

TC
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Phanerochaete chrysosporium'UN ANTIOKSİDATİF SİSTEMİ ÜZERİNE
ASTRAZON KIRMIZI FBL TEKSTİL BOYASININ ETKİSİ

ÖZLEM DEMİRCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
KASIM 2006

Tezin Başlığı: *Phanerochaete chrysosporium*'UN ANTİOKSİDATİF SİSTEMİ
ÜZERİNE ASTRAZON KIRMIZI FBL TEKSTİL BOYASININ
ETKİSİ

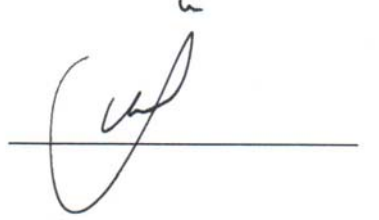
Tezi Hazırlayan: **Özlem DEMİRCİ**

Sınav Tarihi: 08 Kasım 2006

Yukarıda adı geçen tez Jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Murat ÖZMEN (İnönü Üniv.)



Yrd. Doç. Dr. Dilek ASMA (İnönü Üniv.)



Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ (İnönü Üniv.)



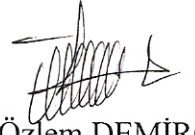
Yrd. Doç. Dr. Dilek Asma
Tez Danışmanı

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Ali Şahin
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum “*Phanerochaete chrysosporium*’ un Antioksidatif Sistemi Üzerine Astrazon Kırmızı FBL Tekstil Boyasının Etkisi” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Özlem DEMİRCİ

ÖZET

Yüksek lisans tezi

Phanerochaete chrysosporium'UN ANTİOKSİDATİF SİSTEMİ ÜZERİNE ASTRAZON KIRMIZI FBL TEKSTİL BOYASININ ETKİSİ

Özlem Demirci

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

53+ ix sayfa

2006

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Dilek Asma

Çevre kirliliği, zarar derecesi bakımından, belki bütün dünyada en temel ekolojik sorunlardan biridir. Bu sorunun ortaya çıkıp gelişmesinde en büyük etken, son 40-50 yıl içinde yaşadığımız hızlı teknolojik gelişimlerdir. Birçok kirletici madde kontrolsüz bir şekilde doğal kaynaklara bırakılmaktadır. Bu nedenle tüm canlılar çeşitli ksenobiyotik ya da toksik maddelere maruz kalmaktadır. Bu maddelerden bazıları da tekstil boyalarıdır. Tekstil boyalarının biyodegradasyonu sonucunda oluşan metabolitler kanserojenik, mutajenik ya da toksik olabilmektedir.

Canlıların katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerden oluşan antioksidan savunma sistemi bu ksenobiyotik ve toksik maddelerden korunabilmede de işlev görmektedir. Bu enzimler hücrede oluşan oksidatif stresin güçlü belirteçleridir.

Bu çalışmada Astrazon Kırmızı tekstil boyasının farklı konsantrasyonlarının üremenin farklı dönemlerindeki *Phanerochaete chrysosporium* üzerindeki etkisi ve antioksidan sistemin nasıl etkilendiğini araştırılmıştır ve CAT, GST, GR enzimlerinin aktivitelerindeki ve total GSH seviyesindeki değişimler belirlenmiştir. Düşük konsantrasyon (20 ppm) boya uygulamasının erken dönemlerinde CAT, GST ve GR aktivitesinde ve GSH seviyesinde bir yükselme geç evresinde ise bir inhibisyon belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyon (50 ppm) boya uygulamasının erken ve geç safhasında enzim aktiviteleri ve total GSH seviyesinde inhibisyon tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Tekstil boya kirliliği, antioksidan enzimler, astrazon kırmızı,

Phanerochaete chrysosporium

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECT OF ASTRAZONE RED FBL TEXTILE DYES ON ANTIOXIDATIVE SYSTEM OF *Phanerochaete chrysosporium*

Özlem Demirci

Inönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

53 + ix pages

2006

Supervisor: Asist. Prof. Dilek Asma

Environmental pollution, in respect of its level of harm, is perhaps one of the most important basic problems in all over the world. The most important factor which has enhanced this problem is the technological advancements that we have in the last 40-50 years. A numerous amount of polluting substances are disposed to natural resources in an uncontrolled manner. Due to this, all livings have been subjected to different “xenobiotic” or toxic substances. And some of these substances are textile dyes. Metabolites, formed as a result of biodegradation of textile paints can be carcinogenic, mutagenic or toxic materials.

Antioxidant protection system, made up of enzymes of the living such as catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), has function for protection from these xenobiotic and toxic materials as well. These enzymes are the strong biomarkers of oxidative stress formed in cell.

In this work the effect of different concentrational of textile dyes on the different seasonal *Phanerochaete chrysosporium* and how antioxidant system is affected have been investigated and changes in CAT, GST, GR enzyme activities and in total level of GSH have been determined. An induction in CAT, GST and GR activity in the early phase of low concentration (20 ppm) paint application and GSH level, and an inhibition in the late phase have been determined. Enzyme activities in the early and late phase of high concentration (50 ppm) paint application and inhibition in total GSH level have been determined.

KEYWORDS: Textile dye pollution, antioxidant enzymes, astrazone red,

Phanerochaete chrysosporium

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde deneyimlerini ve değerli bilgileri benimle paylaşan sayın tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Dilek ASMA'ya;

Çalışmalarına fikir ve önerileriyle katkıda bulunan Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya;

Değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e ve Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye;

Çalışmalarım sırasında özverili yardımlarından dolayı Arş. Grv. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye, teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşan Arş. Grv. Elif APOHAN ve Arş. Grv. Seval CİNG'e;

Çalışmamın deney aşamasında desteğini esirgemeyen Arş. Grv. Gökhan DURMAZ'a;

Çalışmalarım boyunca bana maddi manevi olarak desteklerini esirgemeyen aileme;

Bu çalışmayı 2006/20 nolu proje olarak destekleyen İnönü Üniversitesi BAPB'ye

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Çevre ve Çevre Kirliliği.....	1
1.2. Su Kaynaklarındaki Tekstil Boyar Madde Kirliliği.....	1
1.3. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	4
1.4. Boya ve Boyaların Sınıflandırılması.....	5
1.4.1. Boya.....	5
1.4.2. Boyaların Sınıflandırılması.....	5
1.4.2.1. Boyaların Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması.....	6
1.4.2.2. Boyama Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....	6
1.4.2.3. Kimyasal Yapıya Göre Sınıflandırılması.....	7
1.5. Azo Boyalar.....	7
1.6. Serbest Oksijen Radikalleri.....	8
1.7. Antioksidan Savunma.....	12
1.8. Antioksidan Enzimler.....	13
1.8.1. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6).....	13
1.8.2. Glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18).....	14
1.8.3. Glutasyon Redüktaz (GSSGR, EC 1.6.4.2).....	15
1.9. Glutasyon (GSH, γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin).....	15
2. KAYNAK ÖZETİ	17
3. MATERYAL VE METOD	20
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	20
3.2. Çalışmada Kullanılan Boya.....	20
3.3. Çalışmada Kullanılan Organizma.....	20
3.4. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması.....	20
3.5. Fungusun Boyaya Maruz Kalması.....	21
3.6. Üretimin Başlangıcında Boya Eklenerek Fungus Üretimi.....	21
3.7. Fungus Üretiminin Belirli Boya Eklenmesi ve Üretilmesi.....	21
3.8. Fungusların Uygulama Sonrası Alınması, Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifükasyonu.....	22
3.9. Enzimatik Çalışmalar.....	22
3.9.1. Katalaz Aktivitesinin Saptanması.....	22
3.9.2. Glutasyon S-Transferaz Aktive Tayini.....	23
3.9.3. Glutasyon Redüktaz Aktive Tayini.....	23
3.10. Redükte Glutasyon Miktar Tayini.....	24
3.11. Total Protein Miktarı.....	24
3.12. İstatistiksel Analiz.....	24
4. BULGULAR	26

4.1.	<i>P. chrysosporium</i> 'un Astrazon Kırmızı FBL'ye Maruz Bırakılması Sonucu Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri ve Glutasyon Miktar Değişimleri	26
4.1.1.	Katalaz Aktivitesi.....	26
4.1.2.	Glutasyon S-Transferaz Aktivisi.....	39
4.1.3.	Glutasyon Redüktaz Aktiviteleri.....	32
4.1.4	Total Glutasyon Seviyeleri.....	35
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	42
6.	KAYNAKLAR	47
7.	ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. C.I Basic Red 46.....	8
Şekil 1.2. Oksidatif Stres.....	9
Şekil 1.3. Antioksidan Enzimler.....	12
Şekil 1.4. Glutasyon sentezi döngüsü.....	16
Şekil 4.1. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı katalaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	27
Şekil 4.2. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı katalaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	28
Şekil 4.3. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı katalaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	29
Şekil 4.4. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutasyon s-transferaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	30
Şekil 4.5. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutasyon s-transferaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	31
Şekil 4.6. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutasyon s-transferaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	32
Şekil 4.7. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutasyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	33
Şekil 4.8. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutasyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	34
Şekil 4.9. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutasyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler.....	35

Şekil 4.10. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutatyon seviyesindeki değişimler.....	36
Şekil 4.11. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutatyon seviyesindeki değişimler.....	37
Şekil 4.12. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan <i>P. chrysosporium</i> 'da günlere bağlı glutatyon seviyesindeki değişimler.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. STB Besiyeri İçeriği.....	21
Çizelge 4.1. Üretimin 1. gününde 20 ppm ve 50 ppm Ast. Kır. boyasına maruz bırakılan <i>P. chrysosporium</i> 'da 2, 4, 8, 12, 16 ve 20. günlerde enzim aktivitesi (GST (nmol/dakika/mg protein), CAT (μmol/dakika/mg protein) (nmol/dakika/mg protein)) ve Total GSH (μmol/mg protein) düzeyindeki değişimler.....	39
Çizelge 4.2. Üretimin 2. gününde 20 ppm ve 50 ppm Ast. Kır. boyasına maruz bırakılan <i>P. chrysosporium</i> 'da 1. ve 5. günlerde enzim aktivitesi (GST mol/dakika/mg protein), CAT (μmol/dakika/mg protein), GR(nmol/dakika/mg protein)) ve Total GSH (μmol/mg protein) düzeyindeki değişimler.....	40
Çizelge 4.3. Üretimin 6. gününde 20 ppm ve 50 ppm Ast. Kır. boyasına maruz bırakılan <i>P. chrysosporium</i> 'da 1. ve 5. günlerde enzim aktivitesi (SOD, GST (nmol/dakika/mgprotein), CAT (μmol/dakika/mg protein), GR(nmol/dakika/mg protein) ve Total GSH (μmol/mg protein) düzeyindeki değişimler.....	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
GR	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon S-Transferaz
GPX	Glutasyon Peroksidaz
CDNB	1-kloro, 2-4 dinitrobenzen
DTNB	5-5' - dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit Radikali
1O_2	Singlet Oksijen
$HO^{\cdot-}$	Hidroksil Radikali
H_2O_2	Hidrojen Peroksit Radikali
SDB	Sabourout Dextrose Brouth
SDA	Sabourout Dextrose Agar
$LO^{\cdot-}$	Alkoksil Radikali
$LOO^{\cdot-}$	Peroksil Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksit
HOCl	Hipoklorik Asit
O_2^{2-}	Peroksi Anyonu

1.GİRİŞ

1.1.Çevre ve Çevre Kirliliği

Canlıların bulunduğu yerdeki fiziksel-kimyasal koşullar ve diğer canlılar bir canlının çevresini oluşturur [1]. Çevre kirliliği ise canlıların özelliklerini bozan yabancı maddelerin, hava, su ve toprağa yoğun bir şekilde karışması olayıdır. Kirlilik tek bir organizmanın zayıflamasına ya da ölümün neden olabileceği gibi populasyon ve ekosistem seviyesinde de olumsuz yönde etkili olabilir [2].

İnsanoğlu varoluşundan bu yana yaşadığı mekanı oluşturan doğadan çok yönlü olarak yararlı gelmiş, ancak bu ortam üzerindeki olumsuz etkisini 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra algılamaya başlamıştır. Zira bu tarihten sonraki hızlı nüfus artışı, aşırı kentleşme, endüstrileşme ve buna bağlı olarak hızlanan doğal kaynak kullanımı ve tüketimi gelişmişlik düzeyine bakılmaksızın tüm dünya ülkelerinde çevre sorunları olgusunu ortaya çıkarmıştır. Bu durum gelişmiş ülkelerin karşılaştıkları bir olay olmaktan çıkmış tüm insanlığı ilgilendiren bir boyut kazanmıştır.

1.2 Su Kaynaklarındaki Tekstil Boyar Madde Kirliliği

Su, doğal yaşamın sürdürülebilirliği için çok önemlidir. Bu nedenle son yıllarda su kirliliğinin kontrolü büyük önem kazanmıştır. Su Kirliliği, su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi şeklinde gözlenen ve doğrudan veya dolaylı yoldan biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, balıkçılıkta, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde ve enerji akıntılarının boşaltılması olarak tanımlanabilir [3].

Atık sular, evsel lağım suları veya endüstriyel işlemlerden kaynaklanan materyaller olup, toplum sağlığına etkileri ve estetik faktörlerden dolayı arıtılmadan göl ve akarsulara boşaltılmamalıdır. Sudaki istenmeyen ve toksik maddeler ya uzaklaştırılmalı ya da zararsız hale dönüştürülmelidir. Kil, silt ve diğer kalıntılar kimyasal ve fiziksel metotlarla uzaklaştırılırlar. Ancak doğadaki uzaklaştırılacak madde organik ise arıtım genelde organik maddeyi oksitleyerek CO₂'e dönüştürülen mikroorganizmal faaliyetleri içerirler. Atık su arıtımı, hem fiziksel hem de biyolojik

arıtım basamaklarını içeren çok basamaklı bir işlemdir. Atık su arıtımında mikroorganizmalar önemli roller almaktadır.

Tekstil endüstrileri, yaş dokuma işlemleri için çok büyük miktarlarda su ve kimyasal tüketmektedirler [4]. Dünyadaki sentetik boyaların toplam üretiminin bir yılda ~800,000 ton olduğu tahmin edilmektedir ve sentetik boya ürünlerinin yaklaşık % 15'i endüstriyel atık sularda ortaya çıkmaktadır [5, 6]. Tekstil endüstrisinden kaynaklanan atıksular yüksek miktarda boya, tuzlar, asitler, alkaliler, beyazlatıcı ajanlar ve ağır metaller (kadmiyum, bakır çinko, krom, demir) gibi çok çeşitli kirleticiler içermektedir [7]. Bu nedenle endüstriyel atıksular içerisinde tekstil ve boyar madde endüstrisinden kaynaklanan boyalı atıksuların arıtımı en zor olanlardandır. Ayrıca alıcı sulara verilen boyanın çok az miktarı (10-50 mg/L) bile yüksek oranda, su saydamlığını ve gaz çözünürlüğünü etkilediği için boyalı atıksular su ortamındaki ışık geçirgenliğini azaltır ve fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkiler [4, 8].

Sentetik boyalar yoğun renklerinden ve boyaların degradasyonu sonucu oluşan benzidin ve diğer aromatik bileşiklerden dolayı, çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik, genotoksik ve karsinogenik olmaları nedeniyle önemli bir çevre kirleticisi olarak nitelendirilmektedir [9].

Çalışmamızda kullandığımız Astrazon kırmızı FBL bir azo boyadır. Azo boyalar bir ya da daha fazla azo bağı ($-N=N-$) ve aromatik halka içeren ksenobiyotik bileşiklerdir. Ksenobiyotikler serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır [5, 10]. Antioksidanlar ise oluşan serbest radikalleri ve aktif oksijen türlerini ortadan kaldıran ve biyolojik moleküllerle reaksiyona girmelerini önleyen doğal moleküllerdir [11].

Son yıllarda ksenobiyotikler, serbest radikaller, bunların etkileri ve bunlara karşı savunma mekanizmaları hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır [12, 13, 14]. Serbest radikaller sonucu oluşan oksidatif stres bu serbest radikallerin uzaklaştırılmadığı durumlarda oluşmaktadır. Çevre ve canlılar açısından en tehlikeli olay kimyasal bileşenlerin toksik forma dönüşüp bunların birikmesidir. Bu toksik maddeler ekosistemde ya biyotransformasyona uğramakta, ya daha tehlikeli bir kimyasala dönüştürülmekte veya CO_2 ve H_2O 'ya yıkılarak tamamen zararsız hale dönüştürülmektedir. Mikroorganizmalar bazı ksenobiyotikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmelerinden dolayı bu yıkımda görev almaktadırlar. Fakat bazı ksenobiyotikler mikrobiyal yıkıma dirençli olduklarından, doğada geri dönülmez bozunmalar oluşturmaktadırlar. Bu kirleticiler ve onların metabolitleri oksidatif stresle ilişkili olarak toksisiteye neden olabilen çok yönlü zararları olan maddelerdir. Bu

organik maddeler beyaz çürükçül fungus, maya, bakteri ve alg gibi mikroorganizmalar tarafından belirli hızda yıkılmaktadır [32, 33, 35, 36]. Bu amaçla mikroorganizmalar kullanılarak besin endüstrisi atıklarının arıtımı, kömür sıvılaştırılması, odun ve samandan lignin uzaklaştırımı, ağır metallerin biyosorpsiyonu, pestisitlerin yıkımı, tekstil ve boya fabrikası atıklarının arıtımı ve renginin giderimi gibi bazı çalışmalar yapılmaktadır [15, 16, 17, 18, 19, 21]. Beyaz çürükçül funguslar yüksek enzim sentezleme kapasitesine sahiptirler. Lakkaz, Mn-Peroksidaz, ligninaz, glikoz oksidaz ve NADH peroksidaz gibi hücre dışı enzimler çevre biyoteknolojisinde önemli yer tutmaktadır [19, 20]. Toksik maddelerin bulunduğu ortamlarda, bu enzimler üzerine çok fazla oranda araştırma yapılmasına rağmen antioksidatif savunma sisteminde yer alan hücre içi enzimler hakkında ayrıntılı bilgi yoktur [21, 22]. Bu nedenle son yıllarda ciddi çevre problemlerine neden olan boyar maddeler, ksenobiyotikler, serbest radikaller, bunların organizmalara etkileri ve bunlara karşı savunma mekanizmaları hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Boyar maddelere maruz kalmasına bağlı olarak, organizmalarda detoksifikasyon enzimlerinin ve proteinlerinin verdiği cevaplar değişmektedir. Normal olarak hücreler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidatif ve detoksifikasyon enzimlerini içeren hücresel savunma sistemleri tarafından ksenobiyotik, ağır metal ve oksidan/pro-oksidan toksisitesine karşı korunurlar.

Ksenobiyotiklerin ve serbest radikallerin detoksifikasyonu ile ilgili çalışmalar memelilerde geniş ölçüde yapılmasına rağmen prokaryot ve funguslarda bu sistem geniş olarak gözden geçirilmemiştir [23, 24, 25, 26]. Dolayısıyla bakteriler ve funguslarda bu enzim sistemleri hakkında bilgi henüz yeterli düzeye ulaşmamıştır. Bu nedenle bu enzimler ve glutatyonun beyaz çürükçül funguslarda da tespit edilmesi, çalışmamızın amaçları arasındadır. Bu amaç için, önemli bir çevre kirleticisi olan astrazon kırmızı FBL tekstil boyasının *Phanerochaete chrysosporium*'un antioksidan enzimleri ve glutatyon miktarındaki değişimler belirlenmiş ve fungusların antioksidan cevapları araştırılmıştır. Beyaz çürükçül fungusların çok çeşitli atık ve ksenobiyotikleri yıkabilme ve çeşitli enzimleri sentezleyebilme yeteneklerinden dolayı bunlar üzerinde detoksifikasyonlarla ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır [27, 28, 29]. Herhangi bir kirleticinin çevre ya da organizmalar üzerine etkisini belirlemek için kullanılan güçlü belirteçler serbest radikaller ve antioksidan enzimleridir.

1.3. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar, Basidiomycetes sınıfına dahil olup odunun bileşenlerini parçalarlar ve odunda beyaz renkli bir kalıntı oluşumuna neden olurlar [10].

Bu funguslara *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus eryngii* örnek olarak verilebilir.

Beyaz çürükçül funguslar yüksek oksidatif potansiyeli olan ligninaz, lakkaz ve Mn-peroksidaz gibi enzimlere sahip olduklarından dolayı pek çok çalışmalarda kullanılmaktadır [30].

Bunlara bazıları;

- Boyar maddelerin ve tekstil fabrikası atık sularının renginin gideriminde kullanılmaktadır [31]
- Zeytin yağı fabrikası atık sularının arıtımında kullanılmaktadır [32, 33]
- Polisiklik aromatik hidrokarbonların arıtımında kullanılmaktadır [34]
- Pestisitlerin yıkımında kullanılmaktadır [35]
- Ağır metallerin biyolojik absorpsiyonunda kullanılmaktadır [36]
- Hormon üretiminde kullanılmaktadır [37]
- Testil boyalarının detoksifikasyonunda kullanılmaktadır [38]

Günümüzde çevre kirleticileri içerisinde yer alan kimyasal maddelerin biyolojik yıkımı için biyokatalizörler olarak beyaz çürükçül fungusların kullanılması üzerine birçok araştırmacı çalışmaktadır. Bu fungusların biyolojik yıkıma uğrattığı çevre kirletici kimyasallar arasında lignin gibi heteropolimerler, poliklorlu aromatik yapıdaki DDT, endosülfan ve lindan gibi insektisitler yer almaktadır. Biyolojik yıkım fungus tarafından sentezlenen bazı enzimlerin görev aldığı indirek oksidasyon veya indirgenme tepkimeleri sonucunda gerçekleşmektedir. Lignin yıkımı sırasında oksidasyon dışında, aktive olmuş oksijenler olarak adlandırılan nonenzimatik ara ürünlerin de rol aldığı bilinmektedir [39].

1.4. Boya ve Boyaların Sınıflandırılması

1.4.1. Boya

Başka nesnelere renk vermekte kullanılan maddelere "Boyarmadde" denir. Boyarmaddeleri başlıca iki gruba ayırabiliriz [40].

a) Boyalar: Çoğunlukla elyaf boyamada kullanılmaktadır. Çözünürken kristal yapıları yok olan boyarmaddelerdir. Genelde organik maddeler olup yapılarında aromatik gruplar bulunmaktadır.

b) Pigmentler: Herhangi bir çözücüde çözünmeden ve kristal yapıları bozulmadan kullanılan boyar maddelerdir. Pigmentlerin çoğunluğu inorganik olmakla birlikte son yıllarda organik kökenli pigmentler de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Boyaların temel yapıları kromojen ve oksokrom gruplardan oluşmaktadır.

$$\text{Boya} = \text{Kromojen} + \text{Oksokrom}$$

Kromojen, aromatik gruba bağlı kromofor grup demektir. **Kromofor** kelime anlamı olarak "renk verici" anlamına gelir. Kromofor grup yalnız başına renk oluşturmaya yeterli değildir. Aromatik grup, boya molekülündeki rezonansı artırarak renk oluşumunu kolaylaştırır. Başlıca kromofor gruplar; Nitrozo ($-\text{N}=\text{O}$), Nitro (NO_2), Azo ($-\text{N}=\text{N}-$), Etilenik çift bağ ($\text{C}=\text{C}$), Karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gruplarıdır [40].

Oksokrom gruplar ise boyanın rengine katkıda bulunan, boyanın suda çözünmesini ve elyafa bağlanmasını sağlayan gruplardır. Başlıca oksokrom gruplar; Hidroksil ($-\text{OH}$), Amin ($-\text{NH}_2$), Sülfü ($-\text{SO}_3\text{H}$), Karboksil ($-\text{COOH}$), Metoksi ($-\text{OCH}_3$) gruplarıdır [40].

1.4.2. Boyaların Sınıflandırılması

Boyalar birkaç şekilde sınıflandırılabilir. Sınıflandırmada çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri, kullanım yerleri gibi çeşitli karakteristikler göz önüne alınmaktadır [41].

1.4.2.1. Boyaların Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması

A) Suda Çözünen Boyalar

Boyarmaddenin sentezinde kullanılan başlangıç molekülleri suda çözündürücü grup içermiyorsa bu grup moleküle sonradan eklenerek de çözünürlük sağlanabilir. Ancak tercih edilen yöntem, boyar madde sentezinde başlangıç maddelerinin iyonik grup içermesidir. Suda çözünebilen boyalar tuz teşkiledebilen grubun karakterine göre üçe ayrılır [41].

- I. Suda çözünen anyonik boyalar
- II. Suda çözünen katyonik boyalar
- III. Zwitter iyon karakterli boyalar

B) Suda Çözünmeyen Boyalar

Tekstil ve diğer alanlarda kullanılan boyalar suda çözünmeyen boyalardır. Bunlar;

- I. Substratta çözünen boyalar
- II. Organik çözücülerde çözünen boyalar
- III. Geçici çözünürlüğü olan boyalar
- IV. Polikondensasyon boyalar
- V. Elyaf içinde oluşturulan boyalar
- VI. Pigmentler

1.4.2.2 Boyama Özelliklerine Göre Sınıflandırma

- I. Bazik (katyonik) boyalar
- II. Asid boyalar
- III. Direkt (sustantif) boyalar
- IV. Mordan boyalar

- V. Reaktif boyalar
- VI. Küpe boyalar
- VII. İnkişaf boyalar
- VIII. Metal-kompleks boyalar
- IX. Dispersiyon boyalar
- X. Pigment boyalar

1.4.2.3 Kimyasal Yapıya Göre Sınıflandırma

Boyalar kimyasal yapısına göre sınıflandırılmalarında, kromofor gruplara ve kromofor grupları içeren organik yapı gruplarına göre sınıflandırılır [40].

- I. Nitro boyalar
- II. Nitrozo boyalar
- III. Azo boyalar
- IV. Difenil metan boyalar
- V. Trifenil metan boyalar
- VI. Ksanten boyalar
- VII. Kinon-imin boyalar
- VIII. Heterosiklik boyalar
- IX. Vat boyalar
- X. Antrakinoid boyalar
- XI. Sülfür boyalar
- XII. Ftalosiyenin boyalar

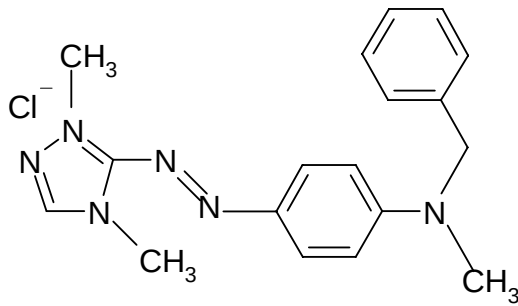
1.5. Azo Boyalar

Azo boyalar yapılarındaki kromofor grup olan azo ($-N=N-$) grubu ile karakterize edilmektedir. Bu gruptaki azot atomları karbon atomlarına bağlanmaktadır. Azo grubuna bağlı karbon atomlarına biri aromatik (benzen, naftalen ve türevleri) heterosiklik halka, diğeri ise enolleşebilen alifatik zincire bağlı bir grup olabilir. Bu nedenle molekülde en az bir tane aril grubu bulunur [41].

Azo boyaların genel formülü; $Ar-N=N-R$ şeklindedir.

R: Aril, heteroaril veya etanolleşebilen alkildir.

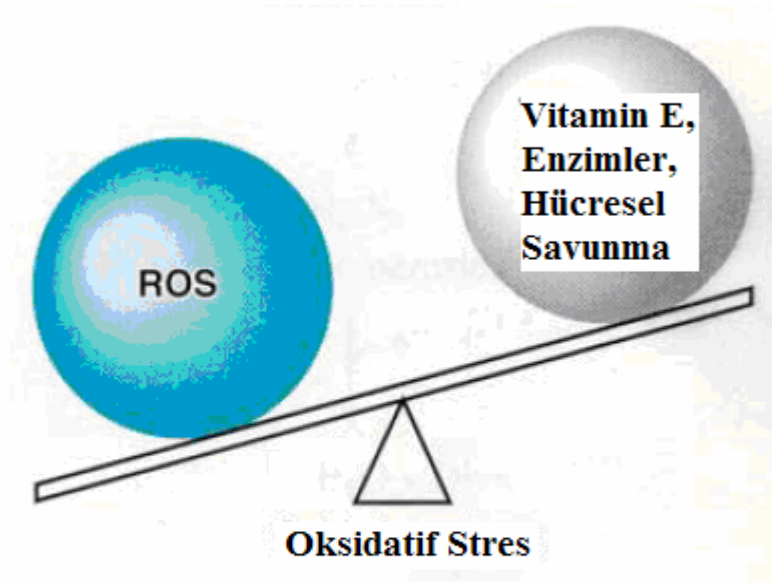
Azo boyalar bütün tekstil boya malzemeleri ürünlerinin önemli bir kısmını oluşturmakta (%60-70) ve tekstil, yiyecek, kâğıt yapımı, deri, kozmetik endüstrilerinde çok yaygın olarak kullanılan sentetik boyalardır [42, 43]. Bu nedenle tekstil fabrikası atık suları genelde su kalitesini etkileyen boya kalıntıları içermektedirler. Bazı azo boyalar ve onların metabolitleri de (aromatik aminler v.b) yüksek düzeyde toksik ve potansiyel olarak kanserojenik ve sitotoksik olabilmektedir [44, 45]. Bu çalışma kullanılan Astrazon kırmızı FBL'nin (C.I. Basic Red 46) kimyasal yapısı Şekil 1.1'de verilmiştir [46].



Şekil 1.1. C.I Basic Red 46

1.6. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal türlerdir. Hücrelerde doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşabileceği gibi iyonize radyasyon, ağırmetaller, organik çözücüler, pestisitler, boyar maddeler ve diğer kimyasal maddeler gibi eksojen kaynakların etkisiyle de oluşmaktadır. Antioksidan sistemlerle bu oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksosite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır [47]. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki ilişki Şekil 1.2.'de özetlenmiştir [48].



Şekil 1.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı oluşmaktadır. Hücrelerde de ciddi bir miktarda ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir. Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.

I.Kovalent bağların homolitik kırılması ile;

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600°C) kimyasal bağların kırılmasına neden olmaktadır. Kırılma sırasında bağ yapılarındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalmaktadır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşmaktadır ve bu türler de reaktiftir.

II. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile;

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşmaktadır.

III. Normal bir moleküle elektron transferi ile;

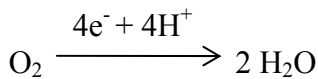
Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olmaktadır [49].

Moleküler oksijen dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında ayrı ayrı orbitallerinde bulunduklarında ve spinleri aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedir. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edilmektedir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu, iki elektron alması ile peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşmaktadır. Oluşan peroksi anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturmaktadır [50].

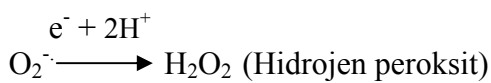
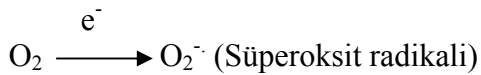
Biyolojik sistemlerde süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksi radikali ($\cdot OH$), tekil oksijen (1O_2), alkoksil radikali ($LO\cdot$), peroksil radikali ($LOO\cdot$) gibi pek çok türde serbest radikal oluşabilmektedir. Ancak serbest radikaller en sık lipid yapılarla oluşmaktadır. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıktığında lipid radikali meydana gelmektedir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girerek ve lipid peroksi radikalini oluşturmaktadır. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatmakta ve lipid hidroperoksitler oluşturmaktadır. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırmaktadır [51].

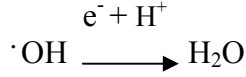
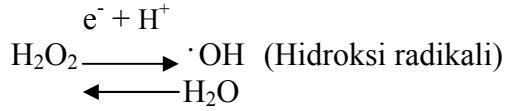
Bütün aerobik organizmalarda lipid peroksidasyonunun önlenmesi temel süreçtir. Çünkü lipid peroksidasyon ürünleri DNA hasarına neden olabilir. Lipid peroksidasyonu artıp antioksidan savunma azaldığında genellikle; epoksitler nükleofilik merkezlerle kendiliğinden reaksiyona girmektedir ve bu yüzden DNA, RNA ve proteinlere kovalent olarak bağlanmaktadır [52].

Organizmada serbest radikallerin büyük bir bölümü metabolik reaksiyonlar esnasında oksijenin tek elektronlu adımlarla indirgenmesi sonucu oluşmaktadır.

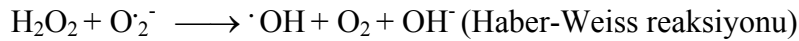


Bu reaksiyonun birer elektronlu ara basamakları şu şekildedir [53]:





Hidrojen peroksit çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle ‘reaktif oksijen türleri’, süperoksit gibi radikalleri, ayrıca hidrojen peroksit gibi radikal olmayanlar için ortak kullanılan bir terimdir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında hidroksi radikali ($\cdot OH$) oluşumuna neden olmaktadır. Hidroksi radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır [54]. Hidroksi radikalleri birçok yolla oluşabileceği gibi aşağıda belirtilen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla da oluşmaktadır.



Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) mikrozomal ve mitokondrial elektron transport sistemini içeren hücresel olaylar sırasında üretilmektedir. Ayrıca ksantin dehidrogenaz/oksidaz ve diğer hücresel oksidazlar bu molekülün önemli kaynaklarıdır [55].

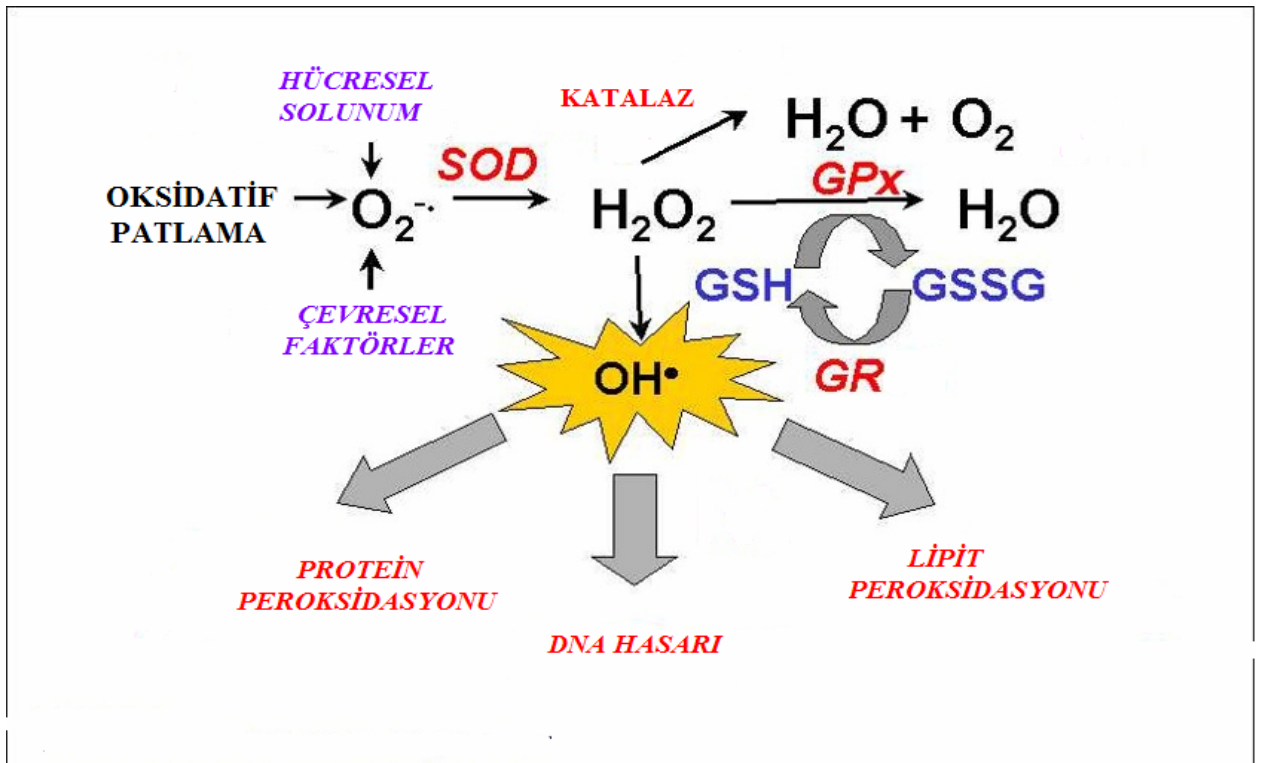
Tekil (Singlet) oksijen (1O_2) aslında bir radikal değildir, ancak reaksiyonlara normal oksijenden daha çabuk girebilmektedir [36]. Tekil oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer etmektedir, ya da kovalent tepkimelere girmektedir. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Tekil oksijen lipidler, nükleik asitler ve proteinler gibi önemli hücresel makromolekülleri okside ederek lipid peroksidasyonu, membran hasarları ve hücre ölümüne neden olmaktadır [49, 56].

1.7. Antioksidan Savunma

Antioksidanlar serbest radikalleri ve aktif oksijen türlerini ortadan kaldıran ve lipid, karbonhidrat, protein ve nükleik asitler (DNA) gibi biyolojik moleküllerle reaksiyona girmelerini önleyen doğal moleküllerdir. Antioksidanlar, ksenobiyotiklerin, ilaçların, kanserojenlerin, toksik maddelerin ve radikallerin olumsuz etkilerine karşı doğrudan ya da dolaylı olarak hücreyi korumaktadır [10].

Belli başlı hücre içi antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerdir. Enzimlerin hücre içi ortamı korumasının aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan A, E ve C vitamileri, melatonin, ferritin, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, β -karoten ve α -1 antitripsin gibi enzimatik olmayan moleküller sorumludur [57].

Çeşitli antioksidan enzimlerinin genleri aynı anda ifade edilmekte ve koordineli olarak, çevresel faktörler ve hücresel solunum nedeniyle oluşan oksidatif stresin ortadan kaldırılması için antioksidan cevapları artmaktadır. Bu olay Şekil 1.3. de özetlenmiştir [58].



Şekil 1.3. Antioksidan Enzimler

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge oksidanların lehine bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açmaktadır [59].

Reaktif oksijen türleri;

- Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipooksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler,
- Hücresinin potasyum kaybını artırırlar,
- Trombosit agregasyonunu artırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırır,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.

Çeşitli antioksidan enzimler hem çeşitli serbest radikalleri süpürerek hem de hücrenin detoksifikasyon mekanizmasını uyarak serbest radikallerin detoksifikasyonunu artırmakta ve bu yolla pek çok pato-fizyolojik süreci önlemektedir.

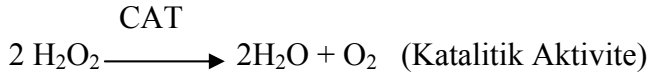
1.8. Antioksidan Enzimler

1.8.1. Katalaz (CAT : H₂O₂ Oxidoreductase : EC 1.11.1.6)

Katalaz (EC 1.11.1.6) 60 kDa'luk dört altünitesi olan bir enzimdir. Her bir molekül dört protoporfirin grup içerir ve molekül toplam 240 kDa'dur. Katalaz en etkili antioksidan enzimlerden biri olarak bilinmektedir [60]. Katalaz, H₂O₂'yi suya ve moleküler oksijene katalizler. Katalaz bu katalitik aktivitesinin dışında peroksidatif aktiviteye de sahiptir. H₂O₂ varlığında birtakım küçük substratlara karşı peroksidaz

aktivitesi gösterir. *In vivo* birçok durumda katalazın peroksidaz aktivitesinin daha etkin olduğu bilinmektedir [61].

Katalazın katalitik mekanizmasının ilk aşaması hidrojen peroksite bağlı oksijen-oksijen'in heterolizisidir [62]. Katalaz katalitik görevini iki farklı yoldan gerçekleştirmektedir.



Katalaz hücreyi hidrojen peroksit ve ürünlerinden korunmaktadır. Katalaz gibi GPX de H_2O_2 detoksifikasyonundan sorumludur. Katalaz bazı hücre tipleri için esansiyel olmamasına rağmen, hücrelerin oksidatif strese toleransın kazanılmasında önemli bir rol oynamaktadır [63].

Katalaz aktivitesi hemen hemen bütün hayvan hücrelerinde ve organlarda bulunmakla beraber, özellikle karaciğer, eritrositler ve böbrek zengin kaynaklardır. Katalaz aktivitesi aynı zamanda bütün bitki materyallerinde ve zorunlu anaeroplardan dışındaki mikroorganizmalarda saptanmıştır [64].

1.8.2. Glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18)

Glutasyon S-transferaz (EC 2.5.1.18) elektrofilik karbon, nitrojen ya da sülfür atomlarını içeren non-polar bileşiklerin redükte glutasyonla (GSH) konjugasyonunu katalizleyen bir enzim grubudur [65]. GST bu yolla ilaçların, pestisitlerin ve diğer ksenobiyotiklerin metabolize edilmesini sağlamaktadır. Bu enzim, glutasyonun –SH grupları ile bazı bileşiklerin (ksenobiyotikler) reaksiyonunu katalizlerleyerek onların elektrofilik alanlarını nötralize eder ve suda iyi çözünen bileşikleri oluştururlar [66].

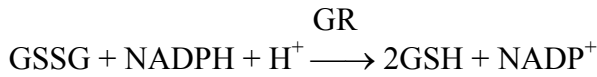
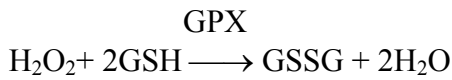
GST'nin sitozolik GST (cGST), mitokondrial GST ve mikrozomal GST olmak üzere 3 önemli grubu vardır [67].

Bakteri ve ökaryot enzimlerinin tersine fungal GST'ler hakkında nispeten çok az şey bilinmektedir. GST aktivitesi yaklaşık 30 fungus türünde tanımlanmıştır [68]. Mikrobiyal GST üzerine ilk bilgiler 1980'lerin başında ortaya çıkmaktadır. Özellikle

son zamanlarda mikroorganizmaların (fungus, bakteri) GST'leri hakkında önemli çalışmalar vardır [69, 70, 71].

1.8.3. Glutasyon Redüktaz (GSSGR, EC 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidazın ve glutasyon S-transferaz'ın katalizlediği reaksiyonlar esnasında oluşan okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyon (GSH) dönüştürmek suretiyle, dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak NADPH kullanır [72].



Hücrelerdeki fizyolojik GSH-GSSG oranı çok önemlidir. GSSG olmadığı durumlarda NADPH'nin hücre içi seviyesinin düşmesi glutasyon redüktazı inaktive etmektedir. Oksidatif bir stres sonucu GSSG'nin hücre içi seviyesi artınca glutasyon redüktaz yeniden aktive olmaktadır [73].

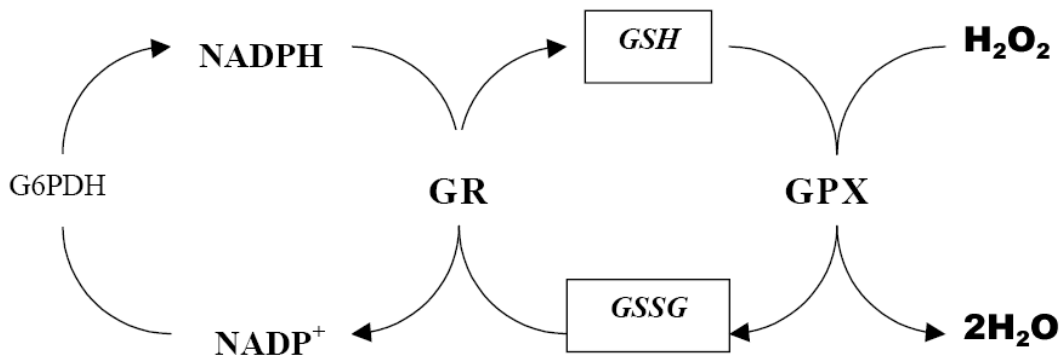
Glutasyon ve glutasyon redüktaz, birçok protein ve polipeptid hormonların disülfid bağları üzerinde ve ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir yer tutmaktadırlar [74].

1.9. Glutasyon (GSH γ -L-glutamil-L-sisteinil-glisin)

Glutasyon insan, bitki, bakteri ve mayalarda bulunan büyük nonpolar tiol bileşiğidir. GSH, tüm memeli hücrelerinde bol miktarda sentezlenmektedir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşmektedir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz enzimi GSH'nin prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizlemektedir. İkinci basamakta ise, glutasyon sentetaz, glisin ve γ -glutamil-sisteinden glutasyonu oluşturmaktadır. GSH negatif feed-back ile glutamilsistein oluşum hızını ve böylelikle kendi sentezini de denetlemektedir. Bu sentezde bir molekül GSH için 2 molekül ATP'nin hidrolizi gerekmektedir [75].

GSH'in, bioredüktif reaksiyonların çok büyük bir kısmı, transportlar, farklı ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi bazı biyokimyasal işlemlerde önemli bir rol oynamaktadır [76].

Oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu, redükte glutatyonun (GSH) oksitlenmiş dimer formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır. Glutatyon peroksidazın (GPX) katalizlediği bu reaksiyonda, GSH'un GPX aktivitesi için önemi büyüktür [77, 78]. Glutatyon sentez döngüsü Şekil 1.4'de verilmiştir [79].



Şekil 1.4. Glutatyon sentez döngüsü

Hücre içinde GSH çevredeki oksidan maddelerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engellemektedir. Bu arada kendisi de oksitlenerek glutatyon molekülü disülfid bağı ile birbirine bağlanır (GSSG). GSH'un biyolojik önemi, temel olarak sistein kısmının serbest sülfidril grubuyla ilgilidir.

2. KAYNAK ÖZETİ

Organizmalar çeşitli kirleticilere maruz kaldığında, hücresel hasarı azaltmak için kirleticileri metabolize etmekte ve ortadan kaldırmaktadırlar. Aerobik organizmalarda normal fizyolojik koşullar altında yabancı kimyasalların metabolize edilmesinden kaynaklanan reaktif oksijen türleri, antioksidan savunma sistemi tarafından iyi bir şekilde ortadan kaldırılmakta ve hücre homeostasisinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Eğer antioksidan savunma sisteminin ortadan kaldıracılabileceğinin ötesinde reaktif oksijen türleri ortaya çıkarsa, oksidatif stres oluşur ve bunun sonucu olarak; enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve sonunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Antioksidan enzimlerdeki değişimler, oksidatif stresin dolaylı kontaminantları için iyi moleküler göstergeleri olabilmekte ve aynı zamanda metaller ve diğer ksenobiyotikler gibi kontaminantlara uzun süreli maruz kalan populasyonlarda cevabın büyüklüğünü göstermektedir [80].

Cohen v.d. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada pentakloronitrobenzen ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'e maruz kalan funguslarda glutatyon miktarı ve glutatyon S-transferaz enziminin aktivitesi araştırılmıştır. Bir fungusit olan pentakloronitrobenzen (PCNB)'e ya da 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'e maruz kalma sonrası (3-6 saat) *Fusarium oxysporium* sp. *melonis* ve *Rhizoctonia solani*'de redükte glutatyon miktarı hızlı bir şekilde tükenmiştir ve bunu GSH seviyelerinde aşamalı bir artış izlemiştir. Bu fungusitlerin, her iki fungusun glutatyon S-transferaz'ın (GST) spesifik aktivitesi üzerine de benzer bir etkisi gözlenmiştir. PCNB'ye duyarlı *R. solana* ve toleranslı *F. oxysporium*'da GSH seviyeleri ve GST spesifik aktivitelerinde belirgin farklılıkların olmadığı saptanmıştır [81].

Sharma v.d. (2000) Hindistan tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılan Sulphur Red Brown 360 (SRB), Jade Green 2G (JG) , Reactofix Turquoise Blue 5GFL (RTB) ve Direct Scarlet 4BS (DS) *Bacillus subtilis*'de boya konsantrasyonunun artışına paralel olarak toksik ve genotoksik etki göstererek büyümenin inhibe olduğunu göstermişlerdir [82].

Moawad v.d. (2002) yaptıkları çalışmada bazı tekstil boyalarının mutajenik etkisini ve toksisitesini araştırmışlardır. Çalışmada *Salmonella typhimurium* suşlarına (TA 100; TA 98; TA 1535; TA 1537; TA 1538) Direkt sarı, Direkt kahverengi, Polar kırmızı, Erio kırmızı, Fast Scarlet sarı, Maxilon kırmızı, Maxilon sarı, Remacryl kırmızı boyalarının mutajenik olup olmadığını belirlemek için 6 farklı konsantrasyonunu (2.5

$\mu\text{g/mL}$, 4.5 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$, 13.5 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$, and 22.5 $\mu\text{g/mL}$), toksisitenin belirlenmesi için 3 farklı konsantrasyonunu (50 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$) uygulanmışlardır. Her alt tür için farklı konsantrasyonlarda olmakla birlikte tekstil boyalarının mutajen ve toksik olduğu tespit edilmiştir [83].

Sabti (1999), mikronükleus test kullanarak yaptığı çalışmada 3, 6 ve 9 gün boyunca Klorotriazin Reaktif Azo Kırmızı 120'nin düşük dozlarını (1.5 10 mg/L) *Carassius auratus gibelio*'ya uygulamıştır. Boya uygulanmış balık gruplarının eritrositlerinde hem doza bağlı hem de zamana bağlı olarak mikronükleus miktarında bir artış saptanmıştır [84].

Yıldırım (2004) yaptığı çalışmada, beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium*'a farklı konsantrasyonlarda (5 μM , 500 μM) kadmiyum uygulamış ve antioksidan enzim ve glutatyon seviyesi üzerine etkilerini araştırmıştır. SOD, CAT, GST, aktivitelerinde indüksiyonlar ve GR aktivitesinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda (500 μM) inhibisyon tespit etmiştir. Yüksek kadmiyum uygulanan gruplarda GSH seviyesinde artış olduğunu saptamıştır [85].

Asma ve Yeşilada (2002) tarafından yapılan çalışmada paraquatın *Funalia trogii*'nin glutatyon seviyesi ve hücresel savunma enzimleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Paraquatın beyaz çürükçül fungus *Funalia trogii*'nin detoksifikasyon enzimleri ve antioksidan savunma aktiviteleri üzerine etkisi belirlenmiştir. 1 mmol/L Paraquat uygulaması, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon transferaz (GT) ve süperoksit dismutaz'ın (SOD) aktivitelerini arttırmıştır. 0.1 mmol/L'lik paraquat uygulaması ise GR ve GST'nin aktivitesini etkilememiştir. Paraquat'ın bütün konsantrasyonları glutatyon miktarını ve katalaz aktivitesini baskılamıştır [86].

Jaskot v.d. (1994) antrokinon boyalar olan Dispers kırmızı 13 ve Dispers 3'ün sıçanlar üzerindeki toksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan boyalar glikoz 6 fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz ve sitokrom P-450 enzimlerinin artmasına neden olmuştur [87].

Guelfi v.d (2003) yaptıkları çalışmada tekstil boyaları gibi ksenobiyotik olan kadmiyum (CdCl_2)'un 0.005 mM - 0.05 mM arasındaki farklı konsantrasyonlarını filamentli bir fungus olan *Aspergillus nidulans*'a uygulayarak büyüme inhibisyonu ve antioksidan enzimler üzerine etkisini araştırmışlardır. 0.005 mM CdCl_2 uygulanan funguslarda önemli bir büyüme inhibisyonu gözlenmezken, 0.025 mM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda büyümenin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. CdCl_2 'nin misel içindeki birikiminin uygulamalarda kullanılan CdCl_2 'nin konsantrasyonundaki artışla

doğrudan bağlantılı olduğu tesbit edilmiştir. Tüm CdCl₂ konsantrasyonları Mn-SOD izoenzimi için önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Fakat SOD aktivitesinde konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bir artış gözlenmiştir. Katalazın aktivitesinde ise yüksek CdCl₂ konsantrasyonlarında bile çok az artış olmuştur. GR aktivitesi ise CdCl₂'un en yüksek konsantrasyonu (0.05 mM) uygulandıktan sonra belirgin bir şekilde artmıştır [88].

Sumathi v.d. (2001) tekstil boyası atıklarının, balıkların (*Cyprinus carpio*) eritrositlerinde ve karaciğer hücrelerinde DNA hasarına neden olduklarına ve atık konsantrasyonunun artışına paralel olarak DNA kırılmalarının da arttığını saptamışlardır [89].

Chung ve Cerniglia (1992) pek çok alanda yaygın olarak kullanılan azo boyaların mutajenik etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu boyaların ağızdan girişinden sonra bağırsak mikroflorası ya da karaciğer azoredüktazları ile aromatik aminlere ve daha genotoksik bileşiklere metabolize edildiklerini belirtmişlerdir [90].

Apohan ve Yeşilada (2005) yaptıkları çalışmada bazı tekstil boyar maddelerinin ökaryot ve prokaryotlar üzerine toksik etkilerinin olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda *Funalia trogii* tarafından biyodegradasyona uğramış tekstil boyar maddelerin *Staphylococcus aureus* ve *Funalia trogii* üzerindeki toksik etkisinin biyodegradasyona uğramamış tekstil boyar maddelerine göre önemli derecede azaldığını saptamışlardır [37].

Bragulat v.d. (1991) tarafından yapılan çalışmada *Deuteromycetes* ve *Zygomycetes* sınıfına ait fungus türlerine 0.25 ppm ve 5000 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda 13 farklı boya uygulanmış ve büyüme inhibisyonları gözlenmişlerdir. Her boyanın farklı konsantrasyonlarının değişen yüzdelerde büyüme inhibisyonuna neden olduğu gözlenmiştir [91].

Yeşilada (1996) yaptığı çalışmada kristal viyolenin farklı besiyerlerinde büyüme inhibisyonunun nasıl etkilediğini araştırmıştır. Sıvı besiyerinde 5 mg/L boya büyümeyi tamamen inhibe etmesine rağmen, katı ortamda funguslar 20 mg/L boyayı tolere edebilmiştir [92].

Sun ve v.d. (2005), saç boyalarında kullanılan HC Orange No.1 (2-nitro-4-hydroxydiphenylamine) boyasına *Carassius auratus*'un verdiği antioksidan cevabı araştırmışlar ve GSH seviyesi ile SOD ve GST aktivitelerinde kontrol gruplarına göre artış ve CAT aktivitesinde ise bir azalma saptamışlardır [93].

MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda esnasında kullanılan okside glutatyon (GSSG), 5-5'dithiobis (2-nitro-benzoik asit) (DTNB), redükte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GSSG-redüktaz), nikodinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte) (NADPH) Sigma firmasından; KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , etilen diamintetraasetik asit (EDTA), sabouroud dextrose brouth (SDB), sabouroud dextrose agar (SDA), ve H_2O_2 Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Boya

Çalışmamızda tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılan Astrazon kırmızı FBL (C.I. Basic red 46) boyar maddesi kullanılmıştır. Ticari karakterdeki bu boya Malatya İPAŞ Tekstil A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.3. Çalışmada Kullanılan Organizma

Çalışmamızda Basidiomycetes sınıfına dahil *Phanerochaete chrysosporium* (ME446) beyaz çürükçül fungus kullanılmıştır.

3.4. Çalışmada Kullanılacak Stok Fungus Kültürlerinin Hazırlanması

Kullandığımız fungusu eğik katı besiyeri kültürü olarak ürettikten sonra stok kültürleri hazırlanırken eğik katı besiyerinde hazırlanan kültürlere 10 mL steril distile su eklenerek kazıma yapıldı ve misel süspansiyonları elde edildi. Daha sonra hazırlanan misel süspansiyonlarından 2 mL alınarak 100 mL Sabouroud Dextrose Brouth (SDB) bulunan erlenlere ekim yapıldı. Ekim yapılan kültürler 30 °C'de 150 rpm'de 3 gün üretilmiş ve pelet eldesi sağlandı.

3.5. Fungusun Boyaya Maruz Bırakılması

Fungus kültürü SDB besiyerinde üretildikten sonra steril koşullarda homojenizatör (Kinematica Gmdh) ile çok düşük devirde homojenize edildi. Homojenize edilmiş 2 mL fungus 30 mL STB (Stok Temel Besiyeri) içeren 250 mL'lik erlenlere ekildi. Erlenlere boya eklenmesi ise Bölüm 3.6 ve Bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

Çizelge 3.1. STB besiyeri içeriği

Kimyasallar	g/L
KH_2PO_4	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.035
Yeast	2
Glukoz	1

3.6. Fungus Üretiminin Başlangıcında Boya Eklenmesi ve Üretilmesi

Uygulama gruplarında, Bölüm 3.5.'de belirtildiği gibi hazırlanan kültür ortamlarına son konsantrasyon 20 ppm ve 50 ppm olacak şekilde boya ilave edildi ve 30°C'de statik koşullarda inkübe edildi. Daha sonra sırasıyla 2, 4, 8, 12, 16 ve 20. günlerde funguslar süzülerek besiyerinden alındı.

3.7. Fungus Üretiminin Belirli Periyotlarında Boya Eklenmesi ve Üretilmesi

Bölüm 3.5.'de belirtildiği gibi hazırlanan kültür ortamına fungus üretiminin 2. ve 6. günlerinde son konsantrasyon 20 ppm ve 50 ppm olacak şekilde boya eklendi 30 °C'de statik koşullarda inkübasyonları (SANYO Incubator) yapıldı. Bu bölümdeki uygulamalar iki şekilde yapıldı. Birinci uygulamada öncelikle Bölüm 3.5.'de belirtildiği

gibi hazırlanan funguslar 2 gün boya eklenmeden üretildi. Daha sonra üretimin 2. gününde son konsantrasyon 20 ppm ve 50 ppm olacak şekilde boya eklenip 30 °C’de statik etüvde inkübe edildi. Boya eklendikten sonraki 1. ve 5. günlerde fungus kültürleri süzülerek besiyerinden alındı.

İkinci uygulamada ise Bölüm 3.5.’de anlatıldığı şekilde hazırlanan funguslar 6 gün boya eklenmeden üretildikten sonra 6. günde son konsantrasyon 20 ppm ve 50 ppm olacak şekilde boya eklenip 30 °C’de statik etüvde inkübe edildi. Boya eklendikten sonraki 1. ve 5. günlerde ise funguslar süzülerek besi yerinden ayrıldı.

3.8. Fungusların Uygulama Sonrası Alınması, Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu

Fungus üretiminin başlangıcında boya eklenen uygulama gruplarında 2, 4, 8, 12, 16 ve 20. günlerde örnekler süzülerek besiyerinden alındı ve üretimin 2. ve 6. günlerde boya eklenen gruplarda ise boya eklenmesinden sonraki 1. ve 5. günlerde örnekler süzülerek besiyerinden alındı. Daha sonra fungus miselleri pH 7,4’lük fosfat tamponu ile homojenize (Kinematica Gmdh) edildi. Homojenat sonifikatörle (SANYO Soniprep 150 MSE) % 80 güçle 30 saniye aralıklarla 3 kez sonifiye edildi ve 25000 g’de + 4 °C’de 15 dakika santrüfj (Ole Dich, Instrumentmakers Aps. 157 Mp) edildi. Elde edilen süpernatantlar enzim aktiviteleri saptanıncaya kadar - 80 °C’de saklandı.

3. 9. Enzimatik Çalışmalar:

Yapılan enzim aktivitesi tayin işlemlerinde mikropilaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax®) ve spektrofotometre (SHIMADZU UV-Visible Spectrophotometer UV-1601) kullanıldı.

3.9.1. Katalaz Aktivitesinin Saptanması

Katalaz enziminin tayini Luck 1963 yöntemine göre yapıldı [94]. Aktivite tayini için pH 7’de 1/15 M’lık Sodyum-Potasyum (K_2HPO_4 - NaH_2PO_4) tamponu hazırlanmıştır ve tamponun 100 mL’sine 160 µL H_2O_2 eklendi. Enzim aktivasyon

tayininde kör olarak hazırlanan tampon + H₂O₂ karışımı kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümü için ise tampon + H₂O₂ karışımının üzerine uygun miktarda süpernatant eklenmiş ve 240 nm’de 1 dakika boyunca absorbans değişimi (Shimadzu-UV-1601, UV/Visible) tespit edildi. Absorbans tespit edildikten sonra mililitredeki enzim ünite sayısı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite hesaplandı.

3.9.2. Glutasyon S-transferaz Aktivite Tayini

Glutasyon S-transferaz (GST) aktivite tayini için Habig ve ark. (1974) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı [95]. Glutasyon S-transferaz aktivite tayini için öncelikle %96’lık etanol içerisinde (0.15 M) 1-kloro, 2-4 dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak hazırlandı. Enzim aktivitesi ölçülürken potasyum fosfat tamponu (pH: 6.5; 0.1 M) ve kofaktör olarak redükte glutasyon (0.002 M) kullanıldı. Enzim aktivitesinin tayini için mikropilaya çukuruna sırasıyla 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu ve 100 µL GSH karışımı pipetlenerek 25 °C’de 3 dak. inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra çukurlara 10 µL CDNB pipetlenmiş ve karışım 15 saniye süre ile mikropilaya okuyucuda karıştırıldı. Absorbans değişimi 344 nm’de 1 dakika süreyle okundu.

3.9.3. Glutasyon Redüktaz Aktivite Tayini

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi Cribb ve ark. (1989) tarafından kullanılan yöntemle göre ölçüldü [96]. Reaksiyon solüsyonu 0.1 mM, 150 µl DTNB, 12 mM, 20 µL NADPH ve 20 µL örnek içermektedir. 20 µL, 3.25 mM GSSG’nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlanmıştır. GSSG’den GSH oluşumu DTNB miktarında azalmaya neden oldu. DTNB azalışı oda sıcaklığında 405 nm’de izlenmiş ve absorbans yükseliş oranı örnekteki protein miktarına oranlandı.

3.10. Redükte Glutasyon Miktar Tayini

Glutasyon miktar tayini Akerboom ve ark. (1981) yöntemine göre yapıldı [97]. Redükte glutasyon miktar tayini için öncelikle 6.3 mM EDTA içeren 125 mM'lık sodyum difosfat tamponu (pH: 7.5) hazırlandı. Tampon mililitresinde 0.248 mg NADPH olacak şekilde taze olarak hazırlandı. Bununla birlikte 5 mL tampon içinde 11.89 mg DTNB olacak şekilde diğer çözelti hazırlandı.

Deney tüplerine NADPH'lı tampondan 700 µL ve DTNB'den 100 µL konuldu ve karıştırılarak 10 dakika 30 °C'deki su banyosunda bekletildi. Okuma yapılırken tüplerdeki karışım 1 mL'lik spektrofotometre küvetine aktarıldıktan sonra kör için 200 µL distile su ve 5 µL glutasyon redüktaz eklenerek absorbans 412 nm'de sıfırlandı. Daha sonra örnekleri okumak için 10 dakika 30 °C'deki su banyosunda bekletildi olan karışım spektrofotometre küvetine koyularak üzerine 175 µL distile su, 5 µL glutasyon redüktaz, 10 µL süpernatant eklenerek hızlı bir şekilde karıştırıldı ve 412 nm'de okundu. Redükte glutasyon tayini yapmak için çizilen standart grafikten 412 nm'de okunan absorbans değerine karşılık gelen değerler süpernatantın mililitresindeki miligram proteine bölündü.

3.11. Total Protein Miktarı

Total protein miktarı Bradford'un (1976) geliştirdiği yöntemine göre, mikropilaka okuyucu sistemi kullanılarak tespit edildi [98]. Süpernatant 1/5 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µl mikropilakalara pipetlendi ve üzerine 250 µl Bradford reaktifi eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Elde edilen değerler BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırılarak, örnekteki total protein değerleri hesaplandı.

3.12. İstatistiksel Analiz:

Elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistiksel paket program (SPSS 10.0 for Windows Inc., USA) kullanıldı. Çalışma bulguları varyans analizi ile uygulanan doza bağlı olarak Kruskal Wallis' testi ile test edildi.

Gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $P<0.05$ düzeyinde önemlilik derecesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında, örnekler ikili karşılaştırma ile Mann Whitney-U testine göre karşılaştırıldı. Buna bağlı olarak grup içi farklılığın $P<0.05$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı.

4. BULGULAR

4.1. *P. chrysosporium*'un Astrazon Kırmızı FBL'ye Maruz Bırakılması Sonucu Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri ve Glutasyon Miktar Değişimleri

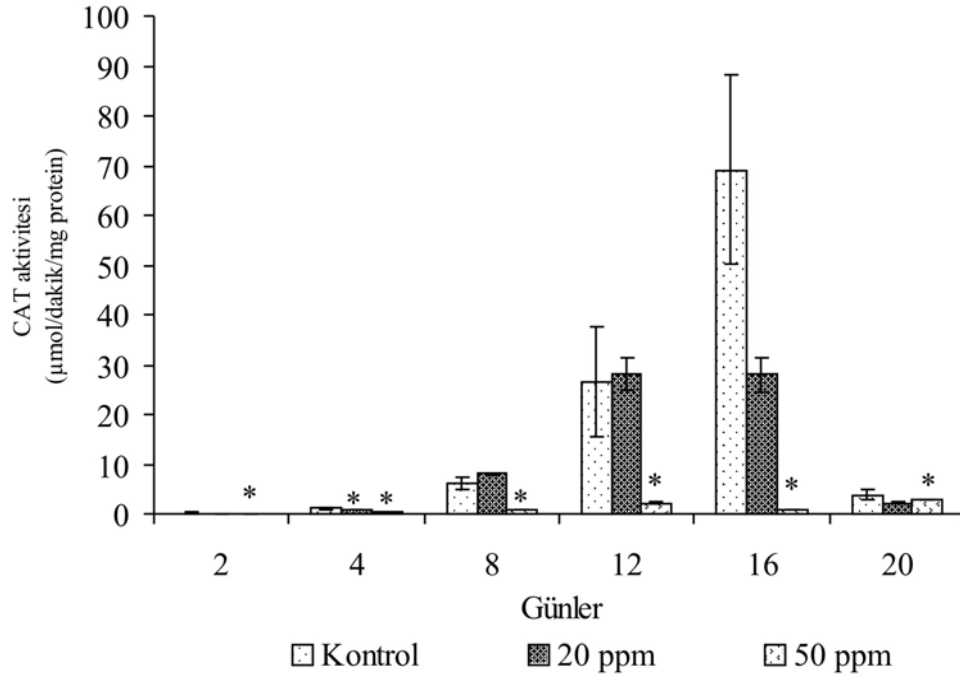
Bu çalışmada *Phanerochaete chrysosporium*'un Astrazon Kırmızı FBL (C.I. Basic red 46)'ye maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplar içerisinde maruz kalma süresine bağlı olarak antioksidan enzim aktiviteleri ve glutasyon (GSH) miktarlarındaki değişimler saptanmıştır.

4.1.1. Katalaz Aktivitesi

P. chrysosporium'un katalaz (CAT) aktivitesi Astrazon Kırmızı FBL'ye maruz bırakılan gruplarda saptanmış ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3).

Üremenin ilk gününde kontrol gruplarında 8. 12. 16. günlerde 2. güne göre (0.185 ± 0.023 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein) bir artış kaydedilmiş 20. günde bir baskılanma gözlenmiştir (3.773 ± 0.969 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein). Üremenin ilk gününde 20 ppm boya uygulanan gruplarında 2. güne göre 8, 12 ve 16. günlerde bir artış gözlenmiş (8.050 ± 0.313 , 28.337 ± 3.241 , 27.968 ± 3.597 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein) 20. günde bir baskılanma kaydedilmiştir (2.203 ± 0.189 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein). 4. günde ise kayda değer bir değişim gözlenmemiştir (0.960 ± 0.054 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein). 4, 8, 12 ve 20. günlerde (0.083 ± 0.031 , 8.050 ± 0.313 , 28.337 ± 3.241 , 27.968 ± 3.597 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein) aktivitede kontrole göre düşüş 2 ve 16. günlerde (0.083 ± 0.031 , 27.968 ± 3.597 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein) bir artış tespit edilmiştir. İlk günde 50 ppm boya uygulanan gruplarda katalaz aktivitesinin 2, 4, 8 ve 16. günlerde (0.070 ± 0.004 , 0.231 ± 0.009 , 0.680 ± 0.040 , 0.740 ± 0.066 $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein) kontrol ve 20 ppm boya uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında baskılanma gözlenmiştir.

20 ppm boya eklenen gruplarda kontrole göre sadece 4. gündeki ve 50 ppm boya eklenen guruplarda ise ölçüm yapılan tüm günlerde, kontrole göre katalaz enziminin aktivite değişimi istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$).

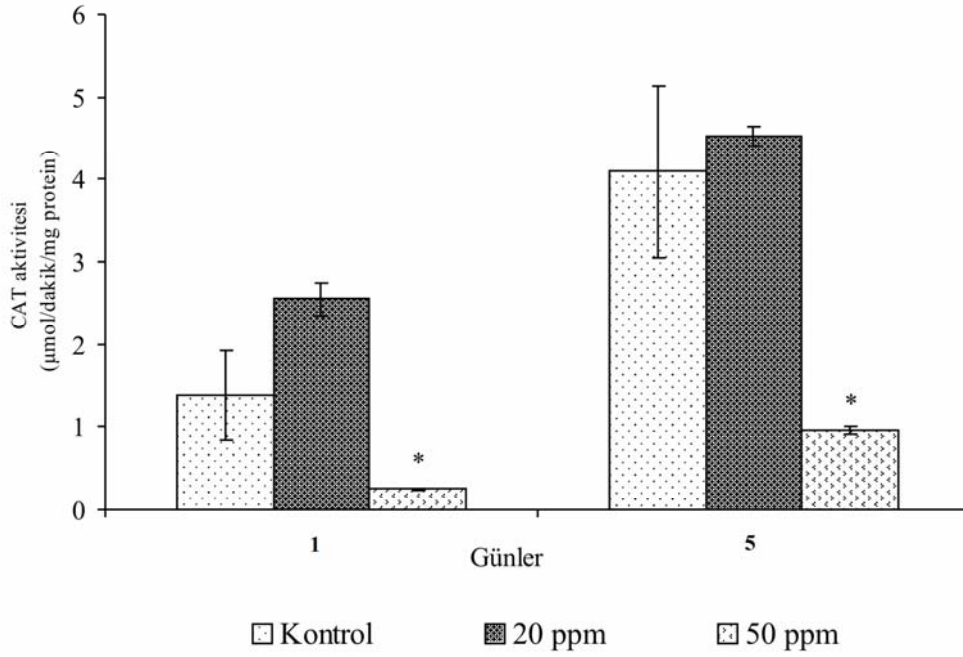


Şekil 4.1. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium* 'da günlere bağlı katalaz enziminin aktivitesindeki değişimler.

* P<0.05

Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulamasının kontrol gruplarında boya uygulamasından sonraki 5. günde (4.094 ± 1.048 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) 1. güne göre bir artış gözlenmiştir (1.376 ± 0.541 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$). 20 ppm boya uygulanan gruplarda boya uygulamasının 5. günde (4.527 ± 0.117 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) kontrole ve 1. güne göre (2.543 ± 0.199 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) aktivitede bir artış kaydedilmiştir. Üremenin ikinci günü 50 ppm boya uygulanan gruplarda boya uygulamasını takiben 1. ve 5. günlerde (0.254 ± 0.013 , 0.962 ± 0.047 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) aktivitede kontrole ve 20 ppm boya uygulanan gruplara göre bir baskılanma gözlenmiştir.

50 ppm boya eklenen gruplardaki, kontrole göre katalaz enziminin aktivite değişimi istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$).

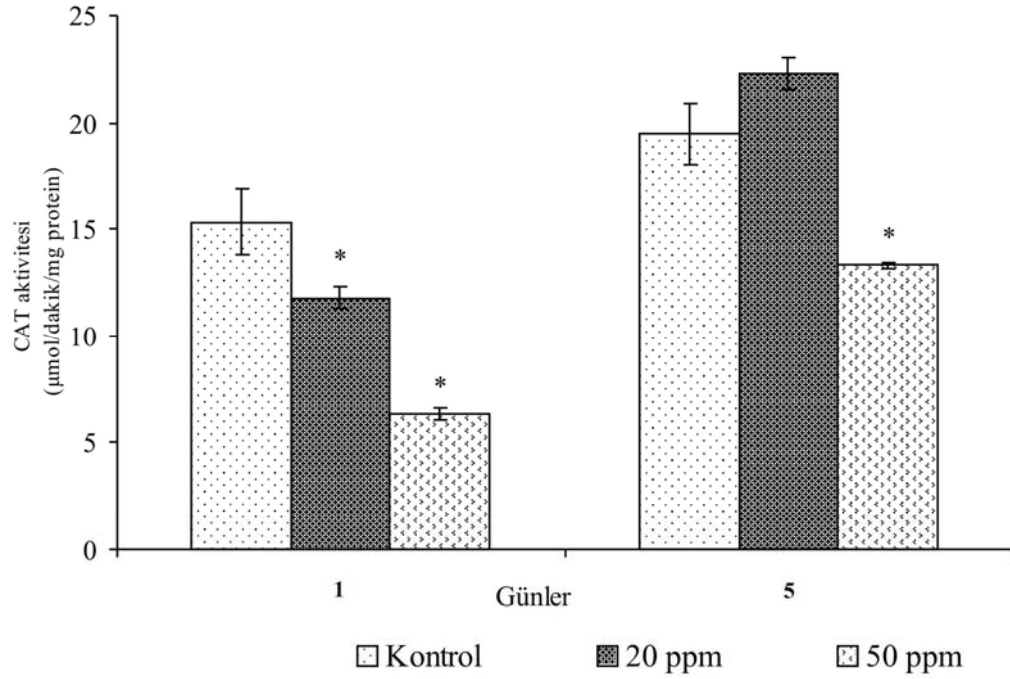


Şekil 4.2. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı katalaz enziminin aktivitesindeki değişimler.
* P<0.05

Üremenin altıncı gününde uygulanan grupların kontrollerinde boya uygulamasından sonraki 5. (19.469±1.421 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) günde 1. güne göre bir artış gözlenmiştir (15.343±1.530 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$). 20 ppm boya uygulanan gruplarda kontrol gruplarında olduğu gibi 5. günde (22.297±0.762 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) 1. güne (11.793±0.510 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) göre bir artış gözlenmiş, fakat 1. günde kontrole göre aktivite azalmış ancak 5. günde ise artmıştır. Altıncı gün 50 ppm boya uygulanan gruplarda boya uygulamasının ardından 5. günde (13.310±0.113 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) 1. güne (6.301±0.282 $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$) göre bir artış kaydedilmiştir. Her iki günde de 50 ppm boya uygulanan gruplarda 20 ppm uygulananlara ve kontrole göre bir azalma kaydedilmiştir.

Genel olarak üremenin 1. gününden sonra düşük dozda (20 ppm) boya uygulanan gruplarda katalaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Yüksek dozda (50 ppm) boya uygulanan gruplarda ise enzim aktivitesinin baskılandığı tespit edilmiştir.

20 ppm boya eklenen gruplarda uygulamadan sonraki 1. gündeki ve 50 ppm boya eklenen gruplarda ise 1 ve 5. günlerdeki, kontrole göre katalaz enziminin aktivite değişimi istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05).



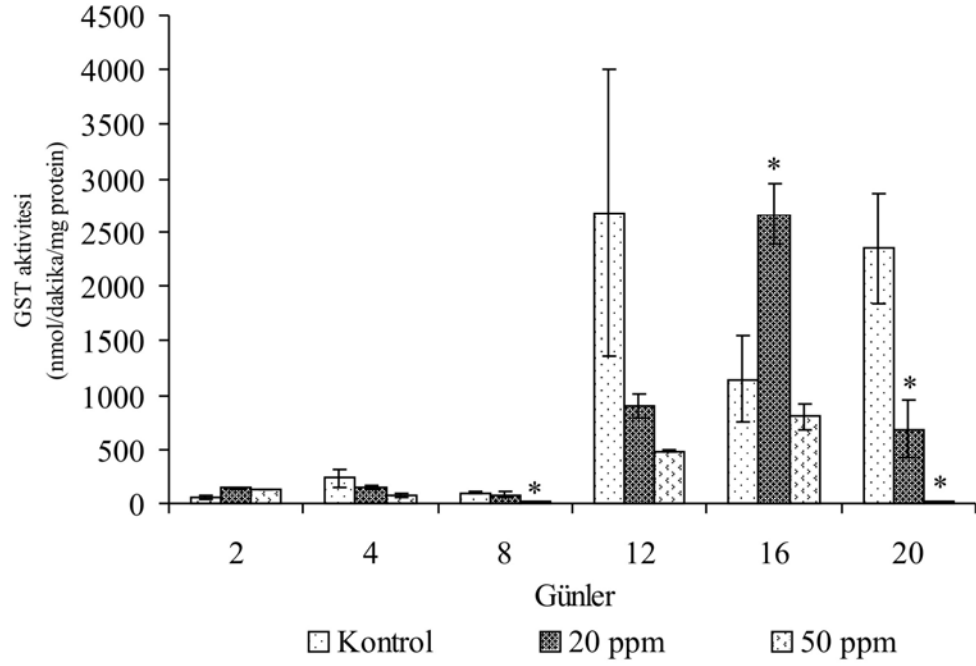
Şekil 4.3. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*’da günlere bağlı katalaz enziminin aktivitesindeki değişimler.
* P<0.05

4.1.2. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi

P. chrysosporium’un glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi Astrazon Kırmızı FBL’ye maruz bırakılan gruplarda saptanmış ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4; 4.5 ve 4.6).

Üremenin ilk gününde boya uygulanan grupların kontrollerinde 2. güne enzim aktivitesinde (62.64 ± 19.68 nmol/dakika/mg protein) göre enzim aktivitesi 4, 8, 12, 16 ve 20. günlerde (233.61 ± 81.61 , 94.88 ± 11.50 , 2679.61 ± 1318.8 , 1145.78 ± 392.81 2353.18 ± 514.96 nmol/dakika/mg protein) bir yükselme tespit edilmiştir. Üremenin ilk gününde 20 ppm boya uygulanan gruplarda kontrole göre sadece 2 ve 16. günlerde (137.79 ± 11.90 , 2671.42 ± 277.74 nmol/dakika/mg protein) aktivitede bir artış gözlenmiştir. 50 ppm boya uygulanan gruplardaki enzim aktivitesi hem kontrol grubu hem de 20 ppm boya uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür.

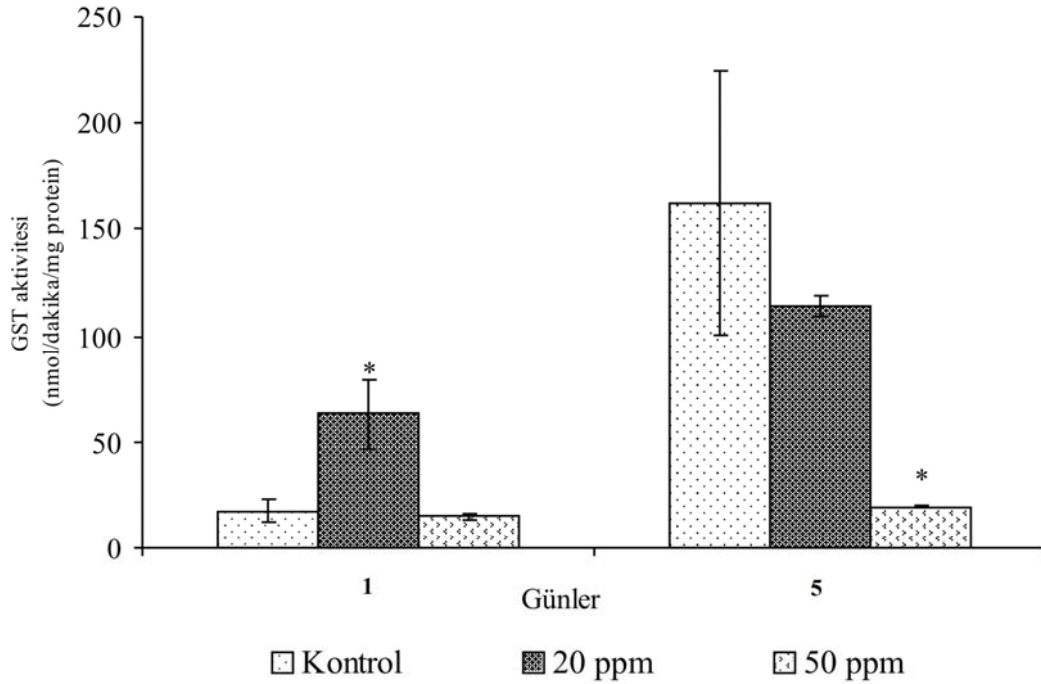
20 ppm boya eklenen gruplarda 16 ve 20. günlerdeki ve 50 ppm boya eklenen gruplarda ise 8 ve 20. günlerdeki, enzim aktivitesi değerleri kontrole göre glutasyon S-transferaz enzimi aktivitesi bakımından istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).



Şekil 4.4. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon S-transferaz enziminin aktivitesindeki değişimler.
* P<0.05

Üremenin ikinci gününde boya uygulanan grupların kontrollerinde, boya uygulamasını takip eden 5. günde GST aktivitesinde 1. güne göre bir artış saptanmıştır. 20 ppm boya uygulanan gruplarda, uygulamasından sonraki 1. günde kontrole göre bir artış, 5.günde (114.22 ± 4.74 nmol/dakika/mg protein) ise azalma saptanmıştır. Üremenin ikinci günü 50 ppm boya uygulanan gruplarda uygulama süresine bağlı bir değişiklik gözlenmemekle birlikte, kontrol grubuna ve 20 ppm boya uygulanan gruplara göre aktivitede bir azalma saptanmıştır.

Üremenin ikinci günü 20 ppm boya eklenen gruplarda uygulamadan sonraki 1. gündeki ve 50 ppm boya eklenen gruplarda 5. gündeki, kotrole göre GST enziminin aktivite değişimi istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($P<0.05$).



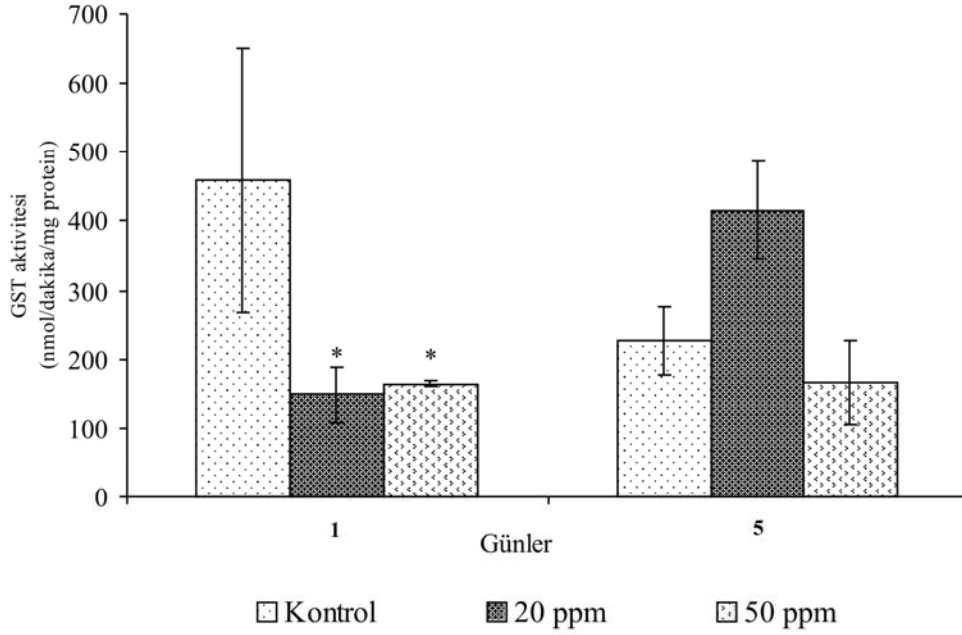
Şekil 4.5. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon S-transferaz enziminin aktivitesindeki değişimler.

* $P < 0.05$

Üremenin altıncı günü boya uygulanan grupları için oluşturulan örneklerde kontrol boya uygulamasından sonraki 5. günde 1. güne göre enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. 20 ppm boya uygulanan gruplarda 1. günde kontrole göre düşük, 5. günde ise kontrole göre daha yüksek bir aktivite saptanmıştır. Altıncı günde 50 ppm boya uygulanan gruplarda enzim aktivitesi hem kontrol hem de 20 ppm boya uygulanan gruplara göre daha düşüktür. 5. günde, 1. güne göre aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.

Genel olarak GST aktivitesinin hem düşük dozda (20 ppm), hem de yüksek dozda (50 ppm) boya uygulanan gruplarda kontrole göre inhibisyona uğradığı saptanmıştır.

Üremenin 6. günü boya eklenen gruplarda 20 ppm ve 50 ppm boya eklenen gruplarda uygulamadan sonraki 1. günde gözlenen, kontrole göre glutatyon S-transferaz enziminin aktivitesindeki değişim istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$).



Şekil 4.6. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon S-transferaz enziminin aktivitesindeki değişimler.

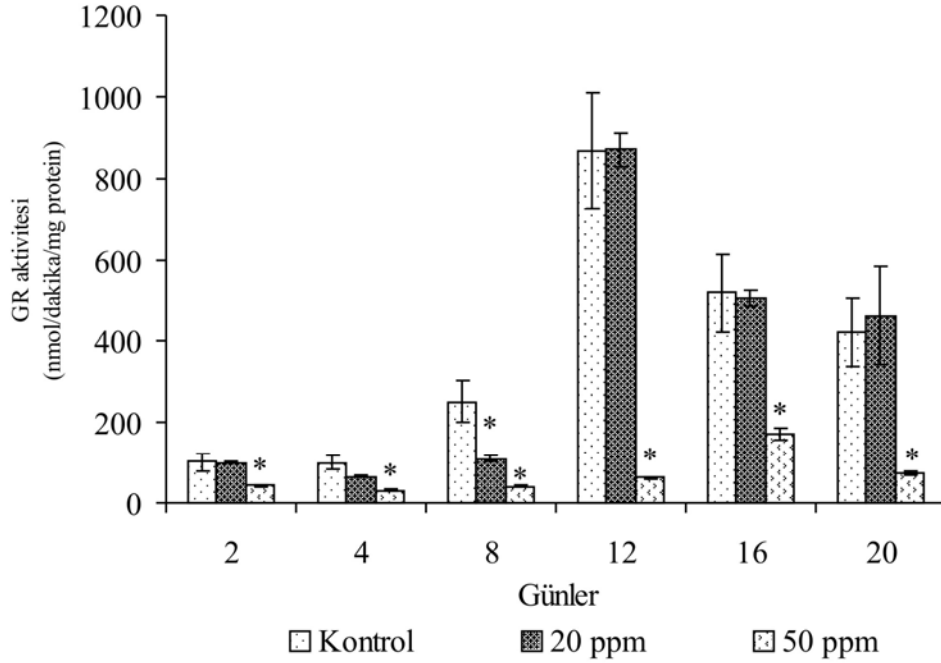
* P<0.05

4.1.3. Glutatyon Redüktaz Aktivitesi

P. chrysosporium'un glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi Astrazon Kırmızı FBL'ye maruz bırakılan gruplarda saptanmış ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.7; 4.8 ve 4.9).

Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulaması için oluşturulan kontrol gruplarında 2. güne (100.75 ± 20.48 nmol/dakika/mg protein) göre 8, 12, 16 ve 20. günlerde enzim aktivitesinde bir artış kaydedilmiştir (252.18 ± 50.32 , 866.82 ± 143.89 , 517.86 ± 94.42 , 421.85 ± 82.25 nmol/dakika/mg protein). İlk günde 20 ppm boya uygulanan gruplardaki aktivitenin kontrole göre 2, 4, 8 ve 16 günde (99.31 ± 3.70 , 65.47 ± 4.07 , 108.99 ± 8.09 , 504.03 ± 19.84 nmol/dakika/mg protein) daha düşük, 12. ve 20. günde (870.67 ± 40.67 , 462.61 ± 118.28 nmol/dakika/mg protein) daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Üremenin ilk gününde 50 ppm boya uygulanan gruplarda 2, 4, 8, 12, 16 ve 20. (0.070 ± 0.004 , 0.231 ± 0.009 , 0.680 ± 0.040 , 2.152 ± 0.206 , 0.740 ± 0.066 , 2.709 ± 0.041 nmol/dakika/mg protein) günlerde enzim aktivitesi hem kontrol hem de 20 ppm boya uygulanan gruplara göre inhibe olmuştur.

20 ppm boya eklenen gruplarda 8. günde ve 50 ppm boya eklenen gruplarda ise tüm günlerde kontrole göre GR enziminin aktivitesindeki değişim istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($P<0.05$).

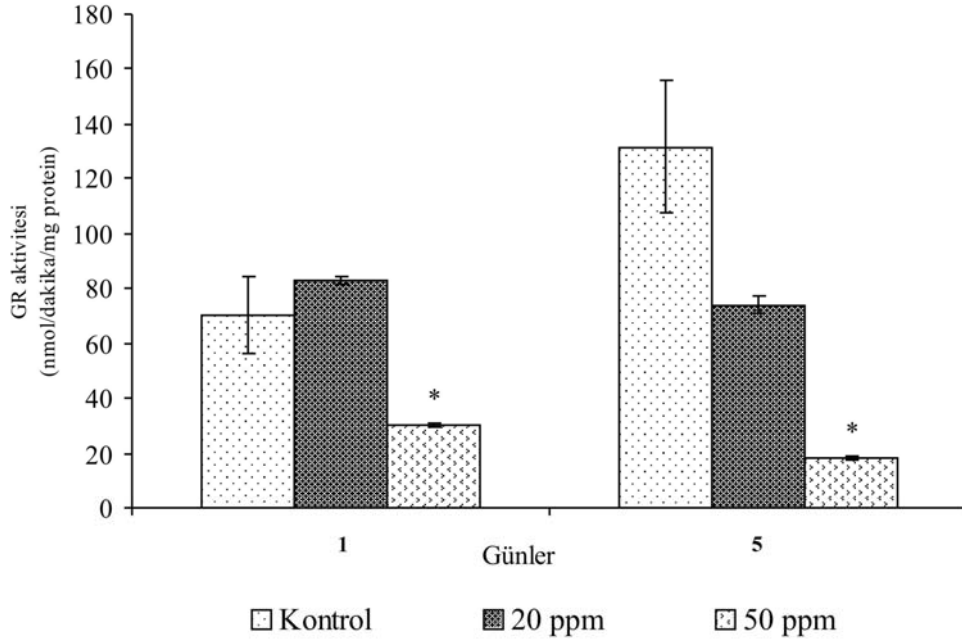


Şekil 4.7. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler.

* $P<0.05$

Üremenin ikinci günü boya uygulanan gruplar için oluşturulan kontrol grubunda boya uygulamasından sonraki 5. günde (131.68 ± 24.19 nmol/dakika/mg protein) 1. güne (70.57 ± 14.13 nmol/dakika/mg protein) göre GR aktivitesinde bir artış olduğu saptanmıştır. 20 ppm boya uygulanan gruplarda kontrole göre uygulamadan sonraki 1. günde aktivitenin yükseldiği 5. günde ise düştüğü gözlenmiştir. Üremenin ikinci günü 50 ppm boya uygulanan gruplarda kontrole ve 20 ppm boya uygulanan gruplara göre aktivitede inhibisyon olduğu tespit edilmiştir. 50-20 ppm boya uygulanan gruplarda 1. gündeki enzim aktivitesi 5. güne göre daha yüksektir.

Üremenin ikinci gününde boya eklenen gruplarda uygulamadan sonraki 1 ve 5. günlerde, kontrole göre glutatyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).



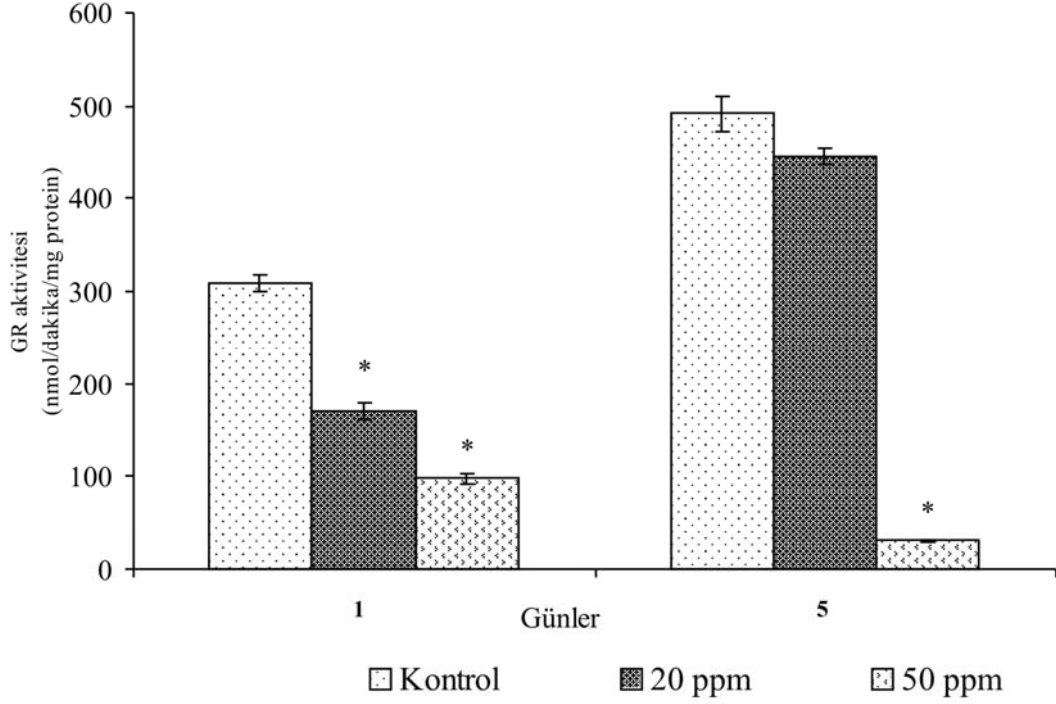
Şekil 4.8. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutasyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler.

* $P < 0.05$

Üremenin altıncı gününde boya uygulanan grupların kontrollerinde boya uygulamasından sonraki 5. günde 1. güne göre enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. Altıncı günde 20 ppm boya uygulanan gruplarda uygulamadan sonraki 1. ve 5. günlerde (171.25 ± 8.95 , 446.17 ± 8.64 nmol/dakika/mg protein) kontrole göre aktivitede azalma gözlenmiştir. 50 ppm boya uygulanan gruplarda hem kontrol hem de 20 ppm boya uygulanmış olan gruplara göre enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. 5. günde (31.04 ± 0.93 nmol/dakika/mg protein) kontrol ve 20 ppm boya uygulanmış gruplardaki aktivitenin 1. güne (98.04 ± 5.50 nmol/dakika/mg protein) göre yüksek olduğu gözlenirken iken 50 ppm boya uygulanmış gruplarda düşük olduğu saptanmıştır.

Genel olarak üremenin ilk gününde başlangıç dozunda (20 ppm) boya uygulanan gruplarda GR aktivitesinde kontrole göre bir artış gözlenirken, üremenin ikinci ve altıncı günlerinde boya uygulanan gruplarda bir düşüş gözlenmiştir. Yüksek dozda (50 ppm) boya tüm uygulama gruplarda ise enzim aktivitesinin baskılandığı tespit edilmiştir.

Üremenin altıncı günü 20 ppm boya eklenen gruplarda uygulamadan sonraki 1. günde, 50 ppm boya eklenen gruplarda 1 ve 5. günlerde kontrole göre GR enziminin aktivitesindeki değişimi istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.9. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon redüktaz enziminin aktivitesindeki değişimler.

* $P<0.05$

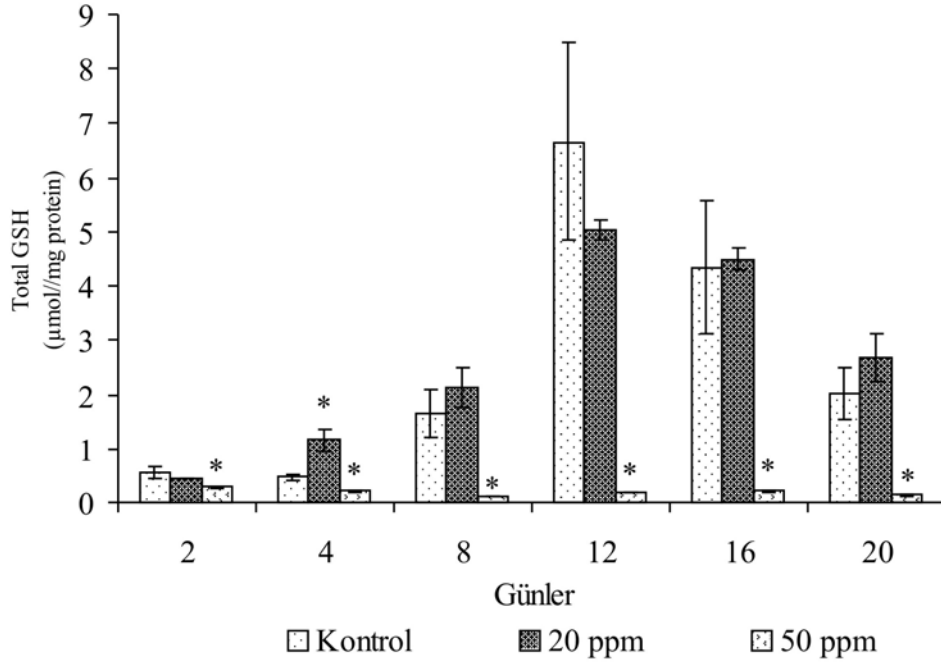
4.1.4 Total Glutatyon Seviyeleri

P. chrysosporium'un total glutatyon seviyeleri Astrazon Kırmızı FBL'ye maruz bırakılan gruplarda saptanmış ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.10; 4.11 ve 4.11).

Total glutatyon seviyesi için üremenin ilk günü boya uygulanan grupların kontrollerinde 2. güne göre 4. günde GSH seviyesinde düşüş tespit edilmiştir. 8, 12, 16 ve 20. günlerde (1.640 ± 0.439 , 6.665 ± 1.814 , 4.344 ± 1.229 , 2.034 ± 0.475 $\mu\text{mol/mg protein}$) ise GSH seviyesinde artış gözlenmiştir. Kontrolde GSH'ın 12. günde en yüksek seviyeye ulaştığı kaydedilmiştir. 20 ppm boya uygulanan gruplarda 2 ve 12. (0.436 ± 0.013 , 5.048 ± 0.182 $\mu\text{mol/mg protein}$) günlerde GSH seviyesi kontrole göre düşüken 4, 8, 16 ve 20. günlerde (1.163 ± 0.198 , 2.141 ± 0.368 , 4.500 ± 0.186 , 2.670 ± 0.438 $\mu\text{mol/mg protein}$) yüksektir. 50 ppm boya uygulanan gruplarda GSH

seviyesi günlere göre çok fazla değişiklik göstermemekle birlikte kontrol ve 20 ppm boya uygulanan gruplara göre düşüktür.

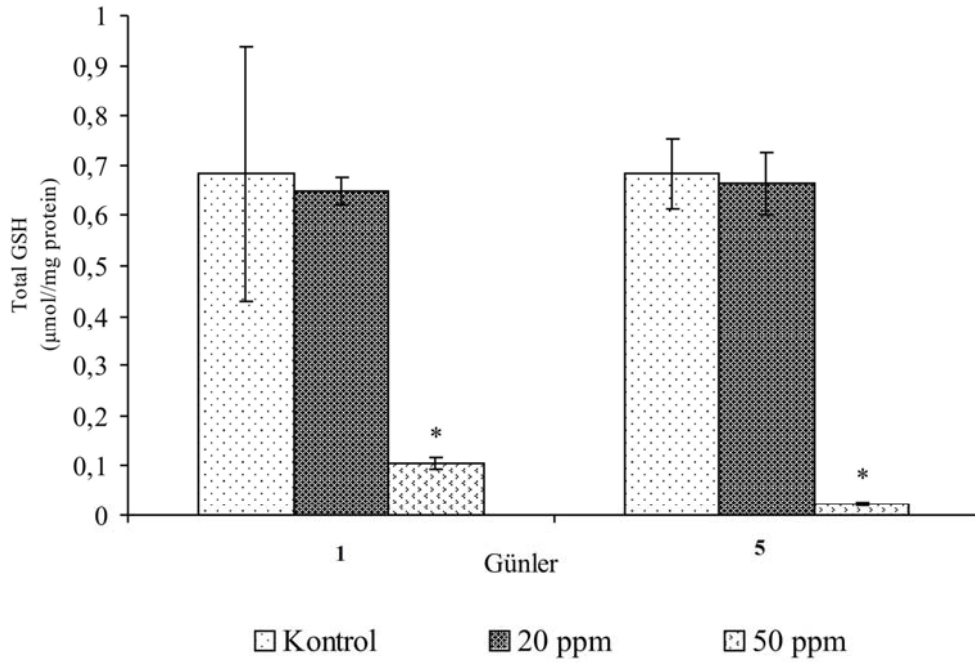
20 ppm boya eklenen gruplarda sadece 4. günde, 50 ppm boya eklenen gruplarda ise tüm günlerde kontrole göre glutasyon seviyesindeki değişim istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.10. Üremenin ilk gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*’da günlere bağlı glutasyon seviyesindeki değişimler.
* $P<0.05$

Üremenin ikinci gününde boya uygulanan grupların kontrollerinde boya uygulamasından sonraki 1 ve 5. günlerde (0.684 ± 0.253 , 0.683 ± 0.069 $\mu\text{mol/mg protein}$) glutasyon seviyesinde değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. 20 ppm boya uygulanan gruplarda uygulamadan sonraki 1 ve 5. günlerde (0.647 ± 0.027 , 0.663 ± 0.062 $\mu\text{mol/mg protein}$) GSH seviyesinin kontrole yakın olduğu saptanmıştır. 50 ppm boya uygulanan gruplarda ise 1 ve 5. günde (0.105 ± 0.013 , 0.024 ± 0.003 $\mu\text{mol/mg protein}$) GSH seviyesinin hem kontrol hem de 20 ppm boya uygulanan gruplara göre oldukça düşük olduğu gözlenmiştir.

Üremenin ikinci günü 50 ppm boya eklenen gruplarda uygulamadan sonraki 1 ve 5. günlerde kontrole göre glutasyon miktarında gözlenen değişim istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

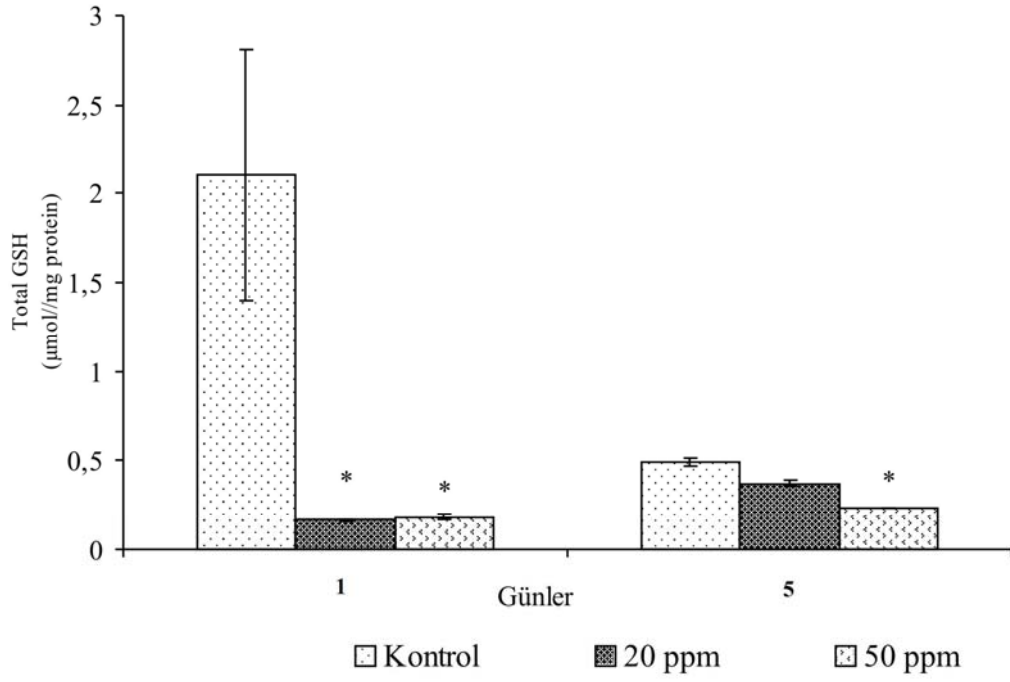


Şekil 4.11. Üremenin ikinci gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon seviyesindeki değişimler.

* P<0.05

Üremenin altıncı gününde boya uygulanan grupların kontrollerinde boya uygulamasından sonraki 5. günde (0.494 ± 0.026 $\mu\text{mol/mg protein}$) 1. güne (2.107 ± 0.703 $\mu\text{mol/mg protein}$) göre GSH seviyesinin düşük olduğu saptanmıştır. 20 ppm boya uygulanan gruplarda 5. günde (0.372 ± 0.015 $\mu\text{mol/mg protein}$) seviye 1. güne (0.167 ± 0.005 $\mu\text{mol/mg protein}$) göre daha yüksek olduğu ve her iki günde de kontrole göre GSH seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Üremenin altıncı gününde 50 ppm boya uygulanan gruplarda GSH seviyesi boya uygulamasından sonraki 5. günde (0.236 ± 0.004) 1. güne (0.181 ± 0.017 $\mu\text{mol/mg protein}$) göre daha yüksektir. Bu grupta her iki günde de kontrole göre GSH seviyesi düşük olmakla birlikte 20 ppm boya uygulanan gruplara göre 1.günde yükselme 5. günde düşüş tespit edilmiştir.

Üremenin altıncı günü 20 ppm boya eklene gruplarda uygulamadan sonraki 1. gün, 50 ppm boya eklenen gruplarda ise 1 ve 5. günlerde kontrole göre glutatyon seviyesindeki değişim istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($P < 0.05$).



Şekil 4.12. Üremenin altıncı gününde 20 ppm ve 50 ppm boya uygulanan *P. chrysosporium*'da günlere bağlı glutatyon seviyesindeki değişimler.
* P<0.05

Çizelge 4.1. Üretimin 1. gününde 20 ppm ve 50 ppm Ast. Kır. boyasına maruz bırakılan *P. chrysosporium*'da 2, 4, 8, 12, 16 ve 20. günlerde enzim aktivitesi (GST (nmol/dakika/mg protein), CAT (μmol/dakika/mg protein), GR(nmol/dakika/mg protein)) ve Total GSH (μmol/mg protein) düzeyindeki değişimler

Doz (ppm)		n	2	4	8	12	16	20
GST	Kontrol	6	62.64±19.68	233.61±81.61	94.88±11.50	2679.61±1318.8	1145.78±392.81	2353.18±514.96
	20	3	137.79±11.90	148.97±16.96	78.48±23.41	906.37±112.35	2671.42±277.74	681.74±267.03
	50	3	130.87±2.19	73.03±13.18	16.76±0.89	486.10±7.37	800.47±124.14	21.25±0.12
GSH	Kontrol	6	0.547±0.105	0.463±0.049	1.640±0.439	6.665±1.814	4.344±1.229	2.034±0.475
	20	3	0.436±0.013	1.163±0.198	2.141±0.368	5.048±0.182	4.500±0.186	2.670±0.438
	50	3	0.279±0.015	0.215±0.023	0.106±0.008	0.184±0.006	0.209±0.014	0.133±0.013
GR	Kontrol	6	100.75±20.48	99.84±16.01	252.18±50.32	866.82±143.89	517.86±94.42	421.85±82.25
	20	3	99.31±3.70	65.47±4.07	108.99±8.09	870.67±40.67	504.03±19.84	462.61±118.28
	50	3	41.76±3.11	31.49±1.91	40.17±1.99	61.56±2.04	170.16±14.54	72.71±5.84
CAT	Kontrol	6	0.185±0.023	1.052±0.199	6.168±1.129	26.439±11.102	39.141±18.955	3.773±0.969
	20	3	0.083±0.031	0.960±0.054	8.050±0.313	28.337±3.241	27.968±3.597	2.203±0.189
	50	3	0.070±0.004	0.231±0.009	0.680±0.040	2.152±0.206	0.740±0.066	2.709±0.041

Çizelge 4.2. Üretimin 2. gününde 20 ppm ve 50 ppm Ast. Kır. boyasına maruz bırakılan *P. chrysosporium*'da uygulamadan sonraki 1. ve 5. günlerde enzim aktivitesi (GST (nmol/dakika/mg protein), CAT (μmol/dakika/mg protein), GR(nmol/dakika/mg protein)) ve Total GSH (μmol/mg protein) düzeyindeki değişimler

Enzim	Doz (ppm)	n	1	5
	50	3		
GST	Kontrol	6	17.78±5.20	162.47±62.17
	20	3	63.02±16.33	114.22±4.74
	50	3	15.26±1.36	19.81±0.49
GSH	Kontrol	6	0.684±0.253	0.683±0.069
	20	3	0.647±0.027	0.663±0.062
	50	3	0.105±0.013	0.024±0.003
GR	Kontrol	6	70.57±14.13	131.68±24.19
	20	3	82.85±1.50	74.14±3.11
	50	3	30.31±0.53	18.11±0.63
CAT	Kontrol	6	1.376±0.541	4.094±1.048
	20	3	2.543±0.199	4.527±0.117
	50	3	0.254±0.013	0.962±0.047

Çizelge 4.3. Üretimin 6. gününde 20 ppm ve 50 ppm Ast. Kır. boyasına maruz bırakılan *P. chrysosporium*'da uygulamadan sonraki 1. ve 5. günlerde enzim aktivitesi (GST (nmol/dakika/mg protein), CAT (μmol/dakika/mg protein), GR(nmol/dakika/mg protein)) ve Total GSH (μmol/mg protein) düzeyindeki değişimler

Enzim	Doz (ppm)	n	1	5
GST	Kontrol	6	459.84±191.56	226.76±50.05
	20	3	148.17±40.96	416.36±70.45
	50	3	164.16±3.37	165.97±61.69
GSH	Kontrol	6	2.107±0.703	0.494±0.026
	20	3	0.167±0.005	0.372±0.015
	50	3	0.181±0.017	0.236±0.004
GR	Kontrol	6	308.90±8.38	491.42±18.44
	20	3	171.25±8.95	446.17±8.64
	50	3	98.04±5.50	31.04±0.93
CAT	Kontrol	6	15.343±1.530	19.469±1.421
	20	3	11.793±0.510	22.297±0.762
	50	3	6.301±0.282	13.310±0.113

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Cd, Pb, Cu gibi ağır metaller, pestisitler ve endüstriyel atık sular gibi çevre kirleticileri oksidatif stresle ilişkili olarak pek çok organizma için toksik etki gösterebilir. Aynı zamanda bu çevresel kirleticiler oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türlerinin üretimine de neden olabilir. Aerobik organizmalar reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran ve hücre homeostasisinin kontrolünde önemli rol oynayan antioksidan sistemlere sahiptirler. Bu maddelere direkt veya indirekt yollarda maruz kalan organizmalarda bu sistemin verdiği antioksidan cevabın tam olarak anlaşılması bu çevre kirleticilerinin ekosistemde oluşturabilecekleri risklerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu çevre kirleticilerine maruz bırakılma sonucu canlı hücrelerde bulunan antioksidatif enzim sistemleri ve proteinler çeşitli şekillerde etkilenmektedir. Normal koşullarda hücrede reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Ancak oksidatif stresin artmasıyla antioksidan sistemde yer alan enzimlerin aktivitelerinde indüksiyon veya inhibisyon meydana gelmektedir [100].

Çevre kirleticilerin oluşturdukları oksidatif stresi saptamak da işte bu antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimlerin gösterilmesiyle sağlanmaktadır. Kirleticiler tarafından oluşturulan oksidatif stres göstermek için antioksidan savuna sistemindeki değişimleri temel alan çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır [99, 100].

Yaptığımız çalışmada Astrazon Kırmızı'nın farklı konsantrasyonlarının antioksidan sistem enzimlerinin aktiviteleri ve GSH seviyesi üzerinde inhibe edici ya da indükleyici etkiye sahip olduğunu tespit ettik. Ott ve arkadaşları da (2002) fungal kültürlerle bir ksenobiyotik olan kadmiyumun eklenmesi sonucunda, uygulama grupları kontrolle karşılaştırıldığında antioksidan enzim aktivitelerinde artış ve düşüşlere neden olduğu tespit etmişlerdir [100]. Bu durum boyar maddeler dışında diğer ksenobiyotiklerin benzer etkilere yol açacağına işaret eder.

Çalışmamızda üretimin 2. gününde 50 ppm Astrazon Kırmızı boyasına maruz bırakılan uygulama grubundaki GST, GR, CAT enzimlerinin aktiviteleri ve GSH miktarında kontrol grubuna göre bir inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni yüksek dozda boya uygulamasına bağlı olarak radikal üretimindeki artış sonucu, enzim sentezinde bir baskılanmanın olmasıdır. Nagalakshmi ve arkadaşları (2001) *Scenedesmus bijugatus*'a 50, 100, 200 µM bakır uyguladıklarında glutatyon redüktaz aktivitesinin baskılandığını saptamış ve bunun nedeninin bir ağır metal olan bakırın

GR'ın aktif merkezindeki tiyol grubuyla reaksiyona girmesi olduğunu vurgulamışlardır [101].

Benzer şekilde Nicolosi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir herbisit olan 3-amino-1,2,4- triazole uygulamasının katalaz aktivitesini % 95 oranında inhibisyona neden olduğunu tespit etmişlerdir [102].

Sun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da HC Orange No.1 saç boyasına maruz kalan *Carassius auratus*'un katalaz aktivitesinde kontrol gruplarına göre önemli bir azalma olduğunu saptamışlardır [93].

Yaptığımız çalışmada 20 ppm'lik boya uygulamalarında ise boya uygulamasının erken evresi olan 1. günde enzim aktivitelerinde ve GSH miktarında genellikle bir artış, geç evresinde yani 5. günde ise genellikle hem kontrol grubuna, hem de 1. güne göre bir baskılanma gözlenmiştir. Enzim aktivitelerindeki ve GSH miktarındaki artışın nedeni fungus üremesinin erken safhasında boya uygulamasına bağlı olarak oluşan radikalleri temizleyecek antioksidan enzimlerin sentezindeki indüksiyona bağlanabilir. Bu indüksiyonun sebebi çeşitli kirleticilere maruz kalan organizmaların bu kirleticileri ve metabolitlerini ortadan kaldırmak için metabolize etmeleri ve hücrel zararını minimize etmelerinden kaynaklanmaktadır. Ksenobiyotikler tarafından aktive edilen reaktif oksijen türlerinin oluşması hücrel antioksidan savunma sistemi tarafından elimine edilmektedir. Bu enzimlerin önemli bir özelliği oksidatif stres şartlarında indüklenmesidir. *P. Chrysosporium*'un boyalı ortamda üretilmesine bağlı olarak oksidatif stres indüklenmiş ve buna bağlı olarak da CAT ve GST enzimleri ile GSH seviyesi etkilenmiştir. 20 ppm'lik ve 50 ppm'lik boya uygulamalarında boya uygulamasının geç evresinde, yani 5. günde ise genellikle hem kontrol grubuna hem de 1. güne göre bir baskılanmanın gözlenmesi ise enzimlerin şiddetli bir oksidatif strese karşı adaptif mekanizmalarının kaybı nedeniyle dir.

Fungus üremesinin geç evresi olan 6. günde 50 ppm'lik boya uygulamasında ise GST, GR, CAT enzim aktiviteleri ve GSH miktarı hem kontrol grubuna göre hem de uygulama sonrası 1. ve 5. günlerde baskılanmıştır. 20 ppm'lik uygulamada GST, GR, CAT enzim aktiviteleri ve GSH miktarı boya uygulamasının 1. günü olan ve fungus üremesinin erken safhasında düşük iken, 5. günde artış göstermiştir. Boyaya maruz kalma süresi arttıkça enzim aktiviteleri de indüklenmektedir. Antioksidan enzimlerdeki bu değişim boya konsantrasyonuna ve boyaya maruz kalma süresine bağlı olarak değişime uğramıştır. Çünkü antioksidan savunma oksidatif stresin az olduğu durumlarda indüklenebilir. Ancak şiddetli bir oksidatif stres, bu enzimlerin aktivitelerini

baskılamaktadır. Oksidatif zarar yüzünden enzimlerde telafi yeteneklerinin kaybına neden olmaktadır. Ksenobiyotiklerin, oksidatif stresi indüklemesi ve enzimlerin cevapları arasında bir korelasyon vardır. Şiddetli bir oksidatif stres enzimlerin adaptif mekanizmalarının kaybı yüzünden baskılanabilir. Eğer enzimler indükleniyorsa meydana gelen radikaller hala enzimlerin eliminasyon kapasitesi içindedir.

Yaptığımız çalışmada 20 ppm'lik uygulamada GSH miktarı boya uygulamasının 1. günü olan ve fungus üremesinin erken safhasında düşük iken, 5. günde artış göstermiştir. Çünkü GSH, oksiradikalleri temizleyen önemli bir antioksidan savunma sistemi elamanıdır. GSH, aynı zamanda elektrofilik maddelerle konjugasyonda bir reaktant olarak görev yapmaktadır. Bu yüzden GSH seviyesindeki değişiklik bir organizmanın detoksifikasyon yeteneğinin çok önemli bir belirteçidir. GSH genellikle oksidatif strese karşı savunmanın ilk basamağını oluşturur. Bir organizmanın kirleticilere maruz kalma süresinin artmasıyla oksiradikallerinin artışına paralel olarak GSH seviyesi de indüklenmektedir.

Sun ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada HC Orange No.1 saç boyasına maruz kalan *Carassius auratus*'da GSH seviyesinde kontrol gruplarına göre önemli oranda indüklenmeyi saptamışlardır [93].

Fungus üretiminin ilk gününde itibaren boya eklenen gruplarda GST aktivitesinde hem kontrol gruplarında ve hem de 20 ppm boya eklenen gruplarda genel olarak zamana bağlı bir artış gözlenmiştir.

GST'nin detoksifikasyon sisteminde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. GST redükte glutatyonla birlikte ksenobiyotiklerin metabolize edilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda birçok ksenobiyotiğin GST aktivitesini artırdığı saptanmıştır. GST aktivitesinin artışı, boyanın daha yüksek miktarlarına karşı metabolik bir adaptasyondur. GST indüksiyonu ile boya toksisitesi azalmaktadır. Birhanlı ve Özmen'in (2005) yaptıkları çalışmada astrazon kırmızı tekstil boyasına maruz kalan *Xenopus* iribaşlarında GST artış gösterdiğini gözlemiştir [103]. Anguiano v.d.'nin yaptığı başka bir çalışmada da insektisit uygulamasına bağlı olarak *Xenopus* embriolarında GST aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [104].

Sun ve arkadaşları da HC Orange No.1 saç boyasının, *Carassius auratus*'da GST ezim aktivitesinin kontrol gruplarına göre önemli oranda arttığını saptamışlardır [93].

Yaptığımız çalışmada 50 ppm'lik uygulamalarındaki GST aktivitesi ise kontrol gruplarıyla kıyaslandığında inhibisyon gözlenmektedir. Bu inhibisyon boya

uygulamasına bağılı olarak hücrede oksidatif stres oluşturmakta ve oluşan radikaller GST aktivitesini inhibe etmektedir. 20 ppm boya uygulanan gruplarda GST aktivitesi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında indüklenme saptanmıştır. Hamed ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada endüstriyel kirleticilere maruz kalan *Oreochromis niloticus*'un farklı dokularında kontrolle karşılaştırıldığında GST, GPX ve GR aktivitesinin arttığı saptanmıştır [105]. Hücredeki bu zararı önlemek ve radikalleri temizlemek için antioksidan enzimler bol miktarda üretilmektedir. Aynı zamanda oluşan radikaller enzim sentezine de engel olmaktadır.

GST'nin hücredeki radikalleri temizlemek için tüketilmesine paralel olarak GSH miktarıda düşmektedir. GSH oksidatif strese karşı önemli bir savunma molekülüdür ve radikal süpürücüdür. GSH düzeyindeki değişim hücredeki oksidatif stresin önemli bir göstergesidir. GST enzimi, GSH'ı kullanarak görev yaptığından dolayı 50 ppm'lik boya uygulanan grupta GSH miktarında da kontrol gruplarına göre dikkat çekici bir oranda baskılanma gözlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada 50 ppm'lik uygulamalarda katalaz enziminin aktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bir baskılanma göze çarpmaktadır. Bu baskılanmanın boya uygulamasına bağılı olarak artan H_2O_2 'in hücrelerden temizlenmesi için GST ve CAT enzimlerinin tüketilmesine bağılı olduğu söylenebilir. Aynı zamanda artan H_2O_2 bu enzimlerin sentezi üzerinde baskılanma yaptığıda söz konusu olabilir. Katalaz aktivitesindeki baskılanma H_2O_2 'in artışına neden olmaktadır. Biriken H_2O_2 süperoksit radikalleriyle reaksiyona girerek $\cdot OH$ radikallerini oluşturmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki en zararlı radikal ise $\cdot OH$ radikalidir. $\cdot OH$ radikalinin artışı, hücresel antioksidan sisteminin etkisiyle de serbest radikal zincir reaksiyonlarını sitümüle ederek hücresel zarara neden olmaktadır. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Carassius auratus*'da 2,4-dichlorophenol uygulamasına bağılı olarak GSH düzeyinin baskılandığı saptanmıştır. Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlara paralellik göstermektedir [106].

20 ppm boya uygulanan gruplarda 2 ve 4. günlerde CAT aktivitesinde kontrole göre bir artış gözlenmemiştir ancak 12. günden sonra CAT aktivitesi yükselmiş fakat 20. günde tekrar düşmüştür. Benzer olarak Guelfi ve ark. yaptıkları deneyde bir okidatif stres faktörü olan 0.05 mM kadmiyum uygulanan *Aspergillus nidulans*'ın katalaz aktivitesi uygulamadan sonraki 6 ve 9. saatlerde CAT aktivitesinde bir artış belirlenememiş fakat 9. saatten sonra aktivite artmıştır.

Yaptığımız çalışmada farklı günlerde boya eklenen grupların kontrollerindeki enzim aktivitelerindeki değişkenlik, farklı günlerde yapılan deneylerde kullanılan hızlı yaşlanan bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium*'un stok kültürlerinin farklı yaşta olmasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile, *Phanerochaete chrysosporium*'un ve tüm canlıların çevredeki ksenobiyotiklere ve özellikle de tekstil sanayisinde yaygın olarak kullanılan ve kontrolsüz bir şekilde çevreye deşarj edilen boyar maddelere direkt veya direkt maruz kalması sonucunda verdikleri antioksidan cevabın tam olarak anlaşılması bu çevre kirleticilerinin ekosistemde oluşturabilecekleri risklerin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu konu mikrobiyal ekologlarca önemli olduğu kadar mikrobiyal fizyologlar ve biyoteknolojide çok çeşitli amaçlarla kullanılan beyaz çürükçül fungusların ürün üretim sürelerini artırmayı amaçlayan biyoteknologlarca da çok önemlidir.

Aynı zamanda yaptığımız çalışmanın sonucunda biyoteknolojik öneme sahip olan beyaz çürükçül fungusların stres faktörlerine karşı verdikleri antioksidan cevap belirlenerek bu konuda literatüre yeni bazı bilimsel katkılar sağlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Kışlalıoğlu, F. Berkes, *Ekoloji ve Çevre Bilimleri*, Büyük Fikir Kitapları Dizisi, 95, İkinci Basım-Ocak, 1994, s.14
- [2] N. Çepel, *Ekolojik Sorunlar Ve Çözümleri*, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, 180, Birinci Basım-Temmuz, 2003, s. 23-24
- [3] *Türkiye'nin Çevre Sorunları*, Türkiye Çevre Vakfı Yayınları, 163, Ankara, 2003, s. 89
- [4] F. O. Kocaer, U. Alkan, *Boyar madde içeren tekstil atıksularının arıtım alternatifleri*, **Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi**, 7:1 (2002) 47-55
- [5] A. A. Dias, R. M. Bezerra, P. M. Lemos and A. N. Pereira, *In vivo and laccase-catalysed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 19 (2003) 969-975
- [6] C. A. Fewson, *Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds*, **Trends Biotechnol**, 6 (1998) 148-153
- [7] N. Mathur, P. Bhatnagar, P. Nagar, M.K. Bijarnia, *Mutagenicity assessment of Sanganer, Jaipur (India):a case study*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 61 (2005), 105-113
- [8] E. A. Clarke, R. Anliker, *Organic dyes and pigments*. Hutzinger O, Editor. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Vol.3 Part A. Anthropogenic Compounds. **Springer-Verlag**, 1980, s. 181-215
- [9] S. Cing, Ö. Yeşilada, *Astrazon Red dye decolorization by growing cells and pellets of *Funalia trogii**, **J. Basic Microbiol.**, 44:4 (2004) 263-269
- [10] R. A. Eaton, M. D. C. Hale, *Wood: Decay, pest and protection*, **Chapman and Hall**, London (1993) 546
- [11] J. Chaudiere, R. F. Iliou, *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*, **Food and Chemical Toxicology**, 37 (1999) 949-962
- [12] D. J. Mustacich, S. W. Leonard, M. W. Devereaux, R. J. Sokol, M. G. Traber, *α -Tocopherol regulation of hepatic cytochrome P450s and ABC transporters in rats* **Free Radical Biology & Medicine** 41 (2006) 1069–1078
- [13] P. Lagrange, I. A. Romero, A. Minn, P. A. Revest, *Transendothelial permeability changes induced by free Radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier*, **Free Radical Biology & Medicine**, 27 (1999) 667–672
- [14] R. H. Elbekai, A. O. S. El-Kadi, *The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As^{3+} , Cd^{2+} , and Cr^{6+}* , **Free Radical Biology & Medicine** 39 (2005) 1499 – 1511
- [15] J. Widada, H. Nojiri, T. Omori, *Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation*, **Appl Microbiol Biotechnol**, 60 (2002) 45–59
- [16] H. F. Ridgway, J. Safarik, D. Phipps, P. Carl, D. Clark, *Identification and Catabolic Activity of Well-Derived Gasoline-Degrading Bacteria from a Contaminated Aquifer*, **Applied And Environmental Microbiology**, 56:11 (1990) 3565-3575
- [17] D. F. Paris, W. C. Steen, G. L. Baughman, J. T. Barnett, *Second-Order Model to Predict Microbial Degradation of Organic Compounds in Natural Waters*, **Jr. Applied and Environmental Microbiology**, 41:3 (1981) 603-609
- [18] C. E. Cerniglia, M. A. Heitkamp, *Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in the Aquatic Environment*, **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**, 38 (1989) 41-68.

- [19] A. Paszczynski, R.L. Crawford, *Degradation of azo compounds by ligninase from Phanerochaete chrysosporium: involvement of veratryl alcohol*, **Biochem Biophys Res Commun.**, 178:3 (1991) 56-63
- [20] M. L. Rabinovich, A. V. Bolobova, L. G. Vasil'chenko, *Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review*, **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40:1 (2004) 1-17.
- [21] E. Abadulla, T. Tzanov, S. Costa, K.H. Robra, A. C. Paulo, G. M. Gubitzi, *Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from Trametes hirsuta*, **Applied and Environmental Microbiology**, 66:8 (2000) 3357-3362
- [22] D. Wesenberg, I. Kyriakides, S. N. Agathos, *White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*, **Biotechnology Advances**, 22 (2003) 161–187.
- [23] C. Nebbia, *Biotransformation Enzymes as Determinants of Xenobiotic Toxicity in Domestic Animals*, **The Veterinary Journal**, 161 (2001) 238-252
- [24] E. P. Gallagher, J. L. Gardner, D. S. Barber, *Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria*, **Biochemical Pharmacology**, 71 (2006) 1619-1628
- [25] K. W. Seo, K. B. Kim, Y. J. Kim, J. Y. Cho, K. T. Lee, K. S. Cho, *Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats*, **Food and Chemical Toxicology**, 42 (2004) 107-114
- [26] F. J. Romero, J. Roma, F. B. Morell, B. Romero, J. S. Aguilar, A. L. Bosch, L. Ernster, *Reduction of Brain Antioxidant Defense Upon Treatment with Butylated Hydroxyanisole (BHA) and Sudan III in Syrian Golden Hamster*, **Neurochemical Research**, 25:3 2000 389-393
- [27] J. B. Sutherland, *Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi*, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 9:1 (1992) 53-61
- [28] T. Saito, K. Tako, Y. Yokogawa, M. Nishida, N. Yamashita, *Detoxification of Bisphenol A and Nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil*, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 98:1 (2004) 64-66
- [29] A. Linares, J. M. Caba, F. Liger, T. Rubia, J. Martinez, *Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using Phanerochaete flavidol-alba*, **Chemosphere** 51 (2003) 887–891
- [30] Ö. Yeşilada, B. Özcan, *Decolorization of orange II dye with the crude culture filtrate of white rot fungus, Coriolus versicolor*, **Tr. J. of Biology**, 22 (1998) 463-476
- [31] D. Wesenberg, F. Buchon, S.N. Agathos, *Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus Clitocybula duseinii* **Biotechnology Letters** 24, (2002) 989-993
- [32] S. Kahraman, Ö. Yeşilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white-rot fungi*, **Folia Microbiol**, 46:2 (2001) 133-6
- [33] Ö. Yeşilada, S. Şık, M. ŞAM, *Treatment of Olive Oil Mill Wastewater With Fungi*, **Tr. J. of Biology**, 23 (1999) 231-240
- [34] J. A. Field, E. Jong, G.F. Costa, J.A. Bont, *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi*, **Appl Environ Microbiol**, 58:7 (1992) 2219-2226
- [35] J.A. Bumpus, S.D. Aust, *Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium*, **Appl Environ Microbiol**, 53:9 (1987) 2001-2008
- [36] Ü. Yetis, G. Özcengiz, F.B. Dilek, N. Ergen, A. Erbay A. Dölek, *Heavy metal biosorption by white-rot fungi*, **Water Science and Technology** 38:4-5 (1998) 323–330

- [37] F. Yürekli, Ö. Yeşilada, M. Yürekli, S. F. Topcuoğlu, *Plant growth hormone production from olive oil mill and alcohol factory wastewaters by white rot fungi*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 15: 4, (1999) 503-505
- [38] E. Apohan, Ö. Yeşilada, *Role of white rot fungus Funalia trogii in detoxification of textile dyes*, **J. Basic Microbiol**, 45:2 (2005) 99–105
- [39] P. L. Hall, *Enzymatic transformation of lignin*, **Enzyme Microb. Technol**, 2:2 (1980) 170-176.
- [40] H. Aydın, *Bitkisel Boyarmadde Çözeltileriyle yün ve ipliğin boyanması ve yün boyamada adsorpsiyon izotermelerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 1995
- [41] İ. Başer, Y. İnancı, *Boyarmadde Kimyası*, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Matbaası, İstanbul, 1990, 47-53
- [42] T. L. Hu, S. C. Wu, *Assessment of the effect of azo dye RP₂B on the growth of a nitrogen fixing cyanobacterium-Anabaena sp.*, **Biores. Technol**. 77 (2000) 93–95
- [43] R. Powell, M. Murray, C. Chen, A. Lee, *Survey of the manufacture, import and uses for benzidine, related substances and related dyes and pigments*, **EPA Report** 560:13 (1979) 79-005. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- [44] G.S. Heiss, B. Gowan, E.R. Dabbs, *Cloning of DNA from a Rhodococcus strain conferring the ability to decolorize sulfonated dyes*, **FEMS Microbiol Lett**, 99 (1992) 221-226
- [45] C. O'Neill, A. Lopez, S. Esteves, F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, S. Wilcox, *Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent*, **Microbiol biotechnol**, 53 (2000) 249-254
- [46] N. Daneshvar, A. Oladegaragoze, N. Djafarzadeh, *Decolorization of basic dye solutions by electrocoagulation: An investigation of the effect of operational parameters*, **Journal of Hazardous Materials**, 129 (2006) 116-122
- [47] Y. Güzelhan, K. Sayar, M. Öztürk, İ. Kara, *Şizofrenide Serbest Radikaller* **Klinik Psikofarmakoloji Bülteni**, 10 (2000) 90-96
- [48] <http://www.mustafaaltinisik.org.uk>
- [49] K. Kılıç A. Kılıç, *Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri*, **Hacettepe Tıp Dergisi** 33:2 (2002) 110-118
- [50] K. Kılıç, *Oksijen radikalleri: Üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri*, **Biyokimya Dergisi**, 10:2 (1995)
- [51] H. Kour, M.J. Perkins, *The free radical chemistry of food additives*, New York, 1991
- [52] J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I. Nunez de Castro, *Antioxidant enzymes and human disease*, **Clin. Biochem.**, 32 (1999) 595–603
- [53] G. Tanırgan, M. Koldaş, F. Uras, *Serbest radikaller*, **Haseki Tıp Bülteni**, 32:4 (1994) 303-308
- [54] http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm
- [55] J. A. Thomas, *Including Glutathione, A Peptide For Cellular Defense Against Oxidative Stres*, AMES, 1999, p. 13
- [56] S.Y. Kim, O.J. Kwon, J.W. Park, *Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye*, **Biochem.**, 83 (2001) 437-444
- [57] B. Halliwell, *Drug antioxidant effects*, **Drugs**, 42:4 (1991) 569-605
- [58] www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html
- [59] B. Halliwell, *Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease*, **Am J Med**, 91 (1991) 14-21

- [60] F. Lledias, P. Rangel, W. Hansberg, **Oxidation of catalase by singlet oxygen J. Biol. Chem**, 273, (1998) 10630– 10637
- [61] R.K. Murray, P.A. Mayes, D.K. Granner, V.W. Rodwell, *Harper'in Biyokimyası*, Barış Kitabevi, İstanbul, 1993, 142
- [62] M. Zamocky, G. Regelsberger, C. Jakopitsch, and C. Obinger. *The molecular peculiarities of catalase-peroxidases*, **FEBS Lett**, 492 (2001) 177-182
- [63] C. Hunt, J.E. Sim, S.J. Sullivan, T. Featherstone, W. Golden, C.V. Kapp-Herr, R.A. Hock, R.A. Gomez, A.J. Parsian, D.R. Spitz, *Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress*, **Cancer Res**, 58 (1998) 3986–3992
- [64] A. White, P. Handler, E.L. Smith, *Principles of biochemistry*, New York, 1908, 407
- [65] J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey, *Glutathione Transferases*, **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 45 (2005) 51-88
- [66] W. H. Habig, M. J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I. M. Arias, W. B. Jakoby, *The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 71:10 (1974) 3879–3882
- [67] R. N. Armstrong, *Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily*, **Biochemistry**, 39 (2000) 13625-13632
- [68] C. A. Dowd, D. Sheehan, *Variable expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the fungus, Mucor circinelloides*, **FEMS Microbiology Lettrs**, 170 (1999) 13-17
- [69] Q. F. Wang, J. L. Miao, Y. H. Hou, Y. Ding, G. Y. Li, *Expression of CspA and GST by an Antarctic psychrophilic bacterium Colwellia sp. NJ341 at near-freezing temperature*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 22:4 (2006) 311-316
- [70] S. McGoldrick, S. M. O'Sullivan, D. Sheehan, *Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily*, **FEMS Microbiology Letters**, 242:1 (2005) 1-12
- [71] C. Burns, R. Geraghty, C. Neville, A. Murphy, K. Kavanagh, S. Doyle, *Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from Aspergillus fumigatus*, **Fungal Genetics and Biology**, 42 (2005) 319-327
- [72] Ö. Akyol, *Şizofrenide Oksidatif Stres Kocatepe Tıp Dergisi* 5 (2004) 15-25
- [73] R. Candas, S. Sohal, S.N. Radyuk, V.I. Klickhko, W.C. Orr, *Molecular organization of the Glutathione Reductase Gene in Drosophila melanogaster*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 339 (1997) 323-334
- [74] V.W. Rodwell 1993. Peptides. In *Harper's Biochemistry* (24th edn), R.K. Murray D.K. Granner, P.A. Mayes (eds). Appleton & Lange: USA; s. 33-40
- [75] E. Z. Ulakoğlu, M.K. Gümüştaş, A. Belce, T. Altuğ, E. Kökoğlu, *Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi*, **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, 29:3 (1998) 127-131.
- [76] M.J. Penninckx, M.T. Elskens, *Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms*, **Adv. Microbial. Physiol.**, 34 (1993) 239-301
- [77] G. Ambrosio, G. Santoro, I. Tritto *Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stres*, **Am J Physiol.**, 262 (1992) 23-30.
- [78] H. Mutoh, H. Hiraishi, S. Ota, *Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells*, **Gastroenterology**, 98 (1990) 1452-1459
- [79] K. Jarvinen, *Antioxidant enzymes and Related mechanisms in malignant Pleural mesothelioma*, **Hospital for Children and Adolescents University of Helsinki**, Helsinki 2001

- [80] D.R. Livingstone, L. Forlin S.G., George, *Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms*, **Freshwater Biological Association**, (1994) 154-171
- [81] E. Cohen, A. Gamliel, J. Katan, *Glutathione and glutathione-S-transferase in fungi effect of pentachloronitrobenzene and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; purification and characterization of the transferase from Fusarium*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 26 (1998) 1-9
- [82] M.K. Sharma, R.C. Sobti, *Rec effect of certain textile dyes in Bacillus subtilis*, **Mutation Research**, 465 (2000) 27-38
- [83] H. Moawad, A.El-Rahim, M. Khalafallah, *Evaluation of biotoxicity of textile dyes using two bioassays*, **J. Basic Microbiol**, 43: 3 (2003), 218-229
- [84] K. Al-Sabti, *Chlorotriazine Reaktive Azo Red 120 textile dye induces micronuclei in fish*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 47 (2000) 149-155
- [85] N. Yıldırım "Farklı konsantrasyonlarda kadmiyumun beyaz çürükçül fungus *Phanerochaete chrysosporium*'un (ME446) antioksidatif enzim aktiviteleri ve glutatyon seviyesi üzerine etkileri " Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2004
- [86] D. Asma, Ö. Yeşilada, *Effect of Paraquat on Cellular Defence Enzymes and Glutathione Level of Funalia trogii*, **Folia Microbiol.** 47:4 (2002)
- [87] R. H. Jaskot, D. L. Costa, *Toxicity of an Anthraquinone Violet Dye Mixture Following Inhalation Exposure, Intracheal Insillation, or Gavage*, **Fundamental and Applied Toxicology**, 22 (1994) 103-112
- [88] A. Guelfi, R.A. Azevedo, P.J. Lea, S.M.G. Molina, *Growth inhibition of filamentous fungus Aspergillus nidulans by cadmium: an antioxidant enzyme approach*, **J.Gen. Appl.Microbiol**, 49 (2003) 63-73
- [89] M. Sumati, K. Kalaiselvi, M. Palanivel, P. Rajaguru, *Genotoxicity of Textile Dye Effluent on Fish Cyprinus carpio Measured Using the Comet Assay*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 66 (2001) 407-414
- [90] K.T. Chung, C. Cerniglia, *Mutagenicity of azo dyes: Structure-activity relationships*, **Mutation research/ Reviews in Genetic Toxicology**, 27 (1192) 201-220
- [91] M. R. Bragulat, M. L. Abarca, M. T. Bruguera, F. J. Cabanes, *Dyes as Fungal Inhibitors: Effect on Colony Diameter*, **Applied and Environmental Microbiology**, (1991) 2777-2780
- [92] Ö. Yeşilada, *Decolourization of Crystal Violet By Fungi and Commercial Horseradish Peroxidase*, **Tr. J. of Biology**, 20 (1996) 129-138
- [93] Y. Sun, H. Yu, J. Zhang, Y. Yin, H. Shen, H. Liu, X. Wang, *Bioaccumulation and antioxidant responses in goldfish Carassius auratus under HC Orange No. 1 exposure* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 63 (2006) 430-437
- [94] H. Luck, *Catalase, Methods of Enzymatic Analysis*, (1963), 885-888
- [95] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, *The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation Glutathione S-Transferases*, **J. Bio. Chem.**, 249 (1974) 7130-7139
- [96] A.E. Cribb, J.S. Leeder, S.P. Spielberg, *Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*, **Analitical Biochemistry** 183:1 (1989) 195-196
- [97] T.P. Akerboom, H. Sies, *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples*, 77 (1981) 373-82
- [98] M.M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Anal Biochem**, 7:72 (1976) 248-54

- [99] A. Birhanlı, "Bazı tekstil boyar maddelerinin *Xenopus laevis* üzerine toksik etkilerinin araştırılması", Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2003
- [100] T. Ott, E. Fritz, A. Polle, A. Schützendübel, *Characterisation of antioxidative system in the ectomycorrhiza-building basidiomycete Paxillus involutus (Bartsch) Fr. and its reaction to cadmium*, **FEMS Microbiology Ecology**, 42 (2002) 359-366
- [101] N. Nagalakshmi, M.N.V. Prasad, *Response of glutathione cycle enzyme and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus**, **Plant Science**, 160 (2001) 291-299
- [102] R.J. Nicolosi, M.B. Baird, H.R. Massie, H.V. Samis, *Senescence in *Drosophila* II. Renewal of catalase activity in flies of different ages*, **Exp. Gerontol.** 8:2 (1973) 101-108
- [103] A. Birhanlı, M. Özmen, *Evaluation of the toxicity and teratogenicity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus**, **Drug Chem. Toxicol.** 28:1 (2005) 51-65
- [104] O.L. Anguiano, A.C. Castro and A.M.P. D'Angelo *The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos tolerance to pesticides*, **Comp. Biochem. Physiol.** 128:1 (2001) 35-43
- [105] R.R. Hamed N.M. Farid S.H.E. Elowa A.M. Abdalla, *Glutathione Related Enzyme Levels of Freshwater Fish as Bioindicators of Pollution*, **The Environmentalist**, 23 (2003) 313-322
- [106] J.F. Zhang, H. Shen, X.R. Wang, J.C. Wu, Y.Q. Xue, *Effect of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater goldfish *Carassius auratus**, **Chemosphere**, 55 (2004) 167-174

7. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Özlem DEMİRCİ
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-01.08.1978
Mesleği ve Durumu : Biyolog-Araştırma Görevlisi

EĞİTİMİ

İlkokul : Gündüzbey İlkokulu 1984-1989
Ortaokul : Gündüzbey Ortaokulu 1989-1992
Lise : Malatya Lisesi 1992-1995

Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat
Fak. Biyoloji Bölümü 1997-2001

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Ortaöğretim Fen ve
Matematik Alanları Eğitimi
Anabilim Dalı 2001-2003

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
2003-2006

BİLİMSEL FAALİYETLER

Dinleyici Olarak Katılman Toplantılar (Toplantı Adı, Tarihi ve Yeri)

- a) **Kongre:** V. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi ; 5-8 Ekim 2004, Bolu
- b) **Kongre:** XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi “Uluslararası Katılımlı”, 26-30 Haziran 2006, Aydın
- c) **Kongre:** VI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi; 18-21 Eylül 2006, Diyarbakır

Verilen Seminerler:

Seminer Konusu : Mikrobiyal Pestisitler