

**MİKRO KİRLETİCİ BAZI İLAÇLARIN FUNGAL
KAYNAKLAR İLE BİYODEGRADASYONUN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION ON BIODEGRADATION OF SOME
MICRO POLLUTANT DRUGS BY FUNGAL SOURCES**

YUSUF DORUK ARACAGÖK

Prof. Dr. NİLÜFER CİHANGİR
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

Yusuf Doruk ARACAGÖK'ün hazırladığı “**Mikro Kirlenici Bazı İlaçların Fungal Kaynaklar ile Biyodegradasyonun Araştırılması** ” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Başkan

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Danışman

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Üye

Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

Üye

Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

Yusuf Doruk ARACAGÖK

ÖZET

Mikro Kirletici Bazı İlaçların Fungal Kaynaklar ile Biyodegradasyonun Araştırılması

Yusuf Doruk ARACAGÖK

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. NİLÜFER CİHANGİR

Eş Danışman: Prof. Dr. HAKAN GÖKER

Haziran, 2016, 83 sayfa

Bu çalışmada dört fungus türü (*Aspergillus niger*, *Funalia trogii*, *Yarrowia lipolytica*, *Phanerochaete chrysosporium*) steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaç grubundan olan naproksen ve diklofenak yıkım kapasiteleri açısından taranmıştır. Yapılan analiz sonuçlarına göre *A. niger* naproksen yıkımı açısından %98 oran ile en verimli fungal kaynak olarak seçilmiştir. *A. niger*'in naproksen metabolizması sonucu son ürün olarak 6-O-desmetilnaproksen ve 7-hidroksinaproksen olduğu, LC/MS, ¹HNMR ve ¹³CNMR analizleriyle ortaya çıkarılmıştır. Naproksenin O-demetilasyonu ve hidrosilasyonunun, *A. niger* tarafından sitokrom P450 enzim sistemiyle gerçekleştirdiği bulunmuştur. *Funalia trogii* 24 saat içinde diklofenakı tamamen yıkıma uğratmıştır. LC/MS analizleri sonucu diklofenakın iki farklı hidroksi türevine rastlanmıştır. *Funalia trogii*'nin 24 saatte diklofenak ve oluşan metabolitleri tamamen giderdiği bulunmuştur. Diklofenak yıkımında lakkaz ve fungal sitokrom P450 enzimlerinin rolü olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonunda etken madde ve yıkım ortamının toksisitesi MicroTox ve Rotoxkit F toksisite testleri ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikro kirletici ilaçlar, naproksen, diklofenak, biyodegradasyon, fungus

ABSTRACT

Investigation on Biodegradation of Some Micro Pollutant Drugs by Fungal Sources

Yusuf Doruk ARACAGÖK

Doctor of Philosophy, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. NİLÜFER CİHANGİR

Co-Supervisor: Prof. Dr. HAKAN GÖKER

June, 2016, 83 pages

In this study four fungus species *Aspergillus niger*, *Funalia trogii*, *Yarrowia lipolytica*, and *Phanerochaete chrysosporium* were tested in terms of anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac biodegradation abilities. According to LC-MS data, *A. niger* was found the most efficient strain with 98% naproxen removal rate. Two main byproducts of fungal transformation naproxen, O-desmethylnaproxen and 7-hydroxynaproxen were identified by using LC/MS, ¹HNMR and ¹³CNMR. Our results suggest that O-demethylation and hydroxylation of naproxen is catalyzed by cytochrome P450 enzyme system. *Funalia trogii* eliminated diclofenac to non-detectable levels in 24h. Two hydroxylated diclofenac derivatives were identified by LC/MS analysis. Our results showed that laccase and fungal cytochrome P450 enzyme system play a key role on biodegradation of diclofenac. After 24 h both parent compound and byproducts disappeared from the medium. Toxicity assessment of untreated and treated substances were performed by MicroTox and Rotox Kit F.

Keywords: Micro pollutant drugs, naproxen, diclofenac, biodegradation, fungus

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Cihangir'e ve hafta sonları bile benimle birlikte laboratuvarında çalışan değerli eş danışmanım Prof. Dr. Hakan Göker'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarına katkılarından dolayı, Tez İzleme Komitesinde bulunan hocalarımdan Prof. Dr. Nilüfer Aksöz'e ve Doç. Dr. Işıl Seyis Bilkay'a teşekkürü bir borç bilirim. Kısa sürede bana çok şey öğreten değerli hocam Nazif Kolankaya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarda yanımda olan ve yardımını esirgemeyen Özgecan Erdem'e ve çok değerli dostum Dr. Fatih Mangıt'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezin Basımı için FDK-2016-11318 kodlu proje kapsamında maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi BAP. Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1 GİRİŞ	1
2. Genel Bilgi	2
2.1. Mikro Kirleticiler	2
2.2. Mikro kirleticiler olarak ilaç etken maddeleri	5
2.3. İlaç Kalıntılarının Çevre İçin Önemi	8
2.3 Hücre Kültürleri ile Yapılan Toksikite Çalışmaları	10
2.4. İlaç Kalıntılarının İnsan Sağlığı Açısından Önemi	12
2.5. Etken Maddelerin Metabolitleri ve Çevre İçin Önemi	12
2.6. Mikro kirleticilerin arıtımında kullanılan yöntemler	14
2.6.1. Aktif Karbon	14
2.6.2. Fizikokimyasal Yöntemler	14
2.6.3. Membranlar	15
2.6.4. UV Işını	15
2.6.5. Biyolojik Arıtım	15
2.7 Tez Kapsamında Kullanılan İlaç Etken Maddeleri	16
2.7.1 Naproksen	16
2.7.2. Diklofenak	17
2.8. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar	18
2.8.1. <i>Aspergillus niger</i>	18
2.8.2. Beyaz Çürükçüller <i>Funalia trogii</i> ve <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	19
2.8.3 <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
2.9. Fungal Sitokrom P450 Enzim Sistemi	21
2.10 Lakkaz (EC 1.10.3.2)	21
3. Materyal ve Yöntem	23
3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar	23

3.2.	Kimyasallar	23
3.3.	Giderim Çalışmalarında Kullanılan Üretim Ortamının Hazırlanması	23
3.4.	Fungusların Ekimi ve Kültürasyonu.....	24
3.5.	Etken Maddelerin Üreme Ortamına Eklenmesi ve Bidegradasyon Çalışmaları.....	24
3.6.	Biyokütlenin Ölçülmesi	24
3.7.	Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	24
3.8.	İlaç Etken Maddelerinin Ölçümü.....	25
3.9.	NMR Analizleri	25
3.10.	Metabolitlerin İzolasyonu.....	26
3.11.	Naproksen Yıkım Ürünlerinin Günlere Göre Değişimi	26
3.12.	1-Aminobenzotriazol ve Saf Lakkazın Kullanımı	26
3.13.	Adsorpsiyon Çalışmaları	26
3.14.	Naproksen Yıkımı İçin Uygun İnokülasyon Miktarının Belirlenmesi.....	26
3.15.	Naproksen Yıkımına Sıcaklık ve pH Değerinin Etkisi.....	27
3.16.	Diklofenak Yıkımı İçin Uygun İnokülasyon Miktarının Bulunması.....	27
3.17.	Diklofenak Yıkımına İnkübasyon Sıcaklığının ve pH nın Etkisi.....	27
3.18.	Kaba Lakkaz Enzimi ile Diklofenak Giderimi	27
3.19.	Microtox Çalışmaları.....	28
3.20.	Rotokit F Çalışmaları.....	28
4.	Sonuçlar ve Tartışma	30
4.1.	Naproksen Yıkımını Gerçekleştiren En Etkin Suşun Belirlenmesi.....	30
4.2.	Yıkım Sonrası Oluşan Ürünlerin Taranması ve ¹ HNMR ve ¹³ CNMR ile Tanımlanması	33
4.3.	<i>A. niger</i> ile naproksen giderimin mekanizmasının belirlenmesi.....	38
4.4.	Oluşan Metabolitlerin Zamana Göre Değişimi.....	40
4.4.	İnokülasyon Miktarının Naproksen Giderimine Etkisi	41
4.5.	İnkübasyon sıcaklığının ve ortam pH sının naproksen giderimi üzerine etkisi.....	42
4.6.	<i>Vibrio fischeri</i> Toksikite Testi (Microtox).....	45
4.7.	Diklofenak Yıkımını Gerçekleştiren En Etkin Suşun Belirlenmesi	46
4.8.	Diklofenak Yıkım Ürünlerinin Taranması.....	49
4.9.	Diklofenak yıkımında rol alan enzimlerin bulunması	54
4.10.	İnokülasyon miktarının, pH değerinin ve sıcaklığın diklofenak giderimi üzerindeki etkisi.....	57
4.12.	Yıkım Öncesi ve Yıkım Sonrası Toksik Etkinin Karşılaştırılması	64

Kaynaklar.....	66
Özgeçmiş.....	82



ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Mikro kirleticiler ve ana bulaş kaynakları.....	2
Çizelge 2. 2. Bazı mikro kirletici bileşiklerin insan sağlığı ve çevre üzerine etkisi...4	
Çizelge 2.3. Ülkelere göre içme suyunda tespit edilen ilaç etken maddeleri ve oranları.....	7
Çizelge 2. 4. Bazı ilaç etken maddelerinin PLHC-1 ve RTG-2 hücre hatları üzerindeki sitotoksitesi.....	11
Çizelge 4.1. Naproksenin fungal transformasyon ürünlerin kimyasal yapıları ve NMR sonuçları.....	38.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. İlaç etken maddelerinin ana bulaş yolları.....	6
Şekil 2.2. Çalışmalarda kullanılan naproksen sodyumun moleküler formülü.....	16
Şekil 2.3. Çalışmalarda kullanılan diklofenak sodyumun moleküler formülü.....	17
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan fungus suşlarının naproksen giderim kapasiteleri açısından karşılaştırılması.....	30
Şekil 4.2. Isı ile öldürülmüş ve kültür ortamına sodyum azid eklenmiş <i>A. niger</i> biyokütleri ile canlı hücre ortamının naproksen giderimi açısından karşılaştırılması.....	32
Şekil 4.3. Yıkım sonrası oluşan ürünler ve naproksenin (a) HPLC kromatogramı ve (b) kütle iyon kromatogramı ESI (-).....	33
Şekil 4.4. Gecikme zamanı 11,03 dakika olan pikin (naproksen) kütle spektrumu ESI (-).....	34
Şekil 4.5. Gecikme zamanı 6,99 dakika olan metabolit 1 için ESI(-) kütle spektrumu	35
Şekil 4.6. Gecikme zamanı 8,35 dakika olan metabolit 2 için ESI(-) kütle spektrumu	36
Şekil 4.7. İzole edilen Metabolit 1 için HPLC ve kütle iyon kromatogramı.....	37
Şekil 4.8. İzole edilen Metabolit 2 için HPLC ve kütle iyon kromatogramı.....	37
Şekil 4.9. 48. Saat sonunda ortamda bulunan tüm bileşiklerin birbirlerine göre yüzde oranları.....	40
Şekil 4.10. Naproksen ve metabolitlerinin zamana göre değişimi.....	41
Şekil 4.11. Farklı inokülasyon miktarlarına göre zamana göre kuru ağırlık (K.A.) ve naproksen giderim oranları.....	42

Şekil 4.12. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının naproksen giderimine etkisi.....	43
Şekil 4.13. Farklı ortam pH değerlerinin naproksen giderimine etkisi.....	44
Şekil 4.14. 48. saat sonunda çalışmada kullanılan fungus suşlarının diklofenak giderim kapasiteleri açısından karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.15. <i>A.niger</i> ve <i>F. trogii</i> 'nin 24 saatlik inkübasyondan sonra bulunan diklofenak giderim oranları.....	47
4.16. Isı ile öldürülmüş ve kültür ortamına sodyum azid eklenmiş <i>F. trogii</i> biyokütleri ile canlı hücre ortamının naproksen giderimi açısından karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.17. Zaman göre diklofenak giderim oranları.....	48
Şekil 4.18. Gecikme zamanı 6. Dakika olan diklofenakın HPLC (a) ve kütle iyon kromatogramı (b) ESI (+).....	50
Şekil 4.19. 6. dakikada gelen diklofenakın kütle spektrumu.....	50
Şekil 4.20. 24. saat sonunda elde edilen HPLC (a) ve kütle iyon kromatogramı (b) ESI(+)......	51
Şekil 4.21. Birleştirilmiş olan örneklerin HPLC (a) ve kütle iyon kromatogramı (b) ESI(+)......	52
Şekil. 4.22. Gecikme zamanı 4,77. dakika olan metabolitin kütle spektrumu ESI (+).....	53
Şekil 4.23. Gecikme zamanı 4,93. dakika olan metabolitin kütle spektrumu.....	53
Şekil 4.24. Diklofenakın, tirozinaz (A) ve lakkaz (B) ile 24 saat muamele edilmesi sonucu reaksiyon ortamındaki değişiklik.....	55
Şekil 4.25. Tirozinaz ve lakkaz enzimlerinin diklofenak giderim kapasiteleri.....	56
Şekil 4.26. Beyaz çürükçüllerde diklofenak metabolizması.....	57
Şekil 4.27. İnokulasyon miktarının diklofenak ve lakkaz aktivitesine etkisi.....	58

Şekil 4.28. İnokulasyon miktarının giderim ve kuru ağırlık üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.29. Ortam pH sının diklofenak giderimine ve lakkaz üretimine etkisi.....	60
Şekil 4.30. Ortam pH sının kuru ağırlık ve dilokfenak giderimi üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.31. İnkübasyon sıcaklığının diklofenak giderimi ve lakkaz enzimi üretimine etkisi.....	61
Şekil 4.32. Farklı pH değerlerinin kaba enzim ile diklofenak giderimine etkisi.....	62
Şekil 4.33. Farklı sıcaklık değerlerinin kaba enzim ile diklofenak giderimine etkisi.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

β	Beta
α	Alfa
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ESI	Electrospray ionization
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i	İnhibisyon
LC/MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
MHz	Megahertz
ml	mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
NMR	Nükleer manyetik rezonans

1. GİRİŞ

Sanayi ve teknolojinin gelişmesiyle yapı ve kullanım amaçları çok farklı olan birçok kimyasal madde kullanıma sunulmaktadır. Sanayiden kişisel kullanıma kadar çok çeşitli uygulama alanı olan bu kimyasallar yeterince arıtılmadıklarında çevre ve insan sağlığı açısından olumsuz etkilere neden olabilmektedirler. Farmasötik etken maddelerin insan ve doğal hayat üzerindeki olası zararlı etkileri nedeniyle doğal ortamlarda bulunmaları, araştırmacıların son yıllarda bu konuya eğilmelerine neden olmuştur [1]. Beta-blokerlar, kolesterol ilaçları, antibiyotikler nöroaktif maddeler, doğum kontrol ilaçları, analjezik ve anti inflamatuvarlar gibi değişik biyolojik etkiye sahip ilaç etken maddeleri tıp ve veterinerlik alanında kullanılmaktadır [2]. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki verimli bir şekilde aratılmayan bu moleküller, taze su kaynakları, yer altı suları ve içme suyu kaynaklarını da kirletmektedir [3], [4]. İlaç etken maddeleri belirli bir biyolojik görevi düşük yerine getirecek ve vücut içinde dayanıklı olacak şekilde üretilirler. Genelde doğada ng/L ile µg/L konsantrasyonda tespit edilen ilaç etken maddeleri insanlar üzerinde akut toksisiteye neden olmaz ancak olası uzun dönem maruz kalmaya dayalı zararlı etkileri endişe yaratmaktadır [2]. İlaç etken maddelerinin özellikle anti inflamatuvar farmasötik aktif maddelerin biyoyıkımı çoğunlukla *Trametes versicolor* ile gerçekleştirilmiştir [1]–[7].

Bu tez kapsamında ağrı kesici ateş düşürücü etkilerinden dolayı dünyada çok yaygın bir kullanımı olan steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaçlar grubundan, naproksen (2-(6-(metoksinaftelen-2-yl)propionik asit) ve diklofenakın (2-[(2,6-diklorofenil) amino] benzenoik asit) dört farklı fungus türü (*Aspergillus niger*, *Funalia trogii*, *Yarrowia lipolytica*, *Phanerochaete chrysosporium*) ile biyoyıkımı amaçlanmıştır. Naproksen ve diklofenak ülkemiz sularında da tespit edilmiştir [8]. Bu nedenle görece yeni bir konu olan mikro kirletici ilaç etken maddelerinin giderilmesi ile ilgili çalışmaların önemli olduğu düşünülmektedir.

2. Genel Bilgi

2.1. Mikro Kirleticiler

Mikro kirletici, doğada, kullanım sularında, atık su arıtım tesislerinin çıkış sularında $\mu\text{g/L}$ ve daha düşük konsantrasyonlarda tespit edilen kimyasalları tanımlamak için kullanılan bir terimdir [9]. Analiz yöntemlerinin gelişmesi ile çeşitli su kaynaklarında tespit edilen mikro kirleticilerin sayısı hızla artmaktadır [10]. Mikro kirletici olarak kabul edilen kimyasal bileşikler, yapılarına ve kullanım alanlarına göre; ilaç etken maddeleri, kişisel bakım ürünleri, pestisitler, sentetik kokular, surfaktanlar, alevlenme geciktiriciler, endüstriyel katkı maddeleri, yakıt katkı maddeleri, hormonal sistemi etkileyen bileşikler ve bu bileşiklerin transformasyon ürünleri olarak gruplandırılabilirler [11], [12]. Ayrıca kokain gibi kullanımı yasak olan aktif maddeler dahi sucul ortamlarda tespit edilmiştir [13]. Mevcut kullanımda olan atık su arıtım tesisleri mikro kirleticilerin arıtımı için tasarlanmamıştır. Bu nedenle mikro kirleticiler verimli bir şekilde arıtılamaz ve alıcı ortamlara verilirler. Bu nedenle mikro kirletici organik bileşikler şebeke sularında dahi tespit edilmiştir [6]. Verimli bir şekilde arıtılmayan evsel atık sular, hastane ve endüstriyel atık suları vs. çevrede görülen mikro kirleticilerin ana kaynaklarıdır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Mikro kirleticiler ve ana bulaş kaynakları [14].

Kategori	Alt kategori	Ana Bulaş Kaynakları
İlaç etken maddeleri	Ağrı kesiciler, kolesterol ilaçları, antikonvülsanlar, β -blokerlar, antibiyotikler, uyarıcılar	Evsel atık su (idrar, dışkılama), Hastane atık suyu, Besi çiftlikleri, Balık çiftlikleri
Kişisel bakım ürünleri	Parfümler, dezenfektanlar, güneş kremleri ve tene uygulanan böcek kovucular	Evsel atık su, yüzme havuzları
Setroid hormonlar	Östrojenler	Evsel atık su, besi çiftlikleri, balık çiftlikleri
Surfaktanlar	Non-iyonik surfaktanlar	Evsel atık su (temizlik ürünleri)
Endüstriyel kimyasallar	Alevlenme geciktiriciler, Plastikleştiriciler(PVC)	Endüstriyel atık su, evsel atık su
Pestisitler	İnsektisitler, herbisitler, fungusitler	Tarım kökenli atıklar, şehir atık suyu

Mikro kirletici bileşikler çevrede insanlar için akut toksisite oluşturacak dozun çok altında bulunur fakat bu bileşikler ile ilgili en önemli sorun orta ve uzun vadede insan sağlığı ve yaban hayat üzerinde gösterebilecekleri negatif etkidir [15], [16]. Kanada'da yapılan bir çalışmada doğum kontrol haplarında bulunan sentetik östrojen 17 α -etinilöstradiol'ün çok düşük konsantrasyonlarda (ng/L), feminizasyon yolu ile balık popülasyonlarını yıkıma uğratacağı gösterilmiştir [17]. Bir diğer örnek olarak içme suyunda bile tespit edilen bisphenol A verilebilir [14]. Bisphenol A (2,2-(4,4,-dihidroksifenil)propan) polikarbonat plastiklerin, epoksi reçinelerin, alevlenme geciktiricilerin, kompakt disklerin vs. yapımında kullanılan bir bileşiktir. Bazı çalışmalar bisphenol A'nın endokrin sistemi etkileyerek meme kanserine yakalanma riskini artırdığı, kız çocuklarda erken ergenliğe ve östrojenik etkisinden dolayı anti androjen etki göstererek erkeklerde feminizasyona neden olduğunu göstermiştir [18], [19], [20]. Antibakteriyel triklosan (5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol) yaygın kullanımından dolayı (anti bakteriyel sabunlar, diş macunları, akne kremleri vs.) sucul ortamlarda sıkça rastlanan bir diğer mikro kirleticidir [21]. Triklosan akut zehirlenmeye neden olmaz fakat alerjilerde artma, deri tahrişi, endokrin sistem üzerinde bozucu etki, bakteriyel direnç, sucul organizmalar üzerinde toksik etki ve karsinojenik yan ürünlerin oluşması gibi olumsuz etkilere sebep olabilir [22]. Bir başka örnek olarak parfüm sanayinde sıklıkla kullanılan ve östrojenik etkisinin yanı sıra sucul canlılar için toksik özellik gösteren galaksolid ve tonalid verilebilir [23], [24]. Bazı mikro kirletici olarak kabul edilen moleküllerin insan sağlığı üzerindeki olası etkileri Çizelge 2. 2 de özetlenmiştir. Görece yeni farkına varılan bir çevresel sorun olan mikro kirleticiler ile ilgili kısıtlayıcı düzenlemeler yetersiz kalmaktadır ve söz konusu kimyasalların çok azı ile ilgili yasal düzenlemeler mevcuttur [14]. Bu nedenle günümüzde mikro kirleticilerin alıcı ortamlarda varlığı ve toksik etkileri ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır.

Çizelge 2. 2. Bazı mikro kirletici bileşiklerin insan sağlığı ve çevre üzerine etkisi

[19]

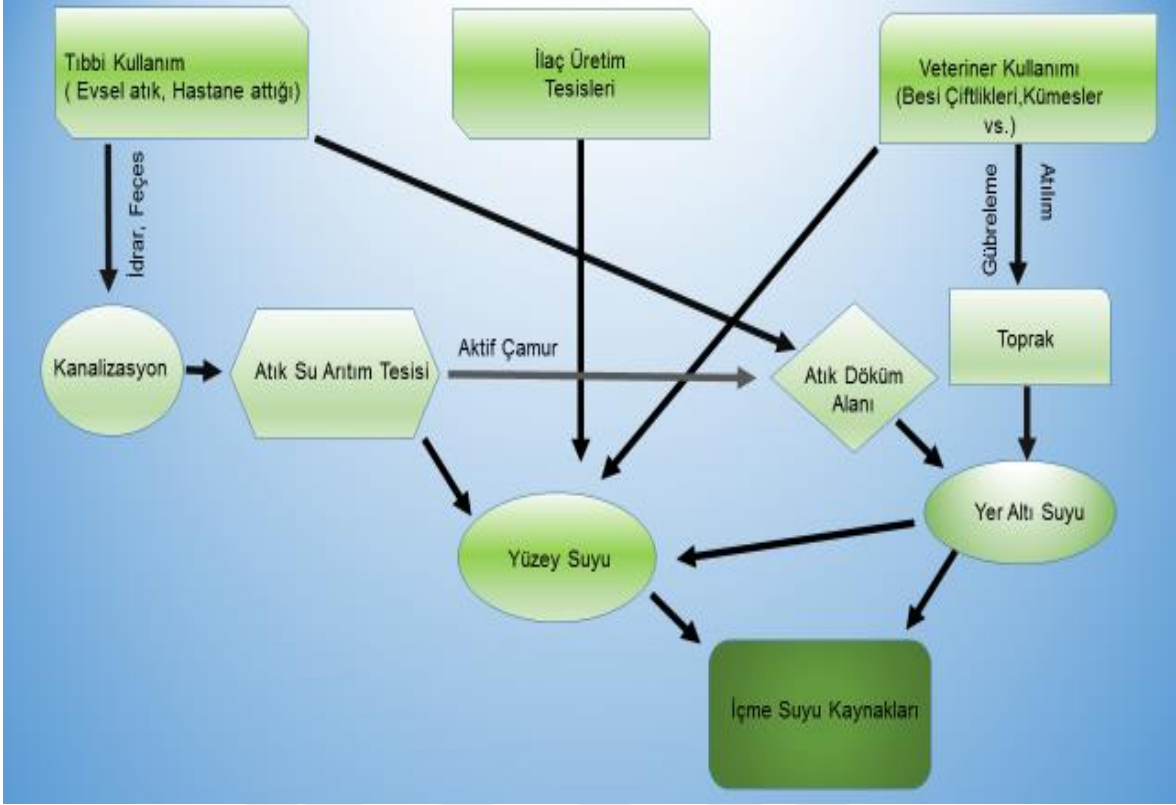
Bileşikler	İnsan sağlığı ve çevre üzerine etkisi
Bisphenol A (epoksi reçineler, polikarbonat plastikler) Bütile Hidrokisanizol BHA (paketlenmiş yiyeceklerde antioksidan)	Meme kanseri yakalanma riskinde artış, erkeklerde anti androjenik etki Östrojenik etki, meme kanserine yakalanma riskinde artış, alabalık ve insan östrojen reseptörlerinde uyarılma
Alkilfenoller- Nonilfenol (deterjanlar)	Östrojenik etki
Fitalatlar (PVC, zemin döşemeleri, plastik oyuncaklar) Fungisitler	Yüksek doza maruz kalındığında düşük ve hamilelikte komplikasyonlar Penkonazol- tiroid, prostat ve testis ağırlığında değişme Prokloraz- hipofiz bezi büyüklüğünde değişme Propikonazol- steroid metabolizması üzerinde etkili Tridemorf- sistik over oluşumu Epoksikonazol- cinsiyet hormonlarının dengesinin bozulması ve ovarium tümörlerinin oluşumu
Östron, 17- β estradiol, 17- α estradiol Antibiyotikler (penisillin, sulfonamid, tetrasiklin vs.)	Balıklarda feminizasyon. Hedef olmayan canlılar üzerinde östrojenik etki Patojenlerin antibiyotiklere direnç geliştirmesi, doğal mikro flora üzerinde etki
Parfüm (sentetik misk)	Misk ksilol - Rodent deneylerinde karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Misk Amber – Sinir sistemi üzerinde tahrip edici etki
Kosmetik ürünlerdeki koruyucular (paraben) Dezenfektanlar –triklosan (akne kremleri, diş macunları, anti bakteriyel sabunlar) Poliklorlu bifeniller (PCBs) – elektronik ekipmanlar	Zayıf Östrojenik etki Toksik etki, bakteriyel direnç gelişimi, doğal mikrobiyal komünite üzerinde yıkıcı etki (biyosidal) Metabolitleri östrojenik etki gösterebilir, çocuklarda zekâ gelişimi üzerinde negatif etki, karsinojenik etki

2.2. Mikro Kirlenici Olarak İlaç Etken Maddeleri

Endüstri ve bilimin gelişmesi ile birlikte günümüzde, farklı amaçlara yönelik binlerce farklı kimyasal bileşik sentezlenmekte ve insan kullanımına sunulmaktadır. Tekstil sanayinde, araba sanayinde, çeşitli endüstri dalları, tarımda vs. kullanılan bu bileşikler çevre için kirlilik yükü oluşturmaktadırlar. Bir diğer kirlilik yükü oluşturan bileşiklere, çeşitli hastalıkların tedavisi, önlenmesi, tanısı, ağrıların giderilmesi ve bunun gibi nedenler ile kullanılan çok çeşitli kimyasal yapıya sahip binlerce farklı ilaç aktif maddeleri verilebilir [25], [26]. Farklı amaçlara yönelik, beta-blokerlar, kolestrol ilaçları, antibiyotikler nöroaktif maddeler, doğum kontrol ilaçları, analjezik ve anti enflamatuar vs. gibi birçok değişik kimyasal yapıya sahip ilaç etken maddesi tıp ve veterinerlikte kullanım alanı bulmaktadır [2]. İlaç etken maddeleri belli bir biyolojik etki göstermesi için üretilirler [27]. Bu nedenle sıvı fazda hareket kabiliyetleri yüksektir ve bu özelliklerinden dolayı kolaylıkla doğal ortamlara ulaşabilirler [28].

Farmasötik bileşikler uygulamadan sonra ya ana molekül değişmeden ya da metabolitleri şeklinde atılırlar. Bazı ilaç etken maddeleri insan vücudunda ya hiç değişime uğramaz ya da daha polar glukoronid konjugatlar oluştururlar. Bu konjugatlar arıtım tesislerinde kolayca parçalanır ve etken madde ortaya çıkar [4]. Ana atılım yolu vücuda giren ilacın ve ilaca ait metabolitlerinin idrar ve dışkılama yolu ile şehir atık suyuna karışmasıdır [2]. Ayrıca kullanılmayan ilaçların kanalizasyona dökülmesi, besi çiftlikleri, besi çiftliklerinden çıkan gübrenin tarımda kullanılması, kullanım süresi dolmuş ilaçların uygun olmayan şekilde imhası, balık çiftlikleri, hastane atık suları ve ilaç üretim tesislerinin çıkış suları farmasötik bileşiklerin doğaya bulaş yollarıdır. [28], [29], [2], [12],[30] (Şekil 2.1).

Birçok araştırma atık arıtım tesislerinin farmasötik bileşiklerin giderilmesinde yetersiz kaldığını göstermiştir [31]–[33]. Artan nüfus ile birlikte farmasötik maddelerin kullanım oranlarının giderek artması ve doğaya yüksek dozlarda verilmesi, çevre için ihmal edilemeyecek bir kirlilik yüküne neden olmaktadır [34],[35] .



Şekil 2. 1. İlaç etken maddelerinin ana bulaş yolları

Atık su arıtım tesisleri, suda bulunan ve istemeyen maddelerin gideriminde önemli bir rol oynamaktadır. Suda bulunan katı maddelerin, gıdaların, biyoyıkılabilir organik maddelerin ve çeşitli kontaminantların giderilmesi amacı ile inşa edilmişlerdir. Fakat farmasötik bileşiklerin gideriminde yetersiz kalmaktadırlar [36],[37]. Sonuç olarak sentetik hormonlar, yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan β -blokerlar, anti-inflamatuarlar, lipid regülatörleri, anti tümör ajanları, nöroaktif maddeler vs. çeşitli ortamlardan alınan su örneklerinde $\mu\text{g/L}$ – ng/L konsantrasyonlarda tespit edilmiştir [2], [14], [32] (Çizelge 3). Atık sularla çevreye bulaşan ilaç etken maddelerinin miktarları çok düşük olduğu için insanda akut toksisiteye neden olması beklenmez ama ciddi kronik etkilere neden olacağı düşünülmektedir [19].

Etkili bir şekilde arıtılmayan farmasötikler kullanım ve içme su kaynaklarını da kirletmektedir [32], [38]. Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, İtalya gibi ülkelerin içme suyu kaynaklarında, farklı farmasötik bileşikler farklı oranlarda tespit edilmiştir [3] (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Ükelere göre içme suyunda tespit edilen ilaç etken maddeleri ve oranları [3].

Etken madde	Terapötik Grup	Tespit edilen maksimum miktar (ng L ⁻¹)	Tespit edilen ülke
Bezafibrat	Kolestrol ilacı	27	Almanya
Bleomisin	Anti-neoplastik	13	İngiltere
Klofibrat asit	Kolestrol ilacı	70 165 270 170 5,3	Almanya Almanya Almanya Almanya İtalya
Karbamazepin	Anti-epileptik	24 258	Kanada Amerika Birleşik Devletleri
Diazepam	Psikiyatrik ilaç	10 23,5	İngiltere İtalya
Diklofenak	Analjezik ve anti- piretik	6	Almanya
Gemfibrozil	Kolestrol ilacı	70	Kanada
İbuprofen	Analjezik ve antipiretik	3	Almanya
Fenazon	Analjezik ve antipiretik	250 400	Almanya Almanya
Propilfenazon	Analjezik ve antipiretik	80 120	Almanya Almanya
Tylosin	Makrolid grubu antibiyotik, (çiftlik hayvanlarında büyümeyi teşvik edici olarak kullanılır)	1,7	İtalya

Ülkemizde Büyük çekmece gölünün beş ana kolunda (Karasu, Hamza, Tahta köprü Beylik çayı, Ahlat) yürütülen bir çalışmada yüzey sularında, amoksisilin, siprofloksasin, eritromisin, atenolol, diclofenak, ibuprofen ve naproksen gibi farmasötik maddelerin varlığı gösterilmiştir [8].

2.3. İlaç Kalıntılarının Çevre İçin Önemi

İlaçların, ilaç üretim aşamasında kullanılan veya sentezlerde yan ürün olarak elde edilen birtakım kimyasalların atık olarak çevreye geçtiklerinde ortaya çıkabilecek olası zararlı etkilerinin değerlendirilmesi ve yeni arıtım teknolojilerinin geliştirilmesi yakın gelecekte ciddi problemlerin önlenmesi açısından önem verilmesi gereken bir konudur.

Sucul çevre için tehlikeli olan bileşikler aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılır:

R50 Sucul organizmalar için çok toksik: Akut toksisite (LC50 (Balık), ED50 (*Daphnia*), IC50 (alg) ≤ 1 mg/L

R50 ve R53 Sucul organizmalar için çok toksik ve uzun vadede negatif etkilere sebep olabilir. Akut toksisite ≤ 1 mg/L ve doğada kolay parçalanamaz

R51 Sucul organizmalara toksik. $1 \text{ mg/L} < \text{Akut toksisite} \leq 10 \text{ mg L}^{-1}$

R52 ve R53 Sucul organizmalara zararlı ve uzun vade de negatif etkilere sebep olabilir. $10 \text{ mg L}^{-1} < \text{Akut toksisite} \leq 100 \text{ mg/L}$ ve doğada kolay parçalanamaz.

R53 Uzun vade de negatif etkilere sebep olabilir. Çözünürlük 1 mg/L den az ve doğada kolayca parçalanamaz [32].

İlaç kalıntılarının ekotoksikolojik etkileri akut ve kronik toksisite olarak iki ana başlık altında incelenebilir.

2.3.1. İlaç Kalıntılarının Akut Toksisitesi

Farmasötiklerin akut toksisitesi OECD, EPA ve ISO gibi uluslararası kuruluşların kabul ettiği algler, omurgasızlar, zooplanktonlar ve balıklar gibi laboratuvar organizmalarla laboratuvar organizmaları ile gerçekleştirilen standart testlerle değerlendirilir [2], [39].

Antibiyotikler: Sulfametoksazol, klortetrasiklin ve lomfloksasin ile yapılan çalışma bu antibiyotiklerin son derece fitotoksik olduğunu göstermiştir. *Lemna gibba*'nın (sucul bitki) yaş ağırlığındaki azalmaya bağlı ED50 değerleri sırasıyla $81 \mu\text{g L}^{-1}$, $219 \mu\text{g L}^{-1}$ ve $97 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak bulunmuştur [40]

Nöroaktif maddeler: Serotonin geri emilim inhibitörü olan fluoksetin ilaç ekten maddeleri arasında en toksik olanlarından biridir. Yapılan çalışmalarda algler için ED50 0,024 mg L⁻¹ bulunmuştur [41]. Yaygın kullanıma sahip diazepam ile *Daphnia magna* üzerine yapılan çalışma ED50 değerinin 14,1 mg L⁻¹ ile 24,6 mg L⁻¹ arasında olduğunu göstermiştir [42].

Kolestrol ilaçları (Lipid regülatörleri): Kolestrol düşürücü ilaçlar arasında ise en yüksek akut toksisiteye sahip olan klofibratdır. *Gambusia holbrooki* ile yapılan çalışmada, bu balık için klofibratın LD50 değeri 7,7 mg L⁻¹ (96 saat) bulunmuştur [43].

B- Blokerlar: β-blokerlar arasında akut toksisitesi en yüksek olan propranolol adlı etken maddedir, zooplankton için EC 50 0,8 mg L⁻¹ olarak bulunmuştur [44]. Atenalol için *Hydra vulgaris* (knidli) ile yapılan çalışmada EC50 10 mg L⁻¹ bulunmuştur [45].

Anti tümör ajanları: Metotreksat ile siliyat *Tetrahymena pyriformis* üzerinde yapılan çalışmada EC50 değeri 45 mg L⁻¹ olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada 85 mg L⁻¹ metotreksatın balık embriyolarında teratojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir [46]

Analjezik ve non-streoidal anti-enflamatuarlar: Bu ilaç grubunda olan diklofenak en toksik bileşiktir. Algler ve omurgasızlarla yapılan bir çalışmada ED50 değeri algler için 14,5 mg/L, zooplanktonlar için EC50 değeri 22,43 mg/L olarak bulunmuştur [44]. Bir diğer örnek olarak balıklarda EC50 değeri 32 mg/L bulunan ketoprofen verilebilir [47].

2.3.2. Kronik Etkiler

Çevreye bulaşmış olan ilaç kalıntılarının miktarları genellikle akut toksisite gösterecek konsantrasyonun altında bulunmaktadır [2]. Doğada bulunan farmasötik madde konsantrasyonu laboratuvar ortamında yapılan çalışmalara göre düşük dozda olsa da sucul organizmaların bu bileşiklere yaşama süreleri boyunca maruz kaldıkları gerçeği ihmal edilmemelidir. Bu nedenle denizlere, tatlı sulara, nehirlere ve kullanım suyuna bulaşmış olan ilaç kalıntılarının kronik etkisi çok daha önemlidir. Doğum kontrol ilaçlarında bulunan sentetik östrojene (EE2) 4 ng/L konsantrasyonda maruz kalan *Pimephales promelas* (yassı kafalı golyan balığı) türünde ikincil seksüel karakterlerin gelişmediği ve erbezi dokularının oluşmadığı tespit edilmiştir [48].

Bir diğ er ç alışma 32 ng/L EE2 nin yumurta dölleme başarisında azalma ve ç ıkan yavru cinsiyetleri oranlarında değişime (diři sayısında artış) neden olduğu göstermiştir [49]. Yařam süreleri boyunca 5 ng/L EE2 ye maruz kalan zebra balıklarının F1 döllelerinde üreme verimliliğinde önemli bir azalış ve sonuç olarak popölasyonun yıkıma uğraması gözlemlenmiştir [50]. Anti-enflamatuar 5 µg/L diklofenak'a 28 gün maruz kalan gökkuşağı alabalıklarında renal dokularda değişim ve solungaçlarda anormallikler gözlenmiştir [51]. Akbabalarda diklofenak'ın direkt böbrekleri hedef aldığı ve akut böbrek yetmezliğine neden olduğu rapor edilmiştir [52]. B-bloker ilaçlar grubunda olan propranolol ile *Oryzias latipes* (balık) yapılan bir ç alışmada 0,5 µg/L konsantrasyonda ilaca iki hafta ve dört hafta maruz kalan bireylerin plazma hormon seviyelerinde değişim ve üretilen yumurta sayısında azalma rapor edilmiştir [53]. Kolesterol ilacı gemfibrozil'e 1,5 ile 10 mg/L 14 gün maruz kalan *Carassius auratus* (japon balığı) plazma testosteron seviyesinde %50 dūřüř bildirilmiştir [54]. *Hyrda vulgaris* ile yapılan ç alışmada 10 µg/L diazepam'ın polip rejanarasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [45]. Dünya ç apında yaygın kullanımı olan klinik depresyonun tedavisinde kullanılan seçici seratonin geri emilim inhibitörü olan flouksetin'in (1- 100 µg/L) *Pimephales promelas'in* (balık) erkek bireylerinde saldırganlık, yuva yapma davranışlarında değişim gibi davranışsal anormalliklere neden olduğu rapor edilmiştir [55]. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan flutamid (0,9 mg/L) *Pimephales promelas* erkek bireylerinde cinsiyet hormonlarında anlamlı bir dūřüře neden olur [56].

2.4. Hücre Kültürleri ile Yapılan Toksisite Ç alışmaları

Caminada ve arkadaşları PLHC-1 ve RTG-2 balık hücre hatlarını kullanarak seçilmiş bazı ilaç etken maddelerinin sitoksisitelerini ortaya koymuştur (Ç izelge 2.4) [57]. Fibratlar (klofibrat, fenofibrat) yağların β-oksidadasyonunu indükleyerek hücre içinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur. Klofibrat ve fenofibrat hücre için toksik olmalarının esas nedeni, oluşmasına neden oldukları oksidatif strestir. Klofibrat ve fenofibrat için bulunan PLHC-1 hücre hattı ED50 değerleri sırası ile 0,46 ve 3,25 mg/L bulunmuştur [58].

Çizelge 2.4. Bazı ilaç etken maddelerinin PLHC-1 ve RTG-2 hücre hatları üzerindeki sitotoksitesisi [52].

Etken madde	PLHC-1 ED50 mM	RTG-2 ED50 mM
Diklofenak	0,243	09,269
İbuprofen	1,20	0,834
Mefenamik asit	0,393	0,218
Naproksen	2,54	1,49
Parasetamol	>10	>10
Fenazon	>10	>10
Rofekoksib	0,531	>5
Salisilik asit	7,24	8,66
Atorstatin	0,0818	0,0718
Bezafibrat	2,60	1,74
Klofibrin	3,77	3,15
Fenofibrat	>5	>5
Gemfibrozil	0,873	0,843
Pravastatin	5,50	6,03
Simvastatin	0,0645	0,173
Asebutolol	>10	>10
Metoprolol	>2	>2
Propranolol	0,158	0,142
Karpamazepin	>2,5	>2,5
Flouksetin	0,0205	0,0242
Metotreksat	>0,4	>0,4

2.5. İlaç Kalıntılarının İnsan Sağlığı Açısından Önemi

İlaç etken maddeleri insanda akut toksisiteye neden olabilecek dozun çok altında bulunsalar da, verimli bir şekilde arılamayan etken maddeler içme suyu kaynaklarını kirletmektedir [3], [26], [32]. Ayrıca kirlenmiş sulardan elde edilen balık tüketimi de farmasötik bileşiklere maruz kalma riskini artırmaktadır [59]. Kirlenmiş su kaynağını kullanan ve kirlenmiş sucul ortamlardan elde edilen balıkları tüketen insanlarda olası uzun dönemli zararlı etkileri endişe yaratmaktadır

Atenolol, bezafibrat, karbamazepin, siklofosmamid, siprofloksasin, furosemid, hidroklorothiazide, ibuprofen, lincomisin, ofloksasin, ranitidin, salbutamol ve sulfamethokzasol karışımı (ng/L) ile yapılan çalışmada karışımın insan embriyonik HEK293 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda etken madde karışımının insan embriyonik hücrelerinin çoğalmasını %30 azalttığı, stres cevap sinyal protein kinaz ERK1/2 aktive ettiği ve glutatyon-S-transferaz genin ifade edilmesinin arttırdığı bulunmuştur [60]. Sucul çevrede bulunan antibiyotiklerin antibiyotik dirençli bakterilerin gelişmesine neden olması ve bu direnç genlerinin diğer patojen bakterilere transfer olma ihtimali insan sağlığı açısından dolayı olsa da önemli bir etki olarak kabul edilebilir [3]. Çevrede bulunan östrojen ve ksenoöstrojenlerin tip 2 diyabete neden olabileceği düşünülmektedir [61].

2.6. Etken Maddelerin Metabolitleri ve Çevre İçin Önemi

Diğer toksinler gibi farmasötik bileşikler de vücuda girdiğinde toksik etkilerinden bedeni korumak için birçok oksidatif ve konjugatif enzim tarafından metabolize edilirler ve daha polar ve suda çözünürlüğü yüksek ürünlere dönüştürülürler. Bu dönüşüm süreci iki ana fazda gerçekleşir; faz I hidroliz, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını, faz II ise konjugasyon reaksiyonlarını içerir [62]. Bu reaksiyonlar sitokrom P450 enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler lipofilik karakterdeki organik moleküllere –OH, -SH, -NH₂, -COOH gibi fonksiyonel gruplar takarak daha hidrofilik hale getirirler. Konjugatif enzimler farmasötik bileşiklere O-, N-glukoronidler, sülfatlar, aseatat esterler, karboksimidler ve glutatyoniler takarak idrarla atılması kolay daha hidrofilik bileşikler haline getirirler [63]. Karaciğerde gerçekleşen bu reaksiyonlar sonucu ana bileşikten daha toksik ürünler ortaya çıkabilmektedir.

Örneğin, lipid düşürücü bir ilaç olan gemfibrozilin glukoronidasyon ürünü CYP2C8 (sitokrom P450 enzim sistemi üyesi) üzerinde ana bileşikten daha inhibitörük etki gösterir [64]. Sonuç olarak diğer ilaçların metabolizmasını da etkileyerek birikime ve toksik etkilere neden olur [62].

Ana bileşiklerin çevre üzerinde ki etkisi kadar idrar ve dışkılama ile doğaya bulaşan metabolitleri de dikkate alınmalıdır. Serotonin geri emilim inhibitörü flouksetinin metaboliti olan norflouksetin atık su arıtım tesisi çıkış suyunda 3,9 ile 25 ng/L konsantrasyonda bulunmuştur [65]. Ayrıca bu metabolite atık arıtım tesisi çıkış suyunun döküldüğü sucul ortamlardan toplanan *Lepomis macrochirus*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio*, ve *Pomoxis nigromaculatus* tür balıkların karaciğer ve beyin dokularında rastlanmıştır [66]. Norflouksetin ana bileşik olan flouksetinden omurgasızlarla yapılan tokisisite çalışmalarında %50 daha toksik bulunmuştur. Anti inflamatuvar ibuprofenin karboksilenmiş ve hidroksillenmiş metabolitleri Norveç atık su arıtım tesisi çıkış suyunda 1,7 µg/L, deniz suyunda ise 7 ng/L konsantrasyonda tespit edilmiştir [67]. Analjezik fenazonun metabolitleri olan 1-asetil-1-metil-2-dimetiloksamoyil ve 1,5-dimetil-1,2-dehidro-3-pyrazolon arıtılmış suda dayanıklı yapılarından dolayı 1 µg/L oranında tespit edilmiştir [68]. Psikiyatride kullanılan karbamazepin yüzey sularında 20 ng/L oranında tespit edilmiştir [69]. Karbama zepinin bir metaboliti olan 2-hidroksi-iminostilben tranformasyon reaksiyonları ile iminoquinona dönüşür. İminoquinonun insanda çeşitli organlara zararlı (böbrek karaciğer) olacağı düşünülmektedir. Karbamazepin-10,11-epoksit, karbamazepin-10,11-dihidrodiol ve 2-hidroksikarbamazepin, karbamazepinden türevlenen metabolitlerdir. Bu metabolitler yüzey sularında ng/L oranında tespit edilmişlerdir [70]. Östrojenler vücutta glukuronidasyon, sülfatlama ve hidroksilasyon ile daha polar bileşiklere çevrilir. Östrojenler çoğunlukla polar konjugatlar şeklinde vücuttan atılır. 17β-estradiol konjugatı 17β-estradiol-3-glukuronid, Östron konjugatı östron-3-sulphat ve estriol konjugatı estriol-16-glukuronid şeklinde vücuttan atılır [71].

Östrojen konjugatları biyolojik olarak inaktif olsalar da aktif ana bileşiğe geri dönüşebilirler. Neredeyse bütün aktif çamurlarda bulunan *E. coli* sahip olduğu β-glukuronidaz ve arilsulfataz enzimleri ile konjugat halindeki bileşikleri ana molekülle dönüştürür [71], [72].

Farmasötik aktif bileşiklerin tespiti buldukları birçok makro molekülünde bulunduğu karışık ortamlarda oldukça zordur. Metabolitlerin tespiti için sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC/MS) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC/MS) oldukça kullanışlı yöntemlerdir. Bilinmeyen bir metabolit söz konusu ise bu yöntemler nükleer manyetik rezonans spektrometresi (NMR) ile desteklenmelidir [62].

2.7. Mikro kirleticilerin arıtımında kullanılan yöntemler

2.7.1. Aktif Karbon

Aktif karbon siyah, ince taneli, kum gibi görünen bir materyaldir. Kirilenmiş su veya hava bu taneciklerin arasından geçerken ya gözenekli yapıya sahip tanecik tarafından emilir ya da karbon taneciğinin yüzeyine yapışır. Evlerde bulunan su arıtma filtreleri, akvaryum pompalarında bulunan filtreler de aynı mekanizma ile çalışmaktadır. Aktif karbon filtreler ayrıca sudan istenmeyen kokuların ve tatların da uzaklaştırılmasında etkindir. Aktif karbonun kirlilik yaratan moleküllerin giderilmesindeki verimliliği giderilecek olan molekülün cinsine, temas zamanına ve kullanılan aktif karbonun özelliklerine (tane büyüklüğü, gözenek çapı vs.) göre değişim gösterir. Granüler aktif karbon organik kirleticilerin giderimde oldukça etkili bir materyaldir [15]. Yapılan bir çalışma aktif karbonun naproksen, diklofenak, flouksetin gibi farmasötik bileşiklerin gideriminde etkili olduğunu ancak ortamda bulunan diğer organik moleküllerin giderimi olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir [73].

2.7.2. Fizikokimyasal Yöntemler

Westerhof ve arkadaşlarının 30 farklı mikro kirletici madde ile yaptıkları çalışma flokülasyon ve koagülasyon yöntemlerinin mikro kirleticilerin gideriminde yetersiz kaldığını göstermiştir. Yine aynı çalışmada ozonlama ve klorlamanın kirletici gideriminde kullanışlı olduğu rapor edilmiştir [74] Koagülan ajan olarak alüminyum sülfat ve ferrik sülfatın kullanıldığı bir çalışma, test edilen antibiyotiklerin gideriminde bu yöntemin başarısız olduğunu göstermiştir [75]

Klorlama ana bileşiğin oksitlenmesine dayanan bir yöntemdir ve mikro kirleticilerin gideriminde iyi sonuçlar vermekte ise de sonuçta daha toksik ürün veya ürünler çıkabilmektedir.

Örneğin, atık suyun klorlanması esnasında asetaminofenin ana bileşikten daha toksik olan iki metaboliti 1,4-benzokinon ve N-asetil-p-benzokinon imin ortaya çıkar [76]. Bir diğer yöntem ise Fenton reaksiyonudur, Fe iyonlarının hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesi ve oluşan yüksek oksitleme kapasitesine sahip hidroksil radikalının organik kirleticileri oksitlemesi esasına dayanan yöntemdir. Bazı mikro kirleticiler için başarılı sonuç verir [15]. Ozonlamada organik kirleticilerin direk ya da oluşan hidroksil radikalleri ile oksitlenmesi esasına dayanan verimli bir yöntemdir [77].

2.7.3. Membranlar

Nanofiltrasyon ve ters osmos gibi yöntemler mikro kirleticilerin gideriminde kullanılan etkili yöntemlerdir [78].

2.7.4. UV Işını

UV ışınları son yıllarda, kullanım ve atık suyun mikroorganizmalardan arındırılmasında kullanılan ve başarılı olan bir yöntemdir. UV ışınları ayrıca mikro kirletici organik moleküllerin gideriminde de kullanılmaktadır [11].

2.7.5. Biyolojik Arıtım

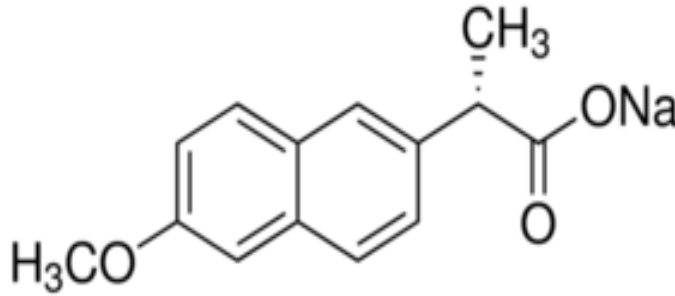
Biyolojik arıtım sistemleri, funguslar ve bakterilerin kullanıldıkları sistemlerdir. Bu sistemlerin devamlılığı ve başarısı ortam pH'sı, ortam bulunun besin maddeleri, ortamın redoks potansiyeli, tuz oranı, sıcaklık, toksik madde varlığı gibi birçok parametreye bağlıdır [79]. İlaç etken maddelerinin biyolojik arıtımı bileşiğin kimyasal yapısına göre çok çeşitlilik göstermektedir. İbuprofen için %90 nin üstünde bir arıtım sağlanırken bu oran karbamazepin için sıfırdır [80]. Bir diğer çalışmada doğal ve sentetik östrojenlerin ancak %10 luk bir kısmının biyoyıkım ile giderilebildiğini, giderilebilen bir kısmının ise aktif çamura adsorpsiyon ile gerçekleştiğini bildirilmiştir [19].

2.8. Tez Kapsamında Kullanılan İlaç Etken Maddeleri

Tez kapsamında analjezik ve antipiretik özellik gösteren steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlar grubunda yer alan naproksen ve diklofenak kullanılmıştır.

2.8.1. Naproksen

Naproksen (2-(6-(metoksinaftalen-2-yl)propionik asit) steroidal olmayan anti-inflamatuar ilaçlar arasında bulunan bir aril propionik asittir. Naproksen ağrı kesici ve anti-inflamatuar özellik gösteren bir moleküldür. Naproksen'in ağrı kesici ve anti-inflamatuar özelliği prostaglandin sentezinden sorumlu olan siklooksijenaz enziminin aktivitesini baskılamasından kaynaklanır [81]Reçeteye bağlı olmayan naproksen cerrahi müdahale sonrası ağrı, migren atakları, rometoid artirit ve osteoartritin semptomatik tedavisinde kullanılmaktadır [82]. Yaygın kullanımından dolayı naproksen yüzey suları, yer altı suları hatta içme suyu kaynaklarında dahi tespit edilmiştir [38], [83], [84]. Ülkemizde apanax, aleve, apraxin, aprol, naprex, naprosyn , naprosyn jel, apromed vs. gibi ticari isimlerle kullanıma sunulmuştur.



Şekil 2.2. Çalışmalarda kullanılan naproksen sodyumun formülü

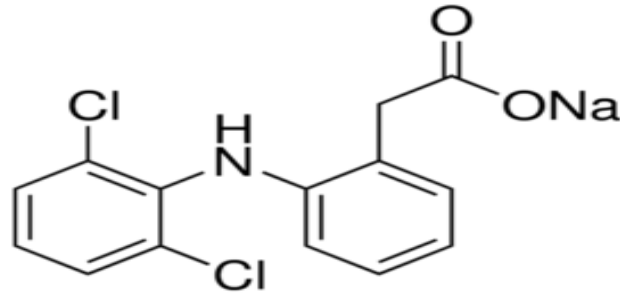
Naproksen ve sodyum tuzu sodyum naproksen tablet şeklinde ve süspansiyon şeklinde kullanılmaktadır. Naproksen kullanımdan sonra %95 oranında idrar yoluyla vücuttan atılır. Bu nedenle çevrede sıklıkla tespit edilen farmasötik maddelerdendir [85]. Türkiye'de yapılan çalışmada 2013 yılı temmuz ayında Büyük Çekmece Gölünü besleyen Ahlat ve Beylik çaylarında sırasıyla, 1.3 µg/L ve 12.3 µg/L konsantrasyonda naproksen tespit edilmiştir [8]. Tixier vd. yaptıkları çalışmada atık su arıtım tesisi suyunda 2,6 µg/L konsantrasyonda naproksen bulunduğunu bildirmişlerdir [86]. Naproksen çok düşük miktarda dahi olsa da kullanım suyu kaynaklarında tespit edilmiştir [38].

Brachionus calyciflorus (omurgasız) için naproksen ve naproksen sodyum LD50 değerleri sırasıyla 62,48 mg/L ve 54, 64 mg/L olarak bulunmuştur. *Thamnocephalus platyurus* (omurgasız) için naproksen ve naproksen sodyum LD50 değerleri sırasıyla, 62,48 mg/L ve 43,54 mg/L olarak bulunmuştur [87].

2.8.2. Diklofenak

Diklofenak (2-[(2,6-diklorofenil)amino]benzene asetik asit) steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaçlar grubunda yer alır (Şekil 2.3). Ağrı kesici ve ateş düşürücü özelliklerinden dolayı dünya çapında çok yoğun şekilde kullanılmaktadır. Dünya üzerinde yıllık kullanımı 940 tonu bulmaktadır Farklı ortamlardan alınan su örneklerinde en sık rastlanan ilaç etken maddelerinden biridir [88].

Diklofenak ülkemiz yüzey sularında da tespit edilmiştir [8]. Antiflojistik ve analjezik özelliklerinden dolayı çok geniş bir kesim tarafından kullanılmaktadır. Diklofenak terapötik özelliğini prostaglandinlerin salınımını ve sentezini engelleyerek gösterir. Tedavi edici özelliklerinin yanı sıra gastropati, anti enflamatuara bağlı kolit, karaciğerde dejeneratif değişiklikler ve renal dejenerasyon gibi yan etkilere de sebep olur [89]



Şekil 2.3. Çalışmalarda kullanılan diklofenak sodyumun moleküler formülü

Diklofenak'ın doğa üzerinde ki etkisini en çarpıcı şekilde Oaks ve arkadaşlarının 2004 yılında çalışma göstermektedir. Bu çalışmada, Hindistan alt kıtasının önemli yırtıcı kuşlarından olan ve sayısı 1990 lardan itibaren azalmaya başlayan *Gyps bengalensis* (ak-sırtlı akbaba) nın popülasyonundaki azalmanın nedeni araştırılmıştır. Araştırmacılar Pakistan lokasyonunda gerçekleştirdikleri çalışmalarda akbaba popülasyonundaki renal yetmezliğe bağlı ölümlerin nedeninin çevrede bulunan diklofenak olduğu gerçeğini göstermişlerdir [52].

Diklofenak'ın zebra balığı üzerinde lethal ve teratöjenik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, zebra balığı embriyoları için LD50 96 saat için $480 \pm 50 \mu\text{g/L}$ ve ED50 $90 \pm 20 \mu\text{g/L}$ 96 saat olarak bulunmuştur [51]. Diklofenak ülkemizde voltaren, dicloflam, diclomec, difenak ve dikloron gibi ticari isimlerle kullanıma sunulmuştur.

İlaç etken maddelerinin yarattığı kirlilik, analiz teknolojilerinin gelişmesiyle farkına varılan görece yeni bir kirlilik grubudur. Bu güne kadar rapor edilmiş farmasötik maddelere bağlı kirlilikler insan için akut toksisite yaratabilecek dozun altındadır. Ancak içme suyu kaynaklarında bile tespit edilen farmasötik maddelere uzun süre maruz kalmanın insanlar üzerinde yaratabileceği zararlı etkiler endişe yaratmaktadır. Bu neden ile ilaç etken maddelerinin giderimi ile ilgili çalışmalar değer kazanmaktadır.

2.9. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar

Bu tez kapsamındaki çalışmalarda filamentöz *Aspergillus niger*, beyaz çürükçül mantarlar ailesinden *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium*, maya *Yarrowia lipolytica* kullanılmıştır.

2.9.1. *Aspergillus niger*

Aspergillus'lar konidiasporlarının rengine göre sınıflandırılırlar. Konidiosporları kahverengi-siyah olanlar *Aspergillus niger* olarak gruplandırılır. *Aspergillus niger* neredeyse dünyanın her yerinden izole edilebilir. *A. niger* toprakta, komposta, çürüyen bitkilerin üzerinde vs. gibi birçok organik maddenin bulunduğu ortamda üreyebilir. *A. niger* geniş sıcaklık ($6-47^\circ\text{C}$) ve oldukça geniş pH (1,4-9.8) aralığında yaşayabilmektedir [90].

Aspergillus niger 1919 yılında, yiyecek ve içecek sanayi, kozmetik sanayi, şarap üretiminde vs. gibi çok çeşitli sanayi dallarında kullanımı olan sitrik asit üretimiyle endüstriyel anlamda kullanılmaya başladı [91], [92]. *A. niger* ayrıca proteaz, pektinaz, amiloglukosidaz ve lipaz gibi endüstriyel kullanımı olan enzimleri de üretebilmektedir [90], [93]. Günümüzde rekombinant *A. niger* suşları glukoamilaz, α -amilaz, glukoz oksidaz, pektin esterase, arabinofuranosidaz, fosfolipaz, fitaz ve ksilinaz üretiminde kullanılmaktadır [94].

A. niger kirleticilerin giderilmesinde de kullanılabilir. *A. niger*'in herbisit klorimuronetil in biyokimyasını gerçekleştirdiği bildirilmiştir [95]. Herbisit klorosulfuron ve metsulfuron metil in biyokimyasının *A. niger* tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [96]. Pamuk, çay, şeker kamışı ve sebzeler gibi ekonomik önemi olan tarımsal ürünlerin zararlılardan korunmasında kullanılan organoklorlu bir pestisit olan endosulfan *A. niger* tarafından başarılı bir şekilde yıkıma uğratılmıştır [97].

2.9.2. Beyaz Çürükçüller *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium*

Beyaz çürükçül terimi taksonomik bir sınıflamadan ziyade fizyolojik bir gruplandırma. Bu gruba beyaz çürükçül adının verilmesinin sebebi lignini yıkıma uğratmaları ve sonunda oluşan beyaz görünümdür [98] Beyaz çürükçüller ligninin karbon döngüsüne katılmasında da eşsiz bir rol oynarlar [99]. Doğal olarak üretilen ve bilinen biyolojik yıkıma en dayanıklı biyomateryal lignindir. Vasküler bitkilere büyümeleri için gerekli sağlamlığı verir ve bitkinin yapısal polisakkaritlerinin mikroorganizmaların yıkımından korunmasını sağlar [100]. Bu çalışmada Basidiomycota şubesinde olan beyaz çürükçül funguslardan *Phanerochaete chrysosporium* ve *Funalia trogii* kullanılmıştır.

Beyaz çürükçüller tarafından üretilen ve lignin yıkımında önemli rolü olan enzimlere örnek olarak, lignin peroksidaz (LiP, E.C. 1.11.1.14), mangan bağımlı peroksidaz (MnP, E.C. 1.11.1.13) ve bakır grubu içeren lakkaz (Lac, E.C. 1.10.3.2) verilebilir [98]. Beyaz çürükçül fungusların lignin degradasyonundan sorumlu enzimleri ile birçok organik kirleticiyi yıkıma uğrattığı gösterilmiştir [101].

Phanerochaete chrysosporium düşük azot içeren ortamlarda, ligninolitik enzimlerden olan lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz için iyi bir kaynaktır [94]. Askeri mühimmatın güvenli bir şekilde atılması çok önemli bir husustur. Askeri mühimmatın atımı sırasında patlama gibi risklerin yanında bu gibi atıklar çevre için çok toksik ve kararlı bir yapı gösterirler. Savunma sanayinin en önemli atıklarından biri olan TNT nin *Phanerochaete chrysosporium* tarafından mineralize edilebildiği gösterilmiştir [102].

Başka bir çalışmada patlayıcı RDX in (hekzahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin) *Phanerochaete chrysosporium* tarafından yıkıma uğratıldığını göstermiştir [103].

Phanerochaete chrysosporium organoklorlu kimyasalların da yıkımını gerçekleştirebilmektedir. Örneğin, organoklorlu bir kirletici olan 2,7-diklorodibenzo-p- dioksinin yıkımını başarıyla gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [104]. *Phanerochaete chrysosporium* birçok çevresel kirleticiyi, atrazin (herbisit), pentoklorofenol, benzen, tolüen, etilbenzen, ksilen, kağıt ağartma tesisi atık suyu, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sentetik boyalar gibi yıkıma uğratma kabiliyetine sahiptir [105]–[110].

Basidiomycota şubesine ait *Funalia trogii* verimli bir lakkaz üreticisidir [111]. *Funalia trogii*'nin zeytinyağı fabrikası atık suyunda, kimyasal oksijen isteğini (%63), toplam fenolü (%93) ve rengi (%81) azalttığı bildirilmiştir [112]. Reaktif Siyah 19, Reaktif Mavi 49, Asit Violet 43, Reaktif Siyah 5, Reaktif Turuncu 16 ve Asit Siyah 52'nin giderimi üzerinde yapılan bir çalışma, *Funalia trogii*'nin kullanılan altı boyayı verimli bir şekilde giderdiğini göstermiştir [113]. Civa, kadmiyum ve çinko iyonları *Funalia trogii* kullanılarak adsorpsiyon yolu ile giderilebilmiştir [114].

2.9.3 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica aerobik karakterde insan için patojenik karakter göstermeyen bir mayadır. Dimorfik karakter gösteren *Yarrowia lipolytica*, miselyum ve pseudo miselyum oluşturabilir. Yüksek GC içermesiyle diğer Ascomycete mayalardan ayrılır [115]. *Yarrowia lipolytica* çoklu biyoteknolojik uygulamaları olan organizmalara iyi bir örnektir. *Yarrowia lipolytica* sitrik asit, isositrik asit, alkalın proteaz, RNaz, lipaz eldesinde ve biyoremediyatif amaçlı kullanılabilir [116]. *Yarrowia lipolytica*, TNT (2,4,6-Trinitrotoulen) yıkımını verimli bir şekilde gerçekleştirebilir [117]. *Y.lipolytica* alkenleri, yağ asitlerini ve yağları kullanabilme yeteneğinden dolayı, bitkisel ve mineral yağ atıklarının gideriminde kullanılabilir [116]. Yapılan başka bir çalışma *Y.lipolytica* nın Reaktif Siyah 5 azo boyasını 24 saat içinde %97 oranında giderdiğini göstermiştir [118]. Alplerden alınan toprak örneklerinden izole edilen bir *Y. lipolytica* suşu 0°C ile 30°C arasında üreme yeteneğine sahiptir. Bu suş 10 gün içinde dizel yağını %68 oranında yıkıma uğratabilmektedir [119].

2.10. Fungal Sitokrom P450 Enzim Sistemi

Sitokrom P450 enzimleri hem-thiolat proteinlerdir. Bu enzimler prokaryotlar (arkeler, bakteriler), funguslar, böcekler, bitkiler ve insanlar gibi tüm canlı gruplarında bulunur. Genelde lipofilik karakterdeki molekülleri daha suda çözünebilen hidrofilik moleküllere dönüşümünü katalizlerler. Fungal P450 enzim sisteminin gerçekleştirdikleri reaksiyonlar kısaca, alifatik, alisiklik ve aromatik moleküllerin, hidroksilasyonu, epoksidasyonu, dealkilasyonu, sulfoksidasyonu, deaminasyonu, desülfürasyonu, dehalojenizasyonu ve N-oksit redüksiyonudur [120]. Bir grup CYP450 enzimi hücrenin primer metabolizmasında rol oynamaktadır. Fungal CYP51 ve CYP61 enzimleri ergosterol biyosentezinde rol oynamaktadır. CYP51 enzimi diğer alemlerde de yer almasına rağmen CYP61 enzimi sadece funguslarda bulunur [121]. CYP52 enzimi n-alken asimilasyonu yapan *Candida* türlerinde bulunan bir enzimdir. Bu enzim n-alkenleri ve yağ asitlerini hidroksiller ve hidroksilenmiş ürünler daha ileri oksidasyona uğrayacakları β -oksidasyon yolağına girerler [120]. Fungusların patojenitelerinde de indüklenebilir P450 enzimlerinin rolü vardır. Konağın ürettiği anti fungal ajanlara karşı bir korunma mekanizmasıdır [120]. Bezelye patojeni *Necria haematococca* nın sahip olduğu pisatin demetilaz (CYP57A1), patojeni konağın ürettiği anti fungal pisatinin etkilerine karşı korur [122]. Progesteronun hidroksilasyonu gibi farmasötikçilerin ilgisini çeken birçok fungal temelli dönüşüm reaksiyonlarında da rol oynarlar [123]. Fungal sitokrom P450 enzimlerinin çevre kirleticilerinin de detoksifikasyonunda rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır. Polisiklik hidokarbon olan benzo piren mutajenik ve kanserojenik bir moleküldür. *Penicillium janthinellum*'un benzo piren yıkımını P450 enzim sistemi sayesinde gerçekleştirdiği düşünülmektedir [124].

2.11. Lakkaz (EC 1.10.3.2)

Lakkaz 1883 yılında Japon lak ağacından (*Rhus vernicifera*) elde edilen lateksin oksijen varlığında sertleşmesini gözlemleyen Yoshida tarafından bulunmuş ve 1985 yılında Bertrand tarafından karakterize edilmiştir [125]. Lakkaz (benzenediol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) çoklu bakır içermesiyle karakterize olan bir proteindir [126]. Çoklu bakır atomları içeren lakkaz aromatik ve aromatik olmayan çok çeşitli molekülleri moleküler oksijen varlığında oksitleyebilmektedir.

Düşük substrat özgülüğü gösteren lakkaz enzimleri, difenoller, sübstitiye fenoller, diaminler ve aromatik aminler gibi çok çeşitli substratın oksidasyonunu katalizleyebilmektedir [127]. Özgül olmayan yüksek oksidasyon kapasiteleri nedeni ile lakkaz enzimleri oldukça çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için kullanışlı olan biyokatalizörlerdirler. Bira sanayinde lakkaz bulanıklık nedeni olan polifenollerin uzaklaştırılması ve fermantasyon işlemi bittikten sonra oksijen içeriğinin düşürülmesi için kullanılmaktadır [128]. Selinheimo vd. (2006) *Trametes hirsuta*'dan elde edilen lakkazın hamurda bulunan ferulik asit ve arabinoksilan arasında ester bağları oluşumunu katalizlediğini ve sonuç olarak da hamurun mekanik direncinin arttığını göstermişlerdir [129]. Ferry vd. (2005) *Trametes versicolor*'dan elde ettikleri lakkaz enzimiyle, kateşolamin nörotransmitterler olan dopamin, epinefrin, norepinefrin miktarını nano molar seviyesinde belirleyebilecek bir biyosensör üretmişlerdir [130]Lakkaz bitkiler, funguslar, bakteriler hatta böcekler olmak üzere çok geniş bir canlı grubunda bulunurlar. Fungal lakkazların redoks potansiyelinin diğer gruplarda bulunan lakkazlardan yüksek olması, fungal lakkazları biyoteknolojik uygulamalarda kullanım açısından ayrı bir yere koyar [126] Lakkaz sadece ortamda bulunan bileşiklerin oksidasyonunda görev almaz bazı patojen fungusların patojenitelerinde de önemli rol oynamaktadır. Örneğin, *Cryptococcus neoformans* ölümle sonuçlanabilecek ağır enfeksiyonlara neden olan bir fungus türüdür. Fungusun hücre duvarıyla sıkı bir ilişki içinde olan lakkaz ve ürünü olan melanin, konağın bağışıklık sisteminden patojeni korur [131].

Lakkaz enziminin düşük substrat özgülüğü göstermesi ve çok çeşitli farklı substratın oksitlenmesini katalizlemesi gibi özellikleri nedeni ile birçok çevre kirleticinin gideriminde kullanılmaktadır. *Trametes polyzona*'dan izole edilen lakkazın önemli bir kirletici olan Bisfenol-A'nın ve sentetik boyaların yıkımını verimli bir şekilde gerçekleştirdiği gösterilmiştir [132]. Yapılan bir başka çalışma *Pleurotus ostreatus* kaynaklı lakkaz ile fenolik kirleticilerin gideriminin yapılabileceğini göstermiştir [133]. *Trametes hirsuta* kaynaklı lakkaz ile alkenlerin yıkımı gerçekleştirilmiştir [134]. Lakkaz, triarylmelan, indigoid, azo ve arthraquinonik boyaların gideriminde etkindir [135].

3. Materyal ve Yöntem

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Funguslar

Bu çalışma kapsamında kullanılan *Phanerochaete chrysosporium* ME446, *Funalia trogii* ATCC 200800, *Aspergillus niger* NRRL 328 ve *Yarrowia lipolytica* NBRC1658 suşları Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edildi. Stok kültürlerin devamı amacıyla sabouraud dextrose agar (Merck) katı besiyeri kullanıldı. Stoklar 20 günlük aralıklarla yeni besiyerlerine aktarıldı ve 30°C de 7 gün inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonunda 4°C de buzdolabında saklandı.

3.2. Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan Naproksen-Na (%98) Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalından, Diklofenak-Na ise (%98) Sigma Aldirch'ten temin edildi.

3.3. Giderim Çalışmalarında Kullanılan Üretim Ortamının Hazırlanması

Çalışma kapsamında modifiye Vogel kültür ortamı kullanıldı. Kültür ortamında kullanılan iz element stok çözeltisi (100 ml): Sitrik asit.H₂O: 2,5 g, ZnSO₄.7H₂O: 2,5 g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O: 0,5 g, CuSO₄.5H₂O: 0,125 g, MnSO₄.H₂O: 0,025 g, H₃BO₃:0,025 g, H₃P(Mo₃O₁₀).H₂O: 0,025 g olacak şekilde hazırlandı ve 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda (150 rpm) karıştırıldı ve hazırlanan 99 ml Vogel ana stok çözeltisine 1 ml eklendi. Vogel ana stok çözeltisi (100 ml); Na–sitrat: 15 g, KH₂PO₄: 25 g, MgSO₄.7H₂O: 1 g, NH₄NO₃:10 g, CaCl₂.2H₂O: 0,5 g. %1 (v/v) oranında iz element çözeltisi içeren ana stok %2 glukoz içeren üretim ortamına %2 (v/v) olacak şekilde eklendi. *Phanerochaete chrysosporium* üretim ortamında azot kaynağı 50 mg/L olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan üretim ortamı 1 M HCl ile pH 4.7 ayarlandı. Üretim ortamları 1,5 atmosfer basınç altında 110°C de otoklavda steril edildi.

3.4. Fungusların Ekimi ve Kültürasyon

Yatık Sabroud dextrose agarda kültüre edilmiş olan mikroorganizmalar 20 ml steril serum fizyolojik ile süspansiyon edildi. Süspansiyon edilmiş *F. trogii* kültürleri önce Malt extract brotta 5 gün 30°C de inkübe edildi. Beşinci gün sonunda *F. trogii* kültürleri 2400 rpm de homojenizatör (IKA) yardımıyla homojenize edildi. Elde edilen homojenizat yıkım çalışmalarında ana kaynak olarak kullanıldı. Diğer fungal kaynaklar direk süspansiyon edilmiş şekilleri ile kullanıldılar.

3.5. Etken Maddelerin Üreme Ortamına Eklenmesi ve Biyodegradasyon Çalışmaları

Çalışmalarda kullanılan Naproksen-Na, Diklofenak-Na etil alkolde çözüldü ve 30°C 150 rpm de etüvde ön inkübasyona tabi tutulan *Phanerochaete chrysosporium* ME446 (7 gün), *Funalia trogii* ATCC 200800 (7gün), *Aspergillus niger* NRRL 328 (3 gün) ve *Yarrowia lipolytica* NBRC1658 (3 gün) kültür ortamlarına son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde eklendi. Etken maddenin eklendiği zaman 0 kabul edildi. Kültür ortamları pH 4.7 de 48 saat 30°C de 150 rpm çalkama hızında ışık görmeyecek şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda abiyotik kontroller ve deney grupları naproksen için diklorometan, etanol (9:1), diklofenak için etil asetat a çekildi ve LC/MS de analiz edildi. Her yıkım çalışması ekim yapılmamış abiyotik kontroller baz alınarak değerlendirildi. Bütün çalışmalar aksi belirtilmedikçe üç tekrar yapıldı.

3.6. Biyokütlenin Ölçülmesi

Biyokütlenin ölçülmesi için kuru ağırlık yöntemi kullanıldı. Üretim sonrası fungal biyokütle önceden darası alınmış kurutma kâğıdıyla süzüldü ve 40°C de iki gün kurumaya bırakıldı. Kuruyan biyokütle hassas terazide ölçüldü.

3.7. Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Lakkaz aktivitesi ABTS oksidasyonuna dayalı yöntem ile ölçüldü [136]. Lakkaz aktivitesinin ölçümü için toplam hacim 3 ml olacak şekilde 0,3 ml substrat olarak ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), enzim kaynağı olarak 0,3 ml kültür süpernatanı ve reaksiyon ortamı olarak 2,4 ml 100 mM pH: 4,5 Na-Asetat tamponu kullanıldı. 30°C de 1 dakikalık inkübasyondan sonra reaksiyon

ortamı spektrofotometrede (Shimadzu UV- 1700) 420 nm dalga boyunda okundu. Unit enzim 30°C de 1 dakikada 1 µmol çıkan ürün olarak tanımlandı.

Tirozinaz aktivitesi L-Dopa dan Dopa krom oluşumu esasına göre tayin edildi. Kültür süpernatanı enzim kaynağı olarak kullanıldı. Reaksiyon 50 mM pH:7 fosfat tamponu içerisinde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Bir unit enzim 1 dakikada 30°C de oluşan µmol Dopa krom olarak tanımlandı. Absorbans değişimi 475 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu [137].

Lignin peroksidaz aktivitesinin ölçümü veratril alkolün veratil aldehite oksidasyonuna dayalı metot ile ölçüldü [138]. Reaksiyon 200 mM veratril alkolün substrat olarak kullanıldığı, pH: 3 100mM Na-tartarat tamponu içinde gerçekleştirildi. 0,1 ml kültür filtratı enzim kaynağı ve H₂O₂ reaksiyonu başlatıcı olarak kullanıldı. Bir Unit enzim bir dakikada oluşan 1 µmol veratil aldehit olarak tanımlandı. Absorbans değişimi spektrofotometrede 310 nm dalga boyunda okundu. Mangan peroksidaz aktivitesi 0,1 M pH 5 sodyum tartarat tamponunda, 0,1 mM varlığında MnSO₄ Mn³⁺tartarat oluşumuna dayanan yöntemle göre 238 nm dalga boyunda ölçüldü [139]. Bir unit 1 dakikada 30°C de oluşan bir µmol ürün olarak tanımlandı.

3.8. İlaç Etken Maddelerinin Ölçümü

Tez kapsamında kullanılan naproksen ve diklofenak etken maddelerinin tayini. Waters Alliance HPLC ye bağlı Waters Micromass ZQ ile gerçekleştirildi. HPLC kısmı için (Naproksen) yürütücü faz su: MeOH: % 0.1HCOOH aseto nitril içinde(37: 53: 10), kolon XTerra® MS C-18 (4.6 mm x 250 mm, 5 µm), akış hızı 0,55 ml/dak, enjeksiyon hacmi 4 µL ve 254 nm diode array detektörde ölçüldü. Diklofenak ölçümlerinde sadece yürütücü faz değişti. Diklofenak ölçümünde kullanılan yürütücü faz; asetonitril: MeOH: su: % 0.1HCOOH asetonitril içinde (65:15:10:10). Akış hızı 0,6 ml/dak. Kütle spektrometresi için analitik koşullar; Kapillar voltaj: 3,7 kV, kon voltaj: 29 V, kaynak sıcaklığı 100°C, desolvasyon sıcaklığı: 350°C (Naproksen ESI(-), Diklofenak ESI(+)) . Diklofenak tayininde ek olarak spektrofotometrik nitrik asit yöntemi de kullanıldı [140]. Yüzde giderim abiyotik kontrole göre hesaplandı.

3.9. NMR Analizleri

VARIAN MERCURY 400 MHz FT marka model cihazda, CD₃OD çözücü olarak kullanıldı. Kimyasal kaymalar ppm (δ) TMS ye göre relatif olarak verildi.

3.10. Metabolitlerin İzolasyonu

Yıkım ürünlerinin izolasyonu için Silika jel 60 (0.015-0.040 mm) kullanıldı. Toplanan fraksiyonların kontrolü silika TLC (Merck) plakları ile yapıldı. Elde edilen fraksiyonlar son olarak LC/MS ile kontrol edilerek saflıklarından emin olundu. Naproksen yıkım ürünlerinin izolasyonu için yürütücü faz olarak CH₂Cl₂: MeOH (95: 5) kullanıldı. Diklofenak yıkım ürünlerinin izolasyonu için toluene: etil asetat (6:4) kullanıldı.

3.11. Naproksen Yıkım Ürünlerinin Günlere Göre Değişimi

Naproksen yıkım ürünlerinin günlere göre değişiminin belirlenmesi amacıyla yıkım ortamından 24 saatte bir örnek alındı ve metanol diklorometan karışımına çekildi ve LC/MS de analiz edildi.

3.12. 1-Aminobenzotriazol ve Saf Lakkazın Kullanımı

Lakkaz enziminin diklofenak üzerinde etkisini belirlemek amacı ile *Trametes versicolor*'dan elde edilmiş ticari saf lakkaz (Sigma) kullanıldı. Ticari saf lakkaz 2,4 U olacak şek Fungal sitokrom P450 enzim sisteminin naproksen transformasyonundaki etkisini anlamak için P450 enzim inhibitörü olan 1-Aminobenzotriazol (Sigma) son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde kültür ortamına eklendi.

3.13. Adsorpsiyon Çalışmaları

İlaç etken maddelerinin gideriminde adsorpsiyonun etkisini incelemek için otoklavda 125°C de ısı ile öldürülmüş ve 5 mM sodyum azidle paralize edilmiş hücreler kullanıldı.

3.14. Naproksen Yıkımı İçin Uygun İnokülasyon Miktarının Belirlenmesi

Naproksen yıkımını gerçekleştirmek için gereken uygun *A. niger* inokülasyon miktarını belirlemek için, 1,2×10⁶/ml spor içeren süspansiyondan 100, 200, 300, 400, 500 µl alınarak farklı besiyerlerine ekim yapıldı.

Ekim yapıldıktan hemen sonra etanolde çözülmüş naproksen son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde eklendi. Kültürler 30°C da inkübe edildi ve 24 saatte bir örnek alınıp LC/MS te analiz edildi.

3.15. Naproksen Yıkımına Sıcaklık ve pH Değerinin Etkisi

Naproksen yıkımına sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile spor ($1,2 \times 10^6/\text{ml}$) süspansiyonundan 400 µl pH 4,7 besiyerlerine ekim yapıldı ve farklı sıcaklıklarda (10, 20, 30, 40°C) inkübe edildi. 96. saatin sonunda deney grupları naproksen giderimi bakımından analiz edildi. Naproksen yıkımına pH nın etkisini anlamak için besiyerlerinin pH sı 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 a ayarlandı. *A. niger* sporları ($1,2 \times 10^6/\text{ml}$) içeren süspansiyondan her bir besiyerine ekim yapıldı ve son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde naproksen eklendi. 96. saat sonunda deney grupları naproksen giderimi açısından ve kuru ağı değerlendirildi.

3.16. Diklofenak Yıkımı İçin Uygun İnokülasyon Miktarının Bulunması

Diklofenak yıkımı için uygun inokülasyon miktarının bulunması amacıyla daha önce 30°C 150 rpm çalkalama hızında malt extract sıvı besiyerinde 5 gün süre ile inkübe edilen *F. trogii* homojenizatörden geçirildi ve besiyerlerine 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml olacak şekilde ekildi. Diklofenak ortama fungal homojenizat ile birlikte 50 mg/L olacak şekilde eklendi.

3.17. Diklofenak Yıkımına İnkübasyon Sıcaklığının ve pH nın Etkisi

Diklofenak yıkımına pH ve sıcaklığın etkisini belirlemek amacı ile daha önce anlatılan şekilde hazırlanan fungal homojenizattan 5 ml besiyerlerine ekildi. Diklofenak yıkımına pH etkisini belirlemek için pH sı 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 ayarlanmış besiyerlerine 5 ml ekim yapıldı 30°C 150 rpm de inkübe edildi. Diklofenak yıkımına sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 ml fungal homojenizat ekilmiş besi besiyerleri (pH:4.7) 20, 25, 30, 35, 40, 45°C inkübe edildi.

3.18. Kaba Lakkaz Enzimi ile Diklofenak Giderimi

Kaba enzim elde etmek için *F. trogii* kültürleri Vogel besiyerinde 7 gün süreyle 30°C 150 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fungal biyokütle filtre kağıdı ile süzüldü. Elde edilen supernatan 20 µm por çaplı filtreden geçirildi ve kaba lakkaz enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kaba lakkaz enzimi ile giderime sıcaklığın etkisini belirlemek amacı ile son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde diklofenak eklenen deney grupları, 15, 20, ,25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C inkübe edildi ve 48. Saat sonunda analiz edildi.

Kaba lakkaz enzimi ile diklofenak giderimine pH'nın etkisini incelemek amacı ile son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde diklofenak eklendi ve deney gruplarının pH'sı 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 olacak şekilde ayarlandı. Farklı pH'lara ayarlanmış deney grupları 48. Saat sonunda analiz edildi.

3.19. Microtox Çalışmaları

Etken maddelerin yıkım öncesi ve yıkım sonrası toksisitelerinin karşılaştırılması için *Vibrio fischeri* bakterisinin biyoluminisansına dayanan Microtox (MicroBioTets Inc.) testi yapıldı. Liyofilize halde bulunan bakteriler canlandırma solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Besiyeri içinde etken madde bulunan gruplar ve yıkım gerçekleşmiş deney grupları 0,20 µm por çaplı filtrelerden geçirildi ve supernatanların pH'sı 7'ye ayarlandı. Biyoluminisanstaki azalmanın anlamlı olup olmadığı kitin içinden çıkan içinde toksik herhangi bir molekül olmayan kontrol grubuna göre değerlendirildi. Bakteriyel ışımada gerçekleşen değişimler Kikkoman lumitester PD-20 ile ölçüldü. Toksik etki değerlendirmesi, kitin içinden çıkan kontrol grubununun ışımada değişimi ile örnekteki değişimin oranlanması esasına dayanmaktadır. Her grup için ayrı ayrı başlangıç ışımada değerleri ve 30 dakika sonraki ışımada değerleri alındı ve aşağıdaki eşitliğe göre % toksik etki hesaplandı.

$$\text{Örnek} = (RLU_{t0} - RLU_{t30}) (RLU: \text{Relatif Işık Unit})$$

$$\text{Kontrol} = RLU_{t0} - RLU_{t30}$$

$$\% \text{ Toksisite} = \left(\frac{\text{Örnek RLU}}{\text{Kontrol RLU}} \right) \times 10$$

3.20. Rotoxkit F Çalışmaları

Rotoxkit F (MicroBioTest Inc) test organizması olarak rotifer *Brachionus calyciflorus*'un kullanıldığı bir toksisite testidir. Testi gerçekleştirmek için önce standart taze su hazırlandı. Hazırlanan standart taze su akvaryum pompası ile en az 15 dakika havalandırıldı. Rotifer sistleri 5 cm çaplı petri kaplarına döküldükten sonra üstlerine 10 ml standart taze su eklendi ve 18 saat ışık kaynağı altında 25°C de inkübe edildi. 50 mg/L diclofenak içeren ve diclofenak'ın saf lakkaz ile yıkıma uğratıldığı ortam 0,20 µm por çaplı filtrelerden geçirildi.

Filtreden geçirilen ortamların pH sı 7 ye ayarlandı. Hazırlanan ortamlar testin kitapçığına göre beş farklı konsantrasyon elde edilecek şekilde sulandırıldı: C1(hiç sulandırılmamış), C2(1/2), C3(1/4), C4(1/8), C5(1/16). 18. Saat sonunda sistlerinden çıkan rotiferler bir mikroskop altında her konsantrasyon için 8 kuyucuk olan test ortamına her kuyucuğa 1 rotifer düşecek şekilde pay edildi ve 48 saat 25°C de inkübe edildi. Yüze inhibisyon aşğıdaki eşıtlie göre hesaplandı.

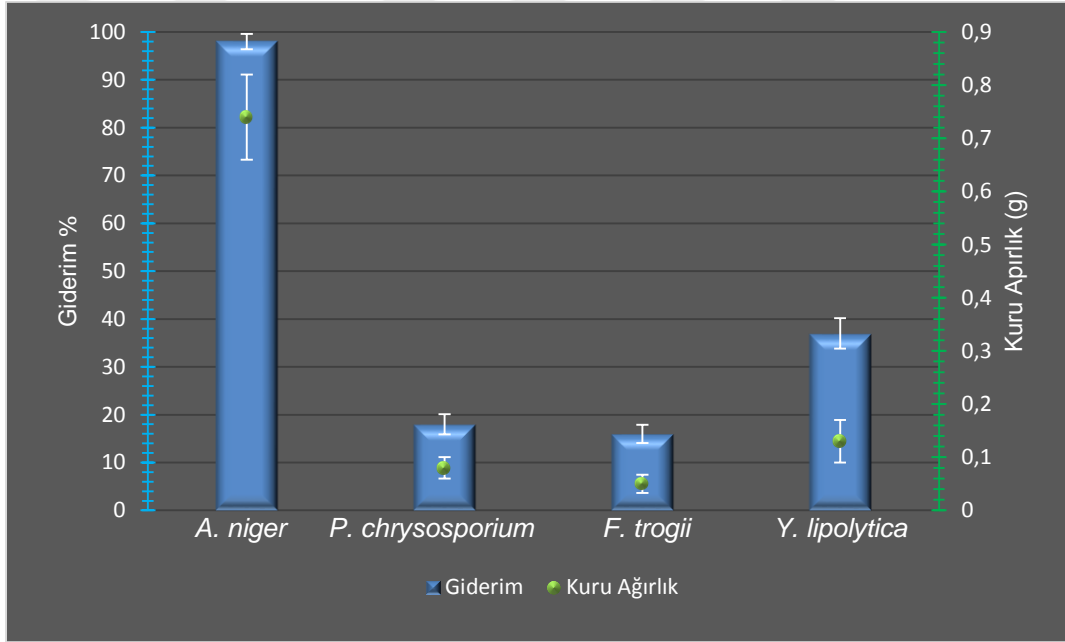
$$i(\%) = \frac{N(Kontrol) - N(Canlı)}{N(Kontrol)} \times 100$$



3. Sonuçlar ve Tartışma

4.1. Naproksen Yıkımını Gerçekleştiren En Etkin Suşun Belirlenmesi

Naproksen yıkımını gerçekleştiren en etkin fungal kaynağın bulunması amacıyla ön kültürasyona tabi tutulan *A. niger*, *P. chrysosporium*, *F. trogii*, *Y. lipolytica* suşları ve fungus içermeyen abiyotik kontrol 50 mg/L naproksen ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 48. saatinde kültür ortamlarından ve kontrolden alınan örnekler metanol:diklorometan karışımına çekildiler ve LC/MS de analiz edildiler . Analiz sonuçlarına göre %98 naproksen giderimi oranıyla *A. niger* en etkin fungal kaynak olarak belirlenirken. Diğer fungus suşlarının giderim kapasiteleri sırasıyla *Y. lipolytica* %37, *P. chrysosporium* %18 ve *F. trogii* %16 olarak bulundu (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan fungus suşlarının naproksen giderim kapasiteleri açısından karşılaştırılması (pH:4.7, 30°C, 150 rpm)

Beyaz çürükçül funguslar sahip oldukları özgül olmayan ligninolitik enzimleri sayesinde birçok çevre kirleticinin gideriminde oldukça etkin mikroorganizmalardır [141]. Bu özelliklerinden dolayı araştırmacılar mikro kirleticilerin gideriminde de beyaz çürükçül fungusların yıkım yeteneklerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır [1], [142].

Marco-Urrea vd. lerinin 2010 da yaptıkları çalışma *Trametes versicolor*'un naproksen (10 mg/L) gideriminde son derece etkin olduğunu göstermiştir[5]. Bir başka çalışmada *Trametes versicolorun* steril toprak örneklerinde Naproxen giderimini gerçekleştirdiği gösterilmiş ve biyoaugmentasyon uygulamalarında *T. versicolor'un* kullanılabileceğini bildirmiştir [143]. Beyaz çürükçül *Bjerkandera adusta*'dan elde edilen versatil peroksidaz ile yapılan çalışmada ise %80 naproksen giderim oranına ulaşılmıştır [144]. Rodarte-Morales 1 mg/L naproksenin *Bjerkandera sp.* tarafından 7 günde, *P. chrysosporium* tarafından 4 günde tamamen giderildiğini göstermişlerdir [145]. Naproksenin bakteriyel yıkımı ile ilgili çalışma oldukça azdır, 2014 yılında *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 ile yapılan bir çalışma *Stenotrophomonas maltophilia*'nın 35 günlük inkübasyondan sonra %78 lik bir naproksen giderim oranına ulaşıldığını bildirmiştir [146]. *Planococcus sp.* ile yapılan bir çalışma, bu cinsin naproksen degradasyonunu gerçekleştirebildiğini göstermiştir [147]. *Pseudomonas sp.* CE21 suşunun sulfamethoksazolün yanında naproksen giderimini de gerçekleştirdiği gösterilmiştir [148].

Bu çalışmada ise beyaz çürükçül funguslardan *P. chrysosporium* ve *F. trogii*'de en düşük naproksen giderim oranı bulunmuştur. İnkübasyon sonunda ölçülen fungal biyokütleye bakıldığında, *A. niger*'in 0,74 g kuru ağırlıkla en çok üreyen fungus olduğu görülmektedir. En düşük yıkım gösteren *F. trogii* ve *P. chrysosporium* 'un üremelerinin de diğer kullanılan fungal kaynaklara nazaran düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak 0,74 g kuru ağırlığa sahip *A. niger* %98 giderim, 0,13 g kuru ağırlığa sahip *Y. lipolytica* %37, 0,08 g kuru ağırlığa sahip *P. chrysosporium* %18 ve 0.05 g kuru ağırlığa sahip *F. trogii* %16 giderim göstermiştir (Şekil 4.1). Elde edilen sonuçlara göre biyokütle oluşturma kapasitesiyle giderim arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir. *A. niger* biyokütlesinin fenol ve Kongo Red gibi kirleticilerin biyosorpsiyon/adsorpsiyon yolu ile gideriminde başarılı sonuçlar verdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [149], [150]. *A. niger*'in giderim başarısının fungal biyokütleyle adsorpsiyona dayanıp dayanmadığını anlamak için 5 gün ön inkübasyona tabi tutulan kültürlerin bir kısmı 110°C de otoklavlanarak öldürüldü, diğer kısmına ise ATPaz inhibitörü olan 5 mM sodyum azid eklendi [7]. Deney gruplarına son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde naproksen eklendi.

48. Saatin sonunda naproksen içeren ortamlar çözücü karışımına çekildi ve analiz edildi. Analiz sonucunda ısı ile öldürülmüş grupta (kuru ağırlık: 0,69 g) %19, sodyum azid eklenmiş grupta (kuru ağırlık: 0,77 g) %23 adsorpsiyon yoluyla naproksen giderimi gözlenmiştir (Şekil 4.2). Elde ettiğimiz sonuçlar *Aspergillus niger* ile naproksen gideriminde hücre yüzeyine tutunmanın payı olsa da esas giderimin enzimatik olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar *A. niger*'in naproksen etken maddesini enzimatik olarak giderdiğini göstermiştir.

A. niger'in biyoyıkıma dayanıklı bir etken madde olan karbamazepini giderme yeteneği olduğu Gauthier vd. tarafından 2010 yılında rapor edilmiştir [151]. Daha önce yapılan bir çalışma klorlu bir pestisit olan endosulfan'ın *A. niger* tarafından biyoyıkıma uğratıldığını göstermiştir [97]. *A. niger*'in ayrıca herbisit, klorimuron-etil, klorsulfuron ve metsulfuron-metil'i biyoyıkıma uğrattığı gösterilmiştir [95], [96]. Sonuç olarak *A.niger* diğer kullanılan fungal kaynaklar arasında en verimli naproksen gideren suş olarak seçildi ve bu giderimi enzim/enzimler aracılığıyla gerçekleştirdiği belirlendi.

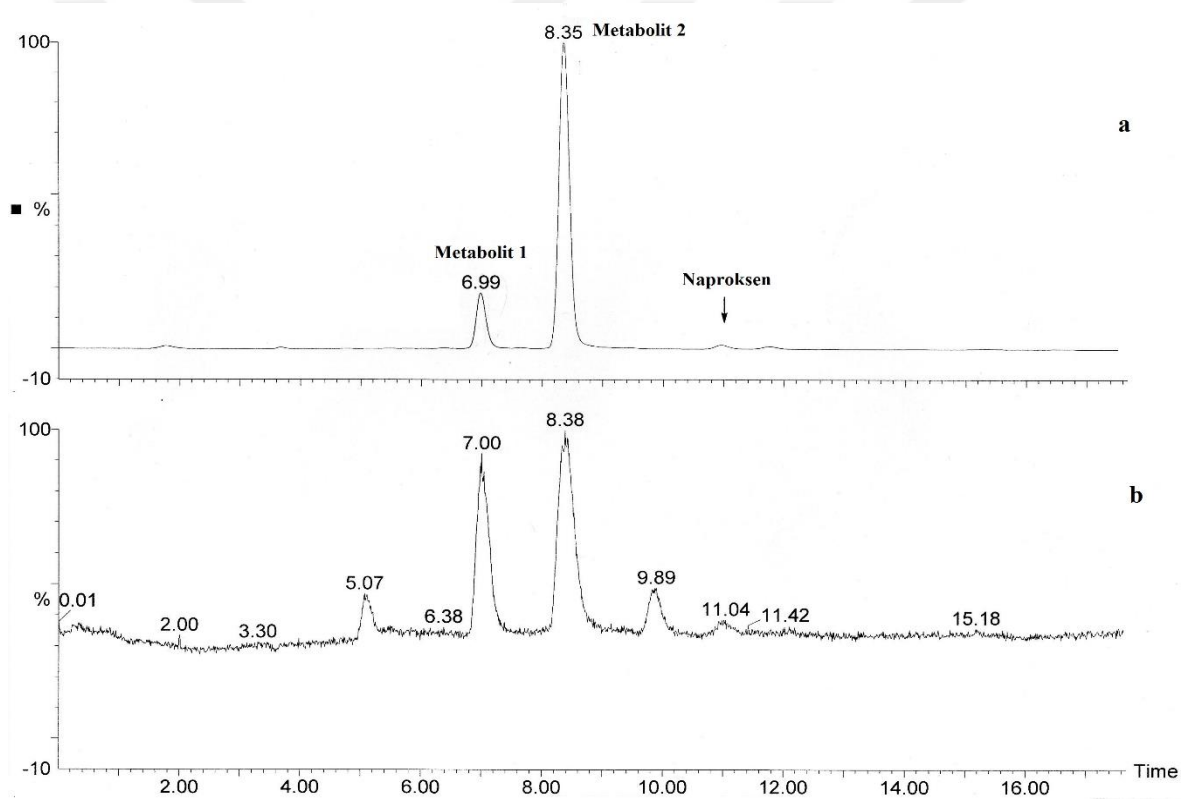


Şekil 4.2. Isı ile öldürülmüş ve kültür ortamına sodyum azid eklenmiş *A. niger* biyokütleleri ile canlı hücre ortamının naproksen giderimi açısından karşılaştırılması (pH:4.7, 30°C, 150 rpm)

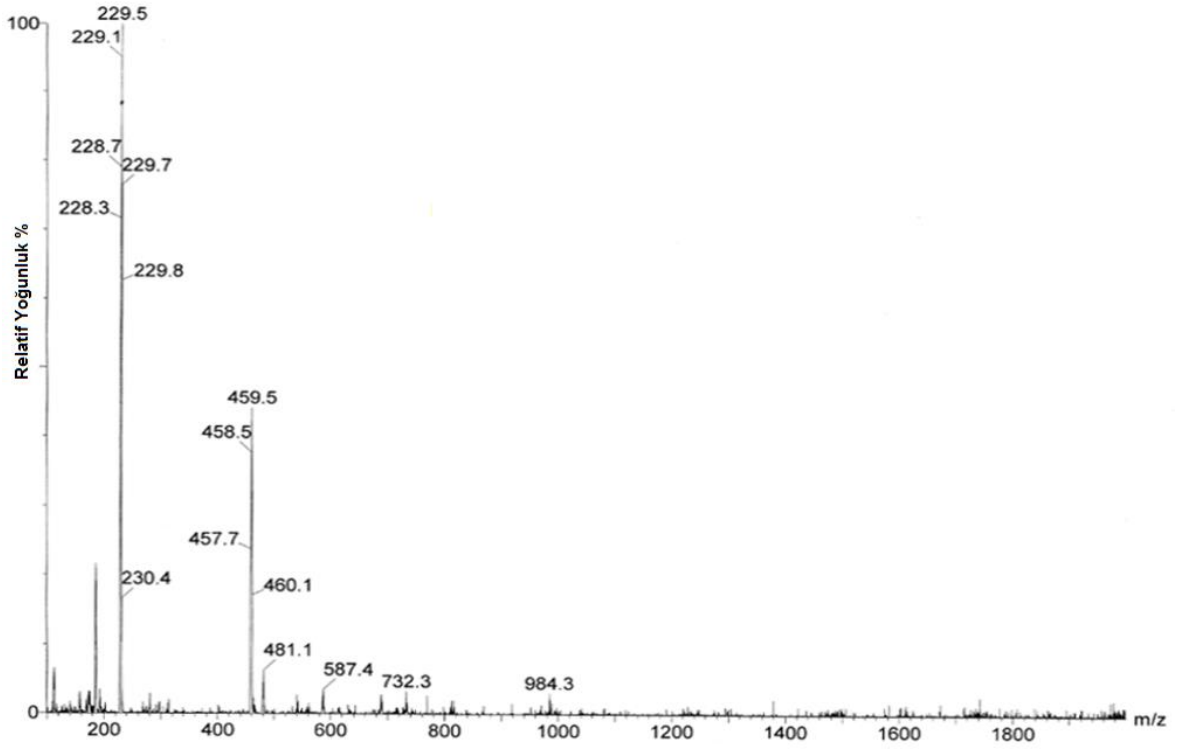
4.2. Yıkım Sonrası Oluşan Ürünlerin Taranması ve ¹HNMR ve ¹³CNMR ile Tanımlanması

Naproksen giderimini gerçekleştiren en etkin fungal kaynak olarak *A. niger* belirlendi. 48 saat naproksen ile inkübe edilen *A. niger* kültür ortamı fitre edildi. Elde edilen filtrat CH₂Cl₂:MeOH karışımına çekildi ve LC/MS de analiz edildi. LC-MS ESI (-) analizi sonucunda üç ana pik gözlemlendi, t_R (gecikme zamanı) 6,99 da metaboliti 1, t_R 8, 35 metabolit 2 ve t_R 11,03 değişmeden kalmış naproksen (Şekil 4.3).

11,03 inci dakikada gelen pikin naproksen olduğu abiyotik kontrol ile aynı zamanda gelmesinde ve kütle spektrumundan anlaşıldı, 11,03 de gelen pikin verdiği m/z 229 iyon naproksenin bir Hidrojen kaybetmiş iyonudur (Şekil 4.4).



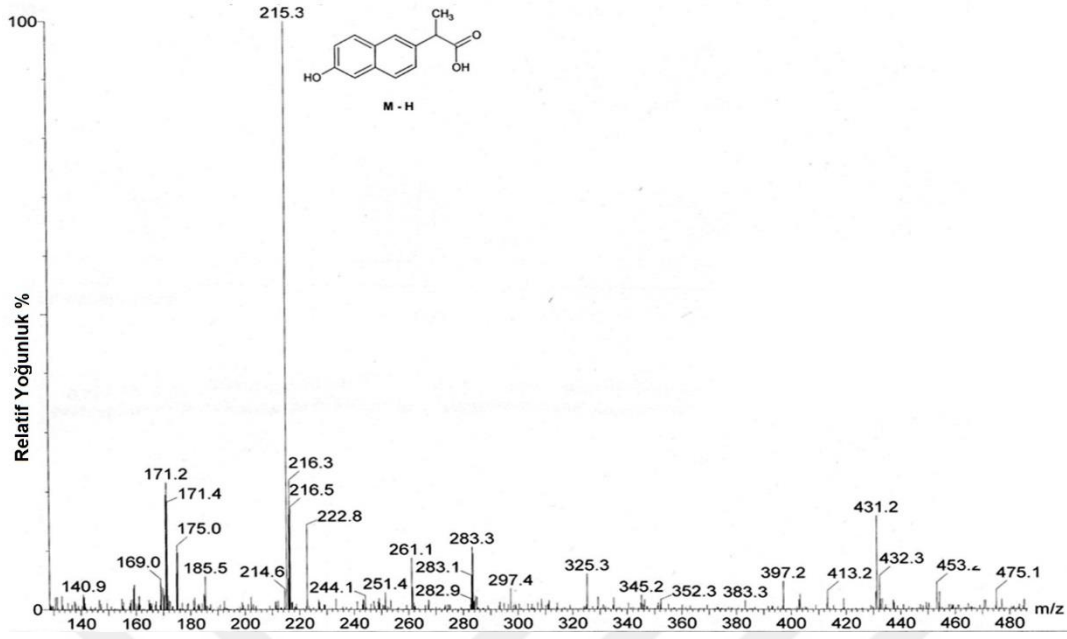
Şekil 4.3. Yıkım sonrası oluşan ürünler ve naproksenin (a) HPLC kromatogramı ve (b) kütle iyon kromatogramı ESI (-)



Şekil 4.4. Gecikme zamanı 11,03 dakika olan pikin (naproksen) kütle spektrumu ESI (-)

Gecikme zamanı 11,03 olan pikin ful ESI(-) kütle spektrumununa bakıldığı zaman iki ana iyon görülmektedir bu iyonlar 230 molekül ağırlıklı naproksenin, m/z 299 [M-H] ve birleşmiş iyon m/z 459 [2M-H] dir.

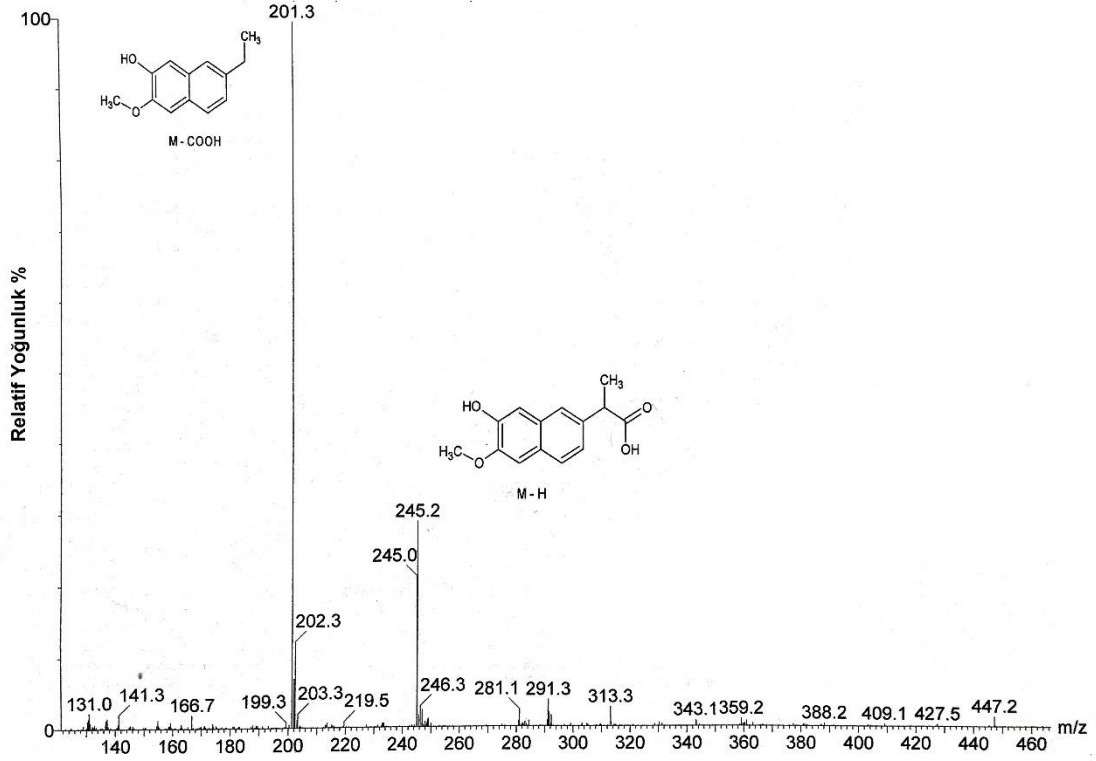
Metabolit 1 ve metaboliti 2 nin kütle spektrumlarına baktığımız zaman. Metabolit 1 için üç ana iyon görülmektedir bunlar m/z 215 [M-H] (%100), m/z 431 [2M-H] (%19) ve m/z 171 [M-COOH] (%22) dir (Şekil 4.5). Metabolit 2 için ise, m/z 245 (%29) ve m/z 201(%100) olmak üzere iki ana iyon gözlenmiştir (Şekil 4.6). Oluşan metabolitler izole etmek amacıyla organik çözücüye alındı ve silika jel de CH₂Cl₂: MeOH (95: 5) karışımı ile yürütüldü. Elde edilen fraksiyonlar TLC de kontrol edilmiş ve saflıklarından LC/MS analizi ile emin olunmuştur. Saf metabolitlerin LC/MS analiz sonuçları, metabolit 1 için şekil 4.7. ve metabolit 2 için şekil 4.8. de verilmiştir.



Şekil 4.5. Gecikme zamanı 6,99 dakika olan metabolit 1 için ESI (-) kütle spektrumu

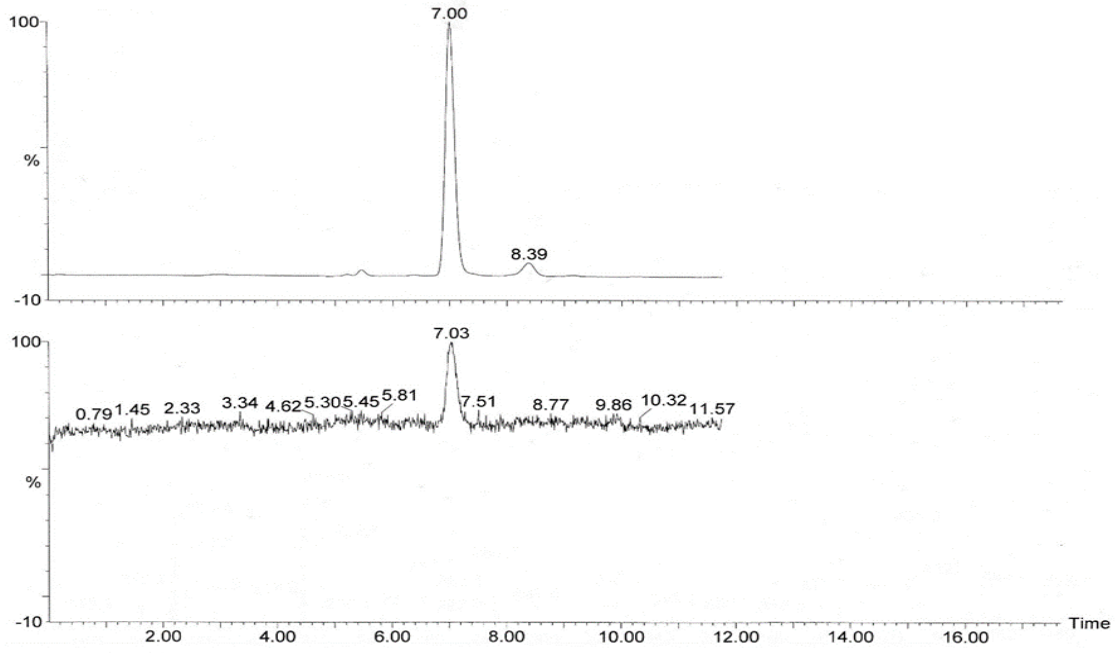
Metabolit 1 m/z 215 [M-H], $C_{14}H_{14}O_3$ (moleküler ağırlık: 230) kimyasal formüle sahip ana molekül naproksenden (m/z 229 [M-H]) 14 kütle üitesi düşüktür. Kütlede 14 birimlik bir düşüş naproksenin metil grubunu kaybettiğini göstermektedir. Saf halde elde edilen metabolit 1 (Şekil 4.7) in 1H -NMR ve ^{13}C -NMR analizleri, oluşan ürünün naproksenin metil grubunu kaybetmiş türevi 216 moleküler ağırlığa sahip 6-O-desmetilnaproksen ($C_{13}H_{12}O_3$) olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.1.). Yapılan analizler sonucu 6-O-desmetilnaproksen olduğu belirlenen metabolit 1 insan idrarında da tespit edilmiş bir naproksen metabolitidir [152]. İnsan sitokrom P450 enzim sisteminin analoguna sahip olduğu bilinen *Cunninghamella* cinsleri ile yapılan bir çalışmada da naproksenin metaboliti olarak O-desmetilnaproksen tanımlanmıştır [82]. Beyaz çürükçül *Trametes versicolor*'unda naprokseni 6-O-desmetilnaproksene metabolize ettiği gösterilmiştir [153]. Naproksen desmetil metabolitinin insan idrarında ve memelilerde ki sitokrom P450 enzim sisteminin analoguna sahip olduğu bilinen *Cunninghamella* türlerinin kültürlerinde bulunması, *A.niger*'inde naproksen metabolizmasında fungal sitokrom P450 enzimlerinin rolü olduğunu düşündürmektedir.

Ana pik olarak m/z 201 veren metaboliti 2 (Şekil 4.8) nin yapısı 1H-NMR ve 13C-NMR (Çizelge 4.1.) aydınlatılmış ve naproksen (C₁₄H₁₄O₃) molekülüne 7. Karbondan bir oksijen girmesiyle oluşan 246 moleküler ağırlıklı 7-hidroksinaproksen(C₁₄H₁₄O₄) olduğu bulunmuştur. Buna göre ana pik m/z 201 [M-COOH] ve m/z 245 [M-H] olarak yorumlanabilir (Şekil 4.6)

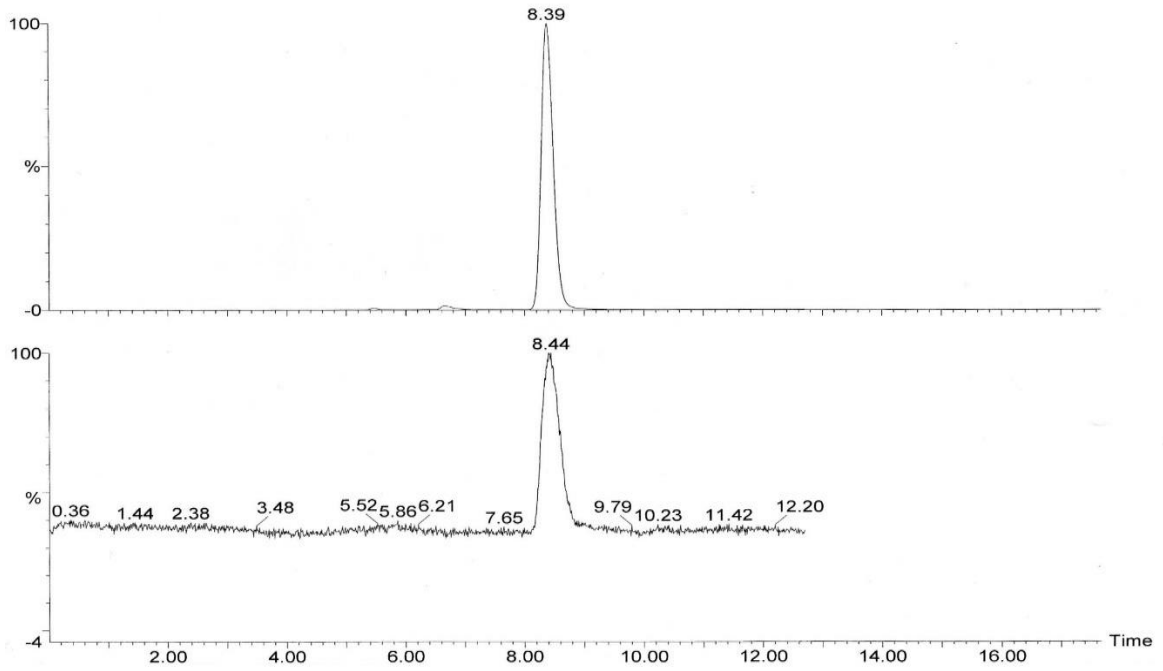


Şekil 4.6. Gecikme zamanı 8,35 dakika olan metabolit 2 için ESI (-) kütle spektrumu

. *A. niger* steroidlerin, terpenlerin, ve alkaloidlerin hidroksinlenmesini katalizleyebilmektedir [154]. Bugüne kadar yapılan yapılan çalışmalarda naproksenin fungal metabolitleri olarak; O-desmethylnaproksen, 7-hydroxynaproksen, 7-hidroksi-O-desmetilnaproksen, desmetilnaproksenin sulfat konjugatı ve 1-(6-metoksinaftelen-2-yl)etanon olarak tespit edilmiştir [5], [82], [154]. Birçok aromatik bileşiği yıktığı bilinen bir bakteri olan *Stenotrophomonas maltophilia* ile yapılan bir çalışmada ara metabolit olarak 5,7,8-trihidroksinaproksen tanımlanmıştır [146].

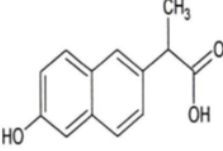
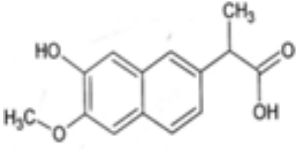


Şekil 4.7.. İzole edilen Metabolit 1 için HPLC ve kütle iyon kromatogramı



Şekil 4.8. İzole edilen Metabolit 2 için HPLC ve kütle iyon kromatogramı

Çizelge 4.1. Naproksenin fungal transformasyon ürünlerin kimyasal yapıları ve NMR sonuçları

Metabolit	¹ H-NMR (CD ₃ OD) 400 MHz δ ppm	¹³ C-NMR (CD ₃ OD) 100 MHz δ ppm
M1 (6-O-desmetilnaproksen) 	1.51(d,3H, J=7.2Hz,-CH ₃) 3.79(q,1H,J=7.2Hz,-CH-) 7.02(dd,1H,J=8,6 & 2.4Hz,H-7) 7.06(d,1H,J=2.4Hz,H-5) 7.35(dd,1H,J=8,4 & 1.6Hz,H-3) 7.58 (d,1H,J=8.4Hz, H-4) 7.63(s,1H,H-1) 7.66(d,1H,J=8.4Hz,H-8)	177.7, 154,9, 135,7, 134,0, 128,9, 128,4, 126,1, 125,7, 125,5, 118,02, 108,3, 45,5, 17.7
M2 (7-hidroksinaproksen) 	1.48(d,3H,J=7.2Hz,-CH ₃) 3.72(q,1H,J=7.2Hz,-CH-) 3.88(s,3H,-OCH ₃) 6.81 (d,1H,J=1.6Hz,H-5), 7.06 (dd,1H,J=9,2 & 2.8Hz,H-3) 7.18 (s,1H,H-8), 7.46 (d,1H,J=2.8Hz,H-1), 7.62(d,1H,J=9.2Hz,H-4)	177.4, 157,2, 152,5, 136,7, 130,4, 128,8, 125,1, 118,7, 117,1, 107,8, 100,1, 54,4, 45,6, 17,8.

4.3. A. niger ile Naproksen Giderimin Mekanizmasının Belirlenmesi

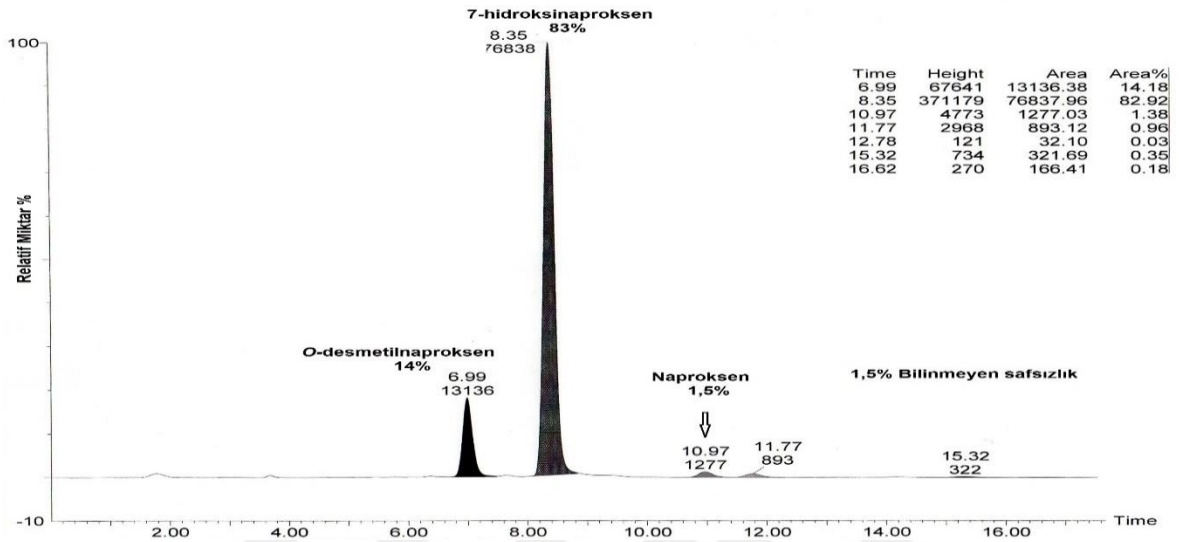
Naproksen biyotransformasyonunu gerçekleştiren enzim veya enzim grubunun tespit etmek için önce enzim ya da enzim grubunun lokalizasyonunu belirlemek gereği duyuldu. Enzim veya enzim grubunun lokalizasyonunu belirlemek için hücreden ayrılmış süpernatant 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek hücre dışı enzim kaynağı olarak kullanıldı ve 50 mg/L naproksen ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda LC-MS ile analiz edildi, analiz sonucunda giderim ve metabolit oluşumu gözlenmedi. Bu bulgu, naproksen gideriminin ancak canlı hücre ile temas halinde gerçekleşebileceğini göstermiştir. Bu bilginin ışığında giderimden fungal sitokrom P450 enzim sisteminin rolü olabileceği düşünüldü. Kurduğumuz bu hipotezi sınamak amacıyla üç gün ön inkübasyona tabii tutulan *A.niger* kültürlerine cytP450 inhibitörü olan 1-aminobenzotriazol son konsantrasyonu 2mM olacak şekilde eklendi ve 50 mg/L naproksen ile 48 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonucu naproksen giderimi sonucu oluşan metabolitlerden 7-hidroksinaproksen ve O-desmetilnaproksen LC-MS analizleri sonucunda tespit edilememesi, bize naproksen gideriminin sitokrom P450 enzim sistemi tarafından gerçekleştiğini düşündürmektedir. Naproksen insan karaciğerinde sitokrom P450 enzimi tarafından dealkilasyona uğratılır ve O-demetile metaboliti oluşur. Sonuç olarak O-desmetilnaproksen ve konjugatları oluşur [155]. İnsan karaciğerinde bulunan sitokrom P450 izoformları CYP2C9 ve CYP1A2 enzimleri naproksenin O-demetilasyonundan sorumludur [156]. Fungal sitokrom P450 enzimleri hücre için gerekli biyosentez reaksiyonlarında görev almalarının yanı sıra alken asimilasyonu ve fungusitlerin detoksifikasyonu gibi reaksiyonlarda da rol oynarlar [120], [157]. Hidroksilasyon fungal sitokrom P450 enzimleri tarafından gerçekleştirilen bir reaksiyondur. Örneğin fungal CYP504A1 enzimi fenilasetatın 2-hidroksifenil asetat dönüşümünü katalizler [158]. Ayrıca *Candida maltosa*, *Candida tropicalis* ve *Candida apicola* türlerinin alkenleri ve yağ asitlerini hidroksilasyona uğrattıkları bilinmektedir [157]. *A. niger* CYP53A1 enzimi ile antifungal 3-metoksibenzoatın O-demetilasyonla detoksifikasyonu gerçekleştirir [159]. *Cunninghamella blakeslesna*, *Cunninghamella echinulata* ve *Cunninghamella elegans* türlerinin naprokseni fungal P450 enzim sistemi ile O-desmetilnaproksene dönüştürdüğü gösterilmiştir [82]. *Trametes versicolor*'un üreme ortamına eklenen sitokrom P450 inhibitörü 1-aminobenzotriazol naproksen giderim hızını anlamlı bir oranda azaltmıştır [153].

Bu çalışmada tanımlanan metabolitlerden biri olan 6-O-desmetilnaproksenin insan idrarında bulunması, yapılan çalışmalar sonucunda naproksen gideriminin ancak canlı *A.niger* hücresi ile gerçekleştiğinin gözlemlenmesi, yine yıkım çalışmalarında kullanılan ortama P450 inhibitörü eklendiğinde yıkımın ve metaboliti oluşumunun gözlenmemesi, fungal sitokrom enzimlerinin farklı substratları hidroksile ve demetile etme yetenekleri ile ilgili literatür bilgisinin bulunmasına dayanarak. Çalışmamız sonucunda tanımladığımız O-desmetilnaproksen ve 7-hidroksinaproksen oluşumunda *Aspergillus niger*'in sitokrom P450 enzimlerinin rolü olduğunu söyleyebiliriz.

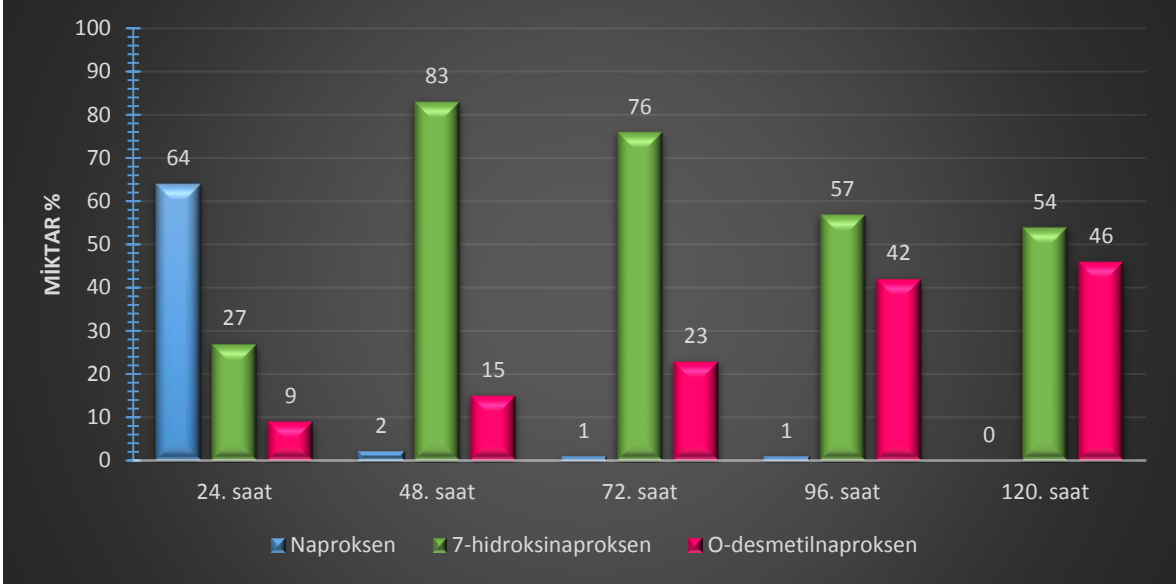
4.4. Oluşan Metabolitlerin Zamana Göre Değişimi

Naproksenin yıkım sonrası oluşan metabolitlerinin ortamdaki oranlarının bulunması için, her 24 saatte bir yıkım ortamından alınan örnek CH₂Cl₂:MeOH çözücü fazına çekildi. Elde edilen piklerin alanından ortamda bulunan metabolitlerin yüzde oranı hesaplandı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 48. Saat sonunda ortamda bulunan tüm bileşiklerin birbirlerine göre yüzde oranları

Yapılan analizler sonucunda sadece naproksen ve metabolitleri dikkate alındığında 24. saatin sonunda relatif miktar olarak, %64 naproksen, %27 7-hidroksinaproxen, %9 O-desmetilnaproxen bulunmuştur. 48. saatin sonunda relatif miktar olarak, %2 naproksen, %83 7-hidroksinaproxen, %15 O-desmetilnaproxen olarak bulunmuştur. 72. saatin sonunda relatif miktar olarak, %1 naproksen, %76 7-hidroksinaproxen, %23 O-desmetilnaproxen olarak bulunmuştur. 96 saatin sonunda relatif miktar olarak, %1 naproksen, %57 7-hidroksinaproxen, %42 O-desmetilnaproxen olarak bulunmuştur. 120. Saatin sonunda ise relatif miktar olarak, naproksen gözlenememiştir ancak metabolitler, %54 7-hidroksinaproxen ve %46 6-O-desmetilnaproxen olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 120 saatlik dönem için naproksenin mineralize olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 48. saatin sonundan 120. saatin sonuna kadar 7-hidroksinaproxen miktarında azalış gözlenirken (%83 - %54), O-desmetilnaproxen miktarında artış gözlenmiştir (%15 - %46). Elde edilen sonuçlar 7-hidroksinaproxenin, 6-O-desmetilnaproksene dönüştüğü şeklinde yorumlanabilir (Şekil 4.10).

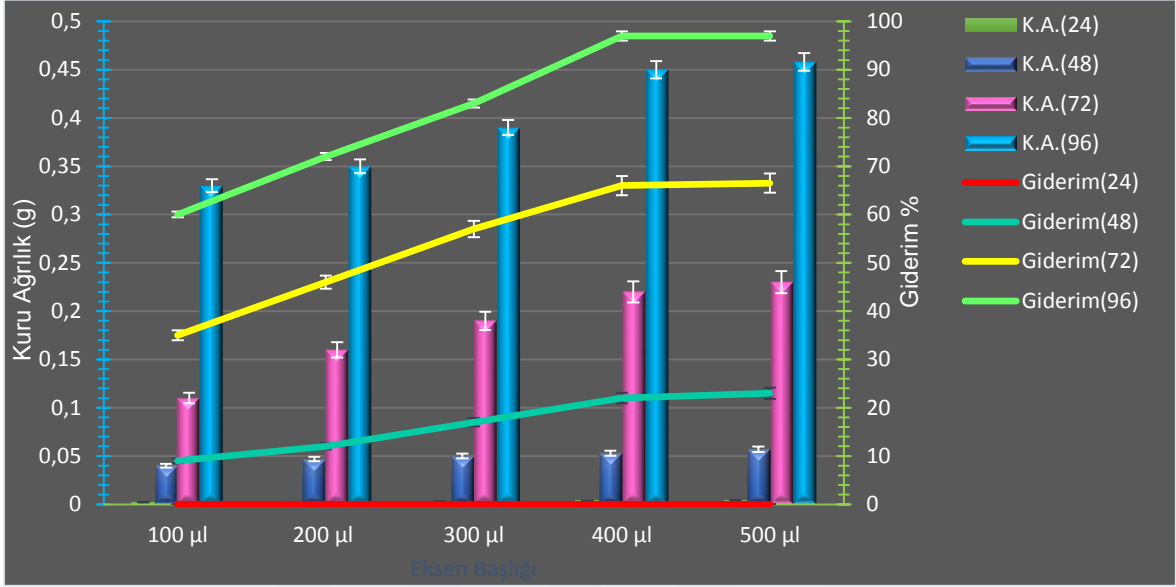


Şekil 4.10. Naprosken ve metabolitlerinin zamana göre değişimi (pH:4,7, 30°C, 150 rpm)

4.4. İnokulasyon Miktarının Naprosken Giderimine Etkisi

İnokulasyon miktarının naprosken giderimine etkisini incelemek amacıyla mililitresinde $1,2 \times 10^6$ /ml spor bulunan süspansiyondan 100 ml besiyerlerine 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl ve 500 µl ekim yapıldı. Ekim yapıldıktan hemen sonra son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde naprosken eklendi. 24. saatten başlamak üzere her 24 saatte bir her bir inokulasyon miktarı için bir kültür ortamı naprosken giderimi ve oluşan biyokütle açısından değerlendirildi. İlk 24 saatlik zaman diliminde hiçbir kültür ortamında naprosken giderimine rastlanamamıştır. İlk 24 saatlik dilimde *A. niger* sporlarının yeni yeni germine olması ve buna bağlı olarak biyokütlesinin çok düşük olması, naprosken gideriminin olmamasının ana nedenidir. Şekil 4.11 de görüldüğü gibi zaman bağlı olarak biyokütle artmakta ve biyokütle artışı ile birlikte giderim oranı da artmaktadır. Elde edilen bu sonuç, daha önceki naprosken gideriminde canlı *A. niger* biyokütlesinin etkin olduğunu bir kez daha kanıtlamıştır. En yüksek giderim oranına %97 ile 96. saat sonunda 500 µl (0,458 g) ve 400 µl (0,450 g) inokulasyon miktarında ulaşılmıştır. En düşük giderim oranına %60 naprosken giderimi ile 100 µl (0,33 g) ekim yapılan grupta rastlanmıştır.

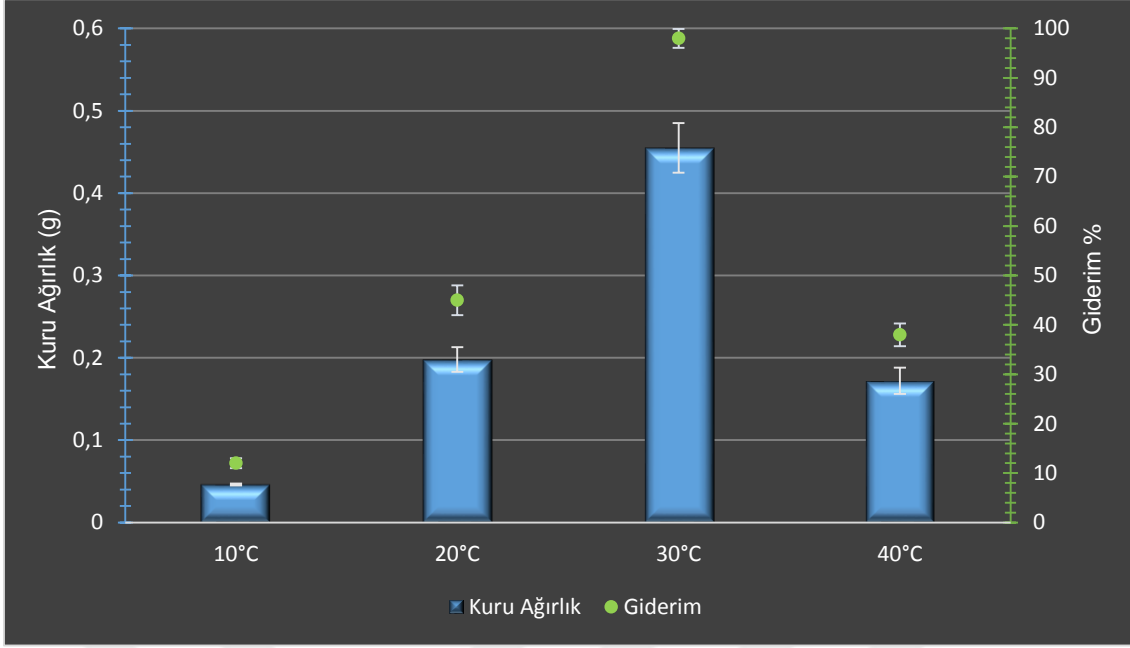
Bütün gruplarda 72. saat ile 96. saat arasında biyokütlede hızlı bir artış ve buna bağlı olarak giderim oranında hızlı bir artış gözlenmiştir. Bu gözlemlerde fungal biyokütle arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Sıcaklık etkisi ve pH etkisini incelemek amacıyla yapılacak olan çalışmalarda 400 µl inokülasyon miktarı olarak seçilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı inokülasyon miktarlarına göre zamana göre kuru ağırlık (K.A.) ve naproksen giderim oranları. (sütunlar; kuru ağırlık, çizgiler; giderim oranı)

4.5. İnkübasyon Sıcaklığının ve Ortam pH sının Naproksen Giderimi Üzerine Etkisi

Sıcaklık ve ortam pH sı mikroorganizmaların üremesi ve aktiviteleri açısından en önemli parametrelerdendir. İnkübasyon çalışması sonucu 96 saat sonunda spor stoğundan ($1,2 \times 10^6$ /ml) 400 µl ekilmiş olan grupta %97 lik giderim gözlemlendi. Bu nedenle ortam sıcaklığı ve pH'nın etkisinin incelendiği çalışmada inokülasyon miktarı 400 µl, giderim çalışmasının sonlandırılacağı zaman 96 saat olarak belirlendi. Ortam sıcaklığının etkisinin belirlenmesi için pH değeri 4.7 ye ayarlanmış kültür ortamlarına son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde naproksen eklendi ve 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C de 96 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda uygun çözücüye alınan örnekler analiz edildi. Yüzde yıkım oranı abiyotik kontrollere karşı hesaplandı. Analiz sonucunda diğer çalışmalarda olduğu gibi fungal biyokütleyle yıkım arasında yakın bir ilişki olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Elde edilen sonuçlar sırası ile ; 10°C için 0,046 g, %12 giderim, 20°C için 0,198 g %45 giderim, 30°C için 0,455 g, %98 giderim ve 40°C için 0,172 g, %38 giderim bulunmuştur.

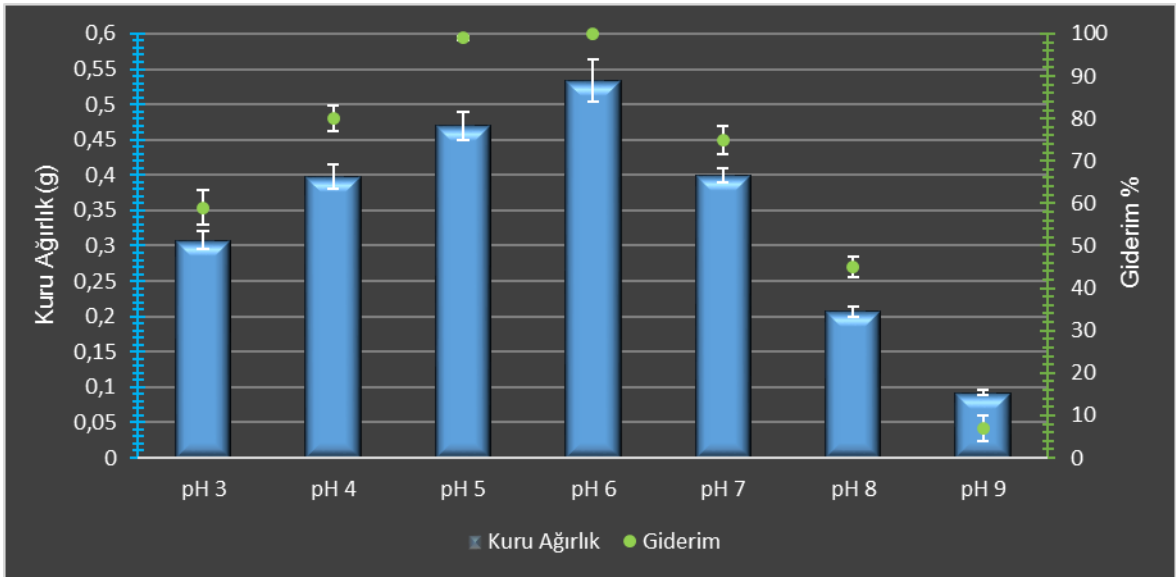


Şekil 4.12. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının naproksen giderimine etkisi (pH 4,7, 150 rpm, 96 saat)

Aspergillus niger için optimum üreme sıcaklığı %70-%90 nem oranında 30°C dir [160]. Bir başka çalışma ise *Aspergillus niger*'in 30°C ile 35°C maksimum üreme gösterdiğini bildirmiştir [161]. *Aspergillus fumigatus*'un anthracene biyoyıkımının (%65) en etkin şekilde 30°C inkübasyon sıcaklığında gerçekleştirdiği bildirilmiştir [162]. Yapılan çalışma sonucu maksimum üremenin ve giderimin gözlemlendiği 30°C *Aspergillus niger*'in optimal giderim gösterdiği sıcaklıktır. Hücre içi enzimler ile gerçekleşen naproksen giderimi üreme ile doğrudan ilgilidir. Bu nedenle kuru ağırlık değerinin en yüksek olduğu 30°C da *A. niger* diğer sıcaklık değerlerine nazaran naproksen giderimini daha etkin bir şekilde gerçekleştirmiştir.

Ortam pH sın *A. niger* ile naproksen giderimine etkisini araştırmak için, pH değerleri önceden 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 olarak ayarlanmış besiyerlerine $1,2 \times 10^6$ /ml spor içeren süspansiyondan 400 µl ekim yapılmıştır. Ekim yapılmış ortamlara konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde naproksen ekildi ve 30°C de 96 saat inkübe edildi. 96 saatlik inkübasyon sonunda abiyotik kontrole karşı yüzde giderim hesaplandı.

Elde edilen sonuçlara göre *A. niger* geniş pH aralığında üreme göstermiştir. Çalışma sonunda pH 4 ile 7 arasında %70 ve üzeri giderim olduğu gözlenmiştir. En yüksek giderim pH 6 ve pH 5 değerlerinde sırasıyla %100 (0,534 g) ve %99 (0,470 g) olarak bulunmuştur. En düşük giderim oranı ise pH 9 da %7 (0,092 g) bulunmuştur. Şekil 4.13 görüldüğü gibi biyokütlenin yüksek olduğu pH değerlerinde naproksen giderim oranı da yüksektir. pH değerinin naproksen giderimine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada da naproksen giderimiyle biyokütle arasında bir ilişki olduğu görülmüştür. *A. ochraceus*'un Reaktif mavi boyasının giderimini en verimli şekilde pH 5 te gerçekleştirdiği bildirilmiştir [163]. Bir başka çalışma *A. versicolor*'un pH 6 da %100 fenol giderimini gerçekleştirdiğini göstermiştir [164].Ye vd. *A. fumigatus* ile yaptıkları çalışmada pH 7,5 üzerindeki değerlerde anthrecene gideriminin keskin bir şekilde düştüğünü rapor etmişlerdir [165]. Bu çalışmada da *A. niger*'in pH 7 de %75 giderim gösterdiği, giderim oranının pH 8 de hızlıca düşüşe geçerek %45 li değerlere indiği gözlenmiştir. Yıkım çalışmalarında yıkımı gerçekleştiren enzimin ya da organizmanın pH değişimine verdiği cevabın yanı sıra molekülünde pH değişimine verdiği cevap göz önüne alınmalıdır. Moleküllerin deprotone ve protone formları, kural olarak pKa larına eş pH larda eşittir. Ortam pH sı pKa nın altında olduğu zaman protone moleküller artar, ortam pH sı pKa nın üzerinde olduğu zaman deprotone moleküller artar. Bu nedenle molekülün çözünürlüğü gibi özellikleri pH ya bağımlı olarak değişir.



Şekil 4.13. Farklı ortam pH değerlerinin naproksen giderimine etkisi (30°C, 96 saat inübasyon, 150 rpm)

Sinan vd yaptıkları çalışmada naproksenin çözünürlüğünün pH artışına bağlı olarak arttığını göstermişlerdir [166]. Naproksen pKa sı 4,15 olan –COOH grubu taşıyan asidik karakter gösteren bir moleküldür. Yapılan çalışmada naproksenin pKa değerlerinin üstü ve altındaki pH değerlerinde giderimin biyokütle oluşturma kapasitesiyle orantılı olduğu görülmüştür. Yapılan gözlemler farklı yükteki moleküllerin nasıl hücre içine alındığını açıklayamamaktadır. Bu nedenle naproksenin fungal hücre içine alımıyla ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

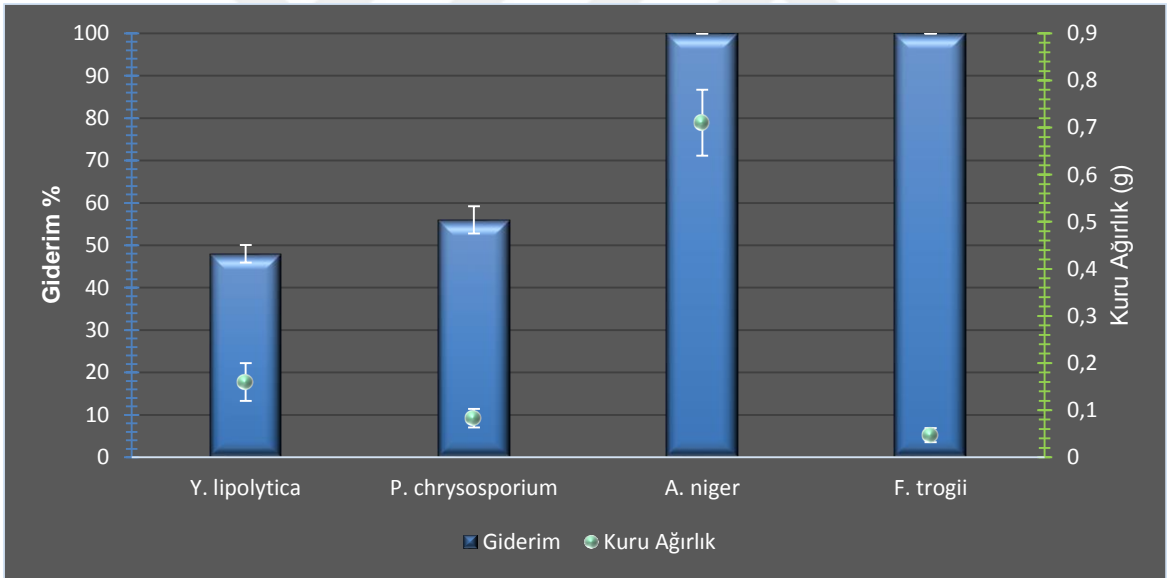
4.6. *Vibrio fischeri* Toksikite Testi (Microtox)

Bir kirleticinin metabolize olması detoksifiye olduğu anlamına gelmez. Bazı durumlarda daha toksik bileşikler ortaya çıkabilmektedir [62] Bu nedenle toksik etki değerlendirilmesi yapılmalıdır. Naproksenin ve yıkım sonrası oluşan ürünlerin toksisitelerinin karşılaştırılması için *Vibrio fischeri* bakterisinin biyoluminisansına dayan Microtox testi yapıldı. Konsantrasyon olarak 50 mg/L naproksen içeren abiyotik kontrol ile *A. niger* ile naproksen yıkımı gerçekleştirilen ortamın, *Vibrio fischeri*'nin biyoluminisansı üzerindeki etkisi karşılaştırıldı. pH değerinin herhangi bir etki yaratmaması için iki grubunda pH sı 7 ye ayarlandı. Abiyotik kontrol ve yıkım ortamının biyoluminisansında 30 dakika içinde kaç birimlik azalmaya neden olduğu Kikkoman lumitesterde ölçüldü. Yüzde toksik etki, hiçbir toksik bileşen içermeyen kontrol grubuna oranlanarak hesaplandı. Bulunan sonuçlar şöyledir; abiyotik kontrol %16 toksik etki gösterirken, %82 7-hidroksinaproksen, %15 6-O-desmetilnaproksen ve %3 naproksen içeren ortam %11 toksik etki göstermiştir. Isidori vd. omurgasızlarla yaptıkları akut ve kronik testler sonucunda naproksenin fototransformasyon ürünlerinin ana bileşikten çok daha toksik özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir [27]. *Trametes versicolor*'un 6 saat içinde naprokseni ve oluşan metabolitleri tamamen giderdiği bildirilmiş ve yalnız naproksen içeren abiyotik kontrolün toksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir [5]. Yaptığımız çalışmada ise abiyotik kontrolün toksisitesi ve yıkım ortamın tokisisitesi arasında çok büyük bir fark gözlenmemiştir. Bunun nedeni ortamda kalan metabolitler ya da üreme sırasında oluşan metabolitler olabilir. Yıkımın gerçekleştiği ortam doğası gereği karmaşık bir karakter göstermektedir ve doğru olan yaklaşım bu ortamın toplam toksisitesinin değerlendirilmesidir.

Çalışma sonunda şunu söyleyebiliriz ki; yıkım ortamı abiyotik kontrolden daha toksik değildir ve az da olsa abiyotik kontrole nazaran toksisitede bir azalma söz konusudur.

4.7. Diklofenak Yıkımını Gerçekleştiren En Etkin Suşun Belirlenmesi

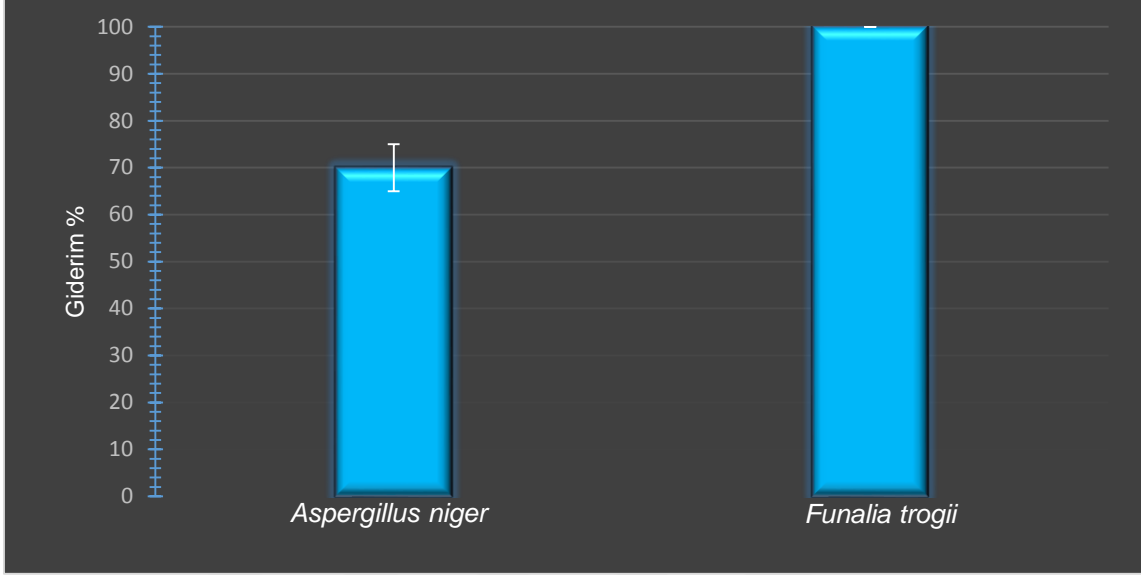
Diklofenak yıkımını gerçekleştiren en etkin fungal kaynağın bulunması amacıyla önkültürasyona tabi tutulan *A. niger*, *P. chrysosporium*, *F. trogii*, *Y. lipolytica* suşları ve fungus içermeyen abiyotik kontrol 50 mg/L diklofenak ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 48. saatinde kültür ortamlarından ve kontrolden alınan örnekler etil asetata çekildiler ve LC/MS de analiz edildiler. 48. saat sonunda fungusların diklofenak giderim yetenekleri abiyotik kontrolde bulunan diklofenak miktarına göre oranlandı. Sonuç olarak, *Yarrowia lipolytica* (K.A.: 0,16 g) için %48, *P. chrysosporium* (K.A.: 0,083 g) için %56, *Aspergillus niger* (K.A.: 0,71 g) için %100 ve *Funalia trogii* (K.A.: 0,047) için %100 giderim oranı bulundu (Şekil 4.14.)



Şekil 4.14. 48. saat sonunda çalışmada kullanılan fungus suşlarının diklofenak giderim kapasiteleri açısından karşılaştırılması (pH:4.7, 30°C, 150 rpm)

Funalia trogii ve *Aspergillus niger* 48 saatlik inkübasyon sürecinin sonunda %100 giderim oranıyla en verimli fungal kaynaklar olarak seçildiler. Seçilen funguslar kendi aralarındaki en verimli suşun belirlenmesi için 24 saat inkübasyona tabi tutuldular.

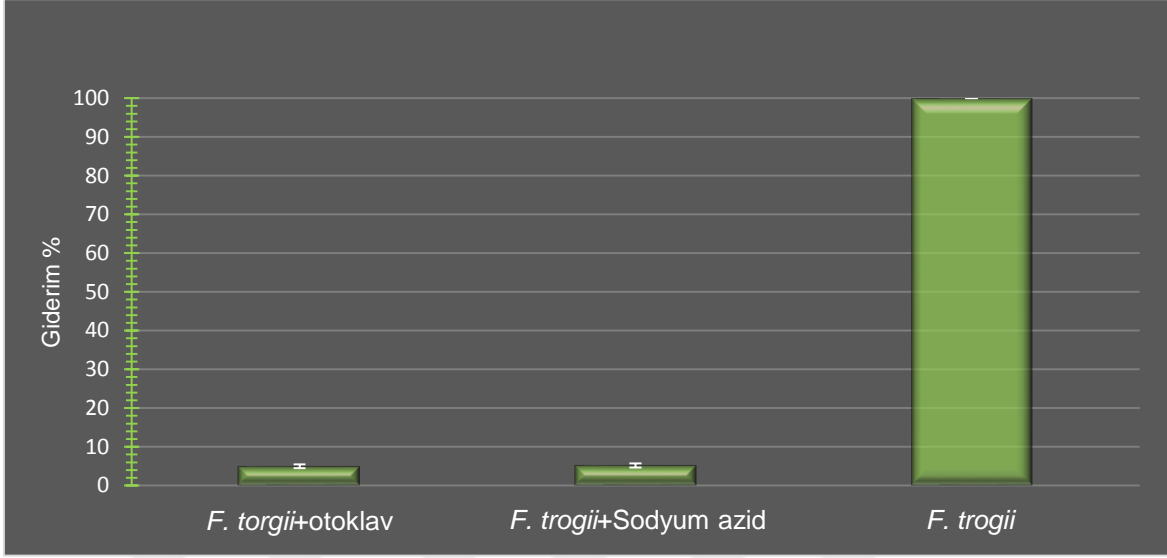
24 saatlik inkübasyonun sonucunda *Funalia trogii* %100 giderim gösterirken *Aspergillus niger* %70 giderim göstermiştir (Şekil 4.15). Bu nedenle ilerleyen çalışmalar *F. trogii* üzerinden devam etmiştir.



Şekil 4.15. *A.niger* ve *F. trogii*'nin 24 saatlik inkübasyondan sonra bulunan diklofenak giderim oranları (pH:4.7, 30°C, 150 rpm).

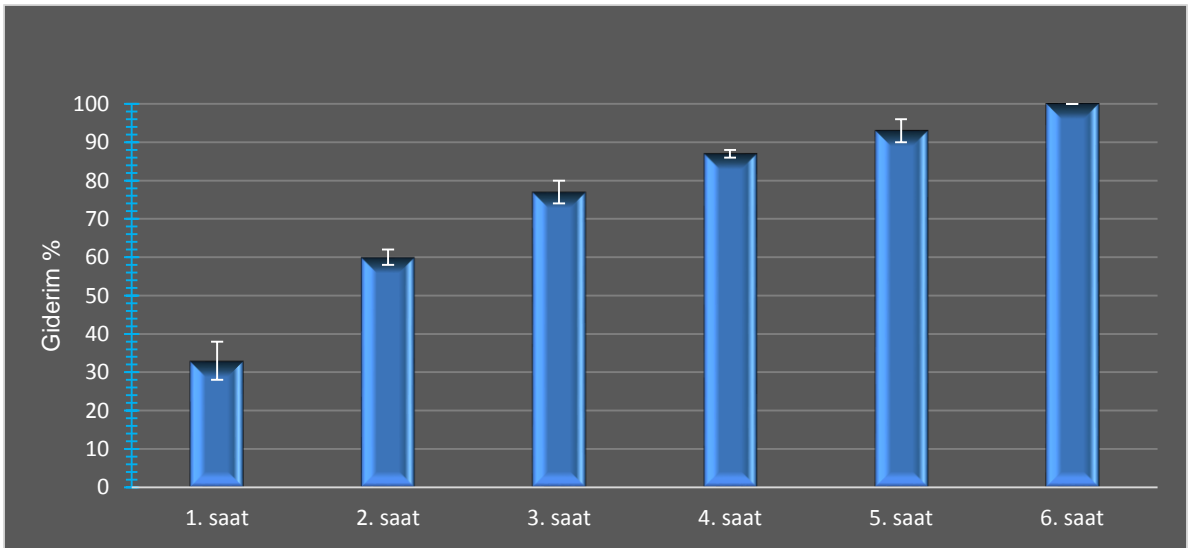
Adsorpsiyonun giderim üzerinde ki etkisini anlamak için 7 gün ön inkübasyona tabi tutulan kültürlerin bir kısmı 110°C de otoklavlanarak öldürüldü, diğer kısmına ise ATPaz inhibitörü olan 5 mM sodyum azid eklendi [7]. Sodyum azid ayrıca lakkaz enzimine de inhibitörük etki göstermektedir [167]. Isı ile öldürülmüş ve sodyum azid eklenmiş ortamlara son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde diklofenak eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda ısı ile öldürülmüş (K.A: 0,045 g) ve sodyum azid eklenmiş grupta (K.A. 0,042 g) %5 civarı giderim gözlenirken, canlı hücrenin bulunduğu grupta (K.A.: 0.052 g) %100 giderim gözlenmiştir. Fungal hücre duvarının fizikokimyasal yapısı yüksek sıcaklıkta değişikliğe uğratılmaktadır ve bazı durumlarda adsorpsiyon kapasitesinde değişimlere neden olabilir [168]. *Trametes versicolor*'un ısı ile işleme maruz kalmış biyokütlesinin, ısı ile işleme tabi tutulmayan biyokütleye nazaran diklofenakı daha iyi adsorbe ettiği bildirilmiştir [7]. Yapılan çalışmada ise *F.trogii* için ısı ile işleme adsorpsiyon kapasitesinde bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Sonuç olarak ısı ile öldürülmüş ve sodyum azid eklenmiş kültürlerde ki diklofenak giderim oranları önemsenmeyecek kadar azdır (Şekil 4.16).

Bu sonuca dayanarak diklofenak giderimini *Funalia trogii*'nin enzimatik olarak gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.



4.16. Isı ile öldürülmüş ve kültür ortamına sodyum azid eklenmiş *F. trogii* biyokütleri ile canlı hücre ortamının naproksen giderimi açısından karşılaştırılması (pH:4.7, 30°C, 150 rpm)

Hızlı bir şekilde diklofenak giderimi gerçekleştirdiği tespit edilen *F. trogii*'nin tam anlamıyla giderim hızını belirlemek için ön kültürasyona tabii tutulmuş *F. trogii*'nin üretim ortamına son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde eklenmiş ve saat başı örnek alınmıştır (Şekil 4.17).



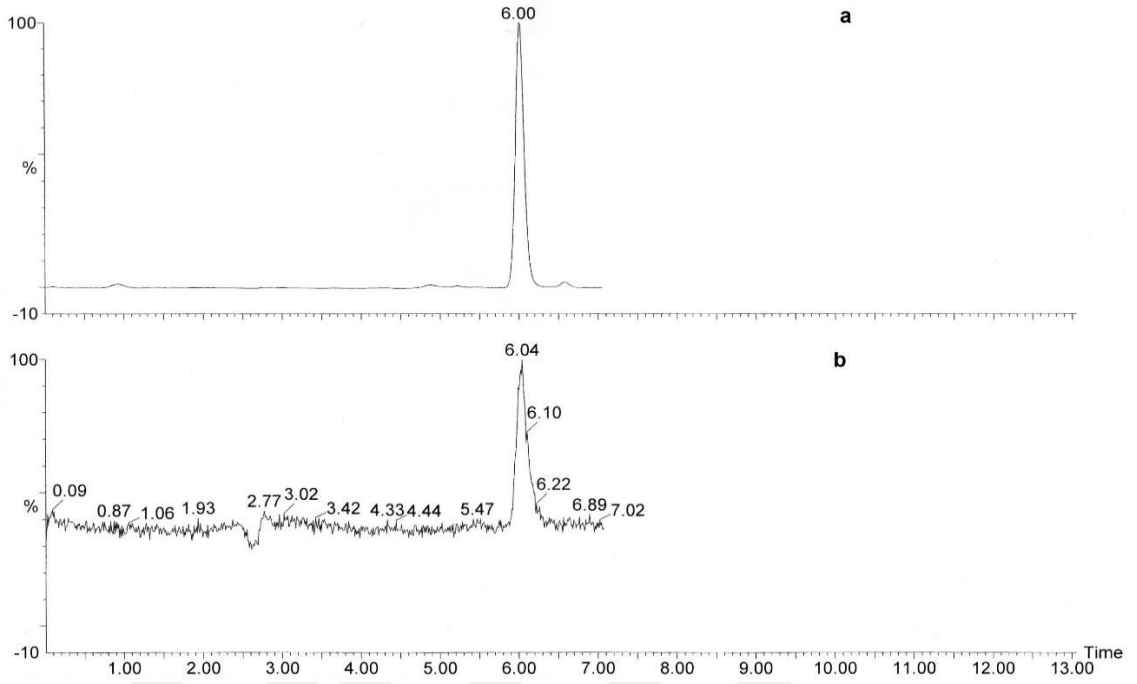
Şekil 4.17. *F. trogii* ile zaman göre diklofenak giderim oranları (pH:4.7, 30°C, 150 rpm)

Marco-Urrea vd. yaptıkları çalışmada beyaz çürükçül grubunda yer alan *Trametes versicolor*'un diklofenak giderimini gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada *Trametes versicolor*'un 10 mg/L diklofenakı 1 saat içinde %94 oranında giderdiğini göstermişlerdir [7]. Bu çalışmada en verimli fungus olan *F.trogii* de beyaz çürükçül grubunda yer almaktadır ve *Trametes versicolor*'un gösterdiği giderim hızına benzer bi diklofenak giderimini gerçekleştirmiştir. Yine bir beyaz çürükçül olan *Phanerochaete sordida* ile yapılan çalışmada diklofenakın 6 gün içerisinde tamamen tespit edilemeyecek konsantrasyona indiğini bildirmişlerdir [142]. *Phanerochaete chrysosporium* başlangıç konsantrasyonu 2 mg/L olan diklofenakı 30 gün içerisinde %93 oranında gidermiştir [169]. Daha önce yapılan farklı bir çalışma üç farklı beyaz çürükçül cinsini diklofenak giderimi açısından karşılaştırmıştır, 1 mg/L konsantrasyonda diklofenak kullanılan çalışmada, *Bjerkandera* sp. R1 4 günde %99 giderim oranı gösterirken, *B. adusta* ve *P. chrysosporium* 7 günde sırasıyla, %91 ve %88 giderim göstermişlerdir [145]. Aktif çamurla yapılan bir çalışmada oksijen varlığında diklofenak gideriminin 27 gün sürdüğü bildirilmiştir [170].

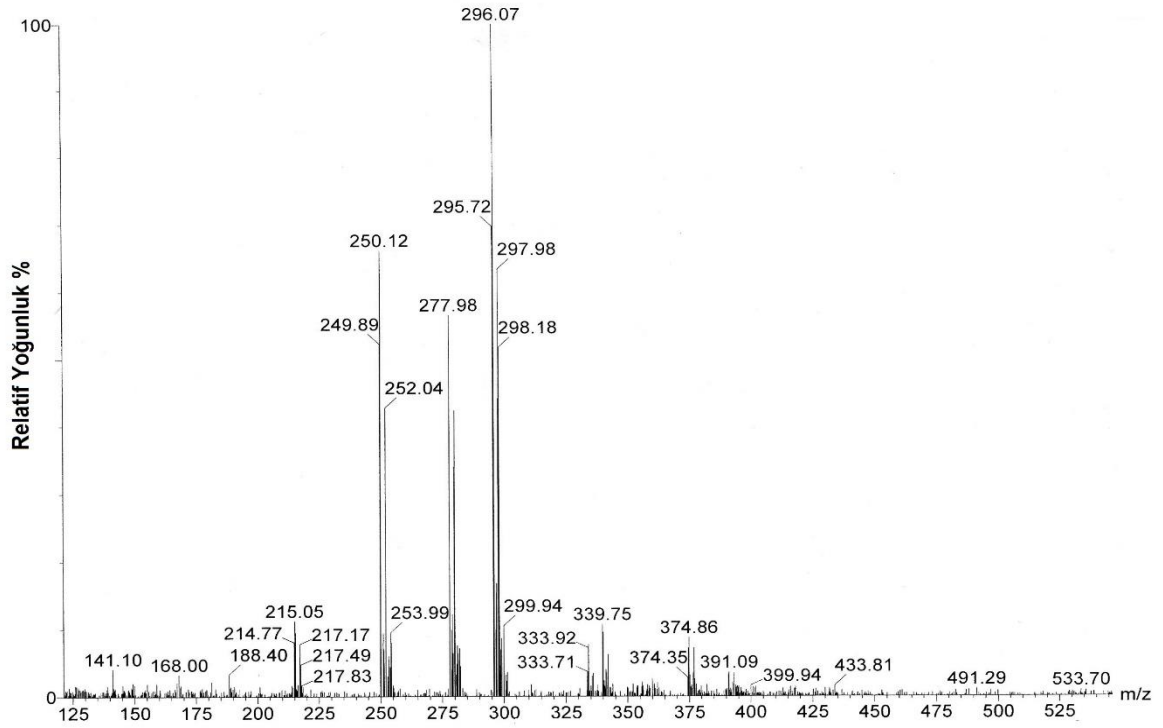
Literatüre bakıldığında beyaz çürükçül fungusların farklı oranda ve hızda olsa diklofenak üzerinde etkin olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmada kullandığımız beyaz çürükçül *Funalia trogii*'nin 50 mg/L diklofenakı 6 saat gibi bir sürede giderdiğini göstermiş bulunmaktayız.

4.8. Diklofenak Yıkım Ürünlerinin Taranması

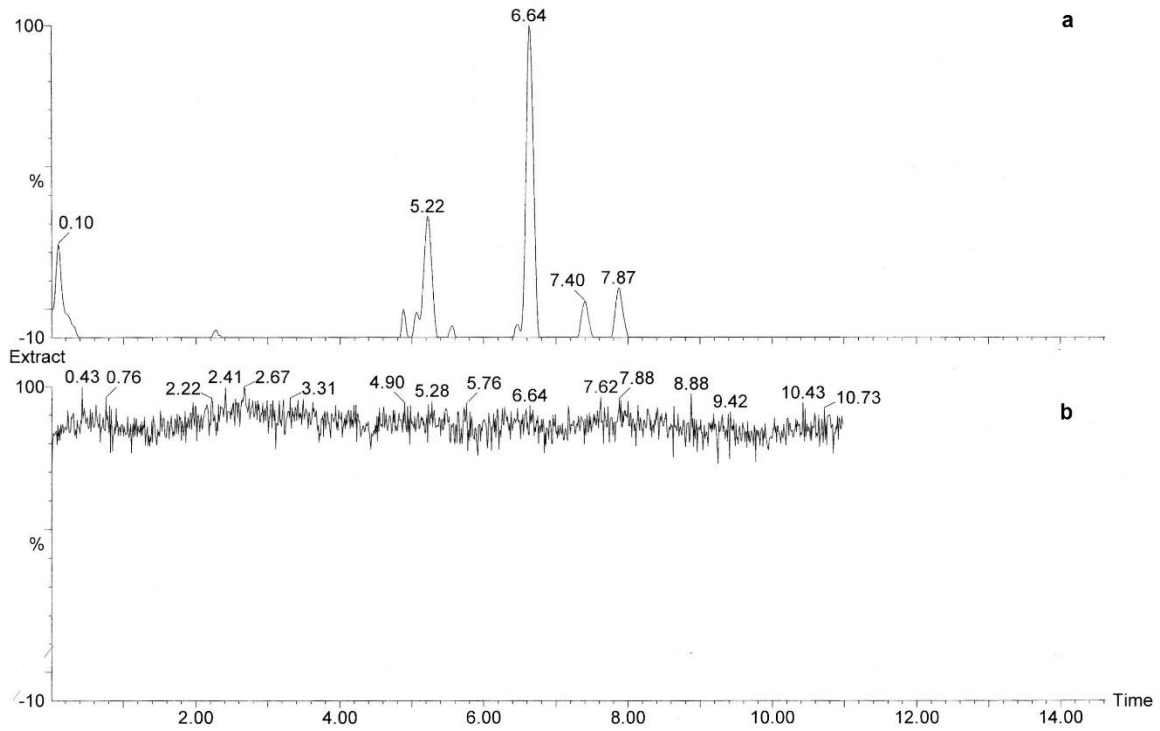
Diklofenak, asetonitril: MeOH: su: % 0.1HCOOH asetonitril içinde (65:15:10:10) yürütücü fazda 6. Dakikada gelmektedir (şekil 4.18). Diklofenakın(C₁₄H₁₁Cl₂NO₂) kütle spektrumuna bakıldığında 3 ana iyon görülmektedir, Bu iyonlar protone diklofenak m/z 296, m/z 250 [M+H - H₂O - CO] ve m/z 278 [M+H - H₂O] dur (Şekil 4.19). Diklofenakın yıkım ürünlerini tespit etmek amacıyla 24 saat 50 mg/L diklofenak ile inkübe edilen *F.trogii* kültürü 1:1 oranında etil asetata alındı ve LC/MS de analiz edildi. Analiz sonucunda diklofenak ya da oluşan bir ürün bulunamadı (Şekil 4.20).



Şekil 4.18. Gecikme zamanı 6. Dakika olan diklofenakın HPLC (a) ve kütle iyon kromatogramı (b) ESI(+)



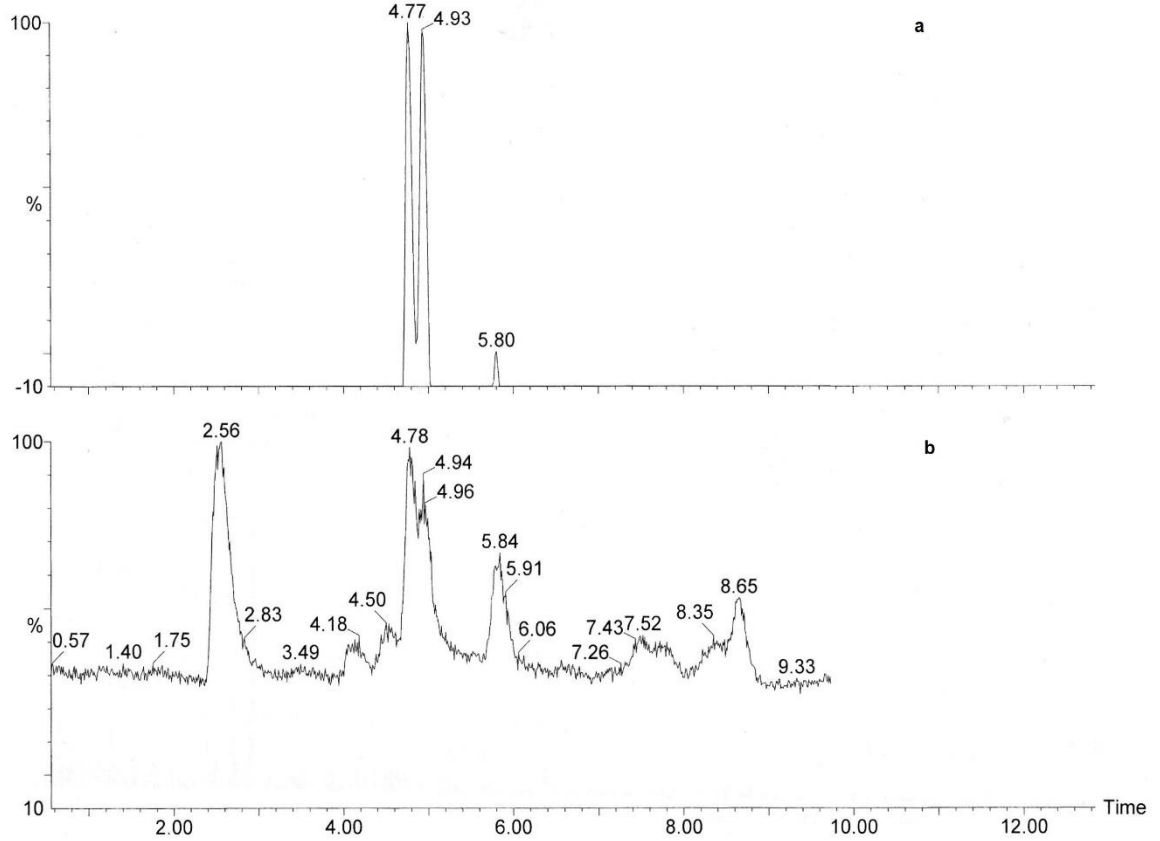
Şekil 4.19. 6. dakikada gelen diklofenakın kütle spektrumu



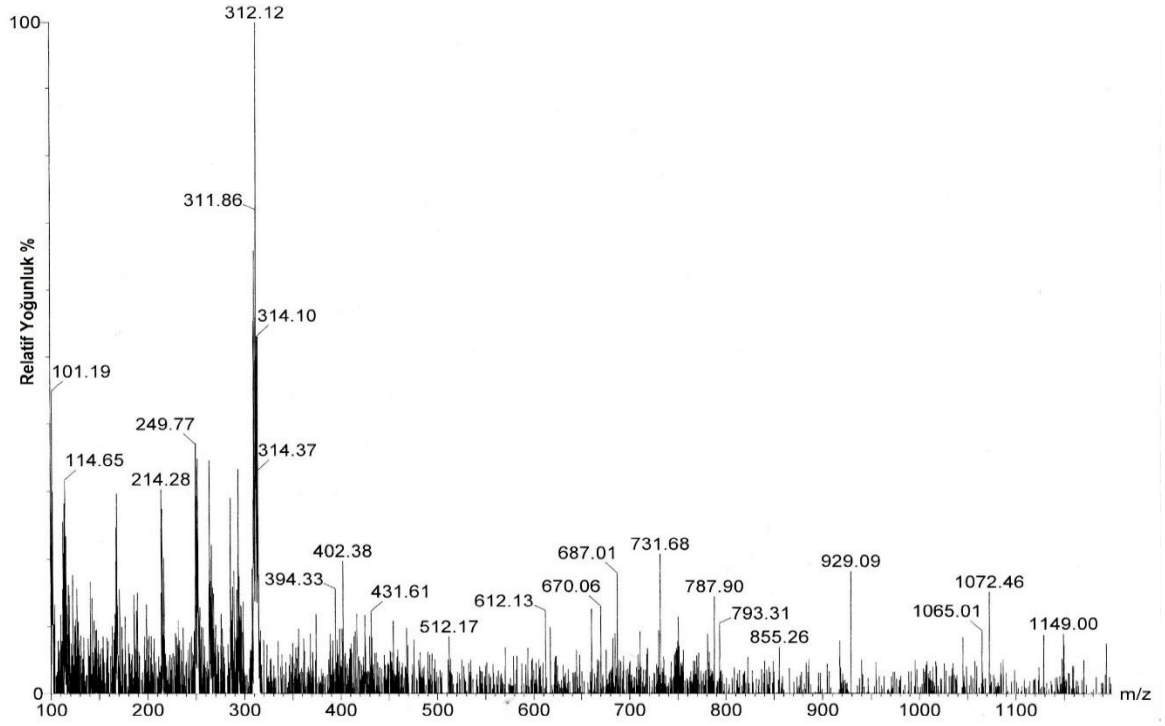
Şekil 4.20. 24. saat sonunda elde edilen HPLC (a) ve kütle iyon kromatogramı (b) ESI (+)

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi kütle total iyon kromatogramında gelen bir madde tespit edilememiştir. HPLC kromatogramında görülen pikler ise yürütücü fazdan gelen gürültü pikleridir. Elde edilen sonuçlara göre *F. trogii*'nin 24 saat içinde diklofenakı mineralize ettiğini ya da tespit edilemeyen ürünlere çevirdiğini söyleyebiliriz. *Trametes versicolor* ile yapılan çalışmada da aynı sonuca ulaşılmıştır. Araştırmacılar *Trametes versicolor* ile 24 saat inkübasyona tabi tutulan diklofenakın tamamen yok olduğunu bildirmişlerdir [7]. Hızlı denebilecek bir sürede hiçbir son ürün bırakmadan tamamen yıkılan diklofenakın yıkımı sırasında oluşan ara ürünlerini tanımlamak için, 30. dakika, 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat ve 6. saat olmak üzere farklı zamanlarda örnek alındı ve 1:1 oranında etil asteta çekildi. Alınan örnekler çıkan metabolitleri tek bir kromatogramda görebilmek için birleştirildi. Birleştirilmiş örnek analiz edildiğinde 5,80. dakikada gelen diklofenakın yanında 4,93 ve 4,77. dakikalarda gelen iki yeni maddenin oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.21).

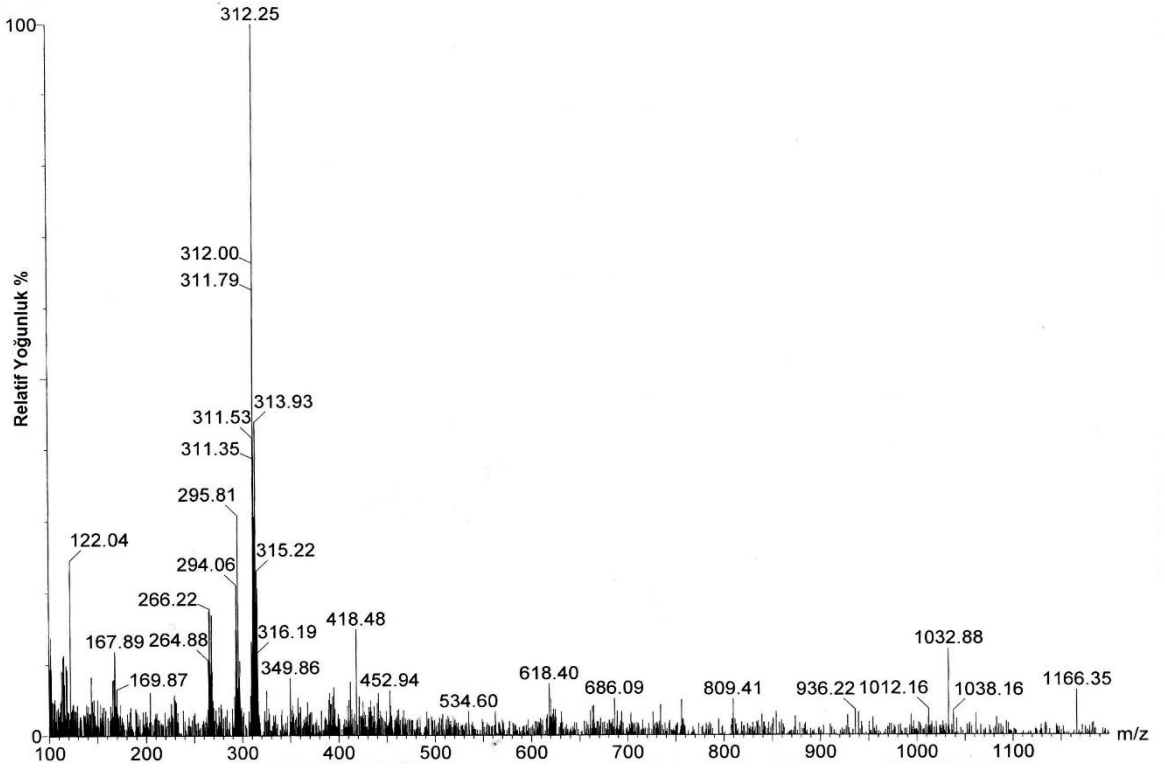
4,77. dakikada gelen maddenin kütle spekturumuna bakıldığında ana iyon piki ESI (+) m/z 296 olan diklofenaktan 16 kütle unit büyük m/z 312 piki gözlemlendi (Şekil 4.22). Diğer pik olan 4,93 kütle spekturumunda m/z 312 pikine rastlandı. Şekil 4.21 de görüldüğü gibi 4,77 ve 4,93. dakikada gelen maddelerin verdiği iyon piki (m/z 312) orijinal diklofenakın (m/z 296) verdiği iyon pikinden 16 kütle unit büyüktür. Bu sonuç diklofenakın hidrosillenmiş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.21. Birleştirilmiş olan örneklerin HPLC (a) ve kütle iyon kromatogramı (b) ESI(+)



Şekil 4.22. Gecikme zamanı 4,77. dakika olan metabolitin kütle spektrumu ESI(+)



Şekil 4.23. Gecikme zamanı 4,93. dakika olan metabolitin kütle spektrumu

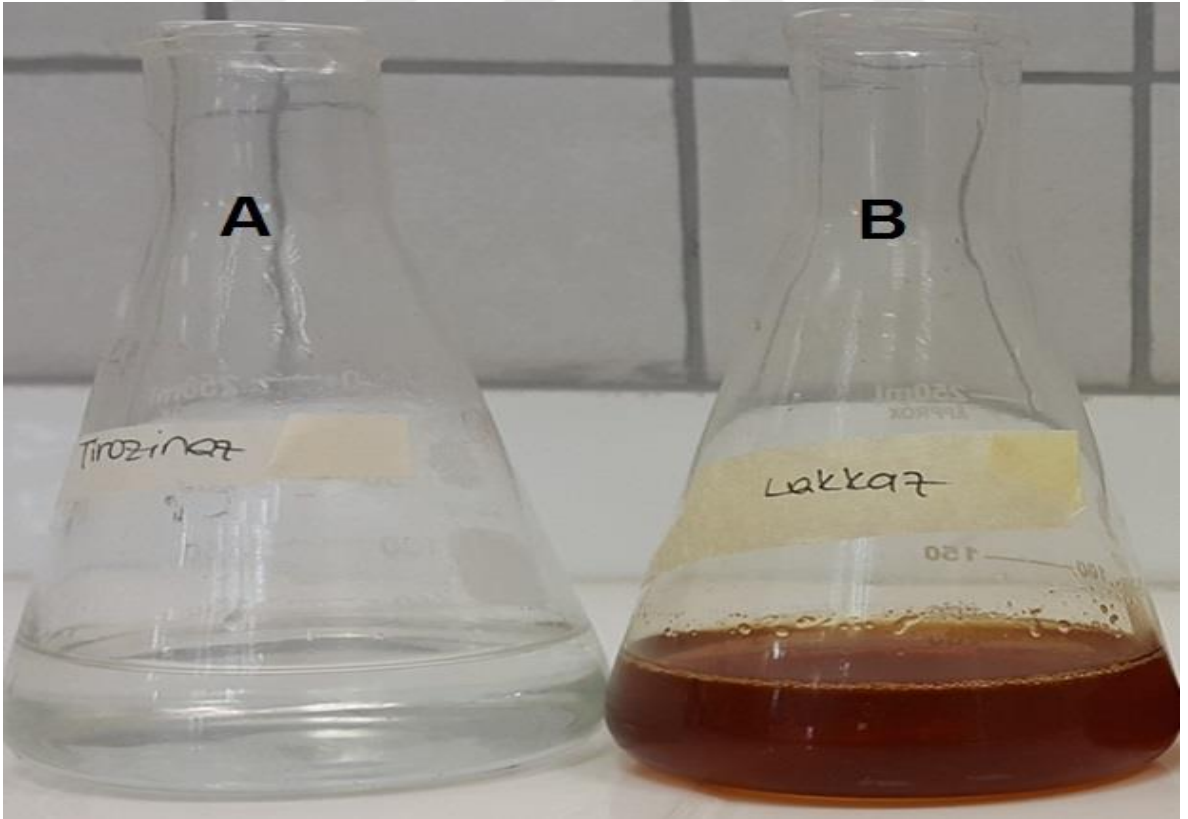
İnsan karaciğerinde sitokrom P450 ailesinden CYP2C9 diklofenakın hidroksillenmesinden ve 4-hidroksidiklofenak oluşumundan sorumludur [171]. *Paecilomyces farinosus*, *Arthrinium phaeospermum*, *Mucor plumbeus*, *Scytalidium sp.*, *Pestalotiopsis sp.* ve *Epicoccum nigrum* gibi birçok fungus diklofenakı hidroksilleyebilmektedir. Beyaz çürükçül *Phanerochaete sordida* diklofenak metabolizması sonucu ürün olarak 4'5-dihidroksidiklofenak, 4'-hidroksidiklofenak ve 5-hidroksidiklofenak oluşturduğu bildirilmiştir [142]. Başka bir beyaz çürükçül olan *Trametes versicolor*'un diklofenak metabolizması sonucu 4'-hidroksidiklofenak ve 5-hidroksidiklofenak oluşur. Ayrıca araştırmacılar diklofenakın hidroksi türevlerinin oluşumunu *Trametes versicolor*'un sahip olduğu sitokrom P450 enzimlerine bağlamışlardır [7]. Diklofenakın bakteriyel metaboliti olarak, *Actinoplanes*'in diklofenak metabolizması sonucu ortaya çıkan 4-hidroksi ve 4,5-hidroksi diklofenak örnek olarak verilebilir [172]. *Pestalotiopsis sp.* ve *Epicocum nigrum* ile yapılan çalışmalar 4-hidroksidiklofenakın ana metaboliti olduğunu, 3-hidroksi ve 5-hidroksidiklofenakın minör metabolitler olduğunu göstermiştir [173], [174] Elde ettiğimiz kütle spekturumları diklofenakın hidroksillenmiş olduğunu gösterse de OH-grubunun moleküle hangi karbondan girdiğini göstermekte yetersiz kalmaktadır. Diklofenak molekülünün hangi karbon atomundan hidroksillendiğini bulmak için, molekül ağırlıkları aynı ve polariteleri birbirine çok yakın iki hidroksile molekülü saf halde elde edip NMR analizlerinin yapılması gerekmektedir. Ancak yapılan tüm çalışmalara rağmen birbirine çok benzeyen iki molekül birbirinden ayrılamamıştır. Bu nedenle daha önce fungal metabolitler olarak tanımlanmış, 4-hidroksidiklofenak, 5-hidroksidiklofenak ve 3-diklofenaktan ikisi olabileceği düşünülmektedir. Beyaz çürükçüllerde 4 ve 5-hidroksifenak tanımladığı için yine bir beyaz çürükçül olan *Funalia trogii*'de oluşan hidroksi metabolitlerinde, 4-hidroksidiklofenak ve 5-hidroksi diklofenak olma olasılığı oldukça yüksektir.

4.9. Diklofenak Yıkımında Rol Alan Enzimlerin Bulunması

Beyaz çürükçül funguslar sahip oldukları hücre dışı enzimleri ile birçok kirleticinin boykımını gerçekleştirebilirler [175]. Beyaz çürükçül funguslarda lignin yıkımından sorumlu olan enzimlerden en çok bilinenleri lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkazdır [98]. *Funalia trogii*'nin tirozinaz enzimini de ürettiği bilinmektedir [137].

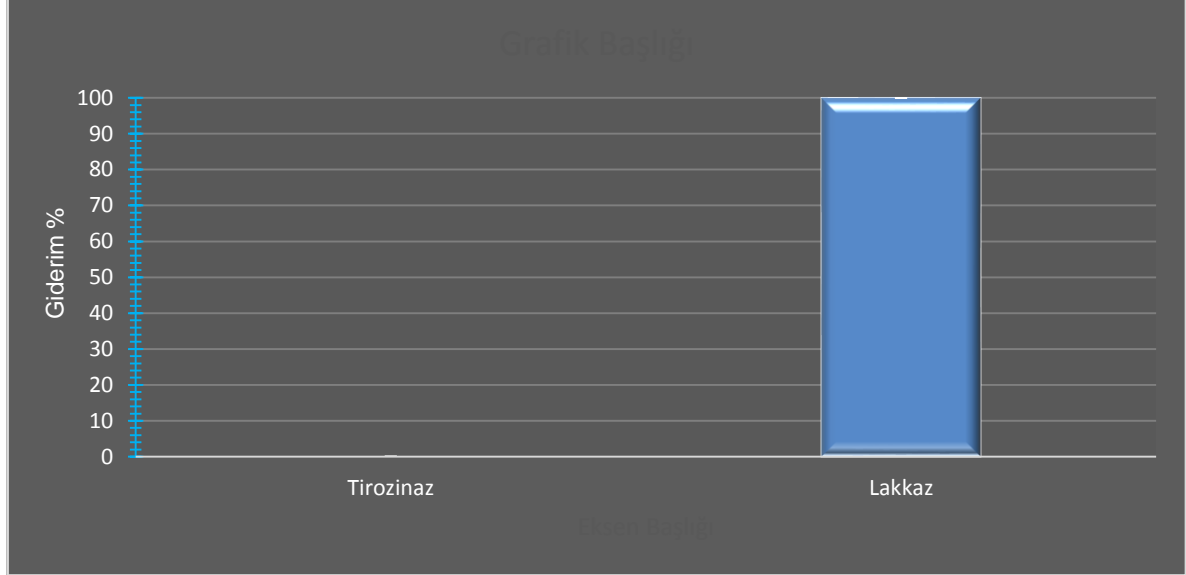
Bu nedenle diklofenak yıkım ortamında lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, lakkaz ve tirozinaz enzimlerinin varlığı araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu *F. trogii* supernatanında 1,8 U/ml lakkaz aktivitesi ve 1,2 U/ml tirozinaz aktivitesi saptanmıştır. Lignin peroksidaz ve Mangan peroksidaz aktivitesine ise rastlanamamıştır.

Süpernatanda bulunan enzimlerin diklofenak gideriminde bir etkisinin olup olmadığı ticari olarak elde edilen saf lakkaz ve saf tirozinaz enzimleri ile sınanmıştır. Lakkaz enzimin diklofenak giderimindeki rolünü orta ortaya çıkarmak için pH 4,5 sodyum asetat tamponunda aktivitesi 2,4 U/ml olacak şekilde lakkaz enzimi hazırlanmış ve ortama son konsantrasyon 50 mg olacak şekilde diklofenak eklenerek 30° de 24 saat inkübe edilmiştir. Saf tirozinaz (10 Unit) enzimi ise pH 7 fosfat tamponunda hazırlanmış ve son konsantrasyonu 50 mg/L olan diklofenak ile 30° de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda lakkaz ve diklofenak içeren ortamın gözle görülecek şekilde renk değiştirdiği, berrak olan ortamın koyu kahverengiye döndüğü görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Diklofenakın, tirozinaz (A) ve lakkaz (B) ile 24 saat muamele edilmesi sonucu reaksiyon ortamındaki değişiklik

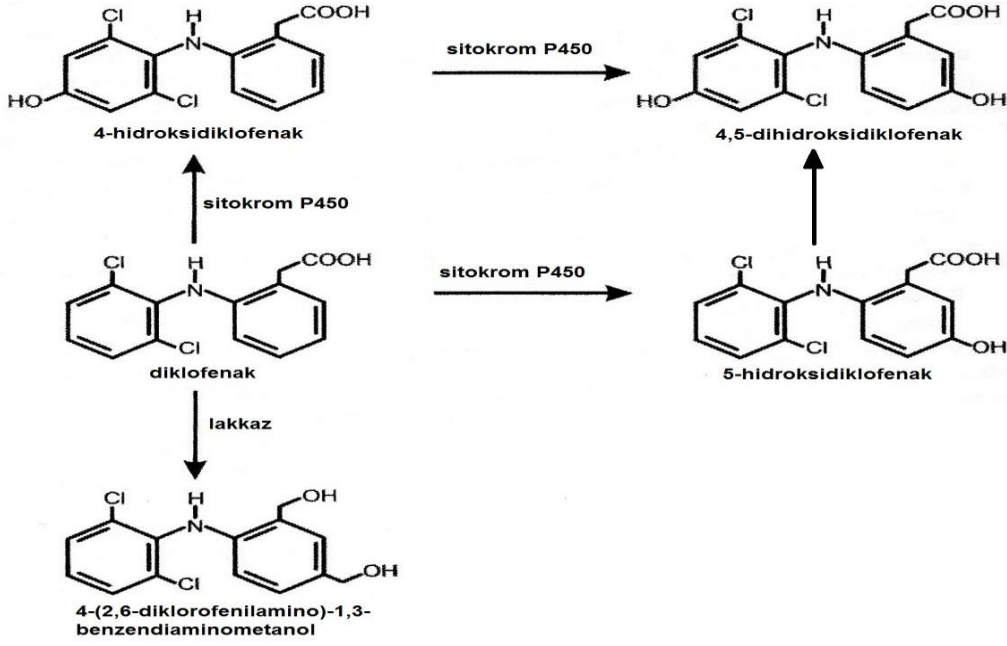
Tirozinaz ve lakkazın diklofenak üzerindeki etkisini anlamak için iki ortamdan da örnek alındı LC/MS de diklofenak giderimi açısından abiyotik kontrole göre değerlendirildi. LC/MS analizi sonucu tirozinazın diklofenak üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gözlemlenirken, saf lakkaz enziminin diklofenakı tamamen giderdiği bulunmuştur (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Tirozinaz ve lakkaz enzimlerinin diklofenak giderim kapasiteleri

Lakkazın difenoller, klorlu fenoller, alkenler, heterosiklik bileşikler ve polifenoller gibi birçok çevre kirleticisini moleküler oksijeni kullanarak oksitlediği bilinmektedir [126]. Tran vd. yaptıkları çalışmada lakkaz enziminin diklofenak, naproksen ve indomethazin üzerinde son derece etkili olduğunu bulmuşlar ve diklofenakın, ABTS, violurik asit, HBT gibi lakkaz substratlarına moleküller yapı itibariyle oldukça benzediğini bildirmişlerdir [176]. Lloret vd. *Myceliophthora thermophila*'dan elde edilen saf lakkaz ile yaptıkları çalışmada mediatör olarak HBT (1-hidroksibenzotriazolun) bulunduğu ortamda %95 ye kadar diklofenak giderimine ulaşırlarken, mediatör içermeyen ortamda diklofenak giderimi %65 de kalmıştır [177]. *Trametes versicolor*'dan elde edilen saf lakkaz ile yapılan bir çalışmada 4,5 saat içinde %95 oranında diklofenakın giderildiği ve son ürün olarak 4-(2,6-diklorofrenilamino)-1,3-benzendimethanol çıktığı bildirilmiştir [7].

Bizim yaptığımız çalışmada ise 4-(2,6-diklorofrenilamino)-1,3-benzendimethanole ait bir pike LC/MS te rastlanamamıştır bunun nedeni, kurulan deney sisteminde iyonizasyonun sağlanamaması olabilir.



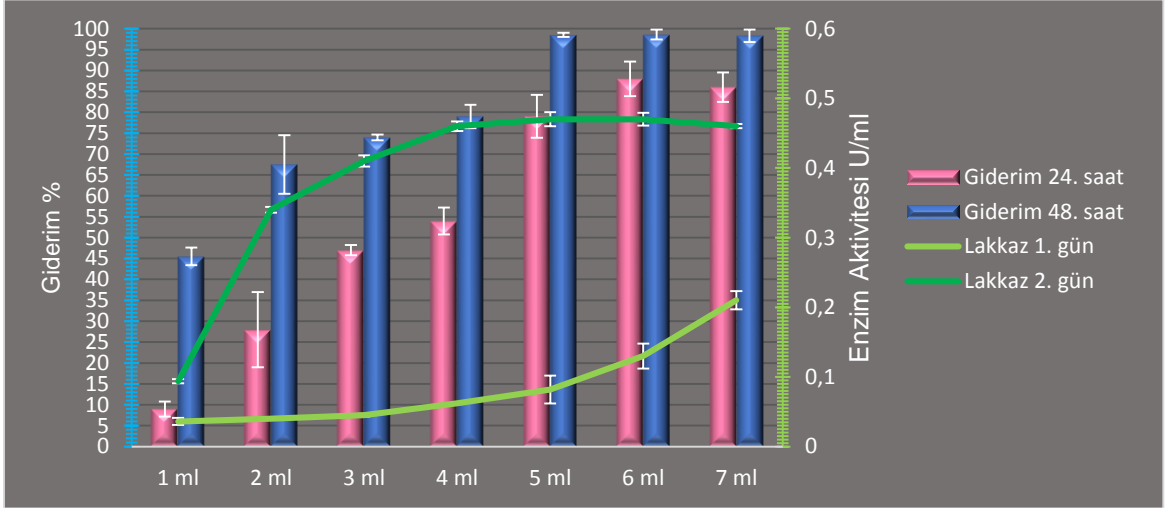
Şekil 4.26. Beyaz çürükçüllerde diklofenak metabolizması [7], [142], [169].

İnsan karaciğerinde diklofenak metabolizması sonucu 4-hidroksidiklofenak, 5-hidroksidiklofenak, 3-hidroksidiklofenak ve 4,5-hidroksidiklofenak oluşmaktadır [178]. Bu çalışmada da diklofenakın iki hidroksi metabolitine rastlanması fungal sitokrom P450 enziminin *F.trogii*'nin diklofenak metabolizmasında P450 enzim sisteminin rolünün olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce beyaz çürükçüllerle yapılan çalışmalarda da hidroksi türevlerinin oluşumu fungal sitokrom P450 enzim sistemine bağlanmıştır [7], [142], [174]. Ayrıca lakkaz saf lakkaz ile yapılan çalışmalar, lakkaz enziminin diklofenakın giderimini gerçekleştirdiğini göstermiştir [7], [176], [177]. Elde ettiğimiz verilere ve daha önce yapılan çalışmalara dayanarak *F. trogii*'nin sitokrom P450 enzim sisteminin ve lakkaz enziminin rol aldığı bir yolla diklofenak giderimini gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.

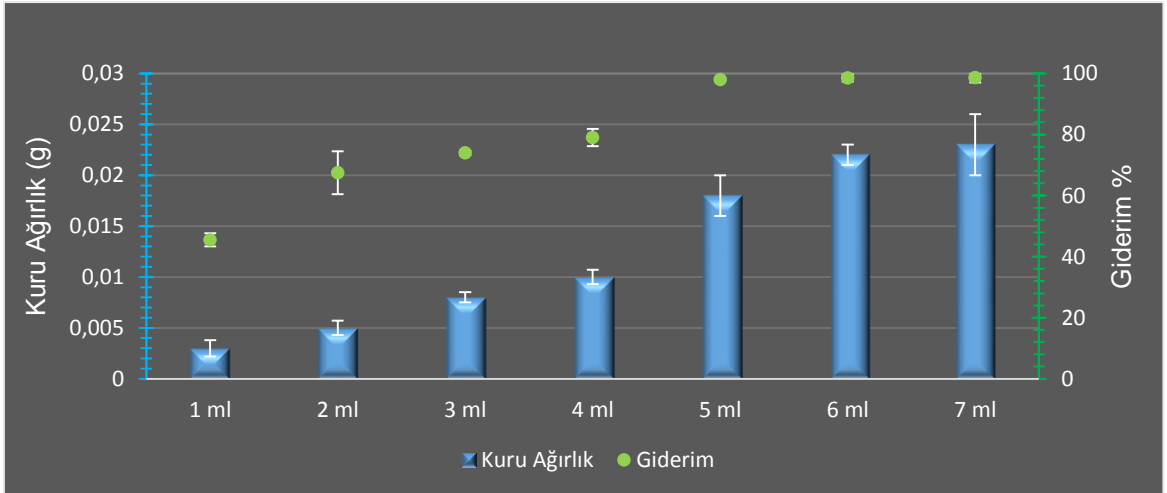
4.10. İnokulasyon Miktarının, pH Değerinin ve Sıcaklığın Diklofenak Giderimi Üzerindeki Etkisi

Diklofenak yıkımı için uygun inokülasyon miktarının bulunması için daha önce 30°C 150 rpm çalkalama hızında malt ekstraktta 5 gün süre ile inkübe edilen *F. trogii* homojenizatörden geçirildi ve besiyerlerine 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml olacak şekilde ekildi. Ekim ile birlikte son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde diklofenak eklendi.

30°C de inkübe edilen deney gruplarından, 24 saatte bir örnek alındı, deney grupları diklofenak giderimi kuru ağırlık ve lakkaz aktivitesi açısından değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre 48. saat sonunda 5 ml lik inokulasyon miktarında %98,5 lik bir giderim oranı görülürken, 6 ml ve 7 ml ekim yapılmış gruplarda sırasıyla %98,6 ve %98,5 lik bir giderim oranına rastlanmıştır. Lakkaz aktivitesine bakıldığında, 5 ml ekim yapılmış grup lakkaz enzimi açısından 0,47 U/ml aktivite gösterirken 6ml ve 7ml lik ekim yapılmış gruplarda neredeyse aynı aktiviteyi göstermiştir (Şekil 4. 27).



Şekil 4.27. İnokulasyon miktarının diklofenak ve lakkaz aktivitesine etkisi

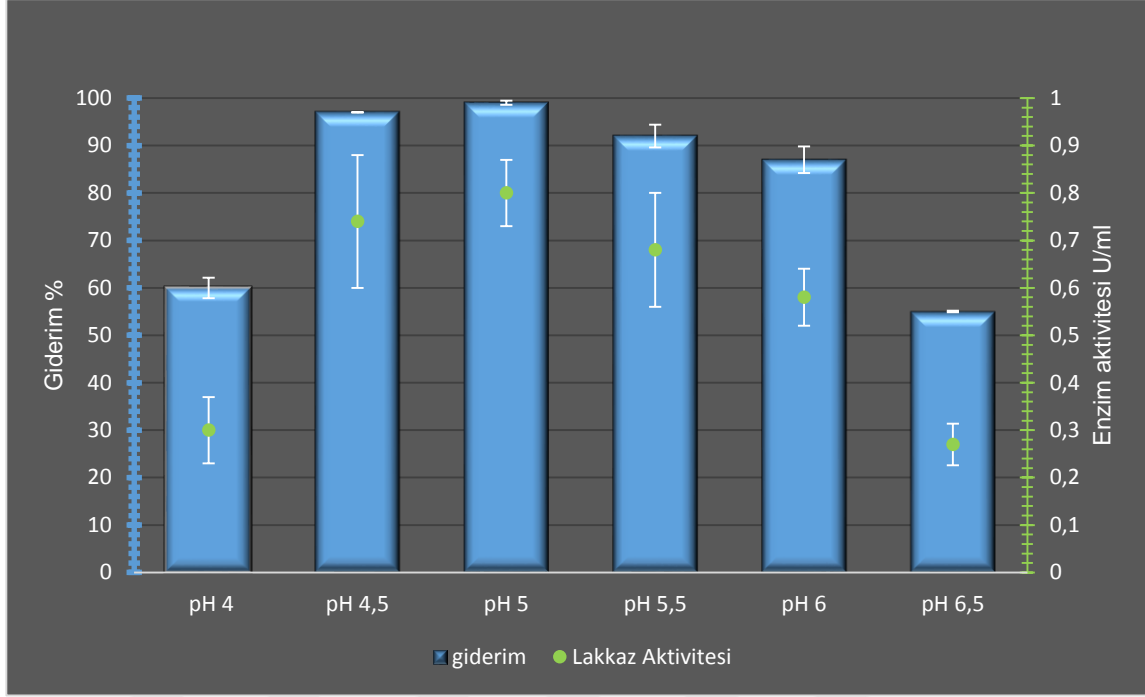


Şekil 4.28. İnokulasyon miktarının giderim ve kuru ağırlık üzerine etkisi

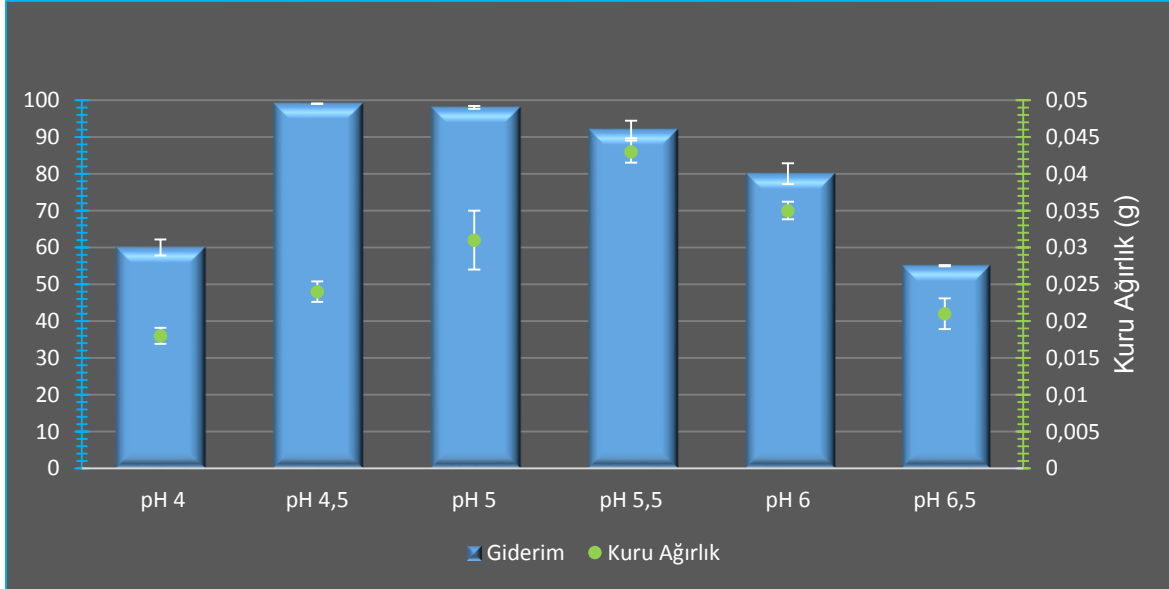
Kuru ağırlık olarak 6ml (0,022 g) lik ve 7 ml (0,024 g) lik ekim yapılan gruplar daha yüksek üreme değeri gösterirken, 5 ml ekim yapılmış grup 0,018 g ile geride kalmıştır.

5 ml ekim yapılan grup kuru ağırlık olarak, 6 ml ve 7ml ekim yapılan gruplardan geri kalmasına rağmen diklofenak gideriminin pik yaptığı gruptur (Şekil 4. 28). Diklofenak giderimi hem lakkaz hem de hücre içi sitokrom P450 enzimi sisteminin rol oynadığı bir süreçtir. Bu nedenle giderim oranlarında ki değişimi tek bir parametreye bağlayamayız. Yalnız elde ettiğimiz verilere göre belli bir lakkaz aktivitesi ve biyokütle miktarının giderimin verimli olması için gerekli olduğu görülmüştür. Bu çalışma için 5 ml'lik inokülasyon miktarı optimum inokülasyon miktarı olarak belirlenmiştir.

Diklofenak yıkımına pH etkisini belirlemek için pH sı 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 ayarlanmış besiyerlerine *F. trogii* homojenizatından 5 ml ekim yapıldı 30°C 150 rpm de inkübe edildi. 48 saatlik inkübasyon sonunda kültür ortamları diklofenak giderimi, kuru ağırlık ve lakkaz aktivitesi açısından değerlendirildi. En iyi giderim oranları %97 giderim ile pH 4,5 ve %99 giderim oranı ile pH 5 te gözlenmiştir. Farklı ortam pH değerlerinin lakkaz enzimi üretimine etkisine bakıldığında ise en yüksek lakkaz aktivitesi pH 4,5 ta 0,74 U/ml, pH 5 te 0,80 U/ml olarak ölçülmüştür (Şekil 4.29). Ortam pH sı kuru ağırlık ve yıkım ilişkisine bakıldığında en yüksek kuru ağırlığa pH 5,5 te 0,043 g rastlanmıştır. En yüksek giderimin ölçüldüğü pH 5 te ise, kuru ağırlık 0,031 g olarak bulunmuştur (Şekil 4. 30). Kuru ağırlığın en yüksek olduğu pH 5,5 te giderim oranı %91, lakkaz aktivitesi ise 0,68 U/ml olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak söyleyebiliriz ki pH 5 grubu daha yüksek lakkaz aktivitesi gösterdiği için daha yüksek giderim oranına sahiptir. Fungal biyokütlenin diklofenak gideriminde rolü olsa da bu çalışma için lakkaz enziminin aktivitesinin diklofenak gideriminde belirleyici olduğunu söyleyebiliriz. Daha önce yapılan bir çalışmada *F.trogii* için maksimum lakkaz üretimi pH 5 olarak bulunmuştur [179]. *Funalia trogii* ile reaktif siyah 5 boyasının giderildiği bir çalışmada da boya gideriminin pik yaptığı pH değeri 4,78 bulunurken, maksimum üremenin pH 5 değerinde olduğu bildirilmiştir [180]. Yapılan başka bir çalışmada ise *Funalia trogii*'nin reaktif siyah boyasını pH 6,5 te en verimli şekilde giderdiğini bildirmiştir [181]. Bu çalışmada pH 4,5 ve pH 5 değerleri arasında %90 nin üzerinde giderim gözlenmiştir.



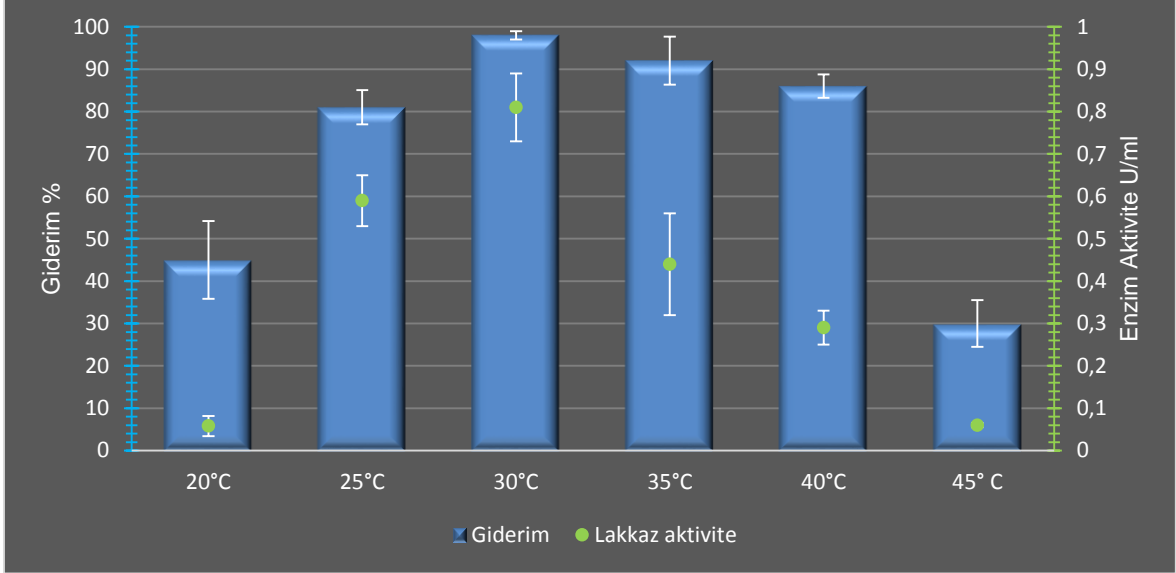
Şekil 4.29. Ortam pH sınırın diklofenak giderimine ve lakkaz üretimine etkisi(30°C,150 rpm)



Şekil 4.30. Ortam pH sınırın kuru ağırlık ve diklofenak giderimi üzerine etkisi (30°C,150 rpm)

Diklofenak yıkımına sıcaklığın etkisini belirlemek için 5 ml fungal homojenizat ekilmiş besi besiyerleri (pH:5) 20, 25, 30, 35, 40, 45°C de 48 saat süreyle inkübe edildi. pH çalışmasında olduğu gibi farklı sıcaklık çalışmasında da lakkaz enzimini n aktivitesinin diklofenak yıkımı ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Farklı sıcaklıklarda ki giderim oranlarına bakılacak olursa en yüksek giderim değeri %98 ile 30°C sıcaklıkta gözlemlenmiştir. Lakkaz aktivitesi yine 30°C sıcaklıkta 0,81 ile en üst değerdedir (Şekil 4.31).

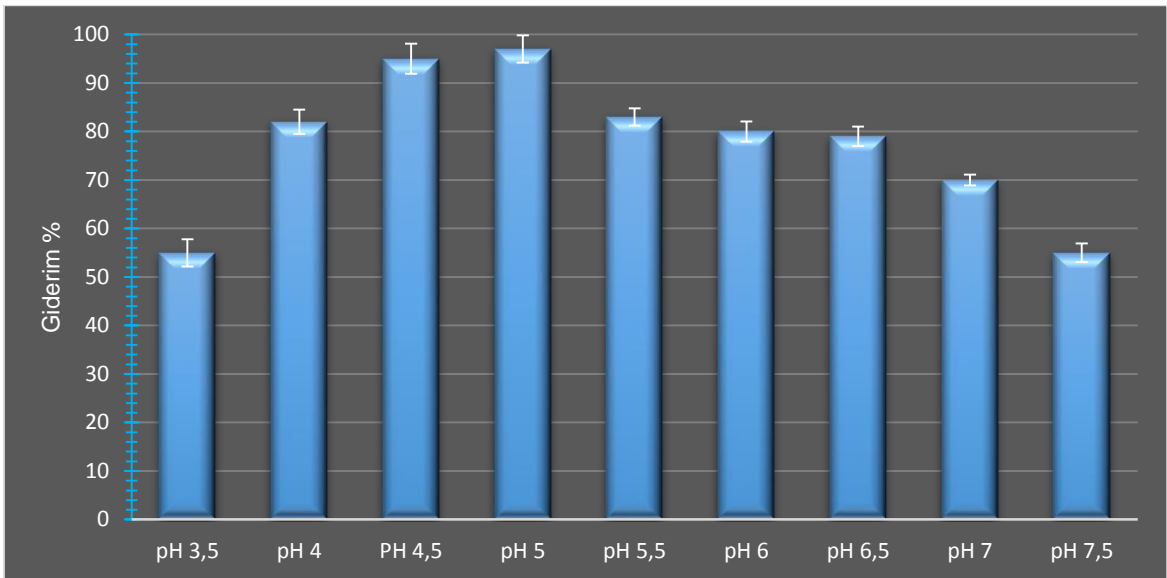


Şekil 4.31. İnkübasyon sıcaklığının diklofenak giderimi ve lakkaz enzimi üretimine etkisi (pH:5,150 rpm)

F. trogii ile yapılan bir çalışmada reaktif siyah boyasının gideriminin en verimli 28°C gerçekleştiği gösterilmiştir[181]. Astrazon kırmızısının dekolorizasyonun çalışıldığı bir başka çalışmada en yüksek dekolorizasyon değerine 30°C inkübasyon sıcaklığında ulaşılmıştır. Reaktif siyah boyası ile yapılan bir başka çalışmada ise en yüksek dekolorizasyon değerine 25°C inkübasyon sıcaklığında ulaşılmıştır [180]. Daha önce yapılan çalışmalar bakıldığında *F.trogii*'nin 25°C ile 30°C arasında oldukça aktif olduğu söylenebilir. Bizim çalışmamızda ise 25°C ile 40°C arası inkübasyon sıcaklığında %80 ve üzeri diklofenak giderimi gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan lakkaz enzimi üretimini etkileyen değişkenlerin diklofenak giderimini doğrudan etkilediği sonucunu çıkarabiliriz. *Funalia trogii*'nin 30°C de en yüksek lakkaz üretim oranında ulaştığı gösterilmiştir [179].

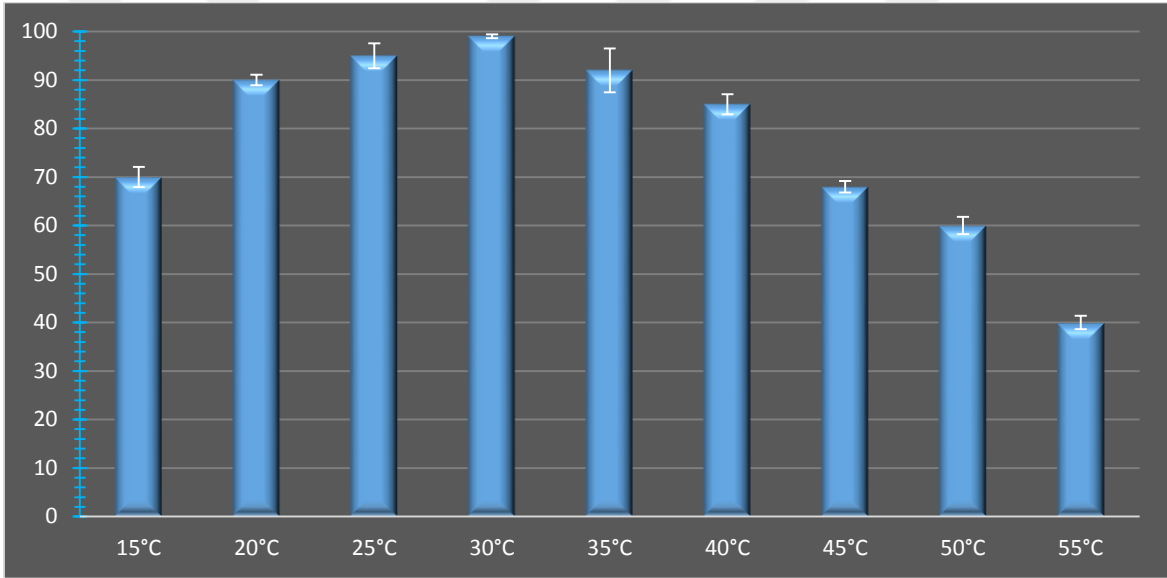
4.11. Kaba Lakkaz Enzimiyle Diklofenak Giderimi ve Giderime pH ve Sıcaklığın Etkisi

Saf lakkaz enzimin diklofenak giderimindeki rolünü gösterdiğimiz çalışmadan sonra *F.trogi*'nin supernatanı ile de giderim olup olmayacağını ve giderime sıcaklık ve pH değerlerinin etkisini göstermek amacıyla 2,1 U/ml lakkaz aktivitesi ölçülen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanıldı. Farklı pH değerlerinde kaba enzim ile inkübe edilen diklofenak maddesinin gideriminin en yüksek %97 olmak üzere pH 5 değerinde gözlemlenmiştir. Bulunan bu değer canlı hücre ile yapılan deneydeki ile aynı pH değeridir. Demek ki pH 5, hem enzim üretimi hem de enzimin diklofenak üzerindeki etkisi için optimum pH değeridir. Diğer pH lardaki giderim oranlarına bakıldığında da canlı hücre ile yapılan deneye benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Yalnız dikkat edilmelidir ki canlı hücre ile yapılan deneyde yükselen pH ile birden giderim yüzdesi hızla düşerken kaba enzim ile yapılan deneyde düşüş daha yavaş olmaktadır. Canlı hücre ile yapılan çalışmada pH 6,5 de giderim %55 seviyelerine gerilerken, kaba enzim ile yapılan çalışmada pH 7 de %70 giderim görülmüştür (Şekil 4.32). Buna dayanarak kaba enzimin daha geniş bir pH aralığında diklofenak giderimi yaptığını söyleyebiliriz.



Şekil 4.32. Farklı pH değerlerinin kaba enzim ile diklofenak giderimine etkisi

Kaba lakkaz enzimi ile giderime sıcaklığın etkisini belirlemek amacı ile son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde diklofenak eklenen deney grupları, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C inkübe edildi ve 48. saat sonunda analiz edildi. Şekil 4.31 de görüldüğü gibi yine canlı hücre ile yapılan deneyde olduğu gibi 30°C inkübasyon sıcaklığında %99 giderim oranı en yüksek giderim oranının ölçüldüğü sıcaklıktır. 25°C ile 35°C arasında %90 ve üzeri oranında bir giderim oranı görülürken. 20°C ile 40°C arasında %80 ve üzeri giderim oranı tespit edilmiştir. *Funalia trogi*'nin kültür filtratıyla yapılan bir çalışmada remazol brilliant mavi boyasının 50° ile 60°C arasında son derece etkin bir şekilde giderildiği gösterilmiştir [179]. Ayrıca sonuçlara bakıldığında kaba enzimin geniş bir sıcaklık aralığında etkin olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.33. Farklı sıcaklık değerlerinin kaba enzim ile diklofenak giderimine etkisi

Trametes versicolor'dan elde edilen kaba lakkaz enziminin 48 saatte pH 4,5 te oldukça stabil olduğu görülürken, pH 7 etkinliğini %57 oranında kaybettiği gösterilmiştir. Yine çalışmada enzimin 48 saatte 30°C son derece aktif olduğu, 40°C etkinliğini %9,8 oranında kaybettiği, 50°C de ise 6 saatte %53, 60°C de ise 6 saatte %58 oranında kaybettiği gösterilmiştir [182]. Bu çalışmada kullanılan kaba lakkaz enziminin de diklofenak giderimi açısından yukarıda bahsedilen çalışmaya benzer bir örüntü gösterdiği görülmektedir.

4.12. Yıkım Öncesi ve Yıkım Sonrası Toksik Etkinin Karşılaştırılması

Diklofenak maddesinin yıkım öncesi ve yıkım sonrası toksisitesinin karşılaştırılması için *Vibrio fischeri* bakterisinin biyoluminisansına dayanan Microtox (MicroBioTets Inc.) testi yapıldı. Toksik etki değerlendirmesi, kitin içinden çıkan kontrol grubunun ışımaya değişimi ile örnekteki değişimin oranlanması esasına dayanmaktadır. Tesitin sonucunda *F.trogii* ile yıkıma uğratılan diklofenak grubu %6 toksik etki gösterirken. Hiçbir muameleye maruz bırakılmayan diklofenak içeren grup %26 toksik etki göstermiştir. Bu sonuca dayanarak *F. trogii*'nin ie diklofenak giderimiyle toksisitede de azalmaya neden olduğunu söyleyebiliriz. *Trametes versicolor* ile yapılan bir çalışmada diklofenak yıkımı sonrası ortamın toksik etkisinin önemsenmeyecek kadar az olduğunu rapor edilmiştir [7].

Saf Lakkaz ile yapılan giderim sonunda çıkan ürünün toksisitesinin belirlenmesinde MicroTox testi ortamın renklenmesi nedeniyle çalışmamıştır. Bu nedenle test organizması olarak rotifer *Brachionus calyciflorus*'un kullanıldığı Rotox kit F kullanıldı. 50 mg/L diklofenak içeren ve diklofenak'ın saf lakkaz ile yıkıma uğratıldığı ortam 0,20 µm por çaplı filtrelerden geçirildi. Filtreden geçirilen ortamların pH sı 7 ye ayarlandı. Hazırlanan ortamlar testin kitapçığına göre beş farklı konsantrasyon elde edilecek şekilde sulandırıldı: C1(hiç sulandırılmamış), C2(1/2), C3(1/4), C4(1/8), C5(1/16). Saf lakkaz ile yıkıma uğratılan grupta C1 için; (İ)%= 50 iken, diklofenak içeren grupta C1 için; (İ)%=100 olarak bulundu. Saf lakkaz ile yıkıma uğratılan grupta C2 için; (İ)%= 30 iken, diklofenak içeren grupta C2 için; (İ) % = 90 olarak bulundu. Diğer sulandırma oranlarında gruplar arasında bir fark bulunamadı. Fare fibroblastları ile yapılan bir çalışma da lakkaz ile muamele edilmiş diklofenakın, ana bileşikten daha az toksik olduğunu göstermiştir [183].

Çalışmamız sonucunda mikro kirlenici olarak kabul edilen naproksen ve diklofenak ilaç etken maddelerinin fungal kaynaklar ile biyodegradasyonu hedeflenmiştir. Bu bağlamda naproksenin *A. niger* tarafından 48 saat içinde %98 oranda giderildiği gösterilmiştir ve yıkımı ürünü olarak 7-hidroksinaproksen ve O-desmetilnaproksen tanımlanmıştır. Yapılan MicroTox testi ile toksisitenin %16 dan %11 e düştüğü gözlenmiştir. Toksisitedeki bu azalış sadece *A. niger*'e dayalı bir arıtım teknolojisinin geliştirilmesi için yeterli değildir ancak daha sonra yapılacak ko-metabolizmaya dayalı çalışmalar daha başarılı bir verebilir.

Diklofenak için ise *Funalia trogii* yıkım açısından en başarılı fungal kaynak olarak bulundu ve 24 saat içinde diklofenak ve yıkım ürünlerinin tamamen ortamdaki yok olduğu gösterildi. Ayrıca *F. trogii*'den elde edilen kaba lakkaz enziminin de diklofenak biyodegradasyonunda oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir. Yapılan MicroTox ve Rotox KitF toksisite testleri sonucu diklofenakın hem canlı hücre ile hem de kaba lakkaz ile yıkımında toksisitenin verimli bir şekilde azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak diyebiliriz ki *F. trogii* ve *F. trogii*'den elde edilen kaba lakkaz enzimi diklofenak gideriminde kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- [1] Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., T. Vicent, G. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR., *Chemosphere*, 78, 474–81, **2010**.
- [2] Fent, K., Weston, A., Caminada, D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, 76, 122–159, **2006**.
- [3] O. A. Jones, J. N. Lester, and N. Voulvoulis, Pharmaceuticals: a threat to drinking water?, *Trends Biotechnology*, 23, 163–167, **2005**.
- [4] Heberer, T., Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data," *Toxicology Letters*, 131, 5–17, **2002**.
- [5] Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T., Caminal, G., Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR, *Bioresource Technology*, 101, 2159–2166, **2010**.
- [6] Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*, *Chemosphere*, 74, 765–772, **2009**.
- [7] Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., Vicent, T., Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR, *Journal of Hazardous Materials*, 176, 836–42, **2010**.
- [8] Aydin, E., Talinli, I., Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey, *Chemosphere*, 90, 2004–12, **2013**.
- [9] Hollender, J., Singer, H., McArdell, C. S., Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle, (P. Hlavinek, O. Bonacci, J. Marsalek, and I. Mahrikova, Eds.) Dordrecht: Springer Netherlands, 103–116, **2008**.
- [10] Daughton, C. G., Non-regulated water contaminants: Emerging research, *Environmental Impact Assessment Review*, 24, 711–732, **2004**.
- [11] Yang, W., Zhou, H., Cicek, N., Treatment of Organic Micropollutants in Water and Wastewater by UV-Based Processes: A Literature Review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44, 1443–1476, **2014**.
- [12] Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barcelo, D., Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options, *Journal of Hydrology*, 389, 416–428, **2010**.

- [13] Baker, D. R., Očenášková, V., Kvicalova, M., Kasprzyk-Hordern, B., Drugs of abuse in wastewater and suspended particulate matter - Further developments in sewage epidemiology, *Environment International*, 48, 28–38, **2012**.
- [14] Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X. C., A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Science of the Total Environment*, 473–474, 619–641, **2014**.
- [15] Renge, V., Khedkar, S., Bhoysar, M., Micropollutant Removal From Waste Water Treatment Plant-a Review, *Technicaljournalsonline.com*, **2012**.
- [16] Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442–448, **2011**.
- [17] Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., Flick, R. W., Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8897–8901, **2007**.
- [18] Staples, C., Dom, P. B., Klecka, G. M., Sandra, T. O., Harris, L. R., A review of the environmental fate, effects, and exposures of Bisphenol A, *Chemosphere*, 36, 2149–2173, **1998**.
- [19] Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T., A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal, *Desalination*, 238, 229–246, **2009**.
- [20] Howdeshell, K. L., Hotchkiss, K., Thayer, K., Vandenberg, J. G., vom Saal, F. S., Exposure to bisphenol A advances puberty, *Nature*, 401, 763–764, **1999**.
- [21] Johnson, D. R., Czechowska, K., Chevre, N., Van Der Meer, J. R., Toxicity of triclosan, penconazole and metalaxyl on *Caulobacter crescentus* and a freshwater microbial community as assessed by flow cytometry, *Environmental Microbiology*, 11, 1682–1691, **2009**.
- [22] A. B. Dann and A. Hontela, “Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action,” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 31, no. 4, pp. 285–311, **2011**.
- [23] Seinen, W., Lemmen, J. G., Pieters, R. H., Verbruggen, E. M., Van der Burg, B., AHTN and HHCb show weak estrogenic — but no uterotrophic activity, *Toxicology Letters*, 111, 161–168, **1999**.
- [24] Schreurs, R., Transcriptional Activation of Estrogen Receptor ER α and ER β by Polycyclic Musks Is Cell Type Dependent, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 183, 1–9, **2002**.
- [25] Kagle, J., Porter, A. W., Murdoch, R. W., Rivera-Cancel, G., Hay, A. G., *Biodegradation of pharmaceutical and personal care products.*, 1st ed., vol. 67, no. 08. Elsevier Inc., 2009.

- [26] Kümmerer, K., Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review, *Chemosphere*, 45, 957–69, **2001**.
- [27] Isidori, M., Lavorogna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L., Rubino, M., Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products, *Science of the Total Environment*, 348, 93–101, **2005**.
- [28] Saygı, Ş., Battal, D., Şahin, N. Ö., “Çevre ve insan sağlığı yönünden ilaç atıklarının önemi, *Marmara Pharmaceutical Journal* , 4, 82–90, **2012**.
- [29] la Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 991–1007, **2008**.
- [30] Boxall, A. B. A., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J. P., Verslycke, T., Ankley, G. T., Beazley, K. F., Belanger, S. E., Berninger, J. P., et al., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?, *Environment. Health Perspective*, 120, 1221–1229, **2012**.
- [31] Benner, J., Helbling, D. E., Kohler, H.-P. E., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C., Ternes, T. A., Albers, C. N., Aamand, J., Horemans, B., Springael, D. Walravens, E., Boon, N., Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes?, *Water Research*, 47, 5955–76, **2013**.
- [32] T. Heberer, Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water, *Journal of Hydrology*, 266, 175–189, **2002**.
- [33] Zwiener, C., Glauner, C., Frimmel, F. H. Biodegradation of pharmaceutical residues investigated by SPE-GC/ITD-MS and on-line derivatization, *Hrc-Journal High Resolution Chromatography*, 23, 474–478, **2000**.
- [34] Lala, L. G., D’Mello, P. M., Naik, S. R., HPTLC determination of diclofenac sodium from serum, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 29, 539–544, **2002**.
- [35] Richard, J., Boergers, A., vom Eyser, C., Bester, K., Tuerk, J., Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217, 506–514, **2014**.
- [36] Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H., Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant., *Water Research.*, 41, 4373–82, **2007**.
- [37] Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment, *Water Research*, 39, 4790–4796, **2005**.

- [38] Benotti, M. J., Trenholm, R., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, D. D. Snyder, S., Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water., *Environmental Science Technology*, 43, 597–603, **2009**.
- [39] Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H. C., Andersen, H. R., Ingerslev, F., Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 63–65, **2000**.
- [40] Brain, R., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R., Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 371–382, **2004**.
- [41] Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., Solomon, M., La Point, T. W., Aquatic ecotoxicology of fluoxetine, *Toxicology Letters*, 42, 169–183, **2003**.
- [42] Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environmental Science and Technology*, 37, 1241–1248, **2003**.
- [43] Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, 413–419, **2005**.
- [44] Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1344–1354, **2004**.
- [45] Pascoe, D., Karntanut, W., Müller, C. T., Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*, *Chemosphere*, 51, 521–528, **2003**.
- [46] Henschel, K. P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A., Environmental hazard assessment of pharmaceuticals., *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 25, 220–225, **1997**.
- [47] Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T., Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients, *Science of the Total Environment*, 364, 67–87, **2006**.
- [48] Länge, R., Hutchinson, T. H., Croudace, C. P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G. H., Sumpter, J. P., Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1216–1227, **2001**.

- [49] Parrott, J. L., Blunt, B. R., "Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males," *Environmental Toxicology*, vol. 20, no. 2, pp. 131–141, **2005**.
- [50] Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C. R., "Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish," *Environmental Health Perspective*, vol. 112, no. 17, pp. 1725–1733, **2004**.
- [51] Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D., "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout," *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no. 2, pp. 141–150, **2004**.
- [52] Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., a Rideout, B., Shivaprasad, H. L., Ahmed, S., Chaudhry, M. J. I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A. A., "Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan.," *Nature*, vol. 427, no. February, pp. 630–633, **2004**.
- [53] Huggett, D. B., Brooks, B. W., Peterson, B., Foran, C. M., Schlenk, D., "Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms," *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 43, no. 2, pp. 229–235, **2002**.
- [54] Mimeault, C., Woodhouse, A. J., Miao, X. S., Metcalfe, C. D., Moon, T. W., Trudeau V. L., "The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*," *Aquatic Toxicology*, vol. 73, no. 1, pp. 44–54, **2005**.
- [55] Weinberger J., Klaper, R., "Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow)," *Aquatic Toxicology*, vol. 151, pp. 77–83, **2014**.
- [56] Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Hurd, K. S., Sherren, A., Stanley, R. D., Tyler, C. R., "Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development," *Aquatic Toxicology*, vol. 70, no. 1, pp. 11–21, **2004**.
- [57] Caminada, D., Escher, C., and Fent, K., "Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines.," *Aquatic Toxicology*, vol. 79, no. 2, pp. 114–23, Aug. **2006**.
- [58] Laville, N., Ait-Aissa, Gomez, S., E., Casellas, C., Porcher, J. M., "Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes," *Toxicology*, vol. 196, no. 1–2, pp. 41–55, **2004**.

- [59] Cunningham, V. L., Binks, S. P., and Olson, M. J., "Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 53, no. 1, pp. 39–45, **2009**.
- [60] Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., Calamari, D., "Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells," vol. 40, no. 7, pp. 2442–2447, **2006**.
- [61] Hectors, T. L. M., Vanparys, C., Van Der Ven, K., Martens, G. A., Jorens, P. G., Van Gaal, L. F., Covaci, A., De Coen, W. Blust, R., "Environmental pollutants and type 2 diabetes: A review of mechanisms that can disrupt beta cell function," *Diabetologia*, vol. 54, no. 6, pp. 1273–1290, **2011**.
- [62] Celiz, M. D., Tso, J., Aga, D. S., "Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 28, no. 0730–7268 (Print), pp. 2473–2484, **2009**.
- [63] Danielson, B. S. P. P.B., "The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans," *Current Drug Metabolism*, vol. 3, no. 6, pp. 561–597, **2002**.
- [64] Ogilvie, B. W., Zhang, D., Li, W., Rodrigues, A. D., Gipson, A. E., Holsapple, J., Toren, P. Parkinson, A. "Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: Implications for drug-drug interactions," *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 34, no. 1, pp. 191–197, **2006**.
- [65] Vanderford, B. J., Snyder, S. A., "Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry," *Environmental Science and Technology*, vol. 40, no. 23, pp. 7312–7320, **2006**.
- [66] Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., Lewis, R. J., "Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, no. 2, pp. 464–469, **2005**.
- [67] Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., and Hühnerfuss, H., "Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites," *Chemosphere*, vol. 56, no. 6, pp. 583–592, **2004**.
- [68] Zuehlke, S., Duennbier, U., Heberer, T. "Investigation of the behavior and metabolism of pharmaceutical residues during purification of contaminated ground water used for drinking water supply," *Chemosphere*, vol. 69, no. 11, pp. 1673–80, Nov. **2007**.
- [69] Batt, A. L., Kostich, M. S., Lazorchak, J. M., "Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS," *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 13, pp. 5021–5030, **2008**.

- [70] Zhang, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Zhang, T., Ye, M., "Heterogeneous oxidation of naproxen in the presence of α -MnO₂ nanostructures with different morphologies," *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 127, pp. 182–189, Oct. **2012**.
- [71] Ternes, T. A., Kreckel, P., and Mueller, J., "Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge," *Science of Total Environment*, vol. 225, no. 1–2, pp. 91–99, **1999**.
- [72] Matějček, D., Houserová, P., Kubáň, V., "Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments," *Journal of Chromatography. A*, vol. 1171, no. 1–2, pp. 80–89, **2007**.
- [73] Snyder, S. A., Adham, S., Redding, A. M., Cannon, F. S., DeCarolis, Oppenheimer J., J., Wert, E. C., Yoon, Y., "Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals," *Desalination*, vol. 202, no. 1–3, pp. 156–181, Jan. **2007**.
- [74] Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E., "Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes," *Environmental Science and Technology*, vol. 39, no. 17, pp. 6649–6663, **2005**.
- [75] Adams, C., Wang, Y., Loftin, K., Meyer, M., "Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes," *Journal of Environmental Engineering*, vol. 128, no. 3, pp. 253–260, **2002**.
- [76] Bedner, M. and MacCrehan, W. A., "Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and N-acetyl-p-benzoquinone imine," *Environmental Science and Technology*, vol. 40, no. 2, pp. 516–522, **2006**.
- [77] Huber, M. M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler D, McArdell C. S., Ried A., Siegrist H., Ternes, T. A., U Von Gunten., "Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study," *Environmental Science and Technology*, vol. 39, no. 11, pp. 4290–4299, **2005**.
- [78] Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T., Dezotti M., "Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 149, no. 3, pp. 631–642, **2007**.
- [79] Oller, I., Malato, S., Sánchez-Pérez, J. A., "Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review.," *Science of the Total Environment*, vol. 409, no. 20, pp. 4141–66, Sep. **2011**.

- [80] Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Göbel, A., McArdel, C. S. I, Ternes, T., Siegrist, H., "Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment.," *Water Research.*, vol. 39, no. 14, pp. 3139–52, Sep. **2005**.
- [81] Jain, N. A. "Spectrophotometric Determination of Naproxen and Esomeprazole In A Laboratory Mixture By Simultaneous Equation , Absorption Correction , Absorption Ratio," vol. 2, no. 5, pp. 130–134, **2011**.
- [82] Zhong, D.F., Sun, L., Liu, L., Huang, H. H., "Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species.," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 24, no. 5, pp. 442–7, May **2003**.
- [83] Grenni, P., Patrolecco, L., Ademollo, N., Tolomei, A., Barra, Caracciolo A., "Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem," *Microchemical. Journal*, vol. 107, pp. 158–164, **2013**.
- [84] Zhao, X., Qu, J., Liu, H., Qiang, Z., Liu, R., Hu, C., "Photoelectrochemical degradation of anti-inflammatory pharmaceuticals at Bi₂MoO₆-boron-doped diamond hybrid electrode under visible light irradiation," *Applied Catalysis. B Environment*, vol. 91, no. 1–2, pp. 539–545, Sep. **2009**.
- [85] DellaGreca, M., Brigante, M., Isidori, M., Nardelli, A., Previtiera, L., Rubino M., Temussi F., "Phototransformation and ecotoxicity of the drug Naproxen-Na," *Environmental Chemistry Letters.*, vol. 1, no. 4, pp. 237–241, Apr. **2003**.
- [86] Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., Müller S. R., "Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters," *Environmental Science Technology*, vol. 37, no. 6, pp. 1061–1068, **2003**.
- [87] Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A, Previtiera, L., Rubino, M., "Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products," *Science of the Total Environment*, vol. 348, no. 1–3, pp. 93–101, Sep. **2005**.
- [88] Zhang, Y., Geissen S.-U., and C. Gal, "Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies.," *Chemosphere*, vol. 73, no. 8, pp. 1151–61, Nov. **2008**.
- [89] Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermay, H., Negele, R. D, "Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout.," *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no. 2, pp. 141–50, Jun. **2004**.
- [90] Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., Van Dijck, P. W. M., "On the safety of *Aspergillus niger*--a review.," *Applied Microbiology and Biotechnology.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 426–35, Aug. **2002**.
- [91] Roukas, T., "Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.*, vol. 25, no. 6, pp. 298–304, **2000**.

- [92] Pazouki, M. and Panda, T., "Recovery of citric acid - A review," *Bioprocess Engineering*, vol. 19, no. 6, pp. 435–439, **1998**.
- [93] Cihangir, N. and Sarikaya, E., "Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp.," *World Journal of Microbiology Biotechnology*, vol. 20, no. 2, pp. 193–197, **2004**.
- [94] Pariza, M. W. and Johnson, E. A., "Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century.," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 33, no. 2, pp. 173–86, **2001**.
- [95] Sharma, S., Banerjee, Choudhury, K., P. P., "Degradation of chlorimuron-ethyl by *Aspergillus niger* isolated from agricultural soil.," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 337, no. 1, pp. 18–24, Dec. **2012**.
- [96] Boschini, G., D'Agostina, A., Arnoldi, A., Marotta, E., Zanardini, E., Negri M., Valle A., Sorlini C., "Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by *Aspergillus niger* in laboratory conditions.," *Journal of Environmental Science and Health. B.*, vol. 38, no. 6, pp. 737–46, Nov. **2003**.
- [97] Bhalerao, T. S. and Puranik, P. R., "Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*," *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 59, no. 4, pp. 315–321, Jun. **2007**.
- [98] Pointing, S. B., "Feasibility of bioremediation by white-rot fungi," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no. 1–2, pp. 20–33, Oct. **2001**.
- [99] Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K. T., Hatakka, A., Hofrichter, M., "Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*," *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 69, no. 5, pp. 573–579, **2006**.
- [100] Hammel, K., "Fungal degradation of lignin," *Driven by Nat. plant litter Qual. decomposition.*, pp. 33–45, **1997**.
- [101] Reddy, C., "The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants," *Current Opinion in. Biotechnology*, 6, 320–328, **1995**.
- [102] Fernando, T., Bumpus, J., Aust, S., "Biodegradation of TNT (2, 4, 6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl. Environ.* 56, 6, 1666–1771, **1990**.
- [103] Bayman, P., Ritchey, S. D., Bennett, J. W., "Fungal interactions with the explosive RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine)," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 15, 418–423, **1995**.
- [104] Valli, K., Wariishi, H., Gold M. H., "Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-Dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Journal of Bacteriology*, 174, 2131–2137, **1992**.
- [105] Mougín, C., Laugero, C., Asther, M., Chaplain, V., "Biotransformation of s-triazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*," *Journal of Pesticide Science*, vol. 49, no. 2, pp. 169–177, **1997**.

- [106] Ning, D. and Wang, H., "Involvement of Cytochrome P450 in Pentachlorophenol Transformation in a White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, **2012**.
- [107] Yadav, J. S., Quensen, J. F., Tiedje, J. M., C. Reddy, A., Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2560–2565, **1995**.
- [108] Michel, F. C. , Dass S. B., E. A. Grulke, Reddy C. A., Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent," *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2368–2375, **1991**.
- [109] Jaspers, C. J., Jimenez G., Penninckx M. J., Evidence for a role of manganese peroxidase in the decolorization of Kraft pulp bleach plant effluent by *Phanerochaete chrysosporium*: Effects of initial culture conditions on enzyme production, *Journal of Biotechnology*, 37, 229–234, **1994**.
- [110] Paszczynski, A. M., Pasti-Grigsby B., Goszczynski S., Crawford R. L., Crawford D. L., Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3598–3604, **1992**.
- [111] Birhanli E. and Yesilada O., Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode," *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1286–1293, Oct. **2006**.
- [112] Yesilada, O. Sik S., and Sam M., "Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: Effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 37–42, **1998**.
- [113] Park C., Lee M., Lee, B. Kim S. -W., Chase H. A., Lee J., Kim S., "Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia trogii*," *Biochemical. Engineering Journal*, 36, 59–65, **2007**.
- [114] Arica M. Y., Bayramoğlu G., Yilmaz M., S. Bektaş, Genc O., "Biosorption of Hg²⁺, Cd²⁺, and Zn²⁺ by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia trogii*," *Journal of Hazardous Materials*, 109, 191–199, **2004**.
- [115] Spencer, J., Ragout de Spencer A., Laluece C. , "Non-conventional yeasts," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 58, no. 2, pp. 147–156, **2002**.
- [116] Goncalves F. A. G., Colen G., Takahashi J. A., *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry, *The Scientific World Journal*, vol. 2014, **2014**.
- [117] Jain M. R., Zinjarde S. S., Deobagkar D. D., Deobagkar D. N., 2,4,6-trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589., *Marine Pollution Bulletin*, 49, 783–8, Nov. **2004**.

- [118] Aracagok Y. D. and Cihangir N., Decolorization of Reactive Black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658, *American Journal of Microbiological Research*, vol. 1, no. 2, pp. 16–20, Apr. **2013**.
- [119] Margesin R. and Schinner F., “Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 47, no. 4, pp. 462–468, **1997**.
- [120] Crešnar B. and Petrič S., “Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1814, no. 1, pp. 29–35, Jan. **2011**.
- [121] Lepesheva, G. I. and Waterman M. R., “Sterol 14-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms,” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1770, no. 3. pp. 467–477, **2007**.
- [122] Van Den Brink ,H. J. M., Van Gorcom R. F. M., Van Den Hondel C. A. M. J. J., Punt P. J., “Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi,” vol. 17, pp. 1–17, **1998**.
- [123] Mahato, S. B. and Majumda I. r, “Current trends in microbial steroid biotransformation,” *Phytochemistry*, vol. 34, no. 4. pp. 883–898, **1993**.
- [124] Launen L., Pinto L., Wiebe C., Kiehlmann E., Moore M., “The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi,” *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 41, no. 6, pp. 477–88, **1995**.
- [125] Maciel, M . J. M., Castro e Silva, A., Ribeiro, H. C. T., “Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review,” *Electron. Journal of Biotechnology*, vol. 13, no. 6, pp. 1–13, **2010**.
- [126] Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F. J., Alcalde M., “Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications,” *Applied Microbiology*, pp. 233–245, **2007**.
- [127] K. Yapisi, İ. T. İ. K. Katal, M. Üniversitesi, F. Fakültesi, and B. Bölümü, “Laccase , Part 1 : Structure , Catalytic Properties and Distributions,” vol. 22, no. 2009, pp. 19–63, **2010**.
- [128] Minussi ,R. C., Pastore, G. M., Durán, N., “Potential applications of laccase in the food industry,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 13, no. 6–7. pp. 205–216, **2002**.
- [129] Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K., “Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs,” *Journal Cereal Science*, vol. 43, no. 2, pp. 152–159, **2006**.
- [130] Ferry, Y. and Leech, D., “Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode,” *Electroanalysis*, vol. 17, no. 2, pp. 113–119, **2005**.
- [131] Williamson, P. R., “Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 2, no. 19, pp. e99–e107, **1997**.

- [132] Chairin, T., Nitheranont, T., Watanabe, A., Asada, Y., Khanongnuch C., Lumyong S., "Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *trametes polyzona*," *Applied Biochemisrty and Biotechnology*, vol. 169, no. 2, pp. 539–545, **2013**.
- [133] Hublik, G. and Schinner, F., "Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 27, no. 3–5, pp. 330–336, **2000**.
- [134] Niku-Paavola, M. L. and Viikari, L., "Enzymatic oxidation of alkenes," *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, vol. 10, no. 4, pp. 435–444, **2000**.
- [135] Abadulla, E., Tzanov, T. Costa, S. K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo, and G. M. Gubitz, "Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 8, pp. 3357–3362, **2000**.
- [136] Bourbonnais R. and Paice M. G., "Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation.," *FEBS Lett.*, vol. 267, no. 1, pp. 99–102, Jul. **1990**.
- [137] Majidi D. and Aksöz N., "Stability of Tyrosinase Enzyme from *Funalia Trogii*," *Am. J. Microbiol. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–3, **2013**.
- [138] D. S. Arora and P. K. Gill, "Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, no. 7–8, pp. 602–605, **2001**.
- [139] S. Camarero, S. Sarkar, F. J. Ruiz-Dueñas, M. J. Martinez, and Angel T. Martinez, "Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 15, pp. 10324–10330, **1999**.
- [140] Matin, A. A., Farajzadeh M. A., Jouyban A., "A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations," *Farmaco*, vol. 60, no. 10, pp. 855–858, **2005**.
- [141] Gao, D., Du L., Yang J., Wu W.-M., Liang H., "A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control.," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 30, no. 1, pp. 70–77, Mar. **2010**.
- [142] Hata, T., Kawai S., Okamura H., Nishida T., "Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation," *Biodegradation*, vol. 21, no. 5, pp. 681–689, **2010**.
- [143] Borràs, E., Llorens-Blanch G., Rodríguez-Rodríguez C. E., Sarrà M., Caminal G., "Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: Substrate selection and naproxen degradation," *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 65, no. 6, pp. 846–852, Sep. **2011**.

- [144] Eibes, G., Debernardi G., Feijoo G., Moreira M. T., Lema J. M., "Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase.," *Biodegradation*, vol. 22, no. 3, pp. 539–50, Jun. **2011**.
- [145] Rodarte-Morales, A. I., Feijoo G., Moreira M. T., Lema J. M., "Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 27, no. 8, pp. 1839–1846, **2011**.
- [146] Wojcieszńska, D., Domaradzka D., Hupert-Kocurek K., Guzik U., "Bacterial degradation of naproxen--undisclosed pollutant in the environment.," *Journal of Environmental Management*, vol. 145, pp. 157–61, Dec. **2014**.
- [147] Domaradzka, D., Guzik U., Hupert-Kocurek K., and Wojcieszńska D., "Cometabolic Degradation of Naproxen by *Planococcus* sp. Strain S5.," *Water Air Soil Pollution*, vol. 226, no. 9, p. 297, **2015**.
- [148] Lin, B., J. Lyu, X. Lyu, H. Yu, Z. Hu, J. C. W. Lam, and P. K. S. Lam, "Characterization of cefalexin degradation capabilities of two *Pseudomonas* strains isolated from activated sludge.," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 282, pp. 158–64, Jan. **2015**.
- [149] Rao, J. . and Viraraghavan T., "Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass," *Bioresource Technology*, vol. 85, no. 2, pp. 165–171, Nov. **2002**.
- [150] Fu, Y. and Viraraghavan T., "Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*," *Advance Environmental Research*, vol. 7, no. 1, pp. 239–247, Nov. **2002**.
- [151] Gauthier, H., Yargeau V., Cooper D. G., "Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism.," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 7, pp. 1701–6, Mar. **2010**.
- [152] Sádecká, J. and Netriová J., "Determination of Naproxen and its Metabolite, 6-O-Desmethylnaproxen, in Human Urine by Capillary Isotachopheresis," *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, vol. 28, no. 18, pp. 2887–2894, **2005**.
- [153] Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo M., Blaquez P., Vicent T., CaminaG. I., "Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 7, pp. 2159–2166, **2010**.
- [154] Hea, A., and Rosazza J. P. N., "Microbial transformations of S-naproxen by *Aspergillus niger* ATCC 9142," *Pharmazie*, vol. 58, no. 6, pp. 420–422, Jun. **2003**.
- [155] Davies, N. M. and Anderson K. E., "Clinical pharmacokinetics of naproxen.," *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 32, no. 4, pp. 268–293, **1997**.

- [156] Miners J. O., Coulter S., Tukey R. H., Veronese M. E., Birkett D. J., "Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen," *Biochemical Pharmacology*, vol. 51, no. 8, pp. 1003–1008, **1996**.
- [157] van den Brink H. M., van Gorcom, R. F. van den Hondel C. A., and P. J. Punt, "Cytochrome P450 enzyme systems in fungi," *Fungal Genetics Biology*, vol. 23, pp. 1–17, **1998**.
- [158] Mingot, J. M., Peñalva M. A., Fernández-Cañón J. M., "Disruption of phacA, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 21, pp. 14545–14550, **1999**.
- [159] Faber, B., W., van Gorcom, R. F., a Duine, J., "Purification and characterization of benzoate-para-hydroxylase, a cytochrome P450 (CYP53A1), from *Aspergillus niger*," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 394, no. 2, pp. 245–254, **2001**.
- [160] Shehu, K. and Bello, M. T. "Effect of Environmental Factors on the Growth of *Aspergillus* Species Associated with Stored Millet Grains in Sokoto . Abstract: Fungi constitute a major problem in the storage of agricultural products especially cereals . In the present study , the effect of environmental factors on the growth of *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*., 19, 218–223, **2011**.
- [161] Alborch, L., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Cabanes, F. J., Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels," *International Journal of Food Microbiology*, 147, 53–57, **2011**.
- [162] Ye, J. S., Yin, H. J., Qiang, H. Peng, H. M. Qin, N. Zhang, and B. Y. He, "Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*," *Journal of Hazardous Materials*, 185, 174–181, **2011**.
- [163] Parshetti, G. K., Kalme, S. D., Gomare, S. S., Govindwar, S. P., Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146, *Bioresource Technology*, 98, 3638–3642, **2007**.
- [164] Karatay, S. E. and Dönmez, G., "An economical phenol bioremoval method using *Aspergillus versicolor* and agricultural wastes as a carbon source," *Ecol. Eng.*, vol. 73, pp. 224–228, Dec. **2014**.
- [165] Ye, J. S., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H. M., Zhang, N., He B. Y., "Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*," *Journal of Hazardous Materials*, 185, 174–181, **2011**.
- [166] Kaynak, M. S. and Şahin, S., A new Hplc approach for determination of in-vitro solubility of naproxen sodium," *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 28, 49–62, **2008**.
- [167] Johannes, C. and Majcherczyk, A., Laccase activity tests and laccase inhibitors, *Journal of Biotechnology*, 78, 193–199, **2000**.

- [168] Arica, M. Y., Arpa, C., Kaya, B., Bektaş, S., Denizli, A., Genç, O., Comparative biosorption of mercuric ions from aquatic systems by immobilized live and heat-inactivated *Trametes versicolor* and *Pleurotus sajur-caju*, *Bioresource Technology*, 89, 145–154, **2003**.
- [169] Domaradzka, D., Guzik, U., Wojcieszynska, D., Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14, 229–239, **2015**.
- [170] Langenhoff, A., Inderfurth, N., Veuskens, T., Schraa, G., Blokland, M., Kujawa-Roeleveld, K., Rijnaarts, H., Microbial removal of the pharmaceutical compounds ibuprofen and diclofenac from wastewater, *Biomed Research International*, 2013, **2013**.
- [171] Leemann, T., Transon, C., Dayer, P., Cytochrome P450TB (CYP2C): A major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver," *Life Science*, 52, 29–34, **1993**.
- [172] Osorio-Lozada, A., Surapaneni, S., Skiles, G. L., Subramanian, R., Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: Case study of diclofenac metabolism by actinoplanes species, *Drug Metabolism and Disposition*, 36, 234–240, **2008**.
- [173] Gröning, J., Held, C., Garten, C., Claußnitzer, U., Kaschabek, S. R., Schlömann, M., Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate, *Chemosphere*, 69, 509–516, **2007**.
- [174] Webster, R., Pacey, M., Winchester, T., Johnson, P., Jezequel, S., Microbial oxidative metabolism of diclofenac: production of 4'-hydroxydiclofenac using *Epiccocum nigrum* IMI354292., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 371–376, **1998**.
- [175] Barr, D. P. and Aust, S. D., Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants," *Environmental Science and Technology*, 28(2), 78A–87A, **1994**.
- [176] Tran, N. H., Urase, T., Kusakabe, O., "Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase," *Journal of Water and Environment Technology*, 8, 125–140, **2010**.
- [177] Lloret, L., Eibes, G., Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M., Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens, *Biochemical Engineering Journal*, 51, no. 3, 124–131, **2010**.
- [178] Bort, R., Mace, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M., Pfeifer J., A., Castell, J., Hepatic metabolism of diclofenac: Role of human CYP in the minor oxidative pathways, *Biochemical Pharmacology*, 58, 787–796, **1999**.
- [179] Deveci, T., Unyayar, A., Mazmanci, M. A., Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800, *Journal of Molecular Catalysis B Enzyme*, 30, 25–32, **2004**.

- [180] Mazmanci, M. A. and Unyayar, A., "Decolorization efficiency of *Funalia trogii* under static condition: Effect of C: N ratios," *African Journal of Biotechnology*, 9, 6539–6544, **2010**.
- [181] Park, C., Lim, J. S., Lee, Y., Lee, B., Kim, S. W., Lee, J., Kim, S., Optimization and morphology for decolorization of reactive black 5 by *Funalia trogii*, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1758–1764, **2007**.
- [182] Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V., Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01, 208–215, **2010**.
- [183] Sathishkumar, P., Mythili, A., Hadibarata, T., Jayakumar, R., Kanthimathi, M. S., Palvannan, T., Ponraj, M., Salim, M. R., Mohd Yusoff, A. R., "Laccase mediated diclofenac transformation and cytotoxicity assessment on mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 23, p. 11689, **2014**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Yusuf Doruk ARACAGÖK
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Bekar
E-posta : doruk@hacettepe.edu.tr
Adresi : Kennedy Cad. Barbaros Mah. Çankaya/Ankara

Eğitim

Lise : Kılıç Arslan Süper Lisesi
Lisans : Hacettepe Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce (İyi)

İş Deneyimi : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2008)

Deneyim Alanları : Çevre Biyoteknolojisi

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi:

Mikro Kirlenici Bazı İlaç Kalıntılarının Fungal Kaynaklar İle Biyodegradasyonu.
Yönetici: Cihangir Nilüfer, Hacettepe BAP. Koordinasyon Birimi (17600 TL)

Ağrı Kesici Diclofenac Etkin Maddesinin Fungal Kaynaklar ile Biyoyıkımının Araştırılması (FHD-2015-5642). Yönetici: Cihangir Nilüfer. Hacettepe BAP. Koordinasyon Birimi (13900 TL)

Mikro Kirlenici Bazı İlaçların Fungal Kaynaklar İle Biyodegradasyonun Araştırılması(FDK-2016-11318). Yönetici Nilüfer Cihangir. Hacettepe BAP. Koordinasyon birimi

Tezden Üretilmiş Yayınlar:

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

Yusuf Doruk Aracagök, Hakan Göker, Nilüfer Cihangir. 'Biodegradation of naproxen by *Aspergillus niger* and identification of some intermediates', European Biotechnology Congress 2013. (Sözlü sunum)

Yusuf Doruk Aracagök, Hakan Göker, Nilüfer Cihangir. 'Degradation of naproxen by a selected fungal strain'. FEMS 2015. Maastricht, Hollanda. (Poster)

