



## Metagenomic Characterization of Heavy Metal-Fungal Microbiota Interaction in *Pinus brutia* Needles

Melike Çebi Kılıçoğlu<sup>1,a,\*</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun Meslek Yüksekokulu 55100, Samsun, Türkiye

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 10.12.2023 Accepted : 29.08.2024</p> <p><b>Keywords:</b> Environmental Mycology Fungal diversity Heavy metal pollution Metagenomics Samsun OIZ</p>	<p>Fungi are considered an effective method as an alternative solution in the biological remediation of heavy metals. The aim of the study was to determine comparative heavy metal concentrations in <i>Pinus brutia</i> needles taken from Samsun Organized Industrial Zone which have been contaminated with heavy metals for a long time and Adalar Forest region, and to evaluate the fungal mycobiome that could be potential bioremediators. As a result of the study, Cu, Pb, Zn, Mn, Cr, Cd, Ni, Se, As, Li, V and Co elements were analyzed in the needle samples, and the concentrations of Ni, As, Li, V and Co among these elements remained below the detectable limits. For all other elements, the concentrations obtained in the industrial zone was higher than the concentrations obtained in the Adalar region. In addition, as a result of metagenomic analysis, <i>Aureobasidium</i> (27.5%), <i>Gibberella</i> (20.7%), <i>Cladosporium</i> (14%), <i>Articulospora</i> (5.8%), <i>Helicoma</i> (3.1%), <i>Alternaria</i> (1.7%), <i>Hazslinszkyomyces</i> (1.6%) and <i>Lasiodiplodia</i> (1%) were determined in Samsun OIZ <i>Pinus brutia</i> needles, respectively. <i>Phaeococcomyces</i> (22.8%), <i>Hormonema</i> (19.1%), <i>Aureobasidium</i> (13.8%), <i>Cladosporium</i> (6.5%), <i>Alternaria</i> (4.6%), <i>Neosetophoma</i> (%3.1). <i>Rachicladosprium</i> (3%), <i>Ophiosphaerella</i> (2.1%), and <i>Phaeosclera</i> (1.8%) were determined in the Samsun Adalar mycobiome, respectively. The results show that taxa known to be resistant to excess element concentrations are dominant in the environment. In the future, this study may serve as a reference for the development of innovative strategies for remediation of heavy metal pollution using biological resources for a sustainable and clean environment.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(9): 1523-1529, 2024

## *Pinus brutia* İbrelerinde Ağır Metal-Fungal Mikrobiyota Etkileşiminin Metagenomik Karakterizasyonu

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 10.12.2023 Kabul : 29.08.2024</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Çevresel Mikoloji Fungal çeşitlilik Ağır metal kirliliği Metagenomik Samsun OSB</p>	<p>Ağır metallerin biyolojik olarak ıslahında alternatif bir çözüm olarak funguslar etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Çalışmanın amacı, uzun süreli ağır metalle kontamine olmuş Samsun Organize Sanayi Bölgesi ve Adalar Orman bölgesinden alınan <i>Pinus brutia</i> ibrelerinde karşılaştırmalı olarak ağır metal konsantrasyonlarını belirlemek ve potansiyel biyoremediatörler olabilecek mantar mikobiyomunu değerlendirmektir. Çalışma sonucunda ibre numunelerinde Cu, Pb, Zn, Mn, Cr, Cd, Ni, Se, As, Li, V ve Co elementlerinin analizleri yapılmış, bu elementlerden Ni, As, Li, V ve Co element konsantrasyonları belirlenebilir limitlerin altında kalmıştır. Diğer elementlerin tamamında ise Samsun OSB’de elde edilen konsantrasyonlar, Adalar bölgesinde elde edilen konsantrasyonlardan daha yüksek seviyededir. Bunun yanı sıra metagenomik analiz sonucunda, Samsun OSB <i>P. brutia</i> ibrelerinde sırasıyla <i>Aureobasidium</i> (%27,5), <i>Gibberella</i> (%20,7), <i>Cladosporium</i> (%14), <i>Articulospora</i> (%5,8), <i>Helicoma</i> (%3,1), <i>Alternaria</i> (%1,7), <i>Hazslinszkyomyces</i> (%1,6) ve <i>Lasiodiplodia</i> (%1) cinsleri belirlenirken Samsun Adalar mikobiyomunda sırasıyla <i>Phaeococcomyces</i> (%22,8), <i>Hormonema</i> (%19,1), <i>Aureobasidium</i> (%13,8), <i>Cladosporium</i> (%6,5), <i>Alternaria</i> (%4,6), <i>Neosetophoma</i> (%3,1), <i>Rachicladosprium</i> (%3), <i>Ophiosphaerella</i> (%2,1), ve <i>Phaeosclera</i> (%1,8) cinsleri saptanmıştır. Sonuçlar element konsantrasyonundaki fazlalığa dirençli olduğu bilinen taksonların ortamda dominant olduğunu göstermektedir. Gelecekte bu çalışma sürdürülebilir temiz bir çevre için ağır metal kirliliğinin biyolojik kaynaklar kullanılarak iyileştirilmesi yaklaşımlarına yönelik yenilikçi stratejilerin geliştirilmesine referans teşkil edebilir.</p>

[mcebi@omu.edu.tr](mailto:mcebi@omu.edu.tr)

<https://orcid.org/0000-0001-6263-4111>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

## Giriş

Toksik metallerin neden olduğu çevre kirliliği günümüzde endişe verici bir boyuta ulaşmıştır. Hızlı ekonomik ve toplumsal gelişme, artan nüfus, kentleşme ve endüstriyel faaliyetlerin artışı gibi yoğun ağır metal birikimi ile ilişkili tüm olaylar, kontrolsüz metal salınımına neden olmaktadır (Işınkaralar ve ark., 2023; Key ve ark., 2023). Ağır metal kirliliği, toksisitesi, biyolojik olarak parçalanamaması, toprakta, besin ağlarında ve ekosistemin diğer kısımlarında birikiminden dolayı insan ve çevre için büyük tehdit oluşturmaktadır (Jha ve ark., 2022). Geleneksel ağır metal giderme teknolojilerinin çeşitli dezavantajları olmasına karşılık, biyolojik ıslah teknolojileri yüksek oranlarda verimli, rekabetçi, etkili ve çevre dostudur. Son yıllarda biyolojik stratejiler, temel çevresel uyumlulukları ve düşük maliyetleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Bibbins ve ark., 2023).

Ekosistemdeki organik kirleticiler ve ağır metaller gibi stres koşullarından birinci derecede etkilenen canlı grupları, bakteri ve funguslar gibi mikroorganizmalardır (Cuadros-Orellana ve ark., 2013). Metal toksisitesine yanıt olarak, birçok mikroorganizma, zararlı metallere direnmek ve detoksifiye etmek için benzersiz hücre içi veya hücre dışı mekanizmalara sahiptir. Funguslar ağır metal hiperakümülatörleri olarak kabul edilmektedir ve bu toksik metalleri uzaklaştırma ve çevresel kirleticileri iyileştirme konusunda yüksek potansiyele sahip ideal organizmalardır (Refaey ve ark., 2021). Mantarlar, ağır metal ve mataloidlerin biyolojik olarak ıslahını biyosorbsiyon, biyoakümülyasyon, biyotransformasyon ve biyovolatilizasyon ile gerçekleştirmektedir (Singh ve ark., 2021).

Endofitik mantarlar, bitkilerin canlı iç dokularında kolonize olan ve herhangi bir belirgin enfeksiyona neden olmaksızın bitki dokularında simbiyotik olarak yaşayan mikroorganizmalardır (Kaul ve ark., 2012; Rai ve ark., 2021). Bitkinin büyümesine ve çevresel stres koşullarına karşı toleransına katkıda bulunan fungal endofitlerden bazıları ağır metal birikiminin fazla olduğu durumlarda bitki büyümesini destekleyebilmektedir (Li ve ark., 2012). Bu endofitler, bitkilerin ağır metallere karşı toleransını artırmak için onların fotosentetik sistemini, antioksidan sistemini ve hücre duvarı yapısını düzenleyebilir. Ayrıca ağır metalleri hareketsizleştirerek bitkinin ağır metal alımını ve dağılımını sınırlandırarak metallerin bitkiye girişini kısıtlayabilirler (Zheng ve ark., 2023). Bazı endofitik mantarlar konukçu bitkinin stresle ilgili genlerinin ekspresyonunu etkileyerek bitkinin strese karşı direncini tetikleyebilir (Domka ve ark., 2019). Bazı mikroorganizmalar adaptasyonun ötesinde ortamdaki ağır metal kirliliğine karşı ortamı temizleyici organizmalar olarak da görev yapmaktadırlar (Bruins ve ark., 2000). Fungal endofitler, büyük miselyal ağlar oluşturma yetenekleri, katabolik enzimlerinin fazla seçici olmaması, büyüme substratı olarak kirleticilere bağımlı olmamaları nedeniyle ağır metallerin biyoremediasyonu için ideal organizmalardır (Akpaşi ve ark., 2023).

Ağır metaller gibi kirleticileri biyolojik olarak iyileştirme konusunda biyokimyasal yeteneğe sahip olan mantarlar, kirleticilerin giderilmesinde oldukça etkilidir (Anand ve Bharadvaja, 2022). Araştırmalar, ağır metal kontaminasyonunun fazla olduğu bölgelerde yetişmiş bitkilerdeki endofitik mantarların metal kirliliğine karşı daha toleranslı olduğunu ve bu nedenle mikrobiyal destekli

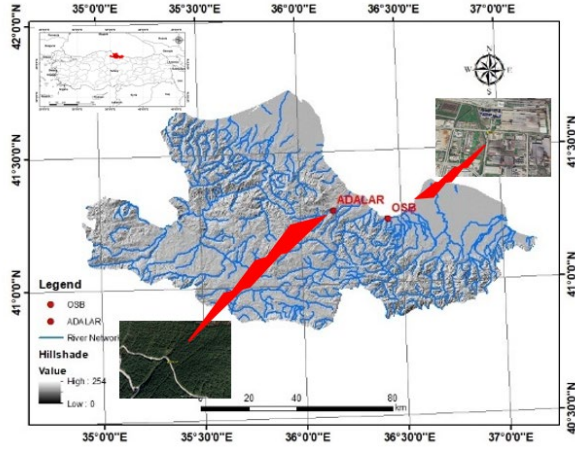
fitoremediasyonda kullanım için potansiyel olarak daha etkili olabileceğini göstermektedir (Domka ve ark., 2019). Endofitik mantarlarında sürece dahil olduğu bitkisel yollarla ağır metallerin ıslahını (fitoremediasyon) anlayabilmemiz için bitki ile ilişkili mikroorganizmaların çeşitliliğini ve ekolojisini daha iyi anlamamız gerekmektedir. Bu nedenle, etkili bir mikoremediasyon elde etmek için belirli kirleticileri hedefleyen mantar türlerinin ve ilişkili bitkilerin tanımlanması gerekmektedir. (Singh ve ark., 2020). Geleneksel kültüre alma çalışmalarının yanı sıra, endofit florasını analiz etmek için yeni nesil dizileme (NGS) gibi moleküler yöntemler kullanıldığında, çeşitli bitkilerle ilişkili daha fazla mantar taksonu belirlenebilmektedir (Deng ve Cao 2017). NGS teknolojileri ve sistem biyolojisi mikrobiyal toplulukların tüm üyelerinin ve bunların konukçu bitkilerle etkileşimlerinin eşzamanlı olarak keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Ağır metalle kirlenmiş habitatların eski haline getirilmesine yönelik faaliyetlerde mikrobiyal biyoteknoloji uygulamaları, süreci daha etkili ve hızlı hale getirmektedir.

Bu araştırmanın hipotezi, ağır metalle kontamine olmuş alanlarda kirlenme koşullarına uyum sağlayan benzersiz mantar topluluklarının, toksik metallerin uzun vadeli doğal biyolojik ıslahının gelişimine katkıda bulunabileceğini varsayarak, bu tür mantarların tanımlanmasının önemli olduğudur. Bu düşünce doğrultusunda, ağır metal ile kontamine olmuş Samsun Organize Sanayi Bölgesi (OSB) ve ağır metal kontaminasyonunun düşük seviyelerde olduğu ormanlık alanda (Adalar) yetişmiş *P. brutia* bitkilerinin ibrelerinde ağır metal birikimi ve metal kirliliğine dirençli endofitik fungusların metagenomik yöntemle belirlenmesi amaçlanmıştır. Her iki bölgede yetişmiş bitkilerin ibrelerindeki fungal organizmaların metagenomik analiz ile tanımlanmasında rDNA-ITS gen bölgesi ampikonları kullanılmıştır. Gelecekte bu çalışma ağır metal kirliliğinin biyolojik olarak iyileştirilmesi yaklaşımlarına yönelik yenilikçi stratejilerin geliştirilmesine referans teşkil edebilir.

## Materyal ve Yöntem

### Kimyasal Analiz

İbrelili bitkilerde ibrelerin, geniş yapraklı yaprak dökken bitkilere nazaran daha uzun süre ağaçta kalması ve yıl boyunca ağır metal biriktirme potansiyeli göz önüne alınarak çalışmada *P. brutia* (kızılcıgam) ibreleri kullanıldı (Türkyılmaz ve ark., 2018). *P. brutia*'ya ait ibre örnekleri bölgenin sanayi faaliyetinin ve ağır metal birikiminin en yüksek olduğu Samsun OSB ve kontrol bölgesi olarak yüksek kirliliğin nispeten daha düşük olduğu ve Sanayi bölgesinden yaklaşık 34 km. uzaklıktaki Adalar ormanlık alanından alındı (Şekil 1). Element analizi için alınan ibre örnekleri petri kaplarına yerleştirildi ve 15 gün boyunca oda ısısında devamında bir hafta boyunca etüvde 50 °C'de kurutuldu. Ağır metal analizleri için numuneler Türkyılmaz vd (2018)'e göre hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerdeki Cu, Pb, Zn, Mn, Cr, Cd, Ni, Se, As, Li, V ve Co elementlerinin konsantrasyonları 3 tekerrürlü olacak şekilde ICP-OES ile analiz edildi. İbre dokularında biriken metal konsantrasyonlarını hesaplamak için analiz sonucu elde edilen değerler seyreltme faktörü ile çarpıldı (Işınkaralar ve ark., 2022; Ghoma ve ark., 2023).



Şekil 1. Çalışma alanı. Samsun Organize Sanayi Bölgesi ve Adalar, Samsun Türkiye.

Figure 1. Study area. Samsun Organized Industrial Zone and Adalar, Samsun, Türkiye

### Amplikon Temelli Metagenomik Analiz

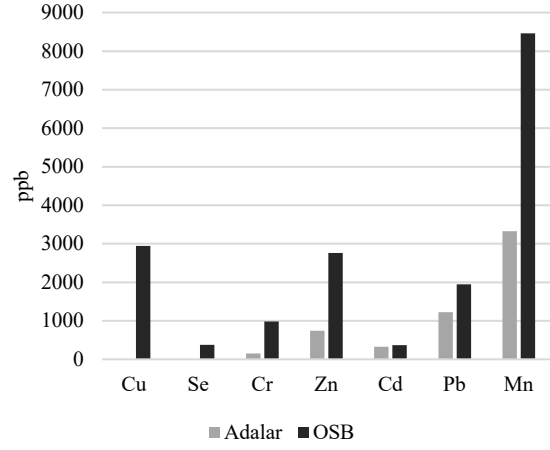
Moleküler analiz için toplanan ibre örnekleri yüzeydeki istenmeyen mikroorganizmaları uzaklaştırmak için yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutuldu (Türkkan ve ark., 2020). İbre dokularından total DNA izolasyonu Qiagen DNeasy Power Soil Pro kit ile gerçekleştirildi. Metagenomik analiz için yeni nesil dizileme işlemleri MacroGen Inc. Company (Seoul, South Korea) tarafından yapıldı. Fungal barkod gen rDNA-ITS bölgesinin amplifikasyonunda ITS3: (5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3') ve ITS4: (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White ve ark., 1990) primerleri kullanıldı ve her örnek için çift yönlü okuma yapıldı. Fungal mikrobiyomun sekans analizi için illumina MiSeq teknolojisi kullanıldı. İstatistiksel mikrobiyom biyoinformatikleri QIIME 2 (Bolyen ve ark., 2019) ile gerçekleştirildi. DADA2 (Callahan ve ark., 2016) kullanılarak ham sekans verileri kalite filtresine tabi tutuldu. filtrelemeden sonra çift yönlü okumalar birleştirildi ve operasyonel taksonomik üniteler (OTU) elde edildi. Mantarlar için referans veri tabanı UNITE classifier kullanılarak tüm amplikon sekans varyantları hizalandı ve tüm taksonomik seviyeler için fungal mikrobiyoma ait taksonlar belirlendi.

### Sonuçlar

Samsun OSB ve Adalar kontrol bölgesinden alınan *P. brutia* ibre örneklerine ait Cu, Pb, Zn, Mn, Cr, Cd, Ni, Se, As, Li, V ve Co elementlerinin analizleri yapılmıştır. Çalışmaya konu elementlerden Ni, As, Li, V ve Co elementleri her iki bölgeye ait bütün numunelerde belirlenebilir limitlerin altında kalmıştır. Çalışmaya konu elementlerin bölge bazında değişimleri karşılaştırmalı olarak Şekil 2'de gösterilmiştir.

Şekil 2 incelendiğinde Cu ve Se elementlerinin Adalar bölgesinde belirlenebilir limitlerin altında kaldığı görülmektedir. Diğer elementlerin tamamında OSB bölgesinde elde edilen konsantrasyonlar Adalar bölgesinde elde edilen konsantrasyonlardan daha yüksektedir.

rDNA-ITS mikrobiyom analizi sonucunda organize sanayi bölgesine ait ibre dokularında Ascomycota

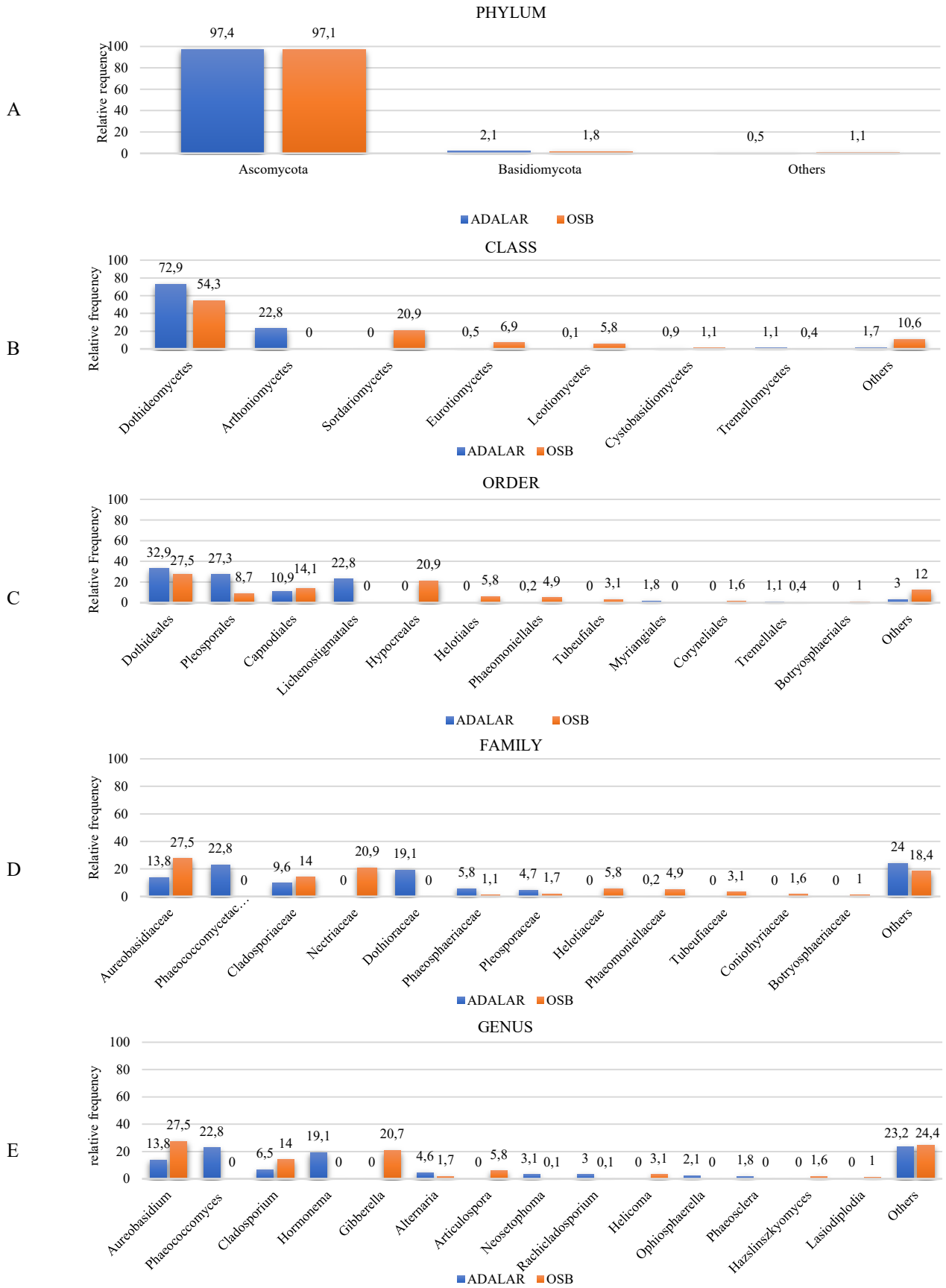


Şekil 2. Elementlerin bölge bazında değişimi  
Figure 2. Change of elements by region

(göreceli frekans: %97,1) ve Basidiomycota (%1,8) filumuna ait fungal endofitlerin varlığı tespit edilmiştir. Ormanlık alan ibre örneklerinde de benzer oranlarda Ascomycota (%97,4) ve Basidiomycota (%2,1) filumuna ait funguslar belirlenmiştir (Şekil 3. A).

Her iki bölgeden toplanan ibre örnekleri sınıf seviyesinde incelendiğinde Dothideomycetes OSB mikrobiyotasında %54,3, Adalar mikrobiyotasında ise %72,9 göreceli bolluk oranı ile en yüksek oranda temsil edilen taksonlardır. Sordariomycetes sınıfı, OSB örneklerinde %20,9 iken Adalar örneklerinde bu taksona ait fungus bulunmamaktadır. Arthoniomycetes Adalar ibre örneklerinde %22,8 oranında bulunurken OSB'de bu sınıfa ait funguslara rastlanmamıştır. Eurotiomycetes OSB'de %6,9 oranında bulunurken Adalar örneklerinde %0,5 gibi çok düşük bir oranda temsil edilmektedir. Aynı şekilde Leotiomycetes sınıfı OSB'de %5,8 oranında iken Adalar'da %0,1 gibi çok düşük bir oranda tespit edilmiştir. Cystobasidiomycetes sınıfına ait taksonlar Sanayi bölgesi ibre dokularında %1,1 göreceli bolluk oranında belirlenirken ormanlık bölge ibrelerinde ise %0,9 olarak tespit edilmiştir. Tremellomycetes sınıfına ait üyeler Adalar orman bölgesinde %1,1 oranında belirlenirken OSB çalışma alanında %1 in altında tespit edilmiştir (Şekil 3.B).

İbre mikrobiyotası ordo seviyesinde karşılaştırıldığında OSB'de göreceli bolluğu %1 in üstünde temsil edilen taksonlar sırasıyla Dothideales (%27,5), Hypocreales (%20,9), Capnodiales (%14,1), Pleosporales (%8,7), Helotiales (%5,8), Phaeomoniellales (%4,9), Tubeufiales (%3,1), Coryneliales (%1,6) ve Botryosphaerales (%1) olarak belirlenmiştir. Adalar bölgesinde %1'in üzerindeki oranlarda Dothideales (%32,9), Pleosporales (%27,3), Lichenostigmatales (%22,8), Capnodiales (%10,9), Myriangiales (%1,8) ve Tremellales (%1,1) ordoları belirlenmiştir. OSB bölgesinde Tremellales ordosu üyeleri %0,4 ün altında temsil edilirken Myriangiales ve Lichenostigmatales ordosuna bu bölgede rastlanmamıştır. Adalar ibre mikrobiyotasında ise Phaeomoniellales ordosu %1 in altında iken Hypocreales, Helotiales Tubeufiales, Coryneliales ve Botryosphaerales ordolarına mikrobiyotada rastlanmamıştır (Şekil 3. C).



Şekil 3. Samsun OSB ve Adalar *P. brutia* ibre mikobiyotasının farklı taksonomik seviyelerde göreceli bolluğu. A. Filum B. Sınıf C. Ordo D. Familya E. Cins.  
 Figure 3. Relative frequency of *P. brutia* needle mycobiota in Samsun OIZ and Adalar at different taxonomic levels. A. Phylum B. Class C. Order D. Family E. Genus.

Sanayi bölgesi *P. brutia* ibre mikobiyotası incelendiğinde göreceli bolluğu %1 ve üzerinde temsil edilen 10 familya tesbit edilmiştir. Bunlar sırasıyla Aureobasidiaceae (%27,5), Nectriaceae (%20,9), Cladosporiaceae (%14), Helotiaceae (%5,8), Phaeomoniellaceae (%4,9), Tubeufiaceae (%3,1), Pleosporaceae (%1,7), Coniothyriaceae (%1,6), Phaeosphaeriaceae (%1,1) ve Botryosphaeriaceae (%1)'dir. Adalar ibre mikobiyotasında ise göreceli bolluğu %1'in üzerinde temsil edilen 6 familya belirlenmiştir. Bunlar sırasıyla Phaeococcomycetaceae (%22,8), Dothioraceae (%19,1), Aureobasidiaceae (%13,8), Cladosporiaceae (%9,6), Phaeosphaeriaceae (%5,8) ve Pleosporaceae (%4,7) olarak tespit edilmiştir Şekil 3. D).

*P. brutia* ibre mikobiyotu cins seviyesinde analiz edildiğinde Samsun OSB'de göreceli bolluğu %1 ve üzerinde 8 fungal takson gözlenmiştir. Bunlar sırasıyla *Aureobasidium* (%27,5), *Gibberella* (%20,7), *Cladosporium* (%14), *Articulospora* (%5,8), *Helicoma* (%3,1), *Alternaria* (%1,7), *Hazslinszkyomyces* (%1,6) ve *Lasiodiplodia* (%1) olarak belirlenmiştir. Adalar mikobiyomunun meta-barkodlama analizi sonucunda göreceli bolluğu %1'in üzerinde temsil edilen 9 cins sırasıyla *Phaeococcomyces* (%22,8), *Hormonema* (%19,1), *Aureobasidium* (%13,8), *Cladosporium* (%6,5), *Alternaria* (%4,6), *Neosetophoma* (%3,1), *Rachicladosprium* (%3), *Ophiosphaerella* (%2,1), ve *Phaeosclera* (%1,8) olarak saptanmıştır. OSB ibre mikobiyotasında *Phaeococcomyces*, *Hormonema*, *Ophiosphaerella* ve *Phaeosclera* cinsleri bulunmazken Adalar ibrelerinde *Gibberella*, *Articulospora*, *Hazslinszkyomyces*, *Lasiodiplodia* ve *Helicoma* cinslerine rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra OSB ibre dokularında *Neosetophoma* ve *Rachicladosprium* cinsleri %1'in altında tesbit edilmiştir (Şekil 3. E).

## Tartışma

Çalışma sonucunda ibre numunelerinde Cu, Pb, Zn, Mn, Cr, Cd, Ni, Se, As, Li, V ve Co elementlerinin analizleri yapılmış, bu elementlerden Ni, As, Li, V ve Co element konsantrasyonları belirlenebilir limitlerin altında kalmıştır. Diğer elementlerin tamamında Samsun OSB'de elde edilen konsantrasyonlar Adalar bölgesinde elde edilen konsantrasyonlardan daha yüksek seviyededir. Bilindiği üzere ağır metaller hem doğal hem de antropojenik kaynaklardan doğaya salınabilmektedir (Cesur ve ark., 2021). Ancak doğal kaynaklardan salınan ağır metal miktarının sınırlı düzeyde olduğu ve özellikle havadaki ağır metal kirliliğinin büyük oranda antropojenik kaynaklı olduğu bilinmektedir (Yayla ve ark., 2022). Havadaki ağır metal kirliliğinin başlıca kaynakları trafik (Sulhan ve ark., 2023), sanayi faaliyetleri (Koç ve ark., 2023) ve madencilik faaliyetleridir (Kuzmina ve ark., 2023). Çalışma alanı olan Samsun'da yapılan çalışmalarda da sanayi bölgesindeki ağır metal kirliliğinin oldukça yüksek düzeyde olduğu (İstanbul ve ark., 2023, Çebi Kılıçoğlu, 2023) ve ağır metal kirliliğinin yüksek düzeyde olduğu alanlarda yetişen bazı bitkilerin çeşitli organlarındaki ağır metal birikiminin de yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir (Karaçocuk ve ark., 2022). Çalışma sonucunda elde edilen bulgular da literatürdeki bu sonuçları desteklemektedir.

Samsun OSB ibre dokusu mikobiyomunun biyoinformatik analizi ile göreceli bolluğu %1'in üzerinde belirlenen cislerden *Aureobasidium* (Cu, Pb, Cd), *Gibberella* (Cu,Zn), *Cladosporium* (Pb, Zn, Cu, Mn, Cd), *Articulospora* (Cd) ve *Alternaria*'nın (Se, Cr, Cu, Cd, Ni, Pb, Zn, Cd) bazı ağır metallere karşı direnç sergileyen mikrofunguslar olduğu bildirilmiştir (Sanusi, 2016; Zhang ve ark., 2022; Refaey ve ark., 2021, Kumar ve Dwivedi, 2021; Wang ve ark., 2022). Araştırmalar belli bir ağır metale belirgin bir adaptasyonu olan fungusların bu toksik metallere kirlenmiş alanlarda daha dominant taksonlar olduğunu göstermektedir (Deng Cao, 2017). Samsun OSB mikobiyotasında dominant olan funguslar literatürdeki veriler ile uyumludur.

Bu çalışmada ICP-OES analizleri sonucunda Cu, Pb, Zn, Mn, Cr, Se ve Cd Samsun OSB ibre dokularında kabul edilebilir sınır değerlerin oldukça üzerinde tesbit edilmiştir. OSB ibrelerinde göreceli bolluğu %27,5 olan *Aureobasidium* cinsi funguslar Cu'yu adsorbe ederek Pb ve Cd'nin biyoakümülyasyonunu gerçekleştirerek bu metallerin yüksek oranda olduğu ortamlarda gelişimini devam ettirebilmektedir (Vaid ve ark., 2022; Mowll ve Gadd, 1984). OSB ibre dokularında göreceli bolluğu %20,7 ile temsil edilen *Gibberella*'nın Zn (Zhang ve ark., 2022) ve Cu (Tu ve ark., 2018) kontaminasyonuna karşı, göreceli bolluğu %14 olan *Cladosporium* cinsi fungusların Pb, Cu, Zn, Mn ve Cd'ye (Wang ve ark., 2022) karşı, yüksek toleransı sayesinde ağır metalle kontamine olmuş sanayi bölgesi ibre dokularında gelişimlerini devam ettirerek en baskın türler haline gelebildiği söylenebilir. Bunun yanı sıra göreceli bolluğu %5,8 olan *Articulospora* cinsi funguslar Cd varlığında bu elementi tiyol bileşikleri ve glutatyon üretiminde kullanılarak (Miersch ve ark., 2001) Samsun OSB'de olduğu gibi yüksek konsantrasyonlarda gelişimini devam ettirebilmektedir. Ayrıca OSB ibre dokularında göreceli bolluğu %1 in üzerinde olan *Alternaria* cinsi funguslarında Cr, Cu, gibi ağır metallerin biosorbsiyonunu gerçekleştirerek bu metallere karşı gösterdiği tolerans sayesinde ibre dokularında varlığını devam ettirdiği söylenebilir (Seshikala ve Charya, 2012). Bunun yanı sıra OSB ibre mikobiyotasında bulunan *Alternaria* cinsi fungusların selenyuma karşı toleransının yüksek olduğu ve Se birikimini etkilediği de bildirilmiştir (Lindblom ve ark., 2018). OSB ibre dokularında temsil edilen bazı funguslar ve yüksek oranda temsil edilen bazı ağır metaller arasında herhangi bir ilişki (direnç-duyarlılık) bilinmese de bazı kaynaklarda belirtildiği üzere bazı mantar türlerinin toksik metallere uzun süre maruz kalmaları nedeniyle metal toksisitesine uyum sağlayabileceklerinin öne sürülmesi (Khan ve ark., 2017) bu fungusların dokulardaki varlığına açıklık getirebilir.

OSB çalışma alanında ağır metal kontaminasyonu yüksek olmasına rağmen beklenenin aksine sanayi bölgesi *P. brutia* ibre dokularında Ni, As, Co, Li ve V gibi toksik metallerin konsantrasyonlarının sınır değerlerin altında kaldığı görülmektedir. *Alternaria* cinsi funguslar Ni elementine karşı da toleranslıdır (Lindblom ve ark., 2018; Refaey ve ark., 2021) ve bu metallerin birikimlerinin yüksek olduğu ortamlarda detoksifikasyon süreçlerine katılarak bu toksik elementlerin birikimini azaltabilmektedir. Bildiğimiz kadarıyla OSB bölgesi ibre dokularında belirlenen fungal mikrobiyota ile limit altı belirlenen As, Co, Li ve V metalleri arasında bir

mikoremediasyon ilişkisine literatürde rastlanmamıştır. Ancak bulgular bu bölgede temsil edilen fungal cinsler ile limit altı belirlenen As, Co, Li ve V arasında mikoremediasyon aktivitesi ile ilgili doğrusal bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Mantarların zamanla çevresel strese karşı toleransı artabilmektedir. Ağır metallere karşı duyarlı bazı fungal taksonlarında zaman içinde toksik metallere tolerans kazanabildiği bilinmektedir. Bazı mikroorganizmalar adaptasyonun ötesinde ortamdaki ağır metal kirliliğine karşı ortamı temizleyici organizmalar olarak da görev yapmaktadırlar (Bruins ve ark., 2000). OSB mikobiyotasında belirlenen fungusların As, Co, Li ve V ağır metallerine karşı detoksifikasyon metabolizmalarının anlaşılabilmesi için detaylı moleküler çalışmalar gereklidir. Ayrıca *P. brutia*'nın fitoremediasyon yeteneğinin de Samsun OSB'de bu toksik metallerin konsantrasyonunun sınır değerlerin altında kalmasına katkıda bulunabileceği göz ardı edilmemelidir. Samsun OSB'de hem *P. brutia*'nın fitoremediasyon süreçleri hem de ağaçtaki endofitik fungusların mikoremediasyon kabiliyetinin, ibre dokularında bu toksik elementlerin birikimini limit değerlerin altına düşürmüş olabileceği varsayılabilir.

## Öneriler

Ağır metal kirliliğinin etkileri son yıllarda küresel anlamda oldukça ciddi bir sorun haline gelmiştir. Araştırmacılar kirleticilerin detoksifikasyonu için daha verimli ve ekonomik yöntemleri geliştirmeye odaklanmışlardır. Geleneksel yöntemlerin teknolojik ve ekonomik sınırlamaları, kirleticilerin artımı için yeni teknolojilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Yararlı mikrobiyal ortak yaşamlar bitkilere ağır metal stresine karşı direnç kazandırabildiğinden, ağır metalle kirlenmiş alanların biyolojik ıslahında bu ortaklıktan faydalanılabilir. Mikrobiyal ortak yaşamların bitki büyümesi ve stres toleransı üzerindeki olumlu etkisi, toksik metallerin detoksifikasyonunda mikrobiyal destekli fitoremediasyonun alternatif bir çözüm olarak kullanılabilirliğini işaret etmektedir. Toksik metaller ile kirlenmiş alanlarda büyüyen bitkilerden izole edilen mantarların kirliliğe karşı daha toleranslı olması mikrobiyal destekli fitoremediasyonda bu mantarların kullanım için potansiyel olarak etkili olabileceğini göstermektedir. Çevre dostu ve sürdürülebilir bu teknolojiye katkı sağlamak için ağır metallere dirençli yeni fungusların belirlenmesi önemlidir. Bu nedenle bu çalışma, Samsun OSB ve kontrol alanındaki *P. brutia* ibrelerinin fungal çeşitliliği ve metal birikimleri arasındaki ilişkileri incelemek suretiyle detoksifikasyon süreçlerine yardımcı olabilecek önemli veriler sunmaktadır.

## Kaynaklar

- Akpasi SO, Anekwe IMS, Tetteh EK, Amune UO, Shoyiga HO, Mahlangu TP, & Kiambi SL. (2023). Mycoremediation as a Potentially Promising Technology: Current Status and Prospects-A Review. *Applied Sciences*, 13(8):4978. DOI: 10.3390/app13084978
- Anand R, Bharadvaja N. (2022). Fungi: The Assorted Bio-Remediators. *ECS Transactions*, 107(1), 13903. DOI: 10.1149/10701.13903ecst
- Bibbins-Martinez M, Juarez-Hernandez J, Lopez-Dominguez JY, Nava-Galicia SB, Martinez-Tozcano LJ, Juarez-Atona R, ... Diaz-Godinez G. (2023). Potential application of fungal biosorption and/or bioaccumulation for the bioremediation of wastewater contamination: A review. *Journal of Environmental Biology*, 44(2), 135-145. DOI:10.22438/jeb/44/2/MRN-5093.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, ... & Caporaso JG. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8):852-857. doi:10.1038/s41587-019-02099.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. (2000). "Microbial resistance to metals in the environment," *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45(3), 198-207. DOI: 10.1006/eesa.1999.1860
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, & Holmes SP. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7):581-583. DOI: 10.1038/nmeth.3869
- Cesur A, Zeren Cetin I, Abo Aisha AES, Alrabiti OBM, Aljama AMO, Jawed AA, Cetin M, Sevik H, Ozel HB (2021) The usability of Cupressus arizonica annual rings in monitoring the changes in heavy metal concentration in air. *Environmental Science and Pollution Research (Environ Sci Pout Res)* 2021. DOI: 10.1007/s11356-021-13166-4;
- Cuadros-Orellana S, Leite LR, Smith A, Medeiros JD, Fern Badotti AA, Fonseca PL, Vaz AB, Oliveira G, Goes-Neto A. (2013). Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: a Decade in Review. *Fungal Genomics and Biology* Vol.3 No.2 pp.1000110, 13 pp. DOI: 0.4172/2165-8056.1000110
- Çebi Kılıçoğlu M. (2023). Ağır Metal ile Kontamine Toprakta Fungal Mikrobiyomun Metagenomik Analizi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 11(9), 1671-1677. DOI: 0.24925/turjaf.v11i9.1671-1677.6261
- Deng Z, Cao L. (2017). "Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review," *Chemosphere* 168, 1100-1106. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.097. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.097
- Domka AM, Rozpaček P, Turnau K. (2019). "Are fungal endophytes merely mycorrhizal copycats? The role of fungal endophytes in the adaptation of plants to metal toxicity," *Frontiers in Microbiology*, 10, 371. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00371
- Ghoma WEO, Şevik H, Işınkaralar K. (2023). Comparison of the rate of certain trace metals accumulation in indoor plants for smoking and non-smoking areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9. DOI: 10.1007/s11356-023-27790-9
- Işınkaralar K, Koç I, Erdem R, Şevik H (2022) Atmospheric Cd, Cr, and Zn Deposition in Several Landscape Plants in Mersin, Türkiye, Water, Air, & Soil Pollution, DOI: 10.1007/s11270-022-05607-8
- Işınkaralar K, Işınkaralar O, Koç İ, Özel HB, Şevik H. (2023). Assessing the possibility of airborne bismuth accumulation and spatial distribution in an urban area by tree bark: A case study in Düzce, Türkiye. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12.
- İstanbul SN, Şevik H, Işınkaralar K, Işınkaralar O. (2023). Spatial distribution of heavy metal contamination in road dust samples from an urban environment in Samsun, Türkiye. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 110(4):78. DOI: 10.1007/s00128-023-03720-w
- Jha S, Kulkarni P, Sharma A. (2022). Heavy Metal Tolerance and Toxicity Studies on Indigenous Microflora and its Application for Bioremediation. *Spectrum of Emerging Sciences*, 2(2), 10-16. DOI: 10.55878/SES2022-2-2-3

- Karaçocuk T, Şevik H, Işınkaralar K, Türkyılmaz A, Çetin M. (2022). "The change of Cr and Mn concentrations in selected plants in Samsun city center depending on traffic density," *Landscape and Ecological Engineering*, 1-9. DOI: 10.1007/s11355-021-00483-6
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., & Dhar, M. K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry reviews*, 11, 487-505. DOI 10.1007/s11101-012-9260-6
- Key, K., Kulaç, Ş., Koç, İ. Sevik, H. (2023). Proof of concept to characterize historical heavy-metal concentrations in atmosphere in North Türkiye: determining the variations of Ni, Co, and Mn concentrations in 180-year-old *Corylus colurna* L. (Turkish hazelnut) annual rings. *Acta Physiol Plant* 45, 120 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03608-6>
- Khan AR, Waqas M, Ullah I, Khan AL, Khan MA, Lee IJ, Shin JH. (2017). "Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation," *Environmental and Experimental Botany* 135, 126-135. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2016.03.005
- Koç I, Çobanoğlu H, Cantürk U, Key K, Kulaç S, Şevik H. (2023). Change of Cr concentration from past to present in areas with elevated air pollution. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-12. DOI: 10.1007/s13762-023-05239-3
- Kumar V, Dwivedi SK. (2021). Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9):10375-10412. DOI: 10.1007/s11356-020-11491-8
- Kuzmina N, Menshchikov S, Mohnachev P, Zavyalov K, Petrova I, Ozel HB, ... & Sevik H. (2023). Change of aluminum concentrations in specific plants by species, organ, washing, and traffic density. *BioResources*, 18(1):792. DOI: 10.15376/biores.18.1.792-803
- Li HY, Li DW, He CM, Zhou ZP, Mei T, Xu HM. (2012). "Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China," *Fungal Ecology* 5(3), 309-315. DOI: 10.1016/j.funeco.2011.06.002
- Lindblom SD, Wangeline AL, Valdez Barillas JR, Devilbiss B, Fakra SC, Pilon-Smits EA. (2018). "Fungal endophyte *Alternaria tenuissima* can affect growth and selenium accumulation in its hyperaccumulator host *Astragalus bisulcatus*," *Frontiers in Plant Science*, 9, 1213. DOI: 10.3389/fpls.2018.01213
- Miersch J, Tschimedbalshir M, Barlocher F, Grams Y, Pierau B, Schierhorn A, Krauss GJ. (2001). Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia*. *Mycological Research*, 105(7), 883-889. DOI: 10.1017/S095375620100404X
- Mowll JL, Gadd GM. (1984). "Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*," *Microbiology* 130(2), 279-284. DOI: 10.1099/00221287-130-2-279
- Refaey M, Abdel-Azeem AM, Abo Nahas HH, Abdel-Azeem MA, El-Saharty AA. (2021). Role of Fungi in Bioremediation of Soil Contaminated with Heavy Metals. In *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: Biodiversity and Ecological Perspectives* (pp. 509-540). Cham: Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-030-67561-5-16
- Rai, N., Kumari Keshri, P., Verma, A., Kamble, S. C., Mishra, P., Barik, S., ...Gautam, V. (2021). Plant associated fungal endophytes as a source of natural bioactive compounds. *Mycology*, 12(3), 139-159. dOI:10.1080/2F21501203.2020.1870579
- Sanusi AI. (2016). Heavy metal profile of *Oreochromis niloticus* harvested from e-waste polluted vials and associated Fungi. *Advances in Microbiology*, 6(8), 555-565. DOI: 10.4236/aim.2016.68056
- Seshikala D, Charya MS. (2012). Effect of pH on chromium biosorption. *Int J Pharma Bio Sci*, 2, 298-302.
- Singh V, Singh MP, Mishra V. (2020). Bioremediation of toxic metal ions from coal washery effluent Desalin. *Water Treat*, 197: 300-318. DOI: 10.5004/dwt.2020.25996
- Singh V, Singh J, & Mishra V. (2021). Development of a cost-effective, recyclable and viable metal ion doped adsorbent for simultaneous adsorption and reduction of toxic Cr (VI) ions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2): 105124. DOI: 10.1016/j.jece.2021.105124
- Sulhan OF, Sevik H, Isinkaralar K. (2023). "Assessment of Cr and Zn deposition on *Picea pungens* Engelm. in urban air of Ankara, Türkiye," *Environment, Development and Sustainability* 25(5), 4365-4384. DOI: 10.1007/s10668-022-02647-2
- Tu C, Liu Y, Wei J, Li L, Scheckel KG, & Luo Y. (2018). Characterization and mechanism of copper biosorption by a highly copper-resistant fungal strain isolated from copper-polluted acidic orchard soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 24965-24974.
- Türkkan M, Çebi Kılıçoğlu M, Erper I. (2020). "Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates collected from *Brassica oleracea* var. *acephala* in Ordu, Türkiye," *Phytoparasitica*, 48(2), 273-286. DOI: 10.1007/s12600-020-00793-9
- Türkyılmaz A, Sevik H, Cetin M. (2018). The use of perennial needles as bio-monitors for recently accumulated heavy metals. *Landsc Ecol Eng* 14 (1):115-120. DOI: 10.1007/s11355-017-0335-9
- Vaid N, Sudan J, Dave S, Mangla H, Pathak H. (2022). "Insight into microbes and plants ability for bioremediation of heavy metals," *Current Microbiology* 79(5), 141. DOI: 10.1007/s00284-022-02829-1
- Wang M, Xu Z, Dong B, Zeng Y, Chen S, Zhang Y, ... & Pei X. (2022). An efficient manganese-oxidizing fungus *Cladosporium halotolerans* strain XM01: Mn (II) oxidation and Cd adsorption behavior. *Chemosphere*, 287:132026.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, & Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1):315-322.
- Yayla EE, Şevik H, Işınkaralar K. (2022). Detection of landscape species as a low-cost biomonitoring study: Cr, Mn, and Zn pollution in an urban air quality. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(10), 1-10. DOI: 10.1007/s10661-022-10356-6
- Zhang J, Fan X, Wang X, Tang Y, Zhang H, Yuan Z, ... & Li T. (2022). Bioremediation of a saline-alkali soil polluted with Zn using ryegrass associated with *Fusarium incarnatum*. *Environmental Pollution*, 312:119929. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.119929
- Zheng J, Xie X, Li C, Wang H, Yu Y, Huang B. (2023). Regulation mechanism of plant response to heavy metal stress mediated by endophytic fungi," *International Journal of Phytoremediation* 1-18. DOI: 10.1080/15226514.2023.2176466