebilir.

## KAYNAKLAR

- Altuner, E. M. (2008). Bazı karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi (Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı).
- Altuner, E. M., & Akata, I. (2010). Antimicrobial activity of some macrofungi extracts. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(1): 45-49.
- Altuner, E. M., Akata, I., & Canli, K. (2012). In vitro antimicrobial activity screening of *Bovista nigrescens* Pers. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 12(1), 90-96.
- Altuner, E. M., & Çetin, B. (2018). Antimicrobial activity of *Isothecium alopecuroides* and potential effect of some climate elements on the activity of this bryophyte sample. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 18(2), 126-137.
- Altuner, EM. (2019). A step by step guide to minimum inhibitory concentration (MIC) test for determining the antimicrobial activity of extracts from natural sources such as plants and macrofungi. Retrieved from <http://www.erginmurataaltuner.com/index.php/2019/11/12/minimum-inhibitory-concentration-mic-test>
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A., & Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of applied microbiology*, 115(2), 346-357.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 260-271.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl\_1), 5-16.
- Appiah, T., Boakye, Y. D., & Agyare, C. (2017). Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Bala, N., Aitken, E. A., Fechner, N., Cusack, A., & Steadman, K. J. (2011). Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical biology*, 49(5), 492-500.

- Baldas, B., & Altuner, E. M. (2018). The antimicrobial activity of apple cider vinegar and grape vinegar, which are used as a traditional surface disinfectant for fruits and vegetables. *Commun. Fac. Sci. Univ. Ank. Series C*, 27(1), 1-10.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Bandara, A. R., Rapior, S., Bhat, D. J., Kakumyan, P., Chamyuang, S., Xu, J., & Hyde, K. D. (2015). *Polyporus umbellatus*, an edible-medicinal cultivated mushroom with multiple developed health-care products as food, medicine and cosmetics: a review. *Cryptogamie, Mycologie*, 36(1), 3-42.
- Brehm-Stecher, B. F., & Johnson, E. A. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), 3357-3360.
- Brüschke N., & Wynn. (2000). Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering in *Encyclopedia of Separation Science*, Pages 1777-1786
- Canlı, K., Yetgin, A., Akata, I., & Altuner, E. M. (2016). In vitro antimicrobial activity of *Angelica sylvestris* roots. *International Journal of Biological Sciences*, 1(1), 1-7.
- Canlı, K., Yetgin, A., Akata, I., & Altuner, E. M. (2017). Antimicrobial activity and chemical composition screening of *Epilobium montanum* root. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3s):239-243.
- Canlı, K., Yetgin, A., Benek, A., Bozyel, M. E., & Altuner, E. M. (2019). In vitro antimicrobial activity screening of ethanol extract of *Lavandula stoechas* and investigation of its biochemical composition. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, Article ID 3201458.
- Carranza-Velázquez, J., & Gilbertson, R. L. (1986). Taxonomy of the *Fomitopsis rosea* complex (Aphylliphorales: Polyporaceae). *Taxonomía del complejo Fomitopsis rosea (Aphylliphorales: Polyporaceae)*. *Mycotaxon.*, 25(2), 469-486.
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S. F., & Li, Y. Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource technology*, 99(8), 3187-3194.
- Chernilevsky, G. (2010). Tinder fungus (*Fomes fomentarius*) on a dead birch (*Betula*). Approximately 10 years old mushroom. Ukraine [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Fomes\\_fomentarius\\_2010\\_G2.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Fomes_fomentarius_2010_G2.jpg)

- Chopra, I., Hodgson, J., Metcalf, B., & Poste, G. (1997). The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(3), 497.
- Clardy, J., & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432(7019), 829-837.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Das, K., Tiwari, R. K. S., & Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.
- De Roman, M. (2010). The contribution of wild fungi to diet, income and health: a world review. In *Progress in mycology* (pp. 327-348). Springer, Dordrecht.
- Deka, A. C., Sarma, I., Dey, S., & Sarma, T. C. (2017). Antimicrobial properties and phytochemical screening of some wild macrofungi of Rani-Garbhangra reserve forest area of Assam, India. *Advances in Applied Science Research*, 8, 17-22.
- Doğan, H. H., Duman, R., Özkalp, B., & Aydın, S. (2013). Antimicrobial activities of some mushrooms in Turkey. *Pharmaceutical biology*, 51(6), 707-711.
- Dresch, P., Rosam, K., Grienke, U., Rollinger, J. M., & Peintner, U. (2015). Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express*, 5(1), 4.
- Dundar, A., Okumus, V., Ozdemir, S., Celik, K. S., Boğa, M., & Ozcagli, E. (2016). Determination of cytotoxic, anticholinesterase, antioxidant and antimicrobial activities of some wild mushroom species. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1178060.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(9), 509-515.
- Forestry Development. [www.forestrydev.org/diseases](http://www.forestrydev.org/diseases) CTD.Group/Heart11\_ehtml. Last modified: 30.12.2011

- Garibay-Orijel, R., Cordova, J., Cifuentes, J., Valenzuela, R., Estrada-Torres, A., & Kong, A. (2009). Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *Forest Ecology and Management*, 258(2), 122-131.
- Gomes-Silva, A. C., Nogueira-Melo, G. S., Baltazar, J. M., Drechsler-Santos, E. R., Lira, C. R. S., Medeiros, P. S., Sotao, H. M. P., Ryvarde, L., Cavalcanti, M. A., Q., & Gibertoni, T. B. (2015). Notes on Fomitopsis (Polyporales, Agaricomycetes) from North and Northeast Brazil. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 179-185.
- Guterres, Z. D. R., Mantovani, M. S., Eira, A. F. D., Ribeiro, L. R., & Jordão, B. Q. (2005). Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 458-463.
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B. C., Maeda, Y., Goldsmith, C. E., Rooney, P. J., Loughrey, A., Rao, J. R., & Moore, J. E. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15(1), 5-7.
- Hilszczańska, D. (2012). Medicinal properties of macrofungi. *Forest Research Papers*, 73(4), 347-353.
- Hobbs, C. (2002). *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, and culture*. Book Publishing Company.
- Jensbn. (2006). *Fomitopsis pinicola*, growing on a dead pine log in Luxembourg. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fomitopsis\\_pinicola\\_1.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fomitopsis_pinicola_1.JPG)
- Jiang, L., & Bao, H. Y. (2011). Antimicrobial Activity of Different Extracts from Fruiting Body of *Fomes fomentarius* in Vitro. *Edible Fungi of China*, 2.
- Keepers, T. R., Gomez, M., Celeri, C., Nichols, W. W., and Krause, K. M. (2014). Bactericidal activity, absence of serum effect, and time-kill kinetics of ceftazidime-avibactam against  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(9), 5297-5305.
- Keleş, A., Koca, I., & Gençcelep, H. (2011). Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *Journal of Food Processing & Technology*, 2(6), 2-6.
- Khadhri, A., Aouadhi, C., & Aschi-Smiti, S. (2017). Screening of bioactive compounds of medicinal mushrooms collected on Tunisian territory. *Int J Med Mushrooms*, 19(2), 127-35.

- Kim, K. M., Yoon, Y. G., & Jung, H. S. (2005). Evaluation of the monophyly of *Fomitopsis* using parsimony and MCMC methods. *Mycologia*, 97(4), 812-822.
- Kolundžić, M., Grozdanić, N. Đ., Dodevska, M., Milenković, M., Sisto, F., Miani, A., Farronato, G., & Kundaković, T. (2016). Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Polyporaceae. *Industrial Crops and Products*, 79, 110-115.
- Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M., & Fung, K. P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology letters*, 105(2), 101-114.
- Liu, X. Q., Wu, Y. T., Chen, W. K., & Yu, Z. L. (1998). Concurrent synthesis of methanol and methyl formate catalyzed by copper-based catalysts in a slurry phase. *Studies in surface science and catalysis*, 557-560.
- Makvana, S., & Krilov, L. R. (2015). *Escherichia coli* infections. *Pediatrics in review*, 36(4), 167-70.
- Mau, J. L., Lin, H. C., & Chen, C. C. (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 6072-6077.
- Mayrhofer, S., Domig, K. J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G., & Kneifel, W. (2008). Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(12), 3745-3748.
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T., & Kawagishi, H. (1995). Antitumor-active substances from mushrooms. *Food Reviews International*, 11(1), 23-61.
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., & Hedjaroude, G. A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International immunopharmacology*, 7(6), 701-724.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12), 1797-1806.
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., & Malm, A. (2015). Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one polish mushrooms. *PLoS One*, 10(10), 1-13.
- Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z. A., Duse, A. G., Jenkins, P., O'Brien, T. F., Pablos-Mendez, A. ve Klugman, K. P. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *The Lancet infectious diseases*, 5(8), 481-493.

- Opige, M., Kateyo, E., Kabasa, J. D., & Olila, D. (2006). Antibacterial activity of extracts of selected indigenous edible and medical mushrooms of eastern Uganda. *Int J Trop Med*, 1, 111-116.
- Padulosi, S., Hodgkin, T., Williams, J., & Haq, N. (2002). 30 underutilized crops: trends, challenges and opportunities in the 21st century. *Managing plant genetic diversity*, 323-338.
- Pala, S. A., Wani, A. H., & Ganai, B. A. (2019). Antimicrobial potential of some wild Macromycetes collected from Kashmir Himalayas. *Plant Science Today*, 6(2), 137-146.
- Palazzolo, E., Letizia Gargano, M., & Venturella, G. (2012). The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). *International journal of food sciences and nutrition*, 63(1), 79-83.
- Parasuraman, S., Thing, G. S., Christopher, P. V., & Dhanaraj, S. A. (2019). Petroleum ether, a laboratory solvent induced cannibalism, piloerection and straub tail reaction in rodents. *Research & Reviews A Journal of Pharmacognosy*, 1(2), 6-10.
- Pegler, D. N. (2001). Useful fungi of the world: Amadou and Chage *Mycologist*, 4(15), 153-154.
- Peintner, U., R. Pöder, and Pumpel, T. (1998). The iceman's fungi. *Mycological Res.* 102, 1153-1162.
- Poggio, C. (2017). Gutta-Percha Solvents Alternative to Chloroform: An In Vitro Comparative Evaluation. *EC Dental Science*, 15, 51-56
- Reshetnikov, S. V., & Tan, K. K. (2001). Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(4), 34.
- Ryvarden, L., & Johansen, I. (1980). A preliminary polypore flora of East Africa. Oslo. Norway: Fungiflora.
- Scheutz, F., & Strockbine, N. A. (2015). *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-49.
- Seniuk, O. F., Gorovoj, L. F., Beketova, G. V., Savichuk, H. O., Rytik, P. G., Kucherov, I. I., Prilutskay, A. B. ve Prilutsky, A. I. (2011). Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (Aphyllphoromycetidae). *International journal of medicinal mushrooms*, 13(1), 7-18.

- Sicaire, A. G., Abert-Viana, M., Fineb, F., Carréc, P., Tostaind, S., & Chemata, F. (2015). Alternative bio-based solvents to n-hexane for the extraction of rapeseed oil Theoretical COSMO-RS simulations and experimental substitution investigation from laboratory to pilot plant scale.
- Stamets, P. (2002). Novel antimicrobials from mushrooms. *Herbal Gram*, 54, 28-33.
- Tiwari, M. S., & Sharma, P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. (1)1, 25-41.
- Tsuji, B. T., Yang, J. C., Forrest, A., Kelchlin, P. A., & Smith, P. F. (2008). In vitro pharmacodynamics of novel rifamycin ABI-0043 against *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(1), 156-160.
- Vlkov, M. K. (2017). A short report on the coexistence of *Abies alba* with *Phellinus hartigii* [www.flickr.com/photos/m\\_klimes/albums/72157714407864177](http://www.flickr.com/photos/m_klimes/albums/72157714407864177)
- Vyas, D., Chaubey, A., & Dehariya, P. (2014). Biodiversity of mushrooms in Patharia forest of Sagar (MP)-III. *Int J Biodivers Conserv*, 6(8), 600-607.
- Wachtel-Galor, S., Tomlinson, B., & Benzie, I. F. (2004). *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *British Journal of Nutrition*, 91(2), 263-269.
- Wasko, S. J., Brenner, M. V., & Cartier, S. F. (2014). Crystalline Metabolites of the Tinder Polypore (*Fomes fomentarius*). *Journal of the North Carolina Academy of Science*, 130(1), 16-22.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3), 258-274.
- WHO. (2011). Regional Committee for Europe, European strategic action plan on antibiotic resistance, Copenhagen.
- WHO. (2017). Outbreaks of *E. coli* in Europe. *Microbiology*, 155, 360-369.
- Wong, K. H., Sabaratnam, V., Abdullah, N., Kuppusamy, U. R., & Naidu, M. (2009). Effects of cultivation techniques and processing on antimicrobial and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 47-55.
- Yilmaz, M. T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 42(Sup. 2), 1423-1429.

- Zapora, E., Wolkowycki, M., Bakier, S., & Zjawiony, J. K. (2016). *Phellinus igniarius*: A Pharmacologically Active Polypore Mushroom. *Natural product communications*, 11(7), 1934578X1601100741.
- Zervakis, G., & Venturella, G. (2002). Mushroom breeding and cultivation enhances ex situ conservation of Mediterranean *Pleurotus* taxa. *Managing plant genetic diversity*, 351-358.
- Zíbarová, L. (2016). <http://www.mykologie.net/index.php/houby/podle-morfologie/chorose/item/151-phellinus-hartigii>. *Mycology - Phytopathology of woody plants - Forest ecology*.30.06.2016
- Zotti, M., Persiani, A. M., Ambrosio, E., Vizzini, A., Venturella, G., Donnini, D., Angelini, P., Di Piazza, S., Pavarino, M., Lunghini, D., & Venanzoni, R. (2013). Macrofungi as ecosystem resources: Conservation versus exploitation. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(1), 219-225.



# **EKLER**

## EKLER

### EK A - İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

#### Normallik Testi

Konsantrasyonlar	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk
	İstatistik	df	Sig.	İstatistik
Absorbans 4xMİK 62,68mg/100µL	0,410	9	0,000	0,569
2xMİK 31,34mg/100µL	0,286	9	0,033	0,835
MİK 15,67mg/100µL	0,177	9	0,200*	0,869

#### Normallik Testi

Konsantrasyonlar	Shapiro-Wilk	
	df	Sig.
Absorbans 4xMİK 62,68mg/100µL	9	0,000
2xMİK 31,34mg/100µL	9	0,050
MİK 15,67mg/100µL	9	0,121

#### Kruskal-Wallis Test

Konsantrasyonlar	N	Ortalama Sıra
Absorbans 4xMİK 62,68mg/100µL	9	23,00
2xMİK 31,34mg/100µL	9	13,17
MİK 15,67mg/100µL	9	5,83
Toplam	27	

**Test İstatistiği<sup>a,b</sup>**

	Absorbans
Ki-Kare	21,224
df	2
Asymp. Sig.	0,000

a. Kruskal Wallis Testi

b. Değişkenlerin gruplanması:  
Konsantrasyonlar

**Mann-Whitney Testi**

	Konsantrasyonlar	N	Ortalama Sıra	Sıra Toplamı
Absorbans	4xMİK 62,68mg/100µL	9	14,00	126,00
	2xMİK 31,34mg/100µL	9	5,00	45,00
	Toplam	18		

**Test İstatistiği<sup>a,b</sup>**

	Absorbans
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,580-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,000 <sup>a</sup>

a. Düzeltilmemiş.

b. Değişkenlerin gruplanması:  
Konsantrasyonlar

## NPar Testleri

### Mann-Whitney Testi

Konsantrasyonlar	N	Ortalama Sıra	Sıra Toplamı
Absorbans 4xMİK 62,68mg/100µL	9	14,00	126,00
MİK 15,67mg/100µL	9	5,00	45,00
Toplam	18		

### Test İstatistiği<sup>ab</sup>

	Absorbans
Mann-Whitney U	0,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,000 <sup>a</sup>

a. Düzeltilmemiş.

b. Değişkenlerin gruplanması:  
Konsantrasyonlar

## NPar Testleri

### Mann-Whitney Testi

Konsantrasyonlar	N	Ortalama Sıra	Sıra Toplamı
AbsorbanS 2xMİK 31,34mg/100µL	9	13,17	118,50
MİK 15,67mg/100µL	9	5,83	52,50
Toplam	18		

### Test İstatistiği<sup>ab</sup>

	Absorbans
Mann-Whitney U	7,500
Wilcoxon W	52,500
Z	-2,920-
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,002 <sup>a</sup>

a. Düzeltilmemiş.

b. Değişkenlerin gruplanması:  
Konsantrasyonlar

## EK B - KLİNİK İZOLATLARIN DİRENÇ PROFİLLERİ

Antibiyotikler	#Bakteri 2	#Bakteri 3	#Bakteri 4	#Bakteri 5	#Bakteri 6
Amikasin	<= 4 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)
Gentamisin	<= 1 (S)	2 (S)	2 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Ertapenem	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)
İmipenem	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	2 (S)
Meropenem	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)
Sefksim	<= 0,5 (S)	> 2 (R)	<= 0,5 (S)	<= 0,5 (S)	1 (S)
Seftazidim	<= 1 (S)	4 (I)	<= 1 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Seftriakson	<= 1 (S)	> 4 (I)	<= 1 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Sefepim	<= 1 (S)	2 (I)	<= 1 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Aztreonam	<= 1 (S)	4 (I)	<= 1 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Ampisilin	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	<= 2 (S)	> 8 (R)
Amoksisilin-Klavulanat (f)	16/2 (R)	4/2 (S)	16/2 (R)	4/2 (S)	8/2 (R)
Piperasillin-Tazobaktam	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)
Kolistin	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)
Trimetoprim-Sülfametoksazole	<= 1/19 (S)	> 4 / 76 (R)	<= 1/ 19 (S)	> 4 / 76 (R)	> 4 / 76 (R)
Fosfomisin w/G6P	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)
Nitrofurantoin	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)
Siprofloksasin	<= 0,25 (S)	> 1 (R)	> 1 (R)	> 1 (R)	> 1 (R)
Norfloksasin	<= 0,5 (S)	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)

(S): Duyarlı

(R): Dirençli

Antibiyotikler	#Bakteri 7	#Bakteri 8	#Bakteri 9	#Bakteri 10	#Bakteri 11	#Bakteri 12
Amikasin	<= 4 (S)	8 (S)	8 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)	<= 4 (S)
Gentamisin	2 (S)	2 (S)	> 4 (R)	2 (S)	<= 1 (S)	<= 1 (S)
Ertapenem	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	> 1 (R)	<= 0,25 (S)
İmipenem	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	2 (S)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)	0,5 (S)
Meropenem	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	<= 0,13 (S)	X	<= 0,13 (S)
Sefksim	<= 0,5 (S)	> 2 (R)	> 2 (R)	> 2 (R)	<= 0,5 (S)	> 2 (R)
Seftazidim	<= 1 (S)	2 (I)	> 8 (R)	> 8 (R)	<= 1 (S)	> 8 (R)
Seftriakson	<= 1 (S)	> 4 (R)	> 4 (R)	> 4 (R)	<= 1 (S)	> 16 (R)
Sefepim	<= 1 (S)	4 (I)	> 8 (R)	<= 1 (S)	2 (I)	> 8 (R)
Aztreonam	<= 1 (S)	2 (I)	> 16 (R)	8 (R)	<= 1 (S)	> 16 (R)
Ampisilin	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	<= 2 (S)	> 8 (R)
Amoksisilin-Klavulanat (f)	> 32/2 (R)	> 32/2 (R)	> 32/2 (R)	> 32/2 (R)	4/2 (S)	16/2 (R)
Piperasillin-Tazobaktam	> 16/4 (R)	> 16/4 (I)	8/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)	<= 4/4 (S)
Kolistin	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)	<= 1 (X)
Trimetoprim-Sülfametoksazole	> 4 / 76 (R)	> 4 / 76 (R)	<= 1/ 19 (S)	<= 1/ 19 (S)	<= 1/ 19 (S)	<= 1/ 19 (S)
Fosfomisin w/G6P	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)
Nitrofurantoin	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	<= 16 (S)	32 (S)
Siprofloksasin	<= 0,25 (S)	> 1 (R)	> 1 (R)	0,5 (I)	<= 0,25 (S)	<= 0,25 (S)
Norfloksasin	<= 0,5 (S)	> 2 (R)	> 2 (R)	1 (I)	<= 0,5 (S)	<= 0,5 (S)

(S): Duyarlı

(R): Dirençli

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nahlah Abraheem Saed ALALAQİ  
Doğum Yeri ve Yılı : Tripoli Libya, 1981  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : awad1996@yahoo.com



### Eğitim Durumu

Lise : Büyük Alfathe Lisesi  
Lisans : Benghazi Üniversitesi

### Mesleki Deneyim

İş Yeri : Benghazi Üniversitesi, 2001 - 2013

### Yayın Listesi :

Altinöz E, Alalaqi NAS, Akata I, Altuner EM. (2020) Screening in vitro efflux pump inhibitor activities of some extracts, EurasianBioChem 2020 Abstract Book, p.90.