



Kırşehir İlinden Toplanan *Morchella esculenta* (L.) Pers (Kuzu Göbeği) Mantarlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Elif Sevim^{1,*}, Ali Sevim²

¹Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye

²Bitki Koruma Bölümü, Ziraat Fakültesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye

Makale Tarihçesi

Gönderim: 10.10.2020

Kabul: 17.02.2021

Yayın: 20.03.2021

Araştırma Makalesi

Öz – Doğal yenilebilir mantarların Dünya'nın birçok ülkesinde geleneksel anlamda besin ve ilaç olarak kullanıldığı uzun zamandan beri bilinen bir konudur. *Morchella esculenta* (L.) Pers (Kuzu Göbeği) tıbbi kullanım ve besin değeri açısından son derece değerlidir. Günümüze kadar yapılan birçok bilimsel çalışmaya göre makro fungusların antiviral, antibakteriyel, antiprotozoal ve antifungal özellik gösteren çeşitli kimyasal bileşiklere sahip olduğu bilinmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışmada Kırşehir ili ve ilçelerinden toplanan Kuzu Göbeği mantarlarının 18S rRNA ve ITS gen bölgeleri çoğaltılarak moleküler olarak tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu mantarlarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri çeşitli mikroorganizmalar üzerinde agar kuyucuk yöntemi ile araştırılmıştır. Son olarak, etkili bulunan ekstraktların Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MIC, MİK) değerleri Broth Dilüsyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en etkili ekstraktın etanol ekstraktı olduğu ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC43288 üzerine oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda etanol ve metanol ekstraktlarının *Candida albicans* ATCC60193 üzerinde de etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, *M. esculenta* mantarının antibakteriyel ve antifungal potansiyeli bakımından dikkate değer olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler –Antimikrobiyal aktivite, kuzu göbeği, moleküler karakterizasyon, *Morchella esculenta* (L.) Pers

Molecular Characterization and Determination of Antimicrobial Activities of *Morchella esculenta* (L.) Pers (Morel) Collected From Kirsehir

Article History

Received: 10.10.2020

Accepted: 17.02.2021

Published: 20.03.2021

Research Article

Abstract –It has been known for a long time that natural edible mushrooms have been used traditionally as food and medicine in many countries of the world. *Morchella esculenta* (L.) Pers (morel) is extremely valuable in terms of medicinal use and nutritional value. According to many scientific studies performed to date, macro fungi are known to have various chemical compounds showing antiviral, antibacterial, antiprotozoal, and antifungal properties. In this study, morel mushrooms collected from Kirsehir province and its districts were molecularly identified using amplification of 18S rRNA and ITS gene regions. In addition, the antimicrobial effects of ethanol, methanol and aqueous extracts of these mushrooms were investigated by using the agar well method against various microorganisms. Finally, Minimal Inhibition Concentration (MIC) values of the effective extracts were determined using the Broth Dilution method. As a result of the studies, it has been determined that the most effective extract is ethanol extract and it is highly effective against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC43288. It has also been determined that ethanol and methanol extracts are effective against *Candida albicans* ATCC60193. According to the data obtained, it was determined that the ethanol and methanol extracts of *Morchella esculenta* mushrooms collected from Kirsehir province were effective against gram positive, gram negative and yeast. Consequently, *M. esculenta* mushroom appears to be notable for its antibacterial and antifungal potential.

Keywords –Antimicrobial activity, morel, molecular characterization, *Morchella esculenta* (L.) Pers

¹ esevim@ahievran.edu.tr

² ali.sevim@ahievran.edu.tr

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1. Giriş

Büyüme ve üreme fazı olarak iki evreye bölünmüş bir yaşam döngüsü olan funguslar ökaryotik ve spor oluşturan mikroorganizmalardır. Makrofunguslar görülebilecek kadar büyük veya yeraltında büyüeyebilen doğal bir meyve gövdesine sahip türlerdir. Bugüne kadar yaklaşık 14.000 kadar makrofungus türü bildirilmiş ve bunların arasından 2000'i yenilebilir olarak rapor edilmiştir. Yenilebilir mantarlar, özellikle β -glukanlar gibi çok zengin polisakkarit içeriği nedeniyle tıbbi özelliklere sahiptirler (Roman vd., 2020). Fungusların tıbbi kullanımını Asya ülkelerinde çok uzun bir geleneğe sahipken, Batı yarımkürede kullanımları sadece son yıllarda artış göstermiştir (Lindequist, Niedermeyer ve Jülich, 2005).

Ülkemizde birçok coğrafi bölgede gözlenebilen ve halk arasında "Kuzu göbeği" mantarı olarak bilinen *Morchella* türleri, tüm Dünya'da yenilebilir mantarlar arasında yer almaktadır (Acar ve Uzun, 2017). Kuzu göbeği mantarı Fungi aleminde, Ascomycota şubesinde, *Pezizomycotina* alt şubesinde, *Pezizomycetes* sınıfında, *Morchellaceae* familyasında ve *Morchella* (gerçek kuzu göbeği mantarı) cinsi içerisinde yer almaktadır (Taşkın ve Büyükalaca, 2012). *Morchella esculenta* (L.) Pers silindirik yapıdan oluşan ve üst kısmı toplam fungus ağırlığının %70-80'ine sahip olan bir pileus'as ahiptir. Bu pileus yaklaşık 3-9 cm uzunluğunda, 2-5 cm genişliğinde, yuvarlak veya düzensiz çukurlara sahip olup kahverengi, sarı, siyah veya soluk renkte olabilmektedir. Fungusun alt kısmı ise toplam fungus ağırlığının % 20-30'una sahip olan sap veya stipe olarak bilinen organdan oluşmaktadır. Stipe ise yaklaşık 1-4 cm uzunluğunda, 0,5 – 3,0 cm kalınlığında ve oyuk yapıdadır. Olgunlaşmanın ilk evrelerinde soluk gri beyazımsı olup olgunlukta ise rengi grimsi kahverengiye dönüşmektedir (Hamayun, Khan ve Begum, 2003).

M. esculenta'nın şapka yapısı, tokoferoller, karotenoidleri, organik asitleri ve fenolik bileşikler içeren çok çeşitli aktif bileşenlere sahiptir. Organik asitler oksalik asit, malik asit, sitrik asit, fumarik asit ve kinik asit içermekte olup protokatekuik asit, para-hidroksibenzoik asit ve para-kumarik asit fenolik bileşikler arasında yer almaktadır. Kuzu göbeğinin içerdiği bu bileşikler tıbbi açıdan oldukça önemlidirler (Ajmal, Akram, Ara, Akhund ve Nayyar, 2015). Birçok araştırmacı kuzu göbeği mantarında yer alan bu aktif bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antialerjenik, antiinflamatuvar, antitümör, bağışıklık uyarıcı ve nöroprotektif gibi muazzam özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (Duncan, Pugh, Pasco ve Ross, 2002; Meng vd., 2010; Baati, Horcajada, Gref, Couvreur ve Serre, 2011; Halliwell, 2011; Halliwell, 2012; Heleno vd., 2013).

Enfeksiyon hastalıkları, Dünya çapında insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olmuş ve olmaya devam etmektedir. Patojenlere karşı çok sayıda antimikrobiyal kullanılmasına rağmen, bu patojenlerde görülen antimikrobiyal direnç artan bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Shameem, Kamili, Ahmad, Masoodi ve Parray, 2017). Artan antimikrobiyal direnç sorunu araştırmacıları çoklu ilaç direncine sahip patojenlere karşı savaşmak ve çeşitli yeni antimikrobiyal maddeleri geliştirmek için alternatif kaynaklar bulmaya teşvik etmiştir (Roman vd., 2020).

Gerçekleştirilen bu çalışmanın amacı; Kırşehir ili ve ilçelerinden toplanan Kuzu göbeği (*Morchella esculenta* (L.) Pers) mantarının moleküler karakterizasyonu ve çeşitli mikroorganizmalara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi'dir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. *Morchella esculenta* Mantarlarının Toplanması

Çalışmada kullanılan kuzu göbeği mantarları 2019 yılı Nisan-Haziran ayları içerisinde Kırşehir ili ve ilçelerinden toplanmıştır. İlk olarak mantarın daha önceden bulunduğu belirtilen alanlar tespit edilmiştir. Daha sonra suyun bol olduğu dere kenarları ve baraj çevreleri gibi sulak alanlar tespit edilmiştir. Tespit edilen bu bölgelerde kuzu göbeği mantarı aranmış ve toplanmıştır. Tespit edilen kuzu göbeği

mantarlarının toprak üstü yapılarına zarar verilmeden bir bıçak yardımı ile topraktan çıkarılmış, kilitli buzdolabı poşeti içerisine konularak kısa zamanda laboratuvara getirilmiştir.

2.2. *Morchella esculenta* Mantarlarının Moleküler Tanımlanması

Kuzu göbeği mantarlarından total DNA izolasyonu Plant DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jel elektroforezinde $1\times$ TAE tamponunda yürütülmüş (90 V), UV ışığı altında görüntülenmiş ve sonraki çalışmalar için -20°C 'de saklanmıştır.

18S ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması için gereken primerler Tablo 1'de verilmiştir. PCR reaksiyonları 50 μl son hacimde olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımında son hacimde $1\times$ Taq DNA polimeraz tamponu, 1.5 mM MgCl_2 , 250 μM dNTPmix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 10 pmol/ μl ileri ve geri primerler, 2U Taq DNA polimeraz ve 100 ng (yaklaşık 1 μl) kalıp DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Son hacim ise steril dH_2O ile 50 μl 'ye tamamlanmıştır.

Tablo 1

Çalışmada kullanılan primerler

Bölge	Primerler	Diziler (5'-3')	T _m (°C)	Uzunluk (bp)	Kaynak
18S	NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	65	907	White, Bruns, Lee ve Taylor, 1990
	NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC			
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	53	620	
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			

PCR döngü parametreleri başlangıç denatürasyonundan sonra (95°C 'de, 3 dk) 35 döngü 95°C 'de 30 sn, 55°C 'de 30 sn ve 72°C 'de 1,5 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Son uzama ise 72°C 'de 5 dk olacak şekilde yapılmıştır. Döngü sonunda PCR ürünleri etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülmüş (90 V) ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Örnekler dizin analizi için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderilmiştir.

Elde edilen 18S ve ITS gen dizileri BioEdit programı ile düzenlenmiş ve NCBI GenBank'ta blastlanarak diğer 18S ve ITS dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlenmiştir (Hall, 1999; Sayers vd., 2020). Benzerlik oranları %97 ve üzerinde olan örnekler aynı tür kabul edilmiştir.

2.3. *Morchella esculenta* Ekstraktlarının Hazırlanışı

Tür tayinleri yapılan kuzu göbeği mantarları küçük parçalar şeklinde dilimlenerek, 40°C 'de gece boyu kurutulmuştur. Daha sonra kuruyan mantar parçaları homojenizatör yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen materyalden 10 gr tartılıp, 100 ml etanol, metanol ve su içeren erlenlere ayrı ayrı eklenmiş ve, manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Bu süre sonunda elde edilen ekstraktlar Whatman No 1 kâğıdı ile süzülüş ve evaporatör (Heidolph, Almanya) yardımı ile basınç altında konsantre edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi için 0,5 gr konsantre edilmiş ekstraktlardan tartılmış ve 10 ml %5 DMSO içerisinde çözülerek 50 mg/ml olacak şekilde test solüsyonları hazırlanmıştır.

2.4. *In-vitro* Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Çeşitli çözücüler ile elde edilen kuzu göbeği ekstraktlarının antimikrobiyal özelliği çeşitli bakteri ve mantar suşlarına karşı agar kuyucuk yöntemi ile test edilmiştir (Magaldi vd., 2004). Bakteri ve mantar suşları Refik Saydam Hıfzıssıhha Sağlık Merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılacak mikroorganizmalar

Escherichia coli ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43288, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 709 Roma, *B. subtilis* subs. *spizizenii* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 60193 ve *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251 olarak belirlenmiştir.

Bakteri suşlarının TSA (Tryptic Soy Agar) besiyerine çizgi ekimleri yapılmış ve gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üreyen tek kolonilerden steril serum fizyoloji (% 0,9 NaCl) içerisine Mc-Farland 0,5 bulanık değerine sahip olacak şekilde eklenmiş ve bu şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonlarının steril eküvyon çubuğu ile MHA (Müller Hinton Agar) besiyeri üzerine yayma ekimleri yapılmıştır. Ardından besiyerleri üzerine 4 mm çapında kuyucuklar steril cork-borer ile açılmıştır. Açılan kuyucukların içerisine 50 µl (2500 µg/ml her bir kuyucuk için) test solüsyonları eklenmiş ve petri kapları 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek antibakteriyal aktivite değerlendirilmiştir. Ampisilin (1 mg/ml) antibiyotiği pozitif kontrol olarak kullanılırken, %5 DMSO solüsyonu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm testler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Candida suşlarının büyütülmesi ve antifungal aktivitelerin belirlenmesi yukarıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiş olup besiyeri olarak PDA (Potato Dextrose Agar) ve YPD (Yeast Peptone Dextrose) besiyerleri kullanılmıştır. İnkübasyon koşulları ise 25 °C'de 48 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Fluconazole (1 mg/ml), negatif kontrol olarak %5 DMSO solüsyonu kullanılmıştır. Tüm testler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Agar kuyucuk yöntemi ile etkili bulunan ekstraktların minimal inhibisyon konsantrasyon (MİK) (MIC, Minimal Inhibition Concentration) değerleri Broth mikrodilüsyon metodu ile 96 kuyucuklu playtlerde gerçekleştirilmiştir. Kuzu göbeği etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının farklı konsantrasyonları bakteriler için MHB (Müller Hinton Broth) ve funguslar için YPD (Yeast Peptone Dextrose) sıvı besiyeri kullanılarak 2000 µg/ml-15.625 µg/ml (2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625) olacak şekilde hazırlanmıştır. Kuyucukların içerisine 0,5 Mc-Farland bulanıklığa sahip hücre süspansiyonlarından 20 µl ilave edilmiştir. Mikroplaytler bakteriler için 37°C'de 1 gece, funguslar için ise 25°C'de 2 gün inkübe edilerek ve MIC değerleri mikrobiyal üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. MIC deneylerinde ampisilin ve flucozanol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.5.GenBank Kayıt Numaraları

Çalışmada kullanılan *M. esculenta* EEA-1mantarının 18S rRNA ve ITS gen bölgelerine ait gen dizilerinin kayıt numaraları sırası ile MT453111 ve MT457418 olarak elde edilmiştir. Tüm gen dizileri NCBI GenBank veri tabanında depolanmıştır.

2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen agar kuyucuk ve MİK değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Test edilen bakteri türlerinin birbiri ile karşılaştırılmasında ise LSD çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Yine ekstraktların birbirleri ile karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve LSD çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Test edilen maya türlerinin birbiri ile karşılaştırılmasında ise (χ^2) testi kullanılmıştır. Anlamlılık derecesi $p < 0,05$ olarak alınmıştır. Varyans analizlerini gerçekleştirmeden önce bütün veriler Levene istatistiği kullanılarak varyans homojenliği açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen bütün veriler SPSS 16.0 istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Kuzu göbeği mantarları Kırşehir ili, Akçakent ilçesi ve ilçeye bağlı köylerden toplanmıştır. Akçakent ilçesi ilin en yağış alan ve sulak arazilerinin bulunduğu bir ilçedir. Yapılan çalışmalar sonucunda burada kuzu göbeği mantarının daha önceden bulunduğu tespit edilmiş ve bu bölgeden toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kuzu göbeği mantarı bal peteğini andıran şapkali görünüme sahip olması ile kolay bir şekilde ayırt edilmiştir (Şekil 1). Tespit edilen bölgelerden dikkatlice kazılarak çıkarılan mantarlar kilitli buzdolabı poşeti içerisine konularak laboratuvara getirilmiştir. Yaklaşık olarak 0,5 gr taze kuzu göbeği mantarı DNA izolasyonu için kullanılmış ve diğer örneklerde antimikrobiyal aktivite testleri için kullanılmıştır.



Şekil 1. Kırşehir ilinden toplanan Kuzu Göbeği mantarının görüntüsü

Genomik DNA'sı izole edilen kuzu göbeği mantarından, 18S rRNA ve ITS gen bölgeleri PCR yardımı ile çoğaltılmıştır. PCR işlemi sonunda 18S rRNA için 907 bp ve ITS bölgesi için ise 620 bp amplifikasyon ürünü agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Kuzu göbeği mantarının çoğaltılmış 18S rRNA ve ITS gen bölgeleri. Sıra 1: ITS gen bölgesi (620 bp), Sıra 2: DNA markır (Vivantis, 100 bp DNA ladder), Sıra 3: 18S rRNA gen bölgesi (907 bp).

PCR ürünleri dizin analizi için Macrogen firmasına gönderilmiş ve gelen sekans sonuçları Bioedit programı ile düzenlenmiştir. Dizin analizleri sonucunda sekanslar GenBank'ta var olan diğer gen sekansları ile karşılaştırılarak yüzde benzerlikler tespit edilmiştir (Tablo 2).

Yapılan 18S rRNA (%98 ve üzeri benzerlik) ve ITS gen dizin analizlerine (%99 ve üzeri benzerlik) göre toplanan mantarların *M. esculenta* olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2

Kuzu göbeği mantarının 18S rRNA ve ITS gen bölgelerinin GenBank Veri Bankasında bulunandığı genler ile yüzde (%) benzerlikleri

Gen bölgesi	Benzer bulunan tür	GenBank No	Örtüşme (%)	Benzerlik(%)
18S rRNA	<i>M. cf. esculenta</i> OSC 100041	AY544708	100	98,55
	<i>M. esculenta</i>	U42642	100	98,40
ITS	<i>M. esculenta</i> isolate VUL641	MH718237	100	99.26
	<i>M. esculenta</i> isolate HAI-C-787	JQ691478	100	99.26
	<i>M. esculenta</i> isolate HAI-C-917	JQ691476	100	99.07

Özellikle mantarları tanımlamayı amaçlayan moleküler çalışmaların çoğu ITS gen bölgesinin RFLP modellerini ve ITS gen dizilerinin karşılaştırılmasına dayandığı bilinen bir konudur. Kuzu göbeği ile ilgili birçok filogenetik çalışma da bu bölgeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diğer moleküler filogenetik çalışmalar ise 18S ve 28S (LSU) rRNA genlerinden alınan dizilere dayanmaktadır. ITS gen bölgeleri genomda çoklu kopyalar halinde bulunurlar ve mantar türleri arasında benzer ve değişken olma eğilimindedirler (Taşkın ve Büyükalaca, 2012). Bu çalışmada da kuzu göbeği mantarının moleküler tür tayinleri 18S rRNA ve ITS gen bölgelerine ait DNA dizileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu gen bölgelerinin dizin analizine göre toplanan mantarların yüksek doğrulukta tür tayinlerinin yapılması sağlamış ve bu da elde edilen verilerin kaynağına dair önemli bilgiler sunmuştur.

M. esculenta EEA-1 izolatının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerindeki antibakteriyal etkileri agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, kuzu göbeği mantarının sulu ekstraktlarının 8 bakterinin 4'ü üzerinde etkili olduğu (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*) ($p<0,05$, $df=7$, $F=55,32$) tespit edilmiştir. Test edilen sekiz bakteriye karşı etanol ekstraktlarının 7'si üzerine etkili olduğu (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*) ($p<0,05$, $df=7$, $F=24,15$) bulunmuştur. Metanol ekstraktlarının ise 5 bakteri üzerinde etkili olduğu (*P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *B. subtilis*) tespit edilmiştir ($p<0,05$, $df=7$, $F=93,52$). Yapılan istatistik analiz sonucunda etanolün en etkili ekstrakt olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$, $df=7$, $F=93,52$).

Bakteri suşları üzerinde etkili olduğu tespit edilen ekstraktların minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri broth mikrodilüsyon tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Kuzu göbeği mantarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının MİK değerlerinin 125-750 µg/ml arasında olduğu bulunmuştur. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre; en etkili ekstraktların etanol ve metanol ekstraktları olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$, $df=2$, $F=17,08$). Etanol ekstraktının en düşük 125 µg/ml konsantrasyonda *P. aeruginosa* suşu üzerine metanol ekstraktının ise en düşük 250 µg/ml konsantrasyonda *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* suşları üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3).

M. esculenta EEA-1 mantarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının *C. albicans* ve *S. cerevisiae* üzerindeki antifungal etkileri agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, kuzu göbeği mantarının etanol ve metanol ekstraktlarının sadece *C. albicans* üzerinde antifungal etkisinin olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Maya suşları üzerinde etkili olduğu tespit edilen etanol ve metanol ekstraktlarının minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri ise broth mikrodilüsyon tekniği yardımıyla 250-500 µg/ml arasında değişen değerlerde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 3

M. esculenta EEA-1 ekstraktlarının antibakteriyel etkisi

Bakteriler	İnhibisyon zonu (mm)				Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (µg/ml)			
	Sulu	Etanol	Metanol	Ampisilin	Sulu	Etanol	Metanol	Ampisilin
Gram negatif bakteriler								
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	11,66±1,54	-	20,66±0,57	-	250±0	-	26,04±9,02
<i>P. aeruginosa</i> ATCC43288	-	11±1	9,66±1,52	20±1	-	125±0	250±0	31,25±0
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC911	-	-	-	21,66±2,08	-	-	-	-
Gram pozitif bakteriler								
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	6,66±0,57	-	18,66±1,52	-	750±0	-	21,16±8,74
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6,66±1,52	10±1	11,33±0,57	18,66±0,57	750±0	250±0	250±0	26,04±9,02
<i>B. cereus</i> 709 Roma	7±1	10,33±1,52	9±1	15,33±0,57	750±0	250±0	750±0	41,66±18,04
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	7±1	10,33±2,51	9,66±1,52	19±1,73	750±0	250±0	250±0	41,66±18,04
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 43251	6,33±1,15	8,66±0,57	8,66±0,57	20±1	750±0	500±0	750±0	26,04±9,02

Tablo 4

M. esculenta EEA-1 ekstraktlarının antifungal etkisi

Funguslar	İnhibisyon zonu (mm)				Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (µg/ml)			
	Sulu	Etanol	Metanol	Flucozanole	Sulu	Etanol	Metanol	Flucozanole
<i>C. albicans</i> ATCC60193	-	14,33±0,57	10,66±0,57	18,33±1,52	-	250±0	500±0	23,43±11,05
<i>S. cerevisiae</i> RSKK 251	-	-	-	-	-	-	-	-

Mantarların doğal ortamlarında hayatta kalabilmeleri ve ekolojik rekabet açısından antibakteriyel ve antifungal bileşikler üretirler. Bu nedenle, az ya da çok güçlü aktiviteye sahip antimikrobiyal bileşiklerin birçok mantardan izole edilebilmesi ve bunların insanlara faydalı olabileceği hiç de şaşırtıcı değildir (Lindequist vd., 2005). Fungal organizmaların sahip oldukları bazı sekonder metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinen bir özelliktir. Farmakolojik açıdan aktif makrofungus bileşiklerinin büyük bir kısmı genellikle polisakkaritler ya da peptidoglikanlardan oluşmaktadır. Bu tür bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* ortamda izolasyonları ve kimyasal yapılarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. 182 cinse dahil 651 hetero- ve homobasidiomycetes sınıfına ait makrofungus türünde antitumoral ya da bağışıklık sistemini güçlendirici farklı polisakkaritler bulunduğu belirtilmektedir. Daha önceki çalışmalarda *Lentinus* (*Lentinula*) *edodes*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa* ve *Sclerotinia sclerotiorum* makrofunguslarında özellikle β -glukanlar, lentinan, schizophyllan (sonifilan ya da sizofiran) ve grifola'nın varlığı tespit edilmiştir (Kalyoncu, Oskay ve Kalmış, 2010). Bu çalışmada ise *M. esculenta* olarak moleküler tanımlaması yapılan kuzu göbeği mantarının antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bu anlamda bazı ekstraktların hem antibakteriyel hem de antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile kuzu göbeğinden elde edilecek ve tanımlamaları yapılacak etken maddelerin antibiyotik ve antifungal ilaçlara alternatif bir tedavi olarak kullanılabilirliğine dair ön çalışma niteliğinde önemli bilgiler elde edilmiştir.

Makrofungusların sahip olabilecekleri antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için değişik çözücülerde hazırlanan ekstraktlar birçok çalışmada kullanılmıştır. Değişik çözücülerde hazırlanan ekstraktların çeşitli mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları antagonistik etki düzeyleri ile makrofungusların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmektedir. Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında çok çeşitli test yöntemlerinin ve test mikroorganizmalarının kullanılmakta olduğu bilinmektedir (Bekçi, Altınsoy, Sarıkaya, Onbaşılı ve Yuvalı Çelik, 2011). Çalışmamızda da *M. esculenta* EEA-1 mantarının etanol, metanol ve sulu ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri ilk olarak agar kuyucuk yöntemi ve daha sonra broth dilüsyon tekniği ile en etkili ekstraktların MİK değerleri belirlenmiştir. *M. esculenta*'dan elde edilen sekonder metabolitlerin gösterdiği antimikrobiyal özellikler ile ilgili literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır. Venturini, Rivera, Gonzales ve Blanco (2008) yaptıkları çalışmada *M. esculata*'ya ait metanol, hekzan, etil asetat ve sulu ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Yersinia enterocolitica* olmak üzere 5 bakteri üzerinde agar kuyucuk yöntemi ile belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmada sadece *M. esculata*'nın sulu ekstraktının *Y. enterocolitica*'ya karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da *E. coli* ve *Y. pseudotuberculosis* bakterileri kullanılmıştır. Fakat *M. esculata* EEA-1'in hiçbir ekstraktı *Yersinia*'ya karşı aktivite göstermemiştir. Sadece metanol ekstraktının *E. coli* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu iki çalışma arasındaki sonuçların farklı olmasının nedeninin kullanılan bakteri suşlarının ve fungus örneklerinin toplanma lokasyonlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Heleno vd. (2013) yaptıkları çalışmada Sırbistan ve Portekiz'den toplanan *M. esculenta* mantarlarının kimyasal içeriğini, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Mantarların metanol ekstraktlarının gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 35210, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Enterobacter cloacae* (insandan izole edilen)) ve gram pozitif (*Listeria monocytogenes* NCTC 7973, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite disk difüzyon ve mikrodilüsyon deneyleri ile test edilmiştir. Yapılan mikrodilüsyon testleri sonucunda Portekiz ve Sırbistan'dan toplanan mantarların metanol ekstraktlarının sırasıyla 600 $\mu\text{g/ml}$ ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda *L. monocytogenes* NCTC 7973 bakterisine karşı, 300 $\mu\text{g/ml}$ ve 20 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda *S. aureus* ATCC 6538 bakterisine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise kuzu göbeği mantarlarından elde edilen 3 ekstraktında (sulu, etanol, metanol) *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterileri üzerine etkili olduğu belirlenmiş. Çalışmamızdaki metanol ekstraktının MİK değeri *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerine karşı sırasıyla 750 $\mu\text{g/ml}$ ve 250 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Çalışmamız ile

karşılaştırıldığında Portekiz'den toplanan ve metanol ekstraktı gerçekleştirilen kuzu göbeği mantarının antimikrobiyal sonuçları bizim çalışmamızdaki veriler ile benzerlik göstermektedir.

[Shameem vd. \(2017\)](#), Küzey Batı Himalaya bölgesinde yenilebilir mantarların antimikrobiyal aktivitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, *M. esculenta*'ya ait etil asetat ve bütanol ekstraktlarının disk diffüzyon metodu ile çeşitli patojenlere karşı etkinliklerini test etmişler ve etkili olan ekstraktların MİK ve MBC (minimal bakterisidal konsantrasyonu) değerlerini belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda *M. esculenta*'nın bütanol ekstraktlarının test edilen *P. aeruginosa* CD0012 karşı 750 µg/ml, *E.coli* CD002 karşı 250 µg/ml ve *S.aureus* CD003'e karşı 250 µg/ml konsantrasyonda etkili MİK değerlerine sahip olduğu tespit edilmiş. Etil asetat ekstraktının ise 750 µg/ml konsantrasyondaki MİK değerinde *E. coli* CD002'ye karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada etil asetat ve bütanol ekstraktlarının olmamasına karşı etanol ekstraktlarının *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı gösterdikleri MİK değerleri [Shamemm vd. \(2017\)](#)'nin bütanol ekstraktları ile aynıdır (250 µg/ml). Bu sonuç bize antimikrobiyal etkisi olan kimyasal bileşiğin aynı olabileceğini ve hatta bütanol, etanol ve metanol içerisinde ekstrakte edilebileceğini düşündürmüştür. [Shanem vd. \(2017\)](#)'nin çalışmasında antifungal aktivite için birkaç fungus kullanılmış ve bütanol ekstraktının *C. albicans* MRD3212'e 18 mm zon çapı ile etkili olduğu gösterilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise kuzu göbeği mantarının etanol ve metanol ekstraktlarının agar kuyucuk metodu ile 14,33 mm ve 10,66 mm zon çapında *C. albicans*'a karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde *M. esculenta*'nın antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar çok olmamakla birlikte birkaç çalışma mevcuttur. [Kalyoncu vd. \(2010\)](#) yaptıkları bir çalışmada Akdeniz bölgesinden 21 değişik yabani mantar örneği toplamışlar ve misellerin etanol ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. *M. esculenta* var. *vulgaris*'inde aralarında bulunduğu bu yabani fungusların etanol ekstraktlarının toplamda 11 Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk metodu ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *M. esculata* var. *vulgaris*'in agar kuyucuk metodu ile oluşturduğu antimikrobiyal zon çapının *S. aureus* ATCC 6538P ve *C. albicans* ATCC 10231'de sırasıyla 8 ve 10 mm olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise Kırşehir ilinden toplanan *M. esculanta* EEA-1 mantarının etanol ekstraktlarının *S. aureus* ve *C.abicans*'a karşı sırasıyla 10,66 ve 14,33 mm çapında aktivite zonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar [Kalyoncu vd. \(2010\)](#)'nin yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir. Fakat bizim çalışmamızda kuzu göbeği mantarının etanol ekstraktlarının *E. coli*, *E. fecalis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı tür bakteri suşları [Kalyoncu vd. \(2010\)](#)'nin yaptığı çalışmada da kullanılmasına karşın herhangi bir etki zonu gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar bize etkili olan kimyasal bileşiğin farklı coğrafi bölgeden toplanan kuzu göbeği mantarlarında farklı olabileceğini düşündürmüştür.

[Acay \(2018\)](#) yaptığı bir çalışmada Mardin'den topladığı *M. esculenta* örneklerinin çeşitli kimyasal özelliklerini, bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon metodu ile incelemiştir. Etanol, metanol ve hekzan ekstraktlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı aktivite gösterdiğini tespit etmiştir. Çalışmada kuzu göbeği metanol ekstraktlarının oluşturduğu zon çapları *P. aeruginosa* ATCC 27853'de 5 mm, *S. aureus* ATCC 25923'de 8 mm ve *C. albicans* ATCC 10231'de 9 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan ekstraktların *E. coli* ATCC 25922 ve *B. subtilis* ATCC 11774 bakterilerine karşı etkinliklerinin olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise EEA-1 izolatının metanol ekstraktlarının *P. aeruginosa*'da 9,66 mm, *S. aureus*'da 11,33 mm, *C. albicans*'da 10,66 mm ve *B. subtilis*'de 9,66 mm inhibisyon zon çapında aktivite gösterdiği ve *E. coli* bakterisine karşı aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda iki çalışmadan elde edilen verilerin birbiri ile benzer oldukları görülmektedir.

[Canlı, Benek, Şenturan, Akata ve Altuner, \(2019\)](#) yaptıkları çalışmada Bolu, Abant bölgesinden *M. esculenta* ve *Trametes versicolor* mantar örneklerini toplamışlardır. Örneklerinin etanol ekstraktlarının Gram pozitif, Gram negatif bakterilere ve mantarlara karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivite incelenmiştir. *M.*

esculenta'nın etanol ekstraktlarının test edilen *B. subtilis* DSMZ 1971'de 7 mm, *C. albicans* DSMZ 1386'da 8 mm, *E. coli* ATCC 25922'de 7 mm, *L. monocytogens* ATCC 7644'de 7 mm, *P. aeruginosa* DSMZ 5071'de 7mm, *S. aureus* ATCC 25923'de 7 mm zon çapı oluşturduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bizim çalışmamız ile büyük oranda benzerlik göstermektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde *M. esculenta* ekstraktlarının farklı veya aynı grup mikroorganizmalar üzerinde farklı aktiviteler gösterdiği görülmektedir. Çalışmamız ile literatürde yer alan bu çalışmalar arasındaki bazı farklılıkların fungus örneklerinin toplanma lokasyonlarının ve kullanılan suşların farklı olmasından dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Fungusların gelişmesinde ve metabolizmalarında buldukları çevrenin çok büyük etkisi bulunmaktadır. Sentezlenecek olan biyoaktif moleküller ve sekonder metabolitler su, hava, sıcaklık ve toprağın besin miktarı gibi birçok çevresel faktörden etkilenmektedir. Aynı zamanda organizma yaşadığı ortamda varlığını sürdürebilmek ve çevresindeki rekabetçi türlere üstünlük sağlayabilmek için sentezlediği bu kimyasallara ihtiyaç duymaktadır. Bu kimyasalların etki düzeyleri miktara ve türe göre zayıf veya kuvvetli olabilmektedir (Kalyoncu vd., 2010). Bu biyotik ve abiyotik faktörlerin de çalışmalar arasındaki farklılığı açıklayabileceği düşünülmektedir.

4. Sonuç

Günümüzde yaklaşık 14.000 makrofungus tanımlanmış ve bunların yaklaşık %15'nin yenilebilir özellikte olduğu bilinmektedir. Yenilebilir makrofunguslar yüksek tıbbi özelliklere sahiptirler (Roman vd., 2020). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin pek çoğu mikrofunguslardan ve aktinomisetlerden izole edilerek hazırlanmaktadır (Kalyoncu vd., 2010). Makrofungusların antimikrobiyal etkileri funguslar tarafından sentezlenen ve bazı fenolik bileşikler, kinonlar, terpenoidler, pürinler, primidinler ve fenil propanoid türevleri gibi çoğunlukla fungusa özgü olan antagonistik maddelerden kaynaklanmaktadır (Roman vd., 2020). Ülkemizde makrofungusların tespitine ve tür tayinlerine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek bir antimikrobiyal rezerve sahip olan bu fungusların farmakolojik, endüstriyel ve tıbbi özelliklerinin de ortaya çıkarılması kaçınılmaz bir konudur. Günümüzde bakteri ve mantarların sürekli olarak geliştirdikleri antimikrobiyal direnç halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Makrofungusların sahip oldukları bu rezervler göz önüne alındığında, bunlardan yeni antibiyotiklerin araştırılması ve keşfinin önemi de açıkça ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda kullanılan *M. esculenta* makrofungusunda birçok bakteri ve *Candida* fungusuna karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak kuzu göbeği mantarının mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlardan korunmak için alternatif bir tıp yöntemi olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF.A4.19.007 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yazar Katkıları

Tüm yazarlar eşit katkıda bulunmuştur.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

Acar, İ. ve Uzun, Y. (2017). An Interesting Half-Free Morel Record for Turkish Mycobiota (*Morchella populiphila* M. Kuo, M.C. Carter & J.D. Moore). *The Journal of Fungus*, 8(2), 125-8. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/357091>

- Acay, H. (2018). Yenilebilen Yabani Mantar *Morchella esculenta* (L.) Pers.'nın Besinsel Kalitesi ve Biyoaktif Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *The Journal of Fungus*, 9(2), 95-105. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/560149>
- Ajmal, M., Akram, A., Ara, A., Akhund, S. ve Nayyar, B. G. (2015). *Morchella esculenta*: An edible and health beneficial mushroom. *Pakistan Journal of Food Science*, 25(2), 71-8.
- Baati, T., Horcajada, P., Gref, R., Couvreur, P. Ve Serre, C. (2011). Quantification of fumaric acid in liver, spleen and urine by high-performance liquid chromatography coupled to photodiode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(4), 758-762. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.011>
- Bekçi, H., Altınsoy, B., Sarıkaya, S., Onbaşılı, D. ve Yuvalı Çelik, G. (2011). Kastamonu Yöresinden Toplanan Bazı Makrofungusların Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(2), 187-190. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/159627>
- Canlı, K., Benek, A., Şenturan, M., Akata, I. ve Altuner, E. M. (2019). *In vitro* Antimicrobial Activity of *Morchella esculenta* and *Trametes versicolor*. *The Journal of Fungus*, Aralık10(Özel Sayı), 28-33. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/900186>
- Duncan, C., Pugh, N., Pasco, D. S. ve Ross, S.A. (2002). Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5683-5. <https://doi.org/10.1021/jf020267c>
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-8. Erişim adresi: <https://www.academia.edu/2034992>
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Hamayun, M., Khan, M. A. ve Begum, S. (2003). Marketing of medicinal plants of Utror-Gabral Valleys, Swat, Pakistan. *Journal of Ethnobotanical Leaflets*, 2003(1), 13-22. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/38285163>
- Heleno, S.A., Stojkovic, D., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P. Ve Ferreira, I. C. F. R. (2013). A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. from Portugal and Serbia. *Food Research International*, 51(1), 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.020>
- Kalyoncu, F., Oskay, M. ve Kalmış, E. (2010). Bazı Yabani Makrofungus Misellerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *The Journal of Fungus*, 1(1), 1-8. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/181923>
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J. ve Jülich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
- Magaldi, S., Essayag, S. M., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. ve Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>

- Meng, F., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Liu, X., Deng, P., Fan, K., Wang, G., Wang, L. ve Zhang, J. (2010). Extraction optimization and in vivo antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01. *Bioresource Technology*, 101(12), 4564-9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.113>
- Roman, M. P. G., Mantilla, N. B., Florez, S. A. C., De Mandal, S., Passari, A. K., Ruiz-Villafan, B. ve Sanchez, S. (2020). Antimicrobial and Antioxidant Potential of Wild Edible Mushrooms. In *An Introduction to Mushroom*. IntechOpen; pp:1-18. Erişim adresi: <https://www.intechopen.com/books/an-introduction-to-mushroom/antimicrobial-and-antioxidant-potential-of-wild-edible-mushrooms>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D. ve Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48, D84–D86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz956>
- Shameem, N., Kamili, N. A., Ahmad, M., Masoodi, F.A. ve Parray, J.A. (2017). Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North western Himalaya. *Microbial Pathogenesis*, 105, 356-360. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.005>
- Taşkın, H. ve Büyükalaca, S. (2012). Kuzu Göbeği (*Morchella*) Mantarı. *Bahçe*, 41(1), 25-36. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/39699>
- Venturini, M. E., Rivera, C. Z., Gonzales, C. ve Blanco, D. (2008). Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1701-6. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1701>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. ve Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., San Diego. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/262687766>