

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ
AĞIR METALLERİN
Penicillium expansum'un ÜZERİNE ETKİLERİ

Ahmet Sidar YAVUZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metaller ve Özellikleri	10
1.1.1. Kadmiyum	10
1.1.2. Nikel	13
1.1.3. Kurşun	14
1.1.4. Bakır	15
1.1.5. Mangan	15
1.1.6. Çinko	16
1.1.7. Krom	16
1.1.8. Kobalt	18
1.1.9. Demir	18
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Toplam spor sayısı	24
3.2.2. Misel ağırlığı	24
3.2.3. Fungusun pH değerinin ölçülmesi	25
3.2.4. Funguslarda elektriksel iletkenlik (EC) değerlerinin belirlenmesi	26
3.2.5. Fungal etmenin gelişim gösterdiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi	27
3.2.6. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi	28
3.2.7. Melanin Analizi	29
3.2.8. İstatistiksel Analiz	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	31
4.1. Fiziksel Parametreler	31
4.1.1. Fungusun miselyal ağırlığı ve toplam spor sayısı	31
4.1.2. Fungusun EC ve pH değerleri	32
4.2. Biyokimyasal Parametreler	36
4.2.1. Fungusun geliştiği ortamın protein içeriği ve protez aktivitesinin belirlenmesi	36
4.2.2. Fungal etmenin melanin değerleri	37
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	47

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ AĞIR METALLERİN *Penicillium expansum*'un ÜZERİNE ETKİLERİ

Ahmet Sidar YAVUZ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ
YIL: 2022, Sayfa: 47

Penicillium expansum hasat sonrası kayıplara yol açan en önemli patojenlerden biridir. Bu etmen meyve kabuğunun yaralanması sonucu oluşan yara ile ürün içine girmektedir. Bu hastalığa karşı kimyasal mücadele çevre kirliliğine neden olmakta, bu kimyasalların ilk sırasında ağır metaller gelmektedir. Fungal etmenlerin çevre kirliliği ile birlikte ağır metallerle toleransı da artmakta, çevre kirliliğinin yanında patolojik olarak bu ortamlarda gelişmesi de tarımsal ürünleri ayrıca tehdit etmektedir. Bu çalışmada, *P. expansum*'un *in vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlardaki ağır metaller (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) 0-500 ppm arası dozlarda verilmiş, fungal etmenin tepkisi ve patojenitesi üzerine etkileri yanında fungusun tolerans seviyesi, fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik tepkileri araştırılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre fungusun misel ağırlığı ve sporulasyonu artan toksik metal dozları ile azalış gösterirken biyokimyasal olarak proteaz enzim seviyesi düşüş göstermiş, melanin içeriği 150 ppm konsantrasyonuna kadar artış göstermiş daha sonra minimal düzeyde gerçekleşmiştir. Ancak fungal etmenin biyokimyasal parametreleri artan doza karşı lineer bir azalış göstermemiş, bu durum fungal etmenin ağır metallerle karşı tolerans gösterebileceği kanaatini oluşturmuştur.

ANAHTAR KELİMELER: *Penicillium expansum*, nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF HEAVY METALS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS ON *Penicillium expansum*

Ahmet Sidar YAVUZ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Murat DİKİLİTAŞ
Year: 2022, Page: 47

Penicillium expansum is one of the most important pathogens causing post harvest damage. This agent enters the host from the wound formed as a result of the injury in the fruit peel. Chemical control against this disease causes environmental pollution, and heavy metals come first among the substances that cause environmental pollution. The tolerance level of the fungal agents to heavy metals increases with environmental pollution, and pathological development in these conditions also threatens agricultural products. In this study, *P. expansum* was exposed to heavy metals (nickel sulfate, lead sulfate, lead nitrate, cadmium nitrate) at different concentrations *in vitro* at doses between 0-500 ppm, and its effects on the response and pathogenicity of the fungus, as well as the tolerance level of the fungus, physiological, biochemical and morphological responses, were investigated. According to the results of the analysis, the mycelial weight and sporulation of the fungus decreased with increasing toxic metal doses, while the biochemical protease enzyme level decreased, the melanin content increased up to 150 ppm concentration, and then the responses continued at minimal levels. However, the biochemical parameters of the fungal agent did not show a linear decrease against the increasing dose and this situation led to the conclusion that the fungal agent could tolerate heavy metals.

KEYWORDS: *Penicillium expansum*, nickel sulfate, lead sulfate, lead nitrate, cadmium nitrate

TEŞEKKÜR

Tezimin alıŐma konusunun belirlenmesinden, yşrştşlşp sonuçlandırılmasına kadar olan her aşamasında bana çalışma imkânı sağlayan ayrıca tezimdaki her aşamada engin tecrşbe ve bilgileri ile yol gşsteren, sahip olduğu deneyimler iŐıėında yşrşyşp geliŐmeme katkı sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'a en içten saygılarımı sunar ve teŐekkřrř borç bilirim.

Tez çalıŐmamın yşrştşlmesinde elzem olan laboratuvar çalıŐmalarının her aşamasında yardım, bilgi ve gřrřŐleri ile destek olan Dr. Őėr. Őyesi Sema KARAKAŞ DİKİLİTAŞ'a, yşksek lisans eğitimim sşrecinde her tşrlş tecrşbe, bilgi ve deneyimleri ile her konuda yardımımı esirgemeyen değerli hocam sayın Ziraat Yşksek Mşhendisi Behzat BARAN'a, doktora Őėrencisi Beritan ÇAPA, yşksek lisans Őėrencileri Sıdka DURMUŐ ve AyŐe Hşmeyra KOçAKOğLU'na ayrıca her daim hoŐėrř ve destekleriyle varlıklarını hissettiren her an destek olup beni yalnız bıraktımayan bugşnlerimi borçlu olduğum değerli aileme teŐekkřrřlerimi sunarım.



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. <i>Penicillium expansum</i> 'un mikroskop görüntüsü	5
Şekil 3.1. <i>Penicillium expansum</i> fungal etmenin PDA ortamı içerisinde gelişmesi.....	22
Şekil 3.2. PDB ortamı içerisine fungal etmenin ilave edilmesi	23
Şekil 3.3. PDB ortamına gelişmesi için bırakılan fungal etmen	23
Şekil 3.4. Fungusun misel ağırlığının belirlenmesi aşamaları (a) Sıvı kültürlerden elde edilen misellerin süzdürülmesi (b) Fungusun misel ağırlığının hesaplanması	25
Şekil 3.5. PDB ortamında pH ölçümlerinin yapılması	26
Şekil 3.6. PDB ortamında EC ölçümü.....	26
Şekil 3.7. Protein içeriğinin ölçülmesi için supernatantlara Coomassie Brilliant Blue eklenmesi	28
Şekil 3.8. Proteaz aktivitesi analizine hazırlık aşamaları (a) Proteaz ölçümünün yapılabilmesi için supernatantlar içerisine TCA (Trichloro asetik asit) eklenmesi (b) Supernatantlar içerisine azocasein eklenmiş son hali	29
Şekil 3.9. Supernatantların spektrofotometrede okutulması.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. <i>Penicillium expansum</i> fungusunun sınıflandırılması	5
Çizelge 3.1. Patates dekstroz Broth (PDB)	24
Çizelge 4.1. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişen <i>P.</i> 34	
Çizelge 4.2. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişme gösteren <i>P. expansum</i> 'un fizyolojik parametreleri	35
Çizelge 4.3. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişme gösteren <i>P. expansum</i> 'un geliştiği ortamın protein içeriği (fungusun ortama bıraktığı protein içeriği) ve proteaz seviyeleri	38



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Sıcaklık (Santigrad derece)
EC	Elektriksel İletkenlik
g	Gram
M	Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDB	Patates Dekstroz Broth
pH	Power of Hydrogen
sp.	Tür
spp.	Türler
TBA	Trichloro tiobarbiturik acid
TCA	Trichloro acetic acid
Tris-HCl	Hidroksimetil-Hidroklorik asit
%	Yüzde oranı

1. GİRİŞ

Bu çalışmada, *Penicillium expansum*'un *in vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlardaki ağır metaller (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) 0-500 ppm arası dozlarda verilmiş, fungal etmenin tepkisi ve patojenisitesi üzerine etkileri yanında fungusun tolerans seviyesi, fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik tepkileri araştırılmıştır. Bununla birlikte günümüzde yaygınlaşan organik tarım uygulamalarında alışlagelmiş pestisit kullanımlarının uygulanmadığı durumlarda patojenlerin oluşturabileceği sorunlar ele alınmıştır. Tez çalışmasında üzerinde durulan ağır metaller (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) *in vitro* koşullarda incelenmiş olup, bu ağır metaller ile ilgili bilgiler çalışmada olabildiğince ele alınmaya çalışılmıştır. Uygun *in vitro* koşullarda ağır metallerin uygulandığı fungusun sporulasyon gelişimi, misel oluşumu, biyokimyasal ve fizyolojik yapılarını belirlemek için farklı dozlarda fungusun gelişebileceği ortamlar oluşturulup, fungusun biyokimyasal ve fizyolojik karakteristik yapısının günyüzüne çıkması planlanmıştır.

“Mikroorganizmalar gıdaların doğal florasında olabileceği gibi tarımsal üretimden tüketim aşamasına kadar geçen süreçte çevresel bulaşmalardan da kaynaklanabilir. Gıdalarda bulunan bu mikroorganizmalar etkilerine göre yararlı, saprofit, etkisiz ve patojen olarak 4 grupta adlandırılır” (Ayhan, 2000). Meyve ve sebzelerin hasat sonrası depo süresini azaltan önemli nedenlerin başında fungal etmenler gelmektedir. Hasattan sonra ortaya çıkan hastalık ve çürümelerin nedenleri arasında biyotik ve abiyotik faktörler önemli rol almaktadır. Biyotik faktörlerin büyük kısmını fungus ve bakteriler oluşturmaktadır. Bunun yanında abiyotik faktörler; hasat sonrası ürünün bozulmasına neden olan metabolitlerin eksikliği ya da fazlalığı, ortamın nem ve sıcaklık değerleri, kimyasal ve fiziksel yaralanmalardır.

Fungal etmenlerin üremesini etkileyen faktörlerin başında pH, kuraklık, sıcaklık, ağır metal, hava kirliliği, düşük oksijen gelmektedir. Funguslar geniş pH ve sıcaklık aralığına sahip olmakla birlikte, bitkilerin vejetatif gelişimini tamamlamakta

zorlandığı kurak koşullarda sporulasyon yapabilmektedirler. Saprofit funguslarda bu oran daha geniş bir aralığa sahiptir (Temur, 2012).

Genel olarak dünya üzerinde besin maddelerinde oluşan hastalıkların sebebi patojen olarak faaliyet gösteren funguslardan kaynaklanmaktadır. FAO'ya göre üretilen ürünlerin %50'si hasat sonrasında kaybolmaktadır. Hasat sonrası ortaya çıkan hastalıklar depolama süresi ve meyvenin pazar değerini de etkilemektedir. Domates, elma ve turunçgillerde *Penicillium expansum*, *P. italicum*, *P. digitatum* ve *Alternaria alternata* gibi bazı fungus türleri olumsuz etkilere yol açmaktadırlar. *Penicillium expansum*'un ürettiği enzimler sebze ve meyvelerde önemli kayıplara yol açmaktadır (Dukare ve ark., 2019; Wang, 2021).

Rhizopus, *aspergillus* ve *Penicillium* spp. meyve ve sebzelerin hasattan sonra hızlı bir şekilde bozulmalarına yol açıp kalite ve kantitelerinin azalmasına aynı zamanda raf ömrünü kaybetmesine neden olmaktadır (Vidal ve ark., 2019).

Penicillium, su, toprak, hava, bitki ve hemen hemen tüm ortamlardan izole edilmesi kolay, havadan yayılması daha kolay olup, bilinen saprofitik fungusların ilk sırasında bulunmaktadır (Visagie ve ark., 2014).

Gerekli şartlar sağlandığında oluşan uygun ortamlarda ortalama 2.5 cm genişliğinde *Penicillium* kolonileri bir günde 400 milyon adet spor hücresi üretebilmektedir (Tikveşli, 2013).

P. expansum çok geniş konukçu ağına sahip olup, depolanan ürünler açısından yüksek oranlarda kayıplara sebebiyet veren önemli bir küf hastalığı etmenidir. Saprofit *Penicillium* türleri yaralanan dokular üzerinden meyve içerisine giriş yaparak depolanan ürünlerde çürümelere sebebiyet vermektedir. Bu patojenlerin öncüleri; *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Botrytis* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp.ve *Geotrichum* spp.'dur. Bu funguslar ile enfekteli olan ürünleri hastalandırmalarının dışında bazen de sağlam ürünler üzerinde hastalığa sebep olabilmektedirler (Köhn ve ark., 2018; Naets ve ark., 2018).

Mikolog botanikçi olan John H.F. Link 1809 yılında ilk defa *Penicillium* türünden bahsetmiştir. Link yaptığı çalışmada *Penicillium* cinsine ait 3 ayrı türden bilgi vermiştir. Bu türler; *Penicillium expansum* (Link), *Penicillium candidum* (Link) ve *Penicillium glaucum* (Link)'dur. Bahsi geçen türlerin ortak özellikleri ise fırça tipinde olup konidiofor üretmeleridir. 1809 yılında Link aracılığı ile gün yüzüne çıkan *Penicillium* türü, bilim insanlarının merak konusu haline gelmiş ve bu tür ile alakalı çeşitli araştırmalar yapmışlardır. Morfolojik karakteristik ve konidiofor kollarındaki yapılar göre *Penicillium* türündeki fungusların sınıflandırmaları yapılmıştır. Konidioforlar, yoğun fırça gibi konidiofor taşıyan yapılardır. Konidioforlar tek yapıya sahip ya da birçok kola ayrılan yapıda da olabilirler, ayrıca şişe şeklinde fiyalid demetleri ile çevrelenirler. Fiyalidlerin uç bölgelerinde ve zincirde genç yapıya sahip köklerde genellikle yeşil renkli olarak konidiler üretilir (Link, 1809).

Hasat edilen ürünlerde önemli ölçüde kalite ve ürünlerin dayanma gücünü olumsuz yönde etkileyen unsurların en önemlisi funguslardır. Hasadı yapılan ürünler bünyesindeki besinler ve su miktarından dolayı fungusların hedefi haline gelmektedirler. Hastalıklı ürünlerde etilen hormonu sayesinde ürünlerdeki ısı ve solunum faaliyetlerinden dolayı daha hızlı bir şekilde olgunlaşırlar. Hastalıklı ürünlerde etkili olan funguslar sağlam ürünlere de olumsuz etki yapabilmektedirler (Wang ve ark., 2021).

Hasat edilmiş ürünlerde koruyucu etki oluşturan biyolojik, fiziksel ve kimyasal yöntemler, hastalık oluşturan etmenlerin gelişiminde yavaşlama olması için önemli derecede engelleyici özellikte olup, ürünlerin kalitelerinin artırılması amacıyla da bu yöntemlere başvurulmaktadır. Organik ürünlerin yetiştirilme aşamasında pestisit kullanımının önüne geçebilmek için bazı fiziksel yöntemler (hasadı yapılan ürünlere sıcak su uygulaması yapılması, bitki ekstraktlarının kullanılması ya da tuz bileşiklerinin uygulanması) ön plandadır. Fakat, kullanılan bu metodlar tam olarak patojenlerin gelişmesini durduramayıp bazen de düşük dozajlarda kullanıldığında patojenlerin gelişmesi yönünde etki etmektedir. Örnek olarak, vitamin ya da çözünebilir katı madde oranı yüksek olan meyveler, kalite yönünden öneme sahipken

hastalık etmenleri için de önemli enfeksiyon kaynağı durumunda bulunabilirler. Domates yetiştiriciliğinin revaçta olduğu son yıllarda yüksek EC içeriğine sahip olan ürünlerde bünyesindeki çözünebilir maddeler, damak tadına uygunluk ve daha yüksek ve kaliteli aromaya sahip ürünler elde edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı bu şekilde üretilen meyveler de patojenler için önemli inokulum kaynağına dönüşmüşlerdir (Dikilitaş ve Karakaş, 2014).

Fungusit uygulamasının hasat öncesinde yapılmasının *P. expansum*'un hem gelişimini durdurduğunu hem de popülasyonunda azalmaya sebep olduğu yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Hasat öncesinde yapılan fungusit uygulaması ile ürünlerin üzerinde kalan fungusit kalıntıları enfeksiyonların kontrol altına alındığını göstermektedir (Xiao ve ark., 2011).

Penicillium cinsi içerisinde bulunan türler Ascomycota şubesi içerisinde sistematik olarak gruplandırılmaktadır. *P. expansum* fungusunun yirmi bir bitki cinsinde hastalığa sebebiyet verdiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Tannous ve ark., 2018).

Patulin adı verilen mikotoksin *P. expansum* aracılığı ile üretildiği bilinen, insanlarda zamanla kronikleşmeye sebep olup sağlık sorunları meydana getirdiği araştırılmıştır (Gonçalves ve ark., 2019).

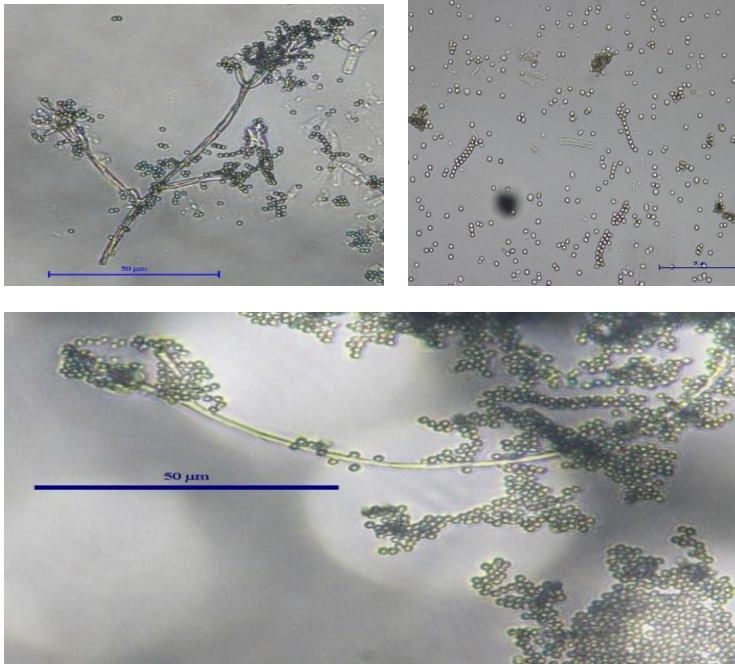
Yapılan araştırmalar neticesinde *P. expansum*'a ait olan 225 tür tespit edilmiş olup, gıda sektörü ve ilaç endüstrisinde önemli yere sahiptir. *Penicillium* adı verilen antibiyotik bazı türleri tarafından üretilmektedir (Pitt ve ark., 2000; Visagie, 2008).

Araştırmacılar tarafından yapılan son sınıflandırmada, *Penicillium*'a ait sınıflandırma Çizelge 1.1. de belirtilmiştir (Pitt ve ark.,2000).

Çizelge 1.1. *Penicillium expansum* fungusunun sınıflandırılması

Alem: Funguslar
Şube: Ascomycota
Dizi: Eurotiales
Sınıf: Eurotiomycetes
Aile: Trichocomaeate
Cins: <i>Penicillium</i>
Alt cins: <i>Penicillium</i>
Grup: <i>Expansa</i>
Tür: <i>Expansum</i>

Penicillium expansum faaliyetleri neticesinde dokularda üretilmesi ile mavi renkte olan konidilere bağlı olarak oluşan bu hastalık “mavi çürüklük” olarak isimlendirilmektedir. Hastalığa sebep olan etmen öncelikle şeffaf görünüm alıp sonrasında çürüyen dokularda yumuşak çürüklükler oluşturmaktadır (Luciano Rosario ve ark., 2020). Fungusa ait konidioforlar ile konidilerin görünümüleri el şekline benzemekte ayrıca bu yapıların uçlarında konidioforlar bulunmaktadır (Şekil 1.1).

Şekil 1.1. *Penicillium expansum*'un mikroskop görüntüsü

Ağır metal kavramı atomik özgül ağırlık olarak genellikle 5 g/cm³'ten daha fazla olan metaloitler ve metal olarak adlandırılan yapıları kapsar. Genel olarak çevre kirliliğine ve toksisiteye sebep olup Cr, Cu, Cd, Hg, Ni, Zn ve Pb elementlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadırlar. Yapılan çalışmalarla 60'tan fazla metal olduğu tespit edilmiş olup doğal olmaları aracılığıyla karbonat, sülfür ve silikat formlarında sabit olarak veya silikatlar içerisinde bağlı bir biçimde mevcut olarak bulunurlar (Kahvecioğlu ve ark, 2007).

Bitkiler; yeraltı suları, toprak ve atmosfer üçgeninde en önemli görevi üstelenen yapıdır. Bitkiler genel olarak yaşamları boyunca farklı stres koşulları ile karşılaşır. Gelişimleri için gerekli olan mikro elementlerin (çinko (Zn), demir (Fe), bakır (Cu) vb.) yanı sıra toprak bünyesinde mevcut olan ağır metaller (kurşun (Pb), kobalt (Co), kadmiyum (Cd) vb.) belli oranlardan fazla olmaları durumunda ve çözünebilme durumlarına göre fitotoksik etki yapabilirler. Bitkilerin beslenmesinde önemli role sahip olan kimi ağır metaller aşırı dozlarda ise fitotoksik etki yapmaktadırlar. Pb, Hg, Cr ve Cd ağır metalleri farklı yollar ile tarımsal ekosistem içerisinde bulunurlar. Bu ağır metaller yoğunlukları ve çözünebilirlikleri açısından bitkilerin bünyelerinde bulunabilirler.

İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler için temel mikro besin maddeleri olan bazı ağır metaller; belirli konsantrasyonların üzerinde fitotoksik etki yaratmakta ve biyolojik açıdan ayrışması mümkün olmayan yapısı sebebiyle insan sağlığı açısından zararlıdır. Bu sebepten dolayı canlı organizmalarda ve dokularda basit bir şekilde birikebilirler. Bitkiler açısından daha toksik etkiye sahip olan ağır metaller olarak Ni, Co, Cu ve Zn olup; hayvanlar açısından daha toksik etkiye sahip olan ağır metaller ise Cd, As, Cr, Hg ve Pb olarak belirlenmiştir (Asati ve ark., 2016; Rodríguez Eugenio ve ark., 2018).

Doğal olarak yeryüzünde bulunan ağır metaller, beşerî faaliyetler sonucunda yoğunlaştırılmış duruma gelirler. İnsanlar havadan, sudan ve yiyeceklerden az da olsa ağır metallere maruz kalabilirler. Ağır metallerin ana kaynakları sanayi bölgeleri, kurşun içerikli benzin türleri ve boya ürünleri, madensel atıklar, gübre kullanımları,

hayvansal gübreler, yoğun metal içerikli atıkların yok edilmesi, atık çamurlar, pestisitler, atık sular ile tarımsal sulamaların yapılması, kömürlerin yanma sırasında ve sonrasında oluşturdukları artıklardan kaynaklı birikmelerdir (Sherameti ve Varma, 2010; Alloway, 2013).

Kentleşme ve sanayileşmenin günümüzde yoğun olarak artış göstermesiyle birlikte çevre kirliliği sorunları da paralel olarak artış göstermektedir. Ağır metaller çevresel kirlilik sorunları olarak karasal yaşamı, sucul yaşamı ve atmosferik çevreyi olumsuz etkilemekte ve canlıların yaşamlarında riskler meydana getirmektedirler. Bilim insanları yıllar süren araştırmalar ile ağır metallerin çevreye verdikleri zararlı etkiler üzerinde çalışmışlardır. Çarpık kentleşme, nüfusun artması, doğal olarak ayrılan kayaçlar, volkanik faaliyetler, madencilik faaliyetleri ve endüstriyel çalışmalar sebepleriyle atmosfer sürekli ağır metallere maruz kalmakta ayrıca su ve toprak kalitesi büyük oranda bozulmaktadır. Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu dünyada birçok ülkede toprakların kirlilik sebebi çinko, bakır ve kurşun metalleri ile alakalıdır. 2015 yılında ABD'de Toksik Madde ve Hastalık Kayıt Ajansı (ATSDR) bünyesinde yayımlanmış 275 adet önemli sorun teşkil eden ağır metaller arasında Pb, Cd ve Zn sıralaması ile 2., 7., ve 118. sırada bulunmaktadırlar (ATSDR, 2017).

Topraklarda var olup ve kirliliğe sebep olan ağır metallerin kullanıldığı sanayi dallarını kısaca belirtmek gerekirse; Zn (kimyasal sanayi ürünleri ve bunlara bağlı yan ürünler), Cd (termik santraller, tarım ilaçlamaları, boya sanayisi, pil sanayisi), Ni (pil üretimi, kimyasal sanayi ürünleri ve bunlara bağlı yan ürünler), Hg (pil üretimi, termik santraller, tıbbi olan atıklar, elektrik ve elektronik ürünlerin üretimi, doğal kaynaklar), Pb (egzozlardan salınan gazlar, otomotiv sanayi, petrol rafinerileri, termik santraller), Cr (termik santraller, demir-çelik sanayileri, madencilik ile ilgili sanayi kuruluşları). Genel kullanım alanları verilen metaller doğada doğal olarak birikip çok toksik özellik göstermektedirler.

Bitkilerdeki eser element yoğunluklarına (azlık veya çokluk) bağlı olarak gerçekleşen kimyasal stres kaynaklı reaksiyonlar net bir şekilde açıklanamamıştır. Bitkiler yaşam süreleri boyunca kimyasal yapı olarak dengesi sağlanmış ortamlara

adapte olup farklı biyokimyasal mekanizmalar oluşturmuşlardır. Bitkiler, ağır metallerin bünyelerine alımında farklı şekilde yönelimler oluşturup bunlar 3 şekilde açıklanabilir. 1- bitki bünyesinde birikme, 2- bitkideki belirtiler, 3- bitkilerin hariç tutulması. Bitkilerin bu farklı yönelimlerden hangisini veya hangilerini seçmesi, genel anlamda o bitkinin özel yeteneğine ve türler arası metallerin alımlarında oluşan özelliklere bağlıdır. Öte yandan yapılan araştırmalarda bitkilerin metal alımlarında aynı türlerin genotip yapıları arasında bile yüksek oranda farklılıklar belirlenmiştir (Kabata Pendias, 2011).

Toprak ve çevrenin kirlenmesine etkide gübreler, pestisitler ve hormonlar da bulunmaktadır (Karaca ve Turgay 2012).

Meyvelerin içerdiği vitamin, protein ve karbonhidrat içerikleri meyvelerin kalitesinde ve funguslara karşı dayanıklılık mekanizması üzerinde önemli etkilere sahip olduğu ve meyve içeriklerinin fungal etmenlerde virulenslik ile alakalı enzimler üzerinde etkilere sahip olduğu öngörülmektedir. Örnek olarak, proteaz enzimi fungal etmenlerin virulenslikleri üzerinde etkiye sahip olduğu kanıtlanmış olan enzimdir (Dikilitas ve ark., 2018).

Funguslar ve bakterilerin de içinde bulunduğu çok sayıda proteaz üreten mikroorganizma bulunmaktadır (Manjeet ve ark., 1998). Proteazlar etlerin yumuşatılmasında gübre ve peynir yapımında, buzağuların mide mukozasının kullanılmasıyla ve derilerin tabaklanmasında kullanıldığını bildirmiştir. (D'Reaumur 1752). Proteazlar, canlı organizmaların fizyolojisinde ve metabolizmalarında bunun yanında peptitler ve proteinlerin sindirimi üzerinde büyük rol sahibidir. Protein sentezlenmesi, proteinlerin aktivasyonu-inaktivasyonu, protein döngüsü ve sinyalleşme gibi birden fazla aşamada kontrol mercii olan bu enzimler fizyolojik süreçlerin de düzenlenmesi gibi önemli roller üstlenmektedirler (Bond, 2019). Bitkilerin savunma mekanizmalarında ve virulensliklerinde etkili olan proteaz enzimleri; konukçu dokuların proteinlerini etkisiz hale getirip bitkilerin savunma mekanizmalarında sorunların ortaya çıkmasında önemli etkiye sahiptirler (Kılıç, 2019).

Karbonhidratlar funguslara genel olarak enerji sağlamalarının yanında bununla birlikte yapısal bir değişikliğe uğrayarak melanin olarak adlandırılan pigmentlerin yapısında da bulunduğu yapılan araştırmalar sonucunda gözlemlenmiştir. Melanin, insanlarda renk koyuluğuna etki ettiği gibi funguslarda da aynı etkiyi gösteren pigmenttir. Fungusların içerdiği melanin pigmenti hücrelerin koyu bir renk almasına neden olup uç sıcaklık dereceleri şeklinde adlandırılan ekstrem sıcak veya soğuk ortam koşullarına karşı koruyucu görev yapmaktadır ve bu pigment insanlar için de güneş ışınlarına karşı dayanıklılığı arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca fungusların virülensliği üzerinde ve pestisit direnci üzerinde de melaninin etkili olduğu gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2021). Bitkiler ve insanlar için öneme sahip olan patojenlerin birçoğu melanin üretebilmektedir. Stres koşullarında gelişebilen fungusların hayatta kalma yeteneklerinin arttırılmasını da melanin gerçekleştirir. Fungusların birçoğunun kahverengi veya siyah pigmentlerden oluşan melaninleri üretmesinin sebebi fenolojik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu sonucunda gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalar ve çalışmalar sonucunda melaninlerin fungusların ilaç direncini arttırmasının yanında ayrıca virülensliğini de arttırdığını ortaya çıkarmıştır (Zhdanova ve ark., 2000; Rosa ve ark., 2010).

Maviküf oluşmasına sebep olan *P. expansum* dünya genelinde meyveler açısından çok riskli durumlar ortaya çıkarmaktadır ve bundan dolayı dünya genelinde gün geçtikçe önemli ekonomik zararlara sebep olmaktadır. *P. expansum* meyvelerin sahip olduğu kalite standartlarının kaybına sebep olmasıyla birlikte insan sağlığı üzerinde etkili olan zararlı mikotoksinlerin oluşmasına neden olmaktadırlar. *P. expansum* ile mücadelede fungusitler ya yeterli olamamakta ya da kullanımlarında birtakım kısıtlamalar uygulanmakta olmasından kaynaklı yeni mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır (Luciano Rosario ve ark., 2020). Ayrıca, ilk olarak hastalık etmeninin hangi şartlarda daha çok etki gösterebileceği değişen depolama ve iklim şartlarında uzun süre boyunca muhafazası sağlanan meyvelerde görülebilecek biyokimyasal değişimlerin veya organik tarım uygulamalarında tarımsal ilaçlar ve suni gübreler kullanılmadan gerçekleştirilen tarımsal faaliyetler neticesinde zengin içeriklere sahip meyvelerin gösterdikleri

tepkileri araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla *P. expansum* fungusunun *in vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat ve kadmiyum nitrat içeriklerine sahip olan fungal gelişim ortamında yetiştirilmesi sağlanmıştır. Böylece fungusun miselyal gelişimi, sporulasyonu ve virulenslikleri üzerinde önemli etkilere sahip olan biyokimyasal enzimlerin seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Ağır Metaller ve Özellikleri

1.1.1. Kadmiyum

İnsanlar, hayvanlar ve bitkiler üzerinde en zehirli olan ağır metallerden biri kadmiyumdur. Bundan dolayı sebze-meyvelerin kalitesi ve çevresel koşullar üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Çoğunlukla çinko rezervlerinin maden işleme işlemleri sırasında saf olarak değil de yan ürün olarak meydana gelmektedir bundan dolayı kadmiyum isteğinden daha fazla çinko içerikli ürünlerin yoğunlaşmasından kaynaklı kadmiyum üretiminde dolaylı olarak fazlalaşma görülmüştür. Kadmiyum çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Bunlar araç akülerini elde etmek için Ni-Cd ve Ag-Cd şeklinde kullanılırlar bunun dışında ise Zn-Cd içerikli bataryaların geri dönüştürülmesinden de kadmiyum açığa çıkartılmaktadır (Kabata Pendias, 2011).

Kadmiyum besin maddelerinde aşırı miktarlarda var olması ve bu besinler ile insan vücuduna alınımında toksik etki gösterirler. Kadmiyum ile bulaşık su içilmesine bağlı olarak insanlarda istifra etme, karın sancıları ve halsizlik gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır. Kadmiyum ağır metalinin solunum yolu ile vücuda alınmasında ise akut olarak zature, akciğerlerde ödem oluşması, nefes darlığı, vücut sıcaklığının düşmesi, akciğer hacminde artış gibi ciddi sorunlar yaratır. Bu etkilerinin yanında idrar içeriğinde kadmiyum oranının artmasına bağlı olarak; idrarda aminoasit, glikoz ve proteinin anormal bir biçimde artmasına sebep olmaktadır (Köstekci, 2017).

Kadmiyum çeşitli sebeplerden dolayı (fosfat içerikli gübreler, çimento fabrikalarının faaliyetleri, ısıtma faaliyetleri, metal işleme sanayisinden kaynaklı

çevreye aktarılan atıklar) tarımsal topraklarda yoğun bir şekilde bulunup en kuvvetli çevre kirleticisidir (Jibril ve ark., 2017).

Bitki bünyesi içerisinde farklı miktarlarda dağılımı olan kadmiyum, bitki içerisinde kökten yapraklara süratli bir şekilde aktarılması gereklidir. 16 mg/kg kadmiyum içeriğine sahip topraklarda mısır bitkisi ile yapılan araştırmada topraktan bitki bünyesine aşağıdan yukarıya doğru olacak şekilde yaprak, kök, boğum, sürgün, gövde, çiçek olacak şekilde kökten çiçeklere doğru kadmiyum alım miktarı azalmaktadır. Bitkiler açısından zehirli etkiye sahip olan kadmiyumun zehirliliğinin en önemli sebebi bitkilerin enzimsel işleyişlerini tahribata uğratmasından kaynaklanmaktadır (Kabata Pendias, 2011).

Kadmiyumun topraktan alınmasında çeşitli faktörler etkili olurken, kimi türler kadmiyuma adapte konusunda ve bitkide kadmiyumun üst tarafta bulunan aksamlarına iletilmesinde daha farklı özellikler meydana getirmektedirler. Toprakta bulunan kadmiyumun uzaklaştırılıp temizlenmesi için kuduzotu (*Alyssum murale*), tütün (*Nicotiana tabacum*), mısır (*Zea mays*), sepetçi söğüdü (*Salix viminalis*) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus*) gibi bazı bitkiler kullanılmaktadır (Kabata Pendias, 2011).

Kadmiyum emilimini azaltan toprak kireçlenmesi, toprağın pH oranını arttırdığı belirlenmiş olup her toprak ve bitki aynı özelliği göstermeyebilir. Toprağın içerdiği kadmiyum miktarı genellikle toprak pH özellikleri ile ilgilidir (Kabata Pendias, 2011).

Killi topraklarda bulunan kadmiyum içeriği kumlu topraklarda bulunan kadmiyum içeriğinden daha fazladır. 7.5 ve üzeri pH içeriğine sahip olan topraklarda rahatça hareket edemeyen kadmiyum, alkali topraklarda durgundur. Asidik özellikli topraklarda bulunan kadmiyum ise 4.0 ile 5.5 arasında bulunan değerlerde oldukça hareketlidir (Kabata Pendias, 2011).

Kadmiyum emilmesi çok kısa sürede gerçekleşmektedir. Emilimi yapılan kadmiyumun % 95 i 10 dakikada tamamlanırken, 60. dakikada dengeye ulaşır aynı

zamanda pH içeriği 6 olan topraklarda ise yüksek oranda bağlanma oluşturduğu gözlemlenmiştir (Kabata Pendias, 2011).

Toprak içerisinde hareket kabiliyetine sahip olan kadmiyum, topraktan bitki bünyesine taşınımı ve bitkide dağılımı oldukça rahattır. Bitki bünyesindeki normal değer olarak 0.2 ile 0.9 mg kg⁻¹ olan kadmiyum, normal değerlerin üzerinde (5-30 mg kg⁻¹) bulunması durumunda ise zehirlenme etkisi yapmaktadır (Schulze ve ark., 2005; Kabata Pendias, 2010).

Soudek ve ark. (2014) sorgum adlı bitki üzerinde yaptıkları çalışmalarda bitkiyi farklı dozlarda (0-2000 µM) kadmiyuma maruz bırakmışlardır. Sorgum bitkisinin köklerinde kadmiyumun yoğun olarak biriktiğini gözlemleyen bilim insanları, düşük yoğunluklarda bitkiye verilen kadmiyumun toksik etkisinin kök kısmına yaptığı etki sürgünlere yaptığı etkiden daha fazla olup; yüksek yoğunluklarda uygulandığında ise kadmiyumun yapraklara iletilmesiyle büyümede gerileme, klorofil azalması ve kloroz gibi sorunlara sebep olduğunu açıklamışlardır.

Zhang ve ark. (2014) tütünde kadmiyumun sebep olduğu sorunlara çözümler bulabilmek amacıyla etilen uygulaması üzerinde yapılan araştırmada, kadmiyum stresine tabii tutulan tütünde bitkinin gelişmesini kontrol altına almışlardır. Kadmiyumun sebep olduğu sorunlarla ilgili olarak tütünde; yapraklarda sararmalar ve köklerde küçülmelere, bitkinin gelişmesini engellediğine, yeni oluşan sürgünlerin ve köklerin ağırlıklarını ve kök uzunluklarını olumsuz yönde etkiledikleri tespit edilmiştir.

Kadmiyum ile bulaşık topraklarda üretilen bitkilerin köklerinde kadmiyum daha çok birikir. Bitki bünyesinde biriken kadmiyum, bitkiler ile beslenmeden kaynaklı canlı vücuduna alınması durumunda sağlık sorunları ortaya çıkartmaktadır. Bu sebeple bitki, gıdalar ve yem bitkilerinin bünyelerinde bulunan kadmiyum seviyeleri sürekli olarak araştırılmıştır (Kabata Pendias, 2011).

Hatay ili Cilvegözü yoluna yakın olan tarımsal alanlarda yola belirli mesafelerde bulunan topraklarda ve bitkilerde ağır metallerin yoğunluklarını belirlemek için birtakım çalışmalar yapılmıştır. Alınan toprak ve bitki örneklerinin Cd, Cr ve Ni içerdikleri yapılan analizler sonucunda gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ortaya çıktığı belirlenen ağır metal miktarlarının Dünya’da ve Türkiye’de belirlenen sınır değerlerini geçmediğini fakat ağır metal seviyesinin artmasının sebebinin ise karayolundan kaynaklandığını bildirmişlerdir (Özkan, 2017).

1.1.2. Nikel

Toprakların pH içerikleri ile nikelin topraktaki hareketlenmesi ters orantılı olduğundan toprağın yüzeye yakın olan katmanlarında genellikle metallerin yayılgılığını arttıran yani şelatlanma formuna dönüşerek toprakta birikir. Nikelin topraktaki hareketliliğini etkileyen önemli faktör ise organik maddelere bağlanarak kompleks bir yapı oluşturmasıdır. Topraklardaki kil tabakası, içerdikleri organik maddeler ve pH seviyesi nikel ağır metalinin topraklardaki hareketlenmesinin kontrol altına alınabilmesinde faydalanılır (Kabata Pendias, 2011).

Kirlerden ari toprakta üretilen bitkilerin bünyesinde bulunan nikel miktarı, yetiştirildiği ortamın özellikleri hakkında genel bilgiler aktarabildiği için büyük oranda farklılık gösterebilir. Nikelin çevreyi maruz bıraktığı kirlilikten dolayı, bitkilerin bünyelerine aldıkları nikel miktarı üzerinde etkili olup, bu bitkilerde yapraklarda ve tepe kısımlarına doğru daha fazla miktarda birikmesine sebep olmaktadır. Atık suların sebep olduğu çamurlaşmalarda da oluşan nikel kirliliği bitkiler için sorun oluşturmaktadırlar (Kabata Pendias, 2011).

Ağır metallere olan nikelin bazı değişik formları toksik etki yapan mekanizma ve biyolojik yapıları ile alakalıdır. Bitkiler nikeli Ni^{+2} formunda aldıkları zaman emilim olarak daha kolay fakat toksik açıdan daha zararlıdır. Bitkilerin nikel alımları, çözelti içeriklerinde bulunan nikel miktarları ile doğrudan alakalı ve alım miktarları oldukça yüksektir. Gerek bitkiler gerek başka etkenler nikel alımını etkiler ve bunların en önemlisi toprak içeriğinde bulunan pH’tır. Nikel zehirliliğinin

oluşturduğu mekanizma net bir şekilde belirlenememiştir fakat nikelin aşırı olması durumunda bitki büyümeleri belli bir değerde stabil olarak uzunca süre incelenmiştir (Kabata Pendias, 2011).

Nikel stresine maruz kalan bitkilerde bitki gelişim mekanizması, kök gelişimi ve besinlerin bitki bünyesine alınması olumsuz yönde etkilenir. Bitki bünyesinde aşırı miktarda bulunan nikelin fotosentez olayını ve bitkinin terleme yoluyla su kaybetmesini durdurması genel olarak nikel toksisitesi oluşmadan gerçekleşmektedir (Kabata Pendias, 2011).

Sorghum bicolor ile yapılan araştırmada Pb, Ni ve Zn ağır metallerinin 5-100 ppm aralığındaki farklı dozlarda yapılan çalışmada hidroponik ve hoagland gibi iki farklı ortamda yetiştirilmeleri gerçekleştirilmiştir. Yetiştirilen bitkilerin nikel, kurşun ve çinko ağır metallerini bünyelerine aldıkları ayrıca bitki köklerinin bu ağır metalleri gövde ve sürgünlerden daha çok miktarda biriktirdikleri gözlemlenmiştir. Nikel'in çinko ve kurşuna göre bir miktar daha zehir etkisinin olduğu ayrıca 11 ppm ve üzeri nikel içerikli ortamlarda gelişemediği bununla birlikte bitki ağırlığında kayıplar yaşandığı gözlemlenmiştir. Nikelin çinkodan, çinkonun ise kurşundan daha fazla toksik etkiye sebep olduğu yapılan çalışma ile belirlenmiştir (Chami ve ark., 2015).

1.1.3. Kurşun

Önemli çevre kirleticilerinden olan kurşun, motorlu araçlarda benzin kullanımına bağlı egzozlarından tetra etil kurşun olarak salındığı için kirliliğe sebep olmaktadır. Büyük çaplı endüstri kuruluşlarının atıklarının denizlere karışmasından dolayı deniz canlılarında da kurşun ağır metale rastlanmaktadır. İnsan vücudunda doku ve kanda belli bir seviyeye ulaşması durumunda zehir etkisi yaratmaktadır. Zehirlenme belirtileri yaş, beslenme durumu ve vücut direncine bağlı olup bunun yanında çocuklar 35-85 µg Pb/100 mL toksisiteye sebep olurken bu değer 85 µg Pb/100 mL üzerinde olduğu zaman zehir etkisi göstermektedir (Vural, 1993).

Kurşundan kaynaklanan zehirlenmelerde insanların vücutlarında meydana gelen zehirlenmeler neticesinde beyin hasarı ve ölümler, bebek ve çocuklarda zekâ geriliği, olayları yavaş algılama, yüksek kan basıncı, kansızlık ve sinirsel rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır (Özbolat ve Tuli, 2016).

1.1.4. Bakır

Gündelik hayatta faydalanılması nedeniyle insan ve hayvanlarda zehirlenmeler ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Eser element halinde canlı vücutlarında bulunan bakır önemli elementlerdendir (Jenkins, 1989).

Bakırın etkisi canlının büyüklüğüne göre değişiklik gösterir. Küçük canlılarda toksik etkiye sebep olurken, büyük canlılarda ise alınması gerekli olan metaldir. Bundan dolayı pestisit, fungusit, dezenfektan olarak tarımsal zararlılar ve yumuşakçalar ile mücadelede sürekli kullanılırlar. El temasının çok olduğu yerlerde özellikle hastane odalarında bulunan kapıların kolları bakır içerikli malzemelerden yapıp, bakırın antiseptik yönünden faydalanılarak hastalık yayıcı zararlıların olumsuz etkilerinden korunma sağlanır. Bakır yiyeceklerde (özellikle sebze ve meyve) bulunup, elmada 0.1-2.2 mg/kg, ay çekirdeğinde 14.2-18 mg/kg, kuru erik içeriğinde ise 3.5-4.9 mg/kg oranlarında bulunur. Güçlü antioksidan olan anne sütü 250-500 µg/L bakır içermektedir. İnsan ve hayvanlarda büyüme gerilikleri, nefes alıp vermede aksamalar, kemik erimesine bağlı rahatsızlıklar, kansızlık, saç ve deride renk değişimi gibi hastalıkların oluşmasını sağlar (Grace ve Lee, 1990).

1.1.5. Mangan

Genel olarak canlıların yaşadıkları tüm alanlarda mangan bulunabilmektedir. Bundan dolayı insan vücuduna mangan alımı çeşitli bitkisel ürünlerle daha kolay bir biçimde geçebilmektedir. Bu ürünlerin başında tahıllar, çay, pirinç, çeşitli baharatlar, yumurta, ıspanak, fındık, zeytinyağı, yeşil fasulye ve soya fasulyesidir. Manganın insan vücudunda az ya da fazla miktarda bulunması çok önemli hastalıklara sebebiyet verebilmektedir. Ürünler ile insan vücuduna alınan mangan kana karışarak vücuda

dağılır ve hastalıklara sebep olurlar. Manganın vücutta gösterdiği etkilerin başında; sinirsel hastalıklar, solunum yetmezliği, baş ağrısı ve halsizlik, bronşit, kan pıhtılaşması, deri hastalıkları, uykusuzluk, saçların renk değiştirmesi, parkinson hastalıkları, kasların güçsüzleşmesidir (İpek, 2016).

Mangan zehirlilik oranı düşük olan metallere biri olduğundan, denizlerde alabalıkların mangan alabilme sınır değeri 75 mg/L, sazan balıkları için bu değer 600 mg/L olarak tespit edilmiştir (Köstekci, 2017).

1.1.6. Çinko

İnsanlarda çinko ağır metalinden kaynaklanan zehirlenme belirtilerine fazla bir şekilde rastlanılmamaktadır. Galvaniz kaplamalı ürünlerde çok fazla muhafaza edilen gıdalardan kaynaklı mide ve bağırsak rahatsızlıkları ve ishal gibi olumsuzluklar oluşturmaktadırlar. İki gün süre ile alınan 10 gr çinko böbrek rahatsızlıklarının yanında hepatit gibi olumsuzluklara da maruziyet yaratmaktadır. Sanayi bölgelerinde çinko kaynaklı dumanın solunmasında ciddi derecede sorunlar ortaya çıkarıp, solumadan sonraki ilk 4 ile 8 saatlik süre zarfında üşüme, soğuk ter atma ve ateşlenme gibi ani etkiler oluşturabilirler. Sularda bulunan çinko ağır metali suda yaşayan canlıları olumsuz etkileyip bu oran balıklarda 0.3 mg/L olarak belirlenmiştir. 5 mg/L sınırı ise içme sularında zararlı etki yapmadığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Deniz suyunda çinko sülfür formunda bulunup, bu oran denizlerde 1 ile 21 mg/L aralığındadır. Balıklarda ve denizlerde bulunan kabuklu canlılarda çinkonun zehirlilik oranı 10 ppm (midyelerde 100 ppm) olup, insanların bunları yemeleri halinde sinirsel ve sindirim sistemi bozukluklarına sebep olmaktadır (Köstekci, 2017).

1.1.7. Krom

Cr tabiiatta hemen hemen her bölgede var olan metaldir. İnsan vücudunda insülinin dolaşmasına katkıda bulunup su, protein ve karbonhidrat metabolizması üzerinde etkilidir. Kirli olmayan sularda 1µg/L ve havada 0.1µg/m³ Cr bulunur. Bazı

toprak çeşitleri 2-60 mg/kg Cr içeriğine sahipken, kirden ari toprakların bazı çeşitlerinde ise 4 g/kg oranında bulunurlar. İlk defa Fransız L. N. Vauquelin tarafından üretilen krom, renk oranının fazla olması nedeniyle Yunan dilinde renkleri ifade eden krom olarak isimlendirilmiştir. Alaşım elementi şeklinde tanımlanan krom, geniş ve yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Bu kullanım alanlarından bazıları şunlardır; kimya sanayisi, metal işleme sanayileri ve dökümhaneler, kâğıt endüstrisi ve deri tabaklamadır. İşlenebilir tarım toprakları için maksimum krom seviyesi 100 mg/kg olup ekstrakte edilebilir krom seviyesi de 1 mg/kg civarındadır. Bitki bünyesinde Cr oranının yüksek miktarda biriktiği yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Toprak içerisinde hareketsiz olarak bulunan krom, bu hareketsizliğinden dolayı su içerisinde çözünürlük oranı yüksek olan Cr tuzlarının kullanılmasında da genel olarak zarar verici etki gözlemlenmemiştir. Bitki bünyesinde de hareket kabiliyeti sınırlı olan krom, aşırı konsantrasyonlarda bitkilere uygulandığında ise toksik etki oluşturabilmektedirler (Seven ve ark., 2018).

Yer kabuğu içeriğinde genel olarak bulunma oranı 100 mg kg⁻¹ olan Cr, genel kullanım alanı metalürji, refrakter ve kimyasal endüstriler olmasının yanında içerdiği sarı renk pigmenti ile boya, vernik ve mürekkeplerde kullanılmak üzere yeşil tonlarının üretilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Cr, kimya endüstrisinde pigmentlerde, metal kaplama işlerinde, ahşap koruyucularında, çelik kaplamada ve kromat kaplama işleri için kullanılır. Cr kirliliğinin ana sorunu olan deri tabaklama işlemi ve kâğıt üretiminde çeşitli evrelerde ciddi bir şekilde Cr içerikli bileşiklerden faydalanılır. Konut ve endüstriyel işletmelerden atık suları arıtma amacıyla yapılan atık su arıtma tesisleri ciddi seviyelerde Cr emisyonu yapmaktadırlar. Kimi bölgeler için kromit cevheri işleme kalıntısı (COPR) ciddi anlamda çevresel sorun oluşturur (Kabata Pendias, 2011).

Bitkilerin üst kısımlarında solmalar meydana gelmesi, kök yaralanmaları, genç yapraklarda görülen kloroz, tahıllarda etkili olan klorotik bantlaşmalar ve kahverengi kırmızı yapraklar bitkilerdeki Cr toksisitesine ait genel belirtilerdir (Kabata Pendias, 2011).

1.1.8. Kobalt

Ağır metal olan kobalt 0.2 ile 0.8 mg/L aralığında doğal bir derişime sahiptir. Bu değerler canlılar için zehirleyici etki yapabilmektedirler (Köstekci, 2017).

1.1.9. Demir

İnsan vücudunda enzim ve proteinleri tamamlama görevinde bulunan demir, metabolik faaliyetler için gereklidir. Ayrıca solunum gazlarının taşınımında görev almalarının yanında proteinlerde mecburi yapıdır. Vücutta eksik miktarda demir alımı hücrelere oksijenin yeterli miktarda ulaştırılmasını etkilerken, bağışıklık sistemi zayıflıkları ve halsizlik gibi etkilere sebep olmaktadır. Demir alımın fazla olması durumunda ise zehirlenmelere ve hatta ölüme bile yol açmaktadır. İnsan vücudundaki demir miktarının 2/3'ü kanda var olan hemoglobinin yapısında bulunup, alyuvar hücrelerindeki proteinler oksijeni dokulara iletmektedir. Mikro elementlerden biri olan demir yeryüzünde en fazla var olan elementler içinde 4. sıradadır. Bitkilerin klorofil sentezi yapabilmeleri için minimum düzeyde de olsa demir almaları mutlak gereklidir. Bitkiler tarafından eksik miktarda alınan demir, klorofilin iyi bir şekilde oluşmasını engellediği gibi kloroz hastalığına sebep olur. Demir eksikliği bitkilerin genç yapraklarında daha fazla görülüp, yaprakların açık sarı renk almasına sebep olur. İnsanların yiyeceklerden aldıkları demir, öldürücü etki yapabilmesi için insanın vücut ağırlığının 200 ile 250 mg/kg olması gerekir. Zehirlenme semptomları vücutsal ağırlık olarak 20 ile 60 mg/kg eşiğine ulaştığında ortaya çıkmaktadır (Seven ve ark., 2018).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Penicillium spp. oldukça küçük yapılı ve ağırlıklarının az olması sebebiyle ortamlar arası geçişleri hava sirkülasyonu ile gerçekleşmektedirler. Buna bağlı olarak belli bir ortamda mevcut olan sporlar iklim, hava kaynaklı faktörler ve çevresel etkilere bağlı olarak farklılık göstermektedirler (Yılmaz, 2010).

Hasat edilen ürünlere yaralardan ve doğal açıklıklardan giriş yapan *Penicillium expansum*'un zararlı etkilerinden korunmak için ürünlerin muhafaza edilme şartları ve sevkiyatları esnasında yaralanmalara sebep olacak etkilerden kaçınmak önemli derecede koruyucu etki yapmaktadır. Muhafaza edilmek üzere depolanması yapılan ürünlerde bozulmalar meydana getirdiklerinden hasat sonrası organizmalar olarak ta adlandırılmaktadırlar (Tiwari ve ark., 2011; HemaMoorthy ve Prakasam, 2013).

Ağır metaller önemli çevre kirleticiler olup toksik etkileri sebebiyle artış gösteren önemli çevresel sorunların başında gelmektedir. Nikel (Ni), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), çinko (Zn), kobalt (Co), demir (Fe), krom (Cr), arsenik (As), gümüş (Ag) ve platinden oluşan ağır metallerdeki yoğunluklar kimyasal özelliklerine göre en önemli etkendir (Nagajyoti ve ark., 2010).

Ağır metaller doğada parçalanmış olan kayaçların oluşmasında bulunup, hızla gelişen kentleşme oranı ve sanayi sektörü ağır metallerin atmosferdeki oranlarında artışa sebep olmuştur (Asati ve ark., 2016).

Demir, kobalt ve çinko gibi ağır metaller insanların sağlıkları açısından önemli yere sahiptirler fakat aşırı miktarlarda alınmaları toksik etki oluşturabilmektedir. İnsan sağlığı için gerekli olan ağır metallerin (Mo, Mn, Cu, Zn ve Fe) hayvanların ve bitkilerin bünyelerinde farklı fiziksel ve biyokimyasal olayları gerçekleştirdikleri gözlemlenmiştir (Chibuike ve Obiora, 2014; Rodríguez Eugenio ve ark., 2018).

Kirlenmiş topraklarda bulunan farklı ağır metaller değişik tepkiler gösterebildiklerinden bitkilerin karakteristik yapıları değerlendirildiğinde bünyelerindeki biriktirme kapasitelerine göre bitkilerde sınıflandırma Ross (1994) tarafınca yapılmıştır (Sacristan ve ark., 2015). Dünya genelinde yetiştirilebilen ve ağır metallerin biriktirilmesi konusunda öncülük eden bitkilerin başında gelen marul (*L. sativa* L.) bitkisi, sulardaki kirliliğin yanında toprak kirliliğinin de ortaya çıkarılmasında en önemli bitkisel indikatörler olarak kullanıldıkları belirlenmiştir (Wolf ve ark., 2017; Priac ve ark., 2017).

Toprakların kirlenmesi hususunda sanayi endüstrisinden kaynaklı atıklar, madensel atıklar, metal oranı fazla olan benzin türleri ve boya maddeleri, tarım arazilerinin yanlış yapılandırılması, kimyevi ve hayvansal gübrelemeler, bilinçsizce kullanılan pestisitler, atık suların toprağa karışması gibi farklı alanlarda yapılan çalışmalar neticesinde ağır metallerin önemli kirleticilerden biri olduğu anlaşılmıştır (Zhang ve ark., 2010).

Kurşun, krom, çinko, arsenik, kadmiyum, cıva ve nikel gibi ağır metaller üzerinde yapılan bazı çalışmalarda toprak tekstüründe aşırı miktarda bulunmaları neticesinde metal kirliliğine neden olmalarının yanında, fiziksel ve kimyasal olarak zarar oluşturabilecekleri gözlemlenmiştir (Wuana ve Okieimen, 2011).

Atmosferden suların bünyesine geçen ağır metaller aşırı oranda seyrilmeye uğramakta ve kısmi olarak sülfat, sülfür ve karbonat olarak katı bileşikler şeklinde su tabanına çöküp birikmektedirler. Ülkemizin önemli tuz rezervi olan Tuz Gölü ve civarlarında bulunan kapalı havzalarda gereken tedbirlerin alınmamasından ve düzensiz bir şekilde göl havzalarının olduğu bölgelerde yapılanmaya başlayan büyük çapta sanayi işletmelerinden dolayı ağır metal oranları sürekli artmaya devam etmektedir (Kahvecioğlu ve ark., 2017).

Ağır metaller, organik atıklar gibi olmayıp biyolojik olarak parçalanamaz ve canlıların vücutlarında birikime uğrayabilirler. Yapılan araştırmalarda ağır metallerin farklı yollar ile insan metabolizmasına geçebildikleri ve zehirli etkilerinin yanında

kanser hastalığının da aralarında bulunduğu birçok hastalığa sebep oldukları belirlenmiştir (Devi ve ark., 2011; Fu ve Wang, 2011).

Sanayi işletmelerinin ve nüfus oranının hızla artması hava kirliliğine sebep olmakla birlikte, bunun yanında birçok kentte sağlık açısından insanları tehdit edici durum haline gelmiştir. Ağır metallerden kaynaklanan hava kirliliği bilimsel açıdan önem kazanmış ve birçok araştırmaya konu olmuştur. Yeryüzünde bozulmaya uğramadan yıllar boyunca bulunabilen ağır metallerin var oldukları ortamlarda konsantrasyonlarının yıllar içerisinde artması, varlıklarını sürdürdükleri ortamların risk oranlarının tespit edilebilmesi yönünden önemli etkilere sahiptirler. Hava kirliliğine sebep olan ağır metallerin atmosferde bulunma yoğunluklarının tespit edilmesindeki en önemli etken biyolojik indikatörlerdir. Trafik kalabalığından kaynaklanan egzoz gazlarından çıkan ağır metallerin içerik bakımından araştırılmasında Sarıçam (*Pinus sylvestris*) bitkisinin biyolojik indikatör olarak bu çalışmada kullanılması planlanmıştır (Çömeten, 2019).

Fitoekstraksiyon olarak adlandırılan yapı, ağır metaller nedeni ile bulaşık olan toprakların, su birikintilerinin temizlenmesinde faydalanılan en önemli ve etkin olan teknik fitoremediasyondur. Yaygın olarak ticari uygulamalarda kullanılabilecek en önemli tekniktir (Sun ve ark., 2011; Milić ve ark., 2012).

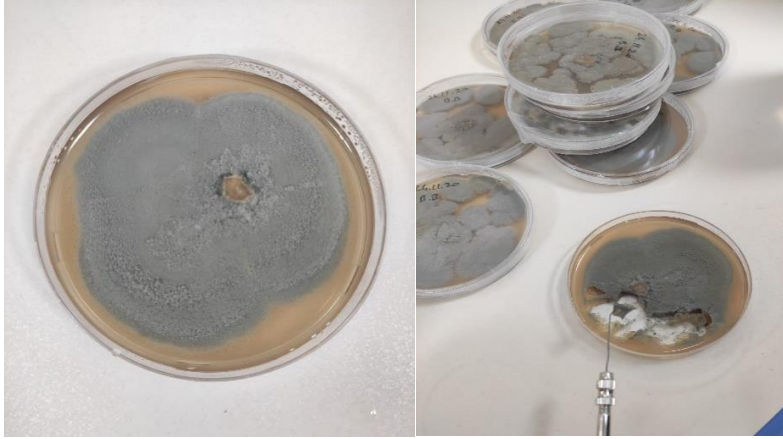
Gelişme ve büyümesi hızlı olan bitkiler, kök yapısı bakımından aşırı yayılma ve saçaklanma gösteren bitikler, köklerde biriken ağır metallerin bitkinin üst kısımlarına doğru iletilmesi, olumsuz hava şartları ve çevre özelliklerine kolay adapte olabilen bitikler, patojenlere ve zararlı organizmalara karşı savunma mekanizması olan bitkiler, ekilmeleri ve hasat edilmeleri kolay olan bitkiler fitoekstraksiyon tekniğine uygun özellikler barındıran bitkilerdir (Sakakibara ve ark., 2011; Shabani ve Sayadi, 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasındaki deneyler, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Bitki Koruma Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır. Yapılan bu çalışma için fungal etmen olan *Penicillium expansum* patojeni Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'ın stok kültür koleksiyonundan alınarak kullanılmıştır. Fungal patojen olan *P. expansum* gelişebilmesi için PDA ortamında kültüre alınmış olup yeterli miktarlarda elde edilerek +4°C'de saklanmıştır.

Hastalık etmeninin fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal yapısı söz konusu patojen için farklı konsantrasyonlarda ağır metallere olan (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) içeriklerinin hastalık etmenin yayılışı üzerine etkileri sıvı patates gelişme (PDB) ortamı içerisinde araştırılmıştır.



Şekil 3.1. *Penicillium expansum* fungal etmeninin PDA ortamı içerisinde gelişmesi

Laboratuvar çalışmalarında faydalanılan nikel sülfat, kadmiyum nitrat, kurşun sülfat ve kurşun nitrat için (Negatif)-, PDB-, 50-, 100-, 150-, 200-, 250-, 400-, ve 500 ppm hacminde konsantrasyonlar oluşturulmuş ve bunların her biri ayrı olacak şekilde PDB ortamına aktarılıp, elde edilen her konsantrasyon için 3 tekerrür hazırlanmış olup

negatif kontrol grubu için saf su kullanılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol grubu için de PDB içeriğine sahip fakat çalışma ile alakalı kimyasal madde içeriği olmayan ortam şeklinde oluşturulmuştur. Çalışma için araştırılan fiziksel parametreler; fungusun miselyal gelişim değerleri, toplam spor sayısı, pH değeri, EC değeri ve sıvı hacmi şeklinde ölçümleri yapılmıştır. Biyokimyasal parametreler ise melanin, proteaz ve protein olup tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak ölçülmüştür.

3.2. Yöntem

Fungusun gelişmesi amacı ile hazırlanan PDB (sıvı besi ortamı) oda sıcaklığında sabit tutulmuştur. Böylece sıvı ortama aktarılan fungusun fungal olarak gelişimi için oluşturulan PDB ortamı hazırlanmıştır. Genel olarak 3 mm çapında *Penicillium expansum*'a ait fungal disk cork barer ile alındıktan sonra 50 ml patates dextrose broth (PDB) içeren Petri kaplarına ortam sterilizasyonu sağlandıktan sonra aktarılıp karanlık ortamda 8 gün boyunca inkubasyona tabi tutulmuştur. Şekiller 3.2 ve 3.3.



Şekil 3.2. PDB ortamı içerisine fungal etmenin ilave edilmesi



Şekil 3.3. PDB ortamına gelişmesi için bırakılan fungal etmen

Çizelge 3.1. Patates dekstrozo Broth (PDB)

İçerik	Konsantrasyon (g/L)
Kabuğu alınıp, doğranan patates	200
Glukoz	20

200 g ağırlığında olan patatesin kabukları soyulup ve küçük parçalara ayrıldıktan sonra, 1 litrelik saf su ile yarım saat boyunca kaynatılarak elde edilen püre mira bezinden (Calbiochem) süzdürülmüş ve daha sonra 1000 ml olacak şekilde saf su ilave edilerek içerisine 20 g glukoz eklenip 15 dakika boyunca 121.5°C’de otoklavlanıp sterilize işlemi gerçekleştirilmiştir, Çizelge 3.1. Ortam içerisine eklenen glukoz ile fungusun enerji almasına yardımcı olunmuş ve farklı konsantrasyonlarda bulunan ağır metallerin fungal patojene etkileri gözlemlenmiştir.

3.2.1. Toplam spor sayısı

Fungusun gelişmesi için inkübasyonda bekletilmesinin ardından spor sayımlarını yapabilmek için, her bir kültürde bulunan fungusun koloni kütlesi alınıp tüpler içerisine aktarılmış misellerin homojen bir şekilde yayılmasını gerçekleştirmek için tüplerin vortex’te çalkalanmasıyla spor hücrelerinin 100 ml solüsyon içerisinde homojen olacak bir biçimde dağıtılması sağlanmıştır. Buradan elde edilen spor süspansiyonundan 0.01 mm’lik hacimde koloni sayımları heamocytometer (Thoma) ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, 100 ml içerisinde bulunan toplam spor olarak belirtilmiştir.

3.2.2. Misel ağırlığı

Deneme sonucunda inkübasyonda 8. günde sıvı kültürlerden elde edilen misellere ait ağırlıkların belirlenip, fungusu ait günlük orantılı büyüme oranı (RGR) aşağıda belirtilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (Bakar ve Leblebici, 2021).

$$RGR \text{ (Gün}^{-1}\text{)} = \frac{[\ln (\text{Misel yaş ağırlığı 8. gün}) - \ln (\text{Misel Yaş ağırlığı 0. gün})]}{\text{GÜN}}$$

Misel yaş ağırlığı 0. gün: İnkübasyonun 0. gününde hesaplanan misele ait yaş ağırlık
Miselin yaş ağırlığı 8. gün: İnkübasyonun 8. gününde hesaplanan misele ait yaş ağırlık



Şekil 3.4. Fungusun misel ağırlığının belirlenmesi aşamaları (a) Sıvı kültürlerden elde edilen misellerin süzdürülmesi (b) Fungusun misel ağırlığının hesaplanması

3.2.3. Fungusun pH değerinin ölçülmesi

PDB ortamında farklı yoğunluklarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişmesi için bekletilen fungusun gelişme gösterdiği ortama ait pH değerleri pH metre ile belirlenip, ortam içine eklenen kimyasalların, ortamın pH'sına etkisini ve fungal gelişim yönünden değişiklik meydana getirip getirmeyeceği hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. PDB ortamında pH ölçümlerinin yapılması

3.2.4. Funguslarda elektriksel iletkenlik (EC) değerlerinin belirlenmesi

Sıvı ortamda (PDB ortamında) değişik ortam yoğunluklarında (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişime bırakılan patojenin gelişim gösterdiği ortama ait EC değerleri, EC metre (AD 31 EC/TDS) ile ölçülüp elde edilen ölçüm sonuçlar ms/cm olarak belirtilmiştir.



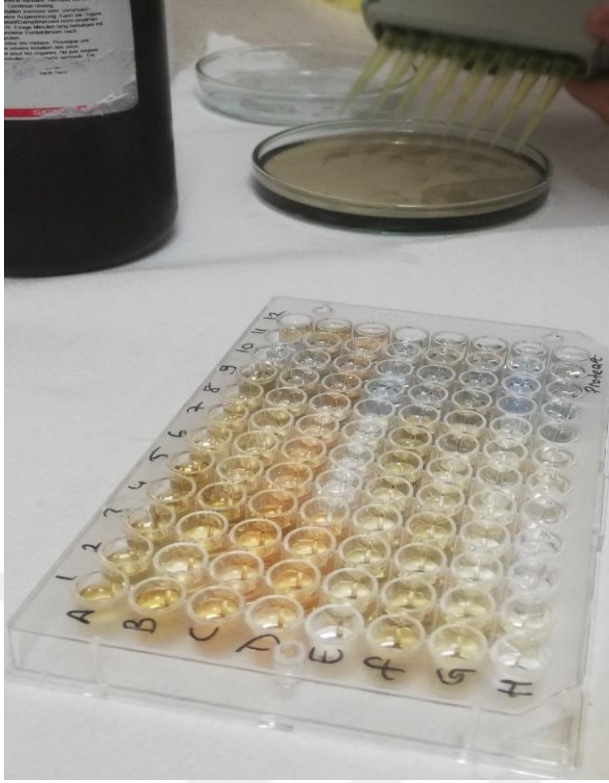
Şekil 3.6. PDB ortamında EC ölçümü

3.2.5. Fungal etmenin gelişim gösterdiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi

Çözünabilir protein ölçümü; sıvı ortam (PDB) içerisinde gelişim gösteren patojenlerden elde edilen supernatantlar (500 µl) sodyum fosfat çözeltisiyle (1.0 ml, pH 7.0) pestel ve mortar ile homojenize edilerek karıştırılmış olup ve ekstrakt 10 000 g'de 10 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlenmesinden sonra oluşan supernatanttan Bradford (1976) metoduna göre protein okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan protein ölçümü, Coomassie Brilliant Blue G-250 boya maddesi kullanılıp Bradford (1976) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Bu metoda istinaden, 20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 ml 95%lik etanol içerisinde çözüldükten sonra solusyon 20 ml 85%'lik w/v fosforik asit ile (H₃PO₄) karıştırıldıktan sonra üzerine saf su eklenerek 200 ml'ye tamamlanmıştır. Protein içeren örnekler (300 µl), 5 ml hacminde Coomassie Brilliant Blue reagent ile karıştırılıp 10 dakika ile 60 dakika arasında değişen süre zarfında 595 nm'de spektrofotometre (Epoch spektrofotometre) ile ölçülerek belirlenmiştir.

Çalışmada yapılan protein ölçümü için Bovine Serum Albumin (BSA) fraction V standart protein olacak şekilde kullanılıp ve 10-100 µg arasında değişen protein konsantrasyonları (stok solusyon, 1 mg/ml) 595 nm'de ölçülerek belirlenen linear grafiğe göre örneklerin protein değerleri hesaplandıktan sonra elde edilen ölçüm sonuçları ise mg protein g⁻¹ misel ağırlık şeklinde açıklanmıştır.

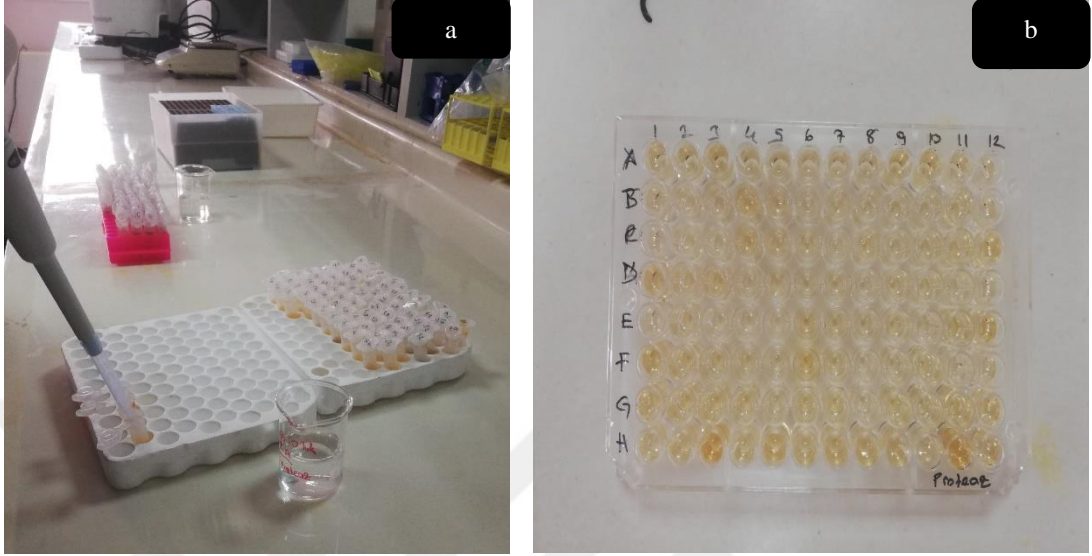


Şekil 3.7. Protein içeriğinin ölçülmesi için supernatantlara Coomassie Brilliant Blue eklenmesi

3.2.6. Proteaz aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada proteaz enzim ölçümü; hücre dışı protease aktivitesi azocasein tabanlı amino asitlerin ve küçük peptitlerin fungal kültürde açığa çıkması esasına dayanarak çalışılmıştır. Bu çalışma için, PDB ortamında gelişmesi sağlanan funguslardan alınan 20 µl supernatant, 1.5 ml hacmindeki Eppendorf tüplerine yerleştirilerek bu tüplerin içerisine 150 µl Tris-HCl (pH 8.8) içerisinde hazırlanan, 1% lik (w/v) azocasein eklenmiştir (hacim, 120 µl). Daha sonra fungal gelişim ve azocasein hidrolizi, tüplerin oda sıcaklığında (+ 23 °C) 60 dakika boyunca inkubasyon işlemine tabii tutulması ve proteolysis (hidrolize uğrayan protein) evresi, ortama 300µl (10%, w/v) soğuk trichloro acetik asit (TCA) eklenmesiyle bitirilmiştir. Bu aşamadan sonra tüpler 15 000 g'de 10 dakika boyunca santrifujlenmesinin ardından, 350 µl supernatant alınıp 30 µl 1 mol L⁻¹ NaOH ile karıştırılarak ve yukarıda anlatılan santrifujleme işleminin bir defa daha yapılmasının ardından proteaz aktivitesi 440 nm spektrofotometrede (Epoch spektrofotometre) ölçülüp; elde edilen sonuçlar, A440

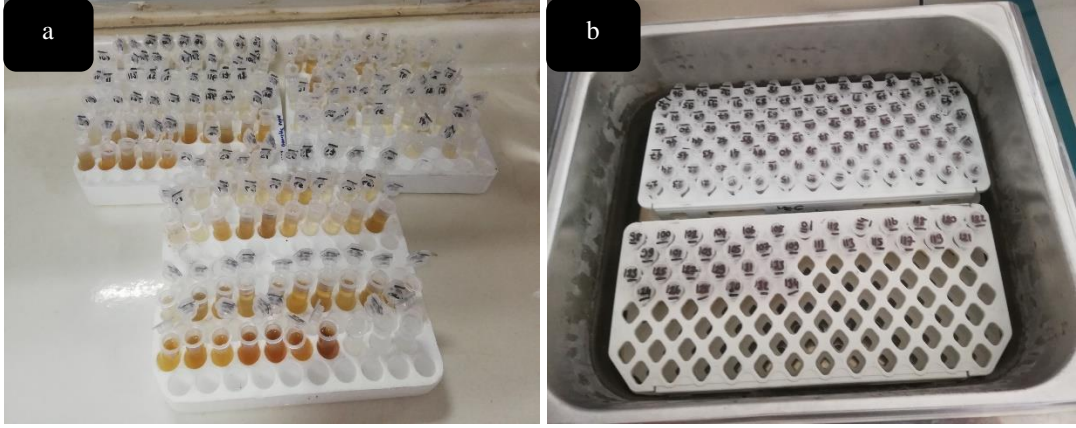
dakika⁻¹ mg⁻¹ protein olarak belirtilmiştir (Girard ve Michaud, 2002; Dikilitaş ve ark., 2018).



Şekil 3.8. Proteaz aktivitesi analizine hazırlık aşamaları (a) Proteaz ölçümünün yapılabilmesi için supernatantlar içerisine TCA (Trichloro acetik asit) eklenmesi (b) Supernatantlar içerisine azocasein eklenmiş son hali

3.2.7. Melanin Analizi

Melanin analizi ve özütlenmesi Gadd (1982)'e göre yapılmaktadır. Gadd (1982)'a göre melanin ekstraksiyonu ve analizi yapılmıştır. Çalışmada belirtilen fungusun besi ortamından 300 µl alınarak Eppendorf tüpler içerisine aktarılan karışım 15 dakika boyunca 120 °C'de otoklav işlemine tabii tutulmuştur. Bununla birlikte, alkalın pigment ekstraktı konsantre halde bulunan HCl ile asitlendirilmesi (pH) ile melanin çöktürülerek, oluşan bu çökelti nemden arı ortamda 20°C'de bir gece boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Melanin analizinin Spektrofotometrede okuması amacıyla kuruması sağlanan pelletler 1 ml NaOH (1 mol L⁻¹) içinde 80 °C'de 180 dakika boyunca çözündürüldükten sonra 12 000 g'da 10 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldıktan sonra Supernatant yeni tüpler içerisine aktarılmış ve daha sonra absorbans 405 nm'de okunmuştur.



Şekil 3.9. Melanin analizi (a) Supernatantlara NaOH ve HCL eklenip hazırlanması (b) Ölçüm için eppendorf tüplerinin gece boyu bekletilme aşaması



Şekil 3.9. Supernatantların spektrofotometrede okutulması

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmaların istatistiksel analizleri SPSS No. 23 ile varyans analiz (One-way ANOVA) metodu ile belirlenmiştir. Ortalamalar arasında oluşan farklılıklar Duncan's Multiple Range Test ile elde edilmiştir. İstatistiksel açıdan 0.05 ($p < 0.05$) olan değerler önemli olarak kabul görmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Fiziksel Parametreler

4.1.1. Fungusun miselyal ağırlığı ve toplam spor sayısı

Penicillium expansum fungusunun farklı ağır metal konsantrasyonları içeren ortamlardaki reaksiyonlarını belirlemek amacıyla inkübasyonun 8. gününde spor sayımı ve miselyal ağırlığı hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre *P. expansum* fungusu 0-500 ppm arası artan ağır metal konsantrasyonlarına maruz kaldığında hem miselyal ağırlığını hem de üretilen spor sayısını olumsuz yönde etkilediği görülmüştür. Bu belirgin etki hem spor hem de miselyal ağırlıkta 100 ppm'den sonra kendini göstermiştir. 100 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda misel ağırlık minimal düzeyde gerçekleşmiştir. Ortamda hiç besin elementi olmadan gelişen fungus grubu (N= Negatif kontrol, saf su) gibi gelişim göstermiş bu durum yüksek ağır metal konsantrasyonlarında fungal etmenin besin elementini alamadığı şeklinde yorumlanmıştır. Benzer sonuçlar Levinskaite (2021), tarafından *P. funiculosum* fungusunda da tespit edilmiştir. Fungal etmenin gelişim geriliği göstermesini besin elementinin yeterli düzeyde alınamaması ve asimile edilememesine bağlamıştır.

Yine spor sayısına bakıldığında 100 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda fungal sporulasyon minimal düzeyde gerçekleşmiş ya da hiç gerçekleşmemiştir. Benzer durum fungal sporulasyonun saf su ortamındaki sporulasyon gibi görülmüştür. Yani ortamda besin içeriği olmadan bırakılan fungal sporulasyonunun gelişmemesi ve çoğalmaması gibi yüksek ağır metal konsantrasyonlarında da fungal sporulasyon herhangi bir gelişim göstermemiştir. Fungal sporulasyonu miselyal ağırlık ile gelişimi paralel seyretmiş hatta sporulasyonun ağır metal konsantrasyonlarından daha fazla etkilendiği görülmüştür. Benzer ifadeler Da Silva Junior (2018), tarafından *Chaetomium aureum* fungusunda miselyal ağırlık ve sporulasyon karşılaştırıldığında da görülmüştür. Genel olarak sporulasyon kısmı generatif çoğalma ile ilgili

olduğundan en düşük stres faktörlerinin generatif periyodu vejetatif periyottan daha fazla etkilediği bilinmektedir.

Ağır metaller açısından kıyaslama yapıldığında ise çalışmada kullanılan ağır metallerin benzer toksik etkiye sahip olduğu sporulasyon ve miselyal ağırlığı benzer etki mekanizması ile olumsuz yönde etkilediği görülmüştür.

4.1.2. Fungusun EC ve pH değerleri

Fungusun ağır metal içeren ortamlarda pH ve EC değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. *P. expansum* fungusunun pH ve EC değerleri farklı ağır metal konsantrasyonları incelendiğinde pH değeri asidik bir yapıya dönüşmüş ancak artan konsantrasyonlarda ağır metallerin pH değerini ciddi oranda değiştirmediği görülmüştür. Ortamın pH’sı artan konsantrasyonlarla birlikte hemen hemen aynı düzeyde asidik olarak kalmıştır. Fungal etmen PDB içerisinde gelişim gösterdiği ortamı hafif asidik yapıdan (pH= 6.4 - 5.4) asidik yapıya (pH= 4) dönüştürdüğü bilinmektedir. Bu durum, Çapa (2022) tarafından da ifade edilmiş, fungal etmenin gelişim periyodu boyunca bulunduğu ortamı kademeli olarak asidik yapıya dönüştürdüğü tespit edilmiştir. Çapa (2022), asidik yapıya dönüşmede *P. expansum*’un miselyal yapısı tarafından ortama bırakılan H⁺ iyonunun pH’ın asidik yapıya dönüşmesinde etkili olduğunu ifade etmiştir (Huang ve ark., 2021).

EC değeri de artan ağır metal konsantrasyonlarda incelenmiş ancak 50 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda ortamın elektriksel iletkenliğini hemen artırdığı tespit edilmiştir. Artan ağır metal konsantrasyonunun EC metrenin değer aralığının dışında olmasından dolayı ölçüm sonuçları 50 ppm’lik ağır metal değerleri ile aynı bulunmuştur. Dolayısı ile daha yüksek orandaki EC değerleri ölçülemediği. Burada şunu ifade etmek önemlidir; 50 ppm ve üzeri ağır metal konsantrasyonlarının bulunduğu PDB solusyonu seyreltilerek EC okuması gerçekleştirilebilirdi ancak bu durumun elde edilen seyreltilme katsayısı ile EC değeri teorik olarak hesaplanabilir ve çok daha yüksek EC değerleri elde edilebilirdi. Ancak bu durum pratikte herhangi bir

fayda sağlamayacağı gibi fungusun EC değerlerinin düşük dozdaki metal konsantrasyonunda bile üst sınıra ulaştığı görüldüğünden seyreltme yolu ile EC belirlenmesi yapılmamıştır. Yani ağır metal konsantrasyonu fungal miselyal yapının elektron dengesini bozmuş ve elektriksel iletkenliğini olumsuz yönde geri dönülemeyecek şekilde etkilemiştir. Bu konsantrasyonların miselyal gelişim sırasında fungal misellerinden çıkan H⁺ iyonunu da etkilediği görüldüğünden yine ortam benzer şekilde minimal pH seviyesi ile devam etmiştir. Dolayısı ile ölçülebilen değerdeki pH ile ölçüm aralığı dışındaki elektriksel iletkenlik fungal gelişimi düşük konsantrasyonlarda bile etkilemiş ve minimal düzeyde fungal gelişim gerçekleşmiştir (Joo, 2012).

Çizelge 4.1. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişen *P. expansum* 'un fizyolojik parametreleri

Konsantrasyon (ppm)	Nikel Sülfat (NiSO ₄)		Kurşun Sülfat (PbS ₂)		Kurşun Nitrat Pb(NO ₃) ₂		Kadmiyum Nitrat (Cd(NO ₃) ₂)	
	M.A. (g)	Toplam spor sayısı (x 10 ⁶)	M.A. (g)	Toplam spor sayısı (x 10 ⁶)	M.A. (g)	Toplam spor sayısı (x 10 ⁶)	M.A. (g)	Toplam spor sayısı (x 10 ⁶)
(Saf Su)	0.30 ± 0.01	76	0.3 ± 0.04	51	0.44 ± 0.07	42	0.76 ± 0.29	62
(PDB)	2.68 ± 0.67 ^a	1478 ^a	3.06 ± 0.43 ^a	1164 ^a	2.82 ± 0.56 ^a	1220 ^a	2.23 ± 0.33 ^a	1042 ^a
50	0.95 ± 0.03	487 ^b	0.88 ± 0.02 ^b	572 ^b	1.31 ± 0.38 ^b	643 ^b	1.60 ± 0.22 ^b	164 ^b
100	0.78 ± 0.02 ^c	224 ^c	0.76 ± 0.13 ^b	216 ^c	1.18 ± 0.18 ^b	286 ^c	1.15 ± 0.20 ^b	27 ^c
150	0.42 ± 0.09 ^c	76 ^c	0.49 ± 0.22 ^c	107 ^c	1.34 ± 0.34 ^b	124 ^c	-	-
200	0.42 ± 0.07 ^c	0	0.62 ± 0.13 ^b	44 ^c	1.39 ± 0.44 ^b	32 ^c	-	-
250	0.34 ± 0.03 ^c	0	0.33 ± 0.04 ^c	0	1.39 ± 0.58 ^b	0	-	-
400	0.30 ± 0.21 ^c	0	0.21 ± 0.07 ^c	0	0.33 ± 0.11 ^c	0	-	-
500	0.21 ± 0.07 ^b	0	0.45 ± 0.15 ^c	0	0.55 ± 0.18 ^c	0	-	-

M.A; misel ağırlığı (g); Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak P≤0.05 değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişme gösteren *P. expansum* 'un fizyolojik parametreleri

Konsantrasyon (ppm)	Nikel Sülfat (NiSO ₄)		Kurşun Sülfat (PbS ₂)		Kurşun Nitrat Pb(NO ₃) ₂		Kadmiyum Nitrat (Cd(NO ₃) ₂)	
	pH	EC (ms /cm)	pH	EC (ms /cm)	pH	EC (ms /cm)	pH	EC (ms /cm)
(Saf Su)	4.8	0.062	3.8	0.092	6.3	0.055	4.2	0.084
(PDB)	3.5	1.173	3.3	1.231	3.1	1.136	3.5	1.135
50	3.7	-	3.3	-	3.3	-	4.1	-
100	3.8	-	3.6	-	3.2	-	4.3	-
150	3.7	-	3.3	-	3.1	-	-	-
200	3.7	-	3.4	-	3	-	-	-
250	3.6	-	3.2	-	2.9	-	-	-
400	3.6	-	3.1	-	2.7	-	-	-
500	3.5	-	3.3	-	2.6	-	-	-

pH: *P. expansum* 'un yetiştiği ortamın pH derecesi; EC: *P. expansum* 'un yetiştiği ortamın elektriksel iletkenlik (EC) derecesi

4.2. Biyokimyasal Parametreler

4.2.1. Fungusun geliştiği ortamın protein içeriği ve protez aktivitesinin belirlenmesi

Farklı ağır metal konsantrasyonlarındaki *P. expansum* fungusunun proteaz ve protein içeriği incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3'te ifade edilmiştir. Kurşun sülfat ve kurşun nitrat ile ilgili veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak kadmiyum nitrat ile ilgili yapılan çalışmalarda proteaz enzim içeriği nikel sülfat içeren ortamlarda 100 ppm'den sonra ciddi düşüş gerçekleşmiş, kadmiyum nitratta ise 50 ppm'den sonra önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Madhi (2022), tarafından funguslarda yapılan çalışmada Pb ve Cd ağır metallerinin proteaz enzim aktivitesinin ağır metal konsantrasyonlarından etkilendiğini ve enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir.

Protein içerikleri açısından bakıldığında ise bütün ortamlarda fungal etmenler protein üretme yeteneğine sahip olmuşlar ancak protein içeriği istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Chakraborty (2014), tarafından *Aspergillus foetidus* fungusunda yapılan çalışmada protein içeriğinde azalma tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ortama verilen protein içeriğinin fungal etmen tarafından sentezlenen protein olduğu bilinmekte ancak bu proteinin savunma proteini mi yoksa miselyal proteininin toplam proteini mi olduğu tespit edilmemiştir. Yani fungal proteinin yapısı hakkında bir çalışma yapılmamıştır ancak metabolit sentezinden proteinlerin stres altında da aktif olduğu fakat yüksek konsantrasyonlarda sadece proteinin varlığı belirlenmiş ancak bunun canlılıkla ilgisi tespit edilememiştir.

Buradaki enzim ölçümleri miseller tarafından ortama verilen hücre dışı enzim olduğu için minimal düzeyde gerçekleşen miselyal gelişimin yeterli düzeyde olmamasından dolayı 100 ppm'den sonra miselyal gelişim olmadığı için enzimsel gelişim de olmamıştır.

4.2.2. Fungal etmenin melanin değerleri

Fungusun melanin iğeriği farklı ağır metal konsantrasyonlarında llmstr. Ortama bırakılan melanin iğeriği 50 ppm seviyesinde bütün ağır metal konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir. Bu artış 150 ppm seviyesine kadar yüksek derecede devam etmiştir. Daha sonra melanin sentezi minimal düzeyde gerçekleşmiştir (izelge 4.4). Gadd (2021), tarafından *Aureobasidium pullulans* ve *Cladosporium resinae* fungusları üzerine yapılan bir çalışmada bakır içeren kültürlere melanin eklenmesi toksisitede bir miktar azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişme gösteren *P. expansum* 'un geliştiği ortamın protein içeriği (fungusun ortama bıraktığı protein içeriği) ve proteaz seviyeleri

Konsantrasyon (ppm)	Nikel Sülfat (NiSO ₄)		Kurşun Sülfat (PbS ₂)		Kurşun Nitrat Pb(NO ₃) ₂		Kadmiyum Nitrat (Cd(NO ₃) ₂)	
	Proteaz (A ₄₄₀ dak ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Protein içeriği (mg protein ml ⁻¹)	Proteaz (A ₄₄₀ dak ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Protein içeriği (mg protein ml ⁻¹)	Proteaz (A ₄₄₀ dak ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Protein içeriği (mg protein ml ⁻¹)	Proteaz (A ₄₄₀ dak ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Protein içeriği (mg protein ml ⁻¹)
(Saf Su)	0.62 ± 0.33	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.13 ± 0.00
(PDB)	0.69 ± 0.03^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.04 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.02^a	0.13 ± 0.01 ^a
50	0.62 ± 0.34^b	0.15 ± 0.00 ^a	0.17 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.43 ^a	0.17 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.00 ^a
100	0.45 ± 0.01 ^c	0.21 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.02 ^b	0.19 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.07 ^b	0.25 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.05 ^b	0.13 ± 0.01 ^a
150	0.44 ± 0.03 ^c	0.18 ± 0.00 ^a	0.27 ± 0.05 ^b	0.16 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	0.57 ± 0.17 ^a	-	-
200	0.28 ± 0.05 ^c	0.19 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.02 ^b	0.18 ± 0.00 ^a	0.36 ± 0.09 ^c	0.82 ± 0.17 ^a	-	-
250	0.30 ± 0.00 ^c	0.19 ± 0.00 ^a	0.14 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.00 ^a	0.17 ± 0.02 ^b	0.67 ± 0.22 ^a	-	-
400	0.14 ± 0.08 ^c	0.22 ± 0.13 ^a	0.09 ± 0.05 ^c	0.21 ± 0.12 ^a	0.20 ± 0.11 ^b	1.75 ± 1.01 ^a	-	-
500	0.25 ± 0.1 ^c	0.23 ± 0.13 ^a	0.22 ± 0.12 ^b	0.21 ± 0.12 ^a	0.11 ± 0.06 ^b	0.54 ± 0.31 ^a	-	-

Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Koyu renkli rakamlar P<0.05 düzeyinde diğerlerinden önemli bulunmuştur. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak P<0.05 değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

Çizelge 4.4. Farklı ortamlarda (nikel sülfat, kurşun sülfat, kurşun nitrat, kadmiyum nitrat) gelişme gösteren *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan melanin seviyeleri

Konsantrasyon (ppm)	Melanin (Δ Absorbans mg protein ⁻¹)			
	Nikel Sülfat (NiSO ₄)	Kurşun Sülfat (PbS ₂)	Kurşun Nitrat Pb(NO ₃) ₂	Kadmiyum Nitrat (Cd(NO ₃) ₂)
(Saf Su)	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.04
(PDB)	0.27 ± 0.04 ^a	0.36 ± 0.13 ^a	0.33 ± 0.10 ^a	0.33 ± 0.10 ^a
50	0.80 ± 0.26 ^b	0.64 ± 0.19 ^a	0.38 ± 0.06 ^a	0.77 ± 0.63 ^b
100	0.71 ± 0.13 ^c	1.00 ± 0.58 ^b	0.35 ± 0.04 ^a	0.59 ± 0.35 ^b
150	0.78 ± 0.15 ^c	0.73 ± 0.28 ^c	0.37 ± 0.03 ^a	-
200	0.27 ± 0.19 ^c	0.29 ± 0.22 ^c	0.25 ± 0.17 ^b	-
250	0.24 ± 0.09 ^c	0.32 ± 0.09 ^c	0.20 ± 0.07 ^b	-
400	0.20 ± 0.41 ^c	0.23 ± 0.13 ^c	0.22 ± 0.65 ^c	-
500	0.20 ± 0.60 ^b	0.11 ± 0.06 ^c	0.25 ± 0.32 ^b	-

Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak $P \leq 0.05$ değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Penicillium expansum fungusu ağır metal konsantrasyonlarından olumsuz yönde etkilenmiş, artan ağır metal konsantrasyonlarında *P. expansum*'un miselyal ağırlığı ve sporulasyonu minimal düzeyde gerçekleşmiştir. Çalışmada kullanılan ağır metaller açısından (etki mekanizması) herhangi bir fark görülmemiş, bütün ağır metaller benzer toksik etkiye sahip olmuştur. Fungusun ağır metal konsantrasyonlarında strese girdiği ve toksik etki belirgin bir şekilde görülmüştür. Ancak 100 ppm ve üzeri ağır metal konsantrasyonlarından sonra tolerans yeteneğini kaybettiği görülmüştür. Hatta elde edilen sonuçlara göre 100 ppm'e kadar ki konsantrasyonlarda sporulasyona devam ettiği bilindiğinden çevre kirliliği ve ağır metal toksisitesini belirli bir düzeye kadar tolere edebileceği hatta bu konsantrasyonlarda adapte kabiliyetini geliştirebileceği ön görülmüştür.

Fungusun gelişimi ile birlikte ortam pH'sının düştüğü ağır metallerin pH'sının düşmesine ciddi katkı sağladığı ve elektriksel iletkenliğin arttığı görülmüştür. Yine bu şartlarda 100 ppm'e kadar gelişim göstermiştir. Fungusun asidik şartlarda da enfeksiyon yapabileceği değerlendirilmiştir. Ağır metal konsantrasyonlarında protein içeriği anlamsız bulunmuştur. Proteaz enzimi ve melanin ise 100 ppm'den sonra düşüş göstermiş bu durum fungusun hem enzim hem de stres metabolitlerini daha fazla sentezleyemediği anlamına gelmiştir. Bu veriler ile fungusun 100 ppm'e kadar rahatlıkla tolere edebileceği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- ALLOWAY, B. J., 2013. Sources of heavy metals and metalloids in soils, In: Heavy metals in soils, Eds: Springer, p. 11-50.
- ASATI, A., PÍCHHODE, M. and NÍKHİL, K., 2016. Effect of heavy metals on plants: an overview, *Int. J. Appl. Innov. Eng. Manage*, 5, 2319-4847.
- ATSDR 2017. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>, Erişim Tarihi: 25.03.2018, Konu: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)'s Substance Priority List*.
- AYHAN, K., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamalar. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü Yayını, 1-552.
- BAKAR, R., ve LEBLEBİCİ, Z. 2021. Çinko oksit nanopartikülünün (ZnO NP) *Pistia stratiotes* l (su marulu) tarafından akümülyasyon yeteneğinin belirlenmesi ve nanopartikülün toksik etkisinin incelenmesi.
- BOND, J. S. 2019. Proteases: History, Discovery, And Roles In Health And Disease. *Journal Of Biological Chemistry*, 294(5), 1643-1651.
- CHAKRABORTY, S., MUKHERJEE, A., KHUDA BUKHSH, A. R., and DAS, T. K. 2014. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 106, 46-53.
- CHAMI ZA, AMER N, BİTAR AL, and CAVOSKİ I 2015. Potential use of *Sorghum bicolor* and *Carthamus tinctorius* in phytoremediation of nickel, lead and zinc 12(12): 3957–3970
- CHEN, Z., YU, L., LIU, W., ZHANG, J., WANG, N., and CHEN, X., 2021. Research Progress Of Fruit Color Development In Apple (*Malus Domestica* Borkh.). *Plant Physiology And Biochemistry*.
- CHIBUIKE, G. U. and OBİORA, S. C., 2014. Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods, *Applied and Environmental Soil Science*, 2014.
- ÇAPA, B., 2022. Elma Maviküf (*Penicillium expansum*) Hastalık Etmeninin Glukoz, Sukroz ve Vitamin C'ye Karışı Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, şanlıurfa, 52s.
- ÇÖMETEN, H., 2019. Trafik kaynaklı ağır metal kirliliğinin izlenmesinde sarıçam (*Pinussylvestris* L.) ibrelerinin biyomonitor olarak kullanılabilirliğı. Kastamonu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi
- D'REAUMUR, RAF., 1752. Observations sur la digestion des oiseaux. *Histoire de l'academie royale des sciences*. 1752: 266, 461.
- DA SILVA JÚNOR, F. M. R., VOLCÃO, L. M., HOSCHA, L. C., and PEREİRA, S. V. 2018. Growth of the fungus *Chaetomium aureum* in the presence of lead: implications in bioremediation. *Environmental Earth Sciences*, 77(7), 1-8.
- DEVI, R., YADAV, S. and PUNDİR, C. S., 2011. Electrochemical detection of xanthine in fish meat by xanthine oxidase immobilized on carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film, *Biochemical Engineering Journal*, 59, 148-153.

- DHAKAR, K., SHARMA and PANDEY, A., 2014. Cold, pH and salt tolerant *Penicillium* spp. Inhabit the high altitude soils in Himalaya, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36s.
- DIKILITAS, M., and KARAKAŞ, S., 2014. Crop Plants Under Saline Adapted Fungal Pathogens: An Overview. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*, Chapter 8, Volume II A sustainable Approach, London, Sydney, San Francisco, Elsevier Academic Press. pp. 173-185.
- DIKILITAS, M., OĞUZ, A. Ç., and KARAKAYA, A., 2018. Extracellular Protease Activity And Glucose Production In Isolates Of Net Blotch Pathogens Differing In Virulence. *Zemdirbyste-Agriculture*, 105(1).
- DIKILITAS, M., OĞUZ, A.Ç. and KARAKAYA, A., 2018. Extracellular Protease Activity And Glucose Production In Isolates Of Net Blotch Pathogens Differing In Virulence. *Zemdirbysite-Agriculture*,105(1): 89-94.
- DUKARE, A. S., S. PAUL, V. E. NAMBI, R. K. GUPTA, R. SINGH, K. SHARMA, and VISHWAKARMA, R. K., 2019. Exploitation Of Microbial Antagonists For The Control Of Postharvest Diseases Of Fruits: A Review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition* 59 (9):1498–513.
- FU, F. and WANG, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters, A review, *Journal of Environmental Management*, 92, 407-418.
- GONÇALVES, B. L., COPPA, C. F. S. C., NEEFF, D. V. D., CORASSIN, C. H., and OLIVEIRA, C. A. F., 2019. Mycotoxins In Fruits And Fruit-Based Products: Occurrence And Methods For Decontamination. *Toxin Reviews*, 38(4), 263-272.
- GADD, G. M., and DE ROME, L. 1988. Biosorption of copper by fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology*, 29(6), 610-617.
- GIRARD C., and MICHAUD D., 2002. Direct Monitoring Of Extracellular Protease Activities In Microbial Cultures. *Analytical Biochemistry*, 38: 388-391.
- GRACE, N. and LEE, J., 1990. Effect of Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn supplementation on the elemental content of soft tissues and bone in sheep grazing ryegrass/white clover pasture, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33 (4), 635-647.
- HEMAMOORTHY, T. and PRAKASAM, V., 2013. First report of *Penicillium expansum* causing bulb rot of liliun in India, *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13 (3), 293-295.
- HUANG, X., REN, J., LI, P., FENG, S., DONG, P., and REN, M., 2021. Potential Of Microbial Endophytes To Enhance The Resistance To Postharvest Diseases Of Fruit And Vegetables. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 101(5), 1744-1757.
- IPEK, B., 2016. Amasya Yöresinden Toplanan Bazı Yenilebilir Mantarlarda Ağır Metal Analizleri, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 18-44.
- JENKINS, K., 1989. Effect of copper loading of preruminant calves on intracellular distribution of hepatic copper, zinc, iron and molybdenum, *J. Dairy Sci*, 72 (9), 2346-2350.
- J.F., DAVIS, K.J., URBAN, N.M., KELLER, K., and SALIENDRA, N.Z., 2011. Upscaling carbon fluxes from towers to the regional scale influence of parameter

- variability and land cover representation on regional flux estimates. *Agricultural and Forest Meteorology*, 197: 142-157.
- JIBRIL S.A., HASSAN S.A., ISHAK, C.F. and WAHAB P.E.M. 2017. Cadmium toxicity affects phytochemicals and nutrient elements composition of lettuce (*Lactuca sativa L.*), *Advances in Agriculture*, 1- 7.
- JOO, J. H., and HUSSEİN, K. A. 2012. Heavy metal tolerance of fungi isolated from contaminated soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 45(4), 565-571.
- KABATA PENDİAS, A., 2010. Trace elements in soils and plants, CRC press, p.
- KABATA PENDİAS, A., 2011. Trace elements in soils and plants, 4th edn. CRC Press, Boca Raton
- KAHVECIOĞLU, Ö., KARTAL, G., GÜVEN, A., ve TİMUR, S., 2007. Metallerin Çevresel Etkileri–I. (erişim adresi: www.metalurji.org.tr /dergi /dergi 136 /d136_4753.pdf)
- KAHVECIOĞLU, Ö., KARTAL, G., GÜVEN, A. ve TİMUR, S., 2017. Metallerin Çevresel Etkileri-I, *TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.
- KARACA, A., ve TURGAY, O.C., 2012. Toprak Kirliliği. *Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi*. 1(1):13-19.
- KILIÇ, G., 2019. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Penicillium expansum* Fungusunun Protein İçeriği Ve Proteaz Enzimi Üzerine Etkileri. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 62s.
- KÖHN, J., WENNEKER, M., GROENENBOOM DE HAAS, B.H., ANBERGEN, R., GOOSSEN VAN DE GEIJN, H.M., LOMBAERS VAN DER PLAS, C.H., PINTO, F.A.M.F., and KASTELEİN, P., 2018. Dynamics Of Post-harvest Pathogens *Neofabraea* Spp. And *Cadophora* Spp. In Plant Residues In Dutch Apple And Pear Orchards, *Plant Pathol*, 67 (2018), Pp. 1264-1277.
- KÖSTEKÇİ, H., 2017. Yeni sentezlenen bazı schiff bazlarının ve metal komplekslerinin floresans özellikleri incelenerek sularda metal analizinde kullanılabilirliğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 4-9.
- LEVINSKAITE, L. 2001. Effect of heavy metals on the individual development of two fungi from the genus *Penicillium*. *Biologija*, 1, 25-30.
- LINK, J. H. F., 1809. Observation in ordines plantarum naturales. *Berlin Magazin. Naturkunde*, 3: 3-42.
- LUCIANO ROSARIO, D., KELLER, N. P., and JURICK, W. M. 2020. *Penicillium expansum*: Biology, Omics, And Management Tools For A Global Postharvest Pathogen Causing Blue Mould Of Pome Fruit. *Molecular Plant Pathology*, 21(11), 1391-1404.
- MADHI, Q. H., ABASS, M. H., and MATROOD, A. A. A. 2021. The effect of lead and cadmium on some physiological characteristics of the fungi that cause wheat damping-off and some biological fungi. *Iranian Journal of Ichthyology*, 8, 412-426.
- MANJEET, K., DHILLON, S., CHAUDHARY, S. and SINGH R., 1998. Production, Purification And Characterization Of A Thermostable Alkaline Protease From *Bacillus Polymyxa*. *Indian. J. Microbiol*, 38: 63-67.

- MILIĆ, D., LUKOVIĆ, J., NINKOV, J., ZEREMSKI ŠKORIĆ, T., ZORIĆ, L., VASIN, J. and MILIĆ, S., 2012. Heavy metal content in halophytic plants from inland and maritime saline areas, *Central European Journal of Biology*, 7 (2), 307-317.
- NAETS, M., VAN DAEL, M., VANSTREELS, E., DAELEMANS, D., VERBOVEN, P., NICOLAI, B., KEULEMANS, W., and GEERAERD, A., 2018. To Disinfect Or Not To Disinfect In Postharvest Research On The Fungal Decay Of Apple. *International Journal Of Food Microbiology*, 266, 190–199.
- NAGAJYOTI, P. C., LEE, K. D. and SREEKANTH, T., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review, *Environmental chemistry letters*, 8 (3), 199-216.
- ÖZBOLAT, G. ve TULI, A., 2016. Ağır Metal Toksisitesinin İnsan Sağlığına Etkileri, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25 (4), 502-521.
- ÖZKAN, A., 2017. Antakya-Cilvegözü Karayolu Etrafındaki Tarım Arazilerinde ve Bitkilerdeki Ağır Metal Kirliliği. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi* 32(3): 9-18
- PITT, J.I., and HOCKING, A.D., 2000. *Fungi And Food Spoilage* Vol. II, ed. Pitt, J. I. And Hocking, A.D. London. Blackie Academic And Professional, 15-45.
- PRIAC A., BADOT P.M. and CRINI G. 2017. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters, *Comptes Rendus Biologies*, 340, 188–194.
- RODRÍGUEZ EUGENIO, N., MCLAUGHLIN, M. and PENNOCK, D., 2018. Soil pollution: A hidden reality.
- ROSA, L.H., VIEIRA, L.M.A., SANTIAGO I.F., and ROSA, C.A., 2010. Endophytic Fungi Community Associated With The Dicotyledonous Plant *Colobanthus Quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) In. *FEMS Microbiol Ecol* 73:178–189.
- SACRISTÁN D., RECATALÁ L. and VISCARRA ROSSEL R.A. 2015. Toxicity and bioaccumulation of Cu in an accumulator crop (*Lactuca sativa* L.) in different Australian agricultural soils, *Scientia Horticulturae* 193, 346–352.
- SAKAKIBARA, M., OHMORI, Y., HA, N. T. H., SANO, S. and SERA, K., 2011. Phytoremediation of heavy metal-contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*, *CLEAN–Soil, Air, Water*, 39 (8), 735-741.
- SCHULZE, E., BECK, E. and MÜLLER HOHENSTEIN, K., 2005. *Plant Ecology*. Vol. 12, Springer, Berlin-Heidelberg.
- SEVEN, T., CAN, B., DARENDE, B. ve OCAK, S., 2018. Hava ve toprakta ağır metal kirliliği, *Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1 (2), 91-103.
- SHABANI, N. and SAYADI, M., 2012. Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study, *The Environmentalist*, 32 (1), 91-98
- SHERAMETI, I. and VARMA, A., 2010. *Soil heavy metals*, Springer, p.
- SOUDEK P, PETROVÁ S, VANĀKOVÁ R, SONG J, and VANEĀK T., 2014. Accumulation of heavy metals using *Sorghum* sp. *Chemosphere* 104: 15–24
- SUN, Y., ZHOU, Q., XU, Y., WANG, L. and LIANG, X., 2011. The role of EDTA on cadmium phytoextraction in a cadmium-hyperaccumulator *Rorippa globosa*, *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3 (3), 45-51.
- TANNOUS, J., D. KUMAR, N. SELA, E. SIONOV, D. PRUSKY, and N. P. KELLER. 2018. Fungal Attack And Host Defence Pathways Unveiled In Near-

- Avirulent Interactions Of *Penicillium expansum* Crea Mutants On Apples. *Molecular Plant Pathology* 19 (12):2635–50.
- TEMUR, C., 2012. Elmalarda Hasat Sonu Çürüklüğü Oluşturan *Penicillium expansum*'un Işınlama ve Işınlama+Sodyum Karbonat Kombine Uygulamasıyla Engellenmesi Üzerine Araştırmalar. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 85s.
- TIKVESLI, M., 2013. Edirne'de üç ayrı camideki halı ve havadaki mikrobiota. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- TIWARI, K., JADHAV, S. and KUMAR, A., 2011. Morphological and molecular study of different *Penicillium* species, *Middle-East J Sci Res*, 7 (1), 203-210.
- VIDAL, A., OUHIBI, S., GHALI, R., HEDHILI, A., DE SAEGER, S., and DE BOEVRE, M. 2019. The Mycotoxin Patulin: An Updated Short Review On Occurrence, Toxicity And Analytical Challenges. *Food And Chemical Toxicology*, 129, 249-256.
- VISAGIE, C. M., 2008. Biodiversity in the Genus *Penicillium* from coastal fynbos soil, *Stellenbosch: Stellenbosch University*.
- VISAGIE, C., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J. C., HONG, S. B., KLAASSEN, C., PERRONE, G., SEIFERT, K., VARGA, J., YAGUCHI, T. and SAMSON, R., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*, *Studies in mycology*, 78, 343-371.
- VURAL, H., 1993. Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler, *Çevre Dergisi*, 8, 3-8.
- WANG, K., NGEA, G. L. N., GODANA, E. A., SHI, Y., LANHUANG, B., ZHANG, X., and ZHANG, H., 2021. Recent Advances In *Penicillium expansum* Infection Mechanisms And Current Methods In Controlling P. *Expansum* In Postharvest Apples. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 1-14.
- WANG, X., LU, D., and TIAN, C., 2021. Analysis Of Melanin Biosynthesis In The Plant Pathogenic Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fungal Biology*.
- WOLF M., BARETTA D., BECEGATO V.A., ALMEIDA V.C. and PAULINO A.T. 2017. Copper/Zinc Bioaccumulation and the Effect of Phytotoxicity on the Growth of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Non-contaminated, Metal-Contaminated and Swine Manure-Enriched Soils, *Water Air Soil Pollution*, 228, 152, 1-9.
- WUANA, A.R., and OKIEIMEN, F.E., 2011. HeavyMetals in Contaminated Soils: A Review of Sources. Chemistry. Risks and Best Available Strategies for Remediation. International Scholarly Research Network ISRN Ecology. Article ID 402647.
- XIAO, J.F., DAVIS, K.J., URBAN, N.M., KELLER, K., and SALIENDRA, N.Z., 2011. Upscaling carbon fluxes from towers to the regional scale influence of parameter variability and land cover representation on regional flux estimates. *Agricultural and Forest Meteorology*, 197: 142-157.
- YILMAZ, Ö., 2010. Edirne ilindeki huzurevinin farklı bölümlerindeki iç ortam havası fungal flora ve bakteri konsantrasyonunun belirlenmesi. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Edirne*.

- ZHANG, M.K., LIU, Z.Y., and WANG, H., 2010. Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41: 7, pp. 820–831.
- ZHANG B, SHANG S, JABEEN Z, and ZHANG G 2014. Involvement of ethylene in alleviation of Cd toxicity by NaCl in tobacco plants *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 101: 64–69
- ZHDANOVA, N.N., ZAKHARCHENKO, V.A., VEMBER, V.A., and NAKONECHNAYA, L.T., 2000. Fungi From Chernobyl: Mycobiota Of The Inner Regions Of The Containment Structures Of The Damaged Nuclear Reactor. *Mycology Research* 104:1421–1426.

