



**FARKLI LED (IŞIK YAYAN DİYOT) KAYNAKLARININ BAZI  
MİKROORGANİZMALARIN TOPLAM PROTEİN VE FOSFOPROTEİN PROFİLLERİ  
ÜZERİNE ETKİSİNİN PROTEİN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**Serap Gönek  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Yrd.Doç.Dr. Aytaç KOCABAŞ  
Şubat, 2018**

**T.C**  
**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI LED (IŞIK YAYAN DİYOT) KAYNAKLARININ BAZI**  
**MİKROORGANİZMALARIN TOPLAM PROTEİN VE FOSFOPROTEİN PROFİLLERİ**  
**ÜZERİNE ETKİSİNİN PROTEİN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Serap Gönek**

**Anabilim Dalı: BİYOLOJİ**

**Programı : BİYOLOJİ**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**KARAMAN-2018**

## TEZ ONAYI

Serap Gönec tarafından hazırlanan “Farklı LED ( Işık Yayan Diyot) Kaynaklarının Bazı Mikroorganizmaların Toplam Protein ve Fosfoprotein Profilleri Üzerine Etkisinin Protein Elektroferez Yöntemi İle Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr Aytaç KOCABAŞ

Juri Üyeleri

İmza:

Yrd. Doç. Dr Mustafa Esen MARTI

Yrd. Doç. Dr Buğrahan EMSEN

Yrd. Doç. Dr Aytaç KOCABAŞ



Tez Savunma Tarihi: 05/ 02/ 2018

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**



**Doç.Dr.Kamil ARI**

**Enstitü Müdürü**

## TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Serap Gönec**

## ÖZET

**Yüksek Lisans Tezi**

### **FARKLI LED (IŞIK YAYAN DİYOT) KAYNAKLARININ BAZI MİKROORGANİZMALARIN TOPLAM PROTEİN VE FOSFOPROTEİN PROFİLLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN PROTEİN ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

**Serap Gönek**

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**Şubat, 2018, 73 sayfa**

Işık yayan diyotlar kullanılarak yapılan bu çalışmada amaç ışığın mikroorganizmaların büyüme tipi ve süreci üzerine etkisinin protein elektroforez yöntemi ile araştırılmasıdır. Bu doğrultuda mikroorganizmalar uygun kültür ortamlarına aşılınmış ve ışıksız veya ışıklı olarak farklı süre inkübe edilmiştir. İnokülasyon üç biyolojik tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Katı besiyeri üzerindeki koloni boyutları ve morfolojileri her gün fotoğraflanmıştır.

Çalışmanın sonunda ışık olmadan yetiştirilen mikroorganizmaların ışık altında yetiştirilen mikroorganizmalara kıyasla kısa inkübasyon sürelerinde daha büyük koloni boyutlarına ulaştığı gözlenmiştir. Mikroorganizmalar, beş günün sonunda yalnızca ışık olmadan yetiştirilen besiyeri ortamında tüm yüzeyi kaplamıştır. Her iki koşulun toplam protein ve fosfoprotein sonuçları farklılık göstermiştir. Işık olmadan yetiştirilen mikroorganizmaların protein profillerinin, ışık altında yetiştirilen mikroorganizmaların protein profillerinden yoğunluk olarak daha fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle, ışığın mikroorganizmaların protein profillerini etkilediği ve büyümeyi yavaşlattığı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Mikroorganizmalar, LED ışığının etkisi, Protein profili

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **DETERMINATION OF EFFECTS OF DIFFERENT LED (LIGHT EMITTING DIODE) SOURCES ON TOTAL PROTEIN AND PHOSPHOPROTEIN PROFILES OF SOME MICROORGANISMS BY PROTEIN ELECTROPHORESIS METHOD**

**Serap Gönec**

**Karamanoglu Mehmetbey Univeristy  
Natural Sciences Institute  
Biology Department**

**Advisor: Asst. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**February, 2018, 73 pages**

The aim of this study, which used the LED sources is to investigate the effect of light on growth type and duration of microorganisms by using protein electrophoresis method. For this purpose, microorganisms were inoculated to appropriate culture media and exposed to LED sources for different periods. Inoculation was performed in three biological replicates. Colony sizes and morphologies on the agar medium were photographed every day.

At the end of the study, it was observed that microorganisms grown without light reached larger colony sizes during short incubation periods compared to microorganisms grown under light. After five days, only the microorganisms grown without light covered the entire surface of the agar medium. Meanwhile, protein concentrations and SDS-PAGE profiles of both conditions were found to be similar. For this reason, it has come to the conclusion that the light affects the protein profiles and slowed down the growth of microorganisms.

**Keywords:** Microorganisms, LED, Protein profile

## ÖNSÖZ

Eğitimim boyunca desteğini sürekli hissettiğim, çalışmalarımın tüm bilgi ve becerileri ile yanımda olan danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışma için 14YL15 nolu proje kapsamında destek veren Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürü borç bilirim.

Araştırma çalışmalarımın destek ve önerileri ile yanımda olan Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü değerli hocalarına, tüm Kamil Özdağ Fen Fakültesi ailesine saygılarımı iletiyorum.

Mikrobiyoloji laboratuvar çalışma arkadaşlarım Suzan ŞAHİN ve Ümmühan ÜNLÜ hocama, İbrahim SAVRAN, Yasemin BAŞKAYA, Nermin GÜMÜŞTAŞ, Merve Ezgi ESKİ, Burhan KARABAKAN, Tuğba ÖZKAN ve diğer laboratuvar çalışanlarına gösterdikleri destek ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Hayatımda büyük önem arz eden sevgili dostlarım Arife TOFUR, Hürü GÖKSEL, Çiğdem UZUN, İraz KAYRAN, Emel KARDEŞ, Setenay SOYKUVVET, Tuğba KONAKÇI, Rabia ÇAKAL ve Süleyman UZUN iyiki varsınız.

Hayatımın her anında gösterdikleri sevgi, sabır ve anlayış için annem Ezima GÖNEK, babam Munzur GÖNEK, kardeşlerim Simge GÖNEK ve Seval BİÇER'e, eniştem Ahmet Mesut BİÇER'e sevgilerimle.

Serap GÖNEK

Şubat, 2018

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	3
2.1. Mikroorganizmalar.....	3
2.1.1. Mikroorganizmaların Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Mikroorganizmaların Dağılımları .....	5
2.1.3. Mikroorganizmaların Çevresel İstekleri ve Etkileri.....	5
2.2. Bakteriler.....	7
2.3. Küfler .....	10
2.3.1. <i>Thermomyces lanuginosa</i> .....	11
2.3.2. <i>Aspergillus terreus</i> .....	11
2.4. Proteinler ve Genel Özellikleri.....	12
2.4.1. Proteinlerin Görevleri.....	14
2.4.2. Proteinlerin İfade Değişimleri.....	16
2.4.3. Fosfoproteinler .....	16
2.5. LED Işık Kaynakları ve Özellikleri .....	17
2.6. Biyolojik Ritim ve Işık.....	19
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	22
3.1. Mikroorganizmalar ve Kültürleri .....	22
3.2. Işık Kaynakları ve Özellikleri .....	23
3.3. Tampon ve Çözeltiler .....	24
3.4. Mavi-1 Kodlu Bakteri İzolatına Uygulanan Biyokimyasal Analizler.....	25
3.5. Proteinlerin Elde Edilmesi .....	26



3.5.1. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	27
3.5.2. Poliakrilamid Jel Elektrophrez Yöntemi ve Jellerin Boyanması .....	27
3.6. Mavi-1 Kodlu Bakteri İzolatı ve Ekzopolisakkarit (EPS).....	29
3.6.1. Ekzopolisakkarit Yapının Saflaştırılması ve Tayini.....	29
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	30
4.1. Işık Yayan Diyotların Bakterilerin Gelişimine Etkisi .....	31
4.2. Işık Yayan Diyotların Küflerin Gelişimine Etkisi.....	36
4.3. Sıcaklık Değişiminin Hücre Çoğalmasına Etkisi .....	39
4.4. Ekzopolisakkarit Miktar Tayini .....	40
4.5. Sıcaklık Değişiminin Ekzopolisakkarit Üretimine Etkisi .....	41
4.6. Glukoz Derişiminin Hücre Çoğalması ve Ekzopolisakkarit Oluşumuna Etkisi.....	41
4.7. Tuz Derişiminin Hücre Çoğalmasına ve Ekzopolisakkarit Oluşumuna Etkisi .....	42
4.8. Fosfoprotein ve Toplam Protein Boyama Sonucu Elde Edilen Jellerin Görüntüleri .....	43
<b>SONUÇ</b> .....	46
<b>KAYNAKLAR</b> .....	47
<b>EKLER</b> .....	52
EK 1 Araştırmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler ve özellikleri .....	52
EK 2 Protein Standart Grafiğinin Elde Edilmesi.....	54
EK 3 Glukoz Standart Grafiğinin Elde Edilmesi .....	55
EK 4 SDS-PAGE İçin Kullanılan Reaktifler ve Jellerin Hazırlanması.....	56
EK 5 Boyama Çözeltileri .....	58
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 2.1.</b> Fonksiyonel özelliklerine göre proteinler.....	15
<b>Çizelge 2.2.</b> Yapısal özelliklerine göre proteinler.....	15
<b>Çizelge 2.3.</b> Aydınlatma sistemlerinin teknik özellikleri.....	18
<b>Çizelge 3.1.</b> Saboruant %4 glukoz besiyeri içeriği.....	22
<b>Çizelge 3.2.</b> Maya özütü nişasta besiyeri içeriği.....	22
<b>Çizelge 3.3.</b> Bazal besiyeri içeriği.....	23
<b>Çizelge 3.4.</b> Araştırmada kullanılan LED kaynakları ve özellikleri.....	24
<b>Çizelge 4.1.</b> <i>A.terreus</i> aydınlık ve karanlık ortamda inkübe edilen kültürlerinde oluşan salgısının antibiyogram sonuçları.....	38
<b>Çizelge 4.2.</b> Bazı örneklere uygulanan fenol sülfirik asit tayin sonuçları.....	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Ökaryot (a) ve prokaryot (b) hücre yapısı.....	4
Şekil 2.2. Gram negatif ve gram pozitif hücre duvarı yapıları.....	8
Şekil 2.3. Bakterilerin hücre şekilleri.....	9
Şekil 2.4. Bakterileri sistemlerinde görülen çoğalma fazları.....	10
Şekil 2.5. Proteinlerin yapı tipleri.....	13
Şekil 3.1. Bakteri izolatının agar üzerinde oluşturduğu renk ve akışkan yapı.....	29
Şekil 4.1. LED ışık döşenmiş inkübatör ve inkübe edilen kültür örnekleri.....	32
Şekil 4.2. LED ışık altında inkübe edilen bakterilerin üreme eğrisi.....	33
Şekil 4.3. Bakteri izolatının 5W sıcak beyaz LED ışık altında gelişimi.....	35
Şekil 4.4. Bakteri izolatının 5W soğuk beyaz LED ışık altında gelişimi.....	35
Şekil 4.5. Bakteri izolatının 2W yeşil LED ışık altında gelişimi.....	35
Şekil 4.6. Bakteri izolatının 2W mavi LED ışık altında gelişimi.....	36
Şekil 4.7. Bakteri izolatının 2W kırmızı LED ışık altında gelişimi.....	36
Şekil 4.8. <i>A.terreus</i> 'un aydınlık kültürlerinde spor gelişimi.....	37
Şekil 4.9. <i>A.terreus</i> 'un karanlık kültürlerinde spor gelişimi.....	37
Şekil 4.10. Aydınlık ve karanlık ortamda inkübe edilen <i>T.lanuginosa</i> 'nın sıvı besiyerinde gelişimi .....	37
Şekil 4.11. <i>A.terreus</i> 'un 10W sıcak beyaz LED ışık altında gelişimi.....	39
Şekil 4.12. <i>T.lanuginosa</i> 'nın 10W sıcak beyaz LED ışık altında gelişimi.....	39

<b>Şekil 4.13.</b> Bakteri izolatının farklı oranlarda glukoz içeren bazal besiyerinde gelişimi ve oluşturduğu akışkan yapının görüntüsü.....	42
<b>Şekil 4.14.</b> Bakteri izolatının 0,1 M NaCl içeren besiyerinde gelişimi.....	43
<b>Şekil 4.15.</b> Bakteri izolatının 0,2 M NaCl içeren besiyerinde gelişimi.....	43
<b>Şekil 4.16.</b> Fosfoprotein ve toplam protein boyama görüntüleri.....	44
<b>Şekil 4.17.</b> Fosfoprotein ve toplam protein boyama görüntüleri.....	44



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### **Simgeler**

g

rcf

CFU

L

$\mu$ L

M

W

kDa

pH

### **Açıklamalar**

Yerçekimi ivmesi

Rölatif santrifüj kuvveti

Koloni oluşturan birim

Litre (ölçü birimi)

Mikrolitre (hacim ölçü birimi)

Molarite (madde konsantrasyonu)

Watt (güç birimi)

Kilodalton (atomik kütle birimi)

Hidrojenin Gücü (ölçü birimi)

### **Kısaltmalar**

LED

BHI

UV

### **Açıklamalar**

Işık yayan diyot

Brain Heart Agar

Ultraviyole (morötesi ışık)

## 1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, ilaç ve besin maddelerinin elde edilebilmesinde, protein açığının giderilmesinde ve çevre sağlığı gibi biyolojik olaylarda rol oynamakta ve bu olaylar sonucunda çeşitli ürünler meydana getirmektedir (Üzümcü, 2009).

Mikroorganizmalar küçük olmalarına rağmen, dünya üzerinde biyokütlenin büyük bölümünü oluşturmaktadır. Dünya üzerinde oldukça fazla bulunan bu canlıların toprak ve su ekosistemlerinden kolaylıkla elde edilebildiği, sayılarının anlık olarak yaklaşık  $5 \times 10^{30}$  olduğu tespit edilmiştir. Bünyelerinde, tüm bitki topluluğunda bulunan karbon miktarına eşit karbon, 10 katı kadar azot ve fosfor bulunmaktadır. Bu canlılar bir araya geldiğinde büyük popülasyonlar oluşturarak habitat üzerinde önemli etkiler meydana getirmektedir. Örneğin, bu canlıların metabolik aktiviteleri sonucu oluşan atıklar o bölgede yaşayan diğer bir canlı için besin olmaktadır (Madigan ve Martinko, 2010).

Metabolik çeşitliliklerinin çok farklı olması, çok çeşitli enzimleri sentezleyebilme yeteneklerinin bulunması, jenerasyon sürelerinin kısa olmasından dolayı bu canlılar değişik ortam koşullarına uymakta çok başarılıdırlar. Adaptasyon yetenekleri yüksek olan mikroorganizmalar, genetik varyasyonlar sonucu çevreye uyumlu yeni tipler oluşturmak suretiyle, kendi varlıklarını doğada sürdürmektedir (Öner, 2008).

Çevreleri ile uyum içerisinde yaşayan bu küçük canlı toplulukları, değişen ortam koşullarından etkilenmekte, buldukları ortamlarda optimal koşullar sağlandığında ise genetik karakterlerine göre iyi bir üreme ve gelişme göstermektedir. Bu değişimler doğrultusunda hücre yapısında bulunan binlerce gen ve bu genlerin ürünü olarak binlerce çeşit protein ortaya çıkmaktadır. Bu proteinlerin her biri ise spesifik bir fonksiyon görmektedir (Üzümcü, 2009).

Bu canlıların büyük bir kısmı zararsız ve yararlılar grubunda yer alsa da insanlar açısından direkt veya dolaylı zararlı çeşitleri de vardır. İnsan, hayvan ve bitkilerde hastalık ve enfeksiyonlara, gıda ve yem maddelerinin bozulmalarına neden oldukları bilinmektedir (Güven ve Zorba, 2015).

İnsan sağlığını tehdit eden birçok farklı türde mikrobun mevcut olduğu, bu mikropların çeşitli bulaşıcı hastalıklara yol açtığı, hastalıkların farklı toplumlara taşınması ve yayılması ile ölümlerin ve salgınların artması sonucunda toplumların bozulmasına neden oldukları bilinmektedir. Örneğin, dünyada halen mikroorganizmaların neden olduğu sıtma, verem, kolera ve şiddetli ishal vb. hastalıklardan dolayı insanlar hayatlarını kaybetmektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

Günümüzde gelişmiş ülkelerde rutin enfeksiyonel hastalıklar kontrol altına alınmış ve ölümler en aza indirgenmiş bile olsa ölümcül tehditini korumaktadır. Fakat gelişmekte olan ülkelerde ölüm sebeplerinde baş sırada enfeksiyonel hastalıklar gelmektedir. Yeni antimikrobiyal maddelerin keşfinin artması, gelişmiş yöntemler ile hastalıkların tespiti ve kontrolü sağlanmıştır. Fakat birçok tedavide başarı sağlansa da mikroorganizmalar halen büyük bir tehlike olabilmektedir. Özellikle antibiyotik tabanlı ilaçlar ile mikroorganizmaların kontrolü giderek zorlaşmakta, dirençli organizmalar gelişmektedir. İlaç tedavilerine ek olarak kullanılan ışık tedavileri ile etkinin arttırılabileceği ve kontrolünün sağlanabileceği düşünölmektedir. Amaç istenmeyen etkileri en aza indirmek için yeni hedeflerin saptanması, yeni mekanizmaların belirlenmesi ve bunlara yönelik yeni tedavilerin geliştirilmesi, uygulanmasıdır.

Birçok hastalığın temel nedeni olan bu canlılara karşı alternatif tedavi olarak kullanılan ışıklar ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Farklı ışık kaynakları asidik ve alkali pH ortamlarında bulunan organizmalara uygulandığında gelişmiş bir antibakteriyal etkinin ortaya çıktığı görölmüştür (Ghate ve ark., 2015). Belirli bir süre ve dozda uygulanan ışık yayan diyotların çalışılan organizma popölasyonlarında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ışık kaynağı olarak farklı frekansa sahip ışık yayan diyotlar kullanılmıştır. Bu ışık kaynaklarının mikroorganizmaların hem morfolojik hem protein seviyesinde etkisine bakılmıştır. Çalışma sonucunda morfolojik farklılıklar gösterenler seçilerek toplam protein ve fosfoprotein profilleri incelenmiştir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Mikroorganizmalar**

Mikroorganizmalar, tek hücre veya hücre toplulukları şeklindeki canlıların, hücre yapısında olmayan virüslerin, prionların ve viroidlerin oluşturduğu, büyük ve çeşitli mikroskobik yapıların bulunduğu bir topluluktur. Biyolojik özelliklerine göre bakteriler, arkealar, siyanobakteriler, mantarlar, protozoalar ve algler olmak üzere gruplara ayrılmıştır (Engelkirk ve Engelkirk, 2017). Yaşam için temel olan olayların başında yer alan bu küçük hücreler, bitki ve hayvanların ortaya çıkışından milyarlarca yıl önce oluşmuştur (Madigan ve Martinko, 2010).

Tek ve çok hücreli organizmalar metabolik reaksiyonlarını yerine getirebilmek için çevrelerinde bulunan besin maddelerini enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu sayede hücreler çoğalmakta, hücre yapı taşlarını sentezlemekte ve oluşan atıkları dışarı atmaktadır. Dışarıdan gelen ışık, sıcaklık, soğuk ve kimyasal uyarıların etkisi ile genetik değişikliklere uğrayabilmekte ve çevresel değişikliklere cevap verebilmektedir (Engelkirk ve Engelkirk, 2017).

Mikroorganizmaların, hayvan ve bitki hücrelerinden farklı olan hücrelerinin incelenmesi ile yaşamın fiziksel ve kimyasal yapısı anlaşılmıştır (Madigan ve Martinko, 2010). Mikroorganizma hücreleri, doğada tek başına bağımsız olarak birçok faaliyeti gerçekleştirmektedir. Bu hücrelerden, madde döngülerinde, endüstriyel atıklar ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde, gıda sanayinde ve tıp çalışmalarında yararlanılmaktadır ( Güven ve Zorba, 2015).

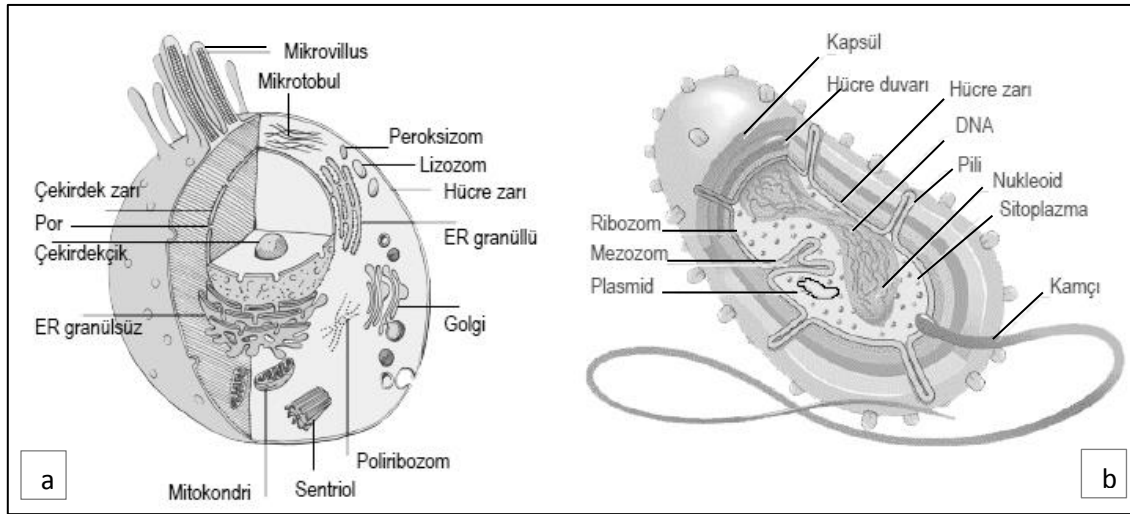
#### **2.1.1. Mikroorganizmaların Genel Özellikleri**

Hücre tipleri prokaryot ve ökaryot olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1). Prokaryot hücreler morfolojik olarak basit, genellikle ökaryot hücrelere göre daha küçüktür. Ökaryot hücrelerin aksine, prokaryot hücreler belirli fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumlu çekirdek ve organel yapılarından yoksundur. Tüm bakteriler ve arkealar prokaryot hücre yapısında, diğer organizmalar algler, mantarlar, protozoalar, yüksek bitkiler ve hayvanlar ökaryotik hücre yapısına sahiptir (Ergene, 2014). Prokaryot hücrelerin



sitoplazmasında ribozom, kromozom ve sitoplazmik partiküller bulunmaktadır. Sitoplazma, gerekli suyu ve enzimleri, atık ürünleri, temel besin maddelerini, proteinleri, karbonhidratları, lipidleri ve bazı bakterilerde çözünmüş oksijeni ihtiva etmektedir. Prokaryot hücrelerin sitoplazmaları, hücre zarı ile ve bazen hücre duvarı veya kapsül ile çevrilidir. Hücre zarı, protein ve fosfolipitlerden oluşmakta, seçici geçirgen bir yapı göstermektedir. Bu özelliği ile hücreye girecek ve çıkacak olan maddelerin kontrolünü sağlamaktadır. Metabolik reaksiyonların çoğunda hücre zarında gerçekleşmekte ve zara çok sayıda enzim tutunmaktadır. Prokaryot hücrelerde çoğalma, ikiye bölünme ve DNA replikasyonunu takiben hücre zarının ayrılması ve daha sonra hücre duvarının oluşması ile olmaktadır (Engelkirk ve Engelkirk, 2017).

Ökaryot canlılar, zarla çevrili çekirdeğe ve hücre içi organellerine sahiptir ve çekirdek, kromozomal DNA içeren çift zarlı bir organeldir. Hücre zarı, hücrenin iç ve dış ortamları arasında seçici geçirgen bir bariyer oluşturmaktadır. Zardaki taşıma sistemi, hücre içine materyallerin seçici bir şekilde geçişine izin vermektedir. Hücre duvarı suyun hücreye giriş çıkışını kontrol etmekte, fotosentetik protista ve mantarlarda bulunmaktadır (Barker ve ark., 2013).



**Şekil 2.1.** Ökaryot (a) ve prokaryot (b) hücre yapısı (Benlioğlu ve Özyılmaz, 2017)

### 2.1.2. Mikroorganizmaların Dağılımları

Mikroorganizmalar, diğer canlılara oranla daha geniş bir popülasyona sahiptir ve yeryüzünün her yanına yayılmıştır. Küçük boyutları ve ağırlıklarının az olması onların yeryüzünün her alanına dağılımlarında en büyük etkidir (Güven ve Zorba, 2015). Mikroorganizmalar çok yüksek sıcaklık ve dondurucu soğuklarda yaşamlarını sürdürebilmektedir (Barker ve ark., 2013).

Mikroorganizmalar, toprağın farklı derinliklerinde, suların yüzey ve derin bölgelerinde besin ihtiyaçları ve oksijen durumlarına göre yaşamlarını sürdürmektedir (Güven ve Zorba, 2015). Çevrenin fiziksel ve kimyasal yapısı mikroorganizmaların gelişimini büyük ölçüde etkilemektedir. Çevrede meydana gelen değişimlerin anlaşılması, mikrobiyal büyümenin kontrolünü ve mikroorganizmaların ekolojik dağılımının incelenmesine yardımcı olmaktadır. Çoğu prokaryot için öldürücü olabilen ortamlar, bazı prokaryotlar için büyüme olanağı sağlamaktadır. Örneğin, *Bacillus infernus*, oksijen olmadan, yeryüzünün 1,5 km'den fazla olan derinliklerinde yaşayabilmektedir. Mikroorganizmalar, çevresel faktörlerin ve besin maddelerinin büyümeyi sınırlandırmasına kadar mikro ortamlarda yaşayabilmektedir. Mikrobiyal büyümeyi etkileyen başlıca fiziksel faktörler çözeltiler ve su aktivitesi, pH, sıcaklık, oksijen seviyesi, basınç ve radyasyondur. Belirli bir yerde artış gösteren mikroorganizmalar, üst üste binen birçok gıda maddelerine ve diğer çevresel faktörlere maruz kalmaktadır (Prescott ve ark., 2006).

### 2.1.3. Mikroorganizmaların Çevresel İstekleri ve Etkileri

Mikroorganizmaların gelişimi için besin maddelerinin ortamda bulunması her zaman yeterli değildir. Bunların yanında belirli ortam koşullarının yerine getirilmesi ile mikroorganizmalar çevrelerinde hazır buldukları besin maddelerinden faydalanarak gelişmeye başlamaktadır. Bu çevresel etkenler başlıca sıcaklık, ortamın pH değeri, oksijen, su ve kimyasal maddelerdir (Benlioğlu ve Özyılmaz, 2017).

Sıcaklık etkeni: Mikroorganizmalar sıcaklık isteklerine göre psikrofil, mezofil, termofil ve hipertermofil olarak gruplandırılmıştır. Psikrofiller 0-20°C, mezofiller 20-40°C, termofiller 40-80°C ve hipertermofiller 80-110°C'de gelişim göstermektedir.

pH etkeni: Genel olarak doğal çevrelerin çoğunun pH aralığı 5 ila 9 arasındadır. Mikroorganizmaların çoğu bu aralıkta yaşayabilmektedir. Düşük pH değerlerinde asidofiller, yüksek pH değerlerinde alkalifiller yaşamaktadır. Bakteriler nötr ortamları, funguslar ise asidik ortamları sevmektedir.

Oksijen etkeni: Hücrelerde karbondan sonra en fazla bulunan elementtir. Aerobik mikroorganizmalar gelişim için serbest oksijen moleküllerine ihtiyaç duymaktadır. Gelişimleri için moleküler oksijene ihtiyaç duymayan mikroorganizmalara ise anaerobik denilmektedir. Anaerobik mikroorganizmalara oksijen toksik etki yapmaktadır. Fakültatif anaeroblar ise oksijen varlığında veya yokluğunda yaşayabilmektedir.

Su etkeni: Canlıların hepsi yaşamlarının devamlılığı için suya gereksinim duymaktadır. Su mikroorganizmaların çoğalmalarında en önemli faktörlerden biridir. Tuz ve şeker içeren ortamlarda mikroorganizmaların gelişimi zorlaşmaktadır. Hücre bu ortamlarda su kaybederek büzüşmektedir. Besin endüstrisinde oldukça önemli bir yeri olan su temin edilebilme durumu, su potansiyeli olarak ifade edilmektedir.

Kimyasal madde etkeni: Kimyasal maddelerin bazıları mikroorganizmalar üzerinde durdurucu ya da öldürücü etki oluşturmaktadır. Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen antibiyotikler diğer mikroorganizmalar üzerinde bu şekilde etki göstermektedir.

Mikroorganizmalar yaklaşık olarak soluduğumuz havanın yarısını üretmektedir. Denizlerde, yeraltı sularında, okyanuslarda ve toprakta meydana gelen birçok kirlilik mikroorganizmalar tarafından başarılı bir şekilde giderilmektedir. Son zamanlarda geliştirilen transgenik bakteriler ile ağır metal atıklarının, radyoaktif elementlerin, sentetik gübrelerin, insektisit ve herbisit gibi zirai ilaçların kalıntıları ve toluen, benzen, etilbenzen ve ksilen gibi toksik etki yaratan maddelerin toprak ve yeraltı sularından temizlenmesi sağlanmıştır. Biyolojik iyileştirme çalışmaları sayesinde endüstriyel atıkların, ilaç kalıntılarının temizlenmesi sağlanmıştır. Toprak ve sularda kirlenmeye neden olan klorlanmış çözücülerin uzaklaştırılmasında *Dehalococcoides* türleri görev almaktadır. Bir başka bakteri *Geobacter metallireducens* ise uranyum ile beslenmekte ve ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Ekici, 2011).

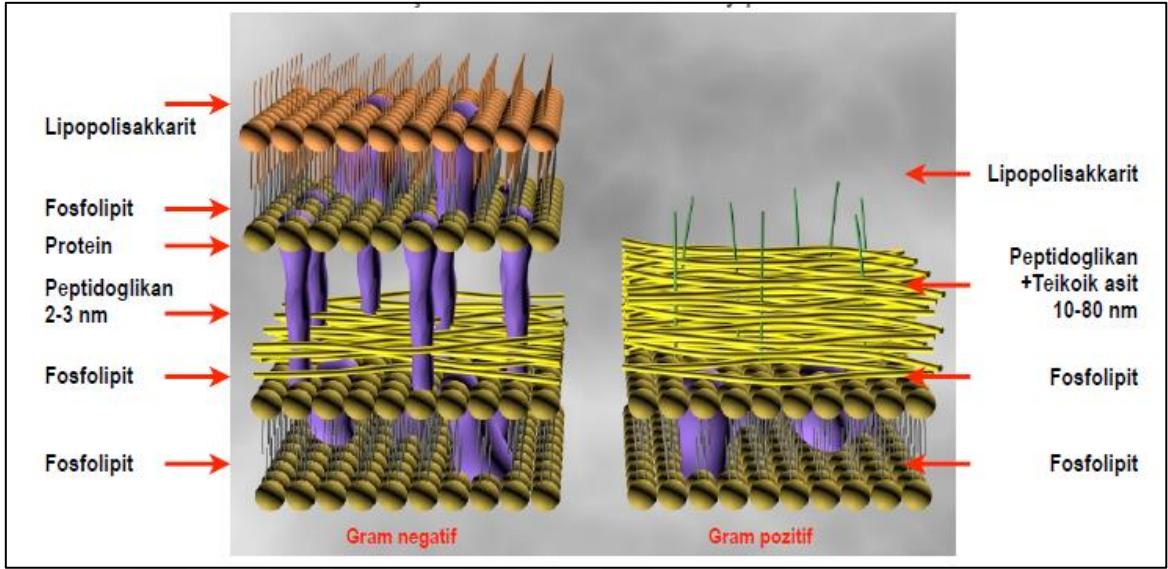
Mikroorganizmalar ile yapılan biyoteknolojik çalışmalar sonucunda birçok alanda yeni yöntemler ve ürünler oluşturulmuştur. Mikroorganizmalar kimyasal üretiminde (aseton, etanol v.b), madencilikte, besin teknolojisinde (yoğurt, ekmek, aminoasit, peynir v.b), aşı üretiminde, bazı proteinlerin üretimi ve vitamin kaynaklarının elde edilmesinde büyük rol oynamaktadır. Örneğin, Gürcistan'da bilim insanları tarafından genetiği değiştirilmiş bakteriler kullanılarak son derece toksik olan trikloroetilen ve tetrakloroetilen çözücülerinin topraktan temizlenmesi sağlanmıştır (Engelkirk ve Engelkirk, 2017) .

## **2.2. Bakteriler**

Bakteriler 1 µm genişliğinde ve 1-5 µm uzunluğunda olan, bağımsız olarak yaşayan tek hücreli canlılardır. Nadir durumlarda 50µm genişliğinde ve bir kaç milimetre uzunluğunda olanları mevcuttur. Ökaryot canlılara göre bölünme zamanları çok daha kısadır. İstisnai olarak aktinomisit ve biyofilm oluşumlarında çok hücreli bakteri yapıları gözlemlenmektedir (Kocabaş ve Ulaşlı, 2014).

Bakterilerde hücrelerine sertlik, güç ve koruma sağlayan hücre duvarı yapıları mevcuttur. Oldukça karmaşık olan bu yapının bileşeni, küçük peptit zincirleri ile birbirine bağlanmış polisakkaritlerin oluşturduğu kompleks bir polimer olan peptidoglikandır. Hücre duvarının kalınlığı ve içeriği bakterilerin türüne göre farklılık göstermektedir (Engelkirk ve Engelkirk, 2017).

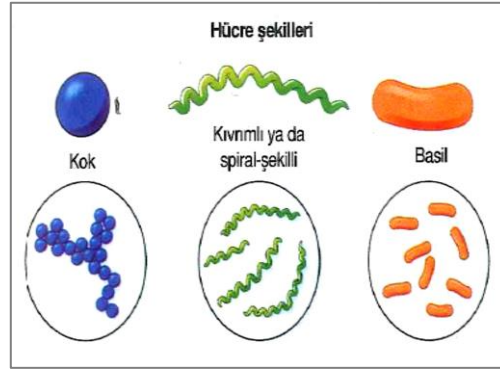
Gram pozitif olarak adlandırılan bakterilerin hücre duvarları, teikoik asit ve lipoteikoik asitten oluşmuş kalın bir peptidoglikan tabakadan oluşmaktadır. Gram negatif olarak adlandırılan bakterilerin hücre duvarları ise daha ince bir tabakadan oluşmakta ve dış zar ile lipopolisakkarit içermektedir (Şekil 2.2). Arkealarda da hücre duvarı mevcuttur fakat pseudopeptidoglikan içermektedir (Engelkirk ve Engelkirk, 2017).



**Şekil 2.2.** Gram negatif ve gram pozitif hücre duvarı yapıları (Benlioğlu ve Özyılmaz, 2017)

Bakteri hücrelerinin sitoplazmalarının yaklaşık olarak %90'ı sudan oluşmaktadır. Bu hücreler, sitoplazmalarında bulunan enzim ve depo granülleri sayesinde glikojen, lipit ve fosfat gibi bileşikleri tutabilmektedir. Bakterilerde hücre duvarının altında yer alan, hücreyi saran, sitoplazmayı dış ortamdaki ayıran plazma zarı bulunmaktadır. Plazma zarı lipoprotein yapıda olup, solunum enzimlerini içermektedir. Birbiri üstüne katlanarak adeta yumak haline gelmiş bir tek kromozomdan ibaret uzun, dolaşmış bir DNA molekülü nükleer materyali oluşturmakta ve nükleoid adı verilmektedir. Bakteri sitoplazmasında genetik bilginin proteinlere dönüştürülmesi, mRNA ve ribozomlar aracılığıyla olmaktadır (Ünal, 2012).

Bakterilerde çubuk (basil), yuvarlak (coccus), virgül (vibrio) ve spiral (spirillum) olmak üzere dört farklı şekil görülmektedir (Şekil 2.3). Bakteri şekilleri besiyerlerinin bileşiminden, çevre şartlarından ve kullanılan kültürün eski olmasından etkilenmektedir. Kültürlerin durma ve ölme durumuna girmesi düzensiz şekilli ve iplikli yapıların oluşmasına neden olmaktadır (Güven ve ark., 2011).



Şekil 2.3. Bakterilerin hücre şekilleri (Engelkirk ve Engelkirk, 2017)

Bakteriler kendi bünyelerinde sürekli olarak kendilerine özgü kimyasal tepkimeler ile organik maddelerin yıkımlarını sağlayarak yaşamsal ihtiyaçlarını karşılamaktadır. En çok bakteri türü toprakta olup miktarları son derece fazladır. Çünkü bakterilerin çoğu toprakta kendileri için gereken koşulların bir çoğunu bulabilmektedir. Toprağın yaşam alanı olarak elverişli olmasının en büyük sebepleri organik ve madensel madde bakımından nemli toprakların verimli olması ve bakterilerin doğrudan güneş ışığından toprak sayesinde korunmalarıdır (Okur, 2012).

Bakteriler beslenmelerinde makro ve mikro birçok elemente ihtiyaç duymaktadır. Mikrobiyal hücreler gelişimleri için makro besin elementlerine daha çok ihtiyaç duyarlar. Başlıca gerekli olan makro elementler karbon, hidrojen, oksijen, azot, kalsiyum, magnezyum, fosfor, kükürt ve demirdir. Mikro elementler ise çinko, bakır, mangan, molibden, nikel ve kobalttır. Hücreler tarafından sentezlenemeyen, küçük miktarlarda mikroorganizma gelişimi için gerekli olan organik maddelere büyüme faktörleri denilmektedir. En önemli büyüme faktörü vitaminlerdir (Benlioğlu ve Özyılmaz, 2017)

Bakteri sistemlerinde dört farklı üreme dönemi görülmektedir. Bu dönemler; ortama uyum (lag), logaritmik (log), sabit ve logaritmik azalma dönemi olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.4) (Pamir, 1985).

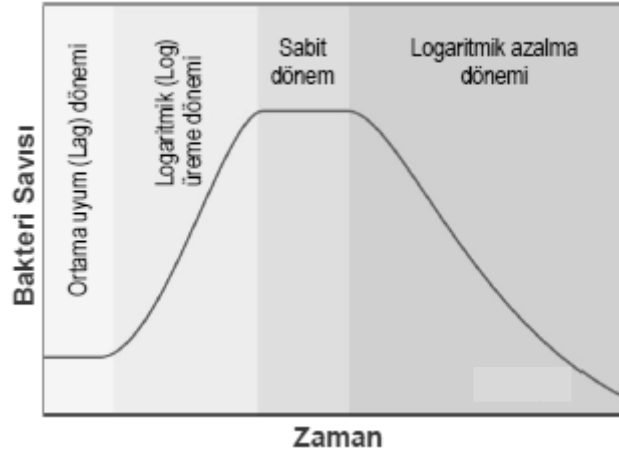
Ortama uyum (Lag) dönemi: Aşılama yapıldıktan sonra maksimum bölünmeye başlama arasında geçen süredir. Bu sürenin uzun ya da kısa sürmesi aşılama bakterinin yaşı ve besiyerinin taze olmasına bağlıdır. Örneğin duraklama fazında bir bakteri seçildiğinde

enzim sentezinin yeni koşullara uyması, hatta mevcut olmayan enzimlerin oluşturulması gerekmektedir.

Logaritmik (Log) üreme dönemi: Hem hızlı hücre bölünmesinin gerçekleştiği hem de bölünme oranının sabit olduğu dönemdir. Bölünme hızı bakteri türü ve besiyeri bileşimiyle ilgilidir.

Sabit dönem: Besiyeri ortamında substrat azaldığından ve metabolizma atıkları ortamda artmaya başladığından çoğalma durmuştur. Hücreler depo maddelerinden ve proteinlerden faydalanabildiği sürece canlı kalmaktadır. Fakat çok hassas olan hücreler ölmektedir.

Logaritmik azalma dönemi: Bu dönemde canlı hücre sayısında azalma görölmektedir.



Şekil 2.4. Bakteri sistemlerinde görölen üreme dönemleri (Benlioğlu ve Özyılmaz, 2017)

### 2.3. Küfler

Mantarlar, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Zygomycetes* ve *Deuteromycetes* olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Mantarlar doğal çevrede oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Küfler doğada saprofit, parazit ve diğer organizmalar ile simbiyotik ilişki içinde yaşayanlar olarak ayrılmaktadır. Küflerin karakterizasyonunda ipliksi ve çok çekirdekli vejetatif organları olan "miselyum" kullanılmaktadır. Miselyumlar devamlı olarak uçtan gelişen, yan dallanma yapan hiflerden oluşmuş bir topluluktur. Besin maddeleri miselyumların bütün yüzeyleri ile alınmaktadır. Miselyumların çoğalmaları belli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra tek veya çok hücreli sporlar, yani üreme organları meydana

gelmektedir. Bu yapılar olgunlaşma gösterdikten sonra ana hücrelerden ayrılarak yeni bireyler oluşturmaktadır.

Küf mantarlarından genellikle endüstriyel alanda yararlanılmaktadır. Küfler, şekerden organik asitleri, endüstriyel ve tarımsal atıklardan mikrobiyal proteinleri oluşturmakta, bazı aromatik maddeleri meydana getirmekte, antibiyotik yapmakta ve çeşitli enzimleri üretmektedir (Pamir, 1985).

### **2.3.1. *Thermomyces lanuginosa***

*Thermomyces lanuginosa* patatesten izole edilmiş bir termofilik mantar türüdür. Bu mantarların üreme sıcaklıkları, en düşük 20°C, en yüksek 61°C ve en iyi 40-57°C arasındadır (Halil ve Kalkancı, 2008). Üreyebildikleri yerlere göre, jeotermal bölgelerde bulunanlar ve çürümüş bitki kümeleri, gübre gibi kendini ısıtan kaynaklarda bulunanlar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Redman ve ark., 1999).

Sıcak topraklarda ve ısısı kendiliğinden, sürekli oluşan kuş gübrelerinde en yaygın görülen mantar türü *T.lanuginosa*'dır. Bu mantar, selülozu ayırma yeteneği olmadığından, selülozu ayırabilenler ile ortak yaşamakta ve onların selülotik aktiviteleri sonucu oluşan şekerleri kullanmaktadır (van Heerden ve ark., 2002). Bazı mantar türlerinin değişen sıcaklık değerleri sonucunda içerdikleri linoleik asit oranları değişmektedir. Örneğin, *T.lanuginosa* mantarının 50°C'de içerdiği linoleik asit oranı, 30°C'dekinden iki kat fazla olduğu görülmüştür (Wright ve ark., 1983).

### **2.3.2. *Aspergillus terreus***

*Aspergillus terreus*, *Aspergillus* cinsine ait ve morfolojik yöntemler kullanılarak laboratuvarında kolaylıkla tespit edilebilen, enfeksiyonlara neden olan toprak saprofitidir. Doğada oldukça yaygın bulunan ve endüstriyel açıdan önemli sekonder metabolitleri üreten, mezofil küflerdir. Depo koşullarında saklanan arpa, mısır ve fıstık kontaminasyonlarının yanı sıra çöl toprağı, mera ve kompost yığınlarından izole edilebilmektedir. Bu türün üyelerinde koloni morfolojileri çeşitlilik göstermektedir. Koloniler parlak turuncudan, tarçın kahverengi tonlarına kadar farklı renk çeşitliliğine



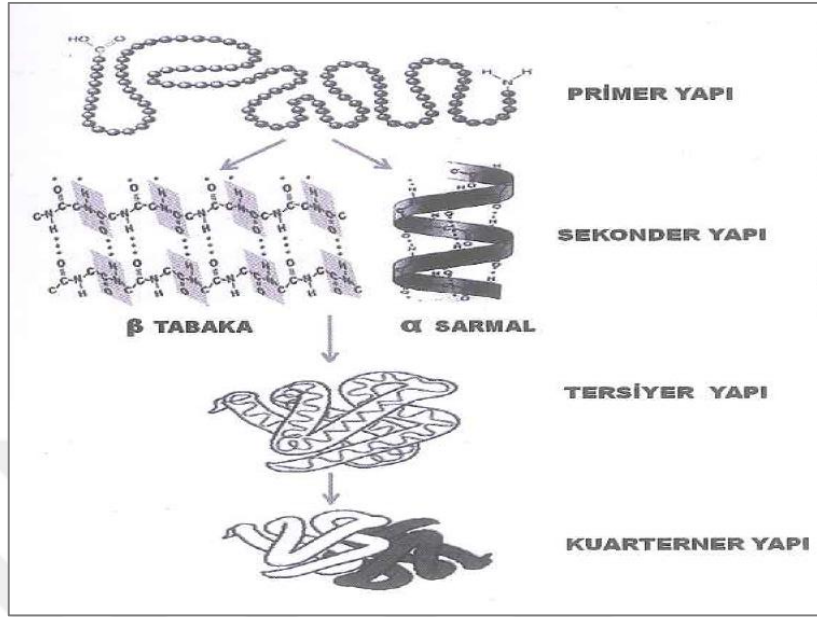
sahiptir. *A.terreus*, agar üzerinde, ağırlıklı sporlanan ve kabarık, yetersiz sporlanan fenotiplere kadar çok değişken koloni görünümlerini sergilemektedir (Balajee, 2009).

*Aspergillus* cinsinin 150'den fazla türünün bulunduğu ve bu türlerden sadece birkaçının insan ve hayvanlarda enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir (Arabatzis ve Velegraki, 2013). *A.terreus*'un yaşam alanını ılıman iklim toprakları, tarım arazileri ve ormanlar oluşturmaktadır. Nadiren ise asidik orman topraklarında ve soğuk bölgelerde yaşadıkları bilinmektedir.

#### **2.4. Proteinler ve Genel Özellikleri**

Proteinler hücrelerde en fazla bulunan makromoleküllerdir. Bütün proteinler, fonksiyonları ve biyolojik aktiviteleri ne olursa olsun 22 çeşit amino asitin farklı kombinasyonlarından oluşmuştur. Amino asitlerin birbirinden farklı olması C atomuna bağlı değişen R-gruplarının varlığıdır (Karagüler ve Kök, 2014). Amino asitlerin tek başlarına biyolojik aktiviteleri olmamasına rağmen, yapıtaşı görevi ile polipeptid zincirlerine girdiklerinde oluşturdukları proteinler farklı aktiviteler için özelleşmiştir. Proteinlerin alfabeti olarak adlandırılan amino asitler sınırsız sayıda farklı dizilme olanağına sahip olduklarından, binlerce çeşit protein meydana getirebilirler (Ası, 1995).

Proteinlerde dört farklı yapı tipi bulunmaktadır. Bunlar primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül) ve kuaterner (dördüncül) yapılarıdır (Şekil 2.5). Bir proteinin primer yapısı, o protein için karakteristik ve genetik olarak tespit edilmiş olan amino asitlerin belirli türde, sayıda ve dizilişte birbirlerine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturdukları bir polipeptit zinciri biçimindeki yapısıdır (Ası, 1995).



**Şekil 2.5.** Proteinlerin yapı tipleri (Ünal, 2012)

Bir proteinin sekonder yapısı ise yarı sertleşmiş polipeptit zincirlerinin özgün bir biçimde bükülme ve katlanması sonucunda oluşan yapısıdır. Bir proteinin sekonder yapısının oluşmasını primer yapı, meydana gelen polipeptit omurgasının özelliği ve hidrojen bağları sağlamaktadır (Ası, 1995).

Tersiyer yapısı, polipeptit zincirinin sekonder yapısının oluşumundan sonra, uzayda daha ileri katlanmalar sonucu oluşan globüler veya fibriler yapısıdır. Tersiyer yapının oluşmasında, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlardan başka Van Der Waals çekimleri ve iyon bağları katılır. Bir proteinin üç boyutlu yapısı onun fonksiyonel karakterini belirlemektedir. Gelişi güzel kıvrılıp bükülen bir protein molekülü biyolojik işlevini yapamaz durumdadır. Proteinlerin fonksiyonunu yapabilmeleri için üç boyutlu yapı içinde atomlarının uygun düzenlenmesi, yani uygun bir konformasyon kazanmaları gerekmektedir. Kuarterner yapı ise primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin büyük yapılar halinde biraraya gelmesiyle oluşan yapılardır (Ası, 1995).

Proteinler, biyolojik işlevleri, miktarları ve fizyolojik önemlerinden dolayı doğal organik bileşikler arasında en başta gelmektedir. Canlılarda oldukça önemli bir yeri olan proteinler, vücudun en küçük birimi olan hücrelerin yapı taşıdır ve vücutta birçok biyolojik olgunun oluşumunda ve onarımında kullanılmaktadır. Proteinler çeşitli bağlarla bağlanmaktadır.

Primer yapılarında kovalent bağlarla, sekonder ve tersiyer yapılarında ise iyonik, elektrostatik, hidrojen ve Van Der Waals bağları rol oynamaktadır (Ünal, 2012).

Proteinler çeşitli etkiler ile denatüre olabilmektedir. Bir proteinin denatürasyonu, moleküldeki yan bağların kopması, polipeptit zincirindeki katların açılması ve sonra yeni bir biçimde yeniden katlanması olayıdır. Denatürasyona uğramış bir proteinin tersiyer yapısı bozulmuş, sekonder ve primer yapısı korunmuş ise geri dönüşümlüdür. Denatürasyonda, proteinin tersiyer ve sekonder yapısı bozulmuş, yalnızca primer yapısı korunmuş biçiminde olursa geri dönüşümsüzdür. Denatürasyona uğramış bir proteinin tekrar eski haline dönmesine ise renatürasyon denilmektedir (Ası, 1995).

Proteinler asit ve baz gibi davranma yeteneklerine sahiptirler. Ayrıca proteinlerin negatif ve pozitif iyon bağlama özellikleri bulunmaktadır. Protein molekülleri için farklı ve karakteristik özellikte olan R-gruplarının sayılarına ve elektriksel yüklerinin çeşitlerine bağlı izoelektrik noktaları bulunmaktadır. Proteinler, elektriksel alanda farklı hızlarda göç etmektedir. Bu göç, izoelektrik noktalarından düşük pH'larda katoda; izoelektrik noktalarından yüksek pH'larda anoda doğrudur. Proteinlerin elektriksel alanda göçme hızı, net elektrik yüklerine ve ortamın pH değerine bağlıdır. Bir protein, elektriksel alanda, izoelektrik noktasına eşit pH ortamında her iki kutup tarafından eşit kuvvetlerle çekildiğinden hareketsiz kalmaktadır (Ası, 1995).

#### **2.4.1. Proteinlerin Görevleri**

Proteinler yapılarına ve biyolojik fonksiyonlarına göre iki gruba ayrılmaktadır. Yapılarına göre proteinler ise basit ve bileşik proteinler olarak ayrılmaktadır. Basit proteinler, hidroliz olduklarında amino asitleri veren, yalnızca amino asitlerden oluşmuş, polipeptit zincirleri yapısındaki proteinlerdir. Bileşik proteinler, hidroliz edildiklerinde amino asitlerden başka değişik nitelikte kimyasal maddeler veren, polipeptit zincirlerinin prostetik grup denen yapılara bağlanmasıyla oluşmuş proteinlerdir. Bu gruplar aşağıda Çizelge 2.1 ve 2.2'de gösterilmiştir. Çizelge 2.1'de proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırılması yapılmıştır ve bazı proteinler için örnekler verilmiştir. Çizelge 2.2'de ise proteinlerin yapılarına göre sınıflandırılması yapılmıştır ve örnekler verilerek gösterilmiştir (Ası, 1995).

**Çizelge 2.1.** Fonksiyonel özelliklerine göre proteinler (Ası, 1995)

<b>a) Enzimler</b> Heksokinaz Laktat dehidrogenaz Sitokrom c DNA-Polimeraz	<b>b) Depo proteinleri</b> Ovalbumin Kazein Ferritin Gliadin Zein
<b>c) Taşınım görevi yapan proteinler</b> Hemoglobin Hemosiyenin Miyoglobin Serum albumin b-Lipoprotein Fe-bağlanmış globulin Seruloplazmin	<b>d) Kontraksiyon yapan proteinler</b> Miyozin Aktin Dinein Tubilin
<b>e) Toksinler</b> <i>Clostridium botulinum</i> toksini Difteri toksini Yılan zehiri Risin Gossipin	<b>f) Koruyucu proteinler</b> Antikorlar (Antibodiler) Komplement Fibrinojen Trombin
<b>g) Hormonlar</b> İnsulin Glukogon Somatotrop hormon Oksitosin Melanin stimulan hormon	<b>h) Yapısal proteinler</b> Viral-kılıf proteinleri Glikoproteinler Keratin 00,Sklerotin Fibroin Kollajen Elastin Mukoproteinler

**Çizelge 2.2.** Yapısal özelliklerine göre proteinler (Ası, 1995)

<b>a) Basit proteinler</b> Albuminler Globulinler Histonlar Protaminler Prolaminler Albuminoidler	<b>b) Konjuge proteinler</b> Nukleoproteinler Glikoproteinler Lipoproteinler Fosfoproteinler Kromoproteinler Metalloproteinler
---	--

Vücutta proteinler taşıma ve depolama görevi üstlenmektedir. Sinir iletilerinin oluşmasını ve iletilmesini proteinler sağlar. Hormon ve enzimler protein yapısındadır. Vücudun aminoasitlere olan gereksinimini karşılarlar ve vücutta yeteri kadar enerji kaynağı olmadığında, proteinler enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Vücudun su ve iyon dengesinin korunmasında doğrudan ya da dolaylı olarak görev almaktadır. Vücudun

hastalıklardan korunmasında ve etkenlerine karşı savunma geliştirmesinde kullanılmaktadır. Hücreler ve hücreler arası sıvılar arasında besin unsurlarının değişimine yardım etmekte, ödemlere sebebiyet veren sıvıların anormal bir şekilde toplanmasına engel olmaktadır. Organların ve yumuşak dokuların yapı unsurudur ve mekanik destek sağlamakta, kemik oluşumunda da görev üstlenmektedir (Ası, 1995).

#### **2.4.2. Proteinlerin İfade Değişimleri**

Yaşamsal süreçlerin sürdürülebilmesi için hücrelerde tüm gerekli bilgiler genlerde bulunmaktadır. Genlerde bulunan bu bilgilerden yararlanılarak asıl iç gören moleküller olan proteinler sentezlenmektedir. Hücre, dinamik bir yapı göstererek yaşam döngüsü boyunca çok farklı protein konformasyonları içermektedir. Proteinlerin fonksiyonları hakkında bilgiler, DNA dizi analizlerinden elde edilen veriler ile yeterli şekilde sağlanamamaktadır (Anderson ve ark., 2000; Gygi ve ark., 2000; Bor ve Özdemir, 2005). Canlı sistemlerin, sağlıklı olduğu dönemleri ile enfeksiyon geçirdikleri dönemler veya çeşitli stres koşullarında seçilen dayanıklı ve duyarlı bireylerin farklılıklarının belirlenmesi protein düzeyinde yapıldığında daha anlamlı bilgiler elde edilebilmektedir (Anderson ve ark., 2000; Dutt ve Lee, 2000; Bor ve Özdemir, 2005). Bu şekilde çeşitli hastalıkların tespitinde rol oynayan özel proteinler veya bu proteinlerde meydana gelen değişimler saptanabilmektedir (Pandey ve Mann, 2000; Bor ve Özdemir, 2005).

Gen mutasyonları ve translasyon sonrası modifikasyonlar sonucunda proteinlerde çeşitli anormallikler gerçekleşmektedir. Translasyon sonrası gerçekleşen fosforilasyon, glikolizasyon ve metilasyon gibi modifikasyonlar proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelen değişiklikleri belirlemektedir (Haseltine, 1997; Bor ve Özdemir, 2005).

#### **2.4.3. Fosfoproteinler**

Fosfoproteinler, prostetik grubu fosforik asit olan proteinlerdir (Ası, 1995). İlk defa 1906 yılında Phoebus Levene tarafından vitellin proteininde fosfat grubu bulunmuştur (Fischer ve Krebs, 1995; Kaynar, 2013). Fosforik asit içeriği proteine asit karakter vermekte ve bu proteinler seyreltik alkaliler ile amonyakta çözünmekte, tuz oluşurmaktadır. Fosfoproteinler asitleştirme işlemi sonucunda çökelmekte ve suda hemen hemen hiç

çözünmemektedir. Fosfoproteinlere en iyi örnek süt proteini olan kazein ve fosvitindir (Ası, 1995).

Modifikasyonlar ile hücrel faaliyetlerin çoğu düzenlenmektedir. En sık rastlanılan modifikasyon fosforilasyondur. Proteinlerde görülen fosforilasyon, bir veya daha fazla amino asite fosfat grubunun tersinir bir şekilde kovalent olarak bağlanması ile olmaktadır. Proteinlerin ne zaman, nerede ve kim tarafından fosfatlanacağını anlaşılmaması birçok hücre içi sinyal iletim mekanizmasının anlaşılmasında anahtar rol oynamaktadır (Kaynar, 2013).

Birçok enzimin ve reseptörün yapısında fosforilasyon ve defosforilasyon yolu ile konformasyonel bir değişim gerçekleşmekte, böylece enzim ve reseptör aktif veya inaktif hale geçmektedir. Bu düzenlenmeler sonucunda reseptörlerin ve enzimlerin aktif veya inaktif hale geçme mekanizmalarının incelenmesi sinyal iletim mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlayacağından önemlidir. Örneğin, retinada bulunan ışığa duyarlı hücrelerde gerçekleşen bu gibi sinyal iletimleri ile gelen ışığın değerlendirilmesi işlemleri sağlanmaktadır (Kaynar, 2013).

Fosforilasyon işlemini katalizleyen özgün protein yapılarının adı kinaz; defosforilasyon olayını katalizleyen özgün protein yapılarının adı ise fosfatazdır. Prokaryotik hücrelerde ise histidin, metiyonin ve aspartik asit fosfatlanmış halde bulunur (Kaynar, 2013).

## **2.5. LED Işık Kaynakları ve Özellikleri**

Işık yayan diyotlar (LED), çevreci, uzun ömürlü, konveksiyonel ve bütün ışık kaynaklarına göre elektrik tüketiminde tasarruflu oluşları sebebi ile birçok ülkede kullanılmakta ve Türkiye’de de kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Teke ve ark., 2011). Işık yayan diyotlar, elektrik akımı geçtiğinde görünür ışık yayan yarı iletken cihazlardır. Işık yayan diyotların hangi renkte ışık yayması isteniyorsa galyum, arsenit, alüminyum, fosfat, indiyum, nitrit gibi kimyasal malzemelerden uygun oranda yarı iletken malzemeye katkı yapılmaktadır. Böylece LED’in istenilen dalga boyunda ışımaya yapması sağlanmaktadır. Işık yayan diyotlar, sıcaklıktaki büyük değişimlere ve titreşime karşı oldukça dayanıklı olup kesintisiz kullanım olanağı sağlamaktadır (Oruç, 2011). Işık yayan diyotlar küçük boyutlu ve esnek olmalarından dolayı çoğu tasarıma kolaylıkla uymaktadır. Mevcut sistemlerde

kullanımları sonunda özel imha yöntemlerine ihtiyaç duyulmamaktadır (Hamamoto ve ark., 2007; Mori ve ark., 2007).

Işık yayan diyotların aydınlatma verimliliği, enerji tasarruflu lambalar ve yüksek basınçlı sodyum lambalardan daha yüksektir. Ayrıca konvansiyonel akkor ampuller ve sodyum lambalarına kıyasla %50 ila 80, enerji tasarruflu lambalara kıyasla %10 ila 20 daha fazla tasarruf sağlamaktadır. Eski akkor elektrik ampullerine kıyasla sekiz kat daha fazla parlaklık sunmakta ve bakımları olağanüstü tasarruf sağlamaktadır. Işık yayan diyotların kullanım ömürlerinin uzun olması sürekli hizmet kesintisinin önlenmesine, hasar ve değiştirme gerekliliğinin ortadan kalkmasına yardımcı olmaktadır. Işık yayan diyotların düşük gerilimle (< 32V) çalışıyor olması ve minimum ısı üretmesi, kullanıcılar için kurulum ve çalışma sırasında oldukça güvenli ortam sağlamaktadır. Bu sistemlerde renkli ışık oluşturabilmek için filtre kullanılmadığından enerji harcamadan daha saf ve derin renkler elde edilebilmektedir (Oruç, 2011).

**Çizelge 2.3.** Aydınlatma sistemlerinin teknik özellikleri (Oruç, 2011)

	Floresan Tüp 120cm (T8- T10)	Led Tüp 120cm (T8)	Led Şeridi 100cm	Akkor Standart Ampul 60W	Led Ampul
<b>Tüketim (W)</b>	40	20	7	60	7
<b>Voltaj (V)</b>	100-240 VAC	100 240 VAC	100-240 VAC/12 VDC	110,120,127, 210-240 VAC	100-240 VAC
<b>Renk</b>	Sıcak/Soğuk Beyaz	Sıcak/Soğuk Beyaz	Sıcak/Soğuk Beyaz	Sıcak Beyaz	Sıcak/Soğuk Beyaz
<b>Renk Sıcaklığı (K)</b>	3000-7000K	3000-7000K	3500-6000K	2700K	3500-6000K
<b>Renk Oluşturma İndeksi</b>	60	80	80	95	80
<b>Kullanım Ömrü (Saat)</b>	8000	50000	50000	1000	50000
<b>Lümen</b>	1900	1700	576	640	600
<b>Watt</b>	48	85	82	11	86
<b>Işık Yayma Açısı</b>	360°	120°	60°	120°	60°

Işık yayan diyotlar antibakteriyal etkilerini, fotodinamik inaktivasyon olarak bilinen bir sistem vasıtasıyla meydana getirmektedir. Hücre içinde fotosensitif olarak bilinen bazı moleküller, ışık absorbe edildikten sonra, lipid, protein ve DNA gibi hücrenel bileşenlerle tepkimeye girmekte ve sitotoksik etki yaratan reaktif oksijen türlerini (ROS) üretmektedir (Luksiene, 2009).

Işık uygun dozlarda ve dalga boylarında uygulandığında hücrelerde bulunan porfirin, flavin ve diğer ışık absorbe eden moleküller tarafından emilmektedir. Emilim sonucunda hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar ile istenilen etki yaratılmaktadır. Bu çalışma mekanizmaları doğrultusunda, LED ışıklarının kullanımı son zamanlarda dikkat çekmekte ve klinik uygulamalarda potansiyel bakteri inaktivasyonu için yeni bir teknoloji olarak araştırılmaktadır (Oruç, 2011). Aydınlatma süresi, ışığın uygulanma mesafesi ve dalga boyu LED ışıklarının antibakteriyal etki derecesini etkilemektedir (Ghate ve ark., 2013).

Örneğin, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Candida albicans* (ATCC 18804) tarafından oluşturulan biyofilmlerin etkinliği üzerine farklı sürelerde uygulanan 455 nm mavi ışık yayan diyodun etkisi araştırılmıştır. Mavi 455 nm LED, farklı zaman dilimlerinde 1, 2, 3, 4, 5, 7 ve 10 dakika uygulanmıştır. Işık uygulamasından sonra seri seyreltme yapılarak BHI veya saboruant agar üzerine yayma ekimle ekilmiş, 24 saat boyunca 35°C'de inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda 455 nm LED ışığının *S.aureus* ve *C.albicans* biyofilm etkinlikleri üzerine 10 dakika uygulanmasının etkili olduğu gösterilmiştir (Rosa ve ark., 2016).

## **2.6. Biyolojik Ritim ve Işık**

Atmosferik çevre ile canlıların uyum içerisinde yaşamasını sağlayan doğal bir zamanlayıcı bulunmaktadır. Bu doğal zamanlayıcıya “Biyolojik Saat” denilmektedir. Biyolojik saat canlılardaki kimyasal olayların günlük, aylık hatta mevsimsel değişimlerini düzenlemektedir. Sistem yapısal olarak periyodiklik, büyüklük, sıklık ve faz gibi özellikler göstermektedir. Biyolojik bir faaliyetin geçmesi için gereken zaman, birim zamanda tekrarlanma sayısı, ortalama değerden olan sapmalar ve biyolojik davranışın başlama, bitiş gibi özellikleri vardır (Bunney ve Bunney, 2000).



Canlıların yürüttüğü biyolojik fonksiyonların faaliyetleri, genellikle çevre şartlarından döngüsel özellikler gösterenlerle eşzamanlı olarak yürür. Eğer bir canlı engelsiz bir şekilde dış ortama ilişkili ise ve faaliyetlerini dış dünyadan gelen uyarılara göre düzenleyebiliyorsa, böyle faaliyetlere bağlı faaliyetler denilmektedir. Bunun yanında, eğer canlı laboratuvar ortamında, çevresel işaretlerden yalıtılmış bir biçimde yetiştirilirse, bu durumda tam olarak çevresel işaretlerle tutarlı olmasa da bir iç ritmi sürdürdüğü görülmektedir. Bu tip faaliyetlere de serbest faaliyetler denilmektedir (Eldebiran ve ark., 2003).

Biyolojik saat ilk defa 1729'da "Günebakan Çiçeği" ile gündeme gelmiştir. Bu çiçeğin gündüzleri yapraklarını açması, akşamları kapatması dikkat çekmiştir. Karanlık bir ortama konulduğunda da aynı tepkileri veren çiçeğin bir içsel mekanizmasının olduğu tespit edilmiştir (Eldebiran ve ark., 2003). Geceleri rengini değiştirebilen bir balık türü üzerinde 1913'te yapılan araştırmalarda, balığın pinal bezinin bulunduğu bölgeye zarar verildiğinde geceleri rengini değiştiremediği görülmüştür. Meyve sinekleri ile 1997'de yapılan bir başka çalışmada ise Clock (CLK) adı verilen biyolojik saat geni bulunmuş ve kodladığı proteine de Clock adı verilmiştir (Şenel, 2008).

Organizmalarda koordineli bir şekilde ilerleyen, 24 saat süren sirkadiyen ritimler, biyolojik evrim geçirmiş tüm organizmaların rekabet etmesine ve hayatlarını çevre ile uyumlu hale getirmelerini sağlamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda hastalıkların tedavisi, metabolik yolların tam anlamıyla düzenlenmesi, transkripsiyon faktörlerinin, redoks ve metabolizma sistemlerin biyolojik saatin yardımı ile düzeltilebileceği anlaşılmıştır (Robinson ve ark., 2014).

Metabolizma ve hormon salgılanması uyku-uyanıklık döngüsü ile kontrol edilen süreçlerdir. Hormonların salgılanması, beden sıcaklığının düzenlenmesi, üreme işlevlerinin ve daha fazlasının yapılabilmesini kontrol etmektedir. Bu döngülerin oluşması epifiz bezinin, suprakiazmatik çekirdeğin, hipotalamusun birbiri ile uyumlu çalışması ile olmaktadır. Yapılan çalışmalar geceleri çalışan ya da düzenli bir çalışma sistemi olmayan insanların kansere yakalanma riskinin yüksek olduğunu göstermiştir. Malign hastalıkların tedavisinde biyolojik saatin terapötik etkisi olabileceği düşüncesi oluşmuştur (Kelleher ve ark., 2013).

Melatoninin hormonu biyolojik saatin korunması ve ritminin ayarlanmasında görev almaktadır. Melatoninin hormonunun yetersiz salgılanması sonucunda jet-lag rahatsızlığı, yorgunluk hissi, uykusuzluk, iştahsızlık, hazımsızlık, zihinsel problemler, huzursuzluk, zaman algısında bozulma, olaylara tepki verme zamanının uzaması, yönelim bozukluğu, nedensiz yaygın vücut ağrıları ve bazen terleme gözlenebilmektedir (Özçelik ve ark., 2013). Sirkadiyen ritim ile ilgili yapılan çalışmada, *Pseudomonas putida* organizmasına ışık/karanlık sistemi uygulanmış ve çalışma sonucunda büyüme oranının değiştiği gözlemlenmiştir. Çalışmada katı besiyerlerinin içerisine proteinleri ve diğer ekstrasellüler maddeler ile bağlanan, yüzey değişikliklerini gösteren boyalar kullanılmıştır (Soriano ve ark., 2010).

Yakın bir geçmişe kadar bakterilerin biyolojik saatleri olabileceği düşünülmemiştir. Tüm canlılar için gerekli olan besinlerin ve kimyasalların dönüşümünde bakteriler yaşamsal önem taşımaktadır. Bakterilerde günlük ritmin, çekirdekten gelen sinyallerden kaynaklandığı, bu ritimler sayesinde hücre bölünmesi, enzim sentezlenmesi, metabolik döngünün ve hareketlerin yapılabilmesi sağlanmaktadır. Bakterilerde biyolojik saat çalışması ilk siyanobakterilerde yapılmıştır. Bu organizmanın gündüzleri fotosentez yapması, geceleri ise azot dönüşümü yapıyor olması dikkat çekmiştir. Azotun insanlar tarafından kullanılabilir forma dönüşümünde siyanobakteriler kilit rol oynamaktadır. Azot, nitrogenaz enzimi sayesinde nitrata çevrilmektedir. Nitrogenaz enzimi oksijen varlığında yıkıma uğramakta ve siyanobakterilerin biyolojik saat ayarlama sistemlerinin düzenli bir şekilde işlemini sağlamaktadır. Bakteriler hücre bölünmelerini biyolojik saatlerine göre ayarlamaktadır. Bölünme dönemleri belirli zaman aralıklarıyla olmaktadır. Bunun nedeni güneş ışığındaki morötesi ışınların DNA'da kırılmalara yol açması, hücrenin genetik şifresini değiştirerek dengesini bozmasıdır. Bir hücreli canlılarda bu tür dış etkilere karşı biyolojik saat devreye girmekte ve hücre bölünmesinin zamanını belirlemektedir (Şenel, 2008).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Mikroorganizmalar ve Kùltürleri

##### Nutrient Broth Besiyeri

Laboratuvarlarda standart mikrobiyolojik analizler için kullanılan besiyeridir. Nutrient broth 8 g/L olacak şekilde hazırlanmaktadır. Katı olarak hazırlanacağı zaman 15 g/L agar-agar eklenmektedir. Deneylerimizde bakteri gelişimi için kullanılmıştır.

##### Saboruant Besiyeri

Laboratuvarlarda standart mikrobiyolojik analizler ve özellikle maya, küf gibi mikroorganizmaların izolasyonu, geliştirilmesi ve tanımlanmasında kullanılan besiyeridir. Katı olarak hazırlanacağı zaman 15 g/L agar-agar eklenmektedir. Deneylerimizde *A.terreus* ve topraktan izole edilen Mavi-1 kodlu bakteri gelişimi için kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Saboruant %4 glukoz besiyeri içeriği

Madde	Miktar (L)
Pepton	10 g
Glukoz	40 g
Agar-agar	15 g

##### Maya Özütü Nişasta Besiyeri

*T.lanuginosa* için en uygun gelişim ortamını oluşturan besiyeridir. Amaca göre gerekli konsantrasyonlarda ve dengeli bir şekilde besin maddeleri eklenmiştir. Katı olarak hazırlanacağı zaman 15 g/L agar-agar eklenmektedir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Maya özütü nişasta besiyeri içeriği

Madde	Miktar (L)
Nişasta	15 g
Maya Özütü	4 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Agar-agar	15 g

### Bazal Besiyeri

Glukoz gibi bazı karbonhidratlar, besiyerlerine fermentasyonun izlenmesi ve buna göre kolonilerin ön tanımlanma işlemlerinin yapılabilmesi amacı ile katılmaktadır. Çoğu mikroorganizma bu ortam koşullarında iyi bir gelişim göstermektedir. Mavi-1 kodlu bakterinin glukoz isteğinin belirlenebilmesi ve ekzopolisakkariti en çok hangi oran kullanıldığında oluşturduğunu belirlemek amacı ile bu besiyeri kullanılmıştır. Katı olarak hazırlanacağı zaman 15 g/L agar-agar eklenmektedir (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Bazal besiyeri içeriği

Madde	Miktar (%)
Glukoz	1,2,3,4 g
Maya Özü	0,5 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 g
NaCl	0,01 g
Agar-agar	15 g

### **3.2. Işık Kaynakları ve Özellikleri**

Mikroorganizmaların morfolojik özellikleri ve protein profilleri üzerine LED ışık kaynaklarının etkisinin araştırılması için Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi farklı renk ve güçteki ışık yayan diyotlar (LED) kullanılmıştır. Kullanılan LED ışıklarının watt cinsinden verilen değerlerinin lümen olarak çevrilmesi LX-101 Digital Lux Meter ile yapılmıştır.

**Çizelge 3.4.** Araştırmada kullanılan LED kaynakları ve özellikleri

<b>Işık Rengi</b>	<b>Güç</b>	<b>Aydınlatma Etkinliği</b>	<b>Marka</b>	<b>Kod</b>
Sıcak Beyaz	10W	930 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-127
Sıcak Beyaz	5W	400 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-100
Soğuk Beyaz	5W	420 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-102
Sıcak Beyaz	3W	240 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-107
Mavi	2W	130 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-107B
Kırmızı	2W	90 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-107R
Sarı	2W	85 Lümen	Gold Master-Eco Serisi	LA-107Y
Yeşil	2W	145 Lümen	Gold Master-Eco Color Serisi	LA-107G

### **3.3. Tampon ve Çözeltiler**

#### TCA (trikloro asetik asit) ile Protein Çöktürme

Bu yöntem, proteinler ile trikloro asetik asit anyonlarının bağ kurarak, suda çözünmeyen tuzlar oluşturmaları prensibine dayanmaktadır. Çözelti, 100 mL aseton içerisinde 20 g TCA çözündürülerek hazırlanmıştır. Deneylerde soğuk olarak kullanılmakta ve 1 mL örnek üzerine 300 µL eklenerek, bir gece yada yapılan denemeler sonucunda değişen sürelerde -21°C’de bekletilmektedir. Daha sonra alınan örnekler, TCA çözeltisinin uzaklaştırılabilmesi için iki defa %50’lik aseton ile yıkanmaktadır.

Deneylerimizde hücre içi protein örneklerine 1:1 oranında %20’lik TCA işlemi uygulanmış ve önce 1 saat +4’te, sonra 3 saat -21’de bekletilmiştir. Süre sonunda TCA örnekleri santrifüjlenerek (15000g, 15 dakika) protein çökeltisi (pelletler) elde edilmiştir. Pelletler, %50’lik aseton çözeltisi ile iki defa santrifüjlenerek (15000g, 15 dakika) yıkanmıştır. Elde edilen örnekler SDS-PAGE elektroforez metodu uygulanmıştır. Elde edilen jeller uygun boyama metodu kullanılarak boyanmış ve görüntüleri kaydedilmiştir.

#### Bradford çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası 100 mg, 50 mL %95’lik etanolde çözündürülmektedir. Orto fosforik asit %85’lik 100 mL eklenmekte ve karışımın son hacmi 1000 mL’ye tamamlanmaktadır. Hazırlanan boya çözeltisinden çözünmeyen boya

kalıntılarının uzaklaştırılması amacı ile filtre kağıdından süzölmektedir. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan standart Ek 2’te verilmiştir.

#### Tampon Çözeltiler

Çözeltilere eklenen az miktarlardaki asit veya bazların çözelti pH’nı değiştirmesini önleyici yönde etki gösteren özel çözeltilerdir. Tampon çözeltilerin içinde ya zayıf asit ile konjuge bazı; ya da zayıf baz ile konjuge asidi bulunmaktadır. Bu durumda tampon çözeltinin içinde hem asit hem de baz karakterli parçacıklar olmaktadır. Tampon çözeltiler aynı zamanda çeşitli laboratuvar çalışmalarında durulama ve yıkama basamakları için de kullanılmaktadır (Evcin, 2006).

Sodyum fosfat: Mikrobiyal hücrelerin hücre süspansiyonlarının hazırlanması için laboratuvar çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır. Bu süspansiyon sıvılarında bulunan tuzlar hücre bütönlüğünün ve canlılığının devam ettirilmesi için izotonik bir ortam sağlamaktadır. Ayrıca, canlılığın devamı için pH değeri önemli olabilmektedir. Deneylerimizde kullanılan sodyum fosfat tamponu 7,10 g/L sodyum fosfat dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )’in saf suda çözdürölmesi ile hazırlanmıştır. Çözelti pH: 7’ye ayarlanmış ve işlemlerde kullanılmak üzere  $+4^\circ\text{C}$ ’de saklanmıştır.

İzotonik solüsyon: Laboratuvar çalışmalarında süspansiyon, seyreltme ve durulama işlemlerinde kullanılmaktadır. Besin içermediğinden dolayı bu sıvılarda süspansiyon edilen örnekler uzun süre bekletilmemelidir. Deneylerimizde genellikle seyreltme işlemlerinde kullanılan çözelti 9 g/L NaCl’nin saf su içerisinde çözdürölmesi ile hazırlanmıştır. Otoklavlanmış ve işlemlerde kullanılmak üzere  $+4^\circ\text{C}$ ’de saklanmıştır.

### **3.4. Mavi-1 Kodlu Bakteri İzolatına Uygulanan Biyokimyasal Analizler**

#### Gram Boyama

Saf koloniden bir miktar alınıp lam üzerine fikse edilmiş ve 1-2 dakika kristal violet ile boyanmıştır. Boya saf su ile süre sonunda iyice akıtılmıştır. Boyanın etkisinin arttırılabilmesi için lügol çözeltisi ile 1 dakika boyanmış ve alkol ile yıkanmıştır. Karşıt boya olarak 45 saniye kadar safranin ile boyanıp yıkanan preparatlar immersiyon yağı altında incelenmiş ve pembe renkteki hücreler gram negatif olarak kaydedilmiştir.

### Endospor Boyama

Saf kültür örneğinden bir miktar alınıp lam üzerine fikse edilmiştir. Kaynayan su buharında 5 dakika boyunca malaşit yeşili ile boyanmıştır. Boya süre sonunda saf su ile iyice yıkanmış, 10 saniye karşıt boya olan safranin ile muamele edilmiştir. İmmersiyon yağı altında incelenmiş ve endospor oluşturmadığı kaydedilmiştir.

### Oksidaz Testi

Kovac's ayırıcı damlatılan kurutma kağıdı üzerine bir miktar saf koloniden alınıp yayılmış, mor-mavi renk oluşmaması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

### Katalaz Testi

Kültüre edilen 24 saatlik örnekten bir miktar alınarak temiz bir lam üzerinde, saf su içerisinde dağıtılmıştır. Üzerine 1 damla %3' lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatılmış ve oluşan hava kabarcığı çıkışı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

## **3.5. Proteinlerin Elde Edilmesi**

Sıvı saboruant dekstroz besiyerine Mavi-1 kodlu bakteri kültüründen tek koloni alınıp ekilmiş, gece boyu çalkalamalı inkübatörde 30°C'de inkübe edilmiştir. Bakteri kültür bulanıklığı 0,5 *McFarland* (1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL) standartına ayarlanmış ve 10<sup>-2</sup> kat seyreltme işlemi yapıldıktan sonra katı besiyerlerine paralel olacak şekilde (100 µL yayma ekim) ekilmiştir. Ekim yapılan kültürler aydınlık ve karanlık iki farklı koşulda inkübe edilmiştir. İnkübe edilen kültürlerde istenilen gelişim sağlandıktan sonra izotonik solüsyon kullanılarak drigaski yardımı ile agar üzerindeki izolatlar toplanmıştır. Toplanan izolatlar santrifüj (4000 rcf, 15 dakika) edilerek süpernatant ve pellet ayrılmıştır. Pellet havanda sıvı azot kullanılarak parçalanmış ve sodyum fosfat tamponunda çözdürülmüştür. Çözünmesi sağlanan örnekler tekrar santrifüj (4000 rcf, 15 dakika) edilerek hücre kalıntıları bulunan pellet ayrılmış, süpernatant deneylerde kullanılmak üzere alınmıştır.

*A.terreus* ve *T.lanuginosa* ekimleri ise spor stoklarından 10<sup>-2</sup> kat seyreltme yapıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir. *A.terreus*, %4 glukoz içeren saboruant dekstroz besiyerine, *T.lanuginosa* ise sıvı ve katı maya özütü nişasta besiyerine ekilmiştir. Ekimler sıvı

besiyerlerine öze yardımı ile katı besiyerlerine ise antibiyotik diskler yardımı ile yapılmıştır. Antibiyotik diskler seyreltilen spor stokları içerisine daldırılıp çıkarılmış ve agarın tam merkezine gelecek şekilde yerleştirilmiştir. *T.lanuginosa*, sıvı besiyerine dört öze dolusu olacak şekilde ekilmiştir. Kültürler aydınlık ve karanlık iki farklı koşulda inkübe edilmiştir. *T.lanuginosa* katı besiyerinde istenilen gelişimi gösterememiş, *A.terreus* ise istenilen gelişimi göstermiştir. *A.terreus*'un spatül yardımı ile agardan ayrılması sağlanmıştır. Sıvı besiyerinde gelişim gösteren *T.lanuginosa* süzülerek alınmıştır. Temizlenen küfler havanda sıvı azot kullanılarak parçalanmış ve sodyum fosfat tamponunda çözdürülmüştür. Çözünmesi sağlanan örnekler tekrar santrifüj (4000 rcf, 15 dakika) edilerek hücre kalıntıları bulunan pellet ayrılmış, süpernatant deneylerde kullanılmak üzere alınmıştır.

### **3.5.1. Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein miktar tayini, Bradford metoduna göre BSA standart proteini kullanılarak spektrofotometrede belirlenmiştir. Bradford yöntemi, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşime giren Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Negatif yüklü olan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kırmızı renklidir. Boya proteinlerde pozitif yüklü gruplar ile bağ kurduğunda mavi renk almakta ve 595 nm'de maksimum absorban vermektir. Bradford yönteminde renk oluşumu 2 dakikadan sonra gerçekleşmekte ve 1 saat stabil kalmaktadır.

Bradford reaktifi 0,1 g/L Coomassie Brilliant Blue G-250, %5 (h/h) etanol ve %10 (h/h) %85'lik fosforik asit içermektedir. Yöntemde protein miktar tayini yapılırken; 50 µL örnek üzerine 1,5 mL hazırlanan bradford çözeltisinden eklenip vortekslenmekte ve 30 ila 60 dakika arasında beklendikten sonra 595 nm'de ölçüm yapılmaktadır (Bradford,1976).

### **3.5.2. Poliakrilamid Jel Elektroforez Yöntemi ve Jellerin Boyanması**

Yapılan öğütme işlemlerinin ardından elde edilen proteinler SDS-PAGE elektroforez metodu ile görüntülenmiştir. Elektroforez çalışmaları mini jel sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Ek 4'te belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda alt ve üst jel hazırlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen jeller protein örneklerinin görüntülerinin



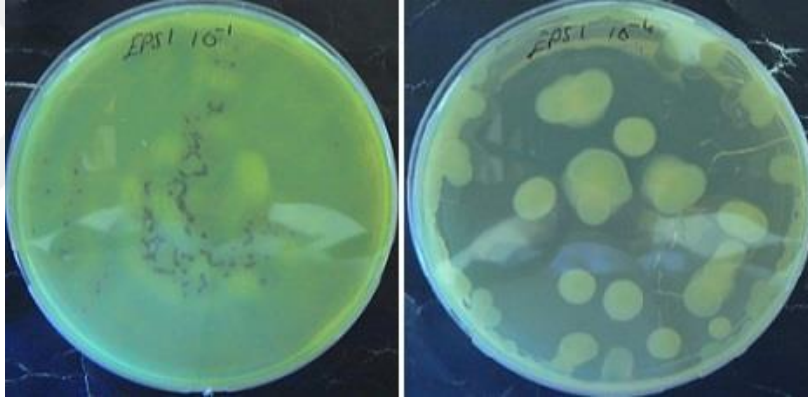
belirlenebilmesi için Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile boyanmıştır. İlk görüntüleri elde edildikten sonra tekrar aynı örneklere SDS-PAGE uygulanarak fosfoprotein ve toplam protein tespitleri yapılmıştır. Jeller boya çözeltisinde 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra boyanın giderilebilmesi için yıkama çözeltisinde iki saat bekletilmiştir. Boyanın iyi bir şekilde giderilebilmesi için her 30 dakikada bir yıkama çözeltisi değiştirilmiştir. Yıkama sonunda protein bantları görüntülenmiştir. Poliakrilamid jel elektroforez yönteminde kullanılan çözeltilerin ve boyaların içerikleri Ek 4 ve 5’de verilmiştir.

Fosfoprotein tayini için standart SDS-PAGE protokolüne göre jeller yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeller, iki defa 100 mL fiksasyon çözeltisinde bekletilmiştir. Her fiksasyon çözeltisi eklendiğinde 30 dakika boyunca çalkalanması sağlanmıştır. İşlem sonunda jeller 100 mL ultra saf su ile üç defa 10’ar dakika olacak şekilde yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra jellerin tamamını kaplayacak şekilde phos-Tag™ phosphoprotein jel boyası eklenmiş, çalkalanması sağlanarak 60-90 dakika boyunca boyanmıştır. Phos-Tag™ phosphoprotein boya uzaklaştırıcı çözelti ile jeller üç defa 30’ar dakika boyunca yavaşça çalkalanarak yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra 5 dakika ultra saf su ile iki kez muamele edilmiştir. Düzensiz görüntü oluşması durumunda jeller 20-30 dakika ikinci yıkamada bırakılmaktadır. Jellerin görüntülenmesi için 300 nm UV transillüminatör kullanılmıştır. Belirtilen şekilde fosfoprotein boyama yapılan aynı jel daha sonra toplam protein tayininin yapılabilmesi için aşağıda belirtilen şekilde boyanmıştır. Kullanılan çözeltilerin ve boyaların içerikleri Ek 5’de verilmiştir.

Su: metanol: asetik asit kullanılarak 1 mL’lik 1000x Luminol™ Protein jel boyası seyreltilmekte ve böylelikle boya çözeltisi hazırlanmaktadır. Çözelti +4°C’de koyu renkli, plastik şişede ışıktan korunmuş bir şekilde saklanmaktadır. Jellerin üzerini kaplayacak şekilde luminol boya çözeltisi eklenmiş ve 90 dakika çalkalanması sağlanarak muamele edilmiştir. Daha sonra yıkama çözeltisi ile 20 dakika çalkalanması sağlanarak jelin yıkanması sağlanmıştır. Jellerin görüntülenmesi için 300 nm UV transillüminatör kullanılmıştır. Kullanılan çözeltilerin ve boyaların içerikleri Ek 5’de verilmiştir.

### 3.6. Mavi-1 Kodlu Bakteri İzolatı ve Ekzopolisakkarit (EPS)

Saboruant ve bazal besiyeri ortamlarında büyütülen bakteri izolatımızın agar üzerinde akışkan, sıvı besiyerinde ise yapışkan bir yapı oluşturduğu tespit edilmiştir. En iyi büyümenin %4 glukoz barındıran saboruant besiyerinde olduğu görülmüştür. Polisakkaritler, birden çok monosakkaritin glikozit bağı ile bağlanması sonucu oluşan kimyasal maddelerdir. Ekzopolisakkaritler (EPS) bağımsız olarak hücre duvarı dışında biriken, hücre duvarına birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda kültür ortamında üretilen yapılardır. Bakteriler tarafından üretilen EPS'ler in vitro çalışmalarda varlıklarını katı besiyerinde Şekil 3.1'de görüldüğü gibi mukoid koloni, sıvı besiyerinde oldukça viskoz bir görünüm ile ortaya koymaktadır (Yılmaz ve Çelik, 2007).



Şekil 3.1. Bakteri izolatının agar üzerinde oluşturduğu renk ve akışkan yapı

#### 3.6.1. Ekzopolisakkarit Yapının Saflaştırılması ve Tayini

Aydınlık ve karanlık iki ayrı koşulda inkübe edilen kültürler alınmış, izotonik solüsyon kullanılarak toplanmıştır. Toplanan izolatlar santrifüj (4000 rcf, 15 dakika) edilerek, süpernatant ve pellet kısımları ayrılmıştır. Süpernatanta fenol sülfirik asit metodu uygulanmış ve glukoz standart kullanılarak miktar belirlenmiştir. 0-150 µg/mL arası değişen konsantrasyonlarda glukoz standardı hazırlanmış, örnekten uygun dilüsyonlar hazırlanarak ölçüm yapılmıştır.

Yöntemde karbonhidrat miktar tayini yapılırken; 100 µL örnek üzerine, 50 µL %80'lik fenol ile 2 mL sülfirik asit eklenip vorteksenmekte ve 10 dakika beklendikten sonra 490 nm'de ölçüm yapılmaktadır. Glukoz standart grafiği Ek 3'de verilmiştir.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Öncelikli olarak bu çalışmanın amacı uzun süre LED ışığının etkisi altında kalan mikroorganizmaların hem morfolojik hem de protein seviyelerindeki değişikliklerinin belirlenmesidir. Kullanılan sekiz farklı LED'in mikroorganizma hücreleri üzerinde etkisinin olup olmadığı ve bu etki sonucunda protein seviyelerinde bir farklılığın oluşup oluşmadığı gösterilmeye çalışılmıştır.

Bununla birlikte, LED'lerin her biri farklı ışık şiddetlerine sahiptir ve her birinin sağladığı etkinin ortaya çıkış zaman aralığı farklı olmaktadır. Deneylerimizde 10W, 5W, 3W ve 2W değerindeki farklı LED lambaları kullanılmıştır. Lambalar inkübatörün tavanına montelenmiştir. Aydınlık ve karanlık kültürler, değerlendirme aşamasında herhangi bir ortam değişikliğinden kaynaklı etki ile karşılaşılmasını için aynı inkübatörde inkübe edilmiştir. Aydınlık örnekler inkübatör içerisinde ışığın tam altına gelecek şekilde, karanlık örnekler ise alüminyum folyoya sarılı olarak koyulmuştur.

LED ışıklarının uygulama esnasında inkübatör sıcaklığını değiştirip değiştirmediği önemli bir detay olduğundan, termometre ile sıcaklık ölçülmüş ve herhangi bir artışa neden olmadığı görülmüştür. Sıcaklık değişimi ile mikroorganizmaların gelişim derecesinin değişebileceği göz önünde bulundurularak, belirli bir LED için sıcaklık artışı denenmiştir. Sıcaklık değişiminden mikroorganizma gelişiminin olumsuz etkilendiği görülmüştür. Işık ile sıcaklığın ilişkilendirilemeyeceği ve bir avantaj olamayacağı kaydedilmiştir. Böylece mikroorganizma kültürlerindeki azalmanın LED aydınlatma kaynaklı olduğu anlaşılmıştır.

Mavi ve kırmızı LED ışık kaynaklarının kullanıldığı bir araştırma sonucunda, bezelye fidelerinin yapraklarındaki klorofil ve  $\beta$ -karoten içeriğinin arttığı görülmüştür (Wu ve ark., 2007). Işıklar ile ilgili çalışmalar arasında mavi ışık denemelerine oldukça sık rastlanmaktadır. Mavi ışığın tedavilerde kullanımının sağlanabilmesi için organizmalar üzerinde denemeler yapılmaktadır. Çalışmalar sonucunda mavi ışığa mikrobiyal direnç geliştirme mekanizmalarının olup olmadığı belirlenmekte ve bununla ilgili parametreler oluşturulmaktadır (Dai ve ark., 2012).

Mavi ışık tedavisi *Propionibacterium acnes* enfeksiyonları için klinik olarak kabul gören bir tedavi yaklaşımıdır. *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu mide enfeksiyonları içinde mavi ışık, umut verici sonuçlar vermiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* da dahil olmak üzere önemli patojen bakterilerin mavi ışık inaktivasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. *P.acnes*, *H.pylori* ve bazı oral bakteriler üzerinde mavi ışığın inaktivasyon mekanizması, hücre içi porfirinlerin ışıkla uyarılması ve daha sonra sitotoksik reaktif oksijen türlerinin üretilmesi olarak kanıtlanmıştır. Mavi ışığın memeli hücrelerinde ve yara iyileşmesinde etkisi hakkında sınırlı ve uyuşmayan sonuçlar bildirilmiştir (Dai ve ark., 2012).

Ultraviyole (UV) ışığının mikrop öldürücü özelliğinin uzun zamandan beri bilinmesine rağmen, 405 nm görünür mavi ışığının antimikrobiyal özelliğinin çevresel dezenfeksiyon ve enfeksiyon kontrol uygulamaları için kullanılmaya başlanması nispeten yeni uygulanmaya başlanmıştır. Bakteriyal ve fungal sporlar gibi dirençli formlar da dahil olmak üzere geniş bir prokaryotik ve ökaryotik mikrobiyal türün tahrip edilmesinde 405 nm mavi ışık ile indüklenen fotodinamik inaktivasyona dair birçok bilimsel çalışma yapılmıştır. Mavi ışığın önemli antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu, fakat mikrop öldürücü etkinliğinin UV ışığından daha düşük olduğu belirlenmiştir. Mikrop öldürücü etkinliğinin artırılabilmesi için işgal edilmiş ortamlarda güvenli, sürekli kullanılması sağlanmalı ve bu şekilde telafisi yapılabilmektedir. Dezenfeksiyon etkinliği ile ilgili umut verici sonuçlar, hastane çalışmalarında elde edilmiştir. Ancak bu teknolojinin enfeksiyon hastalıkları ile ilgili etkisi henüz belirlenememiştir (Maclean ve ark., 2014).

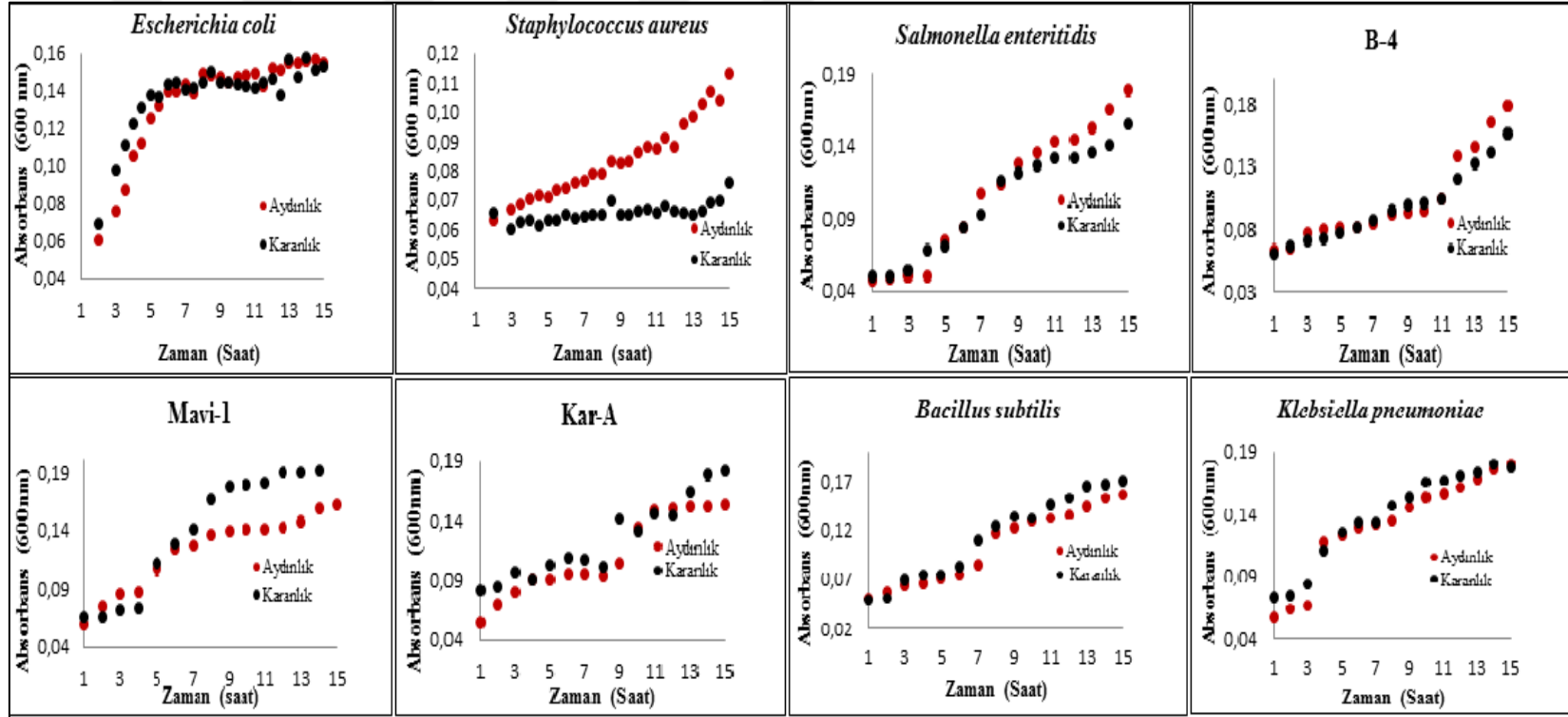
#### **4.1. Işık Yayan Diyotların Bakterilerin Gelişimine Etkisi**

Başlangıç denemelerinde Şekil 4.1'de görüldüğü gibi inkübatör tavanına beyaz şerit LED döşenmiş ve laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve topraktan izole edilen, farklı şekillerde kodlanmış Mavi-1, B-4 ve Kar-A bakteri örnekleri bu ışık altında inkübe edilmiştir. Mikroorganizmaların gelişim parametreleri, bakteri gelişimi için 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler doğrultusunda absorbans ölçümleri ile belirlenmiştir. Bakteriler öncelikli olarak nutrient ve saporuant %4 dekstroz besiyerlerinde

tek koloni olarak elde edilmiştir. Daha sonra bu tek koloniler hazırlanmış olan erlen mayerlerdeki sıvı besiyerlerine ekilmiştir. Mikroorganizmalar aydınlık ve karanlık iki farklı ortamda, 30°C’de inkübasyona bırakılmış, saatlik ölçümler alınmıştır. Kontrol olarak boş sıvı besiyeri kullanılmıştır. Elde edilen veriler ile aşağıda şekillerde verilen absorbanstaman üreme eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.2).



**Şekil 4.1.** LED ışık döşenmiş inkübatör ve inkübe edilen kültür örnekleri

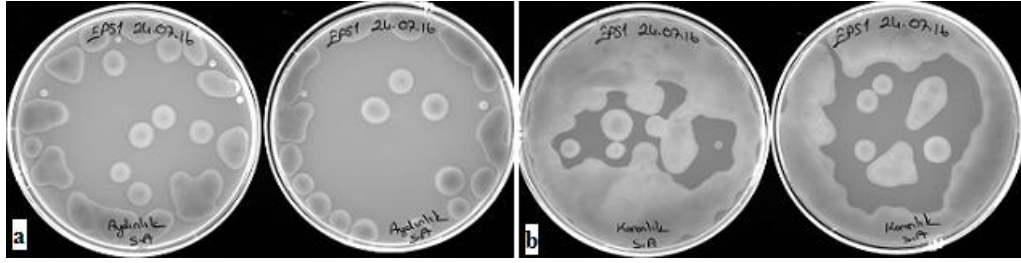


Şekil 4.2. LED ışık altında inkübe edilen bakterilerin üreme eğrisi

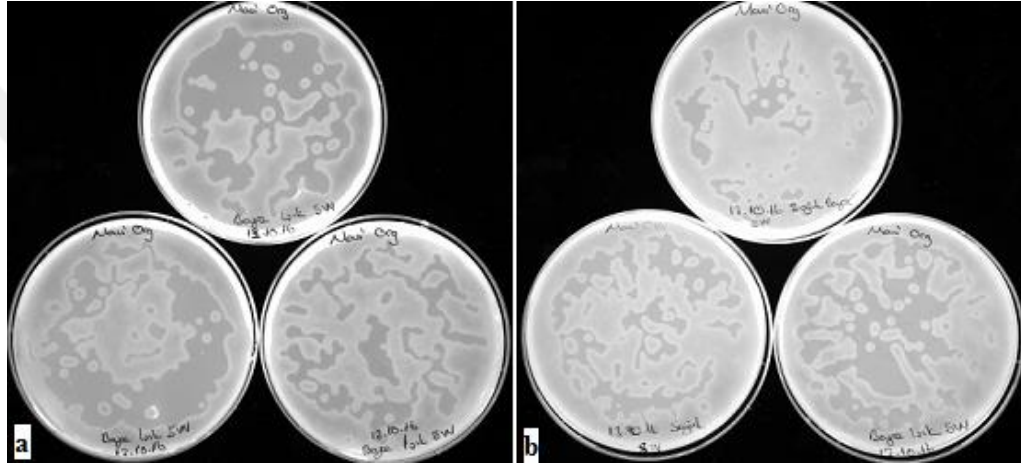
Kullanılan her LED ışığı için 30°C sıcaklık denenmiştir. Bakteri suşunun farklı LED ışıklarına karşı tepkisi değişkenlik göstermiştir. Örneğin, sıcak ve soğuk beyaz LED ışıklarında aydınlık ve karanlık büyüme koşulları arasında agar üzerinde fark gözlemlenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4). Fakat yeşil (Şekil 4.5), mavi (Şekil 4.6) ve kırmızı (Şekil 4.7) ışık altında inkübe edilen örneklerde, agar üzerinde aydınlık ve karanlık büyüme koşulları arasında gelişim farkının olmadığı kaydedilmiştir. Mavi ışığın birçok çalışmada bakteri popülasyonu üzerinde azaltıcı etkisine değinilmiştir. Fakat yaptığımız çalışmada, bakteri izolatomuz üzerinde etki etmediği, aydınlık ve karanlık kültürlerin, muamele edilmemiş kontrol hücrelerine benzer bir gelişme gösterdiği görülmüştür. Mavi ışık ile ilgili örnek çalışmalarda, bakteriler üzerinde öldürücü etkisine değinilmiş ve olumlu sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Bu çalışmalar göz önünde bulundurularak çalışmamızda kullandığımız mavi ışığın etkisi araştırılmış ve yapılan tekrarlı çalışmalar sonucunda agar üzerinde farkın gözlemlenmediği, normal gelişimin olduğu, benzer bir şekilde protein seviyesinde de fark kaydedilmemiştir. Aydınlık kültür örneklerinin protein bant yoğunluğunun, karanlık kültürlerle oranla daha az olduğu belirlenmiştir.

Mavi ışık, özellikle 405-470 nm dalga boyu aralığında, dışarıdan ışığa duyarlı madde ilavesi olmaksızın kendine has antimikrobiyal etkisi nedeniyle ilgi görmüştür. Mavi ışığın, bakterilerdeki mavi ışık reseptörleri aracılığıyla hücre-hücre iletişimi içeren çok hücreli davranışları düzenleyebildiği ve biyofilm oluşumunu engellediği ve ışık inaktivasyonunu güçlendirebildiği rapor edilmiştir. Daha fazla maruz bırakıldığında, mavi ışık hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir antimikrobik etki göstermektedir (Dai ve ark., 2012).

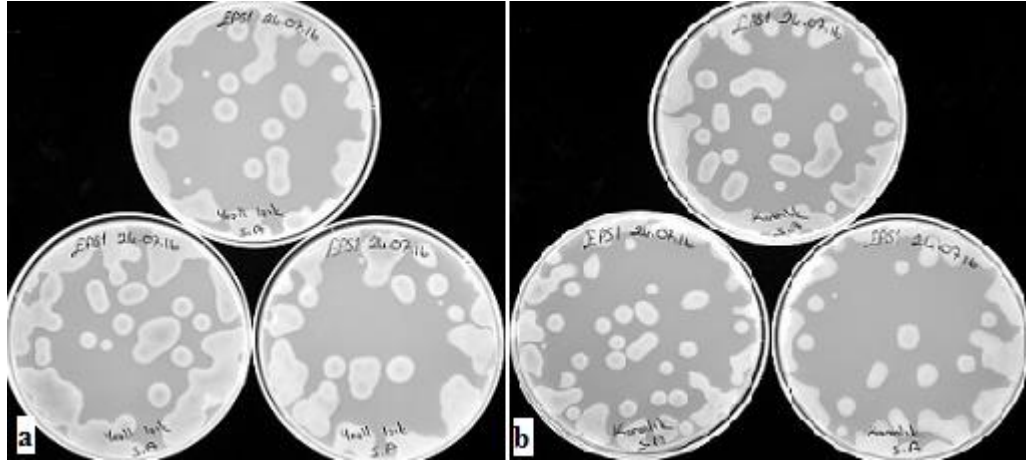
Derin diş çürükleri ile gerçekleştirilen çalışmada gerçek zamanlı PCR yöntemleri kullanılarak fotodinamiklerin antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiştir. Derin çürüğü olan 10 diş seçilmiş, sırasıyla yüzeyden ve derinden örnek alınmıştır. Örnekler geleneksel kültür yöntemleri ile agar plaklara ekilmiş ve elde edilen *Streptococcus mutans* kültürlerinde fotodinamik tedavi sonrasında önemli ölçüde azalma görülmüştür. Fakat yapılan PCR analizi sonucunda fotodinamik tedavi uygulanan ve uygulanmayan iki grup arasında DNA değişikliği görülmemiştir (Araujo ve ark., 2015).



Şekil 4.3. Bakteri izolatının 5W sıcak beyaz LED ışık altında gelişimi (a-aydınlık, b-karanlık)

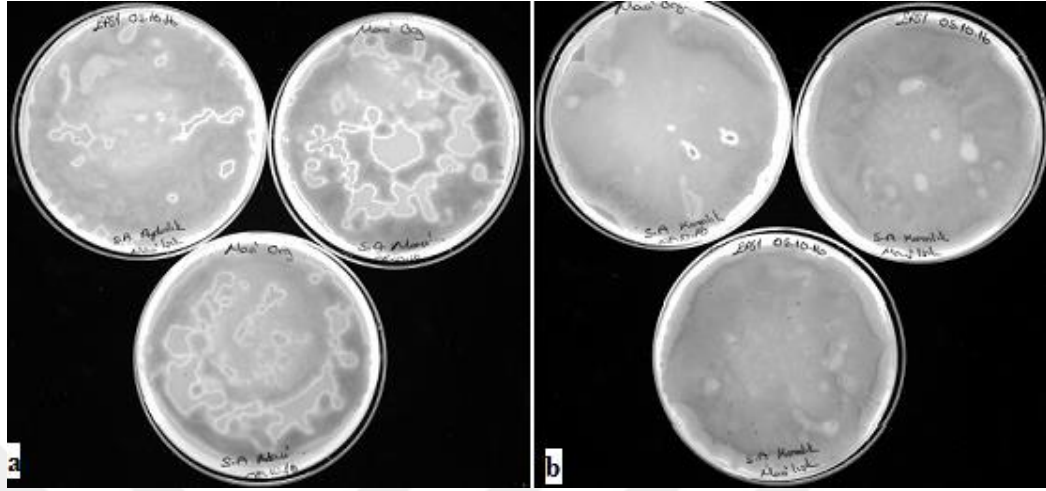


Şekil 4.4. Bakteri izolatının 5W soğuk beyaz LED ışık altında gelişimi (a-aydınlık, b-karanlık)

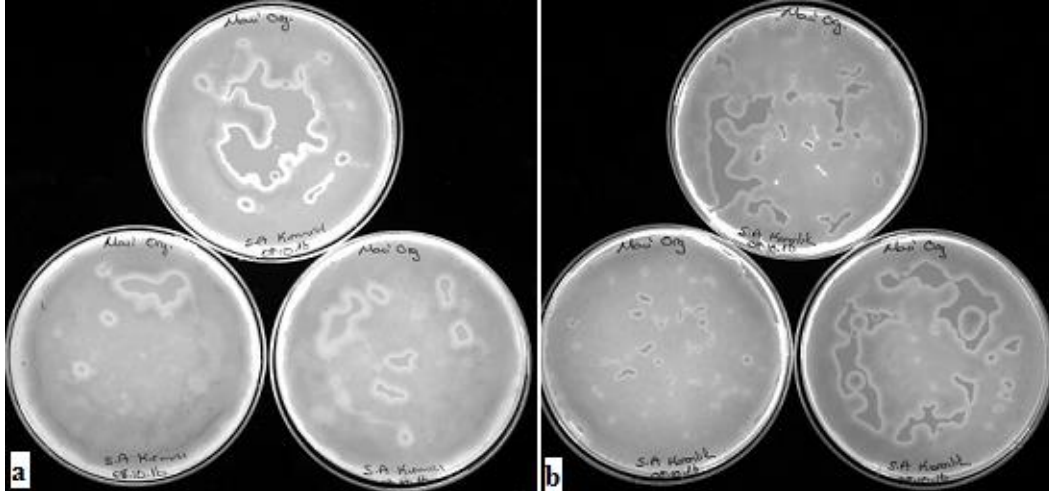


Şekil 4.5. Bakteri izolatının 2W yeşil LED ışık altında gelişimi (a-aydınlık, b-karanlık)





Şekil 4.6. Bakteri izolatının 2W mavi LED ışık altında gelişimi (a-aydınlık, b-karanlık)

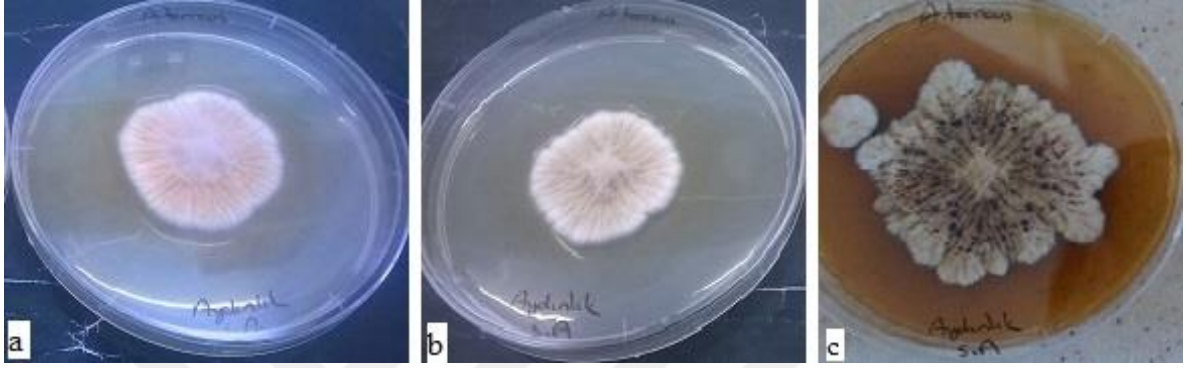


Şekil 4.7. Bakteri izolatının 2W kırmızı LED ışık altında gelişimi (a-aydınlık, b- karanlık)

#### 4.2. Işık Yayan Diyetlerin Küflerin Gelişimine Etkisi

Küf örneklerinin gelişimleri ise katı ve sıvı besiyerinde her gün resimleri kaydedilerek belirlenmiştir. *A.terreus*'un belirlenmesinde katı besiyeri, *T.lanuginosa*'nın belirlenmesinde ise sıvı besiyeri dikkate alınmıştır. Fakat sıvı besiyerinde inkübe edilen *T.lanuginosa* için spektrofotometrik ölçüm yapılmamıştır. *A.terreus* için spor stoğundan  $10^{-2}$  kat seyreltme yapılmıştır. Daha sonra seyreltilen spor stoğundan, antibiyotik diskler yardımı ile %4 glukoz içeren savoruant agara ekimler gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik diskler seyreltilen stok içerisine daldırılıp çıkarılmış ve agarın merkezine gelecek şekilde yerleştirilmiştir.

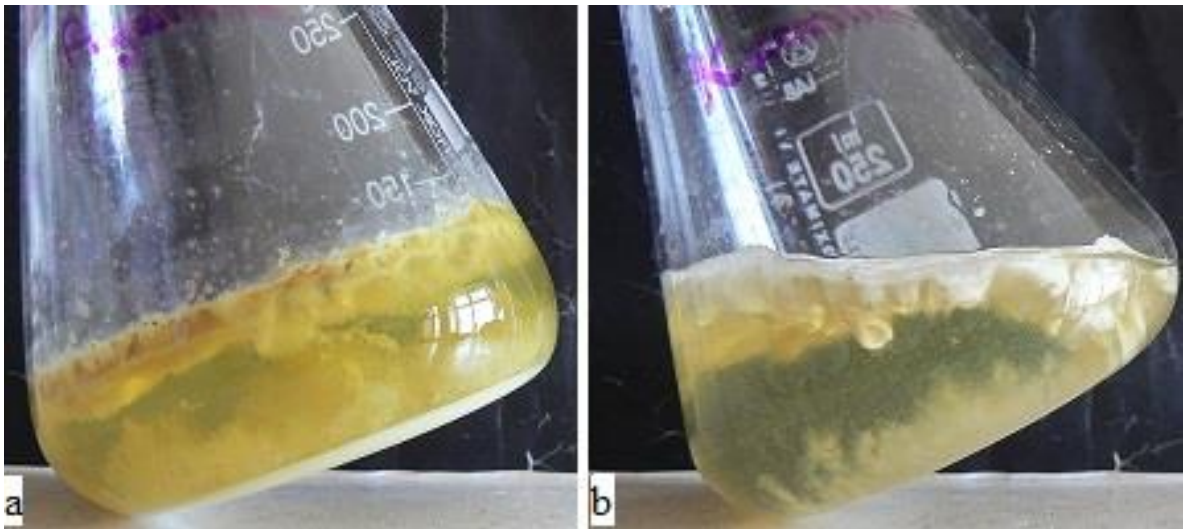
*T.lanuginosa* ise dört öze dolusu alınarak sıvı maya özütü nişasta besiyerine ekilmiştir. Yapılan ekimlerin hepsi paralel şekilde gerçekleştirilmiştir. Spor oluşum zamanları belirlenmiş ve aydınlık ve karanlık farkları kaydedilmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



Şekil 4.8. *A.terreus*'un aydınlık kültürlerinde spor gelişimi (a-2.gün, b-3.gün, c-4.gün)



Şekil 4.9. *A.terreus*'un karanlık kültürlerinde spor gelişimi (a-2.gün, b-3.gün, c-4.gün)



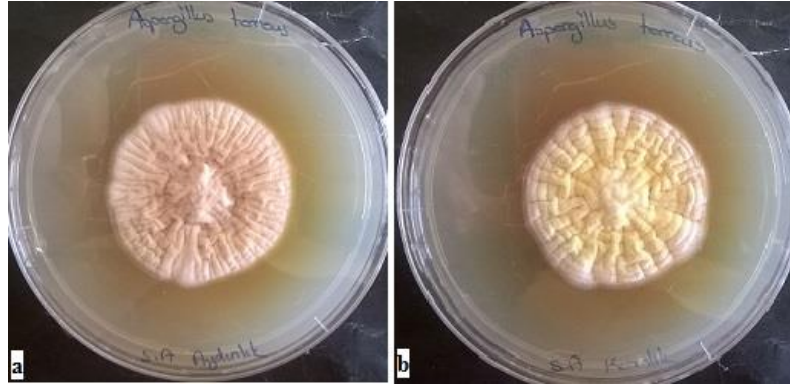
Şekil 4.10. Aydınlık ve karanlık ortamda inkübe edilen *T.lanuginosa*'nın sıvı besiyerinde gelişimi

Kültüre edilen *A.terreus*'un Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görüldüğü gibi katı besiyerinde üst yüzeylerinde sıvı salgısı oluşmuştur. Bu salgılar şırınga yardımı ile toplanmış ve antimikrobiyal etkinliğinin olup olmadığı, var ise aydınlık ve karanlık arasında farkın tespiti için antibiyogram analizi yapılmıştır. Aynı zamanda agarın renginde gün geçtikçe koyulaştığı, aydınlık kültürlerde renk değişiminin daha az olduğu, karanlık kültürlerde ise daha fazla olduğu görülmüştür. Antibiyogram analizi için antibiyotik disklere 25 µL salgılardan emdirilmiş ve agar yüzeyine bırakılmıştır. İnkübe edilen kültürlerde oluşan zon çapları Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi ölçülmüştür. Sonuç olarak bakteriler üzerine etkisinin olduğu, fakat aydınlık ve karanlık kültürlerden elde edilen salgılar arasında etki farkının olmadığı kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *A.terreus* aydınlık ve karanlık ortamda inkübe edilen kültürlerinde oluşan salgısının antibiyogram sonuçları

Bakteriler	Aydınlık Zon Çapı (mm)	Karanlık Zon Çapı (mm)
<i>Salmonella enteritidis</i>	0,8	0,9
<i>Escherichia coli O157: H7</i>	1	1,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2	1,1
<i>Bacillus subtilis</i>	1	1,2

*A.terreus* ve *T.lanuginosa* için tek bir LED aydınlatma kullanılmıştır. Sıcak beyaz 10W LED ışığının kullanıldığı deneyimizde aydınlık ve karanlık kültürler arasında farkın olduğu kaydedilmiştir. İnkübasyonun 2.günüden itibaren her iki örneğimizde üreme görülmeye başlanmıştır. İnkübe edilen *A.terreus* kültürlerinde 5 günün sonunda karanlık ortamda inkübe edilenlerinde açık sarı halka şeklinde sporlanmanın, aydınlık kültürlerinde ise kahverengi sporlanmanın olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** *A.terreus*'un 10W sıcak beyaz LED ışık altında gelişimi (a-aydınlık kahverengi sporlanma, b- karanlık sarı sporlanma örnekleri)

*T.lanuginosa* ise 9 gün inkübe edilmiş ve aydınlık kültürünün sıvı kısmının bulanıklığının yoğun ve üst kısmında oluşan sporlanmanın ise gri renkte olduğu görülmüştür. Karanlıktaki kültürlerde ise üst kısımda beyaz küf oluşumun olduğu, fakat sporlanmanın olmadığı, sıvı kısmının berrak olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** *T.lanuginosa*'nın 10W sıcak beyaz LED ışık altında gelişimi (a-karanlıkta inkübe edilen kültürde küf gelişimi, b-aydınlıkta inkübe edilen kültürde gri sporlanma, c-karanlık kültürün berrak görüntüsü, d-aydınlık kültürde bulanıklığın görüntüsü)

### 4.3. Sıcaklık Değişiminin Hücre Çoğalmasına Etkisi

Işık yayan diyotların antibakteriyal etkisi *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde araştırılmıştır. Bakteri kültürleri 4,5 cm'lik bir mesafe ile sıcaklıkları 7,5, 10, 15 ve 20°C olan inkübatörlerde inkübe edilmiştir. Antibakteriyal etki 461 ve 521 nm aydınlatılmada gözlemlenirken, 642 nm aydınlatılmada herhangi bir etki görülmemiştir. Aydınlatma

sıcaklığına bakılmaksızın 461 ve 521 nm LED ile aydınlatmada tüm bakteri türlerinde hasar gözlemlenmiş ve tedavi süresi arttıkça yaralı hücrelerin yüzdesinde de artış görülmüştür. Sonuçlar, LED'lerin antibakteriyel etkisinin dalga boyu ve aydınlatma sıcaklığına bağlı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda 461 ve 521 nm LED'lerin gıda koruma teknolojisi olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (Ghate ve ark., 2013).

Perakende satış dolaplarında taze kesilmiş papaya meyvesinin üzerinde gelişen salmonella serotiplenmesine karşı farklı sıcaklıkların ve LED ışık uygulamasının gelişmiş bir antimikrobiyal koruma sağlayabileceği düşünülmüştür. Farklı sürelerde uygulanan LED ışık uygulamasından sonra belirlenen sıcaklıklarda bakteri popülasyonunda meydana gelen artış ve azalışlar tespit edilmiştir. Deney aşamasında papaya meyvesinin fizikokimyasal yapısı ve besleyici özelliklerine LED uygulamasının herhangi bir zararının olmadığı belirlenmiştir. Gıda soğutucusu  $405 \pm 5$  nm LED aydınlatması ile donatılmış ve papaya'nın bozulmadan korunabildiği, oluşabilecek risklerin en aza indirgenebileceği tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2017).

Çalışmamızda tüm mikroorganizmalar  $30^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Mavi-1 kodlu bakteri izolatımız için ayrıca oda sıcaklığı,  $+4^{\circ}\text{C}$  ve  $35^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklar denenmiştir. Büyüme ve pigment oluşumunun en iyi  $30^{\circ}\text{C}$ 'de olduğu görülmüştür. Mavi-1 ve *A.terreus* örneklerinde beş günlük inkübasyon sonucunda  $30^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta istenilen gelişim sağlanmıştır. *T.lanuginosa*'da ise 9 günlük inkübasyon sonucunda,  $30^{\circ}\text{C}$ 'de istenilen gelişim sağlanmıştır.

#### **4.4. Ekzopolisakkarit Miktar Tayini**

Saboruant ve bazal besiyeri ortamlarında büyütülen bakteri izolatımızın agar üzerinde akışkan, sıvı besiyerinde ise yapışkan bir yapı oluşturduğu çalışmalarımız sırasında tespit edilmiştir. Aydınlik ve karanlık iki farklı koşulda inkübe edilen kültürlerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin miktar tayinleri yapılmıştır. Glukoz standart eğiminden elde edilen denklem yardımı ile karbonhidrat oranları hesaplanmıştır. Aydınlik kültürlerden elde edilen örneklerin ekzopolisakkarit oranları, karanlık kültürlerden elde edilenlere oranla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Bazı örneklere uygulanan fenol sülfirik asit tayin sonuçları

LED Işık	Aydınlık (mg/mL)	Karanlık (mg/mL)
Şerit Şeklindeki Beyaz LED	0,17575	0,026875
3W Sıcak beyaz	16,98175	1,463175
5W Sıcak beyaz	7,8375	0,810225
5W Soğuk beyaz	5,825	0,52845
10W Sıcak beyaz	15,63675	1,794675

#### **4.5. Sıcaklık Değişiminin Ekzopolisakkarit Üretimine Etkisi**

Farklı ortamlarda bir tür tarafından farklı ekzopolisakkaritler üretilebilmektedir. Ekzopolisakkarit üretimi, mikroorganizmaların üreme aşamalarında gelişim fazlarından, besiyeri bileşiminden, pH ve sıcaklık gibi üremeyi önemli derecede etkileyebilecek parametrelerden etkilenmektedir (Duboc ve Mollet, 2001). Verim logaritmik fazda artmakta, durağan fazda üretim olmamaktadır. Kültür ortamında kullanılan karbon kaynakları, kültürün inkübe edildiği sıcaklıklar EPS üretiminde etkili olmaktadır. Düşük inkübasyon sıcaklıkları EPS üretimini olumlu etkilemektedir (Tallon ve ark., 2002).

Bakteri izolatomuzun farklı büyüme koşullarında EPS üretimi incelenmiştir. Çalışmada 25°C, 30-35°C ve +4°C olmak üzere dört farklı sıcaklık test edilmiştir. En fazla EPS üretiminin +4°C'de 48 saat inkübasyon sonrası olduğu, 20°C ve 30-35°C' de 48 saat inkübasyon sonrası ise zayıf gelişme olduğu görülmüştür.

#### **4.6. Glukoz Derişiminin Hücre Çoğalması ve Ekzopolisakkarit Oluşumuna Etkisi**

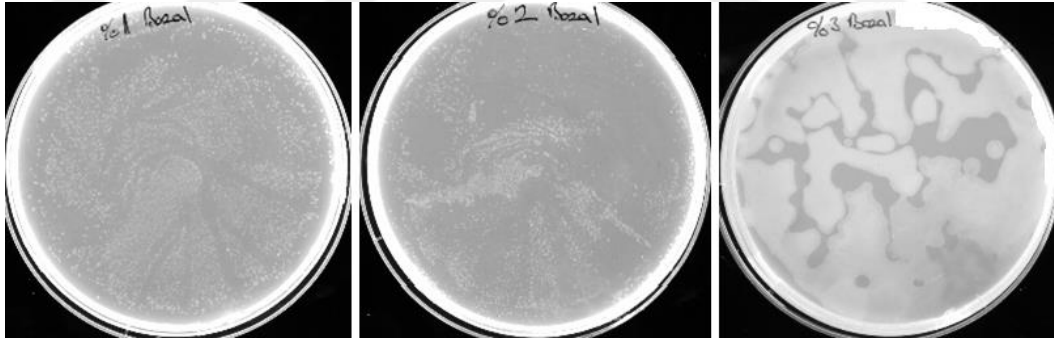
Çelik ve ark. (2007)'nin *Pseudomonas aeruginosa* G1 ve *Pseudomonas putida* G12 bakterileri ile yaptıkları çalışmada farklı karbon kaynaklarının EPS üretimi üzerine etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir. Glukoz, ksiloz, laktoz, galaktoz ve sükrozun karbon kaynağı olarak etkileri incelenmiş ve en yüksek EPS veriminin ksiloz içeren besiyerinde sırasıyla 335 ve 262 mg/L olduğunu bildirmişlerdir (Ergene ve Avcı, 2016).

Kumar (2012)'ın EPS üretimi üzerine yaptığı bir başka çalışmada ise ksilozdan sonra en yüksek verimin fruktozdan elde edildiği belirlenmiştir. Glukoz dahil olmak üzere tüm besin

öğeleri, besiyeri içerisindeki konsantrasyonları arttıkça baskılayıcı etki yapmaktadır. Zengin bir besiyeri oluşturmak amacı ile bütün besin maddelerinin, besin ortamına fazla şekilde eklenmesi uygun bir gelişme sağlamamaktadır (Ergene ve Avcı, 2016).

Glukoz derişimlerinin %1 ile %30 arasında kullanıldığı deneyde glukoz miktarı arttıkça hücre çoğalma hızının ve hücre derişiminin azaldığı görülmüştür. Ancak düşük glukoz derişimlerinde (%1 ve %5) önemli bir fark olmadığı kaydedilmiştir. En yüksek hücre derişimi sırasıyla %1 ve %5 glukoz içeren ortamda 33. saatte bulunmuştur ( Yürüt, 2010).

Mavi-1 kodlu bakterinin farklı miktarlarda glukoz içeren bazal besiyerinde üreme parametrelerinin belirlenmesi ve en çok ekzopolisakkaritin hangi oran kullanıldığında elde edilebileceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Organizmamız Şekil 4.13'de görüldüğü gibi %1, 2, 3, 4 glukoz içeren bazal besiyerinde inkübe edilmiş ve en iyi gelişimin, %3 glukoz içeren besiyerinde olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde ekzopolisakkarit üretiminin %3 glukoz içeren bazal besiyerinde en çok oluştuğu, %4 glukoz içeren bazal besiyerinde ise hiç gelişimin olmadığı görülmüştür.



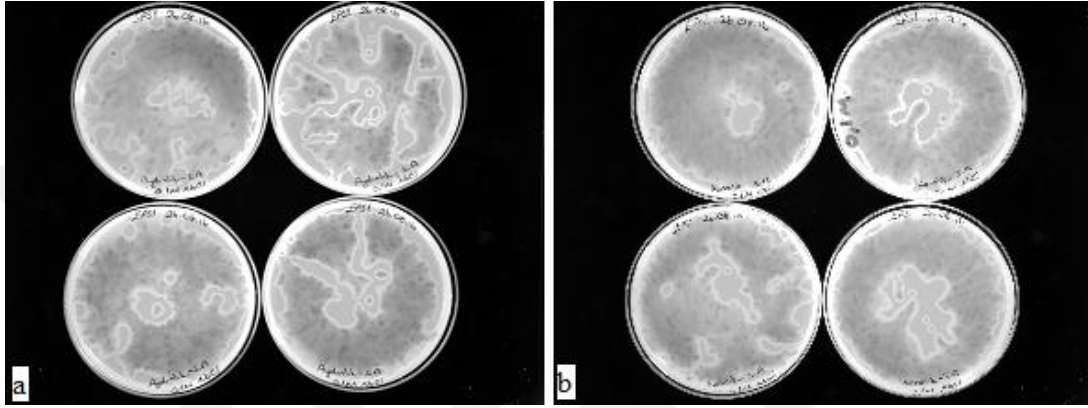
**Şekil 4.13.** Bakteri izolatının farklı oranlarda glukoz içeren bazal besiyerinde gelişimi ve oluşturduğu akışkan yapının görüntüsü

#### **4.7. Tuz Derişiminin Hücre Çoğalmasına ve Ekzopolisakkarit Oluşumuna Etkisi**

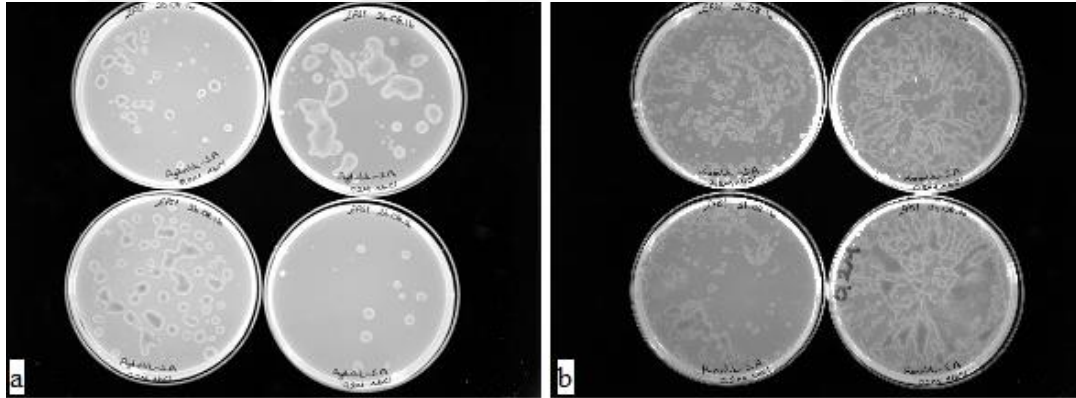
Üç farklı bölgeden alınan su örnekleri ile yapılan çalışmada elde edilen organizmaların EPS üretimine sodyum klorür (NaCl) etkisi incelenmiştir. Besiyeri ortamına farklı tuz konsantrasyonları eklenmiş ve en iyi EPS üretiminin 0,2 M ile 0,4 M NaCl içeren besiyerlerinde olduğu belirtilmiştir (Öztürk ve Aslim, 2010).

Bakteri izolatımız, farklı miktarlarda NaCl içeren, %4 glukoz barındıran saporuant besiyerine üreme parametrelerinin belirlenmesi amacı ile ekilmiştir. Besiyeri içerisine 0,1

M ve 0,2 M NaCl eklenmiş, aydınlık ve karanlık olarak farklı ortamda inkübe edilmiştir. En iyi gelişimin, 0,1 M NaCl içeren karanlık kültürlerde olduğu (Şekil 4.14), ekzopolisakkarit üretiminin, akışkanlığın ve parlaklığın ise daha az olduğu tespit edilmiştir. Sodyum klorürü 0,1 M içeren aydınlık kültürde ise ekzopolisakkarit yapının daha parlak ve akışkan olduğu görülmüştür (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Bakteri izolatının 0,1 M NaCl içeren besiyerinde gelişimi (a-aydınlık, b-karanlık)

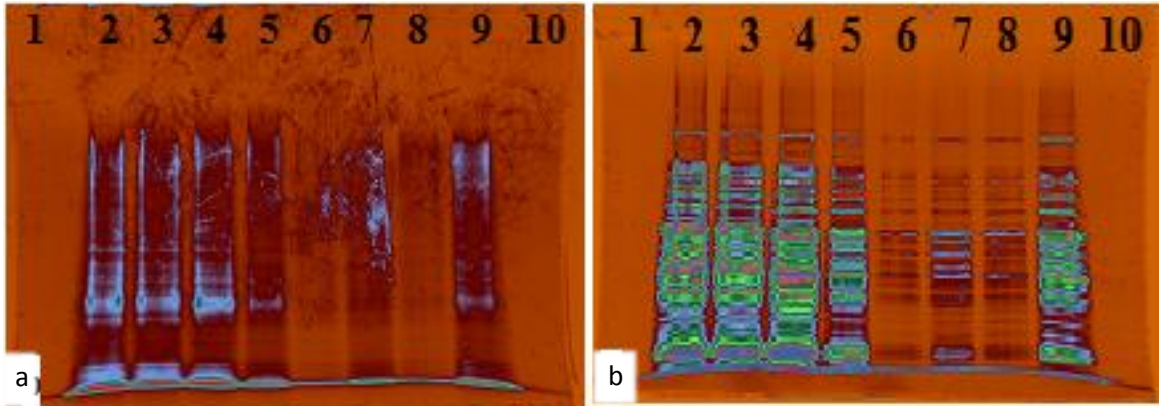


Şekil 4.15. Bakteri izolatının 0,2 M NaCl içeren besiyerinde gelişimi (a-aydınlık, b-karanlık)

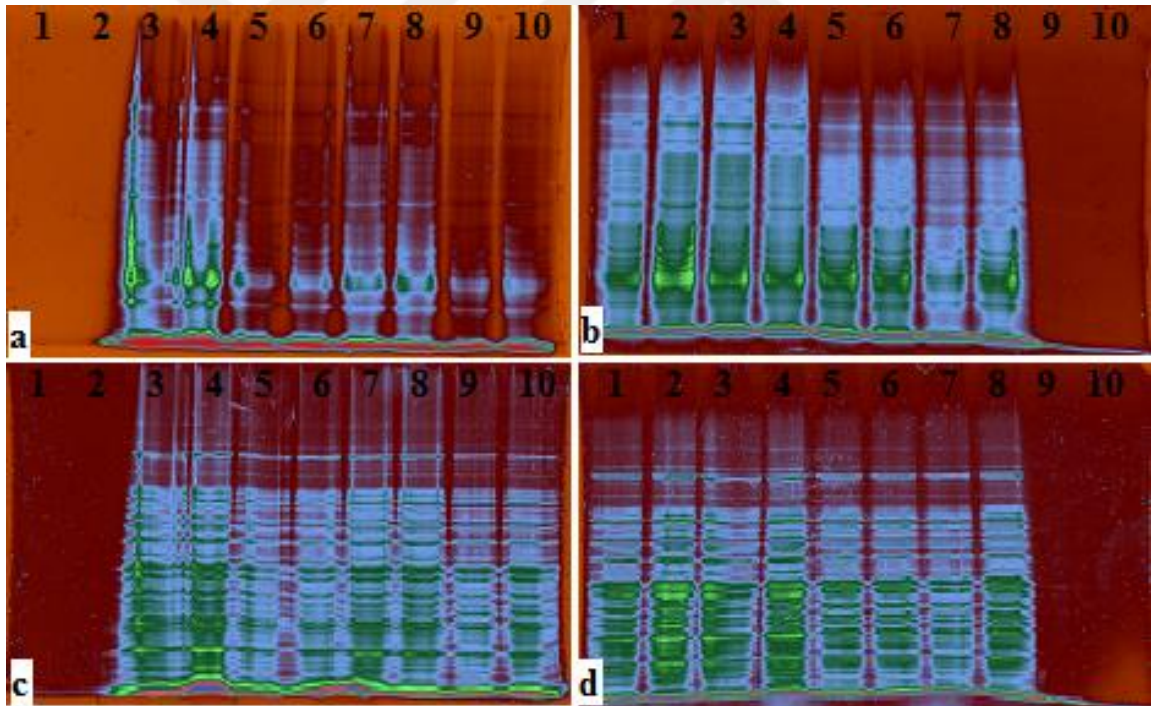
#### 4.8. Fosfoprotein ve Toplam Protein Boyama Sonucu Elde Edilen Jellerin Görüntüleri

Çalışma sonucunda elde edilen proteinlerin fosfoprotein ve toplam protein tayinleri SDS-PAGE metodu kullanılarak ve belirtilen boyama protokolleri uygulanarak tespit edilmiştir. Yükleme yapılan örneklerin konsantrasyonları eşitlenmiş ve aynı miktarda yüklenmiştir. Aşağıda şekillerde tespitleri yapılan jellere örnek sonuçlar verilmiştir. 3W, 5W ve 10W sıcak beyaz LED ışığında elde edilen protein örneklerinin sonuçları Şekil 4.16'da, 3W, 5W sıcak beyaz, 2W mavi ve kırmızı LED ışığından elde edilen protein örneklerinin sonuçları ise 4.17'de gösterilmiştir.





**Şekil 4.16.** Fosfoprotein ve toplam protein boyama görüntüleri. (a) fosfoprotein boyama, (b) toplam protein boyama. Fosfoprotein boyama ve toplam protein boyama için iki farklı jel yürütülmüştür. Jel üzerinde kuyucuklar rakamlarla ifade edilmiştir. Protein örnekleri 2.'den itibaren 3W Aydınlik, 3W Karanlık 5W Aydınlik, 5W Karanlık, 10W Aydınlik, 10W Karanlık, 10W Aydınlik ve 10W Karanlık sıcak beyaz ışık şeklinde yüklenmiştir.



**Şekil 4.17.** Fosfoprotein ve toplam protein boyama görüntüleri. (a) ve (b) fosfoprotein boyama, (c) ve (d) toplam protein boyama sonucunu göstermektedir. Jeller önce fosfoprotein boyanmış daha sonra aynı jellere toplam protein boyama yapılmıştır. Jel üzerinde kuyucuklar rakamlarla ifade edilmiştir. (a) jelinde 3.'den itibaren 3W Aydınlik, 3W Aydınlik, 3W Karanlık, 3W Karanlık, 5W Aydınlik, 5W Aydınlik, 5W Karanlık ve 5W Karanlık sıcak beyaz ışık şeklinde yüklenmiştir. (b) jelinde 1.'den itibaren 2W Aydınlik, 2W Aydınlik, 2W Karanlık, 2W Karanlık Mavi ışık, 2W Aydınlik, 2W Aydınlik, 2W Karanlık ve 2W Karanlık Kırmızı ışık şeklinde yüklenmiştir.

Yukarıda Şekil 4.16 'da 3W LED deneyi sonucunda aydınlık ve karanlık protein profillerinin hem fosfoprotein boyama (a) hem de toplam protein boyama (b) sonrası benzer olduğu gözlemlenmiştir. 5W LED ışığı ile yapılan test sonucunda ise ışığa maruz bırakılmış örnekler için düşük moleküler ağırlığa sahip proteinlerde yoğunluk gözlemlenmiştir. Buna karşılık 10W ile yapılan testlerde karanlıkta çoğaltılan mikroorganizmalarda aynı bölgedeki (düşük moleküler ağırlığa sahip) protein yoğunluğu ışığa maruz bırakılanlara göre daha fazladır. Jel üzerinde 6. ve 8. ile 7. ve 9. kuyucuklara uygulanan örnekler aynı örnekler olmasına rağmen 6. ve 7. kuyucuklara yüklenen protein konsantrasyonlarının düşük olduğu görülmektedir.

3W ve 5W LED deneyleri sonucunda Şekil 4.17'de aydınlık ve karanlık protein profillerinin hem fosfoprotein (a) hem de toplam protein boyama (b) sonrası farklı oldukları belirlenmiştir. 3W LED ışığı ile yapılan test sonucunda ışığa maruz bırakılmış örnekler için düşük moleküler ağırlığa sahip proteinlerde yoğunluk gözlemlenmiştir. 5W LED ışığı deneylerinde de benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. 2W mavi ve kırmızı LED deneyleri sonucunda ise aydınlık ve karanlık sonuçları benzer bulunmuştur.

Çalışma sonucunda, karanlık ortamda gelişime bırakılan mikroorganizmaların, 5W, 10W sıcak ve soğuk beyaz LED ışık ortamında gelişime bırakılan mikroorganizmalardan daha kısa inkübasyon sürecinde daha büyük koloniler oluşturdukları gözlemlenmiştir. Beş günün sonunda, sadece ışıksız ortamda çoğaltılan mikroorganizmalar agar besiyerinin tüm yüzeyini kaplamıştır. Yeşil, mavi ve kırmızı ışık altında gelişime bırakılan mikroorganizmaların aydınlık ve karanlık kültürleri arasında agar besiyeri üzerinde fark oluşmadığı kaydedilmiştir. Sıcak beyaz, mavi ve kırmızı LED ışık çalışmalarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonucu uygun boyamaları yapıldıktan sonra yapılan analizleri doğrultusunda karanlık kültürleri arasında farklılıkların olduğu gösterilmiştir. Bu arada, iki koşula ait protein konsantrasyonları ve SDS-PAGE profilleri farklılık göstermiştir.

## SONUÇ

LED sistemlerinin kullanım ömürlerinin uzunluğu, kurulacak sistemlere uygunluğu ve elektrik sarfiyatı bakımından uygun olması ile birçok alanda kullanımları faydalı olmaktadır. Yapılan birçok denemede LED ışıkları olumlu yönde etki göstermiştir. Biyolojik bilimlerde gıda, sağlık ve özellikle bitki gelişimlerinde uygunlukları test edilmiş ve pozitif etkisi kaydedilmiştir. Bunun yanında mikroorganizmalar üzerine olan etkileri genel olarak dışçilikte mavi LED ışığının inaktive edici özelliği üzerine odaklanmıştır. Bu çalışmalara ek olarak bitkilerde elde edilen verimin, bakterilerin ürettikleri birçok ürün içinde uygulanabileceği çalışmalar yapılarak ortaya konulmalıdır. Geniş renk seçeneklerinden dolayı LED ışıkları ile yapılan çalışmaların artırılması birçok alanda kolaylık sağlayacaktır. Çünkü ışığın canlılar üzerindeki etkisi birçok kez çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bu çalışma sonucunda uygun LED kaynağı kullanılarak mikroorganizmaların çoğalma ve protein profillerinin değiştiği gözlemlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Anderson, N. L., Matheson, A. D. ve Steiner, S., 2000. Proteomics: Applications in Basic and Applied Biology. *Curr. Opin Biotechnol.* 11, 408-412.
- Arabatzis, M. ve Velegraki, A., 2013. Sexual Reproduction in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus terreus*. *Mycologia*, 105 (1), 71-79.
- Araujo, P.V., Correia-Silva, J.F., Gomez, R.S., Massarac, M.L.A., Cortesa, M.E. ve Poletto, L.T.A., 2015. Antimicrobial Effect of Photodynamic Therapy in Carious Lesions in vivo, Using Culture and Real-Time PCR Methods. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12, 401-407.
- Ası, T., 1995. Tablolarla Biyokimya Cilt 1. *İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi*, 268 s, İstanbul.
- Balajee, S.A., 2009. *Aspergillus terreus* Complex, *Medical Mycology*, 47 (1), 42-46.
- Benlioğlu, K. ve Özyılmaz, Ü., 2017. Mikrobiyoloji. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü*.
- Barker, S., Griffiths, C. ve Nicklin, J., 2013. *Mikrobiyoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık TİC. LTD. ŞTİ., 351, Ankara.
- Bor, M. ve Özdemir, F., 2005. Proteom ve Proteom Analizleri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6 (2), 127-135.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
- Bunney, W.E. ve Bunney, B.G., 2000. Molecular Clock Genes in Man and Lower Animals: Possible Implications For Circadian Abnormalities In Depression. *Neuropsychopharmacology*, 22(4), 335-45.
- Çelik, G.Y., Aslım, B. ve Beyatlı, Y., 2007. Characterization and Production of the Exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas Aeruginosa* G1 and *Pseudomonas Putida* G12 Strains. *Carbohydrate Polymers*, 73 (31), 178-182.
- Dai, T., Gupta, A., Murray, C.K., Vrahas, M.S., Tegos, G.P. ve Hamblin, M.R., 2012. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resistance Updates*, 15, 223- 236.
- Duboc, P. ve Mollet, B., 2001. Applications of Exopolysaccharides in the Dairy Industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.

- Dutt, M. J. ve Lee, K. H., 2000. Proteomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 176-179.
- Ekici Kılıç, Ö., 2011. Mikroorganizmaların Çevreye Hizmeti. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*, 75-77.
- Eldebiran, A., Toros, H. ve Şen, O., 2003. Biyolojik Ritim. *III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu*, İstanbul.
- Engelkirk, P.G. ve Engelkirk, J.D., 2017. *Burton Sağlık Bilimlerinde Mikrobiyoloji*. İstanbul Medikal Yayıncılık, 482, İstanbul.
- Ergene, C., 2014. Mikroorganizmaların Yapışmasını Önleyici İnorganik ve Organik Akıllı Yüzeylerin Geliştirilmesi ve İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Atılım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Ergene, E. ve Avcı, A., 2016. Mikrobiyel Ekzopolisakaritler. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20 (2), 193-202.
- Evcin, A., 2006. Gıda Mühendisliği Kimya 1 Ders Notları. s. 1-4.
- Fischer, E.H. ve Krebs, E.G., 1995. Conversion of Phosphorylase B to Phosphorylase A in Muscle Extracts. *Journal of Biological Chemistry*, 216, 121-132.
- Ghate, S.V., Leong, A.L., Kumar, A., Bang, W.S., Zhou, W. ve Yuk, H., 2015. Enhancing the Antibacterial Effect of 461 and 521 nm Light Emitting Diodes on Selected Foodborne Pathogens in Trypticase Soy Broth by Acidic and Alkaline pH Conditions. *Food Microbiology*, 48, 49-57.
- Ghate, S.V., Ng, K.S., Zhou, W., Yang, H., Khoo, G.H., Yoon, W. ve Yuk, H., 2013. Antibacterial Effect of Light Emitting Diodes of Visible Wavelengths on Selected Foodborne Pathogens at Different illumination Temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 399-406.
- Güven, K., Kıvanç, M., Mutlu, M.B., Sarıözlü, N., Demirel, R. ve Yılmaz, M., 2011. Genel Mikrobiyoloji. *Anadolu Üniversitesi, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını*, No: 1961, 261 s, Eskişehir.
- Güven, S. ve Demirel Zorba, N.N., 2015. Mikrobiyal Gelişmenin Kontrolü. *Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu*, Editörler: Karataş, M., ve Boğaz, K. Nobel, s. 73-74.
- Gygi, S. P., Rist, B. ve Aebersold, R., 2000. Measuring Gene Expression by Quantitative Proteome Analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 396-401.
- Halil, E. ve Kalkancı, A., 2008. Termofilik Mantarlar. *Turkish Journal of Infection*, 22 (2), 117-122.

- Hamamoto, A., Mori, M., Takahashi, A., Nakano, M., Wakikawa, N., Akutagawa, M., Ikehara, T., Nakaya, Y. Ve Kinouchi, Y., 2007. New water disinfection system using UVA light emitting diodes. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6), 2291–2298.
- Haseltine, W. A., 1997. Discovering Genes for New Medicines. *Sci. Am.* 276 (3), 92-97.
- Karagüler, N.G. ve Kök, F.N., 2014. Proteinlerin Yapısı ve İşlevleri. *Moleküler Biyoloji*, Editör: Karataş, M. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık TİC. LTD. ŞTİ., Ankara, 345-365.
- Kaynar, G., 2013. Fosfopeptitlerin Çözünmeyen Geçiş Metal Oksitleri Üzerinde Seçimli Zenginleştirilmesi ve Maldi-MS ile Doğrudan Tayinleri. *Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Kelleher, F.C., Rao, A. ve Maguire, A., 2013. Circadian Molecular Clocks And Cancer. *Cancer Letters*, 342, 9-18.
- Kim, M.J., Bang, W.S. ve Yuk, H.G., 2017. 405 ± 5 nm Light Emitting Diode Illumination Causes Photodynamic Inactivation of Salmonella spp. on Fresh-cut Papaya Without Deterioration. *Food Microbiology*, 62, 124-132.
- Kocabaş, A. ve Ulaşlı, M., 2014. Bakteri Genetiği. *Moleküler Biyoloji*, Editör: Karataş, M. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık TİC. LTD. ŞTİ., Ankara, 173-183.
- Kumar, T., 2012. Microbial Extracellular Polymeric Substances Production, Isolation and Applications. *IOSR Journal Pharmacol*, 2 (2), 276-281.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Luksiene, Z., 2009. Photosensitization for food safety. *Chemine Technologija* 4 (53), 62–65.
- Macleane, M., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Woolsey, G., Coia, J.E., Hamilton, K., Taggart, I., Watson, S.B., Thakker, B. ve Gettinby, G., 2010. Environmental decontamination of a hospital isolation room using high-intensity narrow-spectrum light. *The Journal of hospital infection*, 76 (3), 247–251.
- Macleane, M., McKenzie, K., Anderson, J.G., Gettinby, G. ve MacGregor, S.J., 2014. 405 nm Light Technology for the Inactivation of Pathogens and its Potential role for Environmental Disinfection and Infection Control. *Journal of Hospital Infection*, 88, 1-11.
- Madigan, M.T. ve Martinko, J.M., 2010. Mikrobiyolojiye Giriş. *Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Editörler: Çökmüş, C. Palme, s. 3-9.

- Mori, M., Hamamoto, A., Takahashi, A., Nakano, M., Wakikawa, N., Tachibana, S., Ikehara, T., Nakaya, Y., Akutagawa, M. ve Kinouchi, Y., 2007. Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED. *Medical & biological engineering & computing*, 45 (12), 1237–1241.
- Okur, N., 2012. Toprak Mikrobiyolojisinin Türkiye’deki Dünü, Bugünü ve Yarını. *Toprak Bilimi ve Bitki Beslenme Dergisi*, 1(1), 9-12.
- Oruç, A.Ç., 2011. Farklı Renkteki Led Işık Kaynaklarının *Chlorella Sp.*’ nin Büyümesi ve Yağ Asitleri Kompozisyonuna Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.
- Öner, M., 2008. Doğadaki Mikroorganizmaların Çoğalma ve Dağılımlarını Denetleyen Etkenler. *Mikrobiyal Ekoloji. Ege Üniversitesi*, s. 25-27.
- Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A. ve Gülsün, M., 2013. Melatonin: Genel Özellikleri ve Psikiyatrik Bozukluklardaki Rolü. *Current Approaches in Psychiatry*, 5(2), 179-203.
- Öztürk, S. ve Aslim, B., 2010. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environmental microbiology*, 17, 595-602.
- Pamir, H., 1985. Fermantasyon Mikrobiyolojisi. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, No:936, 267 s, Ankara.
- Pandey, A. ve Mann, M., 2000. Proteomics to Study Genes and Genomes. *Nature*, 405, 837-846.
- Prescott, L. M., John P. Harley, J. P. ve Klein, D. A., 2006. *Microbiology*. Mc Graw Hill Companies, 450, Boston.
- Redman, R.S., Litvintseva, A., Sheehan, K.B., Henson, J.M. ve Rodringuez, R.J., 1999. Fungi from Geothermal Soils in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol*, 65 (12), 5193-5197.
- Robinson, I. ve Reddy, A.B., 2014. Molecular Mechanisms of the Circadian Clockwork in Mammals. *FEBS Letters*, 588, 2477–2483.
- Rosa, L.P., Silva, F.C., Viana, M.S. ve Meira, G.A., 2016. In vitro Effectiveness of 455-nm Blue LED to Reduce the Load of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Biofilms in Compact Bone Tissue. *Lasers Med Sci*, 31, 27-32.
- Soriano, M.I., Roibás, B., García, A.B. ve Urgel, M.E., 2010. Evidence Of Circadian Rhythms In Nonphotosynthetic Bacteria. *Journal of Circadian Rhythms*, 8, 8.
- Şenel, F., 2008. Biyolojik Saat. *Bilim ve teknik dergisi*, 58-67.

- Tallon, R., Bressollier, P. ve Urdaci, M.C., 2003. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154, 705-712.
- Teke, A., Haddur, Ö., ve Mutlu, H.İ., 2011. LED teknolojileri, Bölüm 1: Çeşitleri ve Sürücü Devreleri. *Yeni Enerji, Yenilenebilir Enerji Teknolojileri Dergisi*, 24, 48-54.
- Ünal, M., 2012. *Hücre Biyolojisi*. Marmara Üniversitesi Yayınevi, 333, İstanbul.
- Üzümcü, Z., 2009. Pseudomonas sp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- van Heerden, I., Cronje, C., Swart, S.H. ve Kotze, J.M., 2002. Microbial, Chemical and Physical Aspects of Citrus Waste Composting. *Bioresource Technology*, 81, 71-76.
- Wright, C., Kafkewitz, D. ve Somberg, E.W., 1983. Eucaryote Thermophily: Role of Lipids in the Growth of *Talaromyces thermophilus*. *Journal Of Bacteriology*, 156 (2), 493-497.
- Wu, M.C., Hou, C.Y., Jiang, C.M., Wang, Y.T., Wang, C.Y., Chen, H.H. ve Chang, H.M., 2007. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chemistry*, 101, 1753-1758.
- Yılmaz, M. ve Çelik, G.Y., 2007. Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5 (2), 7-13.
- Yürüt, D.D., 2010. Farklı Stres Koşullarında *Debaryomyces Hansenii*'den Hücre Dışı Protein Üretiminin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara.



## EKLER

### EK 1

**Çizelge 1.1.** Araştırmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler ve özellikleri

<b>Kimyasal</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog No</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck	A0383277-304
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	Merck	AM0520186-420
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich	7772-98-7
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	Merck	M101187-1000
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Sigma-Aldrich	7758-11-4
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich	7761-88-8
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich	584-08-7
<b>NaCl</b>	Merck	7647-14-5
<b>Akrilamid</b>	Merck	M800830-1000
<b>Amonyum persülfat</b>	Merck	M101200-5000
<b>Trisma Base</b>	Sigma-Aldrich	77-86-1
<b>TEMED</b>	Merck	M1107320-100
<b>SDS</b>	Sigma-Aldrich	151-21-3
<b>TCA</b>	Merck	M100807-1000
<b>Metanol</b>	Merck	M106009-2500
<b>Etanol</b>	Merck	M100983-2500
<b>Sülfirik asit</b>	Merck	M100748-2500
<b>Asetik asit</b>	Merck	M100058-2500
<b>Glisin</b>	Sigma-Aldrich	56-40-6
<b>Bromofenol blue</b>	Sigma-Aldrich	115-39-9
<b>%37' lik formaldehit</b>	Sigma-Aldrich	50-00-0
<b>Fenol</b>	Sigma-Aldrich	108-95-2
<b>Gliserol</b>	Sigma-Aldrich	56-81-5
<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich	9048-46-8

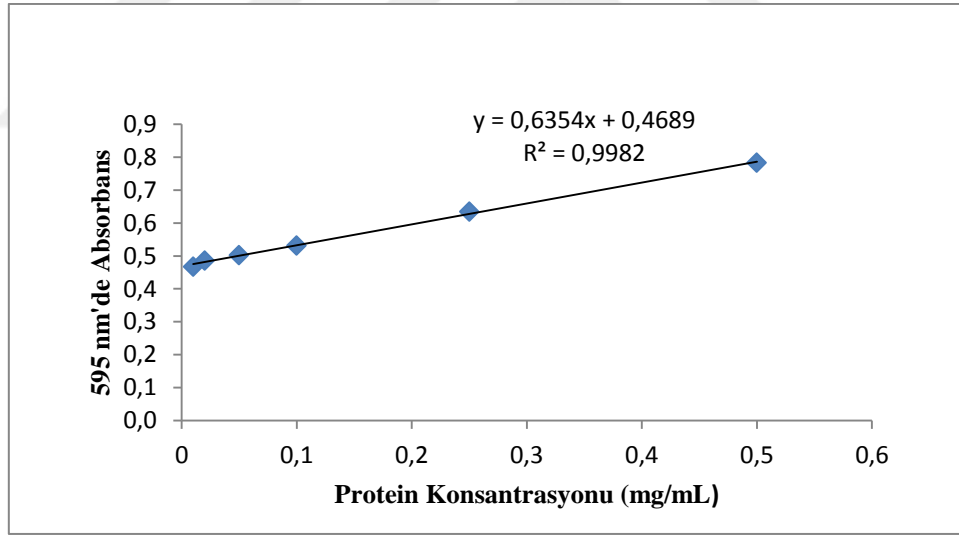
**EK 1 (Devam)**

<b>Yeast Ekstract</b>	Merck	VM221853-042
<b>Nutrient Broth</b>	Merck	105443
<b>Sabouraud – %4 Dextrose</b>	Merck	VM734338-618
<b>Agar-agar</b>	Merck	VM697014-522
<b>Glucose (D+)</b>	Merck	K46890337-541
<b>Peptone from casein</b>	Sigma-Aldrich	101297770
<b>Starch</b>	Sigma-Aldrich	1001630181
<b>Kovac's Indole Reagent</b>	Merck	HX390095
<b>Coomassie brillant blue G-250</b>	Merck	M115444-0025
<b>Cristal violett</b>	Merck	FN1198740-342
<b>Safranin</b>	Norateks Kimya	117020191602
<b>Malasit Yeşili</b>	Norateks Kimya	-
<b>eLuminol™ Protein Gel Stain</b>	GeneCopoeia	A300LY180
<b>Phos-Tag™ Phosphoprotein Gel Stain</b>	GeneCopoeia	A300LY144
<b>Phos-Tag™ Phosphoprotein Destain Solution</b>	GeneCopoeia	P2K1605B

## EK 2

### Protein Standart Grafiğinin Elde Edilmesi

Standart protein olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA'nın 1 mg/mL'lık standart çözeltisi hazırlanmış ve standart çözeltiler bu stoktan 0,01-0,5 mg/mL olacak şekilde, saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 0,05 mL eklenmiş, köre ise 0,05 mL sodyum fosfat tamponu koyulmuştur. Bütün tüplere 1.5 mL hazırlanan bradfort çözeltisinden eklenmiş, karıştırılmış ve 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okunmuş ve protein standart grafiği, konsantrasyona karşı absorbens grafiği çizilmiştir. Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu, bu standart grafiğın analizi sonucu elde edilen denklemin formülünden hesaplanmıştır (Şekil 2.1).

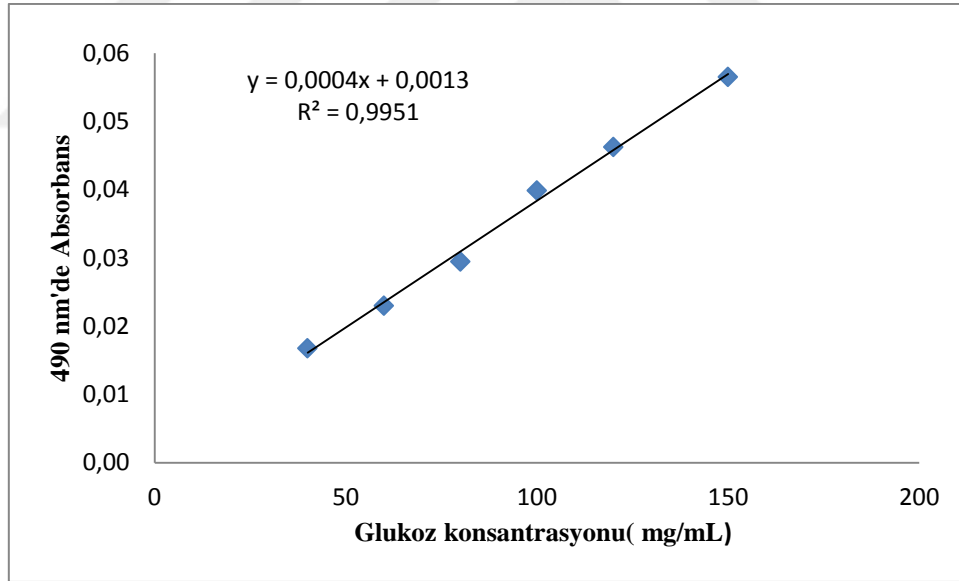


Şekil 2.1. Protein tayini için standart BSA grafiği

### EK 3

#### Glukoz Standart Grafiğinin Elde Edilmesi

Standart karbonhidrat olarak glukoz kullanılmıştır. Glukoz'un 1 mg/mL'lık standart çözeltisi hazırlanmış ve standart çözeltiler bu stoktan 0-150 µg/mL olacak şekilde, saf su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100 µL eklenmiş, köre ise 100 µL sodyum fosfat tamponu koyulmuştur. Daha sonra bütün tüplere %80'lik fenol eklenmiştir. En son bütün tüplere 2 mL sülfirik asit eklenmiş, karıştırılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Standartlar 490 nm dalga boyunda köre karşı okunmuş ve karbonhidrat standart grafiği, konsantrasyona karşı absorbens grafiği çizilmiştir. Bilinmeyen örneğin karbonhidrat konsantrasyonu, standart grafiğinin analizi sonucu elde edilen denklemin formülünden hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Karbonhidrat tayini için standart glukoz grafiği

## EK 4

### SDS-PAGE İçin Kullanılan Reaktifler ve Jellerin Hazırlanması (Laemmli, 1970)

#### Stok özeltiler

A. Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C)

B. 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

C. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

D. %10 SDS

E. Örnek tamponu

Saf su	4,0 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL
Gliserol	2,5 mL
%10 SDS (a/h)	2,0 mL
%0,05 (a/h) bromfenol mavisi	0,2 mL

Örnek tamponu örnek ile karıştırılmadan önce 2-β-merkaptoetanol ile %5 (h/h) oranında karıştırılmıştır. Örnek, örnek tamponu ile en az 1:2 oranında karıştırılıp 5 dakika boyunca 95°C’de kaynatılmıştır.

F. 5X elektrot (yürütücü) Tampon, pH 8,3

Tris baz 9,0 g

Glisin 42,3 g

SDS 3,0 g

G. %10 Amonyum Persülfat (APS)

## EK 4 (Devam)

### SDS Jel Çözeltilerinin Hazırlanması

#### A. Alt (Separating) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, %2,67 C)	%12
Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C stok)	4,0 mL
Saf su	3,35 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,6	-
%10 SDS	100 µL
%10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED ( <i>N,N</i> - tetrametilen etilendiamin)	5 µL

#### B. Üst (Stacking) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, %2,67 C)	%7
Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C stok)	2,3 mL
Saf su	5,1 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,6	2,5 mL
%10 SDS	100 µL
%10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED ( <i>N,N</i> - tetrametilen etilendiamin)	10 µL

Mini-protean Tetra Cell (Biorad, Almanya) elektroforez düzeneğine ait cam plakalar ve aparatlar kullanılarak jel dökme düzeneği oluşturulmuştur. Önce alt jel çözeltisi dökülmüş, jel donduktan sonra üstüne üst jel çözeltisi dökülmüştür. Protein yükleme boşluklarının oluşmasını sağlayan tarak üst jel üzerine geçirilerek, jeller donmaya bırakılmıştır. Jeller donduktan sonra örnek tamponuyla karıştırılan proteinler jellere yüklenmiş ve elektroforez işlemi başlatılmıştır.

## EK 5

### Boyama Çözeltileri

#### Commassie Boyama Yöntemi

##### Boya çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (G 250)	%0,1 (a/h)
Metanol	%50 (h/h)
Asetik asit	%12 (h/h)

##### Yıkama çözeltisi

Metanol	% 30 (h/h)
Asetik asit	%7 (h/h)

SDS-PAGE yöntemiyle protein yürümesi tamamlanan jeller Meyer ve Lamberts'in (1965) yöntemine göre Commassie boyama yöntemiyle boyanmıştır. Jeller boya çözeltisi içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında yıkama çözeltisi kullanılarak proteinlerin belirginleşmesi sağlanmıştır. Jeller, yıkama çözeltisi içerisinde bekletilmiş, saat başı yıkama çözeltisi yenilenecek yıkama gerçekleştirilmiştir.

## EK 5 (Devam)

### Toplam Protein ve Fosfoprotein Boyama

Çizelge 5.1. Fosfoproteinlerin tespiti için boyama protokolü

	<b>Reaktif</b>	<b>Protokol</b>
<b>Düzeltilme (Fikse etme)</b>	50 mL metanol 10 mL asetik asit 40 mL saf su	100 mL, 30 min
		100 mL, 30 min
<b>Yıkama</b>	Ultra saf su	100 mL, 10 min
		100 mL, 10 min
		100 mL, 10 min
<b>Boyama</b>	Phos-Tag™ Phosphoprotein Jel Stain (P005A)	40-60 mL
		60-90 minutes
<b>Boya giderme</b>	Phos-Tag™ Phosphoprotein Destain Solution (P005B)	60 mL, 30 min
		60 mL, 30min
		60 mL, 30 min
<b>Yıkama</b>	Ultra saf su	100 mL, 5 min
		100 mL, 5 min

Çizelge 5.2. Toplam proteinlerin tespiti için boyama protokolü

	<b>Reaktif</b>	<b>Protokol</b>
<b>Boya çözeltisi</b>	1 mL 1000xLuminol boya 600 mL saf su 300 mL metanol 100 mL asetik asit	4 °C'de plastik şişede ışıktan korunmuş şekilde saklanır.
<b>Boyama</b>	1x eLuminol™ boya çözeltisi	90 min 50 ~ 80 mL
<b>Yıkama</b>	10 mL metanol 7 mL asetik asit 83 mL saf su	20 min



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Serap Gönek  
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.09.1987/ Mersin  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : (531) 362 98 01  
e-mail : s.gonek@outlook.com

### Eğitim

Derece	Eğitim birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Mersin Tevfik Sırrı Gür Lisesi	2005

### Proje ve Kongreler

TÜBİTAK 2209/A Üniversite Öğrencileri Yurtiçi Araştırma Projeleri Destekleme Programları, 2013-2014. *Topraktan İnülinaz Pozitif Mikroorganizmaların İzolasyonu*, Araştırmacı Öğrenci.

Gönek, S., 2018. Farklı Led (Işık Yayan Diyot) Kaynaklarının Bazı Mikroorganizmaların Toplam Protein ve Fosfoprotein Profilleri Üzerine Etkisinin Protein Elektroferez Yöntemi ile Belirlenmesi. *Yüksek lisans tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.

İç Anadolu Bölgesi 1.Tarım ve Gıda Kongresi 2-4 Ekim 2013, Niğde. *Topraktan Ksilanaz Pozitif Mikroorganizmaların İzolasyonu*-Poster

4th International Symposium on Development of Kop Region, October 21-23, 2016 Karaman. *Ekzopolisakkarit Üretimi Gerçekleştirebilen Mikroorganizma İzolasyonu ve Glikozun Üretime Etkisi*-Poster

International Conference on Biological Sciences, October 21-23, Konya-ICBS-2016. *Effects of Light on Growth of Some Microorganisms*-Poster

### Yayımlar

Kocabaş, A., Gümüştaş, N. ve Gönek, S., 2017. Topraktan Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Taranması ve Ksilanazın Kısmi Karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2), 503-508.