

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UV-C IŞININ MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ
VE MİKROBİYAL ADAPTASYONUN İNCELENMESİ

BİRGÜL GÜR

OCAK

2014

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

08/01/2014

Doç.Dr.Kültiğın ÇAVUŞOĞLU



Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

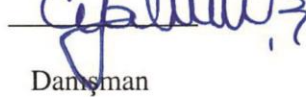
Prof. Dr. İhsan AKYURT



Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Doç.Dr.Emine YALÇIN



Danışman

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Emine YALÇIN

Doç.Dr.Kürşad YAPAR

Doç.Dr.Kültiğın ÇAVUŞOĞLU



ÖZET

UV-C IŞININ MİKROORGANİZMALAR ÜZERİNE BİYOKİMYASAL ETKİLERİ VE MİKROBİYAL ADAPTASYONUN İNCELENMESİ

GÜR, Birgül

Giresun Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç.Dr. Emine YALÇIN

Ocak 2014, 55 sayfa

Bu çalışmada ultraviyole ışıklardan UV-C'nin *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum* mantarları ve *E. coli* bakterisindeki total protein, İDOP, GSH, MDA ve lipid kompozisyonu parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Tüm deneyler 25°C'de kontrol ve örnek olmak üzere iki set halinde gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda her bir mikroorganizmadan iki ayrı örnek hazırlanmış ve biri UV ışınına tabi tutulmuştur. UV uygulanan tüm gruplarda incelenen biyokimyasal parametrelerde çeşitli derecelerde değişimler gözlenmiştir. *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum* ve *E. coli*'nin UV uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla protein, İDOP, MDA, GSH seviyelerinde artış ve yağ asidi profilinde önemli değişimler gözlenmiştir. *Fusarium moniliforme* ve *Fusarium semitectum* mikroorganizmalarında UV uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla protein düzeyinin sırasıyla 1.19 ve 4.31 kat arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde UV uygulaması sonucunda *Fusarium culmorum*'da İDOP ve GSH düzeylerinde önemli

artışlar kaydedilmiştir. *Fusarium semitectum*'da ise UV uygulaması sonucunda MDA düzeyinde $14.74 \text{ nmol.mL}^{-1}$ 'den $33.33 \text{ nmol.mL}^{-1}$ 'e bir artış olduğu tespit edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalarda UV uygulaması sonrasında yağ asidi profilinde önemli değişimler gözlenmiş ve özellikle doymamış lipid seviyelerinde belirgin azalmalar tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar ile UV'nin mikroorganizmalar üzerinde önemli biyokimyasal etkilere sahip olduğu ve UV'nin olumsuz etkilerine karşı mikroorganizmaların doymuş lipid oranında artışa giderek adaptasyon sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum*, *E. coli*, IDOP, GSH, MDA, UV-C.

ABSTRACT

THE EFFECT OF UV-C LIGHT ON BIOCHEMICAL PARAMETERS MICROORGANISMS AND INVESTIGATION OF MICROBIAL ADAPTATIONS

GÜR, Birgül

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Emine YALÇIN

January 2014, 55 page

In this study the effect of UV-C light on the total protein, advanced oxidized protein, GSH, MDA and lipid composition parameters of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum* and *E. coli* were investigated. All tests were performed in two sets including control and sample in control and sample in 25°C. In this context two samples prepared from each microorganism and one of them was subjected to UV rays. Some alterations in biochemical parameters were observed in all UV treated groups. An increase in total protein, advanced oxidized protein, GSH, MDA levels and significant changes in lipid compositions of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum* and *E. coli* were observed. The protein levels of UV treated *Fusarium moniliforme* and *Fusarium semitectum* were 1.19 and 4.31 times higher than control counterpart, respectively. Similarly, after UV treatment oxidized protein, GSH levels of *Fusarium culmorum* were increased significantly. In *Fusarium semitectum* the level of MDA was increased 14.74 nmol.mL⁻¹ to 33.33 nmol.mL⁻¹ after UV treatment. Significant changes in lipid profile of UV treated microorganisms were observed and significant decreases were observed in

unsaturated lipid profile of microorganisms. From the results it was observed that UV had a significant effect on biochemical effects of microorganisms and it was determined that the microorganisms were adapted to UV by the increasing saturated lipid levels.

Key Words: *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium proliferatum*, *E. coli*, Advanced Oxidized Protein, GSH, MDA, UV-C.

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın tüm aőamalarında her türlü desteği sağlayan, maddi manevi ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Sayın Doç.Dr. Emine YALÇIN'a teőekkürü bir borç bilirim. Her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç.Dr. Kültięin ÇAVUŞOĞLU'na teőekkürlerimi sunarım. Tez çalıőmamda yardımcı olan Öğr.Gör. Figen ÇİÇEK'e teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında beni yüreklendiren, maddi manevi yanımda olan aileme őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Stres.....	1
1.2. Stres Çeşitleri.....	3
1.2.1. Asit Stresi.....	3
1.2.2. Isı Stresi.....	5
1.2.3. Açlık Stresi.....	7
1.2.4. Basınç Stresi.....	8
1.2.5. UV Stresi.....	9
1.2.5.1. Ultraviyole Işınlr.....	9
1.2.5.2. UV Lambalar.....	11
1.2.5.3. UV Işınlrının Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri.....	12
1.2.5.3.1. DNA Üzerine Etkisi.....	15

1.2.5.3.2. Proteinler Üzerine Etkisi.....	16
1.2.5.3.3. Hücre Zarı ve Lipid Üzerine Etkisi.....	17
1.2.5.4. UV'ye Karşı Geliştirilen Mikrobiyal Adaptasyonlar.....	19
1.2.5.4.1. DNA Hasarına Karşı Oluşturulan Adaptasyonlar.....	19
1.2.5.4.2. Protein Hasarına Karşı Geliştirilen Adaptasyonlar.....	20
1.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	22
2. MATERYAL VE METOT	26
2.1. Mikroorganizmalar.....	26
2.2. UV Uygulaması ve Hücre Homojenatlarının Eldesi.....	26
2.3. Protein Tayini.....	26
2.4. İleri Derecede Oksidasyon Protein (İDOP) Tayini.....	27
2.5. GSH Tayini.....	27
2.6. MDA Düzeyi.....	28
2.7. Yağ Asidi Analizi.....	29
2.7.1. Lipid Ekstraksiyonu.....	29
2.7.1.1. Sapofinikasyon.....	29
2.7.1.2. Metilasyon.....	29
2.7.1.3. Ekstraksiyon.....	29
2.7.1.4. Bazik Yıkama.....	29
2.7.2. GC-MS Analiz Koşulları.....	30

3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
3.1. Protein Düzeyi.....	31
3.2. İleri Derecede Oksidasyon Protein (İDOP)	32
3.3. GSH Düzeyi.....	33
3.4. MDA Düzeyi.....	34
3.5. Yağ Asidi Analizi.....	35
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	55
EKLER.....	56

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO

1.1. Aminoasitlerden UV ışığı etkisi ile oluşan okside ürünler.....	17
2.1 GS-MS analiz koşulları.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1 Enterik patojenlerin bilinen asit tolerans yanıtları.....	4
1.2 UV ışınların dalga boyuna göre sınıflandırılması.....	10
1.3 UV ışınları dezenfektan etkisi	10
1.4 UV lambaların 254 nm dalgaboylu UV ışın üretimi.....	12
1.5 Fenton reaksiyonu, DNA hasarı ve antioksidan sistem	14
1.6 UV ışınlarının DNA'ya etkisi.....	16
1.7 Araşidonik asidin oto-oksidasyonu mekanizması.....	19
1.8 Oksidatif stresten korunmada GSH'ın antioksidan fonksiyonlarının şematik gösterimi.....	22
1.9 <i>Fusarium moniliforme</i> kolonisi (a), <i>Fusarium semitectum</i> kolonisi (b), <i>Fusarium culmorum</i> kolonisi (c), <i>Fusarium proliferatum</i> kolonisi (d), <i>E. coli</i> kolonisi (e).....	23
1.10 Fumonisin B1'in yapısı.....	24
1.11 Fumonisin B2'nin yapısı.....	25
3.1 UV uygulamasının mikroorganizmalarda protein düzeyi üzerine etkisi.....	32
3.2 UV uygulamasının mikroorganizmalarda İDOP düzeyi üzerine etkisi.....	33
3.3 UV uygulamasının mikroorganizmalarda GSH düzeyi üzerine etkisi.....	34
3.4 UV uygulamasının mikroorganizmalarda MDA düzeyi üzerine etkisi.....	34
3.5 UV uygulamasının <i>E. coli</i> 'de total lipid kompozisyonu üzerine etkisi.....	36
3.6 UV uygulamasının <i>Fusarium moniliforme</i> 'de total lipid kompozisyonu üzerine etkisi.....	36

3.7 UV uygulamasının <i>Fusarium proliferatum</i> 'da total lipid kompozisyonu üzerine etkisi.....	37
3.8 UV uygulamasının <i>Fusarium culmorum</i> 'da total lipid kompozisyonu üzerine etkisi.....	37
3.9 UV uygulamasının <i>Fusarium semitectum</i> 'da total lipid kompozisyonu üzerine etkisi.....	38

KISALTMALAR

ATP	Adenozin tri fosfat
ATR	Asit tolerans yanıtı
ASP	Asit şok protein
Cap	Soğuk şoku alıştırma protein
Csp	Soğuk şoku protein
CPD	Siklobütanpirimidin dimer
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FAR	Fotosentetik aktif radyasyon
GABA	γ -amino bütirik asit
Hsp	Sıcak şok protein
Hs	Isı şok
İDOP	İleri derecede oksitlenmiş protein
LOO \cdot	Lipid peroksit radikali
L \cdot	Lipid radikali
GS-MS	Gaz kromatografisi- kütle spektrometresi

1. GİRİŞ

Stres etmenleri canlı yaşamının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak çeşitli derecede etki gösteren çevresel etmenlerdir. Doğadaki çok çeşitli biyotik ve abiyotik çevre etmenleri mikroorganizmalarda strese neden olmaktadır. Biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin etkisi altında canlılarda ortaya çıkan değişimler de stres olarak tanımlanır. Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak özellikle mikroorganizmalarda büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, mikrobiyal metabolizmada da ciddi değişimlere neden olmaktadır. Stres etmenlerinin oluşturduğu etki mikroorganizmaların çevreye genetik adaptasyon derecesine bağlı olarak değişmektedir. Strese dayanıklılık mekanizması mikroorganizmalarda çeşitli derecelerde etkili olup mikroorganizma ya geliştirdikleri önleyici mekanizmalarla stres faktörlerinin etkinliğini önlemekte ya da tolerans mekanizmalarıyla karşı koyarak yaşamlarını sürdürmektedirler (1-3).

Mikroorganizmalar yaşadıkları çevre koşullarından çeşitli derecelerde etkilenmektedir. Çevre şartlarındaki değişimlere karşı mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için hızlı adaptasyon mekanizmaları geliştirmek zorunda kalmaktadırlar (1). Mikroorganizmaların lethal ortamlara ve aşırı stresli ortamlara karşı geliştirdikleri adaptasyonlar pek çok çalışmada detaylı olarak incelenmektedir. Mackey ve Derrick (2), ısı şokuna maruz bırakılan *Salmonella enterica serovar* suşunun ısıya karşı yüksek adaptasyon sergilediğini rapor etmektedir. Farber ve Brown (3), *Listeria monocytogenes* suşlarını 120 dakika 48°C ısı şoku uygulaması sonrasında gıda hamuruna inokule etmişlerdir. İkinci ısı stresi uygulanan bakterilerde ısıya karşı direncinin arttığını rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada Fay (4), ozmotik strese maruz bırakılmış bakterilerde çeşitli adaptasyon mekanizmalarını incelemiş ve bakterilerde ozmotik stresle birlikte ısıya karşı da güçlü bir adaptasyon olduğunu gözlemlemiştir.

1.1. Stres

Mikroorganizmaların gelişmesini veya üremesini olumsuz yönde etkileyen faktörlere ya da ortamlara stres denilmektedir. Stres faktörlerinin seviyelerinde

farklılıklar görülmektedir. Her mikroorganizma karşılaşmış olduğu strese farklı yanıtlar sergilemektedir. Mikroorganizmaların sublethal yani zayıf stres olarak adlandırılan bir stresle karşılaşması durumunda üreme oranında durma veya azalma gözlenirken, sayılarında herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Orta şiddetli bir stres ile karşılaşan mikroorganizmalarda mikrobiyal gelişimin durmasının yanında, yaşama kabiliyetlerinde azalma da meydana gelmektedir. Şiddetli strese maruz kalan mikroorganizmalarda ise mikroorganizmalar için ölümcül bir durum oluşmakta ve popülasyonun çoğunluğunun ölümü ile sonuçlanmaktadır. Mikroorganizmaların maruz kalabilecekleri stresler ısı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok gibi fiziksel stresler; asitler, tuzlar ve oksitleyiciler gibi kimyasal stresler; mikrobiyal metabolitler, antagonizma ve yarışmacı flora gibi biyolojik stresler şeklinde sıralanmaktadır (2,4-5).Çeşitli stres koşullarına maruz kalan mikroorganizmalarda membran geçirgenliğinde değişimler, ribozomal hasarlar, hücre protein yapısında değişimler ve nükleik asitlerde deformasyon gibi değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Bu değişimlere karşı mikroorganizmalar çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmektedir. Stres sonucunda oluşan hasarı onarabilen veya stres ajanlarını inaktive edebilen proteinlerin üretimi, hücre membranının akıcılığında arttırma ya da azaltma, hücrenin transformasyona uğrayarak sporlanması veya yaşayabilen fakat kültürü yapılamayan (Viable-But-Not-Culturable, VBNC) duruma geçmesi strese karşı geliştirilen bazı adaptasyon mekanizmalarıdır (5). Strese karşı mikroorganizmaların yaşayabilme yeteneği tolerans olarak tanımlanmaktadır. Belli bir strese karşılık her mikroorganizma farklı seviyede tolerans göstermektedir. Örneğin, laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, diğer bakterilere oranla çok daha fazla olabilmektedir. Strese karşı yanıtta gecikme veya adaptasyon yanıtındaki yetersizlikten dolayı mikroorganizmalarda yaralanma meydana gelmektedir. Yaralanma mikroorganizmalarda ölüm ya da iyileşme ile sonuçlanmaktadır. Stres durumunda mikroorganizmaların hücresel yapılarının zarara uğraması bir veya birden fazla zararlı faktöre karşılık duyarlılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (5). Leistner (6), farklı stres koşullarına maruz kalan bakterilerde, enerji tüketiminin arttığını, metabolik yorgunluk ve hemostazisin bozulması yoluyla bakterilerde ölüm meydana geldiğini rapor etmektedir.

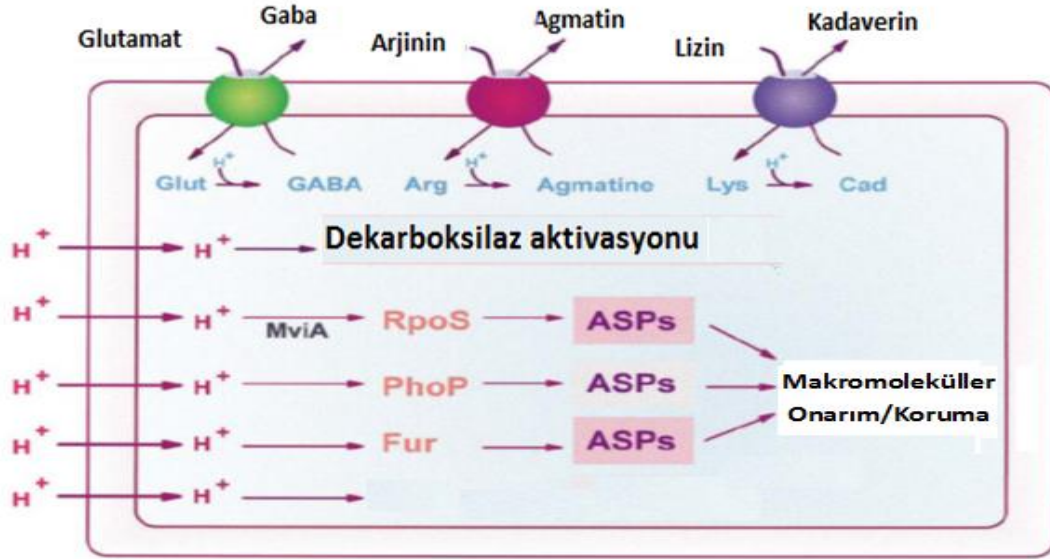
Strese karşılık bakterilerde oluşan tepkiler, ani yanıtlar ve/veya uzun süreli adaptasyonlar şeklinde olmaktadır. Ani ve uzun süreli adaptasyon yanıtları benzer şok proteinler aracılığı ile oluşmaktadır. Ayrıca genel stres yanıtları bazı özel streslere karşı korumakla birlikte pek çok strese karşı da çapraz koruma sağlayabilmektedir (7). Stres faktörüne maruz kalan mikroorganizmalarda direncin genetik olarak kodlanması durumunda stres proteinlerinin sentezi gerçekleşmekte ve adaptasyon sağlanmaktadır. Mikroorganizmaların bir strese karşı aktive ettiği direnç mekanizmaları aynı olabildiği gibi farklı da olabilmektedir. Hatta aynı bakterinin farklı gelişim evrelerinde (lag faz, log faz, durgun faz) aynı strese karşı oluşturduğu direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (5,7).

1.2. Stres Çeşitleri

1.2.1. Asit Stresi

Asit stresi pek çok mikroorganizmanın maruz kaldığı önemli stres faktörlerinden birini oluşturmaktadır (8). Mikroorganizmalar farklı pH aralıklarında gelişim göstermektedirler. Alkalifilik bakteriler soda gölü gibi pH'nın 11.0 olduğu şartlarda gelişim gösterirken, asidofilik bakteriler pH'nın 1.0 olduğu asidik sülfür kaynaklarında gelişim gösterebilmektedir. *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* pH 5.0 ve 9.0 arasında gelişim gösteren nötrofilik bakterilerdir (9). Bakterilerin optimum aktivite göstermeleri için sitoplazmik pH'larını dengede tutmaları gerekmektedir. Bakterilerin çoğu pH 5.5-9.0 aralığında büyüme gösterebilirken sitoplazmik pH 7.4-7.8 aralığındadır. Bu nedenle bakteriler buldukları ortamın durumuna göre sitoplazmalarını alkaliye ya da asitliğe kaydırabilmektedir. Dış ortamdaki pH değişimlerine karşı mikroorganizmalarda asit tolerans yanıtı (ATR) meydana gelmektedir. Bazı mikroorganizmaların asidik pH'a yanıt olarak, asidik metabolitleri, nötral metabolitlere ya da nötral metabolitleri alkali ürünlere dönüştürebilen enzimler ürettikleri tespit edilmiştir. Bu enzimlere en iyi örnek *E. coli*'de bulunan glutamat dekarboksilaz, lizin dekarboksilaz ve arjinin dekarboksilazdır. Bu enzimlerin aşırı ekspresyonu hücre dışı ortamda asidik pH varlığına işaret etmektedir. PH 5.5 ve 6.0'ya maruz kalan mikroorganizmalarda primer şok meydana gelmektedir.

Bu aşamada en az 50 yeni protein sentezlenmekte ve bu proteinler asit şok proteinleri (ASP) olarak adlandırılmaktadır. Mikroorganizma asit şoku süresince üremeyi yavaşlatmaktadır (9). Mikroorganizmalar asit stresine karşılık, aminoasit katabolizmasının artırılması, DNA'yı tamir eden enzimlerin uyarılması, proton pompalarının artırılması ve hücre membranındaki kompozisyon değişikliklerini içeren ATR mekanizmalarına sahiptir (5). Mikroorganizmalarda görülen ATR mekanizmaları çok çeşitli ve farklı düzeylerde olmaktadır. ATR mekanizmalar hücre içi veya hücre dışı pH'nın değişimiyle uyarılmaktadır. *S. typhimurium*'da pH 4.5 seviyesinde 50 adet asit şok proteinin aktif hale geldiği ve ATR mekanizmasında bu proteinlerin rol oynadığı tespit edilmiştir. Hücre içi pH'ındaki bir değişim ASP'lerin üretimini indüklerken diğer mekanizmalar hücre dışı pH'ındaki değişim sonucunda indüklenmektedir. *S. typhimurium* hücrelerinin asit toleransının aktif hale gelmesiyle yüksek sıcaklık, osmolarite ve oksidatif zarara karşı da adaptasyonun geliştiği yani çapraz korumanın oluştuğu belirlenmektedir (10).



Şekil 1.1 Enterik patojenlerin bilinen asit tolerans yanıtları (11)

Dekarboksilaz ATR sistemleri, aside adaptasyonda önemli mekanizmalarından birini oluşturmaktadır (Şekil 1.1). Glutamat dekarboksilaz sisteminde *gadA*, *gadB* ve *gadC* olmak üzere üç gen görev almaktadır. Hücre içerisinde artan H⁺ konsantrasyonu glutamat dekarboksilazın katalizlediği bir reaksiyonla azaltılmaktadır. Hücre içerisinde

artan H^+ iyonları glutamat ile birleştirilerek γ -amino bütirik asite (GABA) dönüştürülmektedir. Reaksiyon glutamat dekarboksilaz enzimi tarafından yürütülmektedir. Reaksiyon sonucunda oluşan GABA, gadC tarafından kodlanan bir antiporter tarafından hücre dışına taşınmaktadır. Bu yolla hücre içerisindeki H^+ iyonu konsantrasyonu azaltılmakta ve aside karşı adaptasyon gelişmektedir. Arjinin dekarboksilaz sistemi de benzer bir yolla yürütülmektedir. Fakat arjinin dekarboksilazın son ürünü agmatin, henüz hangi gen tarafından kodlandığı bilinmeyen bir antiporter ile hücre dışına taşınmaktadır. Böylece internal pH'nın ölümcül seviyelerin altına düşmesi engellenerek, hücreye alınan protonlar tüketilip tekrar hücre dışına atılmaktadır (10). Asidik ortamlarda mikroorganizmalarda gad mRNA seviyesinin önemli derecede arttığı rapor edilmektedir (12). Aside adapte olan hücrelerde kristal violete, etanole, ısı ve ozmotik strese karşı da toleransın arttığı saptanmaktadır (13). Asit stresi mikroorganizmalarda hücre zarı ve DNA yapısında da değişimlere neden olmaktadır. Hücre içi H^+ iyonlarının artışına karşı membran yağ asitlerindeki değişim olağan bir tepkidir (14). Asidik ortamlarda *S. mutans* hücre zarında tekli doymamış ve uzun zincirli yağ asitlerinin arttığı belirlenmiştir. Lipid kompozisyonundaki bu değişim hücrede protonlara karşı geçirgenliğin azalmasını ve aside karşı adaptasyonu sağlamaktadır (15). Hücre içi asitleşme DNA'nın depüridasyonu ve depirimidasyonuna neden olmaktadır. Bu değişim, glikozidik bağın kopması ve baz protonlaşması sonucu oluşmaktadır (16). Asit adaptasyonu sırasında DNA hasarının tamiri için 4 proteinin indüklendiği belirtilmektedir (17). Aside maruz kalan *S. mutans* hücrelerinde RecA bağımsız DNA tamir sisteminin indüklendiği belirlenmiştir (18).

1.2.2. Isı Stresi

Sıcaklık mikroorganizmaların üremesinde ve canlılığını devam ettirmede önemli bir parametredir. Mikroorganizmalar farklı sıcaklık aralıklarında da gelişebilmektedir. Örneğin bazı mikroorganizmalar, sıcaklığın $90^{\circ}C$ 'ye ulaştığı sıcak su kaynaklarından (termofilik bakteriler) ve sıcaklığın $0^{\circ}C$ 'nin altında olduğu kutuplardan (psikrofil bakteriler) izole edilmektedir. *Pyrococcus furious* optimum $95^{\circ}C$ 'de, *Archaeoglobus fulgidus* ise $78^{\circ}C$ 'de yaşamaktadırlar (19). Pek çok bakteri büyüme sıcaklığı olarak $20-40^{\circ}C$ arasını tercih etmektedir (9). Sıcak veya soğuk şok durumunda bakterilerin, düşük

molekül ağırlığındaki stres proteinleri ürettiği bilinmektedir (20). Canlı hücreler düşük bir sıcaklığa maruz kaldığında membran akışkanlığında, translasyon, transkripsiyon ve DNA replikasyon mekanizmalarında bazı fizyolojik değişimler gözlenmektedir. Düşük sıcaklıklarda bütün hücrelerde çift katmanlı fosfolipid membranların akışkanlığı azalmaktadır. Membran akışkanlığındaki değişim daha kısa ve/veya doymamış lipid oranındaki değişim ile sağlanmaktadır. Optimum akışkanlığı sürdürmek için hücreler, membranlarındaki doymamış yağ asiti miktarını arttırmaktadır. Düşük sıcaklıklarda membran yağ asitlerinin uzunluklarını azaltılarak da akışkanlığı artırabilmektedirler (21). DNA'da negatif süpersarmal yapıda azalma ve soğuk şoku proteinleri (Csp) üretimi düşük ısıya karşı geliştirilen diğer adaptasyonlardır (22). Csp'lerin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde birden fazla kopyalarına (2 ile 9 kadar) rastlanmaktadır (23). Düşük sıcaklıkta mRNA'ya bağlanan Csp'ler transkripsiyon ve translasyonu kolaylaştıran RNA şaperonları olarak işlev görmektedirler (24). Düşük sıcaklığa adaptasyonda, soğuk şoku alıştırma proteinleri (Cap) büyüme sırasında devamlı sentezlenmektedirler. Çeşitli mikroorganizmalarda filogenetik olarak Cap'lere rastlanmaktadır (25). Bu proteinler düşük sıcaklıkta membran akışkanlığını korumada ve/veya denatüre olan peptitlerin revizyonunda görev almaktadır (26). Denatüre proteinlerin hücrede birikmesi pek çok metabolik yolda aksamaya neden olmaktadır. Cap'ler proteazlar olarak hareket ederek birikimi önlemektedir. Yüksek sıcaklık hücresel komponentlerde makro moleküler hasar meydana getirmektedir. Yüksek sıcaklığa adaptasyon süresince sentezlenen bazı sıcak şok proteinleri (Hsp) oluşan hasarı onarmakta ve hasarlı komponentleri ortadan kaldırmaktadır. Proteomik çalışmalarda ısı şok (Hs) indüksiyonu iki grupta toplanmaktadır. HrcA, DnaK, GroES, GroEL, Hsp80 (Clp E), Hsp84, Hsp100 ve Hsp26 gibi Hsp'ler ısı uygulamasını takiben ilk 10-15 dakika içinde 10 kat hızlı bir şekilde indüklenmektedir. ClpP (Hsp 23) ve bunun gibi sekiz diğer Hsp grubu ise ısı uygulamasının 25-30. dakikasından itibaren 2-8 kat hızlı bir şekilde indüklenmektedir (27). DnaJ ve DnaK, RNA polimeraz $\sigma 70$ altbirim (rpoD), GroEs, GroeL, Lon proteaz ve Lysu yüksek sıcaklığa karşı üretilen Hsp'lerden bazılarıdır. Isıl işlem ile uyarılmış hücrelerde sentezlenen GroEL ve DnaK gibi bazı stres proteinleri, ısı hasarına uğramış proteinleri toplamakta ve hücrenin bu hasarlı proteinler ile mücadele etmesine yardımcı olmaktadır. Lon ve ClpAP gibi stres proteinleri ise hasara uğramış

protein miktarını azaltmaktadır (28). *E. coli*'de yaklaşık 50 Hsp tanımlanmıştır. *E. coli* rpoH gen lokusu ile 32 kDa σ faktörünü kodlamaktadır. Sıcaklığın 30°C'den 40°C'ye çıkarılması ile *E. coli*'de rpoH translasyonunun arttığı belirlenmiştir. Sıcaklık, hücrelerde membran kompozisyonu üzerinde de ciddi etkiler sahiptir. Pek çok mikroorganizma yüksek/düşük ısıya adaptasyon aşamasında membran akıcılığında değişime gitmektedir. Membran akışkanlığının düzenlenmesi doymuş, doymamış yağ asit oranının değişimiyle mümkündür (29). Yağ asitlerinde dallı-dallanmamış zincir, dallanma türü (30), zincir uzunluğu (31) ve cis-trans oranı (32) membran akışkanlığının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca ısı stresine karşı hücrelerde lipid-polar baş grupları değiştirebilmektedir (33). Bu yolla membrandaki lipid-protein etkileşimi yeniden düzenlenmekte ve membran akıcılığı da değişmektedir (34). Sıcaklık arttıkça lipid molekülleri erimekte, silindirik bir yapı kazanmakta, düzensiz rotasyonlar sergilemektedir (29). Yüksek sıcaklıkta, membran içindeki uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oranında yaygın bir artış görülmekte ve bu değişim akıcılığı azaltarak membran bütünlüğünü korumaktadır (35). Düşük sıcaklıklarda ise bakteriler *cis*-vakkenik asit (18:1 cis11) ve palmitik asit (16:1) gibi uzun zincirli doymamış yağ asitlerini sentezlemektedirler (36). Henderson ve arkadaşları (37), *Vibrio sp.*'de sıcaklığın total lipid kompozisyonu üzerinde önemli etkileri olduğunu rapor etmişlerdir.

1.2.3. Açlık Stresi

Mikroorganizmalar yaşamlarının çoğunu ısı, soğuk, osmotik, oksidatif, asit stres ya da açlık gibi birçok stres koşulları nedeniyle durgun fazda geçirmektedir. Durgun faza en sık açlık stresi neden olmaktadır (38). Bazı bakteriler açlık stresine karşı sporlu sürece girebilir ya da hücre morfolojisinde değişime gidebilir. *E. coli* gibi spor oluşturmayan birçok bakteri için hücre büyümesinin durgun faza girmesiyle hücre boyutunda bir azalma olduğu belirtilmiştir (39). Bu durum bazı *Enterococci* ve *Lactococci* üyeleri içinde rapor edilmiştir (40). Mikroorganizmalarda açlık yanıtına neden olan üç tip sınırlayıcı bileşik mevcuttur: Hücre enerjisinin tüketilmesine yol açan karbonhidrat, enerji kaynağı ve DNA/ RNA sentezi için gerekli fosfat ve protein sentezi için gerekli olan aminoasitlerin yokluğu açlık stresine neden olmaktadır. Açlık stresine karşı mikroorganizmalarda çeşitli cevap ve adaptasyon mekanizmaları mevcuttur. Fosfat

ya da azot açlığı sonrasında *E. coli* içinde polifosfat birikimi açlık stresine karşı geliştirilmiş bir adaptasyon mekanizmasıdır (41). Polifosfat "yüksek enerjili" stokları temsil etmektedir (42). Açlık stresine karşı hücrelerde bazı spesifik proteinlerin üretimi rapor edilmektedir. Glikoz açlığına maruz bırakılan *E. faecalis*'de stres kaynaklı bazı yeni proteinlerin üretimi gözlenmiştir (43). Bu proteinler karbon metabolizmasında çeşitli aşamalarda aktif olarak rol almaktadır. Açlığa karşı indüklenen trioz fosfat izomeraz, dihidroksi asetokinaz, Glc24 proteinleri karbohidrat ve pirüvat metabolizmasında yer almaktadır. Karbonmatkinaz, glisin kesim sistemi ve L-serin dehidrataz aminoasit katabolizmasında yer alan açlığa karşı indüklenen bazı proteinlerdir (43,44). Açlık stresine karşı gen bazında da bazı adaptasyonlar rapor edilmektedir. *E. coli* (45), *Staphylococcus aureus* (46) ve *Corynebacteria* (47) gibi bazı mikroorganizmalarda farklı açlık koşullarına karşı ppGpp birikimi belirlenmiştir. DNA'da ppGpp adacıkları, hücrede enerji tasarrufunun önemli bir işareti olarak kabul edilmektedir (48). Açlık stresine karşı hücrelerde membran komponentlerinde de değişimler söz konusudur. Hücre zarı lipitlerinin cis/trans oranı mikrobiyal toplulukların beslenme durumunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (49). Örneğin, *Vibrio cholerae* hücreleri için düşük besin düzeyinde trans yağ asitlerinin oranı artmaktadır (50).

1.2.4. Basınç Stresi

Mikroorganizmalarda basınç tarafından oluşturulan stres hücre zarında önemli değişimlere neden olmaktadır. Hücre zarı lipitleri basınç tarafından oluşturulan strese karşı oldukça duyarlıdır. Genellikle basınç, membran lipitlerini merkeze doğru geçişini arttırarak lipitlerin daha sıkı paketlenmesine ve akıcılığın azalmasına neden olmaktadır (29). Mikroorganizmalar bu değişimi tolere edebilmek için lipitlerin doymuş/doymamış oranını değiştirerek akıcılığı arttırma yoluna gitmektedir. Birçok derin deniz organizmaları basınca tepki olarak membran akışkanlığı ve kompozisyonunu yeniden düzenlemektedir. *Photobacterium profundum* SS9 suşu ile yapılan çalışmalarda, kültürün basınç altında tekli doymamış yağ asidi (18:1) ve çoklu doymamış yağ asitleri (20:5 ve 22:6) oranlarında artış olduğu belirlenmiştir (51). Barofilik bakterilerde altı çift

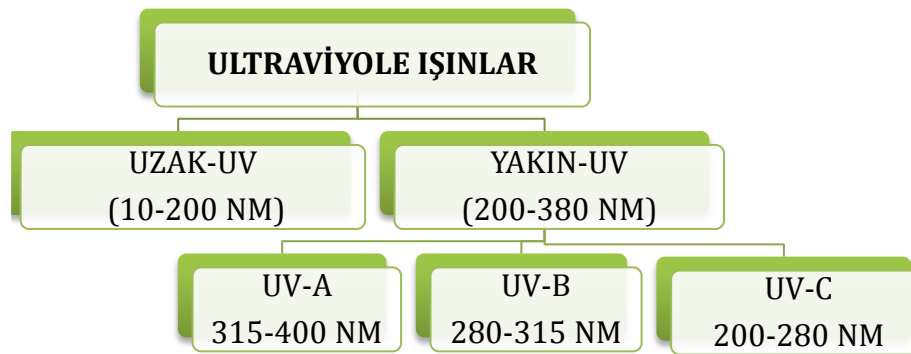
bağına sahip çoklu doymamış yağ asidi oranlarının diğer mikroorganizmalara kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir (29).

1.2.5. UV Stresi

Bir ortamda veya boşlukta enerjinin dalgalar halinde yayılması radyasyon olarak tanımlanmaktadır. Radyasyon endüstriden sağlığa pek çok alanda kullanılmaktadır. Mikrobiyoloji alanında da radyasyondan faydalanılmaktadır. Sterilizasyon, dezenfeksiyon ve mutasyon oluşturma amacıyla mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır.

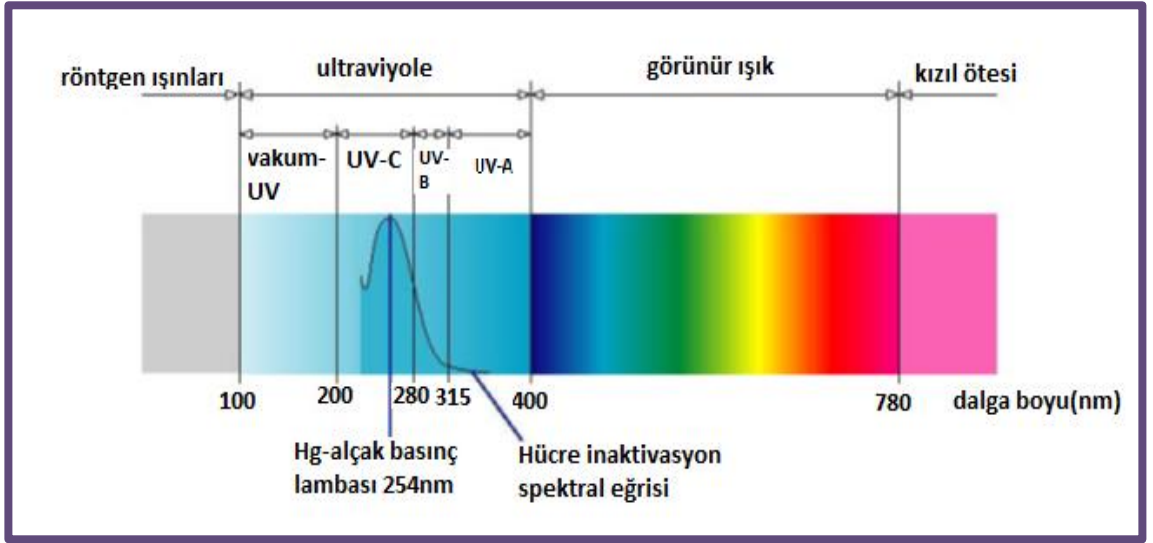
1.2.5.1. Ultraviyole Işıklar

Ultraviyole ışınlar (UV) görünür ışıktan kısa, X ışınından uzun dalga boyuna sahip bir elektromanyetik radyasyondur. Kuantum enerjisi düşük olduğu için UV ışınlarının iyonizasyon oluşturmamaktadır. Fakat moleküllerde çeşitli derecelerde uyarılma meydana getirmektedir. Ultraviyole ışınların dalga boyları 10 nm ile 380 nm (100 Å-3800 Å) arasında değişmektedir. UV ışınları, uzak-UV (extreme-UV, 10-200 nm) ve yakın-UV (near-UV, 200-380) olmak üzere iki ana bölgeye ayrılmaktadır. Yakın-UV insan sağlığına ve çevreye etkileri göz önüne alınarak UV-A (uzun-UV, siyah ışık; 315-400 nm), UV-B (orta-UV, 280-315 nm) ve UV-C (kısa-UV, germisidal-UV; 200-280 nm) olarak üç bölümde incelenmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 UV ışınların dalga boyuna göre sınıflandırılması

UV-A, dalga boyu 400-315 nm arasında olan ışınlardır. Ozon tabakasından, buluttan ya da camdan kolayca geçerler ve kolayca yansılar. UV-A ışınlarının yeme, içme, hareket etme ve üreme gibi normal yaşamsal davranışlar üzerinde önemli etkileri mevcuttur. UV-B, dalga boyu 315-280 nm arasında olan ışınlardır. Bu ışınların vücutta D3 vitamininin sentezlenmesinde önemli rolü vardır. UV-C ise dalga boyu 280-200 nm arasında yer alan ışınlardır. Hücrelerde ciddi tahribat yaparak canlılığın ölümü ile sonuçlanabilen etkilere sahiptir. Bu nedenle UV-C ışını mikrobiyolojik çalışmalarda, akvaryumlarda, ameliyathanelerde sterilizasyon amaçlı kullanılmaktadır.



Şekil 1.3 UV ışınları dezenfektan etkisi (52)

UV ışınlarından 240-280 nm aralığındaki UV-C, mikroorganizmaların DNA'sı üzerinde en fazla tahribata yol açan ışınlarıdır. UV-C ışınları mikroorganizmaların hücre zarı ve DNA da bulunan timin bazları tarafından absorbe edilmektedir. Bu enerji transferi sonucunda DNA zinciri birçok noktadan tahrip olmaktadır. DNA yapısı bozulan canlılığın başta üreme olmak üzere tüm hücre faaliyetleri durmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. UV-C ışınlarının mikroorganizmalar üzerine etkileri üzerine pek çok çalışma mevcuttur. Matak ve arkadaşları (53), $15.8 \pm 1.6 \text{ mJ.cm}^{-2}$ lik UV dozuna maruz kalan *L. monocytogenes* bakterisinde üreme oranında azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Bu ışınların bakteri, mantar, virüs, spor ve hücreler üzerine letal ve mutajenik etkileri vardır. Pratikte UV ışınları, cıva buharlı lambalardan elde

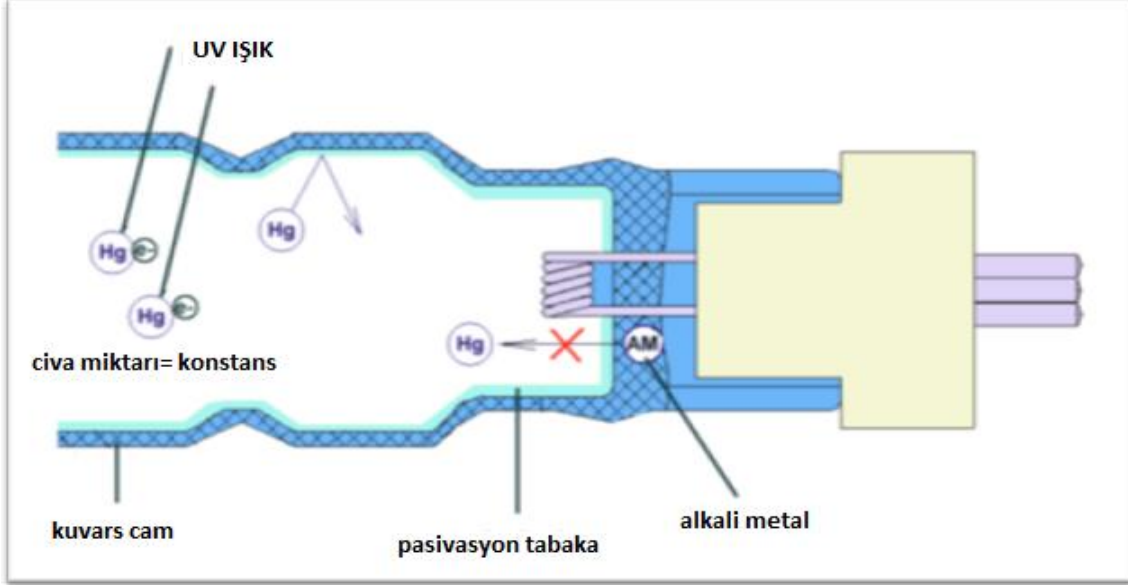
edilmektedir (54). UV kaynağından belirli bir alana verilen ışığın enerjisi mikrowatt (μW) olarak ölçülmektedir. Mikroorganizmaların inaktivasyonunda, gerekli enerji UV ışınının şiddeti ve ışınlama süresinin çarpımı ile hesaplanmaktadır ($\mu\text{W}\cdot\text{saniye}\cdot\text{cm}^{-2}$). Mikroorganizmalar için bu inaktivasyon enerjisi değişiklik göstermektedir (55). Vejetatif bakterilerde, 1 log inaktivasyon için yaklaşık 2-6 $\text{mW}\cdot\text{saniye}\cdot\text{cm}^{-2}$ enerji gerekmektedir. Bakterilerin ortamdaki uzaklaştırılmasında lazer ışıklarının kullanıldığı, fakat ışık kaynağının yanı sıra ışık yoğunluğunda etkili olduğu belirtilmektedir. Farklı lazer ışıkları ile yapılan çalışmalarda da metilen mavisinin bulunduğu ortamda bakterilerin canlılıklarında azalmalar olduğu belirlenmektedir. Burada daha çok dışerde bulunan mikroorganizmaların lazer radyasyonu tarafından öldürüldüğü gözlemlenmiştir (56).

1.2.5.2. UV Lambalar

Bir UV cihazı; UV reaktörü, elektrik panosu ve UV sensöründen oluşmaktadır. UV reaktörü içinde UV lambanın yer aldığı, lambayı koruyucu kuvars tüp içeren kısımdır. Elektrik/kontrol panosu, UV lambaları çalıştıran güç kaynaklarını (balast) ve cihazın fonksiyonlarının kontrolü izlenmesi için gerekli elektrik/elektronik donanımını içermektedir. UV sensörü ise UV ışın şiddetini ölçen bölümdür. Günümüzde germisidal amaçla UV ışık kaynağı olarak kullanılan lambalarda, dayanıklı kuvarstan imal cam bir tüp içindeki düşük basınçlı civa buharı içinden akan elektrik akımı sayesinde UV ışık üretilmektedir. UV lambanın her iki ucunda elektrotlar bulunmaktadır (57). Elektrotlardan yayılan elektronlar civa iyonları ile çarpışarak enerji seviyelerini yükseltir ve civa iyonları aldıkları enerjiyi 254 nm dalga boylu UV-C ışınları yayarak deşarj etmektedir (Şekil 1.4). Pratik uygulamalarda UV cihazlarının su debisine bağlı dezenfeksiyon gücü sayısal değer olarak verilmektedir. Ölçüsü “Joule.m⁻²” olan bu sayısal değer “UV dozu” olarak adlandırılmaktadır.

UV cihazının doğru seçimi için hedef alınan mikroorganizmanın hangi UV dozu ile etkisiz hale getirileceğinin bilinmesi gerekir. Örneğin “Hepatit A” virüsüne karşı %99.99 oranında giderim sağlamak için seçilen UV cihazının kullanım noktasındaki su kalitesi ve pik debisine göre suya en az 300 $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ UV dozu vermesi gerekmektedir. 400

$J.m^{-2}$ UV dozu ile hemen hemen tüm patojen mikroorganizmaları %99.99 oranında giderildiği belirlenmiştir. Bu nedenle UV cihazı seçiminde güvenilir bölgede kalmak için UV dozu en az $400 J.m^{-2}$ olarak tercih edilmelidir (55).



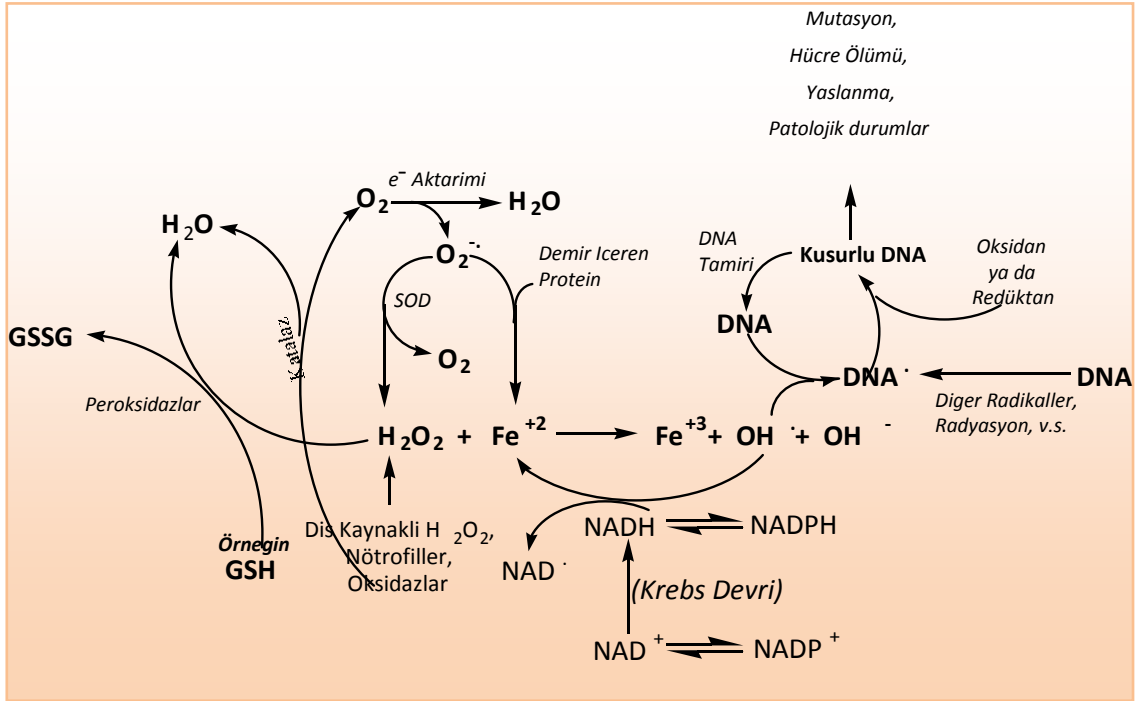
Şekil 1.4 UV lambaların 254 nm dalgaboylu UV ışın üretimi (52)

1.2.5.3. UV Işınlarnın Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri

Sucul ortamlarda yaşayan özellikle enterik ve fekal koliformlar gibi bakterilerin yaşamı, dağılışı ve miktarı çeşitli çevresel faktörlerin varlığına ve etkisine bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörlerden özellikle sucul sistemlerde yaşayan mikroorganizmaların yaşamını etkileyen en önemlilerinden bazıları, güneş ışığı (solar radyasyon) (58), UV ışınları ve fotosensitizer maddelerin varlığıdır (59). Solar spektrumun UV-B (280-315 nm) ışığın en zararlı dalga boyunu ile direk fotobiyolojik DNA zararı içermektedir. Çünkü ortamda bir fotosensitizer ve oksijenin varlığında bakterilerdeki yaralanma olayı daha yüksek olmaktadır (60). Hücre içi ya da hücre dışı kaynaklı ışığa duyarlı moleküllere fotosensitizer adı verilmektedir. Fotosensitizerler ürettikleri serbest radikaller vasıtasıyla bakteriyal proteinlerde, yağ asitlerinde, biyolojik zar ve organellerde bazı değişiklikler meydana getirmektedir.

Eşleşmemiş elektrona sahip olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2), radikal olmayan özelliğe sahip bir reaktif oksijen türüdür. Ancak H_2O_2 , Fenton ve Haber-Weiss

reaksiyonları ile çok güçlü bir reaktif olan hidroksil radikalini (OH^\bullet) oluşturmaktadır. Ayrıca H_2O_2 'nin UV ışınlarının etkisiyle OH^\bullet 'a dönüştüğü de bilinmektedir. OH^\bullet ; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere çok güçlü bir şekilde saldırılmaktadır. Bu şekilde biyomolekülleri oksitleyip yapılarında kalıcı hasarlar bırakılmaktadır. OH^\bullet yarı ömrü 10^{-9} saniye gibi çok kısa olan bir reaktif oksijen türüdür. Aynı zamanda H_2O_2 'in indirgenmesi sonucunda açığa çıkmaktadır (61). H_2O_2 'in bir radikal olmamasına rağmen tehlikeli oluşu, hücre membranından kolayca difüze olabilmemesinden kaynaklanmaktadır (62). H_2O_2 'deki O-O bağı nispeten zayıf olduğu için kolaylıkla parçalanmaktadır. Bu şekilde reaktivitesi çok yüksek olan OH^\bullet radikali oluşturmaktadır. Bu homolitik parçalanma demir (yeryüzündeki elementler arasında dördüncü, metaller arasındaki ikinci en yaygın element) tarafından da gerçekleştirilmektedir (63,64). Bu reaksiyon sırasında oluşan OH^\bullet , yeni radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Böylece DNA hasarının oluşumunda başrol oynamaktadır (65). Bu durum Şekil 1.5.'de gösterilmektedir.



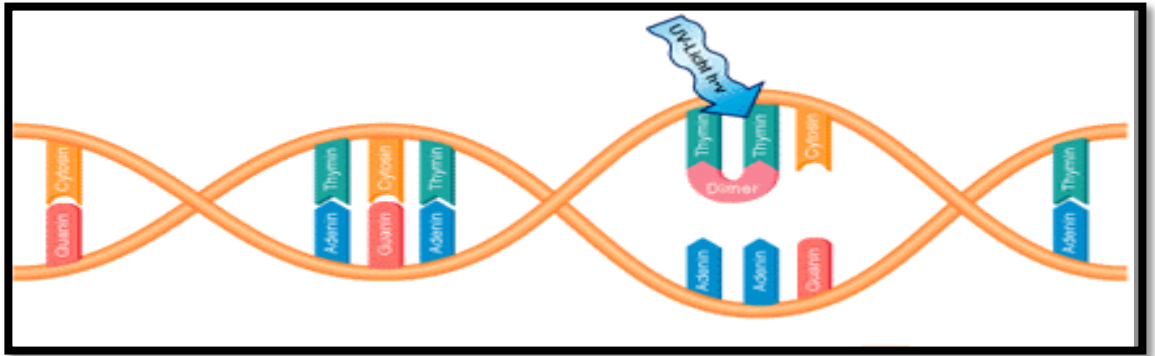
Şekil 1.5 Fenton reaksiyonu, DNA hasarı ve antioksidan sistem (66)

Ozonun sudaki fotolizi H_2O_2 oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca, ozon UV radyasyonu ile reaksiyona girerek OH^\bullet radikali oluşumunu sağlamaktadır. Peyton ve Glaze (67), Ozon/UV prosesi esnasında H_2O_2 oluştuğunu belirtmektedirler. Birçok oksidatif reaksiyon fizyolojik ve patolojik şartlarda, aralarında OH^\bullet radikalinin de bulunduğu birçok radikal üretmektedir. OH^\bullet radikalinin en önemli etkisi DNA üzerinde hasara sebep olmasıdır. Oksidatif stres ile hasara uğrayan protein ve lipitler tamir edilebilmektedir. Fakat DNA hasara uğradığında, eğer tamir edilmezse, bu hasar gelecek nesillere aktarılabilmektedir (64). OH^\bullet radikali organik moleküllere katılabilmekte ya da elektron koparabilmektedir. Bu reaksiyonları nükleik asitlerle de olabilmektedir. OH^\bullet heterosiklik DNA bazlarının çift bağlarına katılabilmektedir. Ayrıca timinin metil grubundan ve/veya 2'-deoksiribozun her bir C-H bağlarından bir H atomu koparmaktadır (64). Protein, geçiş metal iyonunu özel bir bölgeden bağlamaktadır. Bu bölgede geçiş metal iyonu H_2O_2 ile reaksiyona girerek OH^\bullet radikalini oluşturmaktadır. OH^\bullet radikali de hasar verici etkisini metal bağlanma bölgesinde veya ona yakın bölgelerde meydana getirmektedir. Proteinlere olan serbest radikal atakları peroksitlerin ve karbonillerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Radikaller eşleşmemiş elektronları eşleştirme (karşısındaki atom ya da molekülden elektron alma veya verme) eğiliminde oldukları için kararsızdırlar. Bu kararsızlıkları onların kimyasal olarak aktif olmalarının nedenidir. Oksijen, radyasyona maruz bırakılan hayvan ve bakteri hücre kültürlerindeki radyasyon hasarını artırmaktadır.

1.2.5.3.1. DNA Üzerine Etkisi

DNA'da tek ve çift zincir kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme) ve şeker hasarları oksidatif hasara bağlı olarak meydana gelmektedir. Bunların yanında DNA ile protein arasında çapraz bağlanma, DNA'nın antijenik karakter kazanması, anti-DNA antikorları oluşması da oksidatif hasar sonucu oluşabilmektedir (68). OH^\bullet radikalinin reaktivitesi çok yüksek olmasına rağmen hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılığı oldukça düşüktür. Fakat OH^\bullet radikalinin oluşturduğu H_2O_2 membranı kolayca geçerek nükleusta OH^\bullet radikale dönüşmekte ve DNA hasarına neden olabilmektedir. Tüm DNA bazlarına yapışma özelliğine sahip olan OH^\bullet radikali özellikle guanin türevli ürünler oluşturmaktadır (69).

UV radyasyon enerjisi hücrel DNA'larca absorbe edilerek, yan yana bulunan timin bazları arasında kimyasal kovalent bağlar oluşturarak, timin dimerleri meydana getirmektedir (Şekil 1.6). Oluşan bu timin dimerleri hücrel UV hasarının başlıca mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu hasar DNA'nın doğal heliks yapısını bozarak DNA iplikçiklerinde katlanmalara neden olmaktadır. Bu durum hücre bölünme öncesi kromozom replikasyonunu güçleştirmektedir. Bu duruma rağmen kromozom replikasyonu gerçekleşen hücreler üreyemeyen mutant hücrelere dönüşmektedir. Timin dimerlerinin yaşamsal fonksiyonu olan genlerde meydana gelmesi ölümcül olmaktadır. UV ışınlarının dozunun artması durumunda timin dimerleri yanı sıra, sitozin dimerlerinin de oluşumu gözlenmektedir. Mikroorganizmaların UV-B ile muamelesi sonucu en fazla toksik etki DNA'da görülmektedir. Bu durum 315 nm altındaki ışınları DNA'nın kuvvetli bir şekilde absorbe etmesi ile açıklanabilir. Bu durumda en fazla oluşan ürün siklobütan pirimidin dimerleri (CPD)'dir (70). CPD oluşumu RNA transkripsiyonunu ve DNA sentezini engellemektedir. UV-C (200-280 nm) ışınları direkt germisidal etkiye sebep olmaktadır. İnaktivasyon mekanizması 254 nm dalga boyunda yayılan ışığın mikroorganizmanın hücre duvarından geçerek DNA'nın dimerleşmesine neden olması ile açıklanır. Bu durum transkripsiyon ve replikasyon mekanizmasının bloke olması ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (71).



Şekil 1.6 UV ışınlarının DNA'ya etkisi (52)

1.2.5.3.2. Proteinler Üzerine Etkisi

UV etkisi ile oluşan serbest radikaller proteinlerde oksidasyona sebep olmaktadır. Bu tür hasara uğramış proteinler ileri derecede oksitlenmiş proteinler (İDOP) olarak adlandırılmaktadır. Protein oksidasyonu, reaktif oksijen türleri (OH^\bullet ,

H₂O₂ gibi) ile direkt veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirekt olarak oluşabilmektedir. Her iki durumda da proteinlerin kovalent modifikasyonu söz konusudur (72). Aminoasit α karbonundan bir H atomunun OH[•]'a bağlanarak ayrılması ve proteinin ana yapısında değişime neden olmaktadır. Yapısı değişmiş bu proteinler karbon merkezli radikal olarak tanımlanmaktadır. Oksijen varlığında bu tür proteinler hızlıca peroksil radikale dönüşmektedir. Proteinlerde oluşan karbonil grupları diğer karbonil türevleri ile etkileşime girebilir. Bu türevlere ketoaminler, ketoaldehitler ve deoksiozonlar örnek verilebilir. Bu reaksiyon sonucunda şekerlerin indirgenmesi ya da lizin kalıntılarının oksitlenmesi meydana gelir. Bununla birlikte Gardner ve arkadaşları (73), aktif merkezde Fe ya da S kümeleri içeren proteinlerin oksitlenmeye daha çok duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu tür değişimlerin kümülatif etkisi sonucu proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyon meydana gelmektedir.

Yapıları bozulan proteinler fonksiyonlarını yerine getiremezler ve çeşitli metabolik yollarda aksamalar meydana gelir. Bununla birlikte protein-reseptör bağlanmasında, sinyal ileti mekanizmasında, transport sistemlerinde, hücre-hücre iletişiminde ve enzimlerin rol oynadığı hücresele olaylarda aksamalar da görülmektedir (74). Katalitik aktivite kaybı, aminoasit değişikliği, karbonil grubu oluşumu, floresans özellikte değişiklik, parçalanma, protein-protein çapraz bağ oluşumu, proteolitik duyarlılıkta artış ve S-S küprülerinin oluşumu UV ışığı etkisi ile proteinlerde en sık rastlanan anormalliklerden bazılarıdır (Tablo 1.1). Pek çok proteindeki sistein aminoasitleri indirgenmiş halde bulunmaktadır. Oksidatif stres varlığında sistein aminoasitleri yükseltgenerek disülfid bağları oluşmaktadır. Bu duruma geri dönüşümlü bir oksidasyon olan disülfid stresi denilmektedir. Mikroorganizmalarda SoxRS ve OxyR transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile zararlı oksidanların temizlenebilmesi bu stresi geri dönüşümlü kılmaktadır (75).

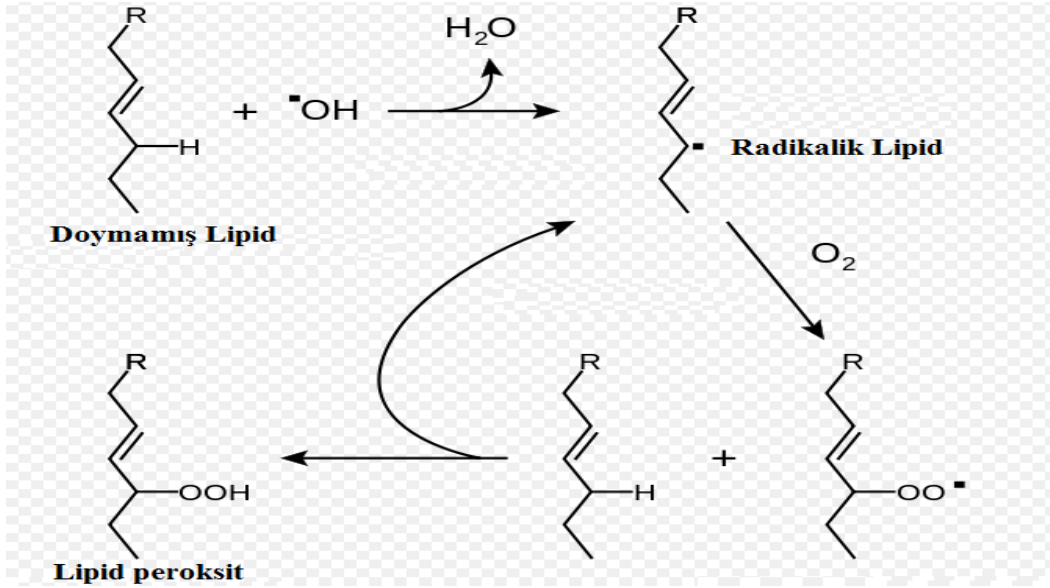
Tablo 1.1 Aminoasitlerden UV ışığı etkisi ile oluşan okside ürünler (76,77)

Amino asit	Oksidasyon Ürünleri
Arjinin	Glutamik semialdehit
Sistein	Disülfürler, Sisteik asit
Glutamil	Oksalik asit, pirüvik asit
Histidin	2-Oksohistidin, asparagin, aspartik asit
Lizin	2-Aminoadipik semialdehit
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Fenilalanin	2,3-dihidroksifenilalanin, 2-, 3- ve 4-hidroksifenilalanin
Prolin	2-pirolidon, 4- ve 5-hidroksi prolinpiro glutamik asit
Treonin	2-Amino-3-ketobütirik asit
Triptofan	2-, 4-, 5-, 6-, 3-hidroksikinürenin, formilkinürenin
Tirozin	3,4-Dihidroksifenil alanin, Tyr-Tyr çapraz bağlantılar

1.2.5.3.3. Hücre Zarı ve Lipid Üzerine Etkisi

Organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalin membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile lipid peroksidasyonu başlamaktadır. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonunu başlatan radikaldir. Lipid peroksidasyonu membran yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin, çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olmaktadır (78). Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi şeklinde başlamaktadır. Ayrıca daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturmaktadır. Bu zincir reaksiyonların kendi kendini devam etmesi hücre membran hasarının geri dönüşümsüz olmasına neden olmaktadır. Lipid radikali (L[•]) hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu oluşan kararsız bir yapıdır. Yapıya moleküler oksijenin girmesi sonucu lipid peroksit radikali (LOO[•]) oluşmaktadır. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Tüm bu reaksiyonlar sonucunda oluşan ürünlerin pek çoğu oldukça reaktiftir. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan

çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (HNE)'dir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölümlerine yayarlar (78). MDA ölçümü ile lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Lipid peroksidasyon süreci başlama, uzama ve bitiş olmak üzere üç bölümden oluşur (79). Lipid peroksidasyonunun temel aşamaları ve bu sırada oluşan bazı toksik bileşikler Şekil 1.7'de görülmektedir.



Şekil 1.7 Araşidonik asidin oto-oksidasyonu mekanizması (80)

1.2.5.4. UV'ye Karşı Geliştirilen Mikrobiyal Adaptasyonlar

1.2.5.4.1. DNA Hasarına Karşı Oluşturulan Adaptasyonlar

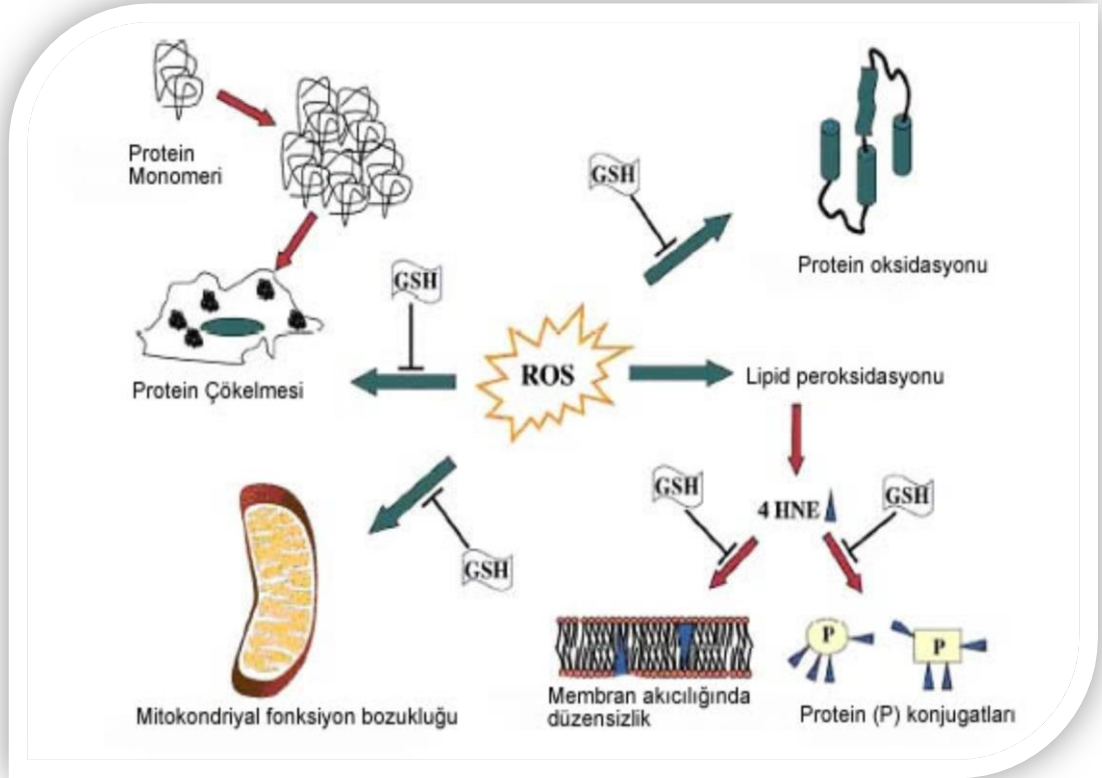
250-260 nm (253.7 nm) dalga boyu UV ışınının en büyük antimikrobik etkinliği bölgesindedir (81). Bu dalga boyu, DNA tarafından en etkin şekilde absorbe edilen dalga boyudur. Bu ışınlar proteinlerin ve nükleik asitlerin özel affiniteleri nedeniyle kolayca absorbe edilirler. Özellikle UV ışığı bir DNA zincirine çarptığı zaman pürin ve

pirimidin molekülleri tarafından absorbe edilmektedir. Bu absorpsiyon sonucunda baz modifikasyonları, tek zincir kırıkları ya da anormal baz eşleşmesi gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir (82). Spor oluşturan mikroorganizmalar UV'den sporulasyon sürecinde oluşan proteinler aracılığı ile korunmaktadır (83). Bu spor proteinleri DNA'ya bağlanarak konfigürasyonu stabil hale getirmektedir. Böylece timin-timin dimerlerinin oluşumu zorlaşmaktadır. Bakteriler UV zararına cevap olarak farklı DNA tamir yolları geliştirmektedir. Bunlar fotoenzimatik tamir, kesip çıkarma tamiri ve rekombinasyonel tamirdir (postreplikasyon tamiri). Fotoenzimatik enerji kaynağı olarak yakın-UV ya da görünür ışık kullanıldığında, tek bir enzim (photoliyaz) tarafından CPD'nin direkt monomerizasyonunu içermektedir (84). Fotoenzimatik tamir, UV-A ya da fotosentetik olarak aktif radyasyon (FAR) ile ikinci bir muameleden sonra UV-B'ye maruz bırakılan sucül bakteriyoplanktonlarda gözlenmiştir (85). UV ışığı ve çeşitli kimyasal mutajenler aracılığıyla oluşan mutasyona *E. coli* bakterisi SOS cevabının uyarılmasıyla karşılık vermektedir (86). SOS cevabı yaklaşık 30 genin expressiyonunu koordine eden genel bir cevap mekanizmasıdır (87). Ayrıca SOS mekanizmasının genel fonksiyonu DNA zararının ortaya çıkmasından sonra hücresel yaşamın devamlılığını sağlamaktır. Bu olay LexA ve RecA proteinlerinin işbirliğiyle kontrol edilir ve SOS regulonunun transkripsiyonel represörü LexA'dır (86). Fotoreaktivasyon, UV ışınlamasından sonra bakteri hücreleri hemen görülebilen ışınlar (300-400 nm dalga boyu) tutulursa, UV-ışınlarının letal etkileri azalır. Bu olay, UV-ışınlaması sonu oluşan primidin dimerlerinin görülebilen ışınlarca aktive edilen özel enzimler tarafından hidrolize edilmesiyle sonuçlanır. Böylece, dimerler ortadan kaldırılarak bozukluk tamir edilir. Şigella gibi bazı bakteriyel patojenler fotoreaktivasyon sistemine sahiptir. Fakat virüsler ve bazı bakterilerde bu mekanizma yoktur. Işıktaki yapılan bu tamir mekanizması yanı sıra bakterilerde, karanlıkla iş görebilen ve dimerizasyonu gideren diğer bir tamir sistemi daha bulunmaktadır (88). Bu mekanizmada 4 enzim görev alır. Bunlar endonükleaz, ekzonükleaz, DNA polimeraz, polinükleotid ligaz'dır. Bu enzimler bozulan bölgeyi tamir ederler. Bu sistemde timin dimerleri taşıyan kısa DNA zincirleri kesilip atılır. Onarım belli bir sürede yapılabilir, bu süre içinde onarım olmazsa, hasar geri dönüşümsüz olacaktır.

1.2.5.4.2. Protein Hasarına Karşı Geliştirilen Adaptasyonlar

Hücresele düzeyde proteinler reaktif oksijen türlerine maruz kaldıkları zaman aminoasit yan zincirleri arasında modifikasyonlar meydana getirir. Dolayısıyla protein yapısında değişimler oluşmaktadır. Bu modifikasyonlar hücre metabolizmasını bozarak fonksiyonel değişimlere yol açmaktadır. 20. yy'ın son on yılında nörodejenetif diyabet, ateroskleroz ve yaşlanma gibi çeşitli hastalıklar oksidatif hasara uğramış proteinlerden kaynaklanmaktadır (77). Hasara bağlı olarak proteinin iç kısmında bulunan hidrofobik bölgeler yüzeye taşınmaktadır. Protein yüzeyinde artan hidrofobiklik ile proteinlerin proteolitik degradasyonunu artırmaktadır. Bu yolla hasarlı proteinler hücreden temizlenmiş olmaktadır. *E. coli*'de oksitlenmiş proteinleri parçalayan ATP'den bağımsız proteinazlar mevcut olduğu rapor edilmektedir (89). Ökaryotik hücrelerde, hücre içi hasarlı proteinler lizozomal olmayan proteozom denilen multikatalitik proteinaz kompleks tarafından parçalanmaktadır (90). Oksidatif stresle indüklenen disülfid bağlarının oluşumu Hsp33 şaperon aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu şaperonlar okside proteinleri çözünebilir tutmada ve proteinleri korumada görev yapmaktadır (91). Bununla birlikte pek çok hücrede hasara karşı glutatyon (GSH) düzeyi artmaktadır. GSH birçok hücrede bulunan ve hücrelerin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan bir tripeptittir (92). Hücrede milimolar derişimde bulunan GSH primer olarak redükte formda bulunmaktadır. İndirgenmiş GSH'ın yükseltgenmesiyle okside formda disülfüd glutatyon dimeri (GSSG) oluşmaktadır (93). GSH'ın hücresele seviyesi aminoasit transporterları, γ -glutamil transpeptidaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon sentetaz ve glutatyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunmaktadır (94). GSH antioksidan bir radikal tutucusu (scavenger) gibi davranarak pek çok protein ve enzimi oksidasyona karşı korumaktadır. GSH hücre savunmasında antioksidan olarak rol oynaması dışında DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresele fonksiyonlarda da önemli rolü bulunmaktadır (95). GSH, oksidatif stres, elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında görev alır. Bu nedenle UV stresine karşı hücrelerde glutatyon düzeyinin dengede tutulması oldukça önemlidir (96).

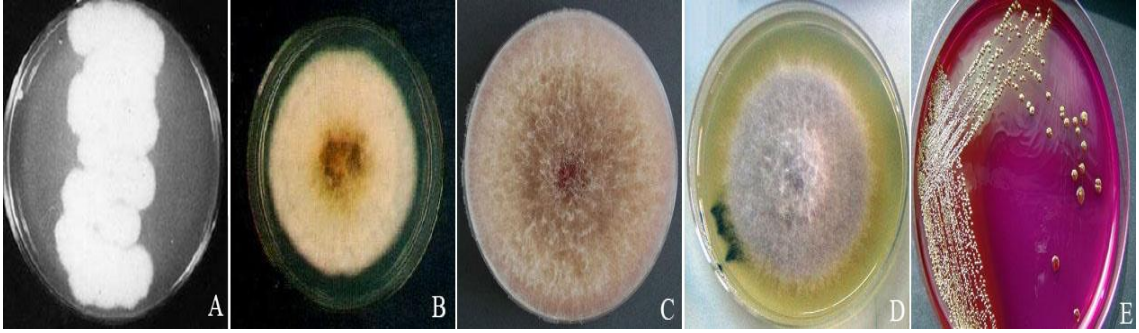
Oksidatif stres koşullarında GSH düzeyinin 4 ana süreçle değişebileceği ön görülmektedir (97). Bu aşamalar GSH'nin GSSG'ye oksidasyonu, GSH'nin proteinlerle birleşerek karışık disülfitler oluşturması, glutatyon transferazların katalizlediği konjugasyon reaksiyonlarından sonra hücre dışına aktif olarak pompalanması ve glutamil transpeptidazların etkisiyle GSH yıkımıdır. Oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken, GSSG artar. Bu durumda biriken H_2O_2 ve organik hidroperoksitler glutatyon peroksidaz ve redüktaz etkisiyle ortadan kaldırılırlar. Bu bileşiğin aktif bir şekilde hücre dışına çıkarılması GSH tükenmesine yol açmaktadır. Reaksiyonlar sonucu oluşan GSSG, NADPH'nin de kullanıldığı bir reaksiyonla tekrar GSH'a çevrilir (98). Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonundan başka, GSH, protein agregatlarının oluşumuna, Kompleks I aktivitesinin inhibisyonuna, mitokondriyal düzensizliklere ve lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri korumaktadır (99).



Şekil 1.8 Oksidatif stresten korunmada GSH'nin antioksidan fonksiyonlarının şematik gösterimi (99)

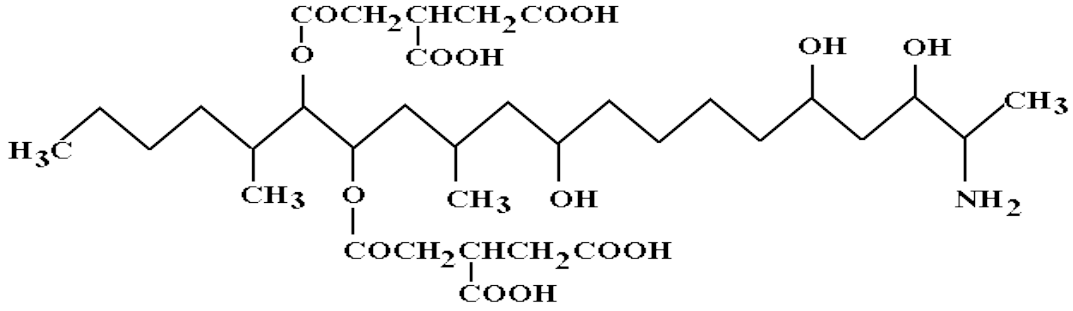
1.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada mikroorganizmalar tarafından UV stresine karşı geliştirilen adaptasyonlar araştırılmıştır. Hedef mikroorganizma olarak *Fusarium* ve *E. coli* seçilmiştir. Stres adaptasyonları başlıklı çalışmalar *Fusarium* türleri ile henüz yeterince araştırılmamıştır. *Fusarium* türleri ilk kez 1821’de Link ex Gray tarafından tanımlanmıştır. *Fusarium* cinsi funguslar tür sayılarının fazla ve enfekte ettiği konukçularının geniş olmaları nedeniyle büyük öneme sahiptirler (100). *Fusarium* türleri tüm dünyada, toprak, bitki, bitki artıkları, hava, su ve çeşitli biyofilm tabakasında bulunan filamentöz funguslardır (101). *Fusarium*’un normal mikroflorası pirinç, fasulye ve diğer ekinlerdir. *Fusarium* türleri öncelikle bitki patojeni olmakla beraber, insanlarda ve hayvanlarda da nadir infeksiyon etkenidirler. İnsanlarda infeksiyon etkeni olarak en sık saptanan türler: *F. solani* (olguların yaklaşık %50’si), *F. oxysporum* (olguların yaklaşık %20’si), *F. verticillioidis* (olguların yaklaşık %10’u) ve *F. moniliforme* (olguların yaklaşık %10’u)’dir. İnsanlarda, *Fusarium* türleri içerisinde *F. solani* keratit etkeni olarak, *F. oxysporum* onikomikoz etkeni olarak sıklıkla saptanmaktadır (102,103). Bazı *Fusarium* türlerinin oluşturduğu toksinler ile kontamine besinlerin alımı sonrası, hem insanlarda hem de hayvanlarda mikotoksikoz görülmektedir (103). *Fusarium* toksinleri ile kontamine olmuş tahılların uzun süre tüketimiyle alerjik semptomların artmasına ya da kanserojenik etkiye neden olmaktadır. İnsanlar için en öldürücü ve en dirençli *Fusarium solani*’dir.



Şekil 1.9 *Fusarium moniliforme* kolonisi (a), *Fusarium semitectum* kolonisi (b), *Fusarium culmorum* kolonisi (c), *Fusarium proliferatum* kolonisi (d), *E. coli* kolonisi (e) (104-108)

Fusarium proliferatum kolonileri 25°C’de Potato Dextrose Agar (PDA)’ da 8 günde 6.5-8.5 cm çapa ulaşmaktadır (Şekil 1.9.d). Mikrokonidiler, genellikle tek hücreli, nadiren tek septalı clevele olup, uzun zincir veya küme şeklinde havai misillerdeki lateral konidiforlarda oluşurlar. Klamidospor bulunmamaktadır. *Fusarium culmorum* bir bitki patojenidir. Koloniler PDA’da hızla büyümektedir (Şekil 1.9.c). Havai misel, sarı kahverengi veya soluk turuncu beyazımsı, ancak yaşla birlikte kahverengi-kırmızı renge dönüşmektedir. Işık ve sıcaklık koşulları altında, alternatif, spor kitlelerin halkalar bir izolat tarafından oluşturulabilmektedir (109). Mısırdaki bulunan *Fusarium moniliforme* (Şekil 1.9.a) ve *Fusarium proliferatum*’un ürettiği mikotoksin fumonisin olarak adlandırılmaktadır. Şekil 1.10 ve şekil 1.11’ de fumonisin grubunun başlıca toksinleri olan FB1 ve FB2’nin yapıları gözlenmektedir (110).

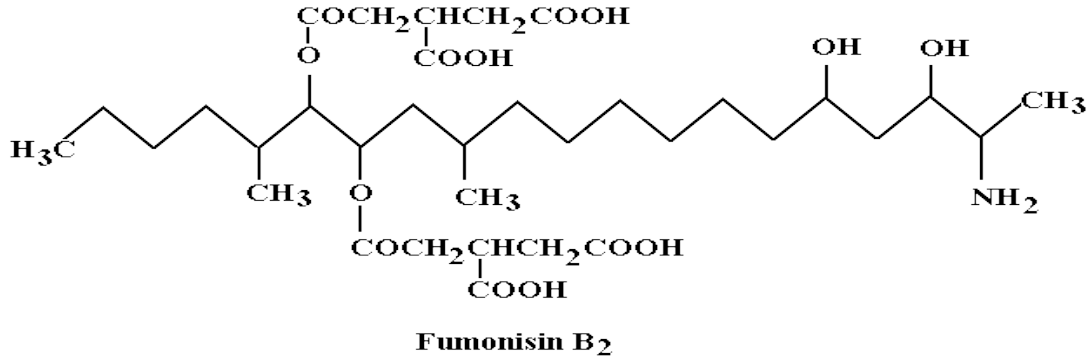


Fumonisin B 1

Şekil 1.10 Fumonisin B1’in yapısı (111)

Fumonisinler toksik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duymayan bileşiklerdir. Daha çok FB1 ve FB2 olmak üzere fumonisinlerin, hayvanlar üzerinde türe bağlı olarak nörotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, immünosupresyon (ve bazen de immünostimulasyon), gelişim bozuklukları, karaciğer tümörleri olmak üzere çeşitli toksik etkileri vardır. FB1’in sfingolipid biyosentezinden farklı olarak palmitik asit oluşumunu değiştirerek hücrelipid sentezini etkilediği gözlenmiştir. Bu nedenle fumonisinler membran bileşenleri, yağ asiti havuzu ve uzun zincirli yağ asitlerinin hücre içinde akümülayonu üzerinde önemli etkilere neden

olabilir. Bu etkiler membran yapılarının bütünlüğünü bozar ve hücre ölümüyle sonuçlanır.



Şekil 1.11 Fumonisin B₂'nin yapısı (111)

E. coli, gram negatif çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Pek çok *E. coli* suşu polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül veya yine polisakkarit yapısında K antijenlerini içeren balık tabakası içermektedir (112). *E. coli* peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerob olarak üremektedir. Optimal üreme 37°C'de, nötral pH'da gerçekleşmektedir. 44°C'de laktozu fermente edebilmesi ve indol oluşturması diğer koliform laktozu fermente eden bakterilerden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (113). Katı besiyerlerinde 24 saatte düzgün kenarlı, ortası kalkık, 2-3 mm capında, pigmentsiz koloniler oluşturmaktadır (Şekil 1.9.e). *E. coli*'nin önemli biyokimyasal özellikleri glikozdan asit ve gaz oluşturması; laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, L-ramnoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente etmesi; adonitol, inositol, sellobioz, eritrol, D-arabitolu fermente etmemesi; nitrata indirgemesi; katalaz, metil kırmızısı, lizindekarboksilaz, 25°C'de DNaz deneylerinin negatif olması; indol oluşturması; H₂S, üreaz oluşturmaması olarak belirtilebilir (112,113).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılacak olan mikroorganizma kültürleri Kırıkkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Mikroorganizmaların çoğaltılması steril Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyerinde gerçekleştirilmiştir (Nüve EN500). Kùltürler çalkalamalı inkübatör de (Handy LAB NB-205) 25°C'de 110 rpm çalkalama hızında 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Mikroorganizma stok kültürleri ise Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerinde hazırlanarak +4°C'de saklanmış ve tüm deney süresince yenilenmiştir.

2.2. UV Uygulaması ve Hücre Homojenatlarının Eldesi

Tüm deneyler iki set halinde gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu sette tüm mikroorganizmalar 25°C'de steril ortamda inkübe edilirken, UV uygulaması alan mikroorganizmalar 25°C'de UV ışığı varlığında 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. UV uygulaması için kültürler UV cihazına (UVGL-58 Handheld UV lamp) yerleştirilmiş ve 99 Joule enerji seviyesi/254 nm dalga boyunda UV uygulaması gerçekleştirilmiştir. Uygulama süresi sonunda kültürler santrifüj (Hettich EBA-20) edilerek hücre pelletleri elde edilmiştir. Pelletler steril 6 mL etanol ile bir kez homojenize edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrasında elde edilen süpernatantlar GSH, protein, İDOP, MDA ve lipid kompozisyonu tayinin de kullanılmıştır.

2.3. Protein Tayini

Protein tayini kültürlerin homojenizasyonu sonrasında elde edilen süpernatantlarda gerçekleştirilmiştir. Protein tayini Teco Diagnostic ticari kit (Total Protein Reagent Set, Teco Diagnostics, Anaheim, CA 92807) kullanılarak spektrofotometrik (SHIMADZU-1240) yöntemle 540 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Tayin yönteminin prensibi proteinlerin alkali ortamda Cu²⁺ iyonuna bağlanarak mor renkli Cu-protein kompleksi oluşumuna dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan mor renkli kompleks spektrofotometrede 540 nm'de analiz edilerek

protein konsantrasyonu belirlenmektedir (114). Standart olarak 2-10 mg.ml⁻¹ aralığında albumin çözeltisi kullanılmış ve kalibrasyon grafiği (Ek-1) elde edilmiştir.

2.4. İleri Derecede Oksidasyon Protein (İDOP) Tayini

İDOP ölçümü Witko-Tarsat ve arkadaşlarının (115) tanımladığı yönteme göre yapılmıştır. Çalışma öncesinde oda ısısına getirilen örneklerden 10 µL alınmış ve üzerine 160 µL PBS tamponu eklenip, karıştırılarak 25 sn inkübe edilmiştir. Süre sonunda karışıma 20 µL reaktif I eklenip, 25 sn inkübe edilmiştir. Son olarak 10 µL reaktif II eklenmiş ve tekrar 25 sn inkübe edilip absorbans 340 nm'de okunmuştur. Chloramine-T 100-1000 µmol.L⁻¹ aralığında standart olarak kullanılmış ve kalibrasyon grafiği (Ek-2) elde edilmiştir.

Çözeltiler

Reaktif I (Asetik asit): % 96 v.v⁻¹ olacak şekilde hazırlanmıştır.

Reaktif II (KI): 1.16 mol.L⁻¹ olacak şekilde hesaplanmış ve PBS (20 mmol.L⁻¹, pH:7.4) ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Tampon: PBS (20 mmol.L⁻¹, pH: 7.4) hazırlanması: Na₂HPO₄' den 5.796 gr, KH₂PO₄'den 0.52g ve NaCl'den 8.71 g tartılmış ve distile su ile 1 litreye tamamlanılmıştır.

2.5. GSH Tayini

GSH tayini Beutler ve arkadaşlarının (116), rapor ettiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir homojenattan 0.75 mL tüpe alınmış ve üzerine 0.3 mL Reaktif I konularak vortekslenmiş (Velp SCIENTIFICA) ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. 3000 rpm'de 10 dakika sanrifüjleme (Sigma 1-14 sartorius) işlemi sonrasında süpernatantdan 0.5 mL başka bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine 2 mL Reaktif II eklenerek vortekslenmiştir. Karışım üzerine 0.25 mL Reaktif III eklenerek 412 nm'de spektrofotometrik analiz gerçekleştirilmiştir. Standart olarak 0.01-0.1 mg.ml⁻¹ aralığında GSH çözeltileri kullanılmış ve kalibrasyon grafiği (Ek-3) elde edilmiştir (116,117).

Çözeltiler

Reaktif I: 1.67 g meta fosforik asit, 0.2 g EDTA sodyum tuzu ve 30 g NaCl tartılarak bir miktar distile suda çözülerek son hacim distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

Reaktif II: 5.34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar distile su ile çözerek son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Reaktif III: 40 mg DTNB ile 1 g sodyum sitrat tartılarak bir miktar suda çözülmüş ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.6. MDA Düzeyi

MDA analizi Yoshioka ve arkadaşlarının (118), bildirdiği yönteme göre yapılmıştır. Bu yöntem MDA ve tiyobarbütirik asit (TBA)'in asidik ve sıcak ortamda pembe bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Örnek ve kontrol grubuna ait örneklerden alınan 0.5 mL üzerine 2.5 mL, %20'lik triklorasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. Tüpler su banyosunda (Nüve ST402) 15 dakika kaynatılmış ve soğutulmuştur. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrasında 2 mL süpernatant üzerine 1 mL TBA ilave edilmiştir. Su banyosunda 15 dk kaynatma işlemi sonrasında tüpler soğumaya bırakılmıştır. Örnek ve standart absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm'de okunmuştur. Kalibrasyon egrisini çizmek için standart madde olarak kullanılan tetraetoksi propan (TEP)'in suda 1.25-20 $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ aralığında çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon egrisini (Ek-4) konsantrasyona karşı absorbans değerleri yerine konularak çizilmiştir.

Çözeltiler

Triklorasetik asit (% 10): 10 g triklorasetik asit (TCA) alınmış, bir miktar distile suda çözülmüş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Tiyobarbütirik asit (% 0.67) : 8 g NaOH 200 mL distile suda çözülmüştür. 1.675 g tiyobarbütirik asit alınmış, 200 mL'lik NaOH'da çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2.7. Yağ Asidi Analizi

2.7.1. Lipid Ekstraksiyonu

Lipid ekstraksiyonu saponifikasyon, metilasyon, ekstraksiyon ve bazik yıkama olmak üzere dört aşamada gerçekleştirilmiştir.

2.7.1.1. Saponifikasyon

Hücre kültürü içeren test tüplerine 5 mL çözelti I ilave edilerek 5-10 sn vortekslenmiş ve 5 dk süreyle 100°C'lik su banyosunda inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüpler tekrar 5-10 sn vortekslenerek 100°C'de 25 dk bekletilmiş ve hızlı bir şekilde soğutulmuştur. Bu muamele ile canlı hücreler parçalanarak, yağ asitlerinin serbest kalması sağlanmıştır.

2.7.1.2. Metilasyon

Saponifikasyon sonrasında test tüplerine 2 mL çözelti II eklenerek 5-10 sn vortekslenmiştir. 80°C'de 10 dk süreyle su banyosunda bekletilmiş ve hemen 2 dk süreyle buz veya soğuk su içerisinde soğutulmuştur. Yağ asitlerinden yağ asit metil esterler elde edilmiştir.

2.7.1.3. Ekstraksiyon

Metilasyon sonrasında tüplere 1.25 mL çözelti III eklenerek çalkalamalı inkübatörde 10 dk süreyle inkübe edilmiştir. Bu aşama ile alt kısımda inorganik üst kısımda da organik sıvı fazları olmak üzere iki ayrı faz oluşmuştur. Pastör pipeti kullanarak tüplerin alt kısmındaki asidik faz atılmış ve organik faz muhafaza edilmiştir.

2.7.1.4. Bazik Yıkama

Lipid ekstraksiyonunun son işleminde bazik yıkama gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her tüpe 3 mL çözelti IV ilave edilerek, 5 dk süre ile çalkalandıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüp içerisinde yeni iki faz oluşmuştur. Üst fazda depolanan ve yağ asidi metil esteri içeren faz pastör pipeti ile alınarak 2 mL'lik gaz kromatografi tüplerine transfer edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır.

Çözeltiler

Çözelti I (Saponifikasyon ayracı): Sodyum hidroksit (ACS) 45 gr, Metanol (HPLC saflıkta) 150 mL, distile su 150 mL ile hazırlanmıştır.

Çözelti II (Metilleştirme ayracı): Hidroklorik asit (6N) 325 mL, Metanol (HPLC saflıkta) 275 mL ile hazırlanmıştır.

Çözelti III (Ekstraksiyon ayracı): Heksan (HPLC saflıkta) 200 mL, Metil tert-butyl-eter (HPLC saflıkta) 200 mL hazırlanmış.

Çözelti IV (bazık yıkama): Sodyum hidroksit (ACS) 10.8 gr, distile su 900 mL ile hazırlanmıştır.

2.7.2. GC-MS Analiz Koşulları

Lipitlerin metil esterlerine dönüştürülmesi ve ekstraksiyonu sonrasında lipid profilinin belirlenmesi amacıyla gaz kromatografisi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Flame Ionizing Detector (FID) ve MN FFAP (50 m x 0.32 mm i.d.; 0.25 µm) kolonu kullanılmıştır. Dedektör ve enjeksiyon sıcaklığı 250°C, taşıyıcı gaz azot (40 mL.dak.⁻¹), split oranı 60:1 olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz koşullarına ait detaylar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1 GC-MS analiz koşulları

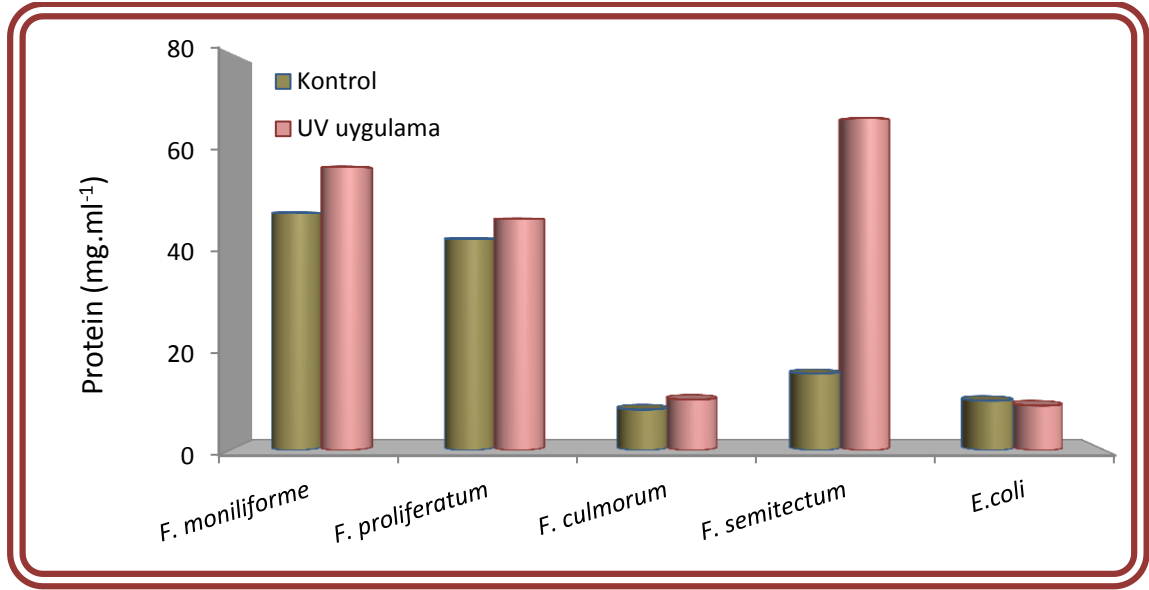
Kolon	Thermon-600 T capillary column(50 m x 0.25mm I.D.F)
Entegratör	C-R4A
Taşıyıcı gaz	Azot
Split oranı	60:1
Sıcaklık programı	70°C- 10 dakika // 2-° / dakika, 180 -°C- 30 dakika
Dedektör	FID
Dedektör sıcaklığı	250-°C
Enjeksiyon sıcaklığı	250-°C

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

UV hücrelerde makromoleküller üzerine farklı düzeylerde etki etmektedir. UV'den en çok etkilenen makromoleküllerin başında proteinler, nükleik asitler ve lipitler meydana gelmektedir. Bu çalışmada da UV'nin *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium semitectum* ve *E. coli* mikroorganizmalarında makromoleküler düzeyde etkileri ve bu etkilere karşı oluşturulan bazı cevaplar araştırılmıştır.

3.1. Protein Düzeyi

Proteinler, hücrede UV ışığından önemli derecede etkilenen makromoleküllerdendir. Bu nedenle çalışma kapsamında mikroorganizmalarda hücre protein düzeyi üzerine UV'nin etkisi Şekil 3.1'de verilmiştir. *Fusarium moniliforme* mantarının protein düzeyi UV uygulanan grupta 57.04 mg.mL⁻¹, kontrol grubunda 47.81 mg.mL⁻¹ bulunmuştur. *Fusarium moniliforme*'de kontrol grubuna kıyasla UV uygulanan grupta protein düzeyinin 1.19 kat arttığı belirlenmiştir. *Fusarium proliferatum*'de de benzer sonuçlar gözlenmiş ve protein düzeyinin kontrol grubuna göre, UV uygulanan grupta 1.09 kat arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde kontrol gruplarına kıyasla protein düzeylerinin *Fusarium culmorum*'da 1.24 kat, *Fusarium semitectum*'da ise 4.31 kat arttığı tespit edilmiştir. UV uygulaması sonucunda protein düzeylerinde gözlenen en yüksek artışın *Fusarium semitectum*'da meydana geldiği gözlenmektedir. *E. coli*'de ise mantarlardan farklı olarak UV uygulaması protein düzeyinde azalışa neden olmuştur. *E. coli*'de protein düzeyi UV uygulanan grupta 9.02 mg.mL⁻¹, kontrol grubunda 10 mg.mL⁻¹ bulunmuştur. Bu değerlere göre protein düzeyinin kontrol grubuna kıyasla UV uygulanan grupta 1.11 kat azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 3.1 UV uygulamasının mikroorganizmalarda protein düzeyi üzerine etkisi

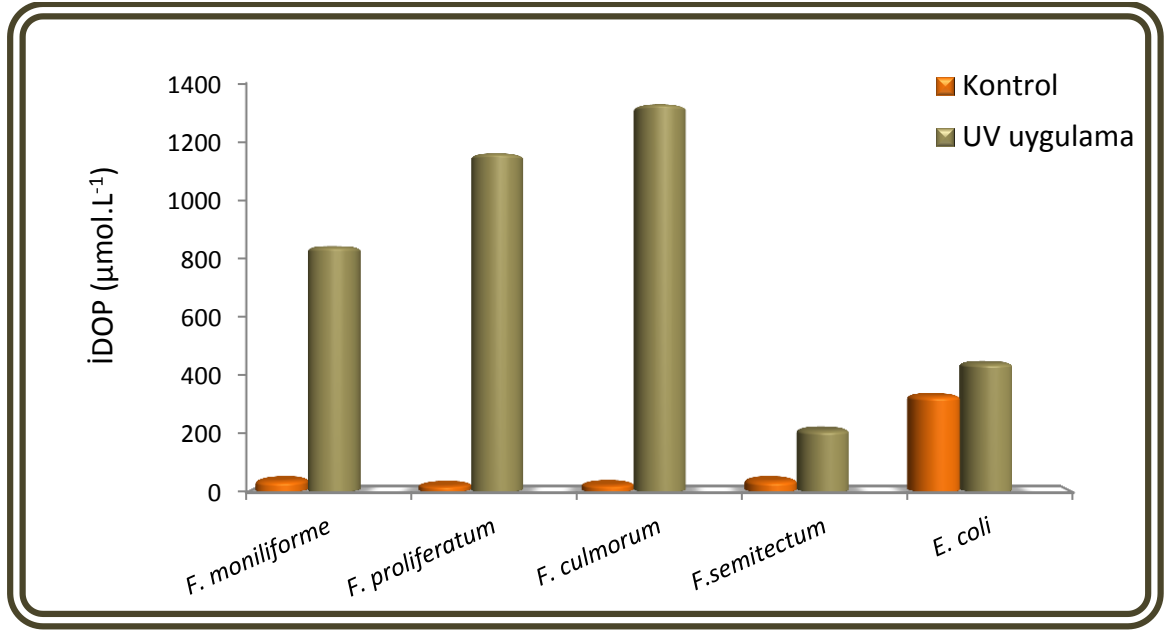
3.2. İleri Derecede Oksidasyon Protein (İDOP)

İDOP protein oksidasyonunun bir göstergesidir. UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda İDOP düzeyleri Şekil 3.2’de verilmiştir. UV uygulamasından sonra İDOP düzeylerinin test edilen tüm mikroorganizmalarda arttığı belirlenmiştir. *Fusarium moniliforme* mantarın İDOP düzeyi UV uygulanan grupta $844.29 \mu\text{mol.L}^{-1}$, kontrol grubunda $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ bulunmuştur. Bu sonuç ile *Fusarium moniliforme*’de İDOP düzeyinin kontrol grubuna kıyasla, UV uygulanan grupta 21.11 kat arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde *Fusarium proliferatum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium semitectum* ve *E. coli*’de İDOP düzeylerinin sırası ile 50.93, 51.84, 5.36 ve 1.34 kat arttığı belirlenmiştir. En yüksek İDOP oluşumu *Fusarium culmorum*’da gözlenirken, en düşük İDOP oluşumu *E. coli*’de gözlenmiştir.

3.3. GSH Düzeyi

GSH hücrede oksidatif hasara karşı geliştirilen bir adaptasyon mekanizmasıdır. UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda GSH düzeyleri Şekil 3.3’de verilmiştir. *Fusarium moniliforme* mantarının UV uygulaması ile GSH düzeyinin 0.02

mg.mL⁻¹'den 0.04 mg.mL⁻¹ arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuca göre GSH düzeyinin 2 kat arttığı söylenebilir.

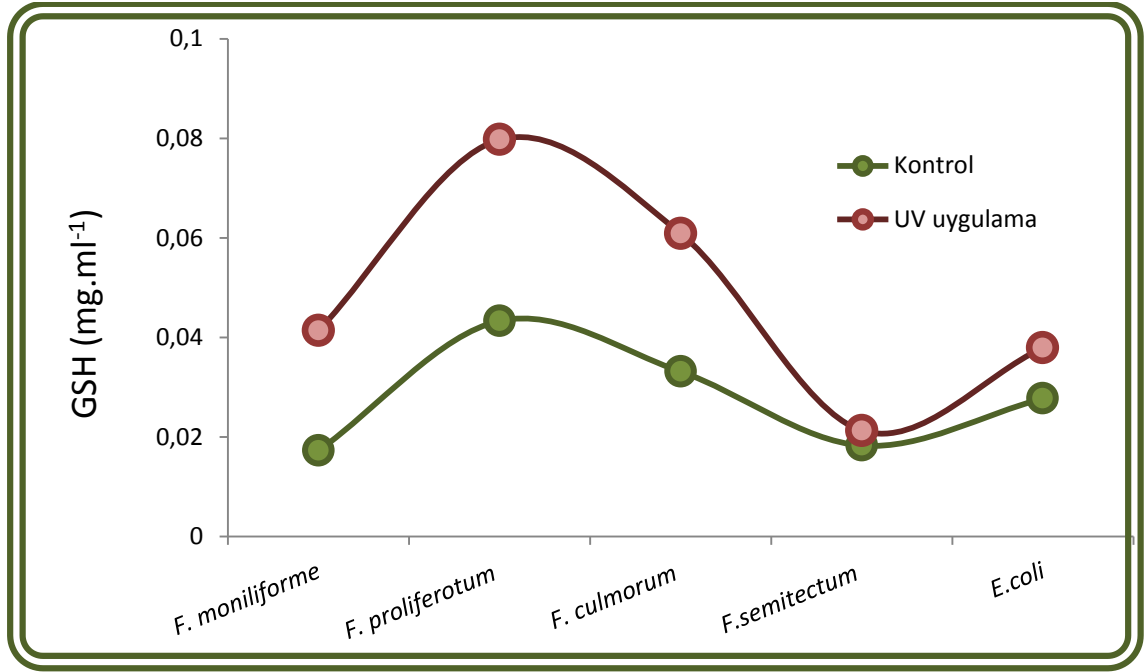


Şekil 3.2 UV uygulamasının mikroorganizmalarda İDOP düzeyi üzerine etkisi

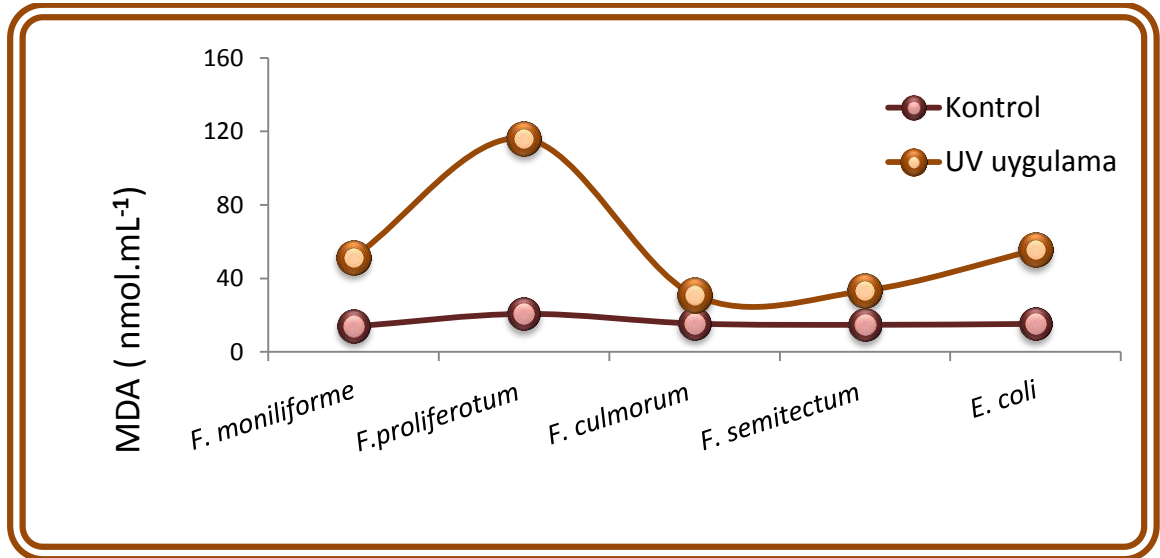
Fusarium proliferatum'de ise UV uygulaması ile GSH düzeyinin mantarın 0.04 mg.mL⁻¹'den 0.08 mg.mL⁻¹'ye arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde UV uygulaması sonucunda *Fusarium culmorum*'da GSH düzeyinin 2 kat, *Fusarium semitectum*'de ise 1.16 kat arttığı belirlenmiştir. *E. coli* ise GSH düzeyinin UV uygulanan grupta 0.04 mg.mL⁻¹, kontrol grubunda 0.03 mg.mL⁻¹ düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Bu değerlere göre GSH düzeyinin kontrol grubuna göre 1.3 kat arttığı tespit edilmiştir.

3.4. MDA Düzeyi

MDA lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir. UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda MDA düzeyleri Şekil 3.4'de verilmiştir. *Fusarium moniliforme* mantarında MDA düzeyi UV uygulanan grupta 51.40 nmol.mL⁻¹, kontrol grubunda ise 13.86 nmol.mL⁻¹ düzeyinde bulunmuştur. Bu durumda *Fusarium moniliforme*'de UV uygulamasının MDA düzeyini 3.64 kat arttırdığı gözlenmiştir.



Şekil 3.3 UV uygulamasının mikroorganizmalarda GSH düzeyi üzerine etkisi



Şekil 3.4 UV uygulamasının mikroorganizmalarda MDA düzeyi üzerine etkisi

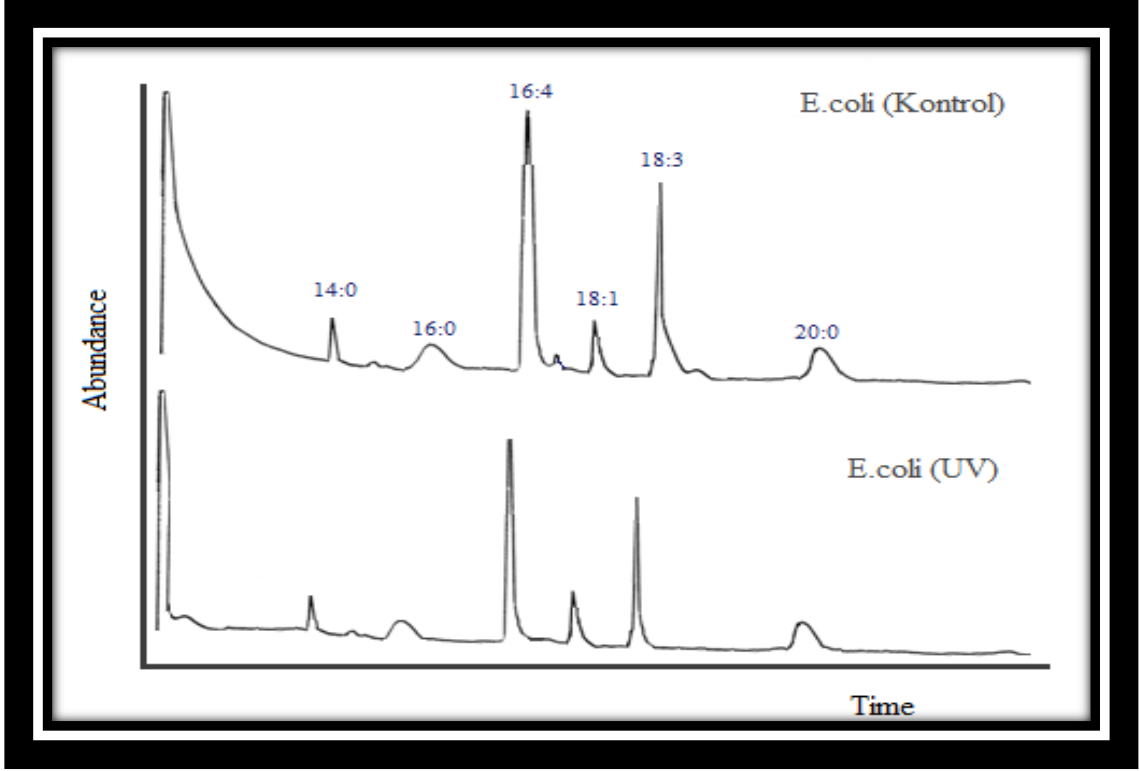
Fusarium proliferatum'da ise UV uygulaması ile birlikte MDA düzeyinin 5.61 kat arttığı tespit edilmiştir. Test edilen diğer mikroorganizmalarda da benzer şekilde MDA düzeylerinde istatistiksel açıdan önemli artışlar belirlenmiştir. *Fusarium culmorum*

mantarında UV uygulaması ile MDA düzeyinin $15.44 \text{ nmol.mL}^{-1}$ 'den $30.88 \text{ nmol.mL}^{-1}$ ' düzeyine ulaştığı gözlenmiştir. *Fusarium semitectum*'da ise $14.74 \text{ nmol.mL}^{-1}$ 'den $33.33 \text{ nmol.mL}^{-1}$ 'e bir artış olduğu tespit edilmiştir. *E. coli*'de ise UV uygulaması ile birlikte MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla 3.63 kat arttığı gözlenmiştir ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

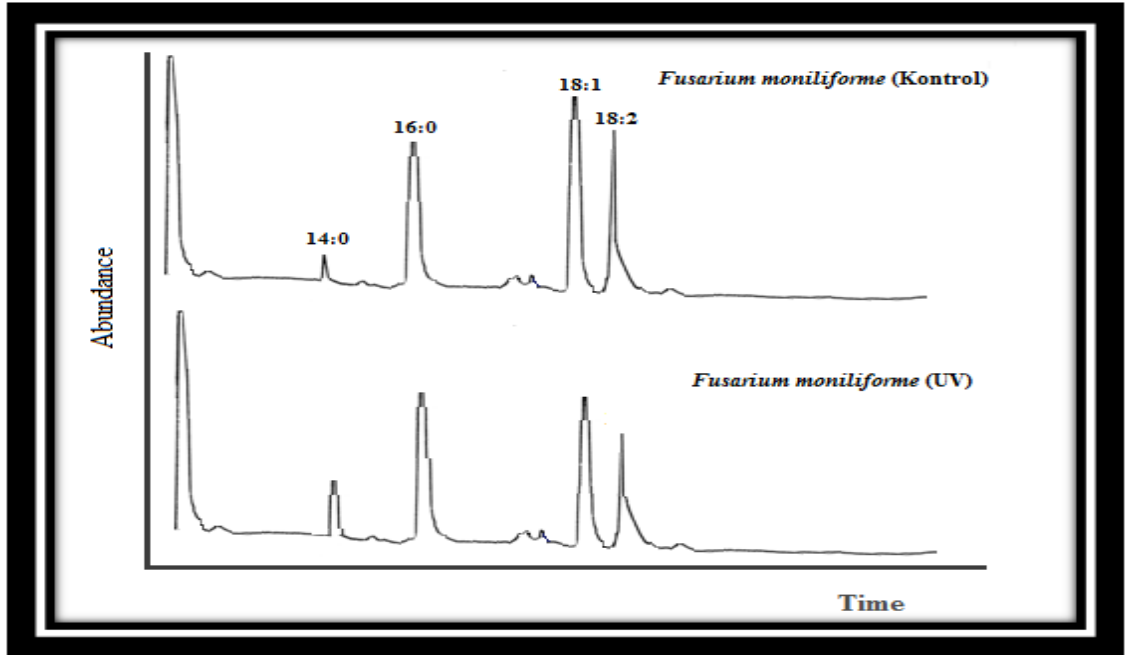
3.5. Yağ Asidi Analizi

E. coli'de GS-MS kromatografisi total lipid profil sonuçları Şekil 3.5'de verilmiştir. UV uygulaması sonrasında tüm mikroorganizmalarda total lipid kompozisyonunda belirgin farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle doymuş yağ asidi oranlarında belirgin azalmalar gözlenmiştir. Fungal mikroorganizmalarda 18C'lu lipid kompozisyonu baskınken, *E. coli*'de lipid kompozisyonunda yüksek çeşitlilik gözlenmiştir.

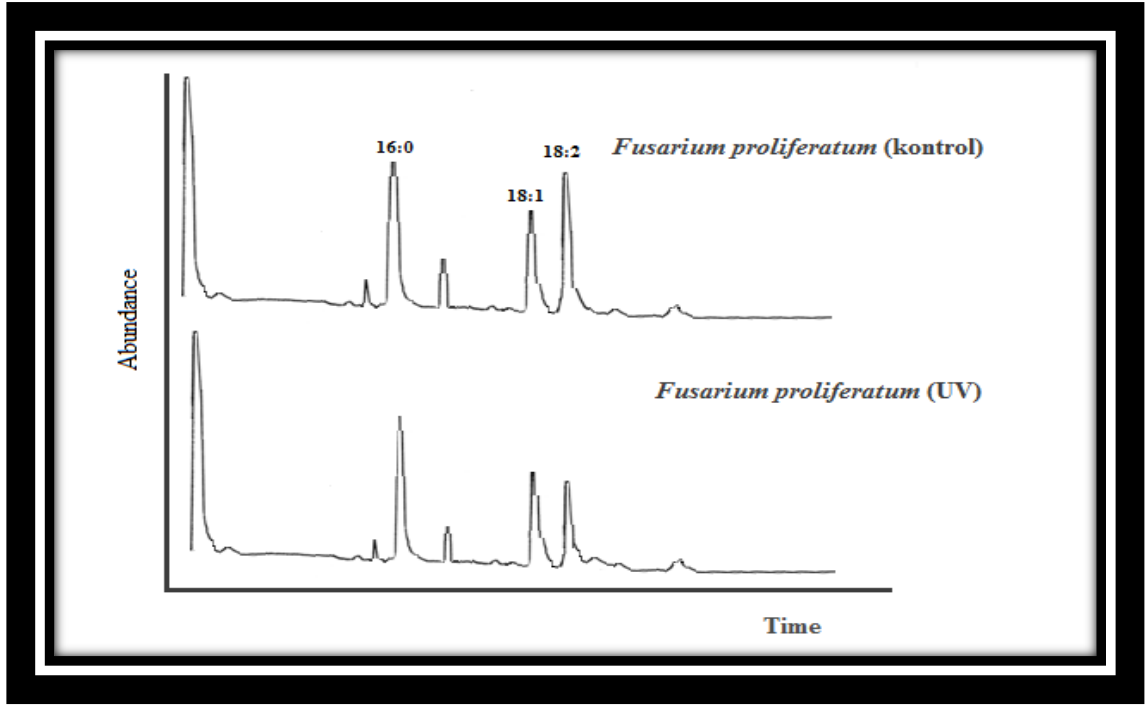
Genel olarak UV uygulaması sonrasında 16:0 ve 14:0 gibi doymuş lipid oranlarında artışlar gözlenirken bu azalmaların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bununla birlikte 16:4 ve 18:3 doymamış lipid seviyesinde önemli oranda azalmalar meydana geldiği gözlenmiştir. Bu azalmaların da istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.



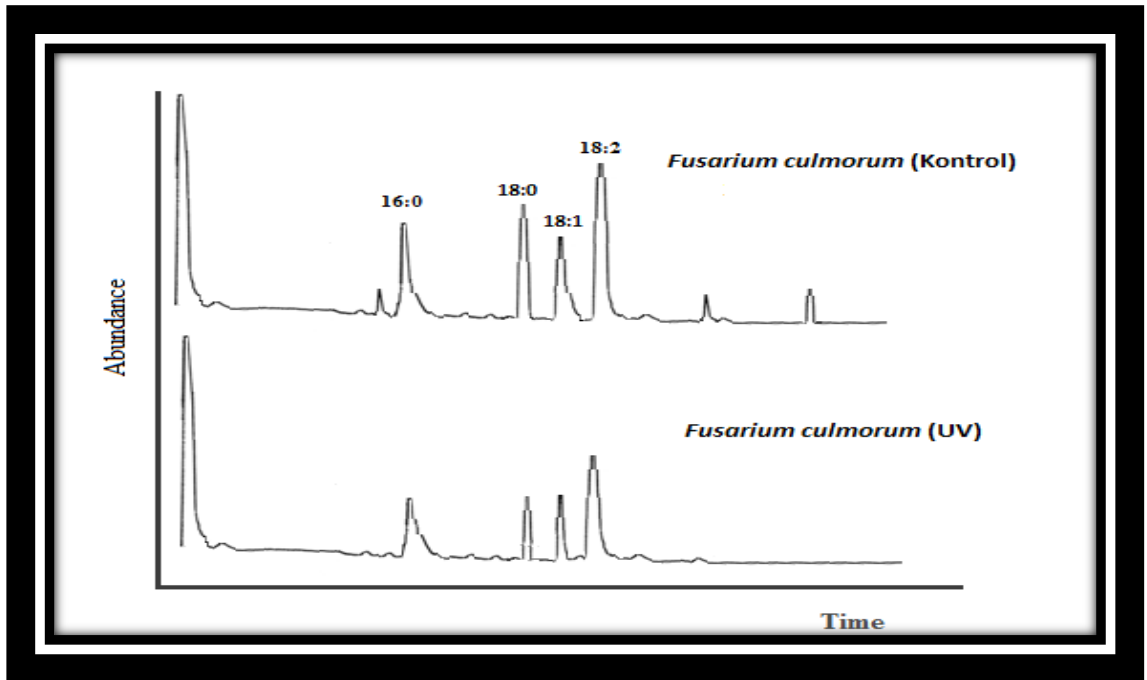
Şekil 3.5 UV uygulamasının *E. coli*'de total lipid kompozisyonu üzerine etkisi



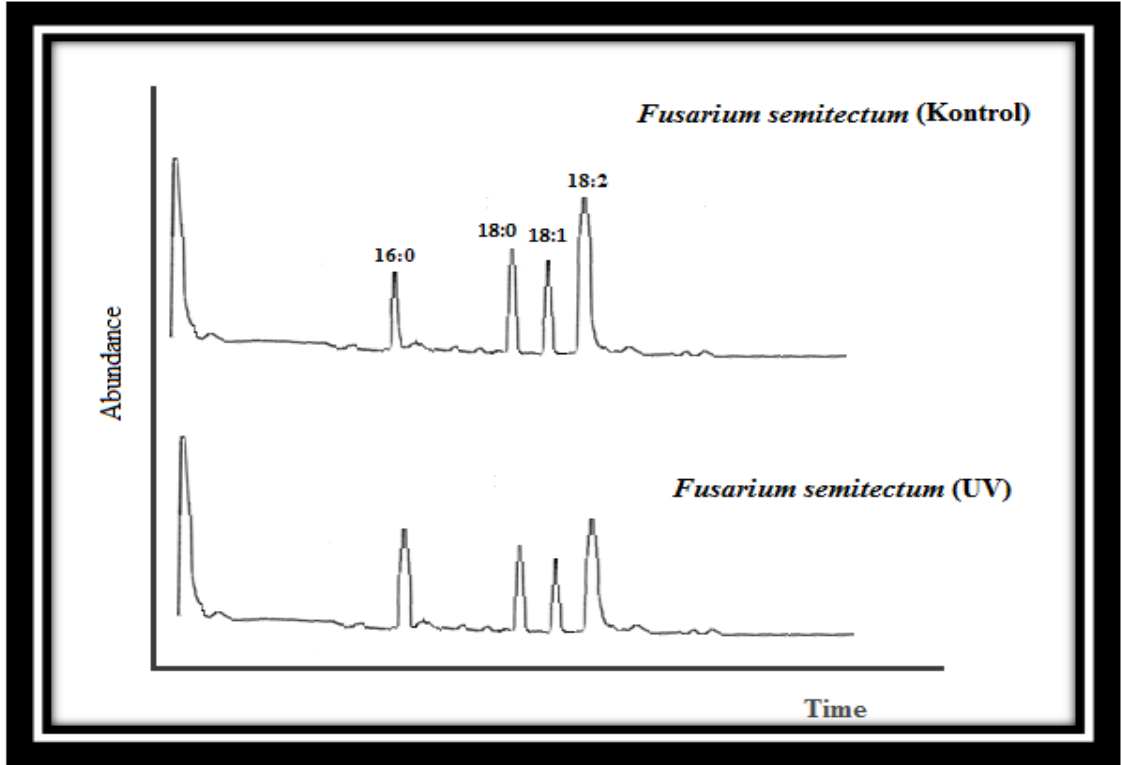
Şekil 3.6 UV uygulamasının *Fusarium moniliforme*'de total lipid kompozisyonu üzerine etkisi



Şekil 3.7 UV uygulamasının *Fusarium proliferatum*'da total lipid kompozisyonu üzerine etkisi



Şekil 3.8 UV uygulamasının *Fusarium culmorum*'da total lipid kompozisyonu üzerine etkisi



Şekil 3.9 UV uygulamasının *Fusarium semitectum*'da total lipid kompozisyonu üzerine etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

İyonlaştırıcı radyasyon mikroorganizmaların hücre zarına, hücre içi membranlara zarar verir. Hücre membranının yapısında yer alan fosfolipid tabakasına, lipoproteinlere, glikoproteinlere, membran por ve kanallara, membranın iyon dengesine hasar verdiği için membranın kendine özgü geçirgenliğini (permeabilitesini) bozmakta, istenmeyen moleküller, hücre içerisindeki farklı kompartımanlardan geçerken kritik hedef bölgelerin konfigürasyonunun değişimine neden olmaktadır. Eğer bir mikroorganizma iyonlaştırıcı ışınlar maruz kalır ve bunu tolere edemez ise ya ölür ya da radyasyona direnç geliştirerek varyasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur. Bu kapsamda bu tez çalışmasında UV ışınlarının mikroorganizmalarda bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. UV sonrasında hücre metabolizmasındaki değişimler biyokimyasal parametrelerin ölçümü ile değerlendirilmiştir.

UV-C'nin mikroorganizmalar üzerine etkisinin incelendiği ilk biyokimyasal parametre total protein düzeyidir. UV uygulanan tüm mikroorganizmalarda protein düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede arttığı belirlenmiştir. UV ile protein düzeylerinde izlenen artış en fazla *Fusarium semitectum* mantarında gözlenmiştir. UV'nin mikroorganizmalarda protein düzeyi üzerine etkisi ayrıntılı olarak çalışılmamıştır. Protein düzeyindeki bu artış UV ile hasara uğramış proteinlerin birikimi ile açıklanabilir. Tüm tayin yöntemleri protein varlığına işaret etmektedir. Denatüre proteinlerde bu tür testlerde pozitif sonuç verebilmektedir. UV etkisi ile hücrede anormal protein birikimi oluşabilir. Bu sonuçta hücrede protein düzeyinin artışı ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte UV stresine karşı hücrelerde yeni proteinlerin sentezi de protein düzeyinde artışa neden olabilmektedir. Bu hipotez literatürde bazı araştırmacılar tarafından desteklenmektedir. Tamarit ve arkadaşları (119), oksidatif strese bağlı olarak bir grup oksitlenmiş proteinin ortaya çıktığını rapor etmişlerdir. Ayrıca *E. coli* hücrelerinin hidrojen peroksit stresine maruz bırakıldığında, alkol dehidrogenaz E, uzama faktörü G, ısı şok proteini DnaK gibi temel proteinlerin sentezinde artış olduğunu belirtmişlerdir (119).

İDOP oksitadif stres sonucu hasar gören proteinleri ifade etmektedir. Bu çalışmada kontrol grubuna göre UV uygulanmış mikroorganizmalarda İDOP düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç total protein düzeyi ile korelasyon göstermektedir. Örneğin UV uygulanmış *Fusarium proliferatum* mantarında İDOP düzeyi $1164.29 \mu\text{mol.L}^{-1}$ iken kontrol grubu *Fusarium proliferatum*'da bu düzey $22.86 \mu\text{mol.L}^{-1}$ 'dir. Sonuç olarak UV ışınının İDOP düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Bunun nedeni UV etkisi ile oluşan oksitadif hasarın proteinlerin yapısını değiştirmesidir. Bu hipotezi doğrulayan Costa ve arkadaşları (120), *S. cerevisiae*'de yaptıkları çalışmalarla, bazı anahtar metabolik enzimlerin H_2O_2 tarafından karbonilasyona teşvik edildiği bulmuştur. Tamarit ve arkadaşları (119), süperoksit radikal ajan olan menadion uygulanmış hücrelerde EF-G ve ATPaz proteinlerin yüksek oranda okside olduğunu ve hasar gördüğünü rapor etmişlerdir.

Glutasyon, oksitadif hasara karşı hücreleri korumaktadır. Bu çalışmada UV uygulanan tüm mikroorganizmalarda GSH düzeylerinin kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. UV ile GSH düzeylerinde izlenen artış en fazla *Fusarium proliferatum* mantarında gözlenmiştir. GSH hücrelerde redükte halde bulunmaktadır ve oksitlenme sonucunda hızla okside GSH formuna dönüşmektedir. Bu yolla redükte ve okside glutasyon düzeyleri sürekli bir değişim halindedir. Izawa ve arkadaşları (121) *S. cerevisiae*'de hücre içi glutasyon düzeyinin H_2O_2 'ye karşı oluşturulan oksitadif stres cevabındaki rolü araştırmışlardır. Bu araştırmada γ – glutamilsistein sentetaz (GSH-I) inhibisyonu sonucunda H_2O_2 'ye duyarlılığın arttığı ve H_2O_2 'ye karşı oluşturulan uyumluluk cevabının baskılandığı belirlemişlerdir.

MDA seviyesi lipid peroksidasyonun bir ölçüsü olarak kabul edilir. Bu çalışmada kontrole göre UV uygulanmış mikroorganizmalarda MDA düzeyinin yüksek olduğu gözlenmiştir. UV uygulanmış *E. coli*'de MDA düzeyi $55.44 \text{ nmol.mL}^{-1}$ iken kontrol grubu da bu düzey $15.26 \text{ nmol.mL}^{-1}$ 'dir. MDA düzeyindeki artış UV uygulaması sonucu hücrelerde oluşan radikalik bileşiklerin lipidlerde peroksidasyona sebep olması ile açıklanabilir. Oksitadif ajanlar hücre zarlarına saldırarak zarda yıkıma ve lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Lipid hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA lipid peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilmektedir. MDA hücre düzeyinde metabolize edilmekte ya da diffüze olmakta ve

diğer hücrelerde hasar yaratmaktadır. MDA pek çok hücrede membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmakta ve bunun sonucunda lizozomal membranlarda yırtılmaya, hücre membran bütünlüğünün kaybına neden olmaktadır. Ayrıca MDA proteinlerin amino gruplarına ataklar yaparak molekül içi ya da proteinler arası bağlar oluşturarak protein yapısını bozmaktadır. Özellikle zarda bulunan integral ya da periferik oluşturdukları hasarlar, bazı hücrelerde permeabiliteyi artırarak hücrenin ölümüne yol açar (122). Bose ve arkadaşları (123) lizozomal membrana UV-A uygulamış ve uygulamadan sonra da MDA düzeyinin doza bağlı olarak arttığını rapor etmişler. Bu sonuç UV-A'nın oluşturduğu lipid peroksidasyonu ile açıklanmıştır.

Çevre şartlarından en çok etkilenen hücre kompartımanlarından biri hücre zarıdır. UV ışınları hücre zarında ciddi etkilere sebep olmaktadır. Hücre zarının ana komponenti lipidlerdir. Hücre zarının UV ışınlarından yüksek oranda etkilenmesinin ana nedeni yüksek lipid oranı ile açıklanmaktadır. Çünkü UV ışınları özellikle doymamış lipidlerde parçalanmalara sebep olmaktadır. Bu veriler literatürde pek çok araştırmacı tarafından da doğrulanmaktadır. Bhandari ve Sharma (124) yapmış oldukları çalışmada *Phormidium corium*'da UV-B ışınlarının hücrede glikolipid oranlarında %56 oranında azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

UV uygulaması sonrasında tüm mikroorganizmalarda total lipid kompozisyonunda belirgin farklılıklar belirlenmiştir. Özellikle doymuş yağ asidi oranlarında belirgin azalmalar gözlenmiştir. Fungal mikroorganizmalarda 18C'lu lipid kompozisyonu baskınken, *E. coli*'de lipid kompozisyonunda yüksek çeşitlilik gözlenmiştir. Genel olarak UV uygulaması sonrasında 16:4 ve 18:3 doymamış lipid seviyesinde önemli oranda azalmalar meydana geldiği gözlenmiştir. UV'nin etkisi ile hücre zarında oluşan lipid peroksidasyonu sonucu doymamış lipid oranında azalmalara neden olmaktadır. Çalışmada doymamış lipid seviyesinde gözlenen bu azalma bu fenomen ile açıklanabilir. Bu azalma hücre zarının akıcılığında ciddi değişimlere neden olmaktadır. Pek çok hücre bu değişimi dengelemek için doymuş lipid oranını arttırmaktadır. Bu dengelemenin bir örneği çalışmamızda da gözlenmiştir ve UV uygulaması sonrasında 16:0 ve 14:0 gibi doymuş lipid oranlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde doymuş lipidlerin varlığı

daha sıkı paketlenmiş bir hücre zarına, doymamış lipid varlığı ise daha akıcı bir yapının varlığına işaret ettiği belirtilmektedir (124).

Bu çalışmada UV ışınlarının mikroorganizmalar üzerine biyokimyasal etkileri ve mikrobiyal cevaplar araştırılmıştır. UV ışınları mikroorganizmalara karşı sterilizasyon amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu kapsamda mikroorganizmaların UV ışınına adapte olması ve zararlı etkileri tolere edebilmesi sterilizasyon prosesini etkisiz kılmaktadır. Bu kapsamda mikrobiyal direnç ve adaptasyon mekanizmalarının aydınlatılması etkili bir sterilizasyon için elzemdir. Bununla birlikte UV'ye karşı oluşturulan mikrobiyal adaptasyon ya da tolerans mekanizmasının aydınlatılması, UV'nin diğer canlılar üzerine zararlı etkisinin giderilmesi için alternatif bir yöntem ışık tutabilir.

KAYNAKLAR

1. **Mrozik, A.**, Piotrowska-Seget, Z. and Łabużek, S. 2004. Cytoplasmatic Bacterial Membrane Responses to Environmental Perturbations. *Polish Journal of Environmental Studies* 13: 487-494.
2. **Mackey, B.M.** and Derrick, C.M. 1987. Theeffect of Prior Heat Shock on the Thermoresistance of *Salmonella thompsonin* Foods. *LettIn Appl Microbiol.* 5: 115-118.
3. **Farber, J.M.** and Brown, B.E. 1990. Effect of Prior Heat Shock on Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* in Meat. *Appl Environ Microbiol.* 56: 1584-1587.
4. **Fay, A.C.** 1934. Theeffect of Hypertonic Sugar Solutions on the Thermal resistance of Bacteria. *J Agric Res.* 48: 453-468.
5. Yousef, A.E. and Courtney, P.D. 2003. Basics of Stres Adaptation and Implications in *New-Generation Foods*. “Microbial Stres Adaptation and Food Safety” (Yousef, A.E. and Juneja, V.K. Eds.), pp. 1–25, CRC Pres, New York.
6. **Leistner, L.** 2000. Basic Aspects of Food Preservation by Hurdle Technology. *Int Food Microbiol.* 55: 181-186.
7. **Cronan, J.E.** 2002. Phospholipid Modifications in Bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 15: 202-205.
8. **Villareal, L.**, Heredia, L.N. and Garcia, S. 2000. Changes in Protein Synthesis and Acid Tolerance in Clostridium Perfringens Type A in Response Acid Shock. *Int. Microbiol.* 3: 113- 116.
9. Moat, A.G., Foster, J.W. and Spector, M.P. 2002. Microbial Physiology, A John Wiley and Sons, Inc., *Publication, Fourth edition*, 582-601, New York.
10. **Foster, J.W.** 1999. When Protons Attack: Microbial Strategies of Acid Adaptation. *Current Opinion in Microbiology* 2: 170-174.
11. **Bearson, S.**, Bearson, B. and Foster, J.W. 1997. Acid Stress Responses in Entorobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 173-180.

12. **Yokoigawa, K.**, Takikawa, A., Okubo, Y. and Umesako, S. 2003. Acid Tolerance and *gad* mRNA Levels of *Escherichia coli* O157:H7 Grown in Foods. *Int J Food Microbiol.* 82: 203-211.
13. **Driscoll, B.**, Gahan, C.G. and Hill, C. 1996. Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria Monocytogenes*: Isolation of an Acid Tolerant Mutant which Demonstrate Increased Virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1693-1698.
14. **Chang, Y.Y.** and Cronan, Jr. J.E. 1999. Membrane Cyclopropane Fatty Acid Content is a Major Factor in Acid Resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33: 249–259.
15. **Quivey, Jr. R.G.**, Faustoferri, R., Monahan, K. and Marquis, R. 2000a. Shifts in Membrane Fatty Acid Profiles Associated With Acid Adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 189: 89–92.
16. **Lindahl, T.** and Nyberg, B. 1972. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* 11: 3610–3618.
17. **Hartke, A.**, Bouché, S., Giard, J.C., Benachour, A., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. 1996. The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 33: 194–199.
18. **Quivey, Jr. R.G.**, Faustoferri, R.C., Clancy, K.A. and Marquis, R.E. 1995. Acid Adaptation in *Streptococcus mutans* UA159 Alleviates Sensitization to Environmental Stress Due to RecA Deficiency. *FEM Microbiol. Lett.* 126: 257–261.
19. **Weinberg, M.V.**, Schut, G.C., Brehm, S., Datta, S. and Adams, W.M. 2005. Cold Shock of a Hyperthermophilic Archeon: *Pyrococcus furiosus* Exhibits Multiple Responses to a Suboptimal Growth Temperature with a Key Role for Membrane-Bound Glycoprotein. *J. Bacteriol.* 22: 336-348.
20. **Theringer, H.A.**, Jones, P.A. and Inouye, M. 1998. Cold Shock and Adaptation. *Bio Essay* 20: 49.
21. **Russell, N.J.**, Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, T. 1995. Memranes as a Target for Stress Adaptation. *Int J Food Microbiol.* 28: 255-261.

22. Phadtare, S., Yamanata, K. and Inouye, M. 2000. The Cold-Shock Response. In: Washington, D.C., *Bacterial Stress Response* (Stortz, G. and Hengge-Aronis, R. Eds.) pp. 33–45, ASM Press.
23. **Wouters, J.A.**, Rombouts, F.M., Kuipers, O.P., de Vos, W.M. and Abee, T. 2000c. The Role of Cold Shock Proteins in Low Temperature Adaptation of Food Related Bacteria [In Process Citation]. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 165–173.
24. **Jiang, W.**, Hou, Y. and Inouye, M. 1997. CspA, the Major Cold Shock Protein of *Escherichia coli*, is an RNA Chaperone. *J. Biol. Chem.* 272: 196–202.
25. **Berger, F.**, Morellet, N., Menu, F. and Potier, P. 1996. Cold Shock and Cold Acclimation Proteins in The Psychrotrophic Bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *J. Bacteriol.* 178: 2999-3007.
26. **Potier, P.**, Drevet, P., Gounot, A.M. and Hipkiss, A.R. 1987a. ATP-Dependent and Independent Protein Degradation in Extracts of The Psychrotrophic Bacterium *Arthrobacter sp* S155. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2797-2806.
27. **Kilstrup, M.**, Jacobsen, S., Hammer, K. and Vogensen, F.K. 1997. Induction of Heat Shock Proteins DnaK, GroEL, and GroES by Salt Stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1826–1837.
28. **Hecker, M.**, Schumann, W. and Volker, U. 1996. Heat Shock and General Stress Response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 199: 417-428.
29. **Hazel, J.R.** and Williams, E.E. 1990. The Role of Alterations in Membrane Lipid Composition in Enabling Physiological Adaptation of Organisms to Their Physical Environment. *Prog. Lipid Res.* 29: 167.
30. **Russel, N.J.** and Fukunaga, N. 1990. A Comparison of Thermal Adaptation of Membrane Lipids in Psychrophilic and Thermophilic Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 171.
31. **Quinn, P.J.** 1981. The Fluidity of Cell Membranes and Its Regulation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 38: 1.
32. **Denich, T.J.**, Beaudette, L.A., Lee, H. and Trevors, J.T. 2003. Effect of Selected Environmental and Physico Chemical Factors on Bacterial Cytoplasmatic Membranes. *J. Microbiol. Meth.* 52: 149.

33. **Hasegawa, Y.**, Kawada, N. and Nosoh, Y. 1980. Change in Chemical Composition of Membrane of *Bacillus Caldotenax* After Shifting the Growth Temperature. *Arch. Microbiol.* 126: 103.
34. **Rosas, S.B.**, Del Carmen Secco, M. and Ghittoni, N.E. 1980. Effects of Pesticides on The Fatty Acid and Phospholipid Composition of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 231.
35. **Keweloh, H.**, Diefenbach, R. and Rehm, H.J. 1991. Increase of Phenol Tolerance of *Escherichia coli* by Alterations of Fatty Acid Composition of the Membrane Lipids. *Arch. Microbiol.* 157: 49.
36. **Russel, N.J.** 1984. Mechanisms of Thermal Adaptation in Bacteria: Blueprints for Survival. *Trends Biochem. Sci.* 9: 108.
37. **Henderson, R.J.**, Millar, R.M., Sargent, J.R. and Jostensen, J.P. 1993. Trans-Monoenoic and Polyunsaturated Fatty Acids in Phospholipids of a *Vibrio* Species of Bacterium in Relation to Growth Conditions. *Lipids* 28: 389.
38. **Konings, W.N.**, Lolkema, J.S., Bolhuis, H., Van Veen, H.W., Poolman, B. and Driessen A.J. 1997. The Role of Transport Processes in Survival of Lactic Acid Bacteria. Energy Transduction and Multidrug Resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 117–128.
39. **Lange, R.** and Hengge-Aronis, R. 1991. Growth Phase Regulated Expression of *Bol A* and Morphology of Stationary Phase *Escherichia coli* Cells are Controlled by The Novel Sigma Factor *Sigma S*. *J. Bacteriol.* 173: 4474-4481.
40. **Hartke, A.**, Giard, J.C., Laplace, J.M. and Auffray, Y. 1998. Survival of *Enterococcus faecalis* in an Oligotrophic Microcosm: Changes Inmorphology, Development of General Stress Resistance and Analysis of Protein Synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4238–4245.
41. **Kornberg, A.**, Rao, N.N. and Ault-Riche, D. 1999. Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89–125.
42. **Kuroda, A.**, Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. and Kornberg, A. 2001. Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. coli*. *Science* 293: 705-708.

43. **Giard, J.C.**, Laplace, J.M., Rince, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeuf, C., Flahaut, S., Auffray, Y. and Hartke, A. 2001. The Stress Proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22: 2947–2954.
44. **Svensater, G.**, Sjogreen, B. and Hamilton, I.R. 2000. Multiple Stress Responses in *Streptococcus mutans* and the Induction of General and Stress-Specific Proteins. *Microbiology* 146: 107–117.
45. **Kvint, K.**, Farewell, A. and Nystrom, T. 2000. RpoS-Dependent Promoters Require Guanosine Tetraphosphate for Induction Even in The Presence of High Levels of Sigma(s). *J. Biol. Chem.* 275: 14795-14798.
46. **Crosse, A.M.**, Greenway, D.L. and England, R.R. 2000. Accumulation of ppGpp and ppGp in *Staphylococcus aureus* 8325-4 Following Nutrient Starvation. *Let. Appl. Microbiol.* 31: 332-337.
47. **Wehmeier, L.**, Schafer, A., Burkovski, A., Kramer, R., Mechold, U., Malke, H., Puhler, A. and Kalinowski, J. 1998. The Role of The *Corynebacterium glutamicum* Rel Gene in (p)ppGpp Metabolism. *Microbiology* 144: 1853-1862.
48. **Chatterji, D.** and Ojha, A.K. 2001. Revisiting The Stringent Response, ppGpp and Starvation Signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 160– 165.
49. **Heipieper, H.J.**, Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H. and De Bont, J.A.M. 1994. Mechanisms of Resistance of Whole Cells to Toxic Organic Solvents. *Trends Biotechnol* 12: 409.
50. **Guckert, J.B.**, Ringelberg, D.B., White, D.C.1987. Biosynthesis of Trans Fatty Acids From Acetate in the Bacterium *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* 33: 748.
51. **Allen, E.E.**, Facciotti, D. and Barlet, D.H. 1999. Monounsaturated But Not Polyunsaturated Fatty Acids are Required for Growth at a High Pressure and Low Temperature in Deep-Sea Bacterium *Photobacterium profundum* Strain SS9. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1710.
52. Kanat, A., Ultraviyole Işınları ile Suların Dezenfeksiyonu, IX. Ulusal Tesistat Mühendisliği Kongresi, 989-1004.

53. **Matak, K.E.**, Churey, J.J., Worobo, R.W., Sumner, S.S., Hovingh, E., Hackney, C.R. and Pierson, M.D. 2005. Efficacy of UV Light for The Reduction of *Listeria Monocytogenes* in Goat's Milk. *J Food Protec.* 68: 2212-2216.
54. Sterilization and Disinfection. 1995. In: *Basic Medical Microbiology* (Boyt, R.F, ed), pp. 5th ed. 93-103, USA: Little Brown and Company (Inc.)
55. **Osdell, D.V.** and Foarde, K. 2002. Defining the Effectiveness of UV Lamps Installed in the Circulation Air Ductwork. *Air Conditioning and Refrigeration Technology Institute*. Report # ARTI 21CR/610-40030-01.
56. **Chan, Y.**, Lai and C.H. 2003. Bactericidal Effects of Different Laser Wavelengths on Periodontopathic Germs in Photodynamic Therapy. *Lasers Med. Sci.* 18 (4): 51-55.
57. U.S. Environmental Protection Agency – Office of Water 2003. Draft Ultraviolet Disinfection Guidance Manual, EPA 815-D-03-007.
58. **Sinton, L.W.**, Hall, C.H., Lynch, P.A. and Daves-Colley, R.J. 2002. Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages From Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and Saline Waters. *App. Environ. Microbiol.* 1122-1131.
59. **Kömerik, N.** and Wilson, M. 2002. Factors Influencing The Susceptibility of Gramnegative Bacteria to Toluidine Blue O-Mediated Lethal Photosensitization. *Journal of Applied Microbiology* 92: 18-623.
60. **Sinton, L.W.**, Daves-Colley, R.J. and Bell, R.J. 1994. Inactivation of Enterococci and Fecal Coliforms from Sewage and Meatworks Effluents in Seawater Chambers. *Appl Environ Microbiol. Jun.* 60 (6): 2040-2048.
61. **Nordberg, J.** and Arner, E.S.J. 2001. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine.* 31: 1287-1312.
62. **Asad, N.R.**, Asad, L.M.B.O. Bonacossa de Almeida, C.E., Felzenszwalb, I., Cabral-Neto, J.B. and Leitão, A.C., 2004. Several Path Ways of Hydrogen Peroxide Action That Damage the *E. coli* Genome. *Genetics and Molecular Biology.* 27 (2): 291-303.

63. Halliwell, B., Clement, M.V. and Long, L.H. 2000. "Hydrogen Peroxide in the Human Body". *Febs Letters*, 486, 10-13.
64. **Evans, M.D.**, Dizdaroglu, M. and Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA Damage and Disease: Induction, Repair and Significance. *Mutation Research* 567: 1-61.
65. **Henle, E.S.** and Linn, S. 1997. Formation, Prevention and Repair of DNA Damage by Iron/Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19095–19098.
66. Mavi, A. 2005. İnsan Eritrosit ve Lökositlerinden Süperoksit Dismutaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, pp. 52–53, Erzurum.
67. **Peyton, G.R.** and W.H. Glaze, 1988. Destruction of Pollutants in Water with Ozone in Combination with Ultraviolet Radiation. Part 3. Photolysis of Aqueous Ozone. Mechanism of Photolytic Ozonation. *Environ.Sci.Technol.* 22-761.
68. **Cooke, M.S.**, Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. 2003. Oxidative DNA Damage Mechanisms, Mutation and Disease. *Faseb J Review.* 17(10): 1195-214.
69. **Cadet, J.**, Douki, T., Gasparutto, D. and Ravanat, J-L. 2003. Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement and Biochemical Features. *Mutat. Res.* 531: 5-23.
70. Mitchell, D.L. and Karentz, D., 1993. The Induction and Repair of DNA Photodamage in the Environment. *Environmental UV Photobiology*, pp. 345-377. Plenum New York.
71. **Bintsis, T.**, Tzanetaki, E.L. and Robinson, R.K. 2000. Existing and Potential Applications of Ultraviolet Light in the Food Industry-a Critical Review. *J Sci Food Agric.* 80: 637-645.
72. **Shacter, E.**, 2000. Quantification and Significance of Protein Oxidation in Biological Samples. *Drug Metab. Rev.* 32: 307-326.
73. **Gardner, P.R.** and Fridovich, I. 1991. Superoxide Sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem.* 266: 19328–19333.
74. **Stadtman, E.R.** and Levine, R.L. 2003. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids.* 25: 207-218.

75. **Åslund, F.**, Zheng, M., Beckwith, J. and Storz, G. 1999. Regulation of the OxyR Transcription Factor by Hydrogen Peroxide and the Cellular Thiol-Disulfide Status. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6161–6165.
76. **Berlett, B.S.** and Stadtman, E.R. 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J Biol Chem.* 272: 20313–20316.
77. **Stadtman, E.R.** 1992. Protein Oxidation and Aging. *Science* 257: 1220–1224.
78. **Halliwell, B.** and Chirico, S. 1993. Lipid Peroxidation: Its Mechanism, Measurement and Significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715-725.
79. **Shewfat, R.L.** and Purvis, A.C. 1995. Toward a Comprehensive Model for Lipid Peroxidation in Plant Tissue Disorders. *Hort. Science* 30 (2): 213-218.
80. **Vickers, T.**, Young, I.S. and Mc Eney, J. 2001. Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis. *Biochem. Soc. Tran.* 29: 358-62.
81. Levinson, W. 1998. Sterilization and Disinfection. In: *Medical Microbiology and Immunology* (Jawetz, E., ed). 5th ed. Prentice- Hall International
82. **Rupp, W.D.** and Washington, DC. 1996. DNA Repair Mechanisms. 2nd Edition. ASM Press.
83. Prescott, L.M. 1999. Microbial Growth. In: *Microbiology* (Harley, J.P, Klein, D.A, eds). 4th ed. pp. 113-34, Mc Graw-Hill Inc, USA.
84. **Sancar, A.**, 1994. Structure and Function of DNA Photolyase. *Biochemistry* 33: 2-9.
85. **Kaiser, E.** and Herndl, G.J. 1997. Rapid Recovery of Marine Bacterioplankton Activity after Inhibition by UV Radiation in Coastal Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4026-4031.
86. **Friedberg, E.C.** 1995. Out of The Shadows and Into The Light: The Emergence of DNA Repair. *Trends Biochem Sci.* 20: (10) 381.
87. **Fernandez De Henestrosa, A.R.**, Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H. and Woodgate, R. 2000. Identification of Additional Genes Belonging to the *lexA* Regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35: 1560–1572.
88. Johansson, C.B., Topçu, A.W., Söyletir, G. and Doğanay, M. (editörler) 2002. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*, pp.333-48. Nobel Kitapevi, İstanbul.

89. **Davies, K.J.A.** and Lin, S.W. 1988a. Degradation of Oxidatively Denatured Proteins in *Escherichia coli*. *Free Rad. Biol. Med.* 5: 215–223.
90. **Rivett, J.A.** 1993. Proteasome: Multicatalytic Proteinase Complexes. *Bio. Chem. J.* 291: 1–10.
91. **Jakob, U.,** Muse, W., Eser, M. and Bardweil, J.C.A. 1999. Chaperone Activity with a Redox Switch. *Cell* 96: 341–352.
92. Champe, P.C. and Harvey, R.A. 1997. Glikozamino Glikanlar. A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: *Biyokimya*, pp 147-156, İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
93. **Sies, H.** 1999. Glutathione and Its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology and Medicine.* 27: 916-921.
94. **Cnubben, N.H.P.,** Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Zanden, J. and Bladeren, P.J. 2001. The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 10: 141-152.
95. **Chavan, S.,** Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A. and Ingole, D. 2005. Reduced Glutathione: Importance of Specimen Collection. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 20 (1): 150-152.
96. **Knapen, M.F.C.M.,** Zusterzeel, P.L.M., Peters, W.H.M. and Steegers, E.A.P. 1999. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology.* 82: 171-184.
97. **Grant, C.M.,** Perrone, G. and Dawes, I.W. 1998. Glutathione and Catalase Provide Overlapping Defenses for Protection against Hydrogen Peroxide in The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253: 893-898.
98. **Seven, A.,** ve Candan, G. 1996. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Med.* 27: 41-50.
99. **Bharath, S.,** Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalas, S. and Andersen, J.K. 2002. Glutathione, Iron and Parkinson's Disease. *Biochemical Pharmacology* 64: 1037-1048.
100. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Com. Myc. Inst. Kew, Surrey, England, 237.

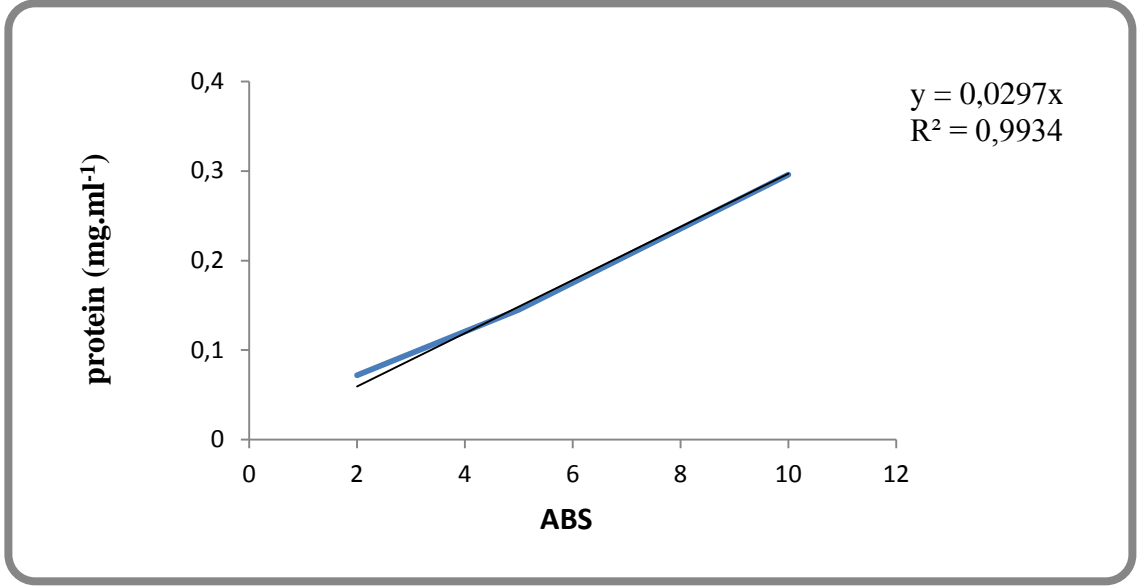
101. **Dignani, M.C.** and Anaissie, E. 2004. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect.* 10: 67-75.
102. **Alastruey-Izquierdo, A.,** Cuenca-Estrella, M. and Monzón, A. et al. 2008. Antifungal Susceptibility Profile of Clinical *Fusarium* spp. Isolates Identified by Molecular Methods. *J Antimicrob Chemother* 61: 805-809.
103. **Nucci, M.** and Anaissie, E. 2007. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol. Rev.* 20: 695-704.
104. http://www.reviberoammicol.com/photo_gallery/Fusarium/moniliforme/Web adresinden 2 Eylül 2013 tarihinde edinilmiştir.
105. <http://ecoport.org/ep?SearchType=pd&PdbID=2430> Web adresinden 2 Eylül 2013 tarihinde edinilmiştir.
106. <http://fungi.myspecies.info/taxonomy/term/5074/media> Web adresinden 2 Eylül 2013 tarihinde edinilmiştir.
107. http://www.ppis.moag.gov.il/ppis/plant_disease_gallery/D_S_W_S/Fusarium_prolifera03-04.htm Web adresinden 2 Eylül 2013 tarihinde edinilmiştir.
108. <http://www.keepourfoodsafety.org/2010/05/e-coli-outbreaks-focus-attention-on-food-safety/> Web adresinden 2 Eylül 2013 tarihinde edinilmiştir.
109. **Leslie, J.F.** and Summerell, B.A. 2006. *Fusarium Laboratory Manual.* Blackwell Publishing. 400.
110. Smith, J.S. and Thakur, R.A. 1996. Occurrence and Fate of Fumonisin in Beef. In: *Fumonisin in Food* (Jackson, L., Ed.), pp. 39-55, Plenum Press, New York.
111. http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/lebensmittelsicherheit/unerwunschte_stoffe/fusarientoxine.htm Web adresinden 2 Eylül 2013 tarihinde edinilmiştir.
112. Toreci, K., Topcu, A.W., Soyletir, G. and Doğanay, M.2002. “Escherichia türleri” *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, pp. 2: 1564-1574 Nobel Tıp Kitapevleri.
113. Bilgehan, H. 2000. “Escherichia” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, *Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, pp. 10: 3-17. Barış Yayınları.
114. Daniel M., Bollag, Stuart J. Edelstein; *Protein Methods.*

115. **Witko Tarsat, V.**, Nguyen-Khoa, T., Jungers, P. and Drüeke, T. B. 1999. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Molecular Basis of Oxidative Stress in Uremia. *Nephrol Dial Transplant* 14:76-78.
116. **Beutler, E.**, Duron, O. and Kelly, B.M. 1963. Improved Method For the Determination of Blood Glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 882–888.
117. **Fairbanks, V.F.** and Klee, G.G. 1999. Biochemical Aspects of Hematology. C.A. Urtis, E.R. Ashwood. Tietz textbook of clinical chemistry. *Third edition, W. B. Saunders*, Philadelphia, 1652–1653.
118. **Yoshioka, T.**, Kawada, K., Shimada, T. and Mori, M. 1979. Lipid Peroxidation in Maternal and Cord Blood and Protective Mechanism against Activated-Oxygentoxicity in the Blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135: 372-381.
119. **Tamarit, J.**, Cabisco, E. and Ros, J., 1998. Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells Exposed to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 273: 3027 – 3032.
120. **Costa, V.M.V.**, Amorim, M.A., Quintanilha, A. and Modoras-Ferreira, P. 2002. Hydrogen Peroxide-Induced Carbonylation of Key Metabolic Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: The Involvement of the Oxidative Stress Response Regulators Yap1 and Skn7. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (11): 1507-1515.
121. **Izawa, S.**, Inoue, Y. and Kimura, A. 1995. Oxidative Stress Response in Yeast: Effect of Glutathione on Adaptation to Hydrogen Peroxide Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 368: 73-76.
122. **Cheeseman, K.H.** and Slater, T.F. 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull.* 49 (3): 481-93.
123. **Bose, B.**, Agarwal, S. and Chatterjee, S. N. 1989. UV-A Induced Lipid Peroxidation in Liposomal Membrane. *Radiation and Environmental Biophysics* 28: 59-65.
124. **Bhandari, R.** and Sharma, P.K. 2006. Effect of UV-B on Photosynthesis, Membrane Lipids and MAAs in Marine Cyanobacterium, *Phormidium corium* (Agardh) Gomont. *Indian Journal of Experimental Biology* 44: 330-335.

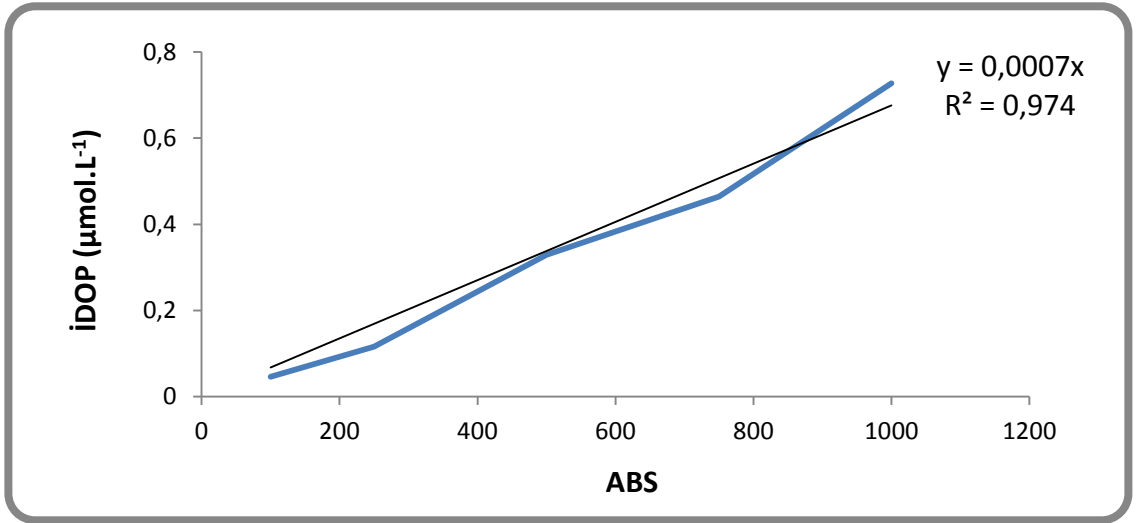
ÖZGEÇMİŞ

1988 Yılında Trabzon'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek-Lisans programına başladı ve Ocak 2014'te mezun oldu. Mikrobiyoloji-Biyokimya alanında bilimsel çalışma ve kongre bildirilerine sahiptir.

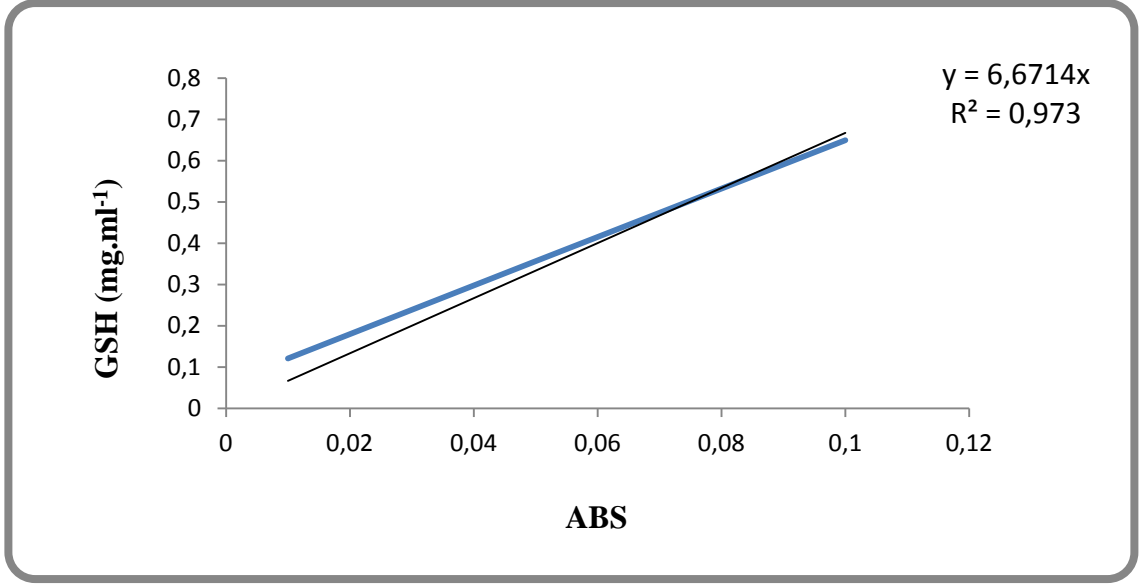
EKLER



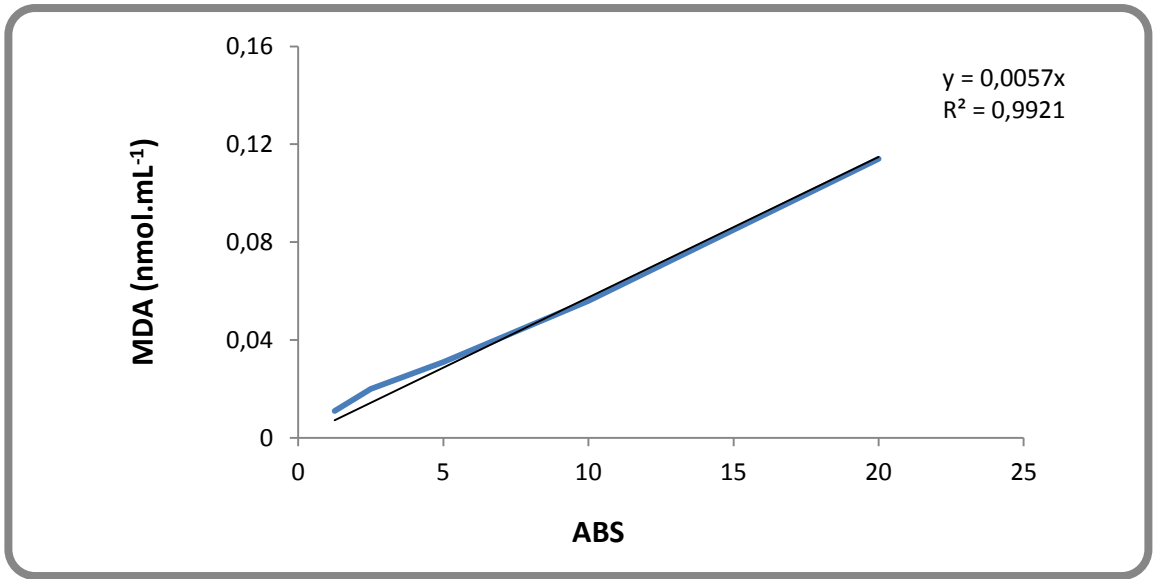
Ek-1 UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda protein düzeylerinin kalibrasyon grafiği



Ek-2 UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda İDOP düzeylerinin kalibrasyon grafiği



Ek-3 UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda GSH düzeylerinin kalibrasyon grafiği



Ek-4 UV uygulanmış ve kontrol grubuna ait mikroorganizmalarda MDA düzeylerinin kalibrasyon grafiği