

**FARKLI DALGA BOYLU IŞINLARIN
ETKİSİNDE FOTOSENSİTİZASYONUN
KARADENİZ SUYUNDA
E.coli ve *S.typhimurium*'UN YAŞAMINA VE
OKSİDATİF ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
ÖNDER İDİL
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI DALGA BOYLU IŞINLARIN ETKİSİNDE FOTOSENSİTİZASYONUN
KARADENİZ SUYUNDA *E.coli* ve *S.typhimurium*'UN YAŞAMINA VE
OKSİDATİF ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖNDER İDİL

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. REŞİT ÖZKANCA**

SAMSUN 2006

FARKLI DALGA BOYLU IŞINLARIN ETKİSİNDE FOTOSENSİTİZASYONUN KARA DENİZ SUYUNDA *E.coli* ve *S.typhimurium*'UN YAŞAMINA VE OKSİDATİF ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada, farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında bir fotosensitizerin varlığında veya yokluğunda *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerinin yaşamında, oksidatif stres enzimlerinde ve lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişim araştırılmıştır. Beyaz, mavi, yeşil, kırmızı ve UV-A'nın ışık kaynakları altında yapılan çalışmada, bakterilerin en fazla UV-A'dan etkilendiği görüldü. Bunun yanında görünür dalga boyu ışık kaynakları arasında, metilen mavisinin bulunduğu veya bulunmadığı ortamda ise bakteri yaşamında en fazla kırmızı ışığın etkili olduğu bulunmuştur.

Deniz suyuna metilen mavisi ilavesinin, doğal deniz suyu ile karşılaştırıldığında bakterilerin sayısında daha fazla azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Aynı şartlar altında, bakterilerin koloni sayılarında oldukça önemli azalmalar görülürken, solonum yapan bakteri sayısının koloni sayısından daha yüksek olduğu belirlendi. Sonuç olarak bakterilerin bütün ışık kaynaklarının etkisi altında dormanta girdiği yapılan sayımlarla belirlenmiştir. Üstelik bu çalışma, aynı çevresel şartlar altında *S.typhimurium*'un *E.coli*'den daha uzun süre yaşamına devam ettiğini göstermiştir. Bu ilginç bir bulgudur, çünkü *Escherichia coli* *Salmonella typhimurium* gibi patojen bakteriler içinde indikatör olarak kabul edilmektedir. Fakat burada bulunan sonuçlar bu yaklaşımı desteklememektedir.

Bu çalışmalara ilave olarak, katalaz, süperoksit dismutaz, glutathion peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz gibi oksidatif stres enzimlerinde meydana gelen değişimlerde araştırılmıştır. Bütün sonuçlar, enzim aktivitelerinin ilk 1-2 saat içinde artış gösterdiğini fakat daha uzun zaman periyodu esnasında önemli azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Metilen mavisinin bulunduğu ortamda beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saatte, kırmızı ışığın etkisi altında 16 saatte ve UV-A'nın etkisi altında ise 10 saatte enzim aktivitelerinde önemli azalmalar olduğu görülmüştür. Diğer taraftan

metilen mavisinin bulunmadığı ortamda ise bakterilerin beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saatte, kırmızı ışık kaynağının etkisi altında 24 ve UV-A'nın etkisi altında ise 15 saatte enzim aktivitelerinde birbirine yakın azalmalar olduğu belirlenmiştir. Burada enzim aktivitesinde meydana gelen azalmanın, metilen mavisinin bulunduğu ortamda ışığın etkisiyle daha fazla miktarda toksik serbest radikalın ortaya çıkmasına bağlı olduğu görülmektedir.

Oksidasyon esnasında bakterilerde meydana gelen en önemli etkilerden biri de lipid peroksidasyonudur. Metilen mavisinin bulunduğu ortamda beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında bakterilerin her ikisinde de 24 saatte lipid peroksidasyonunda önemli artışlar olduğu, bunun yanında kırmızı ışığın etkisi altına 12 ve 16 saatte ve UV-A'nın etkisi altında 6 saatte lipid peroksidasyon miktarında önemli artışlar olduğu görülmüştür. Diğer taraftan metilen mavisinin bulunmadığı ortamda lipid peroksidasyon seviyesinin metilen mavisi ilave edilenden daha az olduğu bulunmuştur.

Bakteriler 5, 10, 20 ve 30 gün açlıkla ön muameleye bırakılmıştır. Daha sonra ise oksidatif stres üzerine ön muamelenin etkisi araştırılmıştır. Farklı ışık kaynaklarının etkisi altında her iki bakteri örneğinin 10, 20 ve 30 gün açlıkla ön muamele edildikten sonra oksidatif strese daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Deniz suyu, Oksidatif stres, Açlık stresi, Katalaz, Süperoksit dismutaz, Glutation peroksidaz, Glukoz-6-P-dehidrogenaz, Metilen mavisi, Dormansi

**THE EFFECT OF PHOTSENSITIZATION ON SURVIVAL AND OXIDATIVE
ENZYME ACTIVITY OF *Escherichia coli* AND *Salmonella typhimurium* UNDER
DIFFERENT WAVELENGTH LIGHT SOURCES IN SEAWATER**

ABSTRACT

In this study, an alteration of survival, oxidative enzymes activity and lipid peroxidation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* under the effect of different wavelength were investigated with the presence and absence of photosensitizer. Among the light sources such as white, blue, green, red and UV-A, UV-A was the most efficient light. Moreover, among the visible lights, red light was found as the most effective on bacterial survival with the presence and absence of methylene blue. The addition of methylene blue to the sea water led to more reduction in number of bacteria compare to natural sea water. Under the same conditions, although number of colony forming unit was declined, the number of respiring cell was found higher than colony count. These results mean that, all tested light sources resulted in some bacteria entering dormant state.

Moreover, this study showed that *Salmonella typhimurium* survived longer than *Escherichia coli* under the same environmental conditions. This is an interesting finding, because *Escherichia coli* is accepted as indicator for pathogene bacteria such as *Salmonella typhimurium*. However, the present results did not support this approach.

In addition, activities of oxidative stress enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxide and glukoze-6-P-dehydrogenase were explored. It was detected that the activities of tested enzymes were increased in first 2 hours but reduced in a longer period of time. This reduction in enzyme activities with the presence of methylene blue occurred in 32 hours for white, blue and green light, 16 hours for red light and 10 hours for UV-A. On the other hand, with the absence of methylene blue, the enzyme activities were detected as 72 hours for white, blue and green, 24 hours for red light, 15 hours for UV-A. It could be the main reason that the reduction in enzyme activities

depended on higher oxidative reactions in methylene blue samples because more toxic free radicals occur under the light effect.

The other important oxidation seen in bacteria is lipid peroxidation with the presence and absence of methylene blue. The lipid peroxidation for each bacteria was found to increase in higher level under the white, green and blue light in 24 hours, 12-16 hours for red light and 6 hours for UV-A. On the contrary with the absence of methylene blue, this lipid peroxidation level was found lower than in samples added methylene blue.

Bacteria were pretreated by starvation for a certain period of time such as 5, 10, 20 and 30 days, in order to detect the effect of pretreated on oxidative stress. It was detected that 10, 20 and 30 days of starvation pretreatment resulted in more resistance to oxidative stress for each bacteria, ie. longer survival under the effect of different artificial light sources.

Key words: Sea water, Starvation stress, Catalase, Superoxide dismutase, Glutathione peroxide, Glukose-6-P-dehydrogenase, Methylene blue, Dormancy

TEŞEKKÜR

Doktorada yaptığım çalışmanın ortaya çıkmasında ve her adımında, yapıcı ve yönlendirici eleştirilerinin yanında benden yakın ilgisini esirgemeyen, bundan sonraki çalışmalarında karşıma çıkacak bütün engelleri aşabilmem için gerekli bilimsel altyapı oluşturmamda yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Reşit ÖZKANCA'ya en derin saygılarımla teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tezin şekillenmesinde yardımlarını gördüğüm ve tez izleme komitesindeki yapıcı ve yönlendirici eleştirileri nedeni ile sayın Prof. Dr. Zafer EREN ve Prof. Dr. Abdülkadir HURŞİT'e, çalışmalarımız sırasında laboratuvarında karşılaştığımız sorunlarda ve akademik gelişim sürecimizde yol gösterici ve bilgilendirici yardımlarından dolayı Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Kamil IŞIK, ve Yrd. Doç Dr. Haydar KARAKAYA'ya ayrıca teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. 3 yıl boyunca günün her saatinde beraber olduğum, bütün sıkıntılara karşı beraberce göğüs gerdiğimiz ve aynı atmosferi paylaştığım çok değerli arkadaşım Yrd.Doç.Dr Cihan DARCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca laboratuvar çalışmalarım esnasında karşılaştığım bir çok zorluğun üstesinden gelmemde bana yardımcı olan Dr.Arş.Gör. Tevfik ÖZEN'e yaptığı destekten ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, çalışmalarım esnasında bana sonsuz desteği ve sabrı olan, bütün sıkıntılarımda benim yanımdan ayrılmayan ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen eşime ve oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Önder İDİL

İÇİNDEKİLER

SAYFA

1. GİRİŞ

1.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin Karakteristik özellikleri	1
1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> 'un Karakteristik Özellikleri	1
1.3. Işık ve Fotosensitizer Maddelerin Bakteriler Üzerine Etkileri	2
1.3.1 Güneş Işığı ve Görünür Işığın Bakterilerin Yaşamı Üzerine Etkileri	2
1.3.2. Solar UV Radyasyonun Bakteriler Üzerine Etkisi	5
1.3.3. Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi	7
1.4. Fotosensitizer Maddeler	8
1.4.1. Fotosensitizer Olan Metilen Mavisinin Özellikleri ve Reaktivitesi	8
1.4.2. Fotosensitizer Maddelerin Proteinlere Etkisi	11
1.4.3. Fotosensitizer Maddelerin DNA'ya Etkisi	12
1.4.4. Fotosensitizer Maddelerin Lipitlere Etkisi	14
1.4.5. Fotosensitizer Maddelerin Biyolojik Membranlara Etkisi	14
1.5. Fotodinamik Terapi (FDT)	15
1.6. Oksidatif Stres	16
1.6.1. Serbest Oksijen Radikalleri	16
1.6.2. Oksidatif Stresin Kaynağı	17
1.6.3. Dış Kaynaklı Oksidatif Stres	18
1.6.4. Oksidatif Hücre Zararının Mekanizması	20
1.6.5. Oksidatif Strese Karşı Savunma Sistemi	21
1.6.6. Oksidatif Stres Regülasyonunun Düzenlenmesi	22
1.6.6.1. SoxRS'nin Düzenlenmesi	22
1.6.6.2. OxyR'nin Düzenlenmesi	24
1.6.6.3. Oksidatif Strese Cevapta Diğer Düzenleyici Sistemler	25
1.6.7. Antioksidantlar	26
1.6.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	26
1.6.7.2. Katalaz (Catalaze)	27

1.6.7.3. Glutatyon Peroksidaz	27
1.7. Bakterilerin Deniz Suyundaki Yaşamına Açlık Stresinin Etkisi	27
1.8. Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (Dormansi) (VBNC)	28
1.9. Çalışmanın Amacı	31
2. MATERYAL VE METOD	33
2.1. Bakteri Suşları	33
2.2. Besiyerleri	33
2.2.1. Nutrient Agar Besiyeri	33
2.2.2. Nutrient Broth Besiyeri	33
2.2.3. Eosin Metilen Blue (EMB) Besiyeri	33
2.2.4. Deniz Suyu	34
2.3. Deneylerde Kullanılan Işık Kaynakları	34
2.4. Ringer Solüsyonu	34
2.5. Bakteri Yaşam Deneyleri	34
2.5.1. Koloni Sayımı	34
2.5.2. Bakterilerin Açlıkla Ön Muamele Edilmesi	35
2.5.3. Direkt Mikroskopik Bakteri Sayımı	35
2.5.3.1. Kullanılan Stoklar	35
2.5.3.2. Bakterilerin Mikroskopta Sayımı	35
2.5.4. Solunum Yapan Bakterilerin Sayımı	36
2.5.4.1. Kullanılan Stoklar	36
2.5.4.2. Solunum Yapan Bakteri Sayımı	37
2.5.5. Yaşam Deneylerinde Değerlerin Analizi	37
2.6. Deneylerde Kullanılan Metilen Mavisi	37
2.7. Enzim Aktivitelerinin Tayin Edilmesi	38
2.7.1. Hücrelerin Parçalanması	38
2.7.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini	38
2.7.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini	39
2.7.4. Glutathion Peroksidaz Aktivite Tayini	39
2.7.5. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivite Tayini	40
2.7. Lipit Peroksidasyon Tayini	40

3. BULGULAR	41
3.1. Deniz Suyunda Metilen Mavisinin Bulunduğu veya Bulunmadığı Ortamda Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Yaşamına Etkisi	41
3.1.1. Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Yaşamı	41
3.1.2. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Deniz Suyu Ortamında Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Yaşamı	45
3.1.3. Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Yaşamı	48
3.1.4. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Yaşamı	55
3.1.5. Açlıkla Ön Muamele Edildikten Sonra Metilen Mavisi İlave Edilen Deniz Suyunda Farklı Dalga Boylarında Işık Kaynaklarının Etkisi Atında <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i> Bakterilerinin Yaşam Grafikleri	64
3.1.6. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda Açlıkla Ön Muamele Edildikten Sonra Farklı Dalga Boylarında Işık Kaynaklarının Etkisi Atında <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i> Bakterilerinin Yaşamı	71
3.2. Deniz Suyunda Yaşayan <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Oksidatif Stres Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim	80
3.2.1. Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Oksidatif Stres Enzimlerinden Olan Katalaz, Süperoksit Dismutas, Glutathion Peroksidas ve Glukoz-6-P Dehidrogenaz Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim	80
3.2.2. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Oksidatif Stres Enzimlerinden Olan Katalaz, Süperoksit Dismutas, Glutathion Peroksidas ve Glukoz-6-P Dehidrogenaz Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim	97

3.2.3. Deniz Suyu Ortamında Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda 8 Saat Esnasında <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i>'un Katalaz, Süperoksit Dismutas, Glutathion Peroksidas ve Glukoz-6-P-Dehidrogenaz Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim	107
3.3. Deniz Suyu Ortamında Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i> Bakterilerinde Lipit Peroksidasyon Miktarında Meydana Gelen Değişim	117
3.3.1. Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i> Bakterilerinde Lipit Peroksidasyonunda Meydana Gelen Değişim	117
3.3.2. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda <i>E.coli</i> ve <i>S.typhimurium</i> Bakterilerinde Lipit Peroksidasyon Miktarlarında Meydana Gelen Değişim	121
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	125
5. KAYNAKLAR	138
6. ÖZGEÇMİŞ	160

SİMGE VE KISALTMALAR

BSA	: Bovin serum albumin
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
CTC	: 5-Cyano-2,3-ditolyt tetrazolium chloride
DAPI	: 4',6'-Diamidino-2-phenylindole 2HCl
EMB	: Eosin metilen blue agar
Kkal	: Kilokalori
Log	: Logaritma
MDA	: Malondialdehit
MM	: Metilen mavisi
M	: Molarite
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomol
UV-A	: Ultraviole A
VBNC	: Aktif fakat kültürü yapılamayan (Viable but non culturable)
U	: Ünite

ŞEKİLLER LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1.1 Metilen Mavisinin Genel Yapısı	9
Şekil 1.2 Metilen mavisinin (MM) fotokimyasal şeması	10
Şekil 1.3 Farklı oksijen türlerine karşı hücre regülonlarının cevabı	19
Şekil 3.1 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>E.coli</i> 'nin yaşamı (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	42
Şekil 3.2 Metilen Mavisii İlave Edilen Deniz Suyunda <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı (Kırmızı ışık)	42
Şekil 3.3 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>E.coli</i> 'nin yaşamı (UV-A)	43
Şekil 3.4 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	43
Şekil 3.5 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı (Kırmızı ışık)	44
Şekil 3.6 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı (UV-A)	44
Şekil 3.7 Deniz suyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin yaşamı (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	45
Şekil 3.8 Deniz suyunda Kırmızı Işığın Etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin yaşamı	46
Şekil 3.9 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	46
Şekil 3.10 Deniz suyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	47
Şekil 3.11 Deniz Suyunda Kırmızı Işığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	47
Şekil 3.12 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un yaşamı	48
Şekil 3.13 Beyaz Işığın (400-700 nm) Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	50
Şekil 3.14 Mavi ışığın (400-500 nm) Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	50
Şekil 3.15 Yeşil ışığın (500-600 nm) Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	51
Şekil 3.16 Kırmızı ışığın (600-700 nm) Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	51
Şekil 3.17 UV-A'nın Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	52
Şekil 3.18 Beyaz Işığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	52

Şekil 3.19 Mavi ışığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	53
Şekil 3.20 Yeşil ışığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	53
Şekil 3.21 Kırmızı ışığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	54
Şekil 3.22. UV-A'nın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	54
Şekil 3.23. Beyaz Işığın Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	56
Şekil 3.24. Beyaz Işığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	57
Şekil 3.25 Mavi Işığın Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	57
Şekil 3.26 Mavi Işığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	58
Şekil 3.27 Yeşil Işığın Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	58
Şekil 3.28 Yeşil Işığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	59
Şekil 3.29 Kırmızı Işığın Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	59
Şekil 3.30 Kırmızı Işığın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	60
Şekil 3.31 UV-A'nın Etkisi Altında <i>E.coli</i> 'nin Yaşamı	60
Şekil 3.32 UV-A'nın Etkisi Altında <i>S.typhimurium</i> 'un Yaşamı	61
Şekil 3.33. Mikroskopta Direkt Bakteri Sayım yönteminde bakterilerin görüntüsü (1- Uzayamayan bakteriler, 2-Uzayabilen bakteriler)	63
Şekil 3.34 Mikroskopta solunum yapan bakteri sayım yönteminde bakterilerin görüntüsü (1-Kırmızı, depozit biriktirmiş olanlar canlı, 2-Mavi, depozit biriktirmemiş olanlar ölü hücreler)	63
Şekil 3.35 <i>E.coli</i> 'nin Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı (5, 10, 20, 30 gün açlık)	65
Şekil 3.36 <i>S.typhimurium</i> 'un Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı (5, 10, 20, 30 gün açlık)	66
Şekil 3.37 <i>E.coli</i> 'nin Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı (5, 10, 20, 30 gün açlık)	66
Şekil 3.38 <i>S.typhimurium</i> 'un Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı (5, 10, 20, 30 gün açlık)	67
Şekil 3.39 <i>E.coli</i> 'nin Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı (5, 10, 20, 30 gün açlık)	67
Şekil 3.40 <i>S.typhimurium</i> 'un Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı (5, 10, 20, 30 gün açlık)	68
Şekil 3.41 <i>E.coli</i> 'nin Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı	

gelen değişim (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	83
Şekil 3.58 <i>E.coli</i> 'nin glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	84
Şekil 3.59 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	85
Şekil 3.60 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	86
Şekil 3.61 UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	87
Şekil 3.62 UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	88
Şekil 3.63 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	89
Şekil 3.64 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	90
Şekil 3.65 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	91
Şekil 3.66 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	92
Şekil 3.67 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	93
Şekil 3.68 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	94

(5, 10, 20, 30 gün açlık)	68
Şekil 3.42 <i>S.typhimurium</i> 'un Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	69
Şekil 3.43 <i>E.coli</i> 'nin UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	69
Şekil 3.44 <i>S.typhimurium</i> 'un UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı	70
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	
Şekil 3.45 <i>E.coli</i> 'nin Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı	73
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	
Şekil 3.46 <i>S.typhimurium</i> 'un Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	74
Şekil 3.47 <i>E.coli</i> 'nin Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	74
Şekil 3.48 <i>S.typhimurium</i> 'un Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	75
Şekil 3.49 <i>E.coli</i> 'nin Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	75
Şekil 3.50 <i>S.typhimurium</i> 'un Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	76
Şekil 3.51 <i>E.coli</i> 'nin Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	76
Şekil 3.52 <i>S.typhimurium</i> 'un Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	77
Şekil 3.53 <i>E.coli</i> 'nin UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	77
Şekil 3.54 <i>S.typhimurium</i> 'un UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı	
(5, 10, 20, 30 gün açlık)	78
Şekil 3.55 <i>E.coli</i> 'nin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	
(Beyaz, mavi, yeşil ışık)	81
Şekil 3.56 <i>E.coli</i> 'nin Superoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesinde meydana	
gelen değişim (Beyaz, mavi, yeşil ışık)	82
Şekil 3.57 <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana	

Şekil 3.69 UV-A'nın etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	95
Şekil 3.70 UV-A'nın etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	96
Şekil 3.71 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	98
Şekil 3.72 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	98
Şekil 3.73 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	99
Şekil 3.74 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	99
Şekil 3.75 Deniz suyunda kırmızı ışığın etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	100
Şekil 3.76 Deniz suyunda kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	100
Şekil 3.77 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	102
Şekil 3.78 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	102
Şekil 3.79 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	103

Şekil 3.80 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	103
Şekil 3.81 Deniz suyunda kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	104
Şekil 3.82 Deniz suyunda kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	104
Şekil 3.83 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	105
Şekil 3.84 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	105
Şekil 3.85 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	106
Şekil 3.86 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	106
Şekil 3.87 <i>E.coli</i> 'nin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	108
Şekil 3.88 <i>E.coli</i> 'nin superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	109
Şekil 3.89 <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	109
Şekil 3.90 <i>E.coli</i> 'nin glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	110
Şekil 3.91 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	110
Şekil 3.92 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitelerinde meydana gelen değişim	111

Şekil 3.93 <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	112
Şekil 3.94 <i>S.typhimurium</i> 'un superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	112
Şekil 3.95 <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	113
Şekil 3.96 <i>S.typhimurium</i> 'un glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	114
Şekil 3.97 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	115
Şekil 3.98 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim	116
Şekil 3.99 <i>E.coli</i> 'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	117
Şekil 3.100 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	118
Şekil 3.101 UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	118
Şekil 3.102 <i>S.typhimurium</i> 'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen Değişim	119
Şekil 3.103 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen Değişim	120
Şekil 3.104 UV-A'nın etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	120
Şekil 3.105 <i>E.coli</i> 'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	121
Şekil 3.106 <i>S.typhimurium</i> 'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	122
Şekil 3.107 Kırmızı ışık kaynağının etkisi altında <i>E.coli</i> 'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	122
Şekil 3.108 Kırmızı ışık kaynağının etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'da lipit	

peroksidasyonunda meydana gelen değişim	123
Şekil 3.109 UV-A'nın etkisi altında <i>E.coli</i> 'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	123
Şekil 3.110 UV-A'nın etkisi altında <i>S.typhimurium</i> 'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim	124

Analitik Safılıkta Kullanılan Kimyasal Maddeler Listesi

Acridin orange	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Acridin orange	Sigma
Bromfenol mavisi	Sigma
BSA	Biological Industries
Cyt C	Serva
DAPI	Serva
EDTA	Sigma
EMB agar	Acumedia
Comassie brilliant mavisi R-250	Sigma
CTC	Polysciences
Glutation redüktaz	Serva
Hidrojen peroksit	Sigma
Ksantin	Serva
Ksantin oksidaz	Serva
Malondialdehit	Serva
B-Mercaptoetanol	Sigma
Metilen mavisi	Sigma
NADPH	Serva
Nalidixic asit	Sigma
Nutrient Agar	Merck
Nutrient Brot	Merck
Ringer	Merck
Sudan Black B	Aldrich
2-thiobarbütirik asitin	Sigma
Tris	Baker Chem

florasında bulunmazlar, enterik mikroorganizmalar arasında esas patojenik grubu temsil ederler.

1.3. Işık ve Fotosensitizer Maddelerin Bakteriler Üzerine Etkileri

1.3.1. Güneş Işığı ve Görünür Işığın Bakterilerin Yaşamı Üzerine Etkileri

Sucul sistemlerde yaşayan özellikle enterik ve fekal koliformlar gibi bakterilerin yaşamı, dağılışı ve miktarı çeşitli çevresel faktörlerin etkisi ve varlığına bağlı olarak değişmektedir. Bilhassa sucul sistemlerde mikroorganizmaların yaşamını etkileyen en önemli faktörlerden bazıları güneş ışığı (solar radyasyon) (Gourmelon ve ark., 1997; Fiksdal ve ark., 1999; Kussovski ve ark., 2001; Sinton ve ark., 2002), UV ışınları (McCambridge ve ark., 1981; Pickup, 1991) ve fotosensitizer maddelerin varlığıdır (Tuite ve ark., 1993; Wilson ve ark., 1994; Merchat ve ark., 1996; Özkanca ve ark., 2002; Kömerik ve ark., 2002). Burada güneş ışığı (solar radyasyon), UV ve görünür bölge ışınlarının bakteri yaşamı üzerine etkisi ve güneş ışığının ışığa karşı duyarlı moleküllerle olan etkileşimi oldukça önemlidir. Çünkü çevresel faktörlerden biri veya birkaçında görülecek değişiklikler bu bakterilerin yaşamı üzerinde oldukça önemli etkiler ortaya çıkarır ve stres ortamı yaratır. Fakat ışığın bu etkisi derinlere inildikçe azalmakta hatta sınırlı bir hale gelmektedir (Sinton ve ark., 1994). Bu konuda yapılan çalışmalarda böyle hücrelerin önemli bir kısmının canlı fakat kültürü yapılamayan bir durumda kaldığı ve koloni oluşturma yeteneğinde hızlı bir azalma olduğu görülmüştür (Troussellier ve ark., 1998; Davies ve ark., 1991).

Yeryüzüne ulaşan güneş ışığını, görünür ve UV olmak üzere iki kısım altında toplamak mümkündür. Görünür bölge ışığı mavi, yeşil, sarı ve kırmızı dalga boyunu içermekte, UV ise UV-A, UV-B ve UV-C olmak üzere üç kısım altında toplanmaktadır. Solar spektrumun UVB (280-320 nm) kısmı direk fotobiyolojik DNA zararı ile ışığın en zararlı dalga boyunu içermektedir (Calkins ve ark., 1982). Daha yüksek dalga boylarında fotokimyasal mekanizma daha önemli olmuş, çünkü ortamda bir fotosensitizer ve oksijenin varlığında bakterilerdeki yaralanma eğilimi daha yüksek olmuştur (Sinton ve ark., 1994). Nitekim bu konuda yapılan çalışmalarda enterik bakteriler üzerine güneş ışığının öldürücü

1. GİRİŞ

1.1. *Escherichia coli*'nin Karakteristik özellikleri

E.coli Enterobacteriaceae familyasına ait Gram (-) bir bakteridir. Karbon kaynağı olarak sadece glukoz yada gliserolü kullanan, basit büyüme ortamlarında kültürü yapılabilen, çubuk şeklinde fakültatif anaerob bir bakteridir (Cruickshank ve ark., 1973; Cruickshank ve ark., 1975). *E.coli* spor meydana getirmez. Genellikle tutunmak için fimbriaları ve hareket etmek için flagellası vardır. *E.coli* laktozu fermente ederek MacConkey agar üzerinde kırmızı koloniler oluşturur (Cruickshank ve ark., 1973). *E.coli*'nin koloni şekli yuvarlak ve yüzeyi düz olmasına rağmen bazı suşlar mukoid koloniler oluşturur (Macone ve ark., 1981). *E.coli* ilk olarak memeli bağırsağında tespit edilen fekal koliform bir bakteridir.

Triptofandan indol yaparlar, metil kırmızısı testi olumlu, Voges-Proskauer testi olumsuzdur. Simonun sitratlı besiyerinde üremezler. Bu dört karakter İMVİC testleri adını almaktadır (Bilgehan, 1994).

1.2. *Salmonella typhimurium*'un Karakteristik Özellikleri

Enterobacteriaceae familyasına ait, gram negatif, 2-5 µm boyunda, 0.6-1.5 µm çapında, sporsuz, kapsülü bulunmayan çomak şeklinde bir bakteridir. Peritrik kirpikleri aracılığıyla hareket ederler. Basit büyüme ortamlarında kolayca üreyebilmektedirler. Aerob ve fakültatif anaerobdurlar. PH 7.2'de üremeyi severler (Bilgehan, 1994). Laktoza etki etmezler, bu karakterleri onları *Escherichia*'lardan ilk ayırmada önem taşır. İçerisinde laktoz ve uygun bir ayıraç bulunan ayırıcı besiyerine (EMB) ekilen bu bakteriler laktoza etki etmediklerinden renksiz, laktoza etkili olanlar ise koyu kırmızı, siyah, yeşilimsi parlak koloniler oluştururlar. İndol olumsuz, metil kırmızısı olumlu, Voges-Proskauer olumsuz olup sitratlı besiyerlerinde (Simmon) ürerler. ONPG (ortho-nitro fenil galaktopiranosid) deneyi olumsuzdur. Yani laktozu parçalayabilen beta galaktosidaz enzimleri yoktur (Bilgehan, 1994).

Geniş bir yayılım alanlarına sahip olmalarına rağmen daha ziyade insan bağırsakları, sürüngenler, kuşlar esas bulundukları yerlerdir. Normal bağırsak

etkisinin (Merchat ve ark., 1996; Özkanca ve ark., 2002; Kömerik ve ark., 2002) ve zarar veren reaksiyonun fotosensitizerler tarafından ışığın absorpsiyonuyla meydana geldiği gözlenmiştir.

Işığa duyarlı moleküllere fotosensitizer adı verilmektedir. Fotosensitizerler hücre içi yada hücre dışı yani iç kaynaklı veya dış kaynaklı olup ürettikleri serbest radikaller vasıtasıyla bakteriyal proteinlerde, yağ asitlerinde ve biyolojik zar ve organellerde bazı değişiklikler meydana getirmektedir.

Dış kaynaklı fotosensitizer olan topraktaki humik asit ve bitkilerdeki klorofillerin (Hoigne ve ark., 1989) bol olduğu yüzey sularında singlet oksijen tespit edilmiş ve bunun okside eden bir ajan olarak görev yaptığı bulunmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalar UV ve güneş ışığının bakteri yaşamına zarar verdiği ve hümik maddelerinin dış kaynaklı sensitizer olduğu (Curtis ve ark., 1992), ayrıca *E.coli*'nin dış kaynaklı bir fotosensitizerin varlığında görünür ışığa maruz kaldığında hücrelerin singlet oksijen tarafından hızlı bir şekilde inaktif hale geldiği ifade edilmiştir. Çoğu moleküller sensitizerler olarak ifade edilmektedir, fakat biyosferde geniş olarak yayılan porfirinler özellikle yaygın olanıdır. Porphirinler mavi ışığın absorpsiyonuyla ortaya çıkan hücre içi fotosensitizerlerdir ve direk olarak yada hidrojen peroksit ve sudan hidroksil radikalleri, yada moleküler oksijenden singlet oksijen ve süperoksit radikallerinin oluşumuyla hücrelerde hasara sebep olur (Foote ve ark., 1991).

E.coli ile yapılan çalışmalarda hücrelerin içine girmemiş olan hücre dışı bir fotosensitizerin varlığında görünür ışığa maruz kalan hücrelerin singlet oksijen tarafından hızlı bir şekilde inaktive olduğu ifade edilmektedir (Wakayama ve ark., 1980). Hücreler üzerine singlet oksijenin etkisi araştırılmış ve hücre zararının ana yerinin hücre zarları olduğu belirlenmiştir (Malik ve ark., 1990).

Fekal mikroorganizmaların deniz suyunda ışığa duyarlılığında farklılıklar gözlenmiş (Sinton ve ark., 1994; Sinton ve ark., 1999) ve fekal koliformlarla karşılaştırıldığında enterokokları inaktive etmek için daha uzun süreli güneş ışığına gerek duyulduğu belirlenmiştir. Bu da ışığa karşı fekal koliformların fekal bakteriyofajlardan daha duyarlı olduğunu göstermektedir (Sinton ve ark., 1999).

Işığın bakterilerin kültüre edilebilmesi üzerine negatif etkiye sahip olduğu ve *E.coli* ve enterobakteriler doğal sucul populasyonlarda 1-1.5 m derinlikte 7 gün

yaklaşık 5 log azalma olduğu tespit edilmiştir. Durgun fazda H_2O_2 'ye (katE, katG (katalaz), dps (DNA bağlama proteini) ve katE katG dps) direnç genleri bakımından mutant olan türlerin, yabani tiple karşılaştırıldığında ışığa karşı daha duyarlı oldukları görülmüştür (Gourmelon ve ark, 1994). Exponensiyal olarak büyüyen hücrelerde *oxyR*'de bir mutasyon, *oxyR* H_2O_2 'ye cevapta düzenleyici gen olduğu için, ışığa duyarlılığın artmasına sebep olmaktadır (Gourmelon ve ark, 1994). Dahası, öldürücü etkinin H_2O_2 üretimi ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Bununla birlikte *rpoS* mutantlarının artan duyarlılığı, öldürücü etkiye karşı *rpoS* bağımlı korumanın H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasına bağlı olduğu ileri sürülmektedir (Gourmelon ve ark, 1994).

Solar radyasyonun öldürücü etkisinin çözünmüş organik maddeler (Calcins ve ark., 1982), klorofil ve özel maddeler tarafından sağlandığı da ifade edilmektedir (Baker ve ark, 1982).

1.3.2. Solar UV Radyasyonun Bakteriler Üzerine Etkisi

Kısa dalga boyundaki ışık kaynakları, özellikle 500 nm'den düşük olan UV ışığı, toprakta ve bitki yüzeylerindeki bakterilerin inaktivasyonu için önemlidir. UVR (ultraviöle radyasyon) tarafından DNA zararı dalga boyuna bağlı olarak değişmektedir. UV-A (320-400 nm) ortamda reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesiyle lipitlere, proteinlere ve DNA'ya dolaylı olarak bir zarara sebep olur. UV-B (290-320 nm) hem dolaylı hem de direk zarara sebep olur. Çünkü 320 nm'den aşağı dalga boyundaki ışınlar DNA tarafından güçlü bir şekilde absorbe edilir. UV-B ile muamele edildikten sonra en fazla oluşan ürün cyclobutane pirimidin dimerleri (CPD)'dir (Mitchell ve ark., 1993). Meydana gelen CPD sonucunda oluşan zarar DNA sentezini ve RNA transkripsiyonunu bloke ediyorsa öldürücüdür veya eğer zarar (lezyon) DNA polimeraz tarafından bypas edilirse mutagenik olabilir (Jeffrey ve ark., 1996; Jeffrey ve ark., 1996). UV-C ise direk germisidal etkiye sebep olarak canlıların ortamdan elimine edilmesini sağlamaktadır. UV zararına cevap olarak bakteriler farklı tamir yolları geliştirmiştir. Bunlar fotoenzimatik tamir, kesip çıkarma tamiri ve rekombinasyonel tamirdir (postreplikasyon tamiri). Fotoenzimatik enerji kaynağı olarak yakın-UV yada görünür ışık kullanıldığında, tek bir enzim (photolyase)

tarafından CPD'nin direk monomerizasyonunu içerir (Sancar, 1994). Fotoenzimatik tamir, UV-A yada fotosentetik olarak aktif radyasyon (FAR) ile ikinci birmuameleden sonra UV-B'ye maruz bırakılan sucul bakteriyoplanktonlarda gözlenmiştir (Kaiser ve ark., 1997).

E.coli bakterisi UV ışığı ve çeşitli kimyasal mutajenler vasıtasıyla oluşan mutasyona SOS cevabının uyarılmasıyla karşılık verir (Friedberg, 1995). SOS cevabı yaklaşık 30 genin expressiyonunu koordine eden global bir cevap mekanizmasıdır (Fernandez ve ark., 2000). Bunun genel fonksiyonu DNA zararının ortaya çıkmasından sonra hücresel yaşamı yönetmeyi içerir. Bu tepki RecA ve LexA proteinlerinin işbirliğiyle kontrol edilir ve LexA SOS regulonunun transkripsiyonel represörüdür (Friedberg,1995).

SOS cevabı *lexA*'yı kontrol eden *umuDC* operonuna bağlıdır (Kato ve ark., 1981; Steinborn ve ark., 1978). Bu kompleks, son zamanlarda DNA polimeraz olarak tanımlanmış Pol V olarak adlandırılan DNA polimeraz sınıfının bir üyesidir (Pham ve ark., 2001; Reuven ve ark., 1999; Tang ve ark., 1998). Pol V'in, DNA Pol III holoenzimi lezyonlarla bloke olduktan sonra pirimidin dimerleri gibi DNA lezyonlarını bypass'la mutasyonu önlediği düşünülmektedir (Ohmori ve ark., 2001).

UV radyasyonu özellikle bakteriler için öldürücüdür, çünkü bu organizmalar basit haploit genoma sahip olup hacim olarak da küçük bir yapıya sahiptirler (Garcia-Pichel, 1994). Aynı UV tarafından meydana gelen zararın ökaryotik organizmalardan daha çok bakteriyoplanktonlarda ortaya çıktığı belirlenmiştir (Jeffrey ve ark., 1996; Jeffrey ve ark., 1996), ve bu zararın daha çok DNA ve protein sentezinde, ekzoenzimatik aktivitede (Müller-Niklas ve ark., 1995), amino asit birikiminde (Bailey ve ark., 1983), oksijen tüketiminde (Pakulski ve ark., 1998) ve bakteri sayısında bir azalmaya (Müller-Niklas ve ark., 1995; Pakulski ve ark., 1998) sebep olduğu belirlenmiştir.

içinde gözden kaybolduğu rapor edilmiştir. Bu konuda yapılan farklı bir çalışmada, deniz suyu ortamında *E.coli* ve *S.typhimurium* 4 ve 10 saat ışığa maruz bırakıldıktan sonra toplam bakteri sayısının değişmediği, direk bakteri sayısı ve koloni oluşturan bakteri sayısının her iki türde de 4-5 log. azalma gösterdiği gözlenmiştir (Davies ve ark., 1991). Pomepuy ve arkadaşları (1996), deniz suyu ortamında 26 saat güneş ışığına maruz bırakılan *E.coli* bakterisinde direk bakteri sayısı (DBS) ve toplam bakteri sayısında (TBS) herhangi bir değişme olmadığını fakat bunun yanında koloni oluşturan bakteri sayısının (KS) $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 'den tespit edilemeyen bir seviyeye azaldığını belirlemişlerdir. Her nasılsa bu konuda yani görünür ışık altında farklı etkiler tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar görünür dalga boyu ışığa (125 Wm^{-2}) maruz kalan *E.coli* hücrelerinde de görülmüştür. Toplam sayıda herhangi bir değişiklik belirlenmemiş direk bakteri sayısında 1 log azalma ve koloni oluşturan bakteri sayısında 6 log azalma tespit edilmiştir. Bunun yanında ışığa maruz bırakılmayan yani karanlık ortamda bakteride koloni oluşturan bakteri sayısında 1.5 log azalma toplam bakteri sayısı yada direk bakteri sayısında herhangi bir azalma tespit edilmemiştir (Troussellier ve ark., 1998). Kapuscinski ve Mitchell (1981) *E.coli* hücreleri filtre otoklav edilen deniz suyunda ışığa maruz bırakıldıktan sonra sublethal yaralanmalar olduğunu belirlemiştir. Aynı araştırmacılar minimal besiyerine piruvat ya da katalazın ilavesiyle koloni oluşturma yeteneğinin düzelmeye başladığını ifade etmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada, deniz suyunda *E.coli* üzerine görünür ışığın toksik etkisinde reaktif oksijen türlerinin rolü, antioksidant savunma sistemini içeren spesifik genlerden yoksun olan mutantların kullanımıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada, suni ışığa maruz bırakıldıktan 50-100 saat içinde koloni sayısı ile belirlenen hücre yaşamı için *rpoS*'nin fonksiyonel öneme sahip olduğu belirlenmiştir (Gourmelon ve ark., 1994). RpoS çeşitli stresleri de içeren bir σ faktörü içermekte ve varlığının deniz suyunda durgun faz *E.coli* hücrelerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Munro ve ark., 1995). Işığa karşı koruma etkisi olan RpoS'nin sadece durgun faz hücrelerinde olduğu kanıtlanmış ve *rpoS* geninde mutasyonun yabanıl türlerle karşılaştırıldığında, mutant türlerde koloni oluşturan hücrelerin sayısında

1.3.3. Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Mikroorganizmalar Üzerine Etkisi

Güneş ışığı ve UV ışık kaynaklarının özellikle deniz suyu ortamında mikroorganizmaları etkilediği bilinmektedir. Son yıllarda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının mikroorganizmaların yaşamı üzerine etkilerinin nasıl olduğu ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Özellikle kırmızı ışığın sebep olduğu etkinin nasıl olduğu konusu önem kazanmaya başlamıştır.

Antibiyotiklere bakterilerin artan direnci alternatif antimikrobial tekniklerin gelişmesini uyarmıştır. Fotosensitizer ve görünür ışığın kullanımını içeren fotodinamik terapi mikroorganizmaların inaktivasyonu için yeni bir metot olarak düşünülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmaların çoğunda ışığın ancak bir fotosensitizerle birlikte etkili olduğu görülmüştür. Nitekim kırmızı ışık kaynakları ile yapılan çalışmalarda *E.coli*'yi de içeren mikroorganizmaların çoğunun ortamdaki inaktive olduğu görülmüştür. Soukos ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, metilen mavisi ve toludin mavisinin kırmızı lazer ışığını absorbe ettiği ve birçok tür için bakterisidal etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kırmızı filtreli Xenon lambası kullanılarak yapılan çalışmada, *P.gingivalis*'in koloni sayısı göz önüne alındığında, ışık ve toludin mavisi birlikte kullanıldığında karanlık kontrol örneklerinden daha kısa yaşamına devam ettiği görülmüştür (Matevski ve ark., 2003). Toludin mavisi ve ışık kaynağı ayrı ayrı kullanıldığında ise bakteri yaşamında herhangi bir değişime sebep olmadığı görülmüştür.

Lazer ışıklarının bakterilerin ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanıldığı, fakat ışık kaynağının yanı sıra ışık yoğunluğunda etkili olduğu ifade edilmektedir. Ethne ve ark. (2002)'nin yaptığı çalışmada bakterilerin büyümesi üzerine 810 nm lazer ışığı kullanılmıştır. *E.coli*, *S.aureus*'un bu ışık kaynağından etkilendiği bu etkinin ışığın dalga boyuna bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Farklı lazer ışıkları ile yapılan çalışmalarda da metilen mavisinin bulunduğu ortamda bakterilerin canlılıklarında azalmalar olduğu ifade edilmiştir (Chan ve ark., 2003). Burada daha çok dişlerde bulunan mikroorganizmaların lazer radyasyonu tarafından öldürüldüğü belirlenmiştir.

1.4. Fotosensitizer Maddeler

Güneş ışığı ve çeşitli dalga boylarında ışık kaynakları bakterilerin ölümüne sebep olmaktadır. Yoğun güneş ışığı, canlıda yer alan veya dışarıdan organizmaya verilen ışığa duyarlı moleküller vasıtasıyla ölüme neden olmaktadır. Bu olaya ışığın fototoksik etkisi denir. Işığa maruz kalan organizmalarda fotooksidasyona yol açmak suretiyle organizmanın ölümüne yol açan, ışığa karşı duyarlı moleküllere de fotosensitizerler adı verilmektedir.

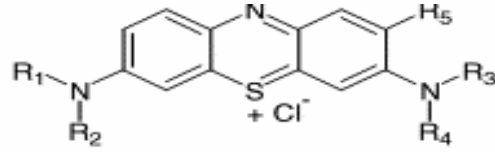
Porfirin ve türevleri (deuteroporfirin (DP), hematoporfirin ve derivatleri, kationik porfirinler) (Merchat ve ark., 1996; Nitzan ve ark., 1994), riboflavin türevleri (Öner, 1987) ve hemin (Nitzan ve ark., 1994), vb. iç kaynaklı fotosensitizerler olarak bilinirken, hümik asit (Clements ve ark., 1992; Curtis ve ark., 1992), fotosentetik pigmentler (klorofil-a, bakterioklorofil) (Mathews, 1993) ise dış kaynaklı fotosensitizerler olarak bilinirler.

Güneş ışığının enterik bakteriler üzerine zararlı etkileri araştırılmış (Whitlam ve ark., 1986; Sinton ve ark., 1994) ve zarar veren reaksiyonun fotosensitizerin sebep olduğu ışık emiliminden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bunlar ya direk ya da çeşitli ara moleküller yani reaktif metabolitler oluşturmak suretiyle hücreye zarar vermektedirler (Sinton ve ark., 1994).

1.4.1. Fotosensitizer Olan Metilen Mavisinin Özellikleri ve Reaktivitesi

Metilen mavisi (MM) (MB) son 1 yüzyıldır insanda çeşitli muameleler için özellikle antiseptik ve dezenfektan olarak ağız yollarında kullanılmıştır. Metilen mavisi 1876'da yeni bir kimyasal olarak izole edilmiştir. Bu, methemoglobinemia'nın (Clifton ve ark., 2003) muamelesinde ve kan ürünlerini HIV'den fotoinaktif etmek için kullanılmaktadır. Metilen mavisi ilk olarak rapor edilen sentetik antimikrobiyaldir ve modern kemoterapinin temelini oluşturan çalışmaların çoğunda kullanılmaktadır.

Metilen mavisi bir thiazine boyası olarak sınıflandırılır, fakat kimyasal adı 3,7-bis (dimethylamino) phenothiazine-5-ium chloride'dir. Metilen mavisi'nin genel yapısı aşağıda görülmektedir.



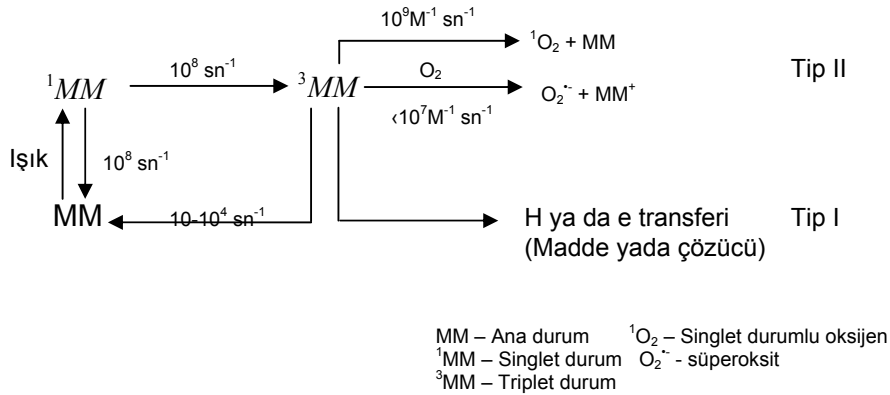
DYE	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Thionin	H	H	H	H	H
Azure C	H	CH ₃	H	H	H
Azure A	H	H	CH ₃	CH ₃	H
Azure B	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H
Methylene Blue	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
Toluidine Blue	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃

Şekil 1.1 Metilen Mavisinin Genel Yapısı

Şekil 1.2’de görüldüğü gibi ışığın etkisi altında MM singlet durum olan ¹MM’e dönüşmektedir. Yaklaşık aynı özelliktedir, ve daha sonra triplet duruma ³MM çıkmaktadır. Ortaya çıkan triplet durumlu ³MM yavaş yavaş geriye dönüşebilir ya da tip I ya da tip II’ye dönüşebilir. Tip II reksiyonu oksijenin varlığında meydana gelir. En hızlı Tip II reaksiyonu singlet oksijen ve MM üretmek için oksijen ile gerçekleşir. Singlet durumlu oksijen normal durumlu oksijenden 23 kcal daha fazla enerji oluşturmaktadır. Ortaya çıkan triplet durumlu ³MM süperoksit oluşturmak için oksijen ile reaksiyona girer fakat bu oluşum singlet oksijen oluşumundan çok daha yavaştır. Tip I reaksiyonu hava ile doymuş sucul solusyonlarda meydana gelmektedir (Foote, 1976).

Çoğu fenotiazinyum boyalarının hücrelerde aktivite yerleri farklılık göstermektedir. Toludin mavisi (TM) membranda aktif olan bir fotosensitizerdir (Ito, 1983). Bu *E.coli*’ye karşı TM aktivitesinin membran stabilizerleri ve antioksidantlar tarafından azaldığı gerçeğini ortaya koymaktadır (Wakayama ve ark., 1980). MM fotoürünlerinin çoğu sulandırılmış solusyonlarda ortaya çıkmaktadır. MM’nin DNA’ya özellikle G-C zengin bölgelere güçlü bir şekilde bağlandığı bilinmektedir. Bu yüzden MM’nin etkilediği yerler ile ilgili çalışmalar, G-G ve A-T bakımından zengin oligomerlerin DNA’da var olduğu zamanlarda yapılmıştır (Kelly ve ark., 1987). Araştırmacılar, singlet durumlu MM’nin A-T bakımından zengin bölgelere değil G-C bakımından zengin bölgelere bağlanan

MM tarafından güçlü bir şekilde yakalandığını ortaya çıkarmıştır. ^3MM 'nin yaşamının oksijenin yokluğunda çok daha uzun olduğu belirlenmiştir. Bu gözlem singlet oksijen oluşturan ^3MM 'den oksijene enerji transferi ile korunmuştur. MM DNA'nın G-C bölgesine bağlandığında çok daha az singlet oksijen oluşumu gözlenmiştir. Bunun sebebinin ^3MM 'nin ürünlerinin azalmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Bunun aksine, MM A-T bakımından zengin bölgelere bağlandığında daha yüksek seviyede singlet oksijen oluştuğu gözlenmiştir (Kelly ve ark., 1987).



Şekil 1.2 Metilen mavisinin (MM) fotokimyasal şeması (Floyd, 2004'den alınmıştır)

MM ve Toluidine mavisi (TM) gibi ticari fenotiazin boyaları virüsler, bakteriler ve maya içeren patojenik organizmaların inaktivasyonu için etkili fotosensitizerlerdir (Wainwright, 1997-a). Benzer kimyasal yapıya sahiptirler, ve benzer fizikokimyasal özellikler gösterirler. Son yıllarda, MM taze dondurulan plazmadaki çeşitli virüslerin inaktivasyonu için kullanılmaktadır (Mohr ve ark., 1997; Wagner ve ark., 1994), bunun yanında TM maya ve bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilerin inaktivasyonu için antifungal ve antibakteriyal ilaç olarak kullanılmaktadır (Ito, 1977; Bhatti ve ark., 1998).

Bu boyaların bakterisidal etkileri karşılaştırılmış ve MM, influenze virüsü (Lambrecht ve ark., 1991) ve *Helicobacter* (Millson ve ark., 1996) için daha etkili olmasına rağmen, TM'nun bazı bakteriler (Wilson ve ark., 1993-a; Wainwright ve ark., 1997-b) ve *Candida albicans* (Wilson ve ark., 1993-a) gibi maya'lara daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Şu anda bu fenotiazin boyalarının

antimikrobiyal özelliklerinin karşılaştırılması hakkında çok az çalışma vardır (Wainwright ve ark., 1997-b; Wilson ve ark., 1993-b).

Bu konuda yapılan çalışmalar kırmızı lazer ışığına maruz bırakılan mikroorganizmaların hepsinin TM ya da MM varlığında bu ışık tarafından geniş oranda yıkıma uğradığını göstermiştir (Usacheva ve ark., 2001). Fakat zararın derecesi boya konsantrasyonu ve lazer ışığının yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Nitekim, aynı ışık akıcılığı altında her iki boyanın artan konsantrasyonu mikroorganizmaların daha fazla foto yıkımıyla sonuçlanmıştır. Aksine, boya konsantrasyonu sabit tutulurken ışık akışı ve yoğunluğundaki artış da bakterilerin daha fazla yıkımına sebep olmuştur, ve bu olay *H.influenze* ve *S.aureus* 6538'de gözlenmiştir (Usacheva ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalarda TM ve MM'nin, gram negatif ve gram pozitif bakteriler için kırmızı lazer ışığının etkisi altında etkili fotosensitizerler olduğu tespit edilmiş, fakat gram negatif ve gram pozitif bakteriler arasında boyanın minimum öldürücü konsantrasyonu arasında farklılık olduğu da belirlenmiştir (Usacheva ve ark., 2001). Bu özellik gram negatiflerin dış membran yapılarının varlığından ileri gelmektedir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi ışığa duyarlı boyalarla inaktivasyonun ana hedefi DNA'dır (Simon ve ark., 1962; Epe ve ark., 1989). Özellikle oksijen eşliğinde yapılacak böyle bir fotodinamik hareketten sonra uyarıma karşı ya direk olarak bir reaksiyon gelişir ya da dolaylı olarak singlet oksijen ya da serbest atom kökleri gibi aktif türler oluşur (Cadet ve ark., 1990). Işığa maruz kalan boya uyarılarak triplet uyarım durumuna geçer. Bu bir yükseltgenme halidir. Singlet oksijen oksijenin daha yüksek enerjili bir halidir. En dıştaki eşleşmemiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitalde antiparalel spinler halinde bulunduklarında oluşurlar. Oksijenin bu hali oldukça reaktiftir ve canlı organizmalara hasar veren esas oksijen türlerinden biridir.

1.4.2. Fotosensitizer Maddelerin Proteinlere Olan etkisi

Fenotiazinyum boyalarının aminleri fotooksidize ettiği bir süredir bilinmektedir (Kayser ve ark., 1976; Kayser ve ark., 1976). Aynı zamanda bunların spesifik olarak triptofan, histidin, metionin, sistein ve tirozin gibi çoğu

amino asidi fotooksidize ettiği belirlenmiştir (Nilsson ve ark., 1972; Papeschi ve ark., 1982). Bu reaksiyonlar hem direk hem de aracı moleküller vasıtasıyla oluşabilir. Oksijen mekanizmaları özellikle histidin için kullanılır. Böyle reaksiyonlar sadece izole aminoasitlerle değil aynı zamanda peptit, protein ve enzimlerle de meydana gelir (Grossweiner, 1976). Enzimlerin fenotiazinyum boyaları kullanılarak fotoinaktivasyon konusunda yapılan çalışmalar, işlemde geçmiş proteinlerde en sık görülen kimyasal değişimin peptit ya da disülfid bağlarının kopmasından ziyade bazı aminoasit yan zincirlerinin (özellikle histidin ve triptofan kalıntıları) parçalanması olduğunu göstermiştir (Schmidt ve ark., 1981; Batra ve ark., 1990). Bu değişiklikler, hormonal aktiviteyi, antijenleri, özgüllüğü, çözünürlüğü ve enzim aktivitesini etkileyebilir. Metilen mavisi, hemoglobin (Girotti ve ark., 1979) ve miyoglobin (Steveninck ve ark., 1984) gibi bazı proteinlerde sabit alt birimler içindeki bağlantıları fotosensitize etmesinin ve izole proteinlere zarar vermesinin yanı sıra kromatindeki DNA-protein bağlantılarını da fotosensitize ederek canlıya zarar vermektedir (Lalwani ve ark., 1990; Lalwani ve ark., 1991).

Fotosensitizasyonun bakteri dış membran yapısını da etkilediği son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Nitekim bu konuda yapılan çalışmada, Özkanca ve ark. (2002) toludin mavisi ilave edilen deniz suyu ortamında ışığın etkisi altında *S.tyhimurium* hücrelerinde dış membran porin protein miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir.

1.4.3. Fotosensitizer Maddelerin DNA'ya Etkisi

MM⁺- fotosensitizasyonunun çift zincirli DNA'da guanin bazlarının tahribine sebep olduğu, ayrıca hem immunolojik olarak hem de termal denatürasyon ısısındaki düşüş ile anlaşılabilir bir değişikliğe yol açtığı görülmüştür (Simon ve ark., 1962). Bunun sonucunda sensitize olan DNA'nın ısınması tek dizi kırılmalarına yol açmaktadır. DNA'nın fenotiazinyum boyaları da dahil birkaç boyayla foto indirgenmesi incelenmiş ve sonuçta bunların etkinliğinin Mb⁺>Ab⁺>Aa⁺, Tb⁺, Ac >Th⁺ sırasıyla değiştiği görülmüştür (Bellin ve ark., 1965). Metilen mavisi sensitizasyonu sonucu DNA'ya verilen zararda hem

denatürasyon öncesinde hem de sonrasında boyanın yoğunluğunda meydana gelen değişikliklere bakılarak kontrol edilmiştir (Speck ve ark., 1976).

Jel elektroforez yöntemleri ve 5'- ^{32}P - grubu restriksiyon fragmentleri kullanıldığında Mb^+ ile sensitize edilen DNA'nın sıcak piperidin ile işleme tabi tutulması sonucu meydana gelen tek dizi kırılmaların bütün guanin kalıntılarında görüldüğü belirtilmiştir (Friedmann ve ark., 1978). Daha sonra hem tek hem de çift zincirli DNA'nın bu şekilde kırılabilceği gösterilmiştir. Bu durum hematoporfirin'in gösterdiği duruma ters olup hematoporfirin oksijen için iyi bir kaynak olmakla birlikte sadece tek zincirli DNA'yı sensitize edebilmektedir (Kawanishi ve ark., 1986).

DNA'da meydana gelen oksidatif zararı daha iyi anlamamızı sağlayan önemli bir gelişme 8-hidroksi-deoksiganosin (8-OH-dG12) merkezinin bulunması olmuştur (Kasai ve ark., 1991). Bu iyonize radyasyon yada kimyasal kaynaklı hidroksil radikalleri ile muamele edilen DNA'nın enzimatik öz maddelerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak bulunmuştur (Floyd ve ark., 1986). Biyolojik olarak 8-hidroksi-deoksiganosin bölgesi hücre tarafından hızlı bir şekilde onarılabildiğinden tek zincir kırılmasından daha önemli bir lezyon meydana getirebilir, çünkü 8-hidroksi-deoksiganosin tamirde hatalı eşleşme vasıtasıyla mutasyona yol açabilir ve değişmiş bazların karşısına tamamlanmamış nükleotitlerle eşleşme olabilir. Floyd ve ark. (1989) 8-OH-dG12'nin, MB^+ 'nin varlığında DNA'nın hava ile temas ettirilen solusyonlarında fotoliziz sonucunda oluştuğunu göstermiştir. Diğer fenotiazinyum boyalarının da beyaz ışıqla muameleden sonra DNA'da 8-OH-dG12 bölgelerinin oluşumuna sebep olduğu görülmüştür (Floyd ve ark., 1990).

DNA yakınlarında sentezlenen hidroksil radikalleri pürin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyona sebep olur. Oksidatif stresten en çok etkilenen bazlar guanin ve sitozindir. Deoksiganosindeki 8 numaralı karbona bir oksijen atomu bağlanması 8-hidroksiganosini oluşturur. Bu bileşik fizyolojik pH'da 8-oksoguanosine dönüşür, bu da DNA'da anormal baz dizilişine ve böylece mutasyona sebep olur. Benzer şekilde, oksidatif şartlarda deoksisitozinden 5-hidroksisitozin meydana gelir (Halliwell, 1984).

etkilenmezler. Gerçek membran sistemlerinde hücre lizisine sebep olan faktör aminoasit yan zincirinin değişimidir (Valenzano, 1987). Singlet oksijen aktif bir tür ise bu, protein ve yağ asitleri ile reaksiyonundaki farklılığa bağlıdır (Vever-Bizet ve ark., 1989). Aslında hücre lizisine yol açan membran reaksiyon mekanizmasının lipit ve proteinler ile etkileşimi gibi bir seri faktöre bağlı olduğu düşünülmektedir. Güçlü bağ kurabilen boyaların tip I (direk bağlanma) boyalar olduğu ifade edilmektedir (Girotti, 1990).

1.5. Fotodinamik Terapi (FDT)

Antibiyotiklere bakterilerin artan direnci alternatif antimikrobiyal tekniklerin gelişmesine neden olmuştur. Örneğin fotosensitizer ve görünür ışığın kombine kullanımını içeren fotodinamik uygulama, suların, kan ve kan ürünlerinin dezenfeksiyonu ve mikroorganizmaların inaktivasyonu (Malik ve ark., 1990; Bertoloni ve ark., 1992; Nitzan ve ark., 1995; Gabor ve ark., 2001; Floyd ve ark., 2004) için yeni bir metod olarak ortaya çıkmıştır. Fotodinamik terapi (PDT) fotosensitizer olarak bilinen toksik olmayan boyanın belli doku ve hücrelere lokalize olabilen ve hedef hücrelere sitotoksik etki yapan serbest radikaller ve singlet oksijeni ortaya çıkarmak için uygun dalga boyunda düşük dozda görünür ışığın kullanılmasını içeren bir anlayışı ifade eder (Dougherty ve ark., 1998). Bakteri (Usacheva ve ark., 2001), fungus (Carre ve ark., 1999), ve virüsler (Floyd ve ark., 2004) gibi mikroorganizmalar uygun bir fotosensitizer ile muamele edildikten sonra görünür ışıkla öldürülebilirler (Gabor ve ark., 2001). Bu konuda yapılan bir çok çalışmada gram pozitif bakterilerin fotodinamik inaktivasyona (PDI) özellikle uygun olduğunu (Bertoloni ve ark., 1984) fakat gram negatif bakterilerin ve özellikle tümörlerin fotodinamik terapide yaygın olarak kullanılan çoğu fotosensitizere dirençli olduğu görülmüştür. Eğer fotosensitizer katyonik bir yüke sahipse (Merchat ve ark., 1996; Minnock ve ark., 1996) ya da bakteri membranı katyonik olmayan fotosensitizer ile birlikte tris/EDTA (Bertoloni ve ark., 1990) veya polimiksin nonapeptit (Nitzan ve ark., 1992) kullanılarak geçirgen hale getirilirse bu durumda gram negatif bakterilerin etkilendiği görülmüştür. Buna bağlı olarak yapılan çalışmalarda metilen mavisi

ve toludin mavisi O gibi katyonik fenotiazinlerin in vitro'da bakterilerin fotoinaktivasyonu için kullanıldığı tespit edilmiştir (Wainwright ve ark., 1998).

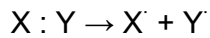
1.6. Oksidatif Stres

1.6.1. Serbest Oksijen Radikalleri

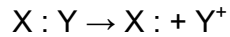
Oksijen çok küçük bir grup anaerobik bakteri hariç çoğu canlı organizmalar için temeldir. İlk olarak, oksidatif fosforilasyon işlemi esnasında ATP'nin oluşumuyla enerjinin ortaya çıkmasında oksijene ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlem oksijen molekülünün suya indirgenmesiyle alakalı olup aerobik organizmalara enerji sağlayan temel bir işlemdir. Ökaryotlarda oksidatif fosforilasyon mitokondride meydana gelmesine rağmen, bakterilerde plazma membranında görülür çünkü bunlar intraselüler membran yapısına sahip değildir.

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler. Dış yörüngedeki bu elektronlar paylaşılmadığında, ayrı ayrı orbitallerde bulunduklarında ve spinleri aynı yönde oldukları zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Oksijenin dış yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronun eklenmesi yaygın şekilde bulunan bu molekülü güçlü bir toksine bir serbest oksijen radikaline dönüştürür. Hücreler, radikallerin zararlı etkilerinden kendilerini koruyacak çeşitli enzimlere sahip olsalar bile yüksek reaktif oksijen metabolitlerinin meydana gelmesi zincir reaksiyonlarını başlatabilir ve hücrel hasara neden olabilir. Serbest radikaller üç yolla meydana gelir (Akkuş, 1995)

- Kovalent bağlı bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik olarak bölünmesi



- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün hidrolitik bölünmesi ki burada kovalent bağı oluşturan elektronlar her iki atomların birinde kalır. Böylece serbest radikal değil, iyonlar meydana gelir.



- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile radikal oluşabilir.

1.4.4. Fotosensitizer Maddelerin Lipitlere Etkisi

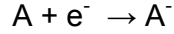
Serbest radikaller fazla miktarda oluştukları zaman hücrelerde çeşitli bozukluklara sebep olurlar. Biyomoleküllerin büyük bir kısmı serbest radikaller tarafından etkilenirler. Hücrelerde fotodinamik etki sonucunda en fazla etkilenen hücre kısmı lipitlerdir. Sensitizere ve şartlara bağlı olarak hem direk hem de radikaller aracılığıyla lipit peroksidasyonu meydana gelemektedir (Girotti, 1990). Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asiti zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar. Sonuçta yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikali meydana gelir (Akkuş, 1995).

Boyaların lipitler üzerindeki etkilerini incelerken genellikle model membran sistemi (fosfolipit membranlar, liposomlar ve veziküller) kullanılır, çünkü biyolojik membranların karmaşıklığı bunlarda yoktur. Fenotiazinyum boyalarının liposomlardaki (fosfolipitler / kolesterol kompozisyonu) fotodinamik etkisi üzerine yapılan çalışmalarda lipit peroksidasyon işlemlerinin lipozom lizisine yol açtığı gözlenmiştir (Anderson ve ark., 1973; Grossweiner ve ark., 1982). Ayrıca singlet oksijenin bundan birinci derecede sorumlu olduğu ifade edilmiştir. Aslında metanolde linoleate esterlerinin metilen mavisini fotooksidasyonu tip II mekanizmasıyla meydana getirilmiş (Chacon ve ark., 1988), ve metilen mavisinin fotodinamik etkisinin, lipozom lizisinin indüksiyonunda süperoksitten 200 kat daha fazla etkili olduğu ifade edilmiştir (Muller-Runkel ve ark., 1981).

1.4.5. Fotosensitizer Maddelerin Biyolojik Membranlara Etkisi

Biyolojik membranlar, fosfolipit ve lipozom kolesterolü ile proteinleri içerir ve bu bileşikler fotosensitizasyon sonucu oluşan bileşiklere duyarlıdır (Valenzano, 1987). Fakat glikoproteinlerin ve glikolipitlerin kalıntıları bunlardan



Oksijenin en bilinen türü temel haldeki triplet oksijendir ve $^3O_2$ olarak gösterilir. Ayrıca hidrojen peroksit, hipokloroz asidi, ozon ve singlet oksijen radikal olmayan reaktif oksijen türleridir. Singlet oksijen $^1O_2$, oksijenin daha yüksek enerjili bir halidir. En dıştaki eşleşmemiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitalde antiparalel spinler halinde bulunduklarında oluşurlar. Oksijenin bu hali oldukça reaktiftir ve canlı organizmalara hasar veren esas oksijen türlerinden biridir. Triplet oksijenin singlet oksijene dönüşmesi için ilave elektrona ihtiyaç yoktur. Fakat, elektronlardan birinin spinini değiştirmesi için enerji gerekir. Singlet oksijenin üretildiği bilinen en iyi yol triplet oksijenin görünür ışıkla olan reaksiyonudur. Singlet oksijenin yüksek oranda reaktif olmasından dolayı, biyolojik sistemlerde plazma membranında bulunan fosfolipitler gibi çeşitli hayati hücre bileşenlerinin oksidatif parçalanmasına yol açacak şekilde oksidatif reaksiyonlar meydana getirdiği bilinmektedir (Halliwell, 1984).

Oksidatif stresin, reaktif oksijenin süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) gibi araçları ortaya çıkarmasıyla meydana geldiği ve bunların proteinlere, nükleik asitlere ve hücre membranlarına zarar verdiği belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar ilerledikçe, meydana gelen kümülatif zararın, çeşitli hastalıklara katkıda bulunan reaktif oksijen türleri tarafından meydana geldiği de gösterilmiştir (Aruoma ve ark., 1998).

Bu oksidantların etkisinin, hipoklorous asit ($HOCl$) ve reaktif nitrogen ortamlı nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), peroksinitrit ($HOONO$) ne nitrosothiols ($RSNO$) tarafından meydana gelen zararla tamamıyla bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Hücreler oksidatif stresin zararlı etkisinden korunmak için, reaktif oksijen türlerini detoksifiye eden ve meydana gelen zararı tamir eden enzimleri sentezlerler.

1.6.2. Oksidatif Stresin Kaynağı

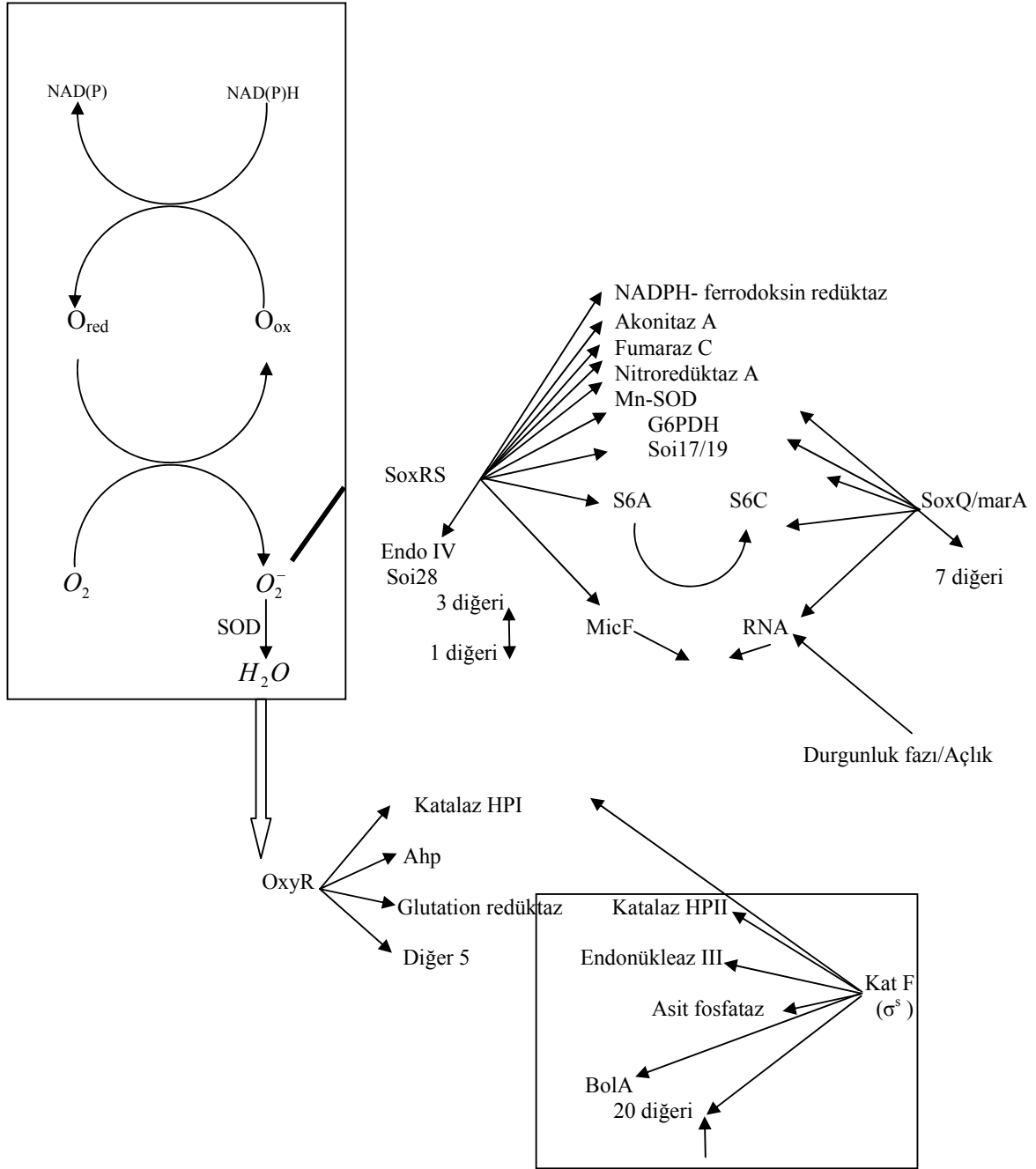
Oksidatif stres aerobik yaşamın ürünleriyle kaçınılmaz bir durumdur. Çünkü O_2^- ve H_2O_2 , moleküler oksijen kimyasal olarak elektron taşıyıcılarıyla oksidize olduğunda meydana gelir. Özellikle indirgenmiş flavoproteinler

E.coli'de bu işlemi başarıyla yaparlar. Exponential olarak büyüyen *E.coli*'de hem O_2° hem de H_2O_2 solunum zincirinde oksidasyonla ortaya çıkmaktadır (Gonzales-Flecha, 1995; Imlay ve ark., 1991). NADP dehidrogenaz II'nin flavini aerobik solunum zincirinde oksijene elektron transferinin kaynağıdır. Fakat beklentilerin aksine çok az yada hiç O_2^- veya H_2O_2 quinone oksidasyonu ya da oksijenin sitokrom oksidaza indirgenmesi esnasında oluşmaz (Messner ve ark., 1999). Anaerobik büyüme esnasında ortaya çıkan terminal bir oksidaz olan fumarat redüktaz oksijen ile çok hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve hücreler anaerobik durumdan aerobik ortama geçtiğinde özellikle oksidatif stresi meydana getirir (Imlay, 1995). Hem NADH dehidrogenaz II hem de fumarat redüktazın expressiyonu *E.coli*'de düzenlenmesine rağmen bütün bakterilerde bulunmayabilir. Endogenous oksidatif stresin miktarı büyüme ortamıyla yakından alakalı olarak değişebilir ve organizmadan organizmaya da farklılık gösterebilir. Aerobik *E.coli* O_2^- den korunmak için yeterli miktarda SOD sentezler. Bu sentezin miktarı O_2^- konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilir (Gort ve ark., 1998).

1.6.3. Dış Kaynaklı Oksidatif Stres

Redoks reaksiyonu hidrojen peroksite indirgenebilen süperoksit anyonunu ortaya çıkarır. Bu, katalaz, alkilhidroksiperoksid redüktaz, glutathione redüktaz ve 5 ilave proteinin expressiyonunu aktive eden OxyR proteinini oksidize eder. Benzer bir zincir reaksiyonunu süperoksit anyonu yapar, fakat bu Mn bağımlı SOD ve glukoz 6-fosfat dehidrogenazı içeren diğer bir grup proteinlerin expressiyonunu düzenlemektedir. Bunun kültür gelişimine bağlı olan efektör genler olduğu ve çoğunun ya da en az ikisinin efektör proteinlere bağımlı olduğu ifade edilmiştir. Örneğin exponential fazda HPI katalaz'ın expressiyonu OxyR tarafından düzenlenirken durgunluk fazında rpoS tarafından düzenlenmektedir. Buna benzer olarak soxRS regulonu'nun effektör proteinleri soxQ ve marA tarafından kontrol edilir (Lushchak, 2001).

Bazı efektör proteinlerin enzimler olduğu ifade edilmektedir. Örneğin Mn-SOD expressiyonuyla süperoksit anyonunda artış meydana gelmektedir.



Şekil 1.3 Farklı oksijen türlerine karşı hücre regülasyonlarının cevabı. *soxRS* ve *oxyR* regülasyonlarının düzenleme mekanizması. Endo IV, endonükleaz IV; G6PDH, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; S6A, S6C ribozomal protein S6'nın değişik formları; OmpF dış membran porin proteini (Lushchak 2001'den alınmıştır)

SOD aktivitesinde artış hücreler için zararlı da olsa hidrojen peroksitin konsantrasyonunu artırır. Bu yüzden *E.coli*'de HPI katalaz'ın aktivitesi OxyR'nin aktivitesine bağlı olarak artar. Sonuçta oluşan süperoksit hidroksil radikaline metabolize olmaz fakat su ve moleküler oksijene metabolize olur. Şekil 1.3'de stres reaksiyonunun genel bir şeması görülmektedir.

Diğer grup efektör proteinler glutathione redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimleri içerir. Glukoz-6-P dehidrogenaz, glutathion redüktaz tarafından glutathionun reduksiyonu için gerekli olan NADPH sağlar. Diğer bir grup ise hücrel bileşiklerin serbest radikal ürünlerini parçalar. Bunlar arasında bazıları endonükleaz IV ve alkilhidroksit redüktazdır. Birincisi DNA'daki zararı tamir eder ve ikincisi organik peroksidasi indirger (Lushchak, 2001).

Oksidatif strese bağlı olarak farklı proteinlerin ortaya çıktığı da görülmüştür. Örneğin, oksidatif stresin ortaya çıkmasına bağlı olarak bir grup oksidize protein ortaya çıkmıştır (Tamarit ve ark., 1998). Aerobik olarak büyüyen *E.coli* hücreleri hidrojen peroksit stresine maruz bırakıldığında, alkol dehidrogenaz E, uzama faktörü G, sıcaklık sok proteini DnaK gibi temel proteinler tanımlanmıştır. Benzer örnekler hücreler aerobik şartlar altında ve farklı demir konsantrasyonlarının varlığında da görülmüştür (Tamarit ve ark., 1998).

1.6.4. Oksidatif Hücre Zararının Mekanizması

O₂ ve H₂O₂ farklı kimyasal özelliklere sahiptir ve hücre içinde farklı tip zararlar ortaya çıkarır. Sitolik SOD bakımından eksik olan *E.coli* mutantlarıyla yapılan çalışmada, bunların fermente olmayan karbon kaynağını katabolize edemediği ve bu yüzden yüksek oranda ani mutasyonların ortaya çıktığı görülmüştür (Gisela ve ark., 1999).

H₂O₂ hücre büyümesini inhibe etmesine rağmen lezyon sebebi açık bir şekilde belirlenememiştir. Bununla birlikte H₂O₂ etkili bir şekilde enzim tiollerini oksidize ettiği ve muhtemelen gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz gibi enzimleri inaktive ettiği ifade edilmiştir. H₂O₂ demiri (Fe⁺²) HO° formuna dönüştürmede de rol oynamaktadır. HO° güçlü bir oksidanttır ve çoğu biyomoleküller ile

difüzyonun sınırlandırılmasında rol oynar. Çünkü demir nükleik asitlerin fosfodiester bağları boyunca yerleşir ve DNA özellikle HO[•]'nun hedefidir. H₂O₂ oluşumuyla meydana gelen hücre ölümünün çoğu muhtemelen DNA zararına bağlıdır (Imlay ve ark., 1988) ve bunun sonunda geniş bir DNA lezyonu oluşur (Aruoma ve ark., 1998). Bazlarda meydana gelen zararın çoğunda hatalı kodon oluşur ki bu lezyonlar aerobik büyüyen hücrelerde dış kaynaklı oksidantlar tarafından meydana gelir.

Fagositler tarafından serbest bırakılan reaktif nitrojen bakteriler için potansiyel toksik bir maddedir. NO[•], heme ya da sitokrom oksidaz'ın bakır sitesine bağlanarak in vitro'da bakterilerdeki solunumu bloke eder (Butler ve ark., 1997) ve bu tanımlanamayan demir-sülfür vasıtasıyla aconitazı inaktive eder (Gardner ve ark., 1997). NO[•] ve O₂^{•-} arasındaki reaksiyonla oluşan HOONO, dehidrat gruplarını hızlı bir şekilde oxide eden O₂^{•-} (Hausladen ve ark., 1994; Keyer ve ark., 1997) ve protein tiollerini oxide eden H₂O₂ (Radi ve ark., 1991) gibi bir oksidanttır. HOONO DNA'yı direk olarak okside edebilme yeteneğine sahip olan güçlü bir oksidanttır (Goldstein ve ark., 1996).

1.6.5. Oksidatif Strese Karşı Savunma Sistemi

Hücreler oksidatif stres tarafından meydana gelen zarara karşı korumada, normal büyüme esnasında düşük seviyede salgılanan antioksidan enzimlere ve tamir mekanizmalarına sahiptir. Artan O₂^{•-} ve H₂O₂ konsantrasyonuna tepki olarak birçok antioksidan proteinin salgılanması indüklenir. O₂^{•-} nin, SoxRS transkripsiyonel faktörü tarafından düzenlenen aktiviteler arasında SOD (*sodA* tarafından kodlanan), DNA tamir enzimi endonükleaz IV (*nfo*) ve fumarazın O₂^{•-}ye dirençli izozimleri (*fumC*) ve aconitase (*acnA*) bulunmaktadır (Jamieson ve ark., 1997). SoxRS'nin aktivasyonu hücrenin gücünü arttıran glukoz-6-fosfat dehidrogenazın (*zwf*) seviyesini arttırır ve demir birikimini azaltan ve ardından OH[•] oluşumunu azaltan Fur (*fur*) represörünün seviyesini azaltır (Jamieson ve ark., 1997). *tolC* tarafından kodlanan dış membran proteini, *arcAB* tarafından kodlanan drug efflux pump ve dış membran proteinlerinin ekspresyonunu baskılayan MicF, O₂^{•-} seviyesinin artmasına yol açan redoks olarak aktif bileşiklerin ortamdan

elimine edilmesine neden olur (Miller ve ark., 1996; Jamieson ve ark., 1997; Aono ve ark., 1998).

H₂O₂'nin sebep olduğu aktivitenin çoğunun ekspresyonu OxyR transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir. OxyR ise hidroperoksidaz I (katalaz, *katG*), hidroperoksid redüktazın iki alt ünitesi (*ahpCF*), glutaredoksin I (*grxA*), glutathione redüktaz (*gorA*) ve Fur represörünü (*fur*) içermektedir (Jamieson ve ark., 1997; Tao, 1997; Zheng ve ark., 1998). Bunun yanında, H₂O₂'ye karşı koruma aktivitesi OxyR'nin kontrolü altında olmayan, hidroperoksidaz II (*katE*) ve DNA tamir enzimi olan endonükleaz III (*xthA*), DNA polimeraz I (*polA*) ve Rec A'yı da içermektedir (Imlay ve ark., 1988; Jamieson ve ark., 1997).

O₂⁻ ve H₂O₂'nin sebep olduğu zarara karşı korumaya ilave olarak SoxRS regulonu, organik solventler ve reaktif nitrogen türleri gibi farklı maddelere karşı dirençte önemli koruma sağladığı (Miller ve ark., 1996; Nakajimi ve ark., 1995) ve OxyR tarafından düzenlenen aktivitenin HOCl, organik solventler ve reaktif nitrogen türlerine karşı dirençte önemli olduğu belirlenmiştir (Dukan ve ark., 1996; Ferrante ve ark., 1995; Hausladen ve ark., 1996; Chen ve ark., 1998). Örneğin, OxyR tarafından kontrol edilen AhpC proteininin reaktif nitrogen araçlarına özellikle peroksidaza karşı hücreleri koruduğu tespit edilmiştir (Chen ve ark., 1998).

1.6.6. Oksidatif Stres Regülununun Düzenlenmesi

1.6.6.1. SoxRS'nin Düzenlenmesi

SoxR, MerR familyasının transkripsiyonel aktivatörlerine ait olan 17 kDa bir polipeptittir (Amabile-Cuevas ve ark., 1991; Wu ve ark., 1991). Solusyonlarda bir dimer formundadır. Her bir monomer 2Fe-2S'lik grup içerir (Hidalgo ve ark., 1995; Wu ve ark., 1995). SoxR proteini *soxS* promotorunun -10 ve -35 arasında bulunan sistein grubuna lokalize olmuştur. Alışılmamış olan bu pozisyon *soxS* promotorunun -10 ve -35 hexamer yapısının sonuna 19 bp uzaklıkta bir mesafedir (Hidalgo ve ark., 1994).

E.coli'de 10 tane genden (Weiss ve ark., 1994; Gaudu ve ark., 1996) meydana gelen *soxRS* regülunu, hücreleri süperoksit anyon radikali, nitrik oksit

ve phenazine methosulfate, metil viologen gibi redoks döngüsü bileşiklerine karşı koruyan oksidatif stres cevap mekanizmasıdır.

soxRS ve oxyR regülonlarının tanımlanmasından sonra araştırmacılar bunları aktive eden intraselüler sensörleri araştırmışlardır. Demple'nin laboratuvarlarında *E.coli* hücrelerinde, soxR olarak adlandırılan genetik lokusun süperoksidi aktive eden 40 proteinin yaklaşık 9'unu pozitif olarak düzenlediği bulunmuştur (Greenberg ve ark., 1990). Proteinler transkripsiyonel seviyede ortaya çıkmaktadır. Burada antioksidant özellikte manganaz içeren SOD, endonükleaz IV (radikalin sebep olduğu DNA zararını tamir eden) ve glukoz 6 fosfat dehidrogenaz gibi en az 3 protein indüklenmektedir. SoxR regülonunun indüklenmesi dış membran proteini OmpF'nin seviyesini azaltır ve küçük ribozomal protein S6'nın seviyesini değiştirir.

soxR geninin ürünü SoxR proteini DNA'ya özel bir bölgeden bağlanır ve soxR genini aktive eder, bunda SoxS protein miktarını arttırdığı tespit edilmiştir (Demple ve ark., 1991; Hidalgo ve ark., 1997). Geni aktive eden bu protein, ki bu *E.coli*'nin korunması ile ilgilidir, süperoksit anyonunun ortaya çıkmasını artırır. Protein, *micF*, *zwf*, *nfo* ve *sodA* genlerinin promotorlarına bağlıdır. *micF* ve *zwf* promotorları ile SoxS'nin bağı bunlar ile RNA-polimerazın sonraki ilişkisini (interaksiyon) hızlandırır (Li ve ark., 1994; Ariza ve ark., 1995). Moleküler ağırlığı 12.9 kD olan küçük düzenleyici protein SoxS bakterilerde oksidatif strese tepkide *soxS* geninin direk bir induseridir, fakat bu transkripsiyon aktivasyonunda diğer proteoiteinlerin katılımına engel olmaktadır (Nunoshiba ve ark., 1993).

SoxR'nin aktivasyon mekanizması hakkında ne biliniyor? Protein 107 amino asit içerir ve hücrelerin antibiyotiklere direncinde önemli rol oynayan diğer bir düzenleyici protein ile yüksek oranda analogdur (De Groote ve ark., 1997). Her iki protein XylS-AraC protein ailesinin C-terminusuna homologdur ve hatta yaklaşık 100 amino asit içeren Rob proteininin N-terminusuna daha yakındır.

Saf SoxR proteini bir dimerdir ve bir nonheme demir içerir. Apoprotein oksijenin varlığında thioller (glutathione (Ding ve ark., 1996) yada merkapttoetanol (Hidalgo ve ark., 1994)) tarafından muameleyle meydana gelir.

Hem apo hem de demir içeren Sox R formunun yaklaşık olarak DNA'da benzer yüksek affiniteye sahip olduğu şaşırtıcı derecede bulunmuştur (Ding ve ark., 1996). Demir σ^{70} faktörü içeren RNA polimerazın başlamasını uyan SoxR-soxS kompleksinin promotor bölgesinin özel yapısını teşvik eder (uyarır) (Hidalgo ve ark., 1997). SoxR alışılmamış (nadir) transkripsiyon aktivasyonu olan bir yolla soxS promotoruna bağlanır. Bu -35 ve -10 arasında yaklaşık 18 baz çiftlik boşluğu kaplar. Dahası soxS promotorundaki bu elementler arasındaki mesafe optimal değildir.

SoxRS'nin aktivitesi hücrenin azalan gücünü arttıran glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (zwf) seviyesinin artmasına sebep olur ve demir birikimini azaltan Fur (fur) represörünün seviyesini artırır ve ardından OH'nın oluşumunu azaltır (Jamieson ve ark., 1997). Dış membran proteinlerini kodlayan tolC, ilaç akış pompaları kodlayan acrAB ve dış membran porinlerin expressiyonunu sınırlayan MicF düzenleyicilerinin hepsi, muhtemelen O_2^- seviyesinin artmasına yol açan redox-active bileşiklere engel olmaktadır (Miller ve ark., 1996; Jamieson ve ark., 1997; Aono ve ark., 1998).

SoxRS tarafından düzenlenmeyen O_2^- zararına karşı koruma sağlayan 2 enzim sitosolik Fe-SOD (sodB) ve periplazmik Cu-Zn SOD (sodC)'dir (Fridovich, 1995; Gort ve ark., 1999).

1.6.6.2. OxyR'nin Düzenlenmesi

OxyR polipeptidi, solusyonda tetramer yapıda ve 34 kDa kütleyle sahiptir. OxyR LysR familyasına ait bir protein olup (Christman ve ark., 1989) nitrosothiollerden sorumludur (Hausladen ve ark., 1996). OxyR tarafından aktive edilen genler *dps* (DNA ve demir bağlama proteini), *gorA* (GSH redüktaz), *grxA* (glutaredoksin), *katG* (peroksidaz), *ahpCF* (alkil hidroperoksit-NADPH oksido-redüktase) ve *fur* içerir. Bu yapıların çoğunun, katalaz tarafından hidrojen peroksitin uzaklaştırılması ve oksidatif ataklardan Dps proteinleri vasıtasıyla DNA'nın korunması gibi hücrelerin antioksidant savunmasında rolleri olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

OxyR proteini, H_2O_2 seviyesinde meydana gelen artışa tepki olarak duyarlı bir sensör rolü oynar. Bu LysR familyasının transkripsiyon

aktivatörlerinin bir üyesidir ve tetramer yapısı iyi karakterize edilmiştir (Hidalgo ve ark., 1998). Protein, oksidize ve reduce formda olmak üzere iki formda gözlenir ve sadece oksidize formu transkripsiyonu aktive eder (Jamieson ve ark., 1997). OxyR'nin direk oksidasyonu bu regülunun aktivasyonundan sorumludur (Jamieson ve ark., 1997; Tao ve ark., 1993). Her iki OxyR formu DNA'ya bağlanır, fakat bunların farklı bağ özelliklerine sahip oldukları gözlenmiştir. Reduce olanı oxyR ve mom promotorlarına bağlanabilir, fakat katG ve ahpC promotorlarına bağlanamaz. Oksidize OxyR'nin OxyR'yi düzenleyen bütün promotorlara bağlandığı bulunmuştur. Bağlanmadaki farklılık OxyR'nin farklı şartlar altında farklı fonksiyonları yapmasına müsaade edebilir. OxyR normal büyüme esnasında oxyR ve mom promotorlarını baskılar ve oksidatif stresden sorumlu katG ve ahpC'yi aktive eder. OxyR RNA polimerazın promotora bağlanmasını artırarak transkripsiyonu aktive eder ve transkripsiyonu aktive etmek için RNA polimerazın α -subünitesinin karboksil terminal kısmı üzerinde özel yüzeylere gerek duyduğu görülmüştür (Jamieson ve ark., 1997; Tao ve ark., 1995).

H₂O₂'deki bir artış OxyR'nin Cys-199 kısmının ve ardından Cys-208 kısmının oksidasyonuna sebep olur (Zheng ve ark., 1998). Bu intramoleküler disülfid bağının oluşumuna neden olur. İki sistein kısmı yüksek oranda korunur ve onların ürünleri direk olarak proteini inaktive eder. Dahası, bu sistein 199 ve 208 arasındaki intramoleküler disülfid bağının oluşumu, transkripsiyon faktörü OxyR'nin aktivasyonunda konformasyonel bir değişiklik ortaya çıkarır.

H₂O₂ tarafından OxyR'nin aktivasyonu geçişli bir işlemdir. Yabanıl tip türlerde oxyR RNA'nın sentez edilmiş miktarı H₂O₂ ile karşılaştıktan sonra 10 dk içinde maksimum seviyeye ulaşır ve 60 dk sonra başlangıç seviyesine döner. Bununla birlikte OxyR protein miktarı H₂O₂ muamelesinden sonra değişmez. Bu gözlemler proteinin, intramoleküler Cys-199-Cys-208 disülfid bağlarının redüksiyonuyla inaktif olduğunu ortaya çıkarmıştır (Zheng ve ark., 1998).

1.6.6.3. Oksidatif Strese Cevapta Diğer Düzenleyici Sistemler

SoxR ve OxyR'ye ilave olarak diğer birçok transkripsiyonel düzenleyiciler, SoxRS/OxyR regülunu ve diğer düzenleyici sistemler arasında geniş bir ilişki

gösteren antioksidant genlerin ekspresyonunu düzenler. RNA polimerazın rpoS'yi kodlayan σ^S subünitesi hücreler osmotik stres, açlık stresi ve asit stresini içeren farklı bir grup strese maruz kaldığında bir grup genin ekspresyonu için önemlidir (Loewen ve ark., 1998). Aç ve durgun faz hücreleri yüksek seviyede H_2O_2 içeren çeşitli stres şartlarına dirençlidir ve σ^S 'nin katE, xthA ve sodC içeren birkaç antioksidant genin ekspresyonunu düzenlediği görülmüştür (Loewen ve ark., 1998). SoxRS düzenleyen pqi5 geni ve OxyR'yi düzenleyen katG, gorA ve dps genleri σ^S regülununun da bir parçasıdır (Loewen ve ark., 1998).

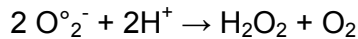
Aerobik regülatörler FNR ve ArcAB, SoxRS'yi düzenleyen sodA, acnA ve fumC geninin ekspresyonunu düzenler ve FNR sodC'yi kontrol eder (Compan ve ark., 1993; Cunningham ve ark., 1997). Aynı zamanda iki SoxS homoloğu MarA ve Rob SoxRS regülönünde hemen hemen bütün genleri düzenler (Miller ve ark., 1996).

1.6.7. Antioksidantlar

Normal metabolik reaksiyonlar sırasında, hücre içinde serbest radikallerin ortaya çıkmasından dolayı tüm aerobik organizmalar hücre hasarından kendilerini korumak için antioksidant savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Antioksidantlar, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirme veya engelleme özelliğine sahiptirler.

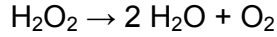
1.6.7.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Tüm canlı varlıklar oksijenin toksik etkisine maruz kalmaktadırlar. 1969'da keşfedilen SOD bu tehlikeye karşı korumada önemli enzimlerden biridir. Süperoksidin tek elektronunu uzaklaştırarak hidrojen peroksit ve oksijen oluşumunu katalizler. Bu ise daha sonra katalaz ve glutathione peroksidaz tarafından detoksifiye edilir (Rengel ve ark., 2002).



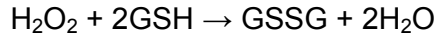
1.6.7.2. Katalaz (Catalaze)

Hücre içi oksidatif reaksiyonlar moleküler oksijeni hidrojen perokside dönüştürür. Katalaz bütün makromolekülleri peroksitlerin yıkıcı etkisinden korumaktadır. H_2O_2 'yi parçalayarak su ve oksijene dönüştürür ve böylece hücreleri H_2O_2 'nin zararlı etkisinden korur.

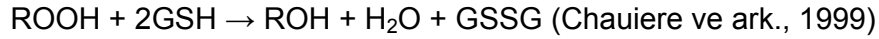


1.6.7.3. Glutatyon Peroksidaz

İlk olarak 1957'de hayvan hücrelerinde bulunmuştur. H_2O_2 'nin hücreden uzaklaştırılmasında veya organik hidroperoksitlerin alkole indirgenmesinde etkili olan başlıca enzimdir (Türe, 1998).



Veya



Redükte glutatyon

indirgen glutatyon

1.7. Bakterilerin Deniz Suyundaki Yaşamına Açlık Stresinin Etkisi

Enterik bakterilerin sucul çevrelerdeki yaşamlarını kontrol eden faktörler yıllardır bilim adamları tarafından araştırılmaktadır (Mitchell ve ark., 1968; Christensen ve ark., 1980; Gauthier ve ark., 1988; Munro ve ark., 1989; Davies ve Evison, 1991; Sorensen, 1991; Garcia-Lara ve ark., 1993; Troussellier ve ark., 1998).

Çeşitli besinler açısından açlık (oligotrofi) deniz suyunda bakterilerin karşılaştıkları en önemli sorunlardan birisi olup, aktivite kaybının temel sebebidir (Rozen ve Belkin, 2001). Besin sınırlaması, bakterilerin sitoplazmik membran transport sistemlerini indükler ve dış membran permeabilitesini arttırarak besin toplama yeteneğini yükseltir (Ferenci, 1999). Aynı zamanda bakteride galaktoz ve maltotrioz gibi indükleyicilerin, anhidroglucitol, AcP, cAMP, ppGpp, polyfosfat gibi sinyal moleküllerinin miktarlarında köklü değişimlere neden olur (Ferenci, 1999; Liu ve Ferenci, 2001). Ayrıca RpoS, besin sınırlaması ile etkilenir ve bu faktöründe çok sayıda genin sentezini düzenlediği bilinmektedir (Henge-Aronis,

1999). Açlık stresine uzun süre maruz kalan bakterilerin morfolojik olarak küçüldüğü tespit edilmiş, ve bu durum minyatürizasyon olarak adlandırılmıştır (Rozen ve Belkin, 2001).

Deniz suyunda açlık stresinde bakterilerin hücre büyüklükleri, DNA içeriği ve RNA içeriğinde kademeli olarak bir azalma görülmektedir. *Salmonella spp* ve *Alteromonas haloplanktis* ile yapılan bir çalışmada yapay deniz suyu ortamındaki 42 günlük inkübasyon sonunda 16S rRNA oranında kademeli bir azalma gösterilmiştir (Lebaron ve Joux, 1994). Deniz suyuna adapte edilmiş *E.coli* hücrelerinin adapte edilmemiş hücrelerden daha canlı ve metabolik olarak aktif kaldıkları bilinmektedir (Garcia-Lara ve ark., 1993). Açlık sırasında bakterilerin daha hidrofobik ve yapışkan oldukları ortaya konmuştur. Membran yağ asitlerinin değiştiği, hücre duvar aminoasitlerinde ve kromozom topolojisinde değişimler olduğu, ozmotik stres, oksidatif stres ve ısıya karşı genel bir direnç artışı gerçekleştiği tespit edilmiştir (Roszak ve Colwell, 1987a; Pichereau ve ark., 2000). Ayrıca porin proteinlerinden OmpC ve OmpF'nin sentezinin de açlık stresi ile değiştiği tespit edilmiştir (Liu ve Ferenci, 1998; Özkanca ve Flint, 2002).

1.8. Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (Dormansi) (VBNC)

VBNC, bazı araştırmacılar tarafından stres şartları altında hücre tamamen yok olana kadar hücrelerin zayıflaması olarak tanımlanmaktadır (Bogosian ve ark., 1998), ve bu hücrelerin metabolik aktiviteyi sağlayabildikleri, solunum yapabildikleri fakat geriye dönüşümlerinin olmadığını ileri sürülmektedir. VBNC durumu ilk olarak Xu ve ark. (1982)'nin *E. coli* ve *V. cholerae* ile deniz suyunda yaptıkları çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Deniz suyundaki bakterilerin kültürel ortamda yapılan sayımlarında, sayılarının hızlı bir azalma gösterdiğini, fakat mikroskopik sayılarının azalmadığını tespit etmişler ve bu sonuçlardan VBNC durum ile ilgili ilk verileri ortaya koymuşlardır (Xu ve ark., 1982). Colwell ve ark. (1989) VBNC durumdaki bir bakteriyi, büyümenin normal olarak yapılabildiği şartlarda hücre bölünmesini yapamayan, fakat metabolik olarak aktif bir hücre olarak tanımlamıştır. Yapılan çalışmalarda geleneksel metodlar ile yapılan koloni sayımlarında ortamdan bakteri izole edilememiş, fakat direkt floresans

boyamalar ile 10^3 /ml kadar aktif bakterinin olduğunu görülmüştür, buna göre bakterilerin büyük oranda VBNC durumda olduğu belirlenmiştir (Tanaka ve ark., 2000). Yine başka bir çalışmada yer altı sularındaki bakterilerden yalnızca %1'inin farklı kültürel ortamlarda tespit edilebildiği, bir çok bakterinin solunum aktivitesi göstererek VBNC durumda olduğu ortaya konmuştur (Ultee ve ark., 2004).

Bakterilerin, sıcaklık, açlık, ozmolarite, ışık ve fotosensitizerlerin var olduğu ekstrem çevre şartlarında VBNC duruma girdiği bir çok çalışma ile gösterilmiştir (Weichart ve ark., 1997; Lesne ve ark., 2000; Muela ve ark., 2000). Bu faktörler arasında özellikle ışık ve ışığın etkisi altında ortamda bir fotosensitizerin varlığında meydana gelen fotooksidasyon esnasında bakterilerin canlı fakat kültürü yapılamayan bir durum içine girdiği belirlenmiştir (Fiksdal ve ark., 1999; Özkanca ve ark., 2002). Fiksdal ve Tryland (1999) yaptıkları çalışmalarda, farklı ışık şiddetlerinin *E. coli* hücrelerinin dormanta girmesine neden olduğunu ve bu durumda bakteride β -galaktosidaz gibi enzimatik fonksiyonların hala devam ettiğini belirlemişlerdir.

Kültürü yapılamayan hücrelerin, uygun floresans probalar, flow sitometri veya epifloresan mikroskop kullanılarak, besin alımı, solunum, membran permeabilitesi, enzimatik aktiviteleri içeren hücresel fonksiyonlarının ölçülmesi ile canlılıkları ortaya konabilmektedir (Joux ve ark., 1997). Buna rağmen VBNC durumu belirleyen çalışmaların çoğunluğu tek bir hücre fonksiyonunun ölçülmesini temel aldığı için kültürü yapılabilen ve canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) arasındaki geçiş durumunun mekanizması hala anlaşılamamıştır (Joux ve ark., 1997; Villarino ve ark., 2003). Kültürü yapılamayan hücrelerin canlılığını ölçmek için bir çok metod önerilmiştir. Ancak bütün çevresel şartlarda ve bütün bakterilerde uygulanabilecek bir metod geliştirilememiştir. Kullanılan metodlar ya hücresel aktiviteleri yada hücre bütünlüğünü temel almıştır. Bu metodlardan Radio işaretleme (Roszak ve Colwell, 1987a), INT ve CTC ile elektron taşıma aktivitesinin belirlenmesi (Zimmerman ve ark., 1978; Rodriguez ve ark., 1992; Joux ve ark., 1997; Baffone ve ark., 2003; Laflamme ve ark., 2004), ve substrat cevabı veren bakterilerin mikroskopik sayımı (Kogura ve ark., 1979; Oliver ve Bockian, 1995;

Braux ve ark., 1997; Yokomaku ve ark., 2000) oldukça yoğun bir şekilde uygulanmıştır. Substrat cevabı veren bakterilerin mikroskopik sayım metodu (DVC) ilk kez Kogure ve ark. (1979) tarafından uygulanmıştır. Bu metod, bakterilerin besin maddesi ile birlikte DNA sentezini engelleyen bir antibiyotik (nalidixic asit gibi) ilave edilerek belirli bir sıcaklıkta inkübe edilmesi ile gerçekleştirilir. Sonucunda besin kullanarak metabolik fonksiyonlarını yerine getiren, ancak bölünemeyen, dolayısı ile normalden oldukça uzamış olan hücreler elde edilmektedir. Bu hücreler floresan bir boya olan Acridin orange ile boyanarak mikroskopta gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarla *Salmonella spp*'nin VBNC duruma girdiği farklı çevresel şartlar altında direk canlı sayımı metodu ile belirtilmiştir (Roszak ve Colwell, 1987b; Chmielewski ve Frank, 1995). Uzamış hücrelerin oranı kültürü yapılabilen hücrelere göre bir fark göstermemiş, bu durum metabolik aktivite kaybı ve kültürünün yapılabilirliğinin kaybı arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır (Joux ve ark., 1997). Ancak bazı çalışmalarda ise koloni sayımı ile direkt sayım arasında fark olduğu ve direkt sayım sonuçlarının fazla çıktığı bulunmuştur (Oliver ve Bockian, 1995). Joux ve ark. (1997) çalışmalarında *S. typhimurium*'u 19 gün yapay deniz suyunda inkübasyona bıraktıklarında açlık stresi ile önce kültürü yapılamaz duruma girdiği, aynı zamanda substrat cevabının kaybolduğu, daha sonra gerçek ve potansiyel solunum aktivitesini ve son olarakta membran permeabilitesini kaybettiğini tespit etmişlerdir. Elektron taşıma sistemi (ETS) canlılığın bir göstergesi olarak düşünüldüğünde, solunum aktivitesi ölçülerek canlılık tespiti yapılabilir. INT başta olmak üzere CTC, TTC, XTT gibi redoks boyaları deniz suları (Pommepuy ve ark., 1996; Caruso ve ark., 2003), nehir suları (Tanaka ve ark., 2000), içme suları (Schaule ve ark., 1993), mineral suları (Ramalho ve ark., 2001), atık sular (Van Elsas ve ark., 2001), yer altı suları (Rodriguez ve ark., 1992; Ultee ve ark., 2004), toprak (Yu ve ark., 1995), sediment (Proctor ve Souza, 2001), nehir biofilmlerini (Schaule ve ark., 1993) içeren çevresel şartlarda yıllardır mikroorganizmaların solunum aktivitelerini ölçmek için kullanılmıştır. Bakterilerin solunum aktivitelerini ölçmek için ilk olarak INT kullanılmıştır (Zimmerman ve ark., 1978). Daha sonra CTC, tümör hücrelerinde solunum aktivitesinin bir indikatörü olarak tanımlanmış ve ilk olarak

Rodriguez ve ark. (1992) tarafından ekolojik örneklerden bakterilerde uygulanmıştır. INT ve CTC boyları bir elektron akseptörü olup, INT formazan ve CTC formazan olarak hücre içinde elektron taşıma zincirindeki dehidrogenaz enzimleri ile redüklenir (Hatzinger ve ark., 2003). Tetrazolium redoks boyları ETS bileşikleri ile mikrobiyal oxidation ve redüksiyon reaksiyonlarından elektronları toplar ve intrasellüler olarak renklenmiş formazan çökeltileri şeklinde, metabolik olarak aktif mikroorganizmalarda birikir. Bu renklenmiş çökelti, direkt epifloresans mikroskopta veya hücre ekstraktları ile spektrofotometrik olarak belirlenebilir (Rodriguez ve ark., 1992, Yu ve McFeters, 1994). Ayrıca bu metod sağlam nükleik asitlerin göstergesi olan Akridin orange direkt sayımı (Oliver ve Bockian, 1995) veya DAPI boyaması (Ullrich ve ark., 1996) ile birlikte kullanılır.

VBNC olan bakterilerin yeniden canlanabilme yeteneğinde olup olmadığı ve patojenik organizmalardaki VBNC durumda virulans özelliği taşıyıp taşımadıkları en temel sorulardan birisidir. Potansiyel patojenitenin korunduğu bir çok in vivo yeniden aktivite kazanma çalışmaları ile ortaya konmuştur.

Yapılan çalışmalarda kültürü yapılamayan hücrelerin hayvansal pasajlarda yeniden canlandığı, birçok durumda virulansını tekrar kazandığı ortaya konmuştur. *E. coli* VBNC hücreleri kültürü yapılamayan duruma dönüştürüldükten sonra tavşan ince bağırsağına verilmiş ve burada yeniden canlandıkları gösterilmiştir (Grimes and Colwell, 1986). Bu sonuçlar gösteriyor ki bakteriler VBNC duruma girdikten sonra da hastalık yapma kapasitelerini tekrar kazanmakta veya hiç kaybetmemektedirler. Bu durum da deniz suyunu kullanmakta olan insanlar için tehlikeli durum ortaya koymaktadır. Çünkü geleneksel metotlarla (örneğin koloni sayımı) ortamdaki tespit edilemeyen bakteriler (bilhassa patojenler) herhangi bir yolla insan vücuduna bulaştıktan sonra tekrar aktivite kazanmakta ve bu da insan sağlığını direk ilgilendirmektedir.

1.9. Çalışmanın Amacı

Fotodinamik terapi (PDT) son yıllarda kullanılmaya başlanan bir uygulamadır. Bu olay fotosensitizer olarak bilinen toksik olmayan bir boyanın

belli doku ve hücrelere lokalize olabilen ve hedef hücrelere sitotoksik etki yapan serbest radikaller ve singlet oksijeni ortaya çıkarmak için uygun dalga boyunda düşük dozda görünür ışığın kullanılmasını içeren bir anlayışı ifade etmektedir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, görünür ışık kaynaklarının bakteriler üzerine etkili olduğu ve bu etkinin ortama bir fotosensitizer madde ilave edildikten sonra daha hızlı ve kısa sürede olduğu belirlenmiştir. Böyle durumlarda bakterilerin canlı fakat kültürü yapılamayan bir durum içerisine girdiği ve böylece daha uzun süre yaşama yeteneği geliştirdiği görülmüştür. Buradan yola çıkarak *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* bakterilerinin, farklı dalga boylarında ışık kaynağının etkisi altında deniz suyu ortamına bir fotosensitizer madde ilave edilerek veya sadece deniz suyunun bulunduğu ortamda dormanta girip girmediği belirlenmeye çalışılmış ve ışık kaynağı ile dormansi arasındaki ilişki belirlenmiştir.

Ayrıca, deniz suyunda farklı dalga boylarında ışık kaynakları kullanılarak bir fotosensitizer olan ve fotodinamik terapide ilk olarak kullanılan metilen mavisinin bulunduğu ortamda veya sadece deniz suyunda, bakterilerin yaşamında, oksidatif stres enzimlerinde, lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Buradaki amaç, bakterilere en etkili olan dalga boyunu tespit etmek ve buna bağlı olarak enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu arasında bağlantı kurmaktır.

Açlık da bakterileri yaşadıkları ortamda etkileyen diğer bir önemli çevresel faktördür. Açlık ve oksidatif stres ile ilgili çalışmalar sonunda, açlığa bırakılan bakterilerin oksidatif strese daha dayanıklı olduğu önceki yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Burada 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa bırakılan bakterilerde gün sayısına bağlı olarak oksidatif strese dayanıklılıkta herhangi bir değişikliğin olup olmadığı araştırılmış ve kaç gün açlığa bırakılan bakterilerin oksidatif strese karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmeye çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bakteri Suşları

Yapılan çalışmalarda *Escherichia coli* W3110 ve *Salmonella typhimurium* LT2 bakterileri kullanılmıştır. Bakteri suşları Nutrient broth besiyerinde 37°C de 24 saat 150 rpm'de sallayıcıda sallanarak inkübe edildi. Her bakteri suşu 20%'lik gliserol içeren Nutrient broth'lu ortamda derin dondurucuda stoklanmış ve gerektiği zaman stoklardan pasajları yapılarak kullanılmıştır.

2.2. Besiyerleri

2.2.1. Nutrient Agar Besiyeri

Bu besiyeri bakterilerin stok olarak buzdolabında saklanması ve koloni sayımlarında kullanılmıştır. 20 gr Nutrient agar (Merck) 1 L distile suda eritilerek otoklavda (Nüve) 121 °C'de 15 dk steril edildi ve petrilere dökülerek hazırlandı. Petrilere döküldükten sonra oluşan su damlalarının uzaklaşması için besiyeri 3 gün oda sıcaklığında bekletildi.

2.2.2. Nutrient Broth Besiyeri

Nutrient brot besiyeri bakterilerin üretilmesinde ve zengin besiyerinde porin protein sentezinin araştırıldığı deneylerde üreme ortamı olarak kullanıldı. 8 gr Nutrient brot (Merck) tartılarak 1 L suda eritildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edildi.

2.2.3. Eosin Metilen Blue (EMB) Besiyeri

EMB besiyeri (Acumedia) doğal deniz suyu çalışmalarında *E. coli*'nin sayımlarını, Nutrient agar besiyerinde yapılan sayım sonuçları ile karşılaştırmak amacı ile kullanıldı. 36 g EMB 1 l distile suda eritildi ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi.

2.2.4. Deniz Suyu

Bu çalışmada kullanılan deniz suyu, kıydan yaklaşık 500 metre açıktan, 0.5 metre derinlikten, dalgadan uzak, koy benzeri bir yer olan Samsun ilinin Baruthane mevkiinden alındı. Su örnekleri steril 500 ml'lik şişeler ile alındıktan hemen sonra laboratuara getirilmiş, Whatmann No 1 (Whatmann) filtre kağıtları ile filtre edilerek fiziksel partiküllerinden arındırıldı. Daha sonra, yapılacak çalışmaların amacına göre deniz suları hazırlandı ve erlenler alüminyum kağıt ile kaplanarak, 121°C'de 15 dk. otoklav ile steril edildi.

2.3. Deneylerde Kullanılan Işık Kaynakları

Yapılan çalışmalarda, beyaz ışık (400-700 nm), mavi ışık (400-500 nm), yeşil ışık (500-600 nm), kırmızı ışık (600-700 nm) ve UV-A ışık kaynakları kullanılmıştır. Burada beyaz, mavi, yeşil ve kırmızı ışık kaynağı olarak Osram L 18W/66 florasan lambalardan her bir çalışma için 8 tane kullanılmıştır. UV-A için ise Osram Eversun L 40W/79K florasan lambalardan her bir çalışma için 4 tane kullanılmıştır.

2.4. Ringer Solüsyonu

Bakteri sayımları sırasında sulandırma için kullanıldı. Hazır olarak satılan Ringer (Merck) tabletlerinden 1 tablet 500 ml saf suda çözülerek hazırlandı. 1/9 oranı göz önünde bulundurularak 4.5 ml deney tüplerine aktarıldı ve 121 °C'de 15 dk. otoklav ile steril edildi.

2.5. Bakteri Yaşam Deneyleri

2.5.1. Koloni Sayımı

Deniz suyunda bakterilerin yaşam sürelerine etkileri Nutrient Agar besiyerlerinde yayma plak tekniği kullanılarak tespit edildi. Deniz suyundan alınan 0.5 ml'lik örnekler 4.5 ml ringer solüsyonlarında 10 tüpe kadar sulandırıldı. Daha sonra her tüpten 100 µl örnek alınarak besiyerlerine aktarıldı. Alkol ile yakılmış cam çubuk ile yayılarak inkübasyona bırakıldı. 37 °C'de 36 saat inkübasyon sonunda koloniler sayılarak kaydedildi. Daha sonra petrilere 48

saat daha oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar sayımları yapılarak daha önce yapılan sayımlarda bir değişim olup olmadığı kontrol edildi.

2.5.2. Bakterilerin Açlıkla Ön Muamele Edilmesi

250 ml'lik erlen mayerlere 100'er ml deniz suyu ilave edilerek filtre otoklav yapıldı. Bir gece inkübatörde büyütülen bakteri örneklerinden 10 ml alınıp 2 kez yıkandıktan sonra önceden filtre otoklav yapılan erlenlere ilave edilir. Hazırlanan örnekler 25°'de inkübatöre konur. Bakteriler inkübatörde 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa maruz bırakıldı.

250 ml'lik beherlere 100'er ml deniz suyu ilave edildi ve filtre otoklav yapıldı. Yukarıda hazırlanan açlık örneklerinden 10 ml bakteri örneği alınarak önceden hazırlanan bu beherlere ilave edildi. Daha sonra hazırlanan bu bakteri örnekleri farklı dalga boylarında ışık kaynaklarına maruz bırakılarak yaşamlarına bakıldı. Sonuçlar logaritmik olarak hesaplandıktan sonra grafikleri çizildi.

2.5.3. Direkt Mikroskopik Bakteri Sayımı

2.5.3.1. Kullanılan Stoklar

Acridin Orange: 0,05 gr acridin orange 100 ml tampona ilave edilerek hazırlandı.

Tampon: 6.6 mM pH 6.7 fosfat tamponu hazırlandı ve bu tamponda %0.01 konsantrasyonda Acridin orange stok solüsyonu hazırlandı. Alüminyum folyo ile kaplanarak 4 °C'de karanlıkta saklandı.

Nalidiksik asit: Nalidixic asit (Sigma) antibiyotiğinin stok solüsyonu, 0.1 mgr/ml konsantrasyonda 0.05 M NaOH (Merck) de çözülerek hazırlandı ve karanlıkta 4°C'de saklandı. Örnek 0,2 milipore filtreden geçirilerek steril edildi.

2.5.3.2. Bakterilerin Mikroskopta Sayımı

Bu sayımda Kogure ve ark. (1979)'nın uyguladığı metod modifiye edilerek kullanıldı. Nalidixic asit genellikle gram (-) bakterilerde kullanılan, replikasyonu engelleyen bir antibiyotiktir. Bu sayımda deniz suyuna ilave edilen

Nutrient broth ile bakterilerin beslenmesi sağlanırken, bu antibiyotik ile bölünmeleri engellenerek besin alıp kullanabilen bakterilerin sayılarında artış olmadan sayımları yapılmaktadır. Böylece besini alıp kullanabilen bakterilerin mikroskopik sayıları tespit edilmektedir. Deniz suyu örneklerinden 1 veya 5 er ml alınarak steril deney tüplerine koyuldu. Üzerine %10 Nutrient brot ve 10 µg/ml son konsantrasyonu olacak şekilde Nalidixic asit ilave edildi. Örnekler alimünyum folyo ile kaplanarak çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 160 rpm hızda 6 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerle son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde %37'lik formaldehit ilave edilerek bakterilerin ölmesi sağlandı. Örnekler steril enjektör yardımı ile alınarak Swinnex filtre kutuları arasına yerleştirilmiş polikarbonat membran filtrelerden geçirilerek bakterilerin filtrelerde kalması sağlandı. Filtreler daha sonra 0.5 ml Acridine orange ile 10 dk. boyandı. Boyama işleminden sonra filtreler alınarak havada kurutuldu. Sayım yapılana kadar buzdolabında saklandı. Sayımlar epifloresan mikroskopta (Nikon eclipse E600) UV ışığı altında yapıldı. Okülere yerleştirilmiş olan kareli bir camın 100'lük objektifte görüntü alanındaki büyüklüğü tabla ve oküler mikrometre ile hesaplandı. Okülerden bakıldığında kareler içinde kalan mikroorganizmaların sayımı yapıldı. Her bir örnek için en az 20 kareli alanın sayımı yapıldı. Sayım sırasında normal boyutlardan en az 3 kat büyük olan bakterilerin sayımı yapılarak direk canlı bakteri sayımı (mikroskopik sayım) olarak kaydedildi. Ayrıca uzamayan küçük bakterilerde sayılarak kaydedildi. Uzamamış ve uzamış olan bakterilerin sayıları toplanarak toplam bakteri sayısı olarak kaydedildi. Elde edilen sayılar logaritmik değerlere çevrildi.

2.5.4. Solunum Yapan Bakterilerin Sayımı

2.5.4.1. Kullanılan Stoklar

CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazoliumchloride): 6,6 ml steril saf suya 100 mlgr CTC ilave edilerek hazırlandı. Alüminyum folyo ile kapatıldı. Kullanılincaya kadar buzdolabında saklandı.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole): 0,0015 gr DAPI 2 ml suda çözülerek stok hazırlandı. Stoktan 100µl örnek alındı 5ml steril saf suya ilave edilerek kullanılacak olan solusyon hazırlandı.

Polikarbonat Filtre: 25 mm 0,2 µm por çapına sahip filtreler 48 saat Sudan Black B boyasında 48 saat bekletildikten sonra kullanıldı.

Sudan Black B: 0,006 gr Sudan Black B 50 ml etanol'de çözülür. Üzerine 50 ml double distile su ilave edilerek hazırlandı.

2.5.4.2. Solunum Yapan Bakteri Sayımı

Solunum yapan bakteri sayısını hesaplamak için kullanılan metot Fiksdal ve ark. (1999) tarafından modifiye edilmiştir.

1 ml bakteri örneği 1 ml steril saf su ile 2 ml'ye tamamlandı. Üzerine final konsantrasyonda litrede 2 mmol olacak şekilde CTC ilave edilerek alüminyum folya ile kapatıldı. 37°C'de 3 saat inkübasyondan sonra 25µl formaldehitte muamele edildi. Deniz suyu örneği polikarbonat filtrelerden geçirildikten sonra filtreler DAPI ile 10 dk boyandı. Buradan elde edilen filtrelerde bulunan bakterilerin epiflorasan mikroskopunda sayımları yapıldı. Mikroskop altında formazan oluşturan bakteriler sayılarak sonuçlar kaydedildi.

2.5.4.3. Yaşam Deneylerinde Değerlerin Analizi

Bakteri yaşam sürelerinin incelenmesinde iki değerlendirme metodu kullanılır. Bunlar T_{90} ve T_{99} değerleridir. T_{90} değeri 0. gündeki inokulasyondan sonra bakteri koloni sayısının 1 logoritmik düşüş süresi, T_{99} değeri ise iki logoritmik düşüşe karşılık gelen değerdir. Lineer değerler (Koloni sayısı-KS, Solunum yapan bakteri sayısı-SYBS, Direk bakteri sayısı-DBS, Toplam bakteri sayı-TBS) exponensiyal değerler yani sulandırma miktarları dikkate alınarak logoritmik değerlere dönüştürüldü ve logoritmik değişimin inkubasyon süresine (gün) göre değişimi grafik olarak gösterildi.

2.6. Deneylerde Kullanılan Metilen Mavisi

100 ml saf suya 0.03198 gr metilen mavisi ilave edilerek stok hazırlandı. 250 ml'lik beherlere hazırlanan 100'er ml'lik filtre otoklav deniz suyu ve bakteri örneklerinin bulunduğu kaba $1,5 \cdot 10^{-6}$ M final konsantrasyonda olacak şekilde metilen mavisi (merc) ilave edildi.

2.7. Enzim Aktivitelerinin Tayin Edilmesi

2.7.1. Hücrelerin Parçalanması

600 ml'lik beherlere 200 ml deniz suyu ilave edilir ve otoklavda steril hale getirilir. Daha sonra beherin içine 15 ml bakteri örneği ilave edilir. Bu bakteri örnekleri nutrient broth besiyerinde 1 gecede büyütüldükten sonra ilave edilir. Farklı dalga boylarında ışık kaynaklarına maruz bırakıldıktan sonra belirli zaman periyotlarında deniz suyu örnekleri alındı ve 8000 de santrifüj edildikten sonra Potasyum fosfat (0.05 M) tamponu ile 2 kez yıkandı. Elde edilen pelet üzerine 0.05 M tampon 0.1mM EDTA ilave edilerek karıştırılır. Hazırlanan örnekler sonikatörde parçalanır (Fisher-Sonic Dışmembratör Model 300). Örnekler 30 sn sonikasyona tabi tutulur ve 30 sn bekletilmek sureti ile parçalanır. Parçalama işleminden sonra örnekler 15.000 G'de (4°C'de) 15 dk santrifüj edilir. Süpernatant enzim analizleri için kullanılmak üzere -25°C'nin altında saklandı.

2.7.2. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Çözeltiler: 50 mM potasyum fosfat tamponu pH 7.0 ve 30 mM hidrojen peroksit solusyonu kullanıldı. 240 nm'de spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi tayin edildi (Aebi, 1984). Bütün örneklerdeki protein miktarı Lowry metoduna göre tespit edilmiştir. Aktivitenin belirlenmesi için aşağıda gösterilen reaksiyon karışımı kullanıldı.

Kör olarak 3 ml tampon kullanıldı ve spektrofotometre sıfırlandı.

Numune için ise, 1920 µl tampon üzerine 80 µl protein ilave edilir ve üzerine 1000 µl hidrojen peroksit ilave edilerek hızlı bir şekilde karıştırılır ve hemen spektrofotometrede okuma yapılır. Okuma işlemi 2 dk boyunca ve 30 sn aralıklarla yapılır (spektrofotometrik ölçümler için kuvarz küvetler kullanılmıştır).

Bir ünite katalaz aktivitesi bir dakikada bir µmol hidrojen peroksitin parçalanmasını katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

2.7.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak (550 nm) tayin edildi (Folhe, 1984).

Çözelti A: 0.76 mg (5 µmol) ksantin, 10 ml 1.0 mM NaOH de çözülür ve 24.5 mg (2 µmol) cyt c ile karıştırılarak 50 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7.8 (0.1 mM EDTA içerir) ile 100 ml ye tamamlanır.

Çözelti B: 0.2 ünite/ml ksantin oksidaz 0.1 mM EDTA da hazırlanır.

Öncelikle spektrofotometre tüpüne 2.90 ml çözelti A, 0.05 ml Çözelti B, 0.05 ml deiyonize su konularak kördeki değişim kaydedildi. Bu kontrol tüp veya blank tüp olarak adlandırılmaktadır.

Ölçümü yapılacak örnek için, tüpe önce 2.90 ml Çözelti A, 0.05 ml protein (numune) ve en son olarak 0.05 ml Çözelti B ilave edilerek hızlı bir şekilde karıştırıldı ve 2 dk boyunca 30 sn aralıklarla spektrofotometredeki değişim kaydedildi. Burada kullanılan çözelti B reaksiyonu başlattığı için, çözelti B ilavesinden sonra hızlı bir şekilde karıştırma işlemi yapılır ve okumaya geçilir.

Bir ünite SOD, xanthine/xanthine oksidaz tarafından meydana gelen süperoksit anyonu ile sitokrom C'nin redüksiyonunun %50 inhibisyonu için geçerli enzim miktarı olarak kabul edildi.

2.7.4. Glutathion Peroksidaz Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak (340 nm de) belirlendi (Leopold, 1984). 0.1 M potasyum fosfat tamponundan 500 µl, 1.125 M NaN₃ (pH 7.0)'den 10 µl, 100 µl enzim (protein) örneği, 100 µl glutathion redüktaz (0.24 u/ml), 90 µl kümen (1.2 mM) ve 10 mM GSH'dan 100 µl ilave edilerek vorteksle karıştırılır ve 37°C'de 10 dk. inkübe edilir (su banyosunda). Daha sonra karışımın üzerine 100 µl NADPH (1.5 mM) ilave edilir ve 3 dk. 340 nm'de absorpsiyondaki değişim takip edilir. Karışım tekrar 37°C'de 10 dk. (su banyosunda) inkübe edilir ve 340 nm'de 5. dk absorpsiyondaki değişim kaydedilir.

Abs: $\epsilon \times b \times c$ denkleminde göre değerler hesaplanır.

2.7.5. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivite Tayini

Tampon: 50 mM Tris-HCL pH 8.0 ayarlanır. %0.1 (v/v) β -merkaptotanol ve 10 mM $MgSO_4$ ilave edilerek hazırlanır.

Enzim aktivite tayini spektrofotometrik olarak 340 nm de yapıldı (Hylemon ve ark., 1972). 1 dk'da 1 μ mol ürün oluşumunun katalizlenmesi bir enzim aktivite ünitesi olarak tanımlandı. 1 mg proteine denk gelen enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak hesaplandı. Kullanılan reaksiyon karışımı aşağıda gösterilmiştir.

<u>Bileşen</u>	<u>Test tüpü</u>	<u>Kör</u>
Tampon	800 μ l	820 μ l
NADP ⁺ (50 mM)	20 μ l	-
Protein	100 μ l	100 μ l
G6P (100 mM)	80 μ l	80 μ l

2.8. Lipit Peroksidasyon Tayini

Lipit peroksidasyon düzeyi 532 nm de spektrofotometrik olarak belirlendi (Varshney ve ark., 1990). Bu metod 2-thiobarbütirik asitin (TBA) aldehit ürünlerinden malondialdehitin (1,1,3,3-tetrametoksipropan; MDA) oluşumuna dayanır. Yapılan çalışmalarda aşağıda tabloda belirtilen reaksiyon karışımı kullanıldı.

<u>Bileşen</u>	<u>Kör (ml)</u>	<u>Standart (ml)</u>	<u>Numune (ml)</u>
0.15 MTris-KCl pH 7.5	1.9	1.9	1.9
MDA	-	0.1	-
%30 TCA	0.5	0.5	0.5
52 mM TBA	0.5	0.5	0.5
Protein	-	-	0.1
Deiyonize su	0.1	-	-
Toplam Hacim	3.0	3.0	3.0

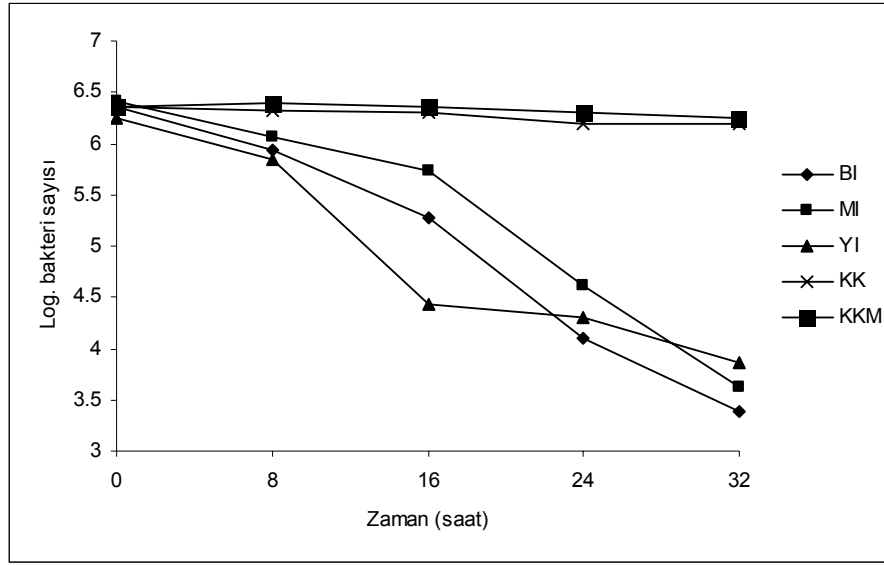
3. BULGULAR

3.1. Deniz Suyunda Metilen Mavisinin Bulunduğu veya Bulunmadığı

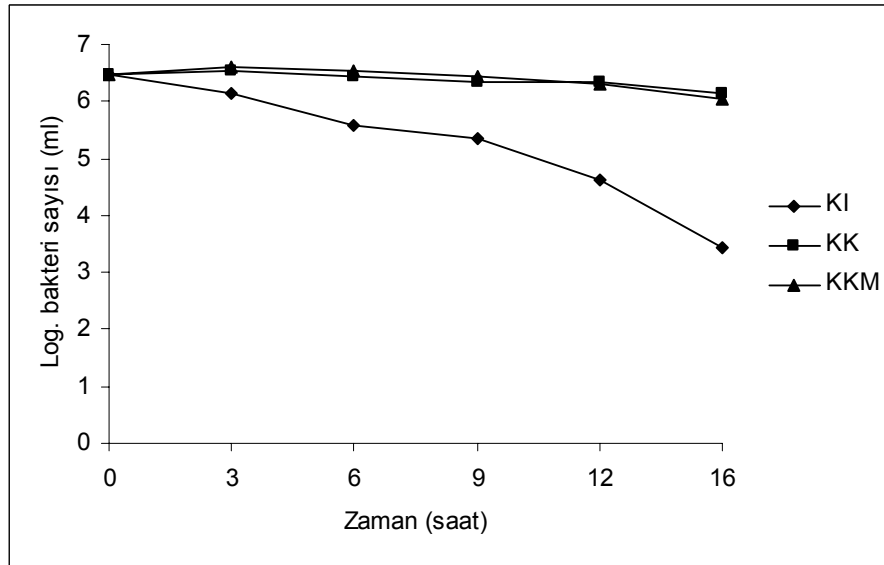
Ortamda Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Yaşamına Etkisi

3.1.1. Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Yaşamı

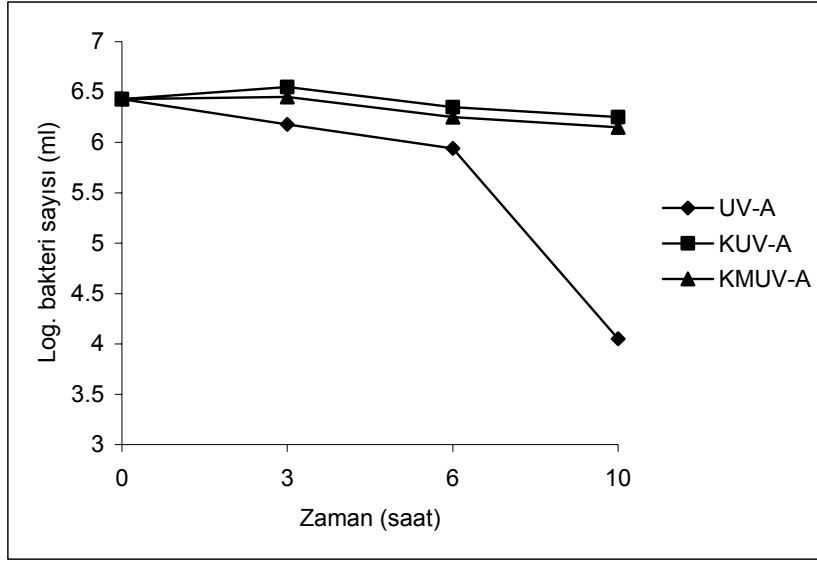
Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisinin bulunduğu ortamda yapılan çalışmada, *E.coli* bakterisi beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saat, kırmızı ışık kaynağının etkisi altında ise 16 saat yaşamına devam etmiştir. UV-A'nın etkisi altında bakterinin 10 saat yaşamına devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.1, 3.2, 3.3). Bakteri sayısının beyaz ışıktaki 2.1×10^6 'dan 4×10^2 'ye, mavi ışıktaki 2.3×10^6 'dan 3×10^2 'ye, yeşil ışıktaki 2.2×10^6 'dan 3.5×10^2 'ye, kırmızı ışığın etkisi altında 3.8×10^6 'dan 2.2×10^2 'ye ve UV-A'nın etkisi altında ise 1.8×10^6 'dan 6.3×10^2 'ye azaldığı tespit edilmiştir. *S.typhimurium* ile yapılan çalışmada ise bakterinin beyaz, mavi, yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saat, kırmızı ışığın etkisi altında 16 saat ve UV-A'nın etkisi altında ise 10 saat yaşamına devam ettiği görülmüştür (Şekil 3.4, 3.5, 3.6). Burada bakteri sayısının beyaz ışıktaki 4.8×10^6 'dan 4×10^3 'e, mavi ışıktaki 5.1×10^6 'dan 2×10^3 'e, yeşil ışıktaki 3.8×10^6 'dan 6.7×10^3 'e, kırmızı ışığın etkisi altında 5.7×10^6 'dan 5.1×10^3 'e ve UV-A'nın etkisi altında ise 2.7×10^6 'dan 5×10^3 'e azaldığı belirlenmiştir.



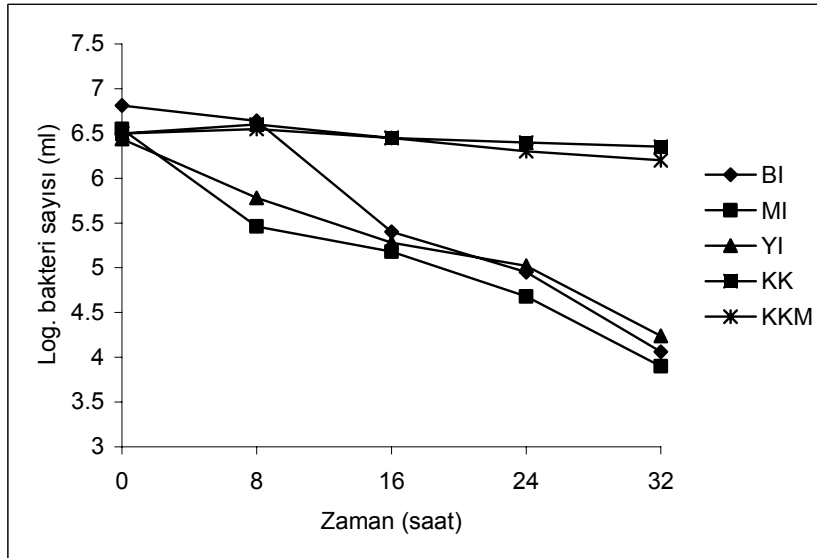
Şekil 3.1 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *E.coli*'nin yaşamı (BI: Beyaz Işık, MI: Mavi Işık, YI: Yeşil Işık, KK: Karanlık Kontrol, KKM: Karanlık Artı Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortam)



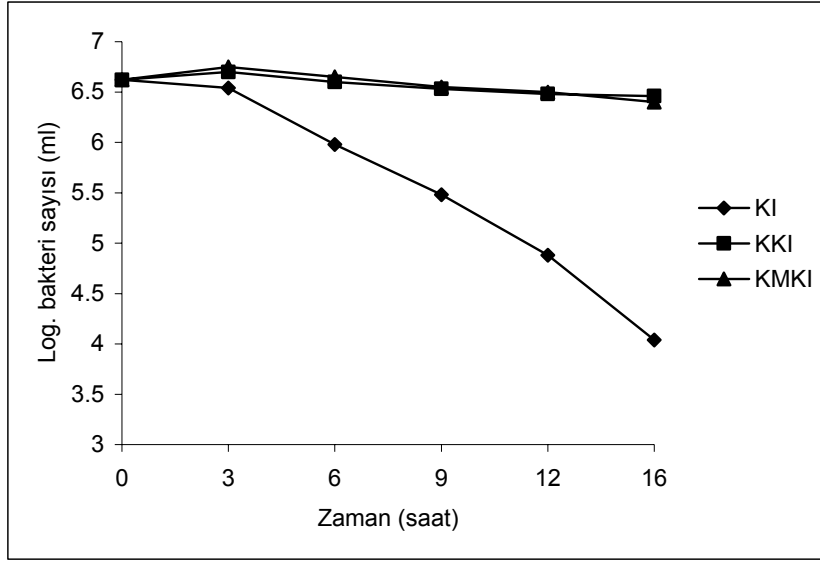
Şekil 3.2 Metilen Mavisini İlave Edilen Deniz Suyunda *E.coli*'nin Yaşamı (KI: Kırmızı Işık, KK: Karanlık Kontrol, KKM: Metilen Mavisini İlave Edilen Karanlık Kontrol)



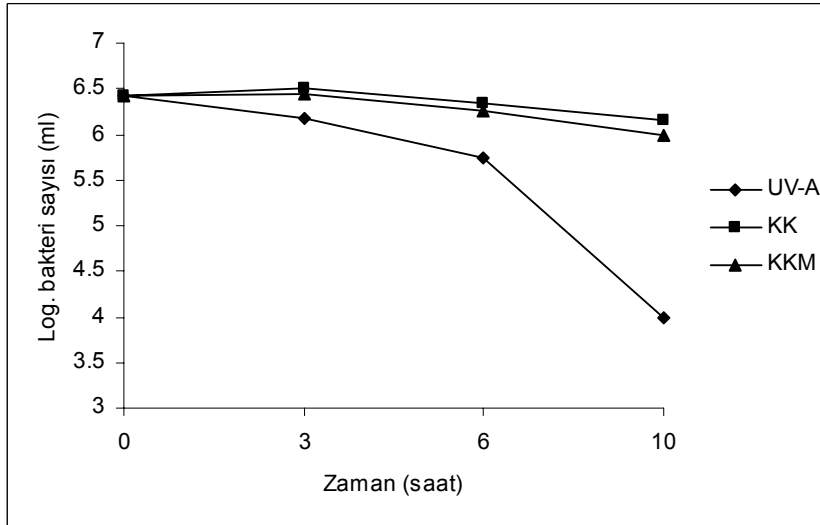
Şekil 3.3 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *E.coli*'nin yaşamı (KUV-A: Karanlık Kontrol, KMUV-A: Metilen Mavisi İlave Edilen Karanlık Kontrol)



Şekil 3.4 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un Yaşamı (BI: Beyaz Işık, MI: Mavi Işık, YI: Yeşil Işık, KK: Karanlık Kontrol, KKM: Karanlık Artı Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortam)



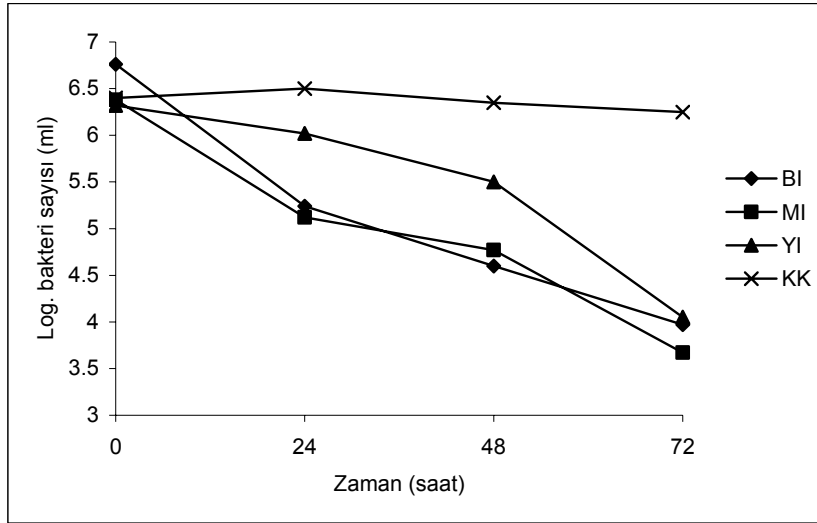
Şekil 3.5 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un yaşamaı
(KI: Kırmızı Işık, KKI: Karanlık Kontrol, KMKI: Metilen Mavisi İlave Edilen Karanlık Kontrol)



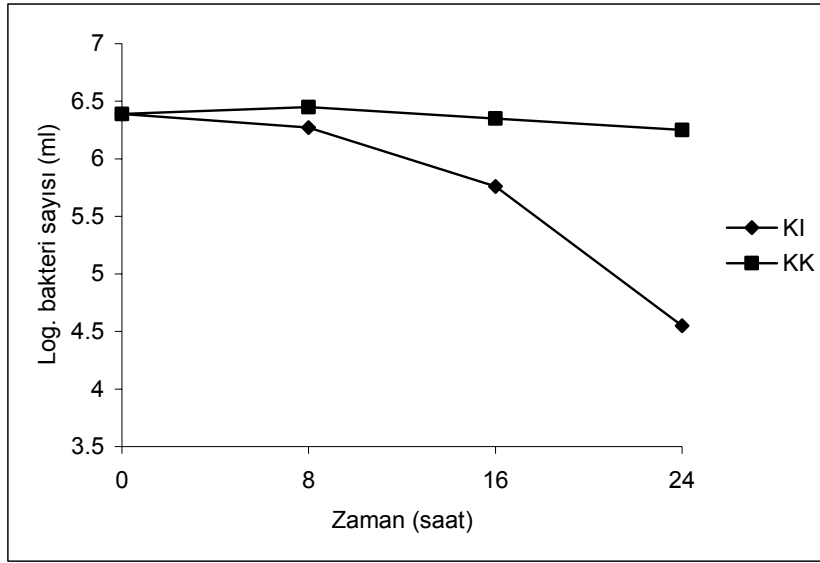
Şekil 3.6 Metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un Yaşamaı
(KK: Karanlık Kontrol, KKM: Metilen Mavisi İlave Edilen Karanlık Kontrol)

3.1.2. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Deniz Suyu Ortamında Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Yaşamı

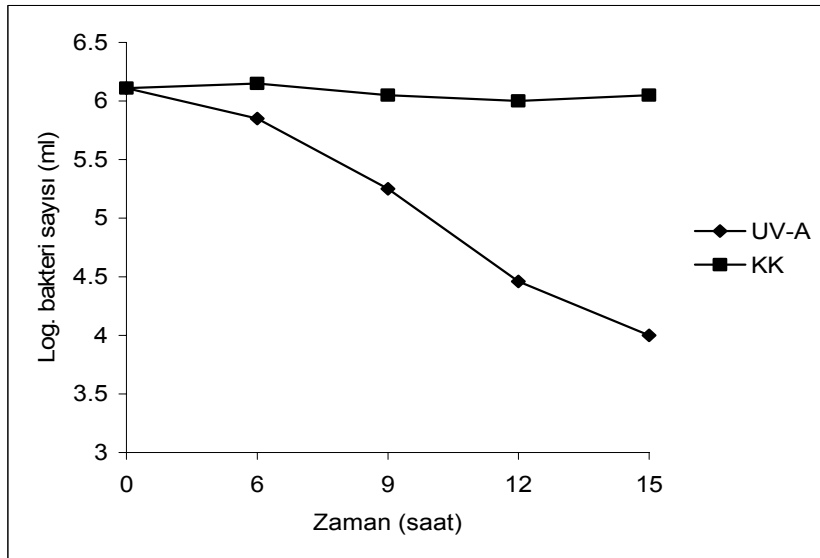
Metilen mavisinin bulunmadığı ortamda yapılan çalışmada, *E.coli* ve *S.typhimurium* bakterilerinin beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saat, kırmızı ışığın etkisi altında 24 saat ve UV-A'nın etkisi altında ise 16 saat yaşamına devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12). *E.coli* bakterisinin beyaz ışıkta 3.1×10^6 'dan 2.4×10^2 'ye, mavi ışıkta 2.2×10^6 'dan 7×10^2 'ye, yeşil ışıkta 3×10^6 'dan 2.8×10^2 'ye, kırmızı ışığın etkisi altında 3.2×10^6 'dan 1.9×10^3 'e ve UV-A'nın etkisi altında ise 1.5×10^6 'dan 1.9×10^2 'ye azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında *S.typhimurium*'un beyaz ışıkta 6.6×10^6 'dan 2×10^3 'e, mavi ışıkta 6×10^6 'dan 1.8×10^3 'e, yeşil ışıkta 3.9×10^6 'dan 2.4×10^3 'e, kırmızı ışığın etkisi altında 4.8×10^6 'dan 9×10^3 'e ve UV-A'nın etkisi altında ise 3.2×10^6 'dan 5×10^3 'e azaldığı belirlenmiştir. Fotosensitizerin varlığında bakterilerin daha kısa sürede ortamdaki yok olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bakterilerin görünür bölge ışık kaynakları arasında en fazla kırmızı ışıktan etkilendiği belirlenmiştir.



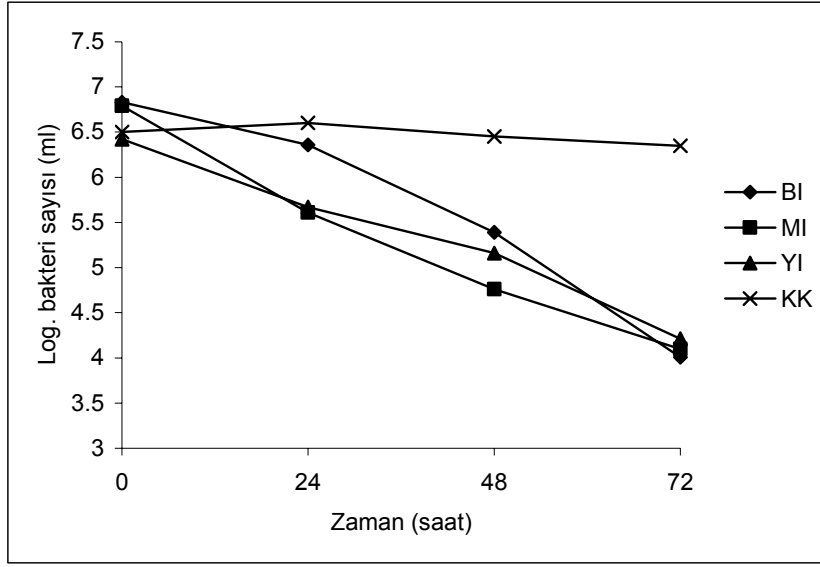
Şekil 3.7 Deniz suyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'nin yaşamı (BI: Beyaz Işık, MI: Mavi Işık, YI: Yeşil Işık, KK: Karanlık Kontrol)



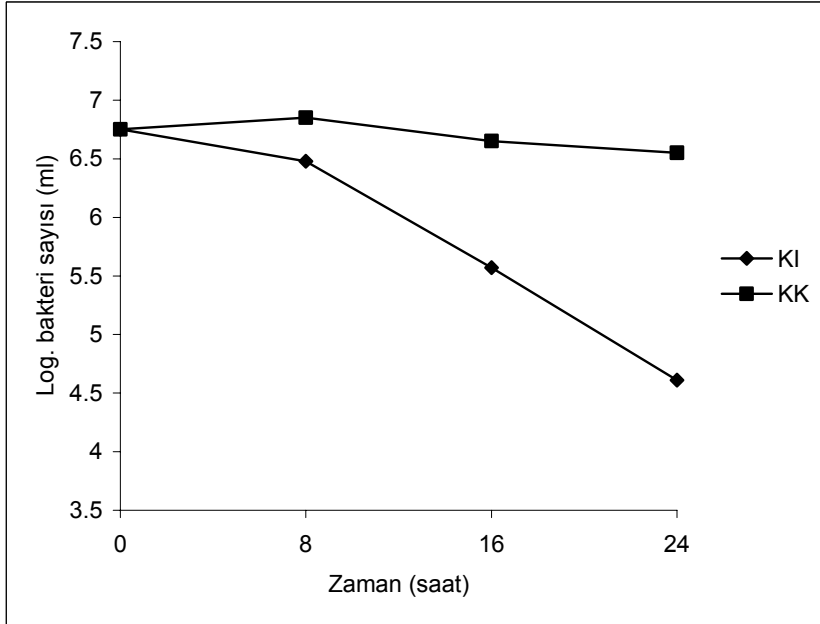
Şekil 3.8 Deniz suyunda Kırmızı Işığın Etkisi altında *E.coli*'nin yaşamaı
(KK: Karanlık kontrol)



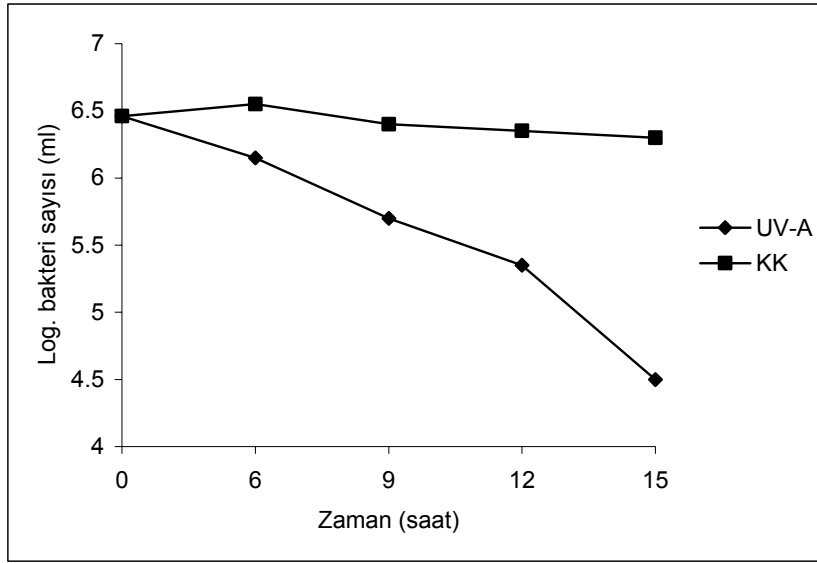
Şekil 3.9 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'nin Yaşamaı
(KK: Karanlık kontrol)



Şekil 3.10 Deniz suyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *S.typhimurium*'un yaşamı (BI: Beyaz Işık, MI: Mavi Işık, YI: Yeşil Işık, KK: Karanlık Kontrol)



Şekil 3.11 Deniz Suyunda Kırmızı Işığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı (KK: Karanlık kontrol)



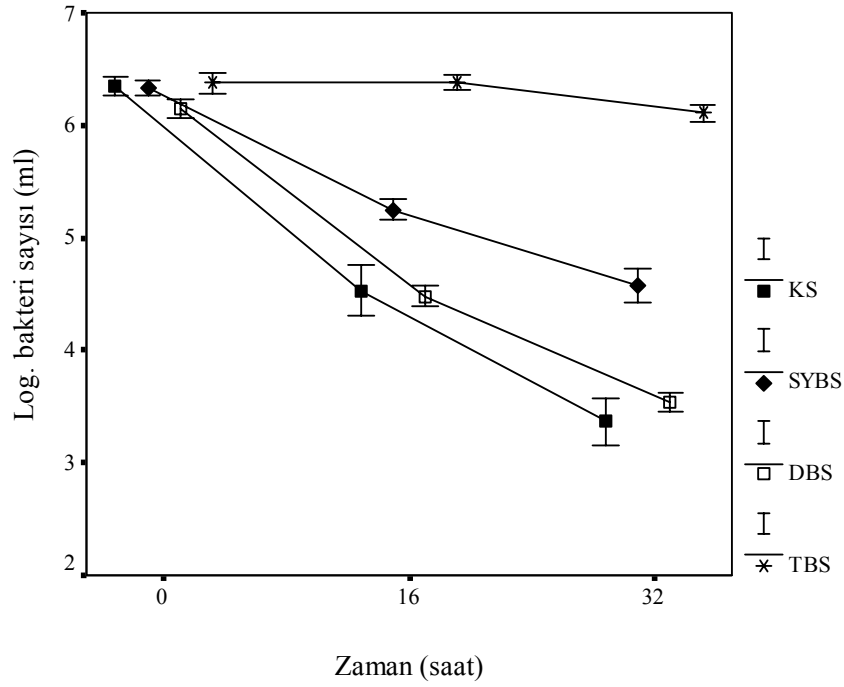
Şekil 3.12 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *S.typhimurium*'un yaşamaı (KK: Karanlık kontrol)

3.1.3. Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Yaşamaı

Deniz suyunda yapılan çalışmada beyaz, yeşil, mavi ışığın etkisi altında metilen mavisini ilave edilen örneklerde, *Escherichia coli* bakterisi koloni sayısına göre 32 saat, kırmızı ışığın etkisi altında ise 16 saat süre ile yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. 32 saat sonunda beyaz ışığın etkisi altında 2.98 log. azalma, mavi ışığın etkisi altında 2.69 ve yeşil ışığın etkisi altında 2.39 log, bunun yanında kırmızı ışığın etkisi altında 3.02 log azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.13, 3.14, 3.15, 3.16). Toplam bakteri sayısında önemli bir değişim tespit edilmemiş, bunun yanında solunum yapan bakteri sayısı göz önüne alındığında, beyaz ışığın etkisi altında 1.88 log., mavi ışığın etkisi altında 1.63 log., yeşil ışığın etkisi altında 1.4 log. ve kırmızı ışığın etkisi altında ise 1.51 log. azalma olduğu görülmüştür. Bu süre içinde direk bakteri sayımlarında koloni sayısına yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu da bize bakterinin yaşamına devam ettiğini fakat bölünüp çoğalamadığını göstermektedir.

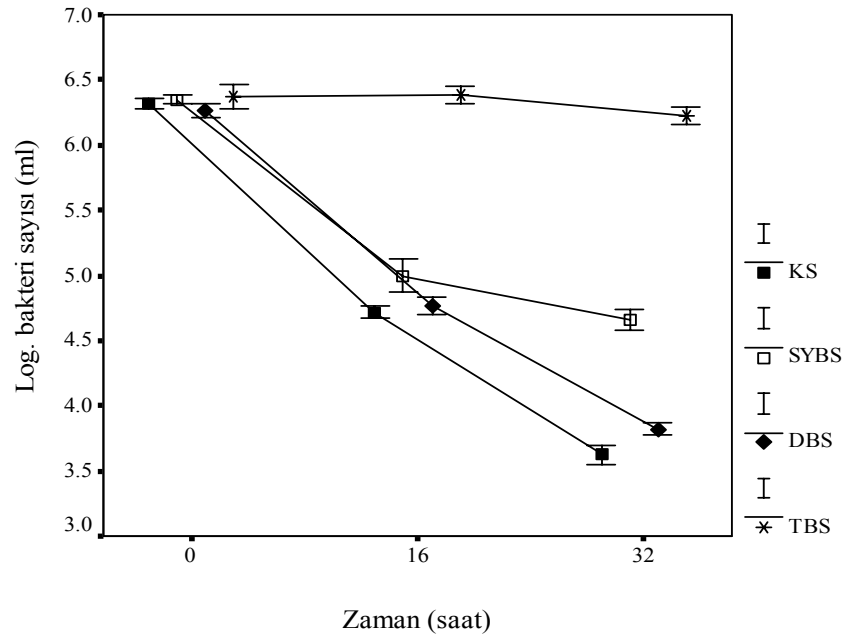
t_{99} değerlendirme sistemine göre beyaz ışığın etkisi altında *E.coli* bakterisinin yaklaşık 19 saat, mavi ışığın etkisi altında 21.3 saat, yeşil ışığın etkisi altında 24 saat ve kırmızı ışığın etkisi altında ise 10.2 saat yaşamına devam ettiği tespit edilmiştir. Solunum yapan bakteri sayısına göre ise bakterinin beyaz yeşil ve mavi ışığın etkisi altında 32 saatten daha fazla kırmızı ışığın etkisinde ise 16 saatten daha uzun süre yaşamına devam ettiği belirlenmiştir.

Salmonella typhimurium ile yapılan benzer çalışmada, bakterinin koloni sayısında beyaz ışığın etkisi altında 2.75 log. azalma, mavi ışığın etkisi altında 2.52 log., yeşil ışığın etkisi altında 2.2 log. ve kırmızı ışığın etkisi altında ise 2.58 log. azalma olduğu belirlenmiştir. Toplam bakteri sayısında önemli bir değişiklik olmamasına rağmen direk bakteri sayısında koloni sayısına yakın azalmalar tespit edilmiştir. Bunun yanında solunum yapan bakteri sayısında da farklılıklar gözlenmiştir. Nitekim beyaz ışığın etkisi altında 1.47 log., mavi ışığın etkisi altında 1.23 log., yeşil ışığın etkisi altında 1.21 log. ve kırmızı ışığın etkisi altında 1.49 log. azalma olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Şekil 3.18, 3.19, 3.20, 3.21). t_{99} değerine göre ise bakterinin beyaz ışıpta 19.5 saat, mavi ışıpta 25,7 saat, yeşil ışıpta 28 saat ve kırmızı ışığın etkisi altında ise 12.7 saat yaşamına devam ettiği görülmüştür.



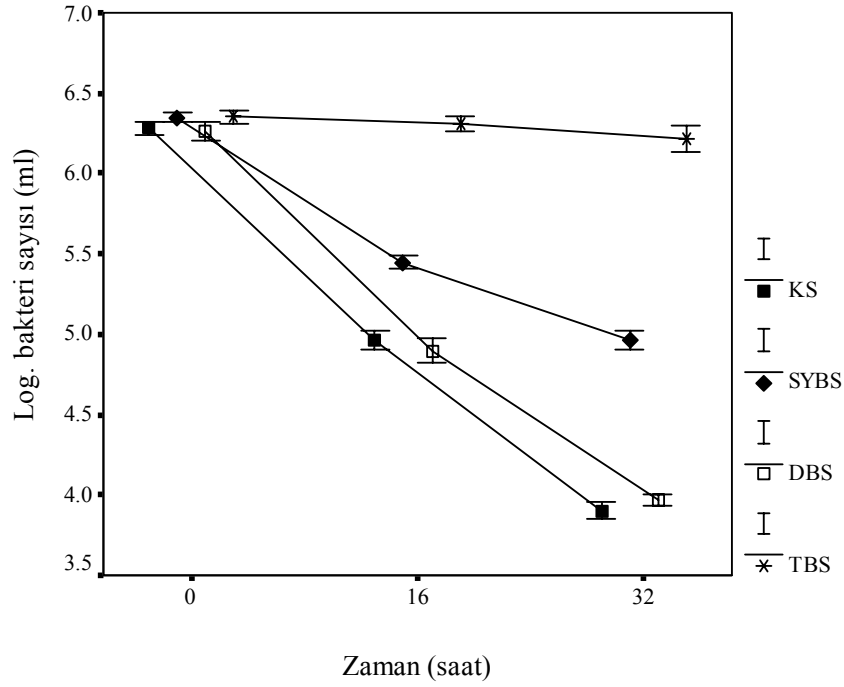
Şekil 3.13 Beyaz Işığın (400-700 nm) Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı

(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)

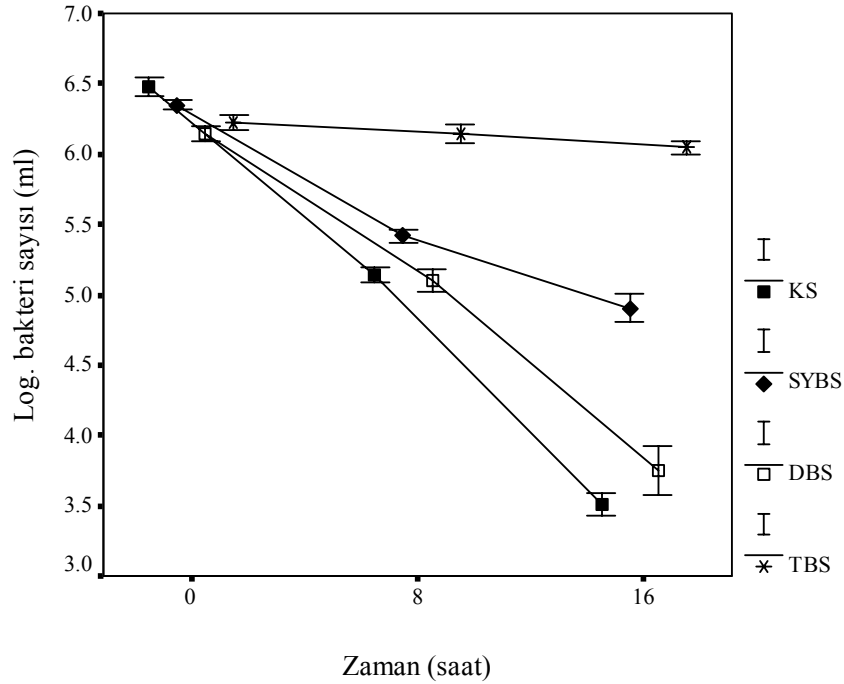


Şekil 3.14 Mavi ışığın (400-500 nm) Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı

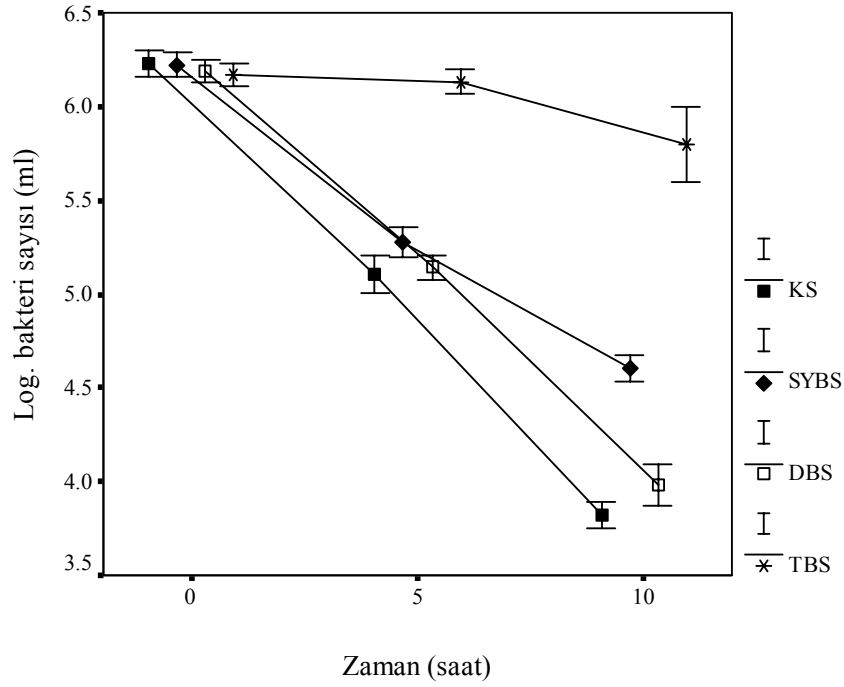
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



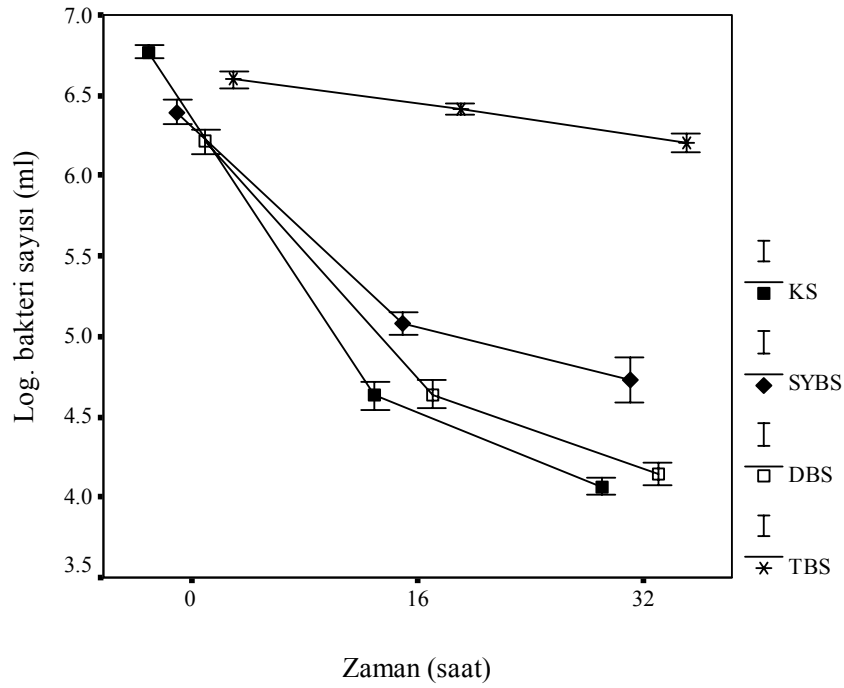
Şekil 3.15 Yeşil ışığın (500-600 nm) Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



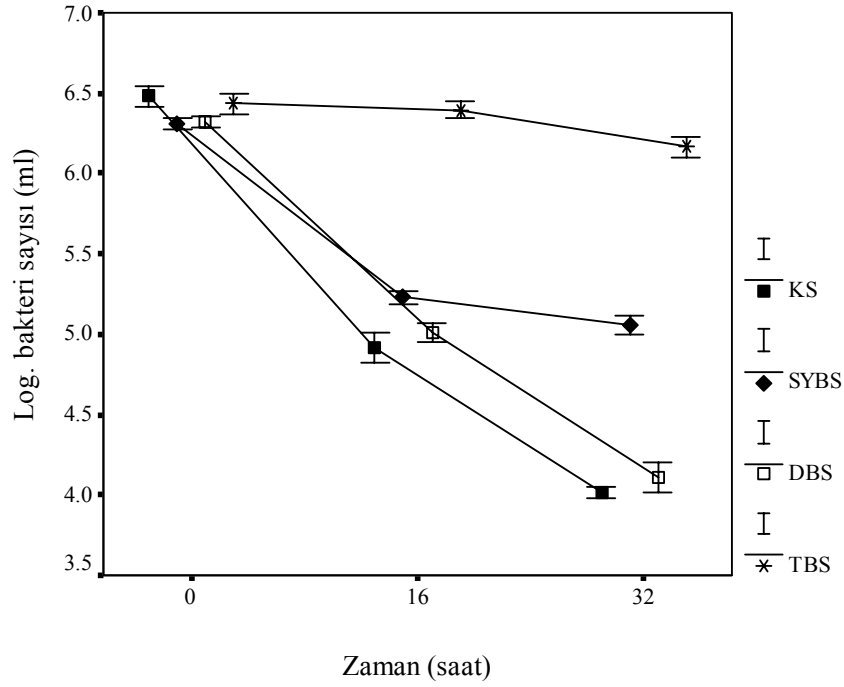
Şekil 3.16 Kırmızı ışığın (600-700 nm) Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



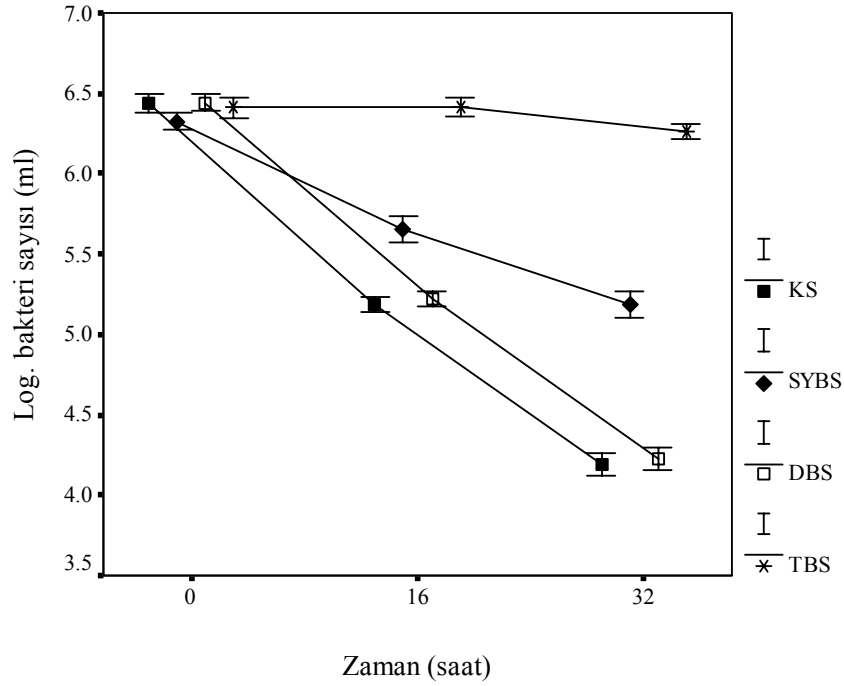
Şekil 3.17 UV-A'nın Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı (KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



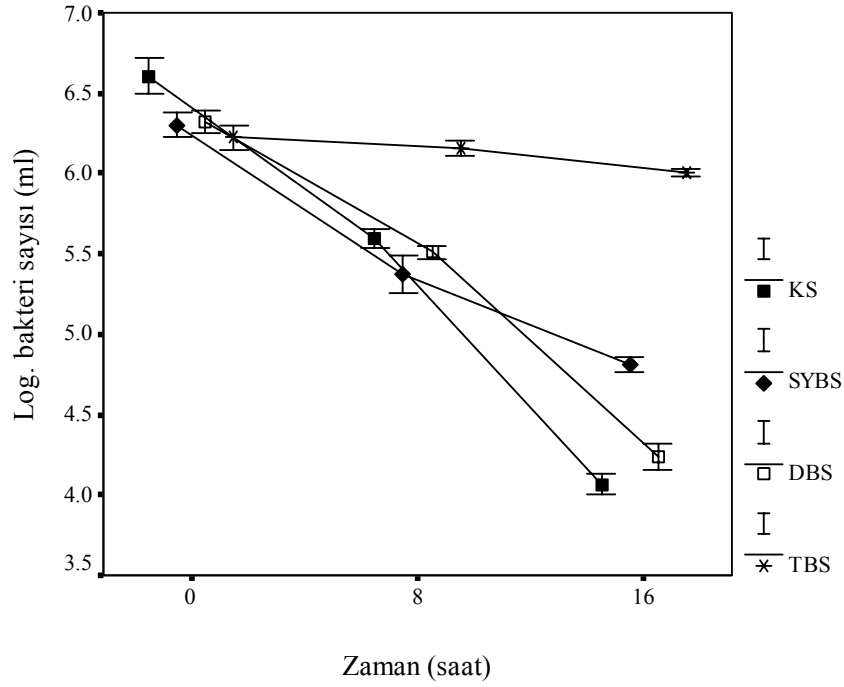
Şekil 3.18 Beyaz Işığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı (KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



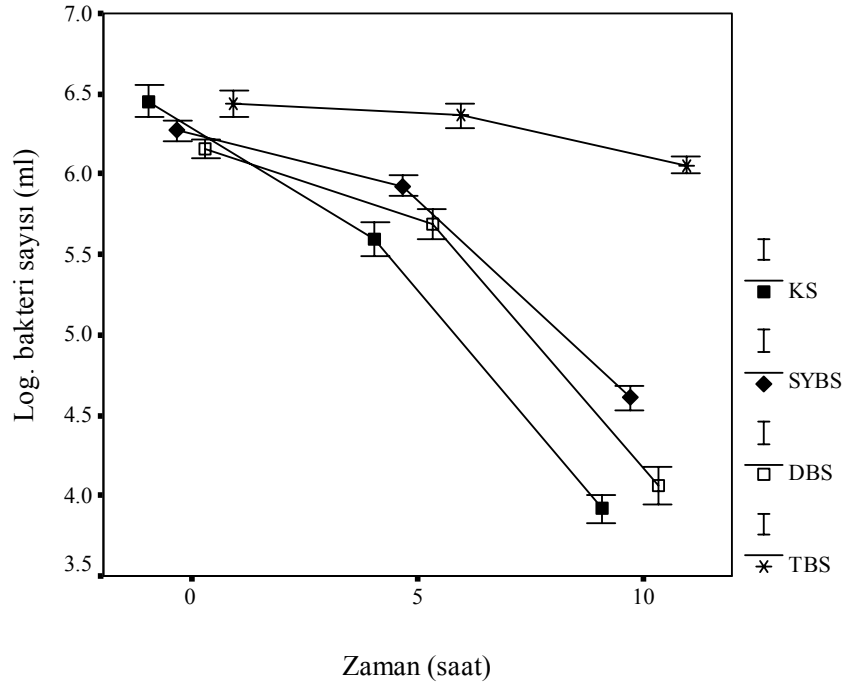
Şekil 3.19 Mavi ışığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 3.20 Yeşil ışığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 3.21 Kırmızı ışığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 3.22. UV-A'nın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)

UV-A'nın etkisi altında 10 saat yapılan çalışmada koloni sayısı göz önüne alındığında *E.coli*'de 2.36 log. azalma, *S.typhimurium*'da ise 2.26. log azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.17, 3.22). Toplam bakteri sayısında önemli bir değişiklik olmamasına rağmen solunum yapan bakteri sayısında azalmanın daha az olduğu görülmüş ve *E.coli*'de 1.64 log. azalma, *S.typhimurium*'da ise 1.49 log. azalma olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada t_{99} değerine göre *E.coli*'nin 6.8 saat yaşamına devam ettiği, bunun yanında *S.typhimurium*'un 7.4 saat yaşadığı tespit edilmiştir.

Görünür dalga boyunda ışığın etkisi altında yapılan çalışmada ortamda bir fotosensitizer varken bakterilerin en fazla kırmızı ışıktan etkilendiği görülmüş. Ve sırası ile kırmızı ışık, beyaz ışık, mavi ışık ve yeşil ışık bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmasında etkili rol oynamıştır.

3.1.4. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Yaşamı

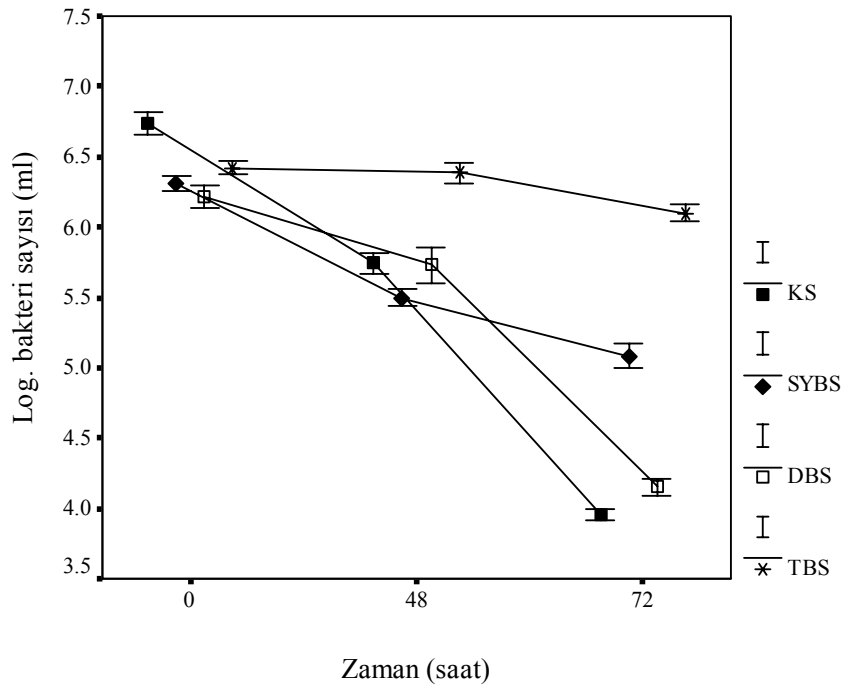
Ortama herhangi bir fotosensitizer madde ilave edilmeden sadece deniz suyu ortamında yapılan bu çalışmada bakteriler farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisine maruz bırakılmıştır. Beyaz, mavi, yeşil ışık kaynakları altında 72 saat süre ile yaşamları izlenmiştir.

Koloni sayısı göz önüne alındığında, *E.coli* beyaz ışığın etkisi altında 2.75 log. azalma gösterirken, mavi ışıktaki 2.40 log., yeşil ışığın etkisi altında ise 2.15 log. azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.23, 3.25, 3.27). Direk bakteri sayısında koloni sayısına yakın azalmalar tespit edilmesine rağmen, solunum yapan bakteri sayısında, beyaz ışıktaki 0.98 log., mavi ışıktaki 1.46 log., yeşil ışığın etkisi altında ise 1.35 log. azalma olduğu belirlenmiştir. 72 saat süre ile yapılan bu çalışmada toplam bakteri sayısında gözle görülür bir azalma tespit edilmemiştir.

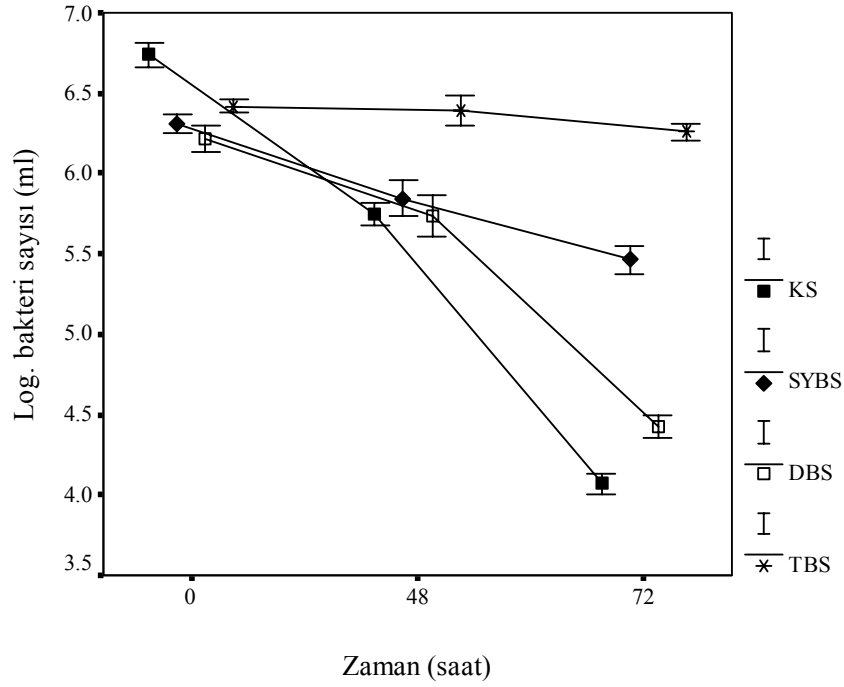
t_{99} değerlendirme sistemine göre koloni sayımlarına bakıldığında bakterinin beyaz ışık altında yaklaşık 56.6 saat, mavi ışığın etkisi altında 59.5 saat, yeşil ışıktaki ise 66 saat yaşamına devam ettiği belirlenmiştir.

S.typhimurium, beyaz ışığın etkisi altında 2.75 log. azalma gösterirken mavi ışığın etkisi altında 2.39 log., yeşil ışığın etkisi altında ise 2.21 log azalma

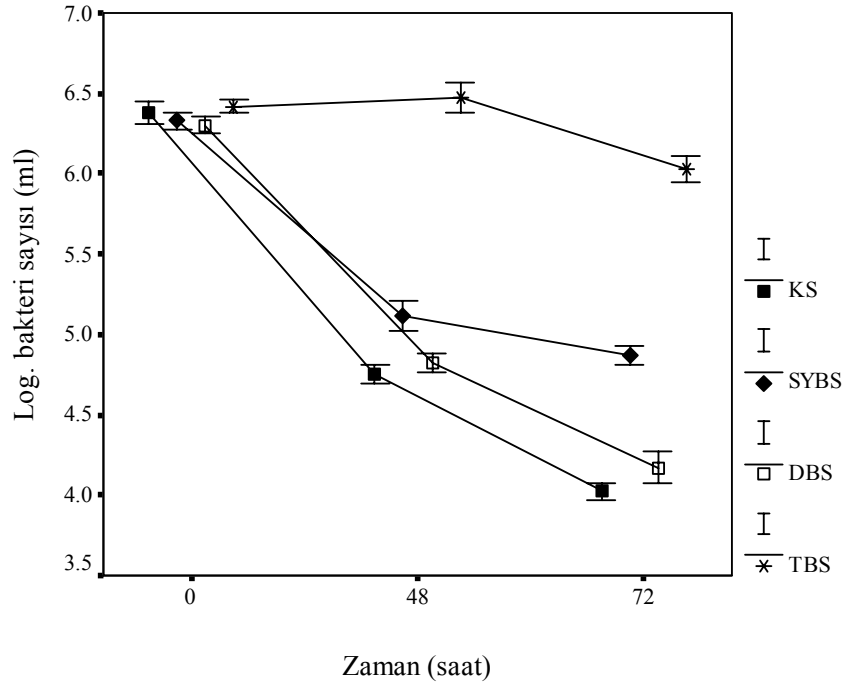
göstermiştir (Şekil 3.24, 3.26, 3.28). Direk bakteri sayısında koloni sayısına yakın değerler bulunmuş fakat toplam bakteri sayısında gözle görülür bir değişiklik belirlenememiştir. Solunum yapan bakteri sayısı göz önüne alındığında beyaz ışığın etkisi altında 0.98 log. azalma, mavi ışığın etkisi altında 1.52 log. azalma ve yeşil ışığın etkisi altında 1.21 log azalma olduğu görülmüştür. t_{99} değerlendirme sistemine göre bakteri yaşamına bakıldığında bakterinin beyaz ışık altında 59 saat, mavi ışık altında 61.6 saat ve yeşil ışık altında 66.4 saat yaşamına devam ettiği tespit edilmiştir.



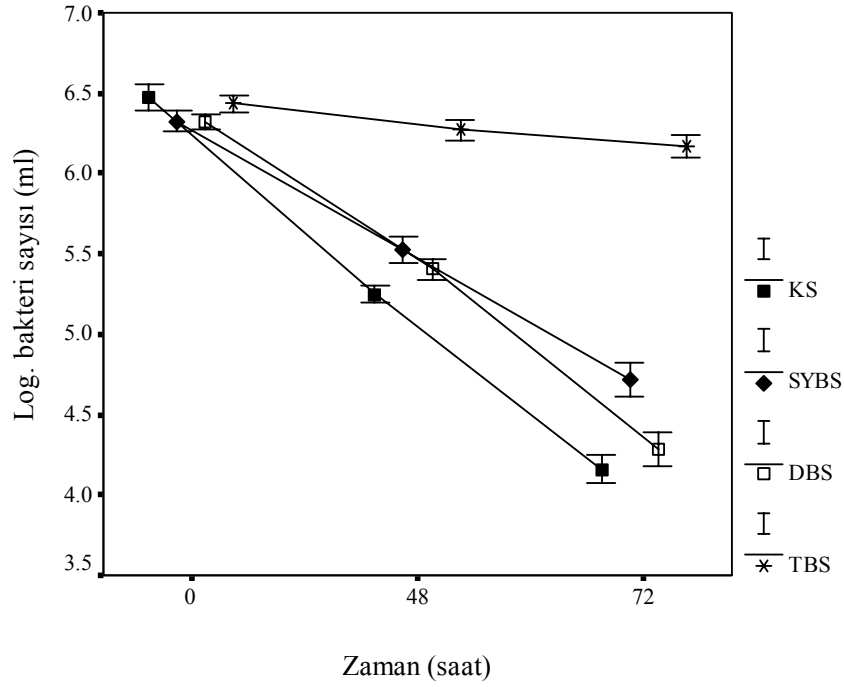
Şekil 3.23. Beyaz Işığın Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı (KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



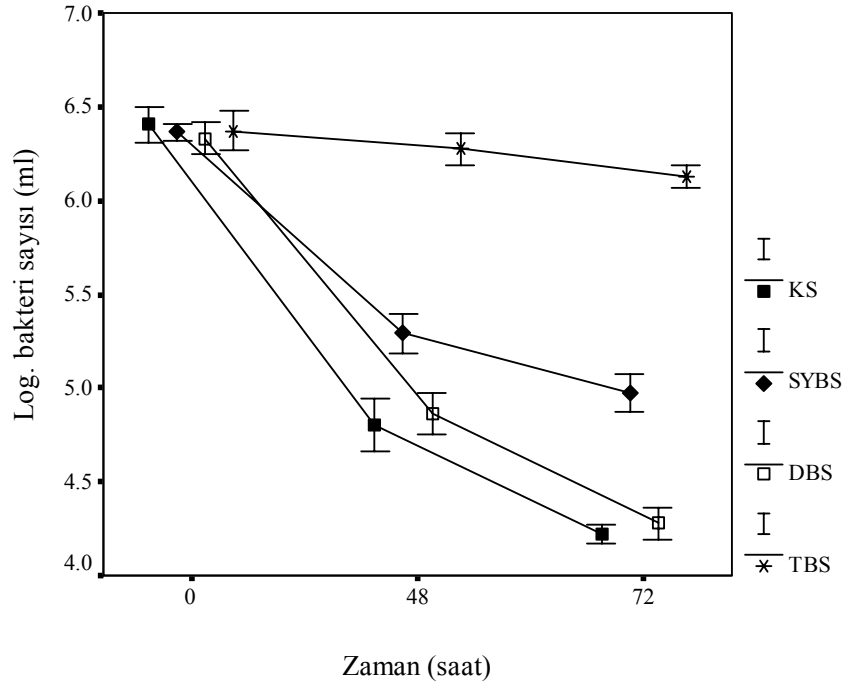
Şekil 3.24. Beyaz Işığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



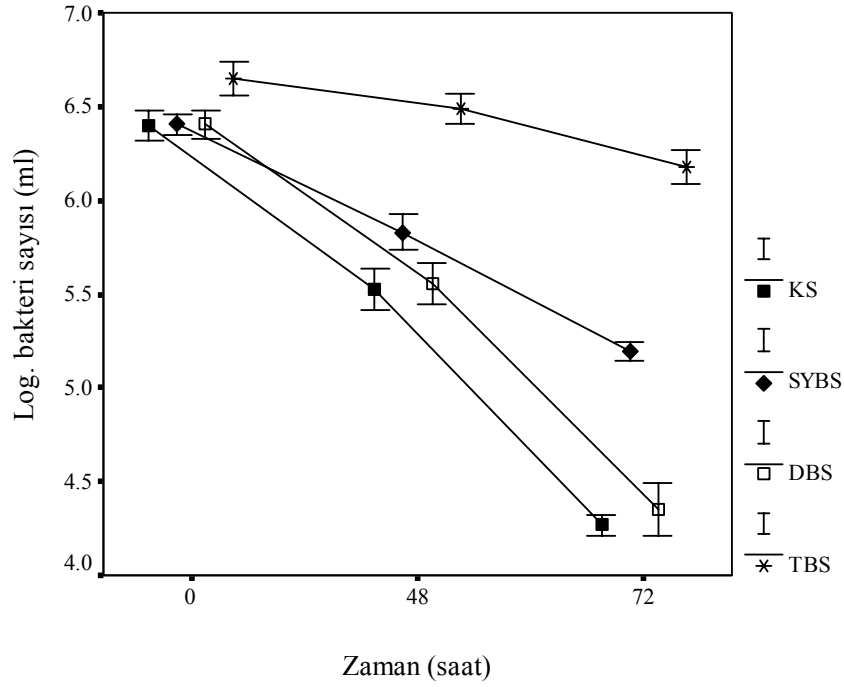
Şekil 3.25 Mavi Işığın Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



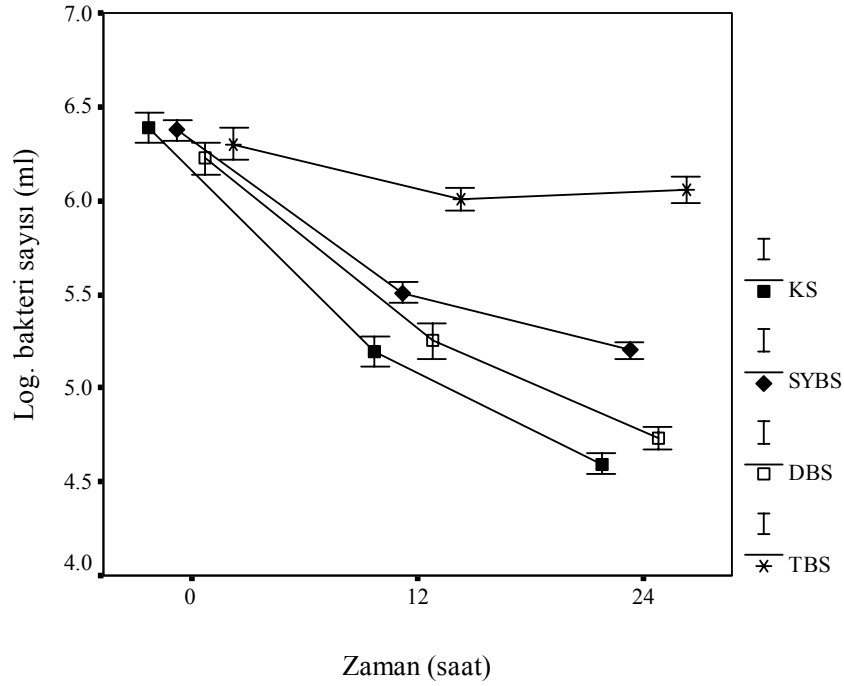
Şekil 3.26 Mavi Işığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



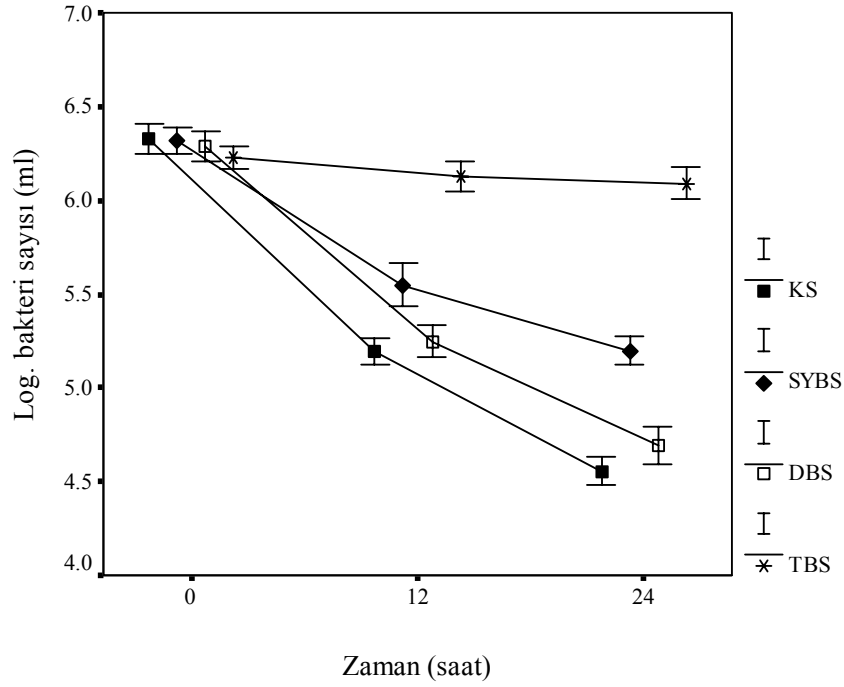
Şekil 3.27 Yeşil Işığın Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı (KS: Koloni sayısı, SYBS:
Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direkt bakteri sayısı, TBS:
Toplam bakteri sayısı)



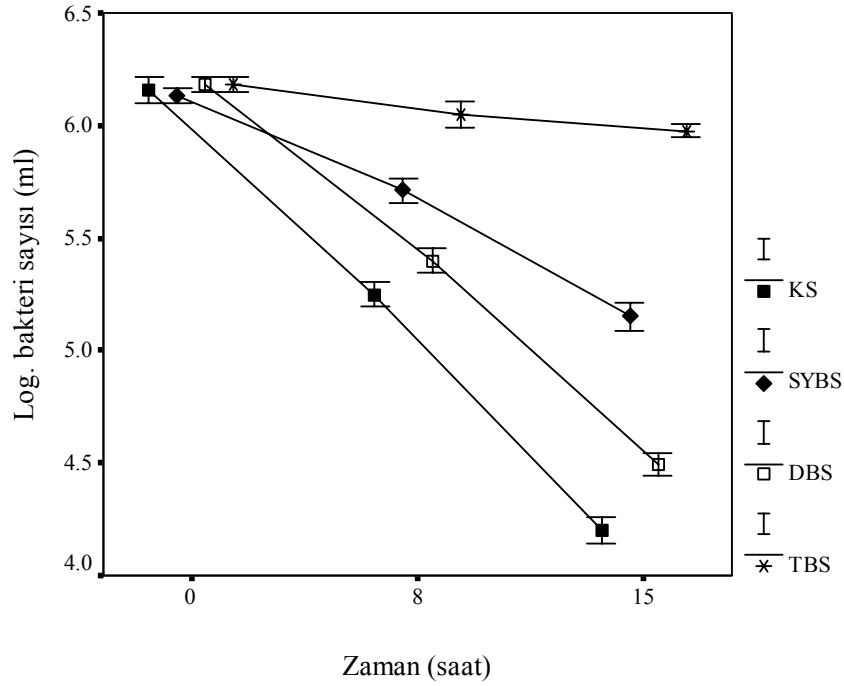
Şekil 3.28 Yeşil Işığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı (KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



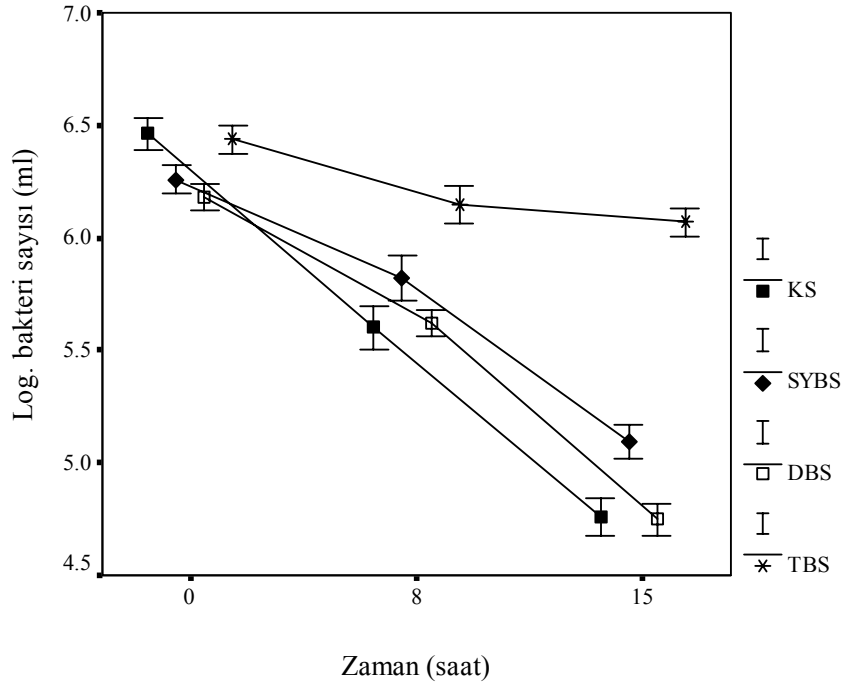
Şekil 3.29 Kırmızı Işığın Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı (KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 3.30 Kırmızı Işığın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 3.31 UV-A'nın Etkisi Altında *E.coli*'nin Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 3.32 UV-A'nın Etkisi Altında *S.typhimurium*'un Yaşamı
(KS: Koloni sayısı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı,
DBS: Direk bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)

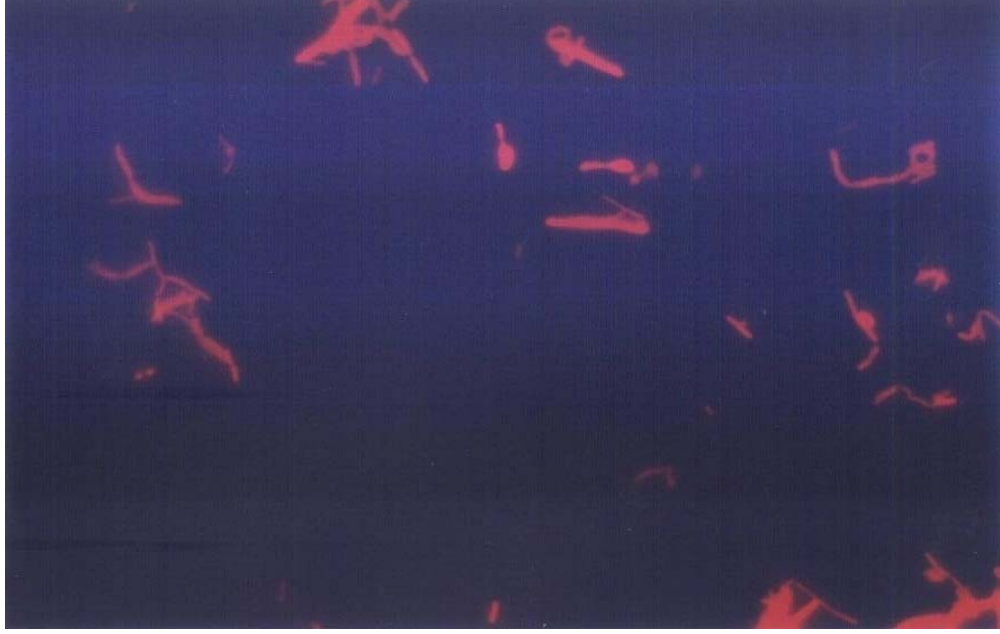
Kırmızı ışık kaynağı da bakterilerin yaşamını olumsuz yönde etkilemiştir. Nitekim Şekil 3.29 ve 3.30'e bakıldığında *E.coli* ve *S.typhimurium*'un kırmızı ışıktan etkilendiği görülmektedir. Yapılan koloni sayımlarına göre *E.coli* ve *S.typhimurium*'un 1.78 log. azalma gösterdiği belirlenmiştir. Direk mikroskopik sayımlar sonunda ise koloni sayılarına yakın değerler tespit edilmiş, bunun yanında toplam bakteri sayılarında önemli değişiklikler görülmemiştir. t_{99} değerlerine göre ise *E.coli* ve *S.typhimurium*'un 24 saatten daha uzun süre yaşamaya devam ettiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir.

Şekil 3.31 ve 3.32 UV-A'nın etkisi altında *E.coli* ve *S.typhimurium*'un yaşamını göstermektedir. Grafikler incelendiğinde bakterilerin 15 saat süre yaşamına devam ettiği görülmüştür. Koloni sayılarına bakıldığında *E.coli*'nin 1.82 log. azalma gösterdiği bunun yanında *S.typhimurium*'da 1.77 log. azalma olduğu görülmüştür. Toplam bakteri sayısında da bir düşüş olmasına rağmen bu düşüşün UV-A'dan kaynaklandığı fakat yine de o kadar önemli olmadığı görülmüştür. Direk mikroskopik sayımlara bakıldığında ise koloni sayılarına

yakın değerler tespit edilmiş fakat solunum yapan bakteri sayısında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Nitekim solunum yapan bakteri sayıları karşılaştırıldığında *E.coli*'de 1.14 log. azalma olduğu *S.typhimurium*'da ise 1.11 log. azalma olduğu tespit edilmiştir.

Yukarıda belirlenen sonuçlara göre sadece görünür ışık kaynakları göz önüne alındığında bakterilerin en fazla kırmızı ışıktan etkilendiği daha sonra sırasıyla beyaz ışık, mavi ışık ve en az yeşil ışıktan etkilendiği görülmüştür.

Bakterilerin koloni sayılarında hızlı bir düşüş olmasına rağmen solunum yapan bakteri sayısında azalmanın daha az olduğu görülmüş. Bu bize bakterilerin solunum yapmaya devam ettiğini fakat koloni oluşturma yeteneklerini kaybettiklerini göstermektedir. Yani canlı fakat kültürü yapılamayan bir duruma (dormant duruma) geldiklerini gösterir. Direkt mikroskopik sayımların koloni sayısı ile aynı olması ise bakterilerin bölünme yeteneklerini kaybettiklerini fakat hala yaşamaya devam ettiklerini göstermesi açısından önemli sonuçlar vermektedir. şekil 3.33 ve 3.34, Direkt mikroskopik sayımda uzayan ve uzamayan bakteriler ile solunum yapan bakteri sayımındaki depozit biriktirmiş (canlı) ve biriktirmemiş (l) rnekleri göstermektedir.



Şekil 3.33. Mikroskopta Direkt Bakteri Sayım yönteminde bakterilerin görüntüsü (1- Uzayamayan bakteriler, 2-Uzayabilen bakteriler)



Şekil 3.34 Mikroskopta solunum yapan bakteri sayım yönteminde bakterilerin görüntüsü (1-Kırmızı, depozit biriktirmiş olanlar canlı, 2-Mavi, depozit biriktirmemiş olanlar ölü hücreler)

3.1.5 Açlıkla Ön Muamele Edildikten Sonra Metilen Mavisi İlave Edilen Deniz Suyunda Farklı Dalga Boylarında Işık Kaynaklarının Etkisi Altında *E.coli* ve *S.typhimurium* Bakterilerinin Yaşamı

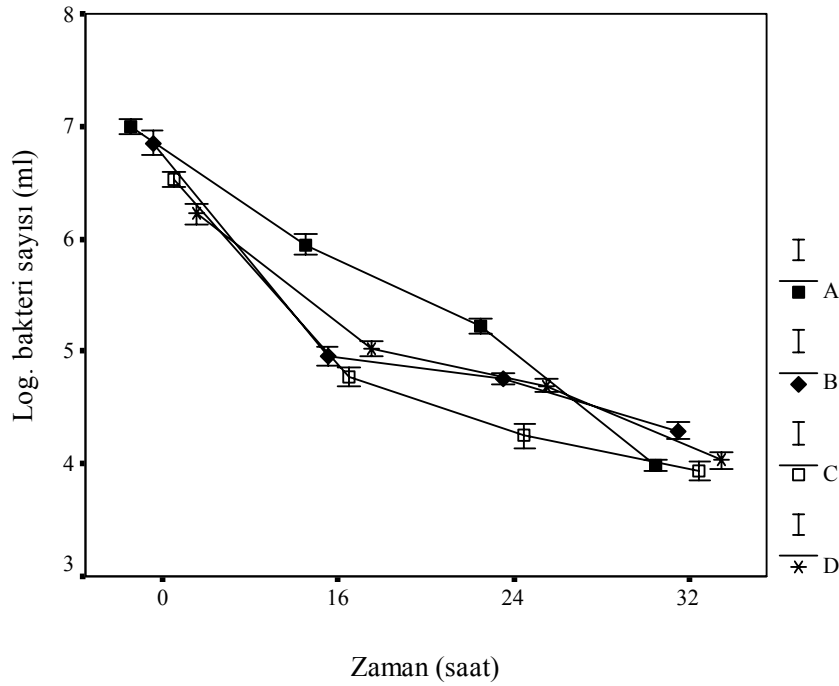
Açlık bakterilerin doğal deniz suyunda yaşamını etkileyen önemli çevresel faktörlerden biridir. Yapılan bu çalışmada açlığa bırakılan bakterilerin oksidatif strese dayanıklılığında bir değişim olup olmadığı araştırılmıştır. Bakteriler beyaz, mavi, yeşil ışığın etkisi altında 32 saat, kırmızı ışık altında 15 saat ve UV-A'nın etkisi altında ise 9 saat fotooksidasyona maruz bırakılmıştır. 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra oksidatif strese maruz bırakılan bakterilerin yaşamında farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Beyaz ışığın etkisi altında ortama fotosensitizer olan metilen mavisi ilave edildikten sonra yapılan koloni sayımlarında *E.coli*'nin 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra sırasıyla 3.01, 2.56, 2.58, 2.19 log. azalma gösterdiği Şekil 3.35 de görülmektedir. Beyaz ışık kaynağının etkisi altında bakteri sırasıyla en uzun 30 gün açlığa bırakıldığında daha sonra 20 ve 10 gün açlığa bırakıldığında oksidasyona karşı direnç kazanmıştır. 5 gün açlıktan sonra ise diğerlerine göre bakteri yaşamında önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Şekil 3.37'de ise mavi ışık altında bakterinin 5 gün açlıktan sonra 3.07 log., 10 gün açlıktan sonra 2.00 log., 20 gün açlıktan sonra 2.11 log. ve 30 gün açlıktan sonra 2.34 log. azalma gösterdiği belirlenmiştir. Yeşil ışınların etkisi altında ise 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra bakterinin sırasıyla 2.9, 2.03, 2.13 ve 2.29 log. azalma gösterdiği (Şekil 3.39) ve bu azalmanın beyaz ve mavi ışık kaynaklarında görülen azalmadan daha az olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* 5, 10, 20 ve 30 gün açlıkla ön muameleden sonra 15 saat kırmızı ışığın etkisine maruz bırakıldığında, bakterinin yaşamında sırasıyla 3.22, 1.79, 1.49 ve 1.68 log azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.41). Bu ışık kaynakları arasında etki bakımından bir karşılaştırma yapılacak olursa, açlıkla ön muameleden sonra bakterinin en fazla kırmızı ışıktan etkilendiği (15 saat), daha sonra sırasıyla beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarından etkilendiği görülmüştür. Mavi, yeşil ve kırmızı ışığın etkisi altında bakteri en uzun 10 gün açlıkla ön muamele edilen örneklerde yaşamına devam etmiştir. Daha sonra sırasıyla 20, 30 ve 5 gün

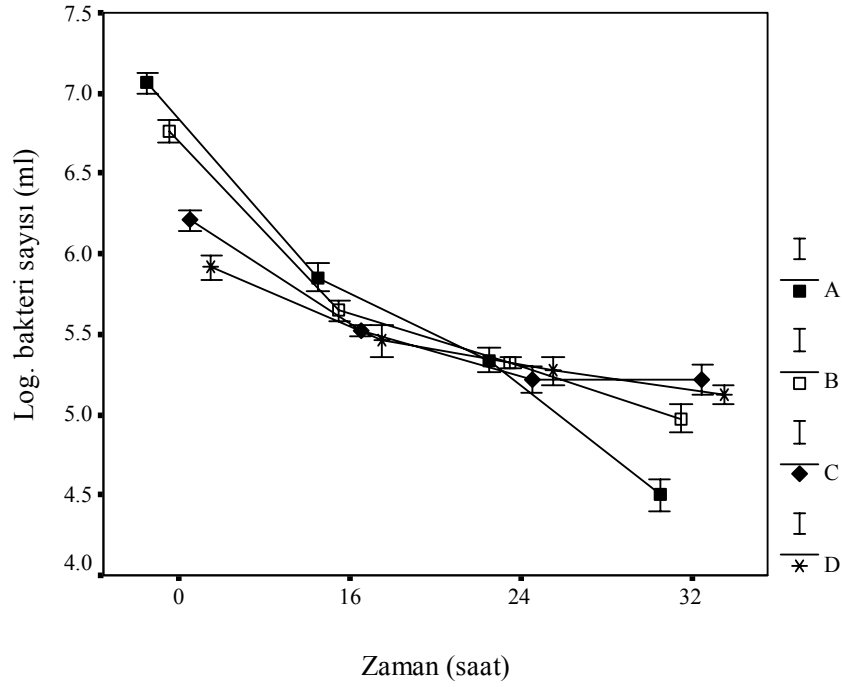
açlıkla muamele edilen örneklerde bakterinin oksidasyona karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

UV-A'da açlıkla ön muamele edilen *E.coli*'nin yaşamını olumsuz yönde etkilemiştir. Fakat bu etki görünür bölge ışık kaynaklarından daha hızlı ve kısa sürede olmuştur. Nitekim 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra bakterinin yaşamında sırayla 3.49, 2.36, 2.39 ve 1.91 log. azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.43). Burada bakteri en uzun 30 gün açlığa bırakılan örneklerde, daha sonra 10, 20 ve 5 gün açlıkla ön muamele edilen örneklerde yaşamına devam etmiştir. Burada tespit edilen sonuçlarda 10 ve 20 gün açlıkla ön muamele edilen örnekler arasındaki yaşam farkı pek önemli görülmemektedir. 5 gün açlıkla muamele edilen örneklerde ise bakteri yaşamında oldukça önemli azalmalar tespit edilmiştir.

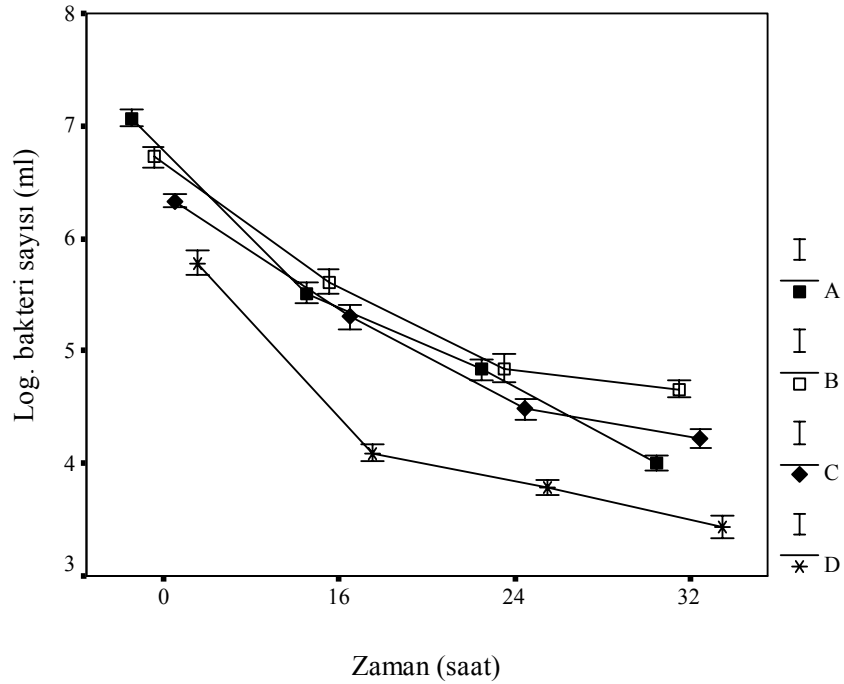
Bakterinin oksidasyona karşı direncinin artmasına sebep olan açlık periyotlarının daha çok 10 ve 20 gün olduğuda yapılan çalışmada belirlenmiştir.



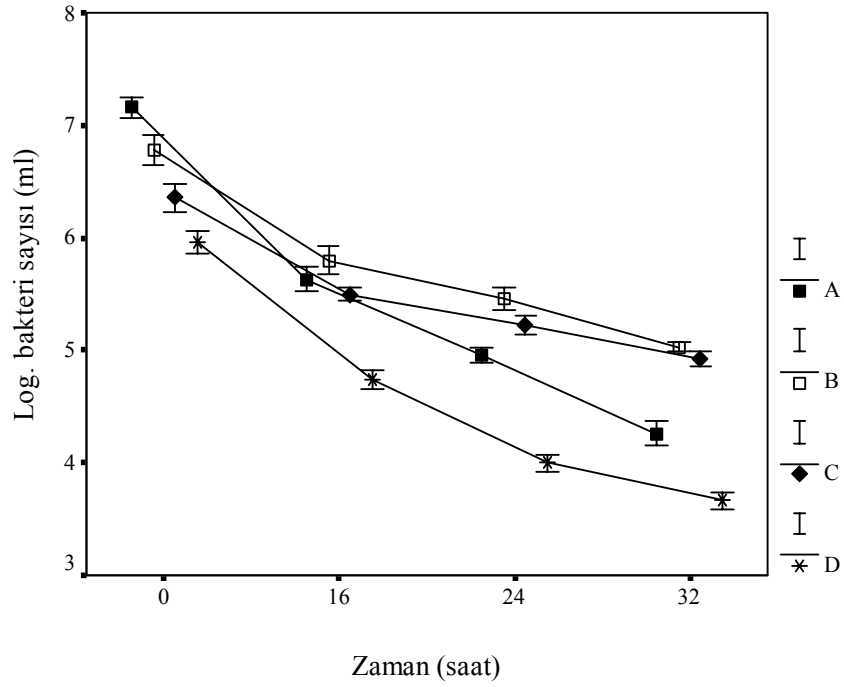
Şekil 3.35 *E.coli*'nin Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



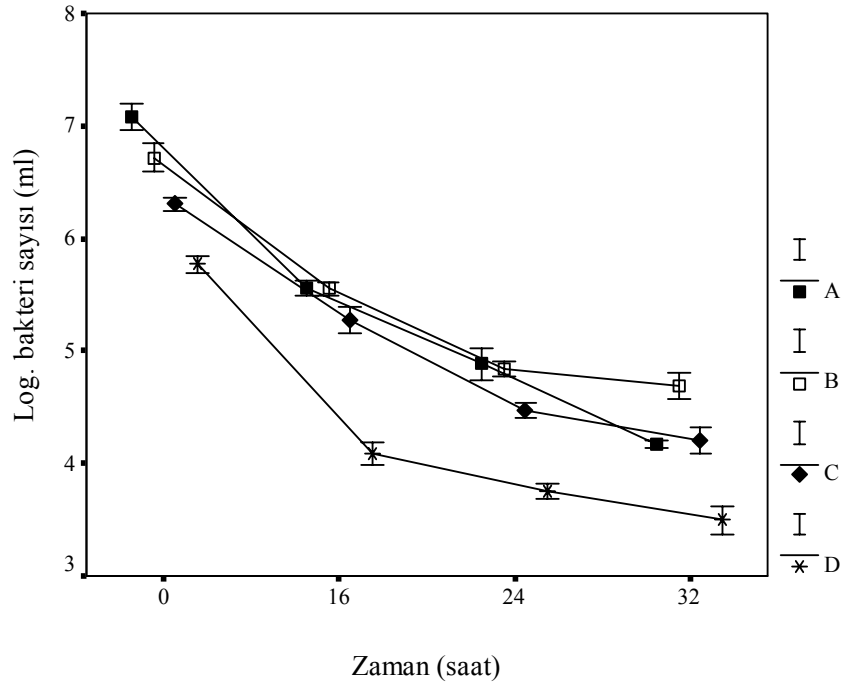
Şekil 3.36 *S.typhimurium*'un Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



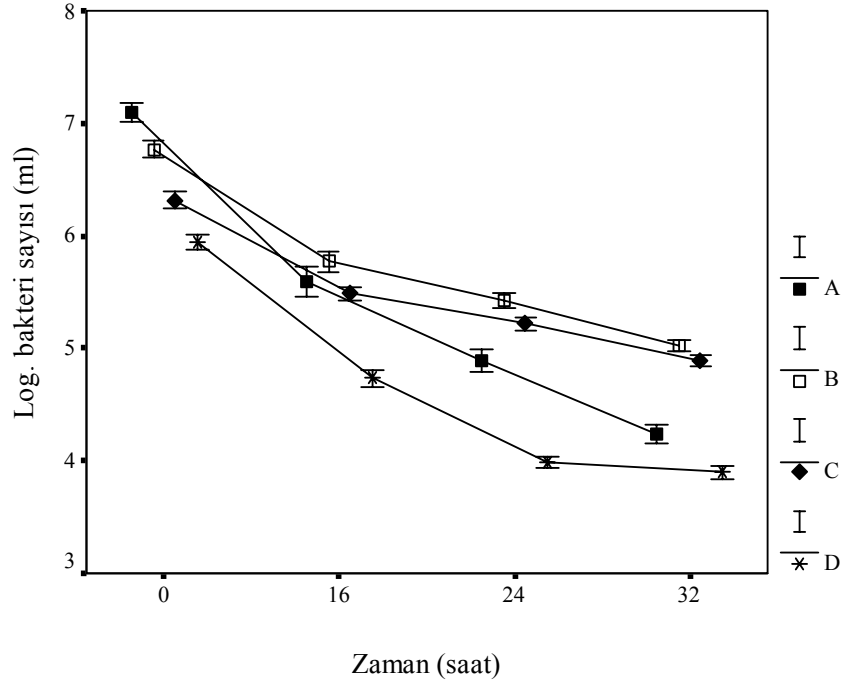
Şekil 3.37 *E.coli*'nin Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



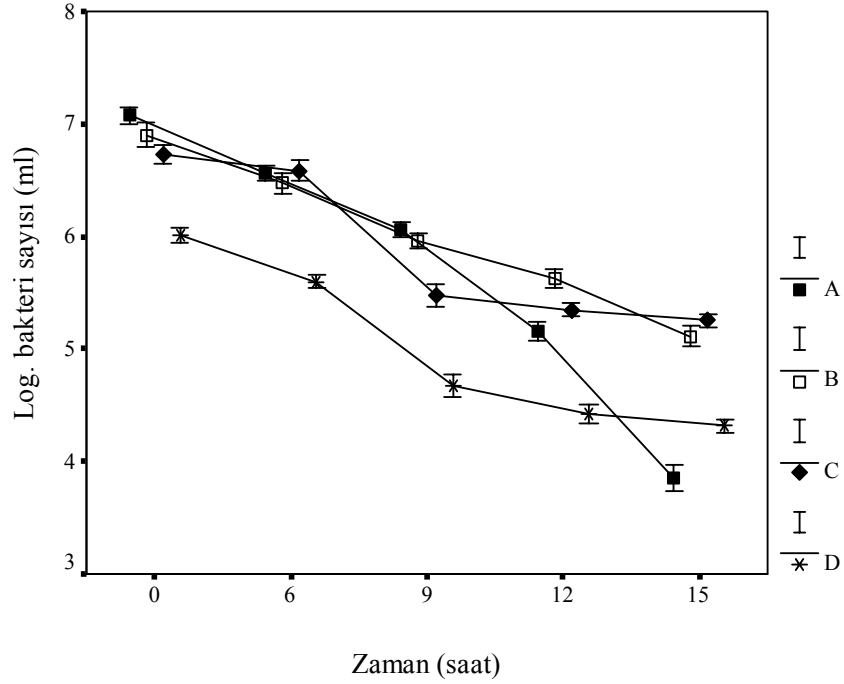
Şekil 3.38 *S. typhimurium*'un Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



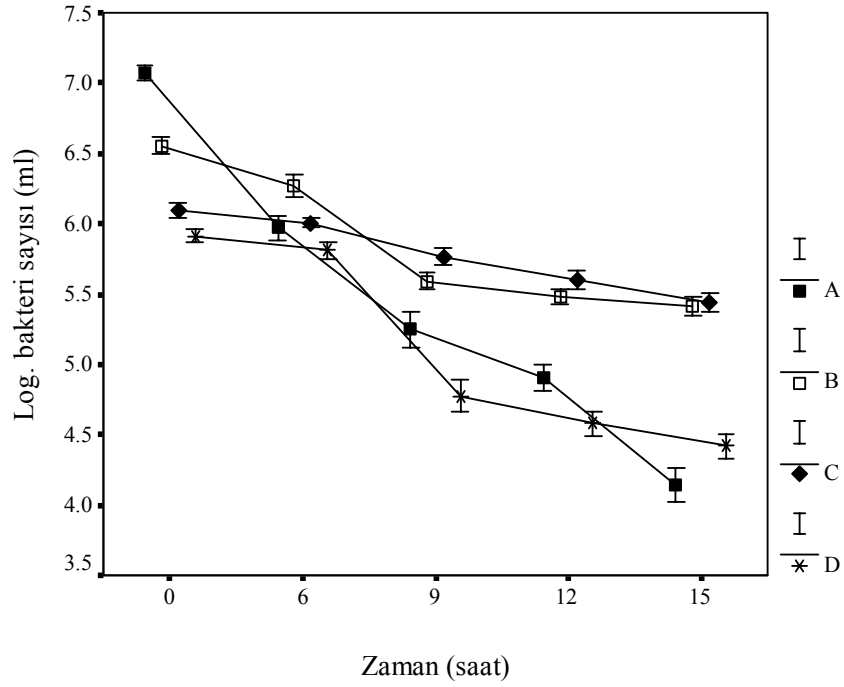
Şekil 3.39 *E. coli*'nin Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



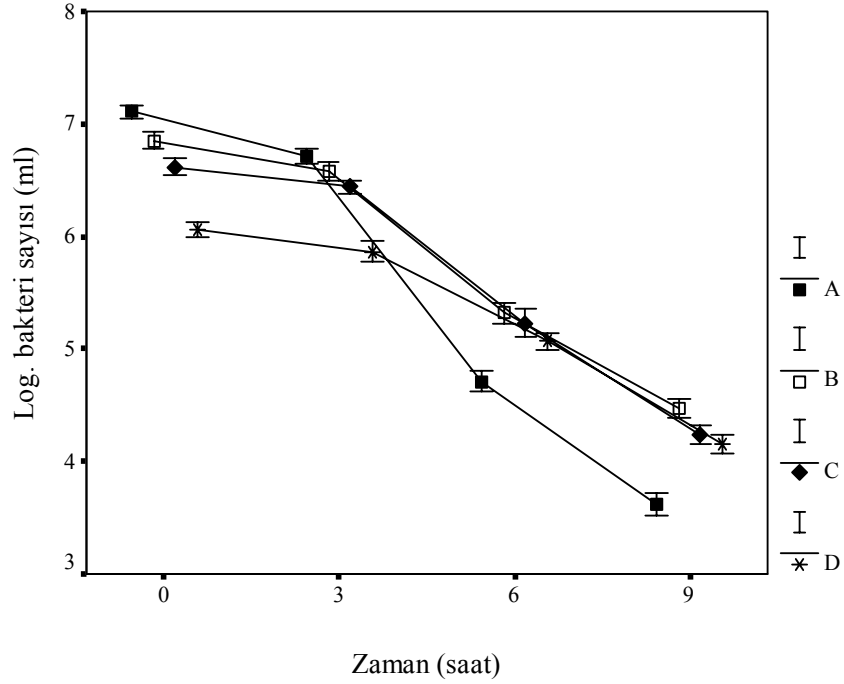
Şekil 3.40 *S.typhimurium*'un Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



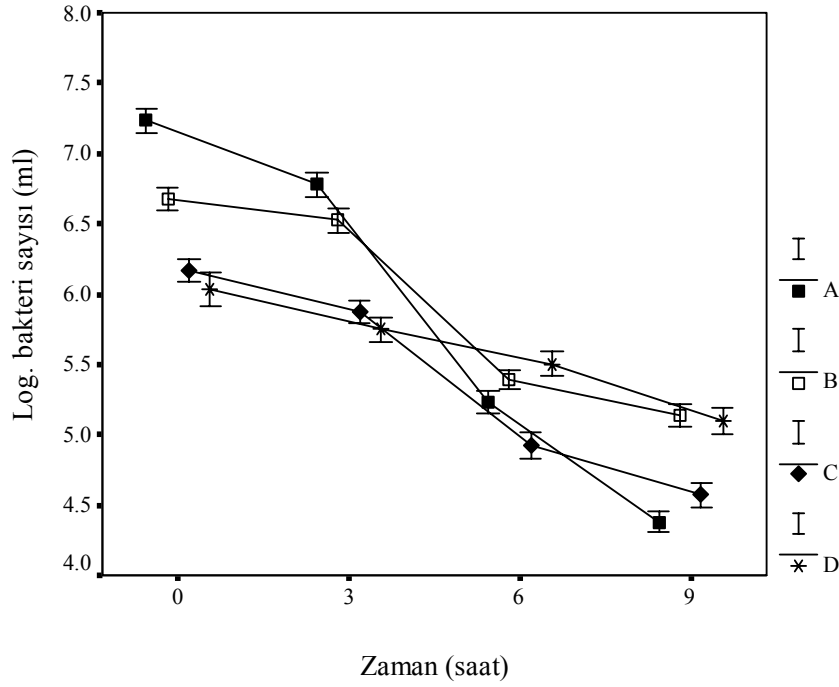
Şekil 3.41 *E.coli*'nin Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



Şekil 3.42 *S.typhimurium*'un Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



Şekil 3.43 *E.coli*'nin UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



Şekil 3.44 *S.typhimurium*'un UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)

Açlıkla ön muamele sonucunda oksidatif strese maruz bırakılan *S.typhimurium*'un yaşamında da önemli değişiklikler görülmüştür. Nitekim burada *E.coli*'den farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Metilen mavisi ilave edilen deniz suyu ortamında açlıkla ön muamele edildikten sonra *S.typhimurium*'un yaşamında azalma tespit edilmiş ve bu azalmanın beyaz ışıktaki 5, 10, 20 ve 30 gün açlıktan sonra fotooksidasyona bırakılan örneklerde sırasıyla 2.56, 1.79, 1.00 ve 0.79 log. olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.36). Burada bakteri örneği en uzun 30 gün açlığa bırakılan örnekte daha sonra sırasıyla 20, 10 ve 5 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam etmiştir. Mavi ışığın etkisi altında ise 5, 10, 20 ve 30 gün açlıktan sonra oksidasyona bırakılan bakterinin yaşamında sırasıyla 2.91, 1.75, 1.43 ve 2.3 log azalma olduğu görülmüştür (Şekil. 3.38). Yeşil ışıktaki yapılan çalışmada mavi ışığa yakın sonuçlar elde edilmiş ve bakteri 5, 10, 20 ve 30 gün açlığa maruz bırakıldıktan sonra ışık altında yaşamında sırasıyla 2.85, 1.72, 1.38 ve 1.79 log. azalma görülmüştür (Şekil. 3.40). Burada da görüldüğü gibi bakteride meydana gelen azalma en fazla 5 gün açlığa bırakılan örneklerde

elde edilmiş ve bunu sıra ile 30, 10 ve 20 gün açlığa bırakılan örnekler izlemiştir. Kırmızı ışık kaynağı altında da bakteri yaşamında bazı değişiklikler tespit edilmiştir. 15 saat süre ile yapılan çalışmada bakteri örneği 5, 10, 20 ve 30 saat açlık stresine maruz bırakıldıktan sonra ışık kaynağı altında logaritmik olarak meydana gelen azalma belirlenmiş ve bu azalmanın 2.92, 1.14, 0.66 ve 1.5 log. olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.42). Yapılan bu çalışmada yukarıdakilere benzer sonuçlar elde edilmiş. Bakteride görülen en hızlı azalmanın 5 gün açlığa bırakılan örneklerde meydana geldiği daha sonra sıra ile 30 gün, 10 gün ve 20 gün açlığa bırakılan örneklerde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Şunu söyleyebiliriz ki görünür bölge ışık kaynakları altında *S.typhimurium* açlıkla ön muamele edildikten sonra fotooksidasyona karşı en fazla direnci 10 ve 20 gün açlığa bırakılan örneklerde göstermiştir.

Farklı periyotlarda açlıkla ön muamele edildikten sonra UV-A ışık kaynağı altında bakterinin oksidasyona karşı direncinde bir artış tespit edilmiştir. Fakat görünür ışık kaynaklarından farklı olarak UV-A bakterilerin daha hızlı ortamdan elimine edilmesine sebep olmaktadır. Bundan dolayı *S.typhimurium* 5 gün, 10 gün, 20 gün ve 30 gün açlıktan sonra 9 saat UV-A ışık kaynağı altında inkübasyona bırakılmış ve bakterinin yaşamında meydana gelen değişime bakılmıştır (Şekil 3.44). Sırası ile bakteri yaşamında 2.88, 1.55, 1.60 ve 0.94 log azalmalar tespit edilmiştir. Burada bakterinin en uzun süre ile 30 gün açlıkla ön muamele sonucunda yaşamına devam ettiği ve bunu takiben 20 gün ve 10 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşadığı bunun yanında bakterinin 5 gün açlıktan sonra fotooksidasyona karşı direncinin diğerlerinden oldukça az olduğu belirlenmiştir.

3.1.6 Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda Açlıkla Ön Muamele Edildikten Sonra Farklı Dalga Boylarında Işık Kaynaklarının Etkisi Atında *E.coli* ve *S.typhimurium* Bakterilerinin Yaşamı

Ortama herhangi bir fotosensitizer madde ilave etmeden sadece deniz suyu ortamında yapılan bu çalışmada bakteri örnekleri ışık kaynaklarının etkisine bağlı olarak değerlendirilmiştir. Burada bakteri örnekleri 5 gün, 10 gün,

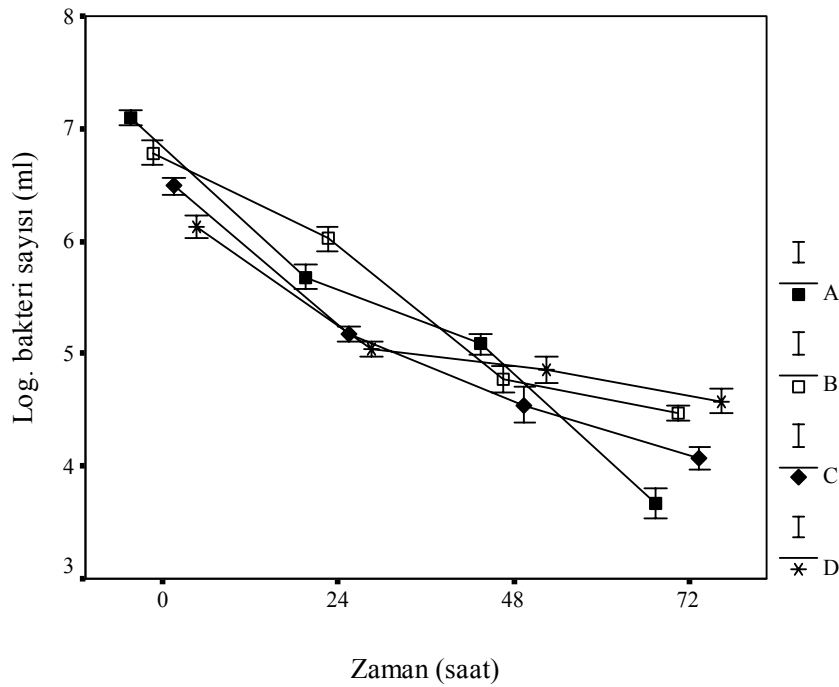
20 gün ve 30 gün açlıkla ön muamele edildikten sonra ışık kaynaklarının etkisine maruz bırakılmıştır.

E.coli'den beyaz ışığın etkisi altında 72 saat süre ile örnek alınmış ve 5 gün, 10 gün, 20 gün ve 30 gün açlıkla ön muamele edildikten sonra ışığın etkisi altında bakteri yaşamında 3.42, 2.30, 2.42 ve 1.55 log. azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.45). Burada da görüldüğü gibi bakteri 30 gün açlığa bırakılan örneklerde ışık kaynağının etkisi altında en uzun süre yaşamına devam etmiştir. Daha sonra 20 ve 10 gün açlığa bırakılan örneklerde ve en son olarak 5 gün açlığa bırakılan örneklerde ise log. olarak en kısa yaşam süresi göstermiştir.

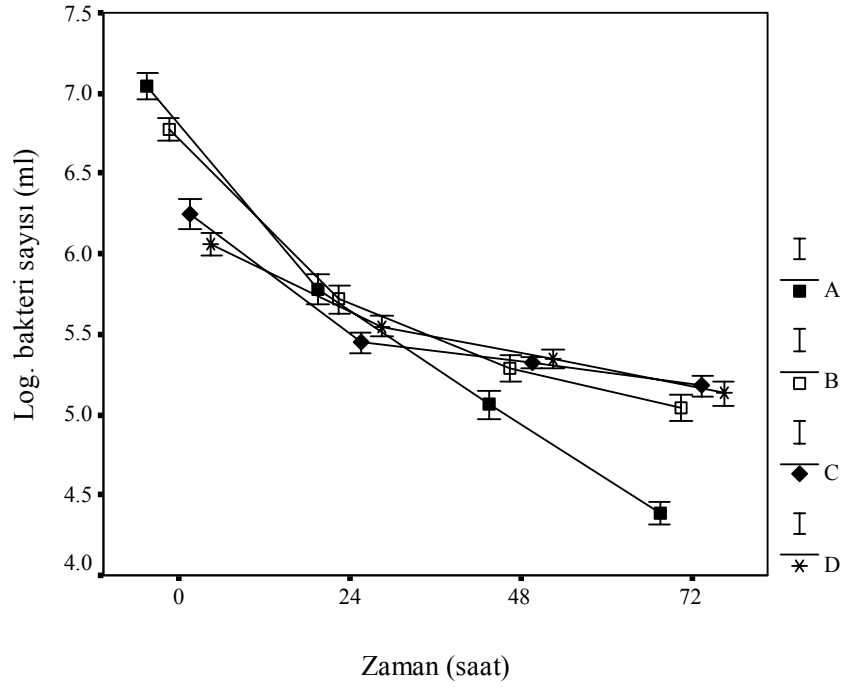
Mavi ışık kaynağının etkisi altında bakteriden 72 saat süre ile belli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve bakterinin en uzun 20 ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra yaşamına devam ettiği, 10 gün açlığa bırakılan örneklerde ise daha az yaşam süresi gösterdiği ve en kısa olarak 5 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam ettiği görülmüştür (Şekil 3.47). Nitekim bakteri yaşamında 5 gün, 10 gün, 20 gün ve 30 gün açlıktan sonra ışık kaynağının etkisi altında sırası ile 3.75, 2.25, 2.13 ve 2.13 log. azalma olduğu belirlenmiştir. Yeşil ışık kaynağı altında yapılan çalışmada mavi ışığın etkisine benzer veriler elde edilmiştir (Şekil 3.49). 5 gün, 10 gün, 20 gün ve 30 gün açlıkla ön muamele edilen *E.coli*'nin yaşamında 3.08, 1.70, 1.59 ve 2.11 log. azalma tespit edilmiştir. Bakteri en uzun 10 ve 20 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam etmiş daha sonra 30 gün ve en kısa yaşam süresi ise 5 gün açlığa maruz bırakılan örneklerde gözlenmiştir.

Açlıkla ön muamele edildikten sonra kırmızı ışığın etkisi altında bakterinin 25 saat yaşamına devam ettiği belirlenmiştir (Şekil 3.51). Bu özelliği ile bakteri diğer görünür bölge ışık kaynaklarından daha kısa süre yaşamına devam etmiştir. Nitekim 5 gün açlığa bırakıldıktan sonra kırmızı ışığın etkisi altında 3.01 log., 10 gün açlığa bırakıldıktan sonra 1.81 log., 20 gün açlığa bırakıldıktan sonra 1.53 log. ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra ise 1.84 log. azalma tespit edilmiştir. Burada bakteri en uzun 10 ve 20 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam etmiştir. 30 gün açlıktan sonra daha kısa yaşam süresi göstermiş fakat 5 gün açlığa bırakılan örneklerde herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

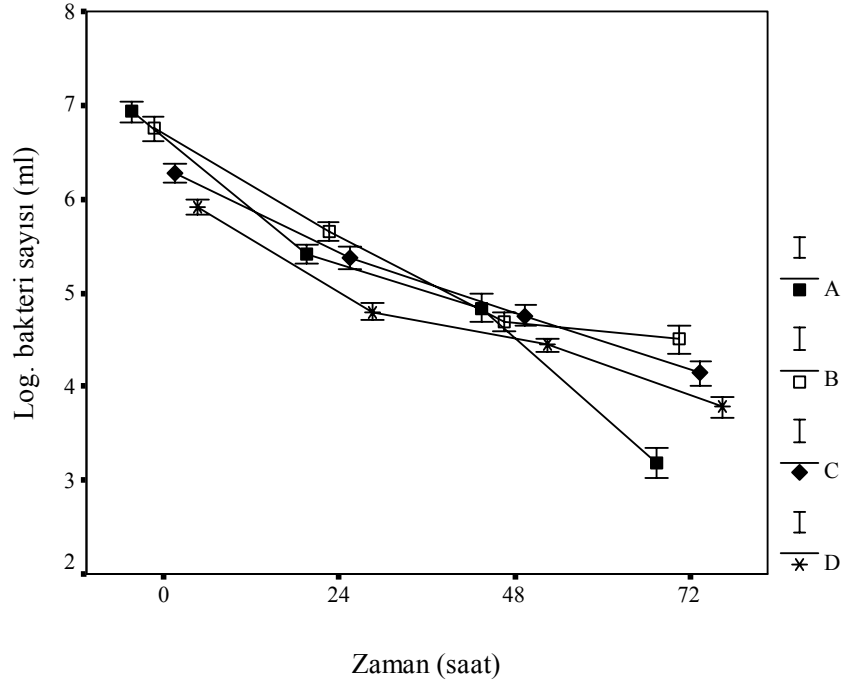
Ultraviole dalga boyunu içeren UV-A'nın etkisi altında yapılan çalışmada bakterinin 15 saat yaşadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.53). Açlıkla 5, 10, 20 ve 30 gün ön muamele edilen *E.coli*'nin yaşamında sırası ile 3.23, 2.31, 2.36 ve 1.62 log. azalma tespit edilmiştir. Diğer ışık kaynaklarından farklı olarak UV-A'nın etkisi altında bakterinin en fazla 30 gün açlığa bırakılan örneklerde daha sonra 10, 20 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. 5 gün açlığa bırakılan örneklerde ise yaşamında oldukça önemli azalmalar tespit edilmiştir.



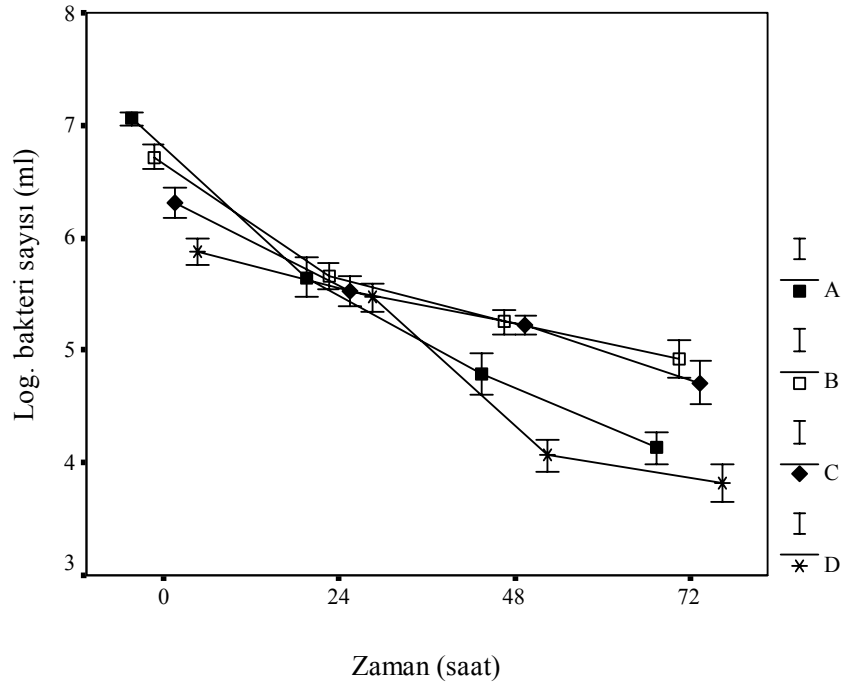
Şekil 3.45 *E.coli*'nin Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün , B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



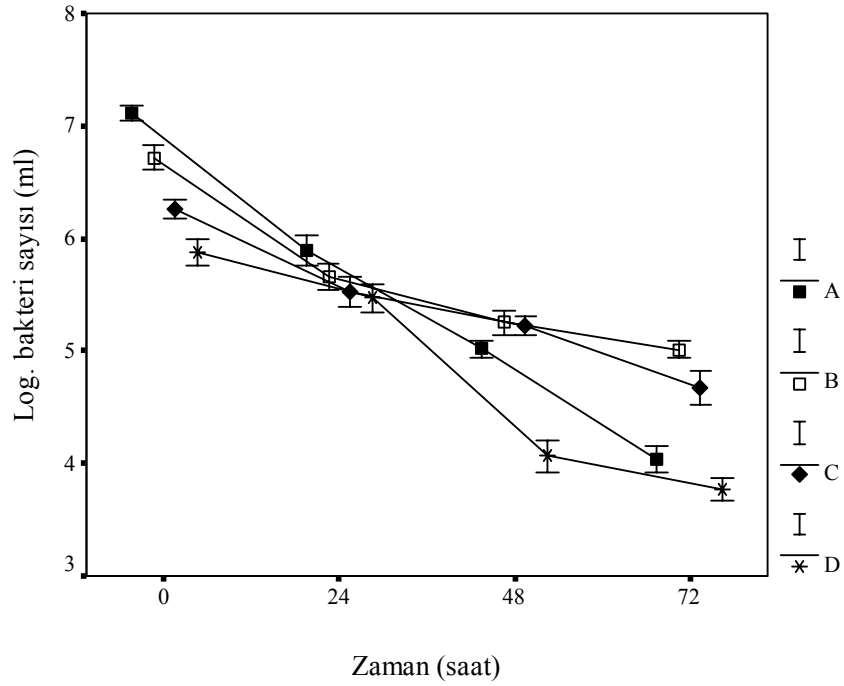
Şekil 3.46 *S.typhimurium*'un Beyaz Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



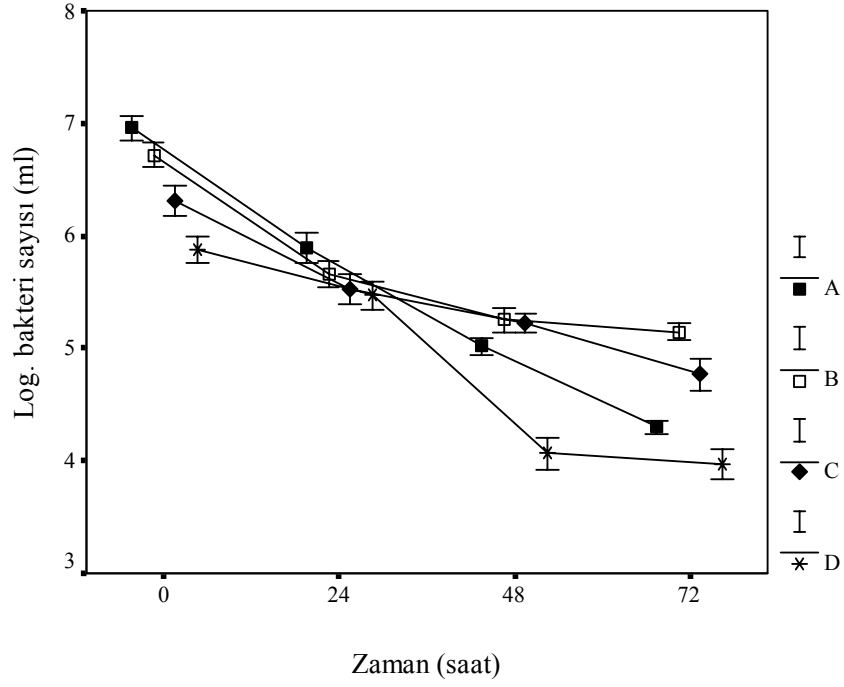
Şekil 3.47 *E.coli*'nin Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



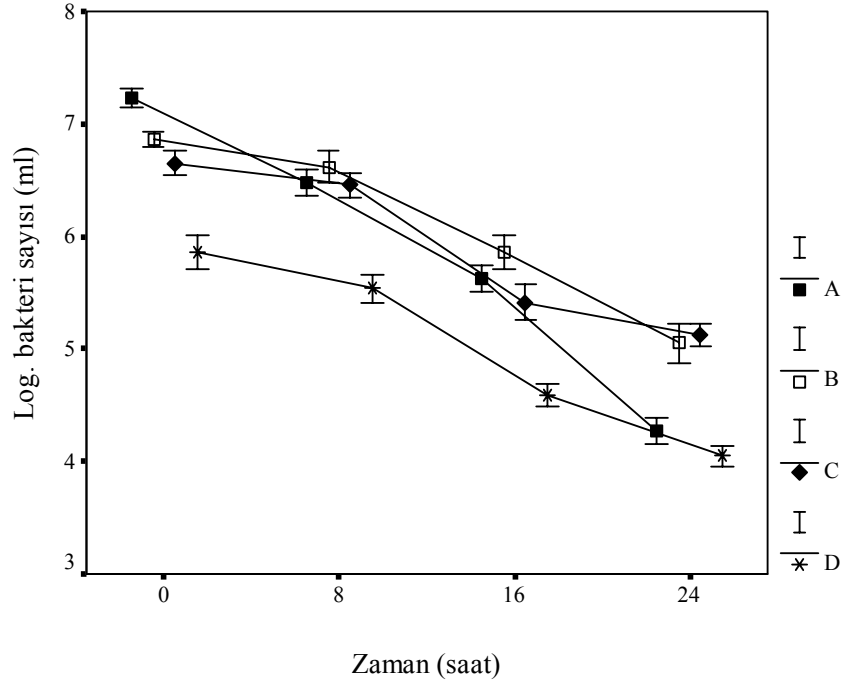
Şekil 3.48 *S.typhimurium*'un Mavi Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



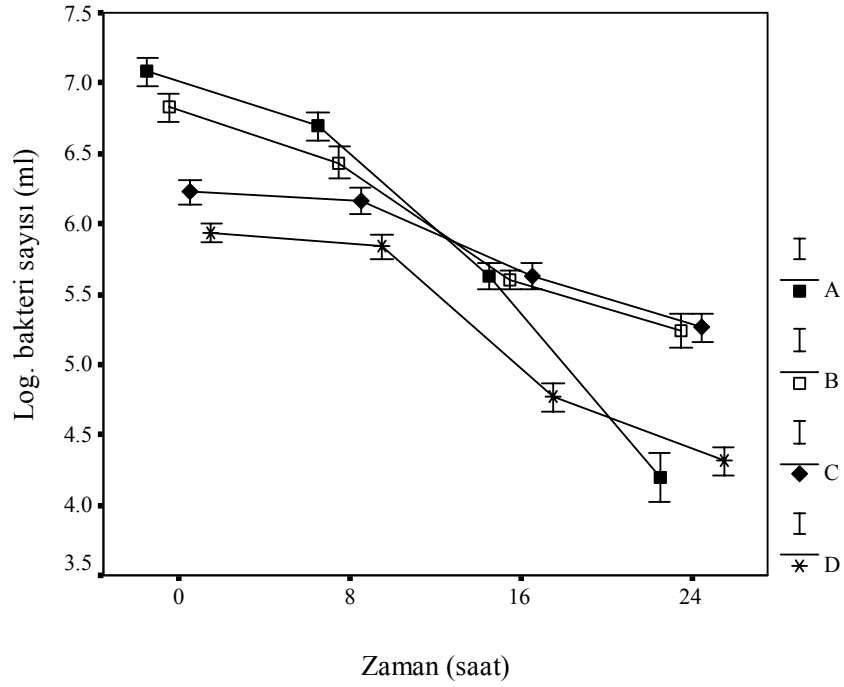
Şekil 3.49 *E.coli*'nin Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



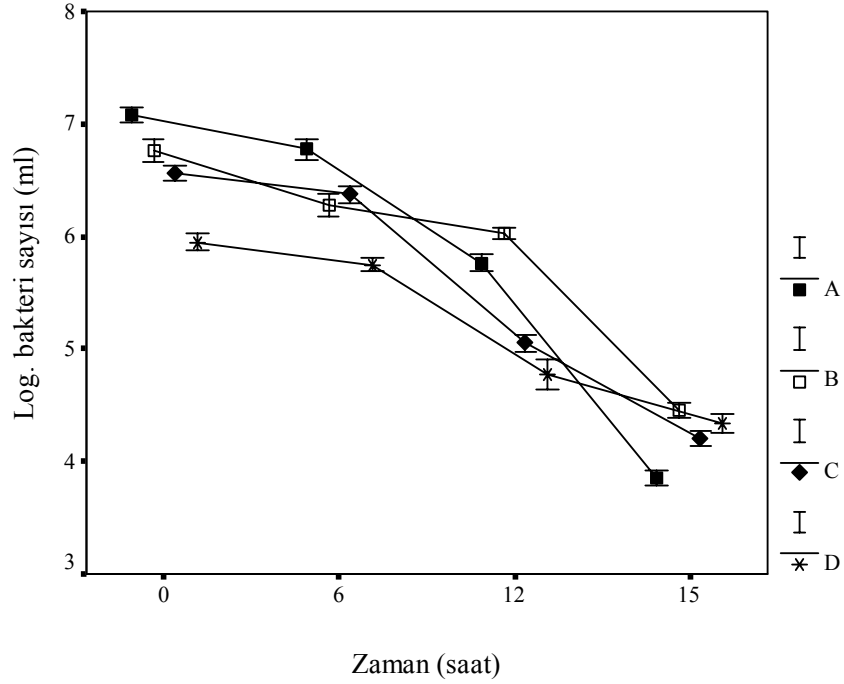
Şekil 3.50 *S. typhimurium*'un Yeşil Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



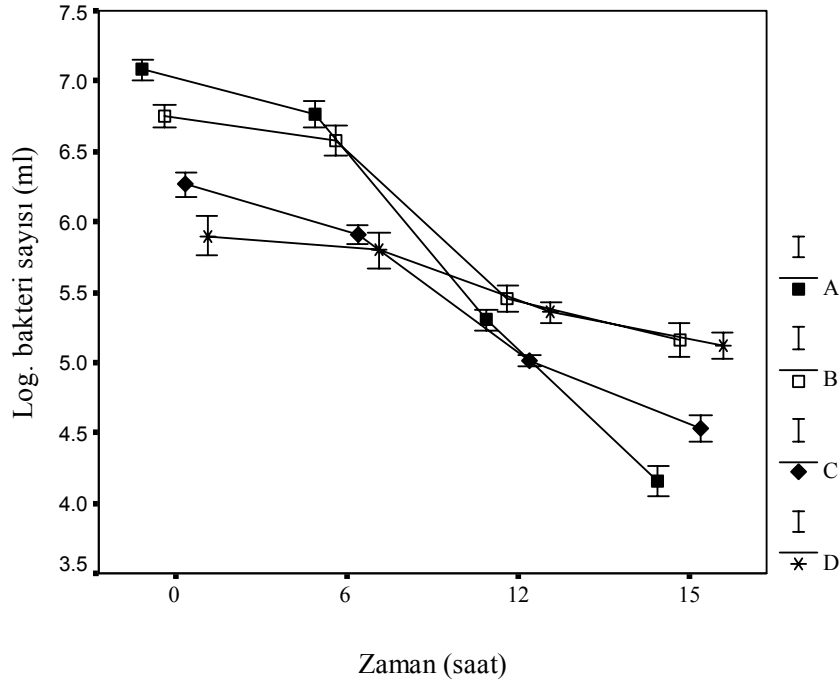
Şekil 3.51 *E. coli*'nin Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



Şekil 3.52 *S.typhimurium*'un Kırmızı Işığın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



Şekil 3.53 *E.coli*'nin UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)



Şekil 3.54 *S.typhimurium*'un UV-A'nın Etkisi Altında Yaşamı (A- 5 gün, B- 10 gün, C- 20 gün, D- 30 gün açlıkla muamele edilen örnekler)

Açlıkla ön muamele edildikten sonra farklı metilen mavisi ilave edilmeyen *S.typhimurium*'un yaşamında da farklılıklar tespit edilmiştir. Beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saat süre ile farklı zamanlarda örnekler alınarak bakterinin yaşam süreleri değerlendirilmiştir. Beyaz ışıkla muameleden sonra 5 gün, 10 gün, 20 gün ve 30 gün açlığa bırakılmış olan bakterinin yaşamında 2.66, 1.75, 1.07 ve 0.93 log. azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 3.46). Bakteri en uzun 30 gün açlığa bırakılan örneklerde, daha sonra 20, 10 ve 5 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam etmiştir. Şekil 3.48 ve 3.50'de görüldüğü gibi mavi ve yeşil ışık kaynaklarına maruz bırakıldıktan sonra bakterinin 20 ve 10 gün açlığa maruz bırakılan hücrelerde diğerlerine oranla daha uzun yaşadığı tespit edilmiştir. Şekilde de de görüldüğü gibi 5 gün açlığa maruz bırakıldıktan sonra mavi ışıkta 2.92 log. yeşil ışıkta ise 2.66 log. azalma görülmüştür. Yine 10 gün açlığa bırakılan örneklere bakıldığında mavi ışıkta 1.79 log, yeşil ışıkta 1.58 log. azalma olduğu, bunun yanında 20 gün açlığa bırakılan örneklerde mavi ışıkta 1.6 log. azalma yeşil ışıkta ise 1.48 log. azalma

olduğu belirlenmiştir. Bakteri 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra ise mavi ışıpta 2.06 log., yeşil ışıpta ise 1.92 log. azalma olduğu görülmüştür.

Kırmızı ışık kaynağı altında bakterinin 25 saat yaşadığı ve bunun sonucunda en fazla düşüşün 2.89 log. azalma ile 5 gün açlığa bırakılan örneklerde tespit edildiği görülmüştür. 10 gün açlığa maruz bırakıldığında ise bakterinin yaşamında 1.58 log. azalma görüldüğü, 20 günlük açlıktan sonra ise 0.96 log. azalma olduğu belirlenmiş, bunun yanında 30 gün açlıktan sonra bakterinin log. olarak 1.62 oranında azalma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3.52). *E.coli*'de de görüldüğü gibi görünür bölge ışık kaynakları arasında *S.typhimurium*'un yaşamını etkileyen en önemli ışık kaynağının kırmızı ışık olduğu belirlenmiştir.

S.typhimurium ile Ultraviole dalga boyunu içeren UV-A'nın etkisi altında yapılan çalışmada bakterinin 15 saat yaşadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.54). Açlıkla 5, 10, 20 ve 30 gün ön muamele edilen *E.coli*'nin yaşamında sırası ile 3.23, 2.31, 2.36 ve 1.62 log. azalma tespit edilmiştir. Diğer ışık kaynaklarından farklı olarak UV-A'nın etkisi altında bakterinin en fazla 30 gün açlığa bırakılan örneklerde daha sonra 10, 20 gün açlığa bırakılan örneklerde yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. 5 gün açlığa bırakılan örnekte ise bakterinin yaşamında UV-A'nın etkisi altında oldukça önemli azalmalar olduğu tespit belirlenmiştir.

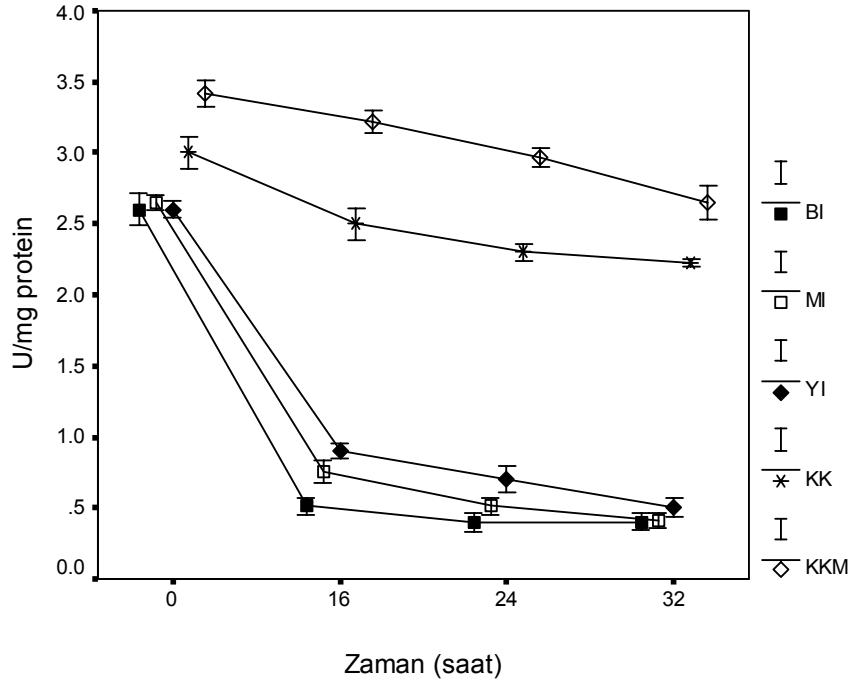
Yapılan çalışmada açlıkla ön muamele edildikten sonra fotooksidasyonla muamele edilen bakterilerin oksidatif strese karşı daha dayanıklı olduğu görülmüştür. 10 ve 20 gün açlıkla muamele edilen örneklerde bu dayanıklılığın diğerlerine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

3.2 Deniz Suyunda Yaşayan *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Oksidatif Stres Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim

3.2.1. Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Oksidatif Stres Enzimlerinden Olan Katalaz, Süperoksit Dismutas, Glutathion Peroksidaz ve Glukoz-6-P Dehidrogenaz Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim

Deniz suyunda yaşayan mikroorganizmaların hayatı burada bulunan bir çok çevresel faktörün etkisine bağlı olarak değişmektedir. Özellikle görünür bölge ışınları ve UV dalga boyunu içeren ışınlar bakterilerin yaşamını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu etki daha çok ortamda bulunan bir fotosensitizerin ışık tarafından Emilimi sonucu radikallerin oluşmasıyla meydana geldiği bilinmektedir. Böyle durumlara karşı bakterilerin kendilerini koruyabilmek için oksidatif stres enzim aktivitelerinde artış olduğu ifade edilmektedir. Burada farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında ortama bir fotosensitizer olan metilen mavisi ilave edilerek veya metilen mavisinin bulunmadığı ortamda sadece deniz suyunun etkisi altında bakterilerde bulunan oksidatif stres enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

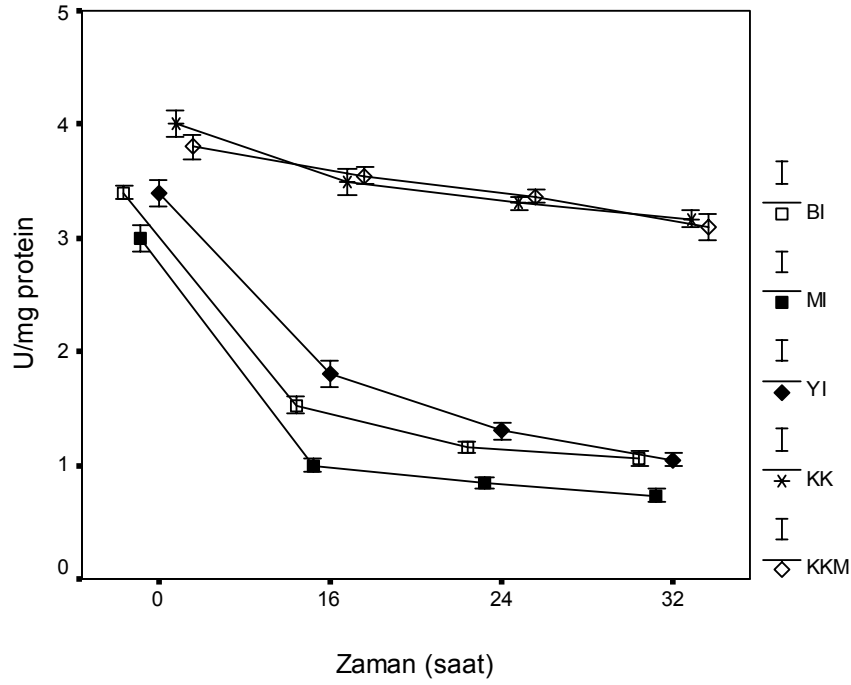
Metilen mavisi ilave edilen örneklerde beyaz, mavi, yeşil, kırmızı ve ışık kaynakları altında yapılan çalışmada *E.coli*'nin katalaz aktivitesinde meydana gelen değişim araştırılmış gözle görülür azalmalar olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.55'de görüldüğü gibi 32 saat süre sonunda beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynakları altında katalaz aktivitesinde azalma olduğu ve bu azalmanın %80'e kadar ulaştığı görülmüştür. Burada en fazla azalmanın mavi ışıktaki olduğu daha sonra beyaz ve yeşil ışık kaynakları altında meydana geldiği şekilde tespit edilmiştir. Fakat kırmızı ışık kaynağı altında bakterinin 16 saat sonunda katalaz aktivitesinde %80'den daha fazla azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.59). Karanlıkta ve metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol ile yapılan çalışmada ise katalaz aktivitesinde önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.55 *E.coli*'nin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim

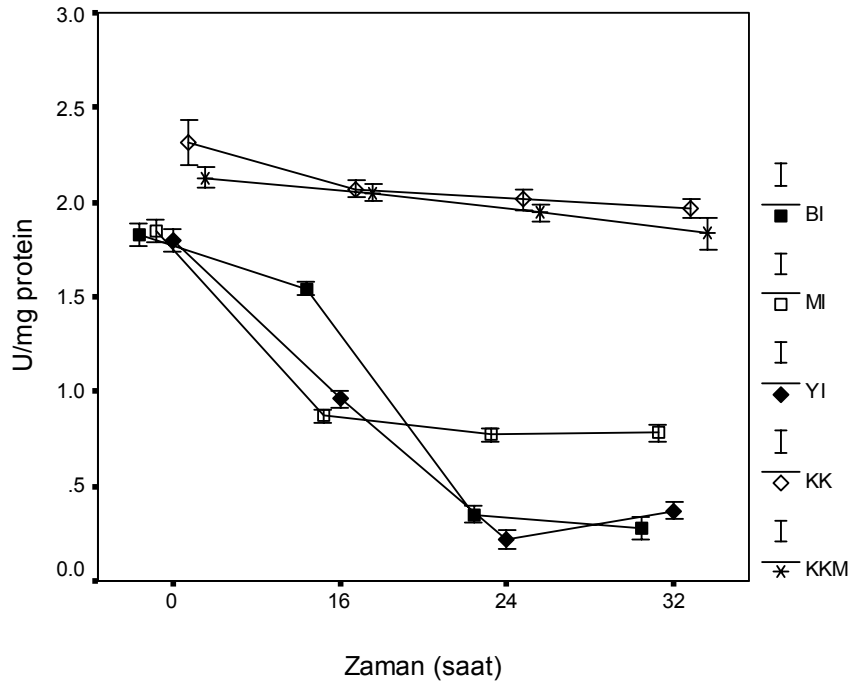
(BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

32 saat yapılan çalışmada *E.coli*'de sod aktivitesinde de önemli azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 3.56). Beyaz ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında yaklaşık %66 oranında azalma görülürken mavi ışığın etkisi altında yaklaşık %87 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Kırmızı ışık kaynağı altında yapılan çalışmada ise sod aktivitesinde 16 saat sonunda %75 oranında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.59). Kontrol için alınan örneklerde bakterinin, sadece karanlıkta ve karanlık artı metilen mavisinin bulunduğu ortamda enzim aktivitesinde gözle görülür bir azalmanın olmadığı belirlenmiştir. Enzim aktivitesinde azalmanın en fazla kırmızı ışık kaynağı altında daha sonra mavi, beyaz ve yeşil ışıkta olduğu gözlenmiştir. Bu da bize enzim miktarındaki azalmanın ışık kaynağı ile alakalı olduğunu göstermektedir.



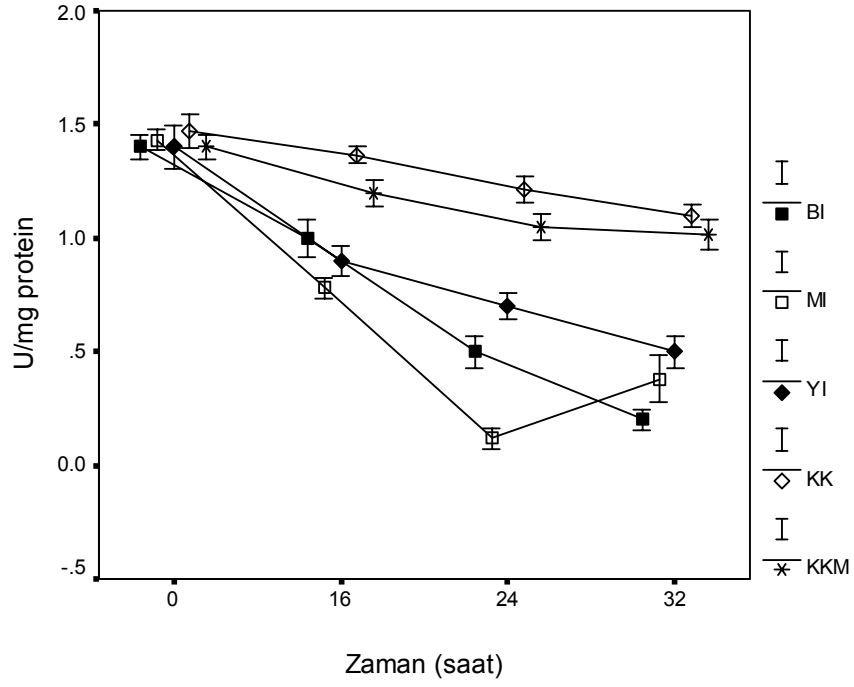
Şekil 3.56 *E.coli*'nin Superoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Oksidatif stres enzimlerden olan glutation peroksidaz aktivitesinde 32 saat sonunda önemli değişiklikler görülmüştür (Şekil 3.57). Kontrol örneklerinde önemli değişiklikler olmamasına rağmen mavi ışıkta %60 , beyaz ışıkta %75 ve yeşil ışık kaynağının etkis altında yaklaşık %70 azalma olduğu belirlenmiştir. Kırmızı ışık kaynağında ise bu azalma 16 saat sonunda meydana gelmiştir (Şekil 3.60). Glutathion peroksidaz enzim aktivitesinde kırmızı ışığın etkisi altında 16 saat sonunda %85 oranında azalma olduğu belirlenmiştir.

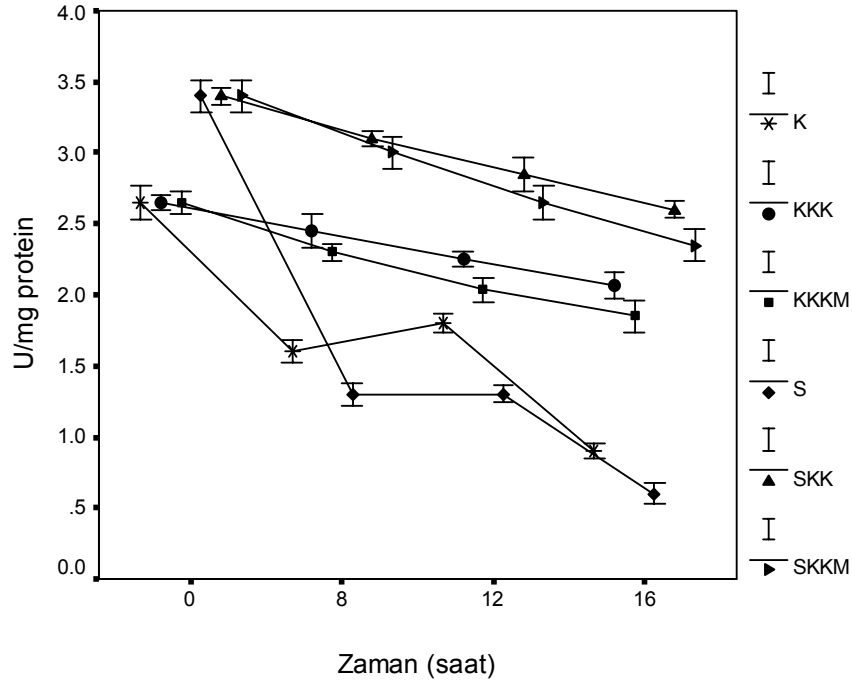


Şekil 3.57 *E.coli*'nin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Glukoz-6-P-dehidrogenaz oksidatif stres enzimlerden biri olarak ifade edilmektedir. Nitekim oksidatif stresde artış meydana geldiğinde enzim miktarında artış olduğu ifade edilmektedir. Bunun bakteriyi radikallerin zararından korumak için yaptığı düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak yapılan çalışmada farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'de glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim araştırılmıştır. 32 saat süre ile yapılan çalışmada beyaz ışığın etkisi altında yaklaşık %83, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında ise %60 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.58). Kırmızı ışık kaynağı altında 16 süre ile yapılan çalışmada ise bakterinin enzim aktivitesinde %80 azalma olduğu bunun yanında kontrol örneklerinde gözle görülür bir azalmanın olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.60).

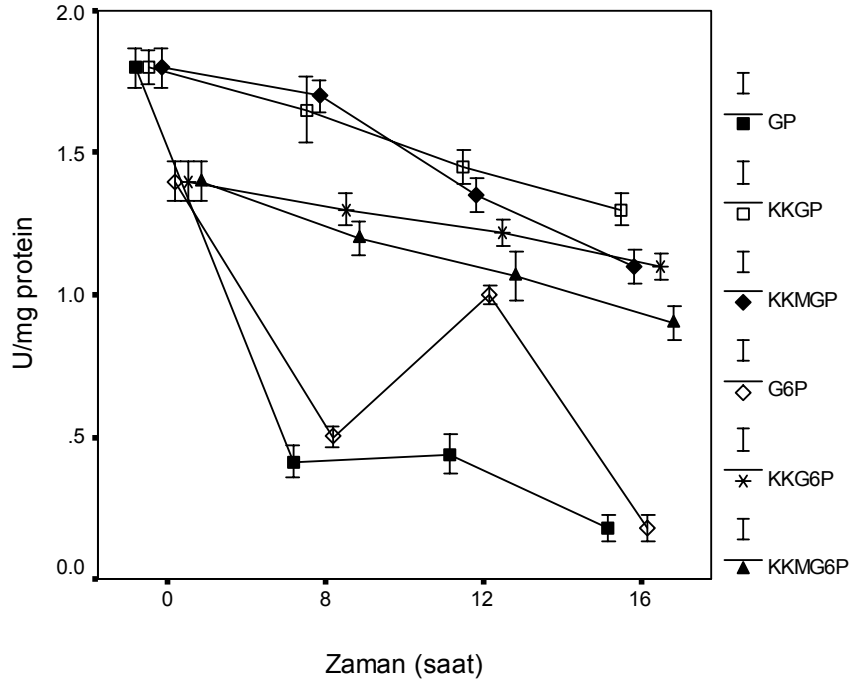


Şekil 3.58 *E.coli*'nin glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



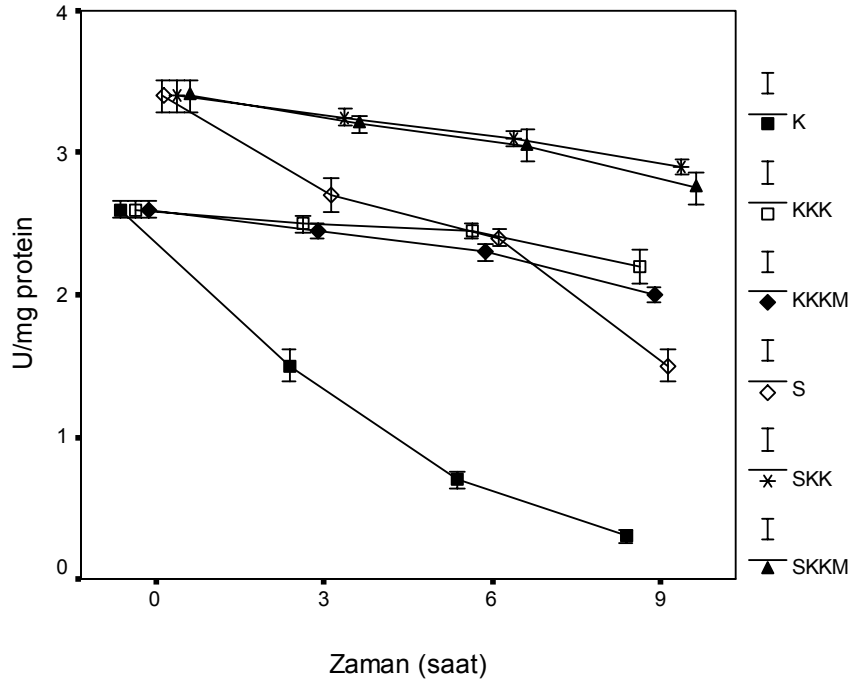
Şekil 3.59 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *E.coli*'nin

katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, KKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık katalaz; S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz, SKKM, Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



Şekil 3.60 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *E.coli*'nin

glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutation peroksidaz, KKG6P: Karanlık kontrol glutation peroksidaz, KKMGP: metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKMGP6P: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)

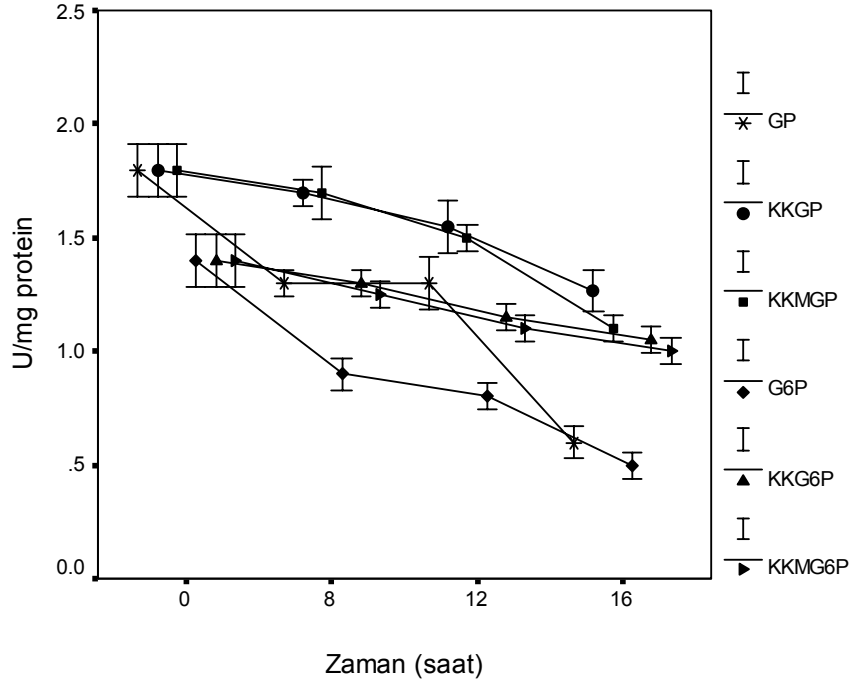


Şekil 3.61 UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'nin katalaz ve superoksit

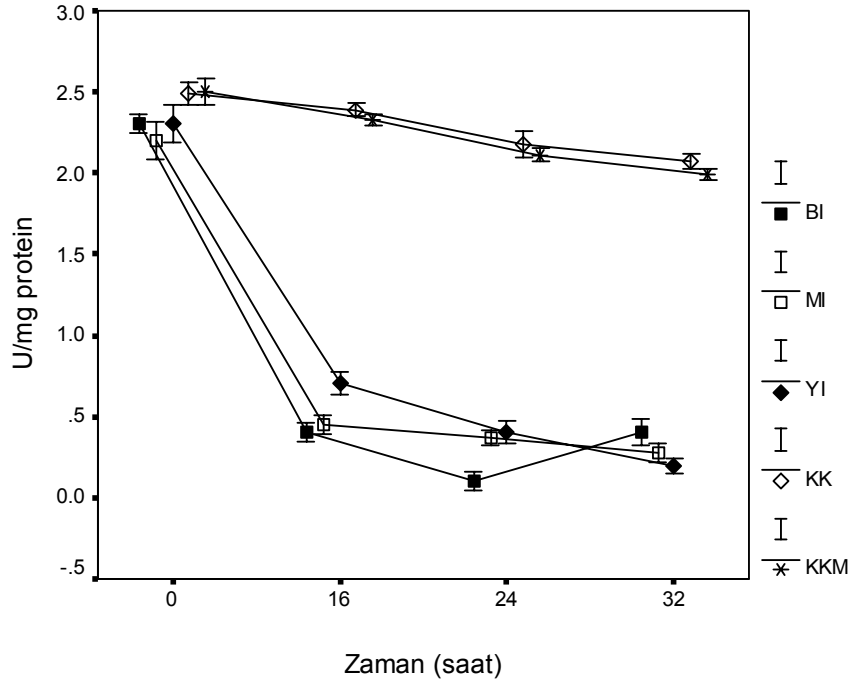
dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, KKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık katalaz; S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz, SKKM, Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Ultraviyole ışın kaynakları bakterilerin sucul sistemlerde yaşamını etkileyen önemli faktörlerden biridir. UV-A özellikle ortamda bir fotosensitizer varken önemli etkilere sahiptir. Çünkü UV-A fotosensitizer maddeler tarafından emilip ortamda radikallerin oluşmasına neden olur, bu da ortamda bulunan bakteri ve diğer canlılara zarar vermektedir. Yapılan bu çalışmada *E.coli* 9 saat UV-A'nın etkisine maruz bırakılmış ve oksidatif enzim seviyelerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Şekil 3.61 ve 3.62'de görüldüğü gibi bu süre esnasında ortamda bir fotosensitizer mevcutken enzim aktivitelerinde önemli azalmalar tespit edilmiştir. Bu sürede katalaz aktivitesinde %60, sod aktivitesinde ise %78 oranında azalmalar olduğu görülmüştür. Glutation

peroksidaz enzim aktivitesinde %78 azalma görülürken glukoz-6-P-dehidrogenaz aktivitesinde %66 oranında bir azalma olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.62 UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutation peroksidaz, KKGP: Karanlık kontrol glutation peroksidaz, KKMGP: metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKMGP6P: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)

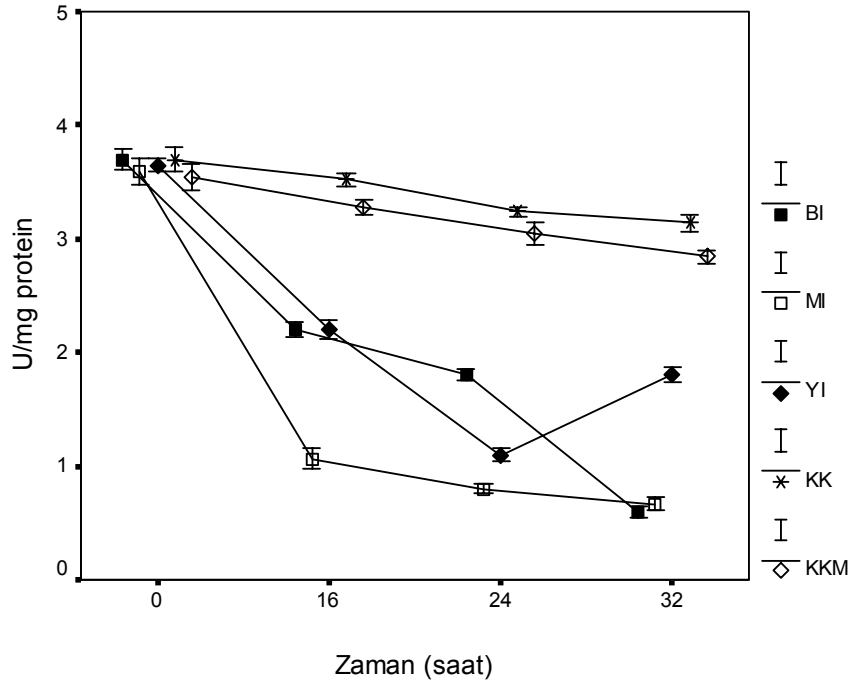


Şekil 3.63 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Ortama fotosensitizer ilave edildikten farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisine maruz bırakılan *S.typhimurium*'un oksidatif stres enzim seviyesinde bazı değişiklikler olduğu belirlenmiştir. Bu değişikliğin daha çok diğer bakteri türünde olduğu gibi azalma yönünde olduğu tespit edilmiştir.

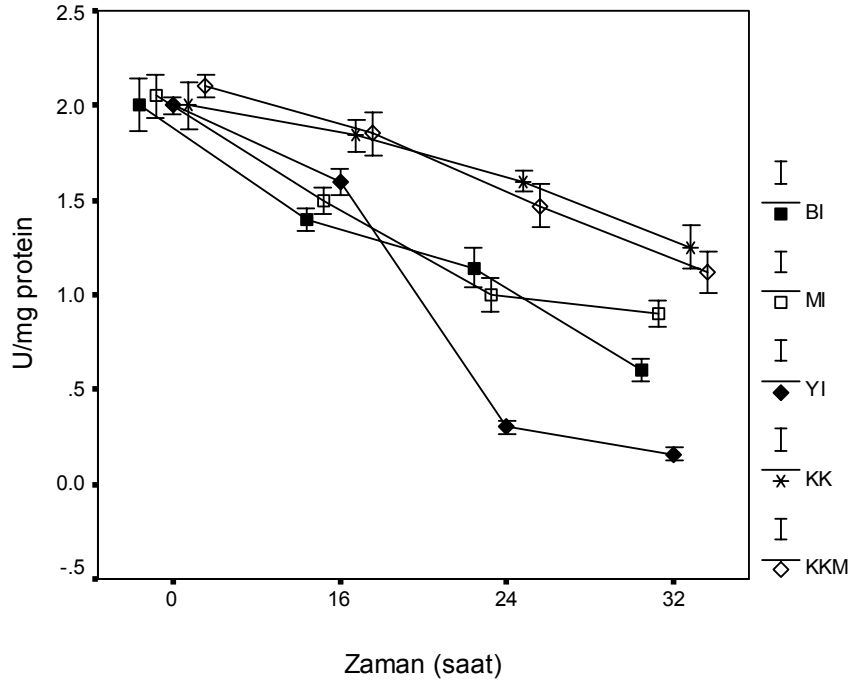
32 saat süre ile yapılan çalışmada beyaz ışık altında katalaz aktivitesinde %85, mavi ışık altında %86 ve yeşil ışığın etkisi altında ise %87 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.63). Kırmızı ışık ise enzim aktivitesinde daha hızlı azalmaya sebep olmuştur (Şekil 3.67). 16 saat süre ile yapılan çalışmada kırmızı ışığın etkisi altında bakterinin katalaz aktivitesinde %83 azalma olduğu belirlenmiştir. Görünür bölge ışık kaynakları arasında en hızlı azalmaya kırmızı ışığın sebep olduğu yapılan çalışmada görülmüş ve bu

azalmanın muhtemelen ışık kaynağı ile fotosensitizer arasında meydana gelen etkileşimden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.



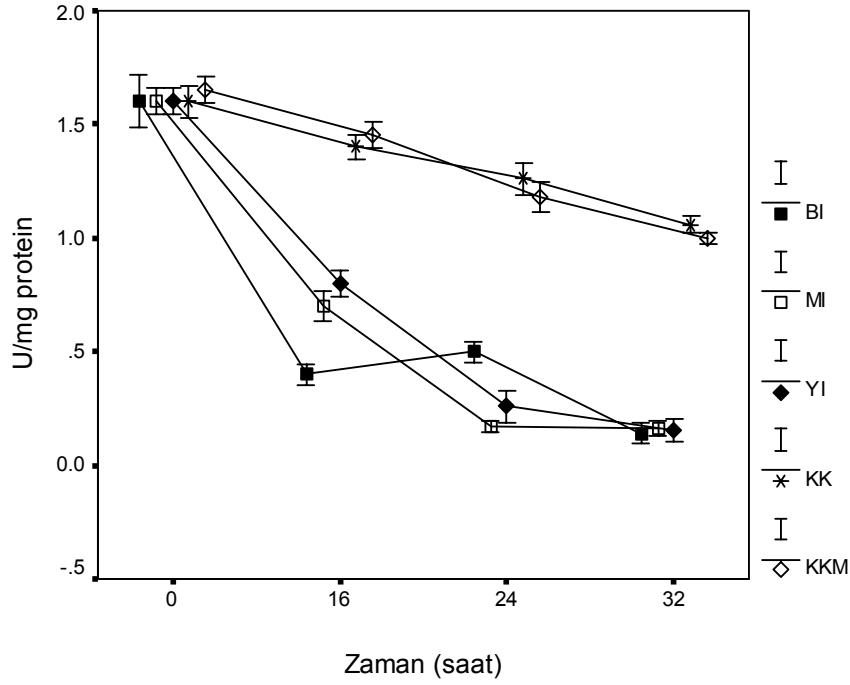
Şekil 3.64 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyuunda *S.typhimurium*'un superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim şekil 3.64 ve şekil 3.67'de görülmektedir. Beyaz ışık altında 32 saat sonunda sod aktivitesinde %86, mavi ışık altında %83 ve yeşil ışık altında yaklaşık %66 azalma olduğu bunun yanında kırmızı ışık ile 16 saat süre yapılan çalışmada enzim aktivitesinde yaklaşık %66 azalma olduğu belirlenmiştir. Karanlık kontrol ve metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol örneklerinde ise gözle görülür bir değişikliğe rastlanmamıştır.



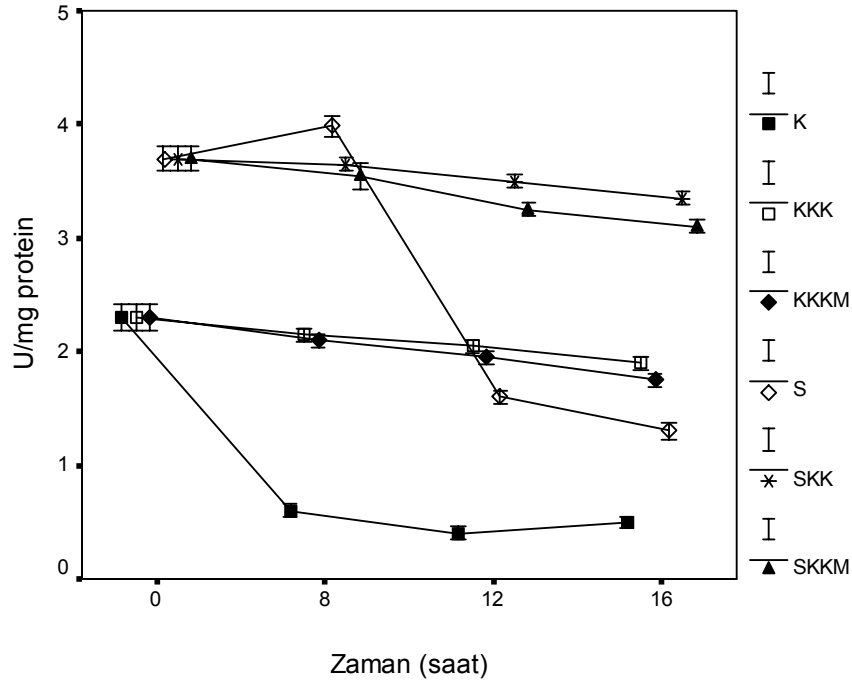
Şekil 3.65 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Şekil 3.65'de görüldüğü gibi oksidatif strese maruz bırakılan *S.typhimurium* bakterisinin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde azalma olduğu ve bu azalmanın beyaz ışık altında %75, mavi ışık altında %60 ve yeşil ışık altında %87 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Kırmızı ışık altında ise bakterinin enzim aktivitesinde %75 azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.68). Burada da ilk 16 saat içinde bakterinin enzim aktivitesinde oldukça fazla düşüş olduğu belirlenmiştir.

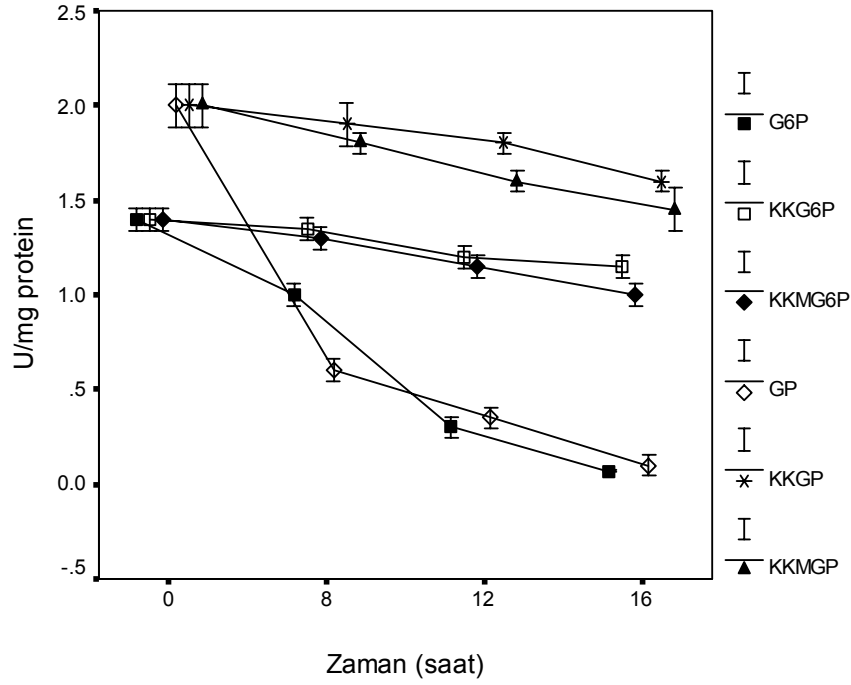


Şekil 3.66 Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Işık kaynakları *S.typhimurium* bakterisinde bulunan glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde azalmaya sebep olmuştur. Beyaz ışık altında yapılan çalışmada bakterinin enzim aktivitesinde yaklaşık %90, mavi ışık altında %89, yeşil ışığın etkisi altında ise %87 oranında azalma olduğu (Şekil 3.66), bunun yanında kırmızı ışık ile 16 saat yapılan çalışmada enzim aktivitesinde yaklaşık %75 azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.68).

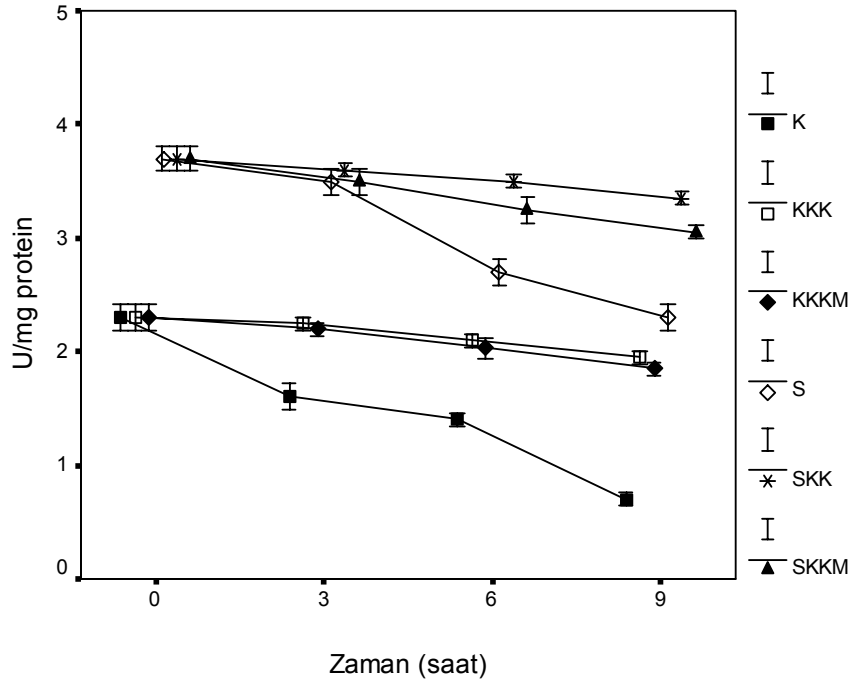


Şekil 3.67 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda *S.typhimurium*'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, KKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık katalaz; S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz, SKKM, Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



Şekil 3.68 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında

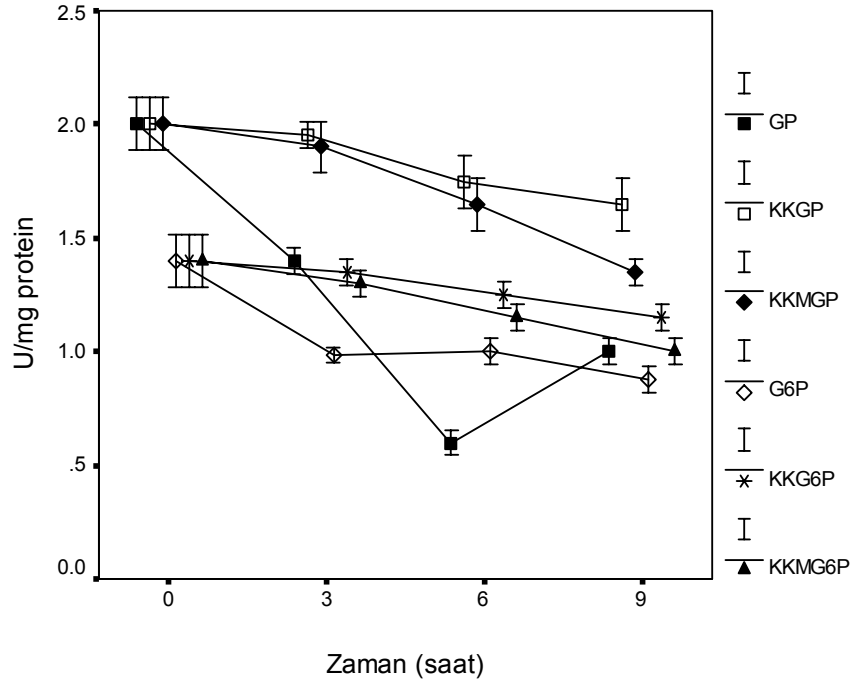
S.typhimurium'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutation peroksidaz, KKG: Karanlık kontrol glutation peroksidaz, KKMGP: metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKMGP6P: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)



Şekil 3.69 UV-A'nın etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda

S.typhimurium'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, KKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık katalaz; S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz, SKKM, Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Ultraviyole dalga boyu içinde UV-A *S.typhimurium*'un oksidatif enzim aktivitesinde değişikliğe sebep olmuştur. Ortamda bir fotosensitizer mevcutken 9 saat süre ile yapılan çalışmada enzim aktivitelerinde azalmalar tespit edilmiştir. Şekil 3.69 de görüldüğü gibi 9 saat sonunda katalaz aktivitesinde %66, sod aktivitesinde ise %33 azalma olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında şekil 3.70 da görüldüğü gibi glutatyon peroksidaz aktivitesinde %50, glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde ise %14 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneklerine bakıldığında ise önemli bir azalmanın olmadığı görülmüştür.



Şekil 3.70 UV-A'nın etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda

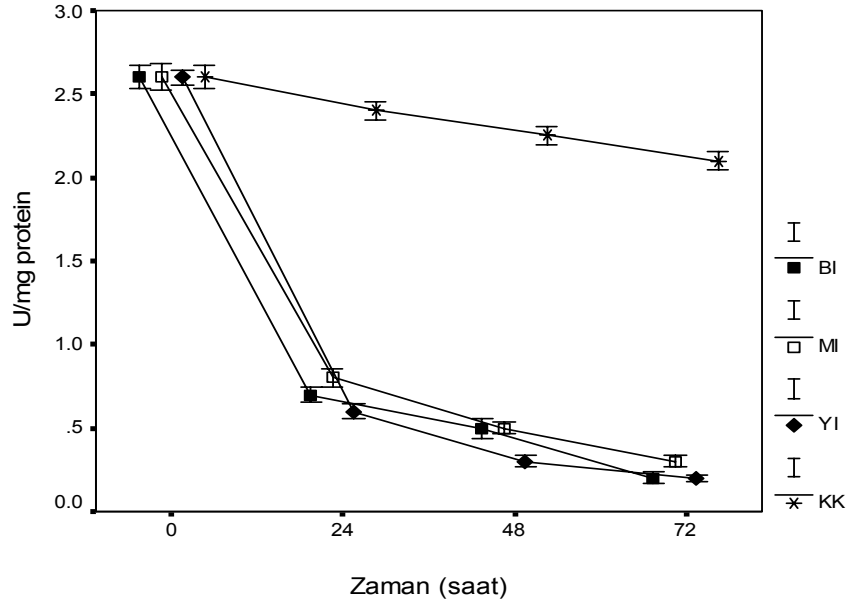
S.typhimurium'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutation peroksidaz, KKGp: Karanlık kontrol glutation peroksidaz, KKMGP: metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKMGP6P: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)

3.2.2. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Oksidatif Stres Enzimlerinden Olan Katalaz, Süperoksit Dismutas, Glutathion Peroksidas ve Glukoz-6-P Dehidrogenaz Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim

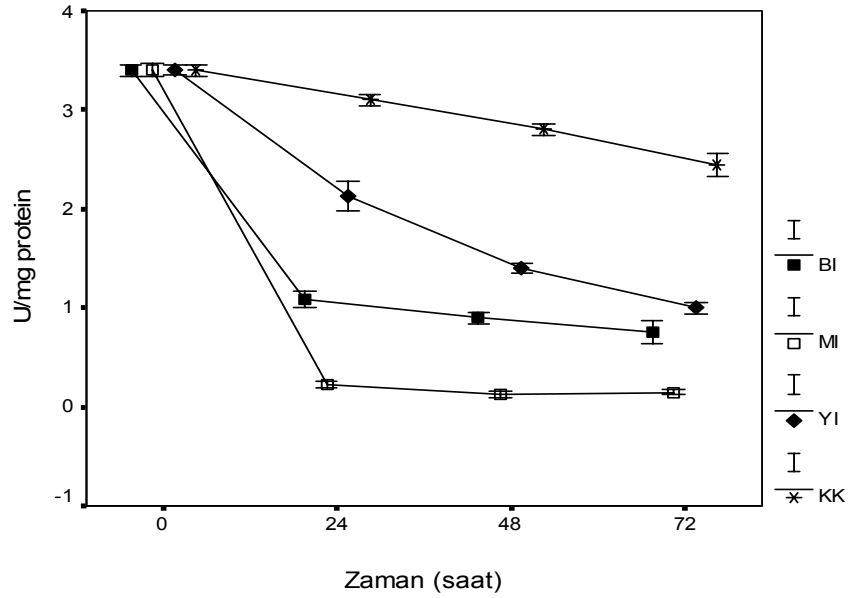
Ortama herhangi bir fotosensitizer madde ilave edilmeden sadece deniz suyu ortamında yapılan çalışmada bakterilerin beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında 72 saat süre, kırmızı ışığın altında 24 saat süre ile enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır.

E.coli ile yapılan çalışmada katalaz aktivitesinde beyaz ışığın etkisi altında %90, mavi ışığın etkisi altında %85, yeşil ışığın etkisi altında %90 oranında azalma olduğu (Şekil 3.71), bunun yanında kırmızı ışık altında 24 saat yapılan çalışmada %75 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.75). Süperoksit dismutaz enzim seviyesinde de azalma olduğu görülmüştür. Bu azalmanın beyaz ışıktaki %75, mavi ışıktaki %95 ve yeşil ışıktaki %60 oranında olduğu (Şekil 3.72) fakat kırmızı ışık altında 24 saat yapılan çalışmada yaklaşık %50 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.75). Şekil 3.73 ve 3.79 glutathion peroksidaz seviyesinde meydana gelen değişimi göstermektedir. Beyaz ışık altında yapılan çalışmada %85, mavi ışık altında %75 ve yeşil ışık altında %95'e yakın azalmalar olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.73). 24 saat kırmızı ışık altında yapılan çalışmada ise %60 oranında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 3.76). Glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim seviyesinde beyaz ışık altında %40, mavi ışık altında %85 ve yeşil ışık altında %67 oranında azalmalar olduğu (Şekil 3.74) bunun yanında kırmızı ışık altında yaklaşık %40 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.76).

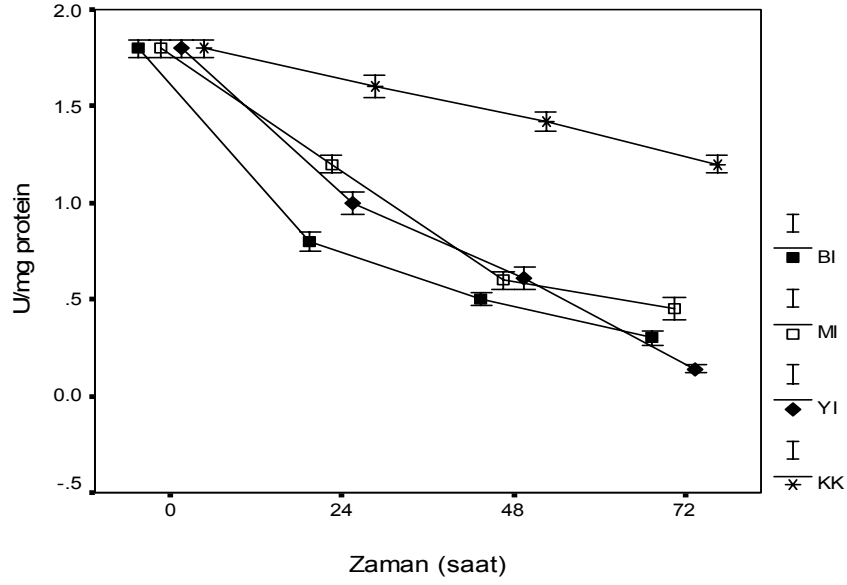
Görünür bölge ışık kaynakları arasında bakterinin enzim aktivitesinde en fazla azalmaya kırmızı ışığın sebep olduğu bunun yanında diğer ışık kaynaklarının enzim aktivitesinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir.



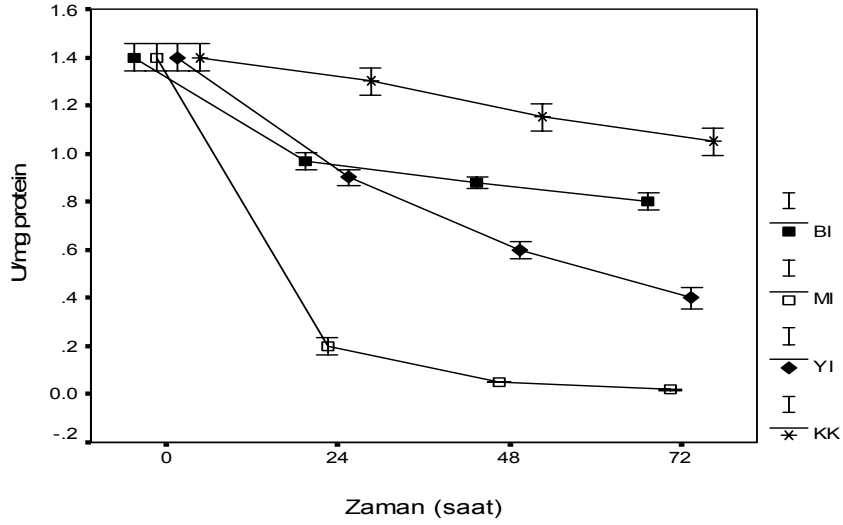
Şekil 3.71 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'nin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



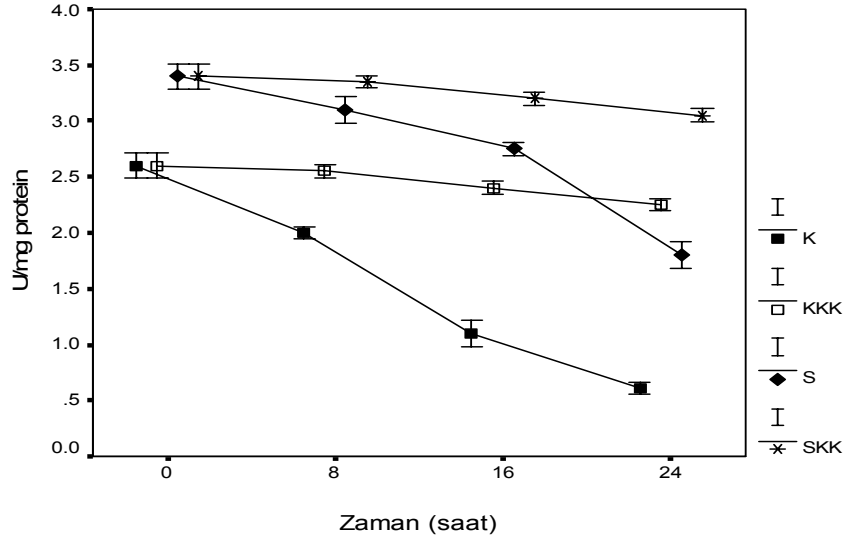
Şekil 3.72 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'nin superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



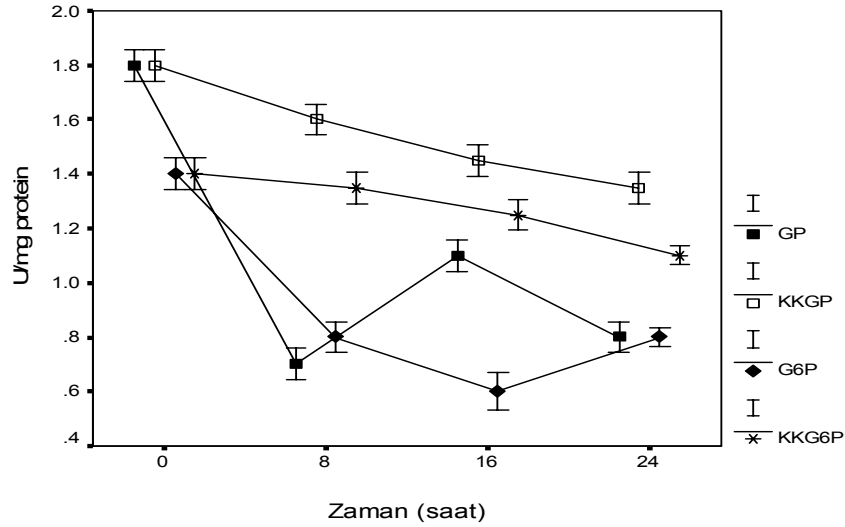
Şekil 3.73 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'nin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



Şekil 3.74 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'nin glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



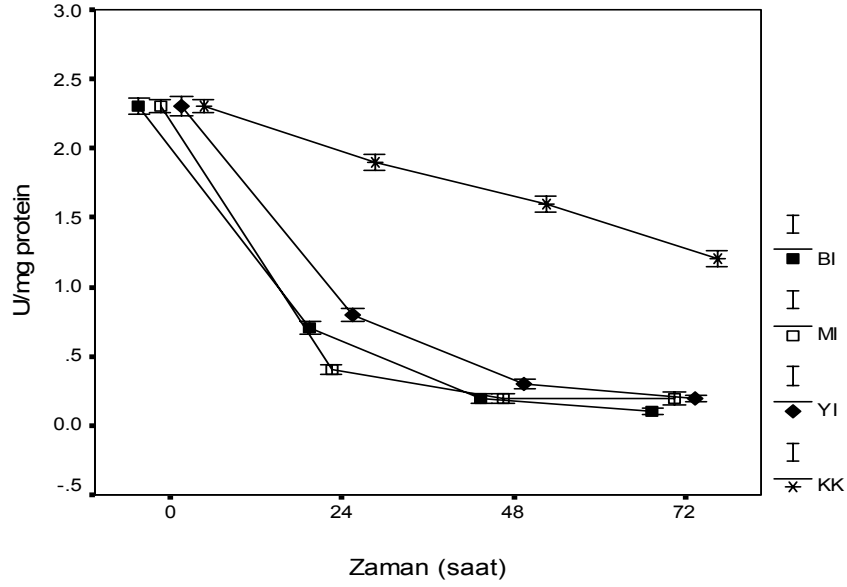
Şekil 3.75 Deniz suyunda kırmızı ışığın etkisi altında *E.coli*'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz)



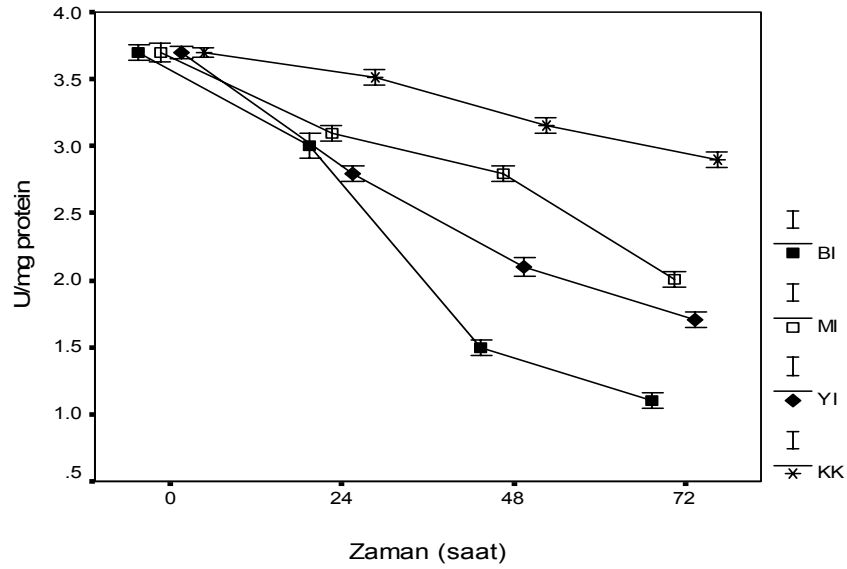
Şekil 3.76 Deniz suyunda kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *E.coli*'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutathione peroksidaz, KGP: Karanlık kontrol glutathione peroksidaz, G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)

Ortama herhangi bir fotosensitizer madde ilave edilmeden sadece deniz suyu ortamında yapılan çalışmada farklı dalga boyunda ışınların etkisi altında *S.typhimurium*'da oksidatif stres enzimlerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Şekil 3.77 de 72 saat süre ile ışık kaynaklarının etkisi altında katalaz enzim seviyesinde meydana gelen değişim görülmektedir. Burada da görüldüğü gibi deniz suyu ortamında beyaz ışığın etkisi altında %95 oranında, mavi ışıkta %90 oranında ve yeşil ışığın etkisi altında %90 oranında azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Kırmızı ışığın etkisi altında 24 saat yapılan çalışmada ise bakterinin katalaz aktivitesinde %75 oranında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.81). Sod miktarında da zamana bağlı olarak bazı değişiklikler olduğu ve bu değişikliklerin dalga boyuna bağlı olarak farklı olduğu da görülmüştür. Şekil 3.76 incelendiğinde beyaz ışığın etkisi altında sod aktivitesinde %65, mavi ışığın etkisi altında %55, yeşil ışığın etkisi altında ise %70 oranında azalma olduğu görülmektedir. 24 saat kırmızı ışığa maruz bırakılan bakteri örneğinde ise sod aktivitesinde %60 gibi bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.81). Diğer dalga boyunda 72 saatte görülen azalmanın burada 24 saatte olması kırmızı ışığın ne kadar etkili olduğunu bize göstermesi açısından önemlidir.

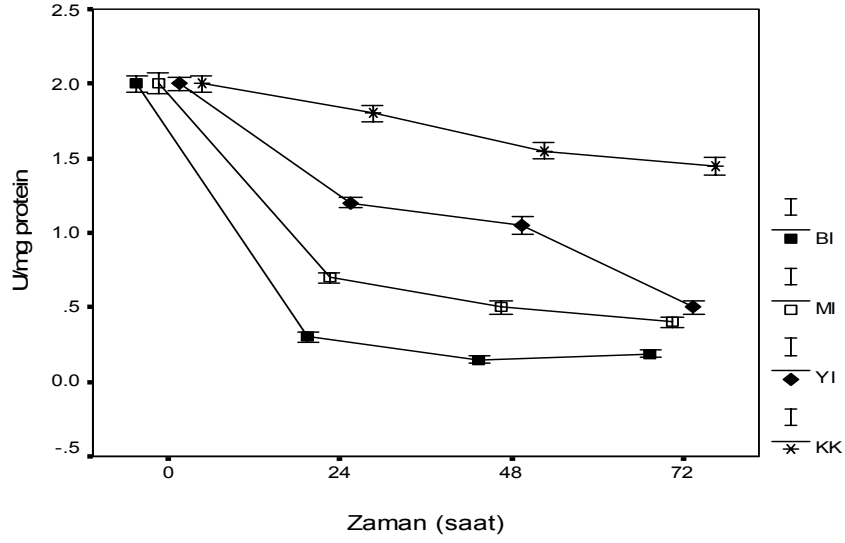
S.typhimurium'un glutation peroksidaz miktarında meydana gelen değişim göz önüne alındığında beyaz ışığın etkisi altında %90, mavi ışığın etkisi altında %80 ve yeşil ışığın etkisi altında %75 azalma olduğu (Şekil 3.79) bunun yanında 24 saat kırmızı ışığın etkisine maruz bırakılan örnekte enzim miktarında %70 azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.82). Kırmızı dalga boyunda ışığın etkisi altında glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde %50 oranında azalma olduğu (Şekil 3.82), fakat bu etkinin 24 saat sonunda gerçekleştiği görülmüş, bunun yanında diğer görünür bölge ışınların etkisi altında 72 saat sonunda enzim aktivitesinde azalmalar olduğu belirlenmiştir. Bu azalmanın beyaz ışığın etkisi altında %95, mavi ışık altında %95 ve yeşil ışık altında % 75 oranında olduğu şekil 3.80 de görülmektedir.



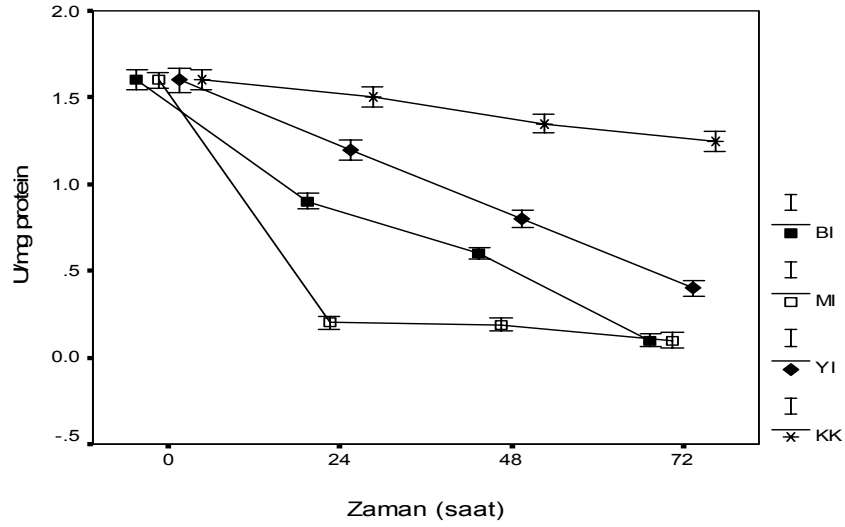
Şekil 3.77 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *S.typhimurium*'un katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



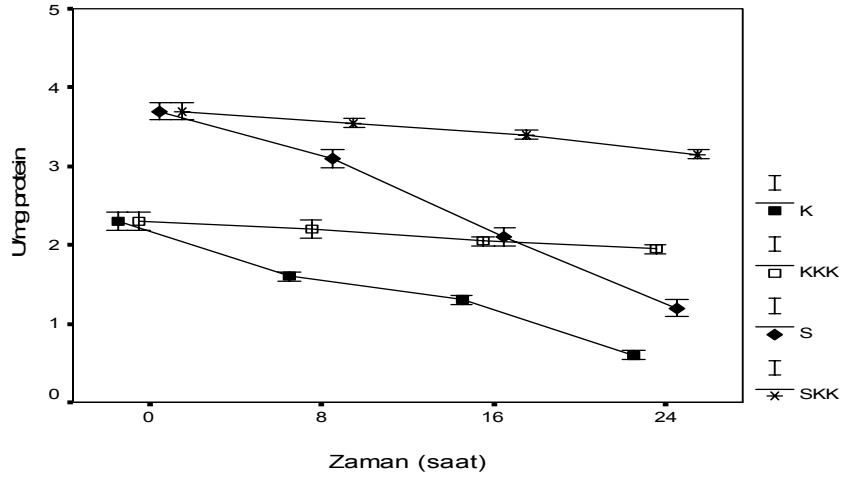
Şekil 3.78 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *S.typhimurium*'un superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



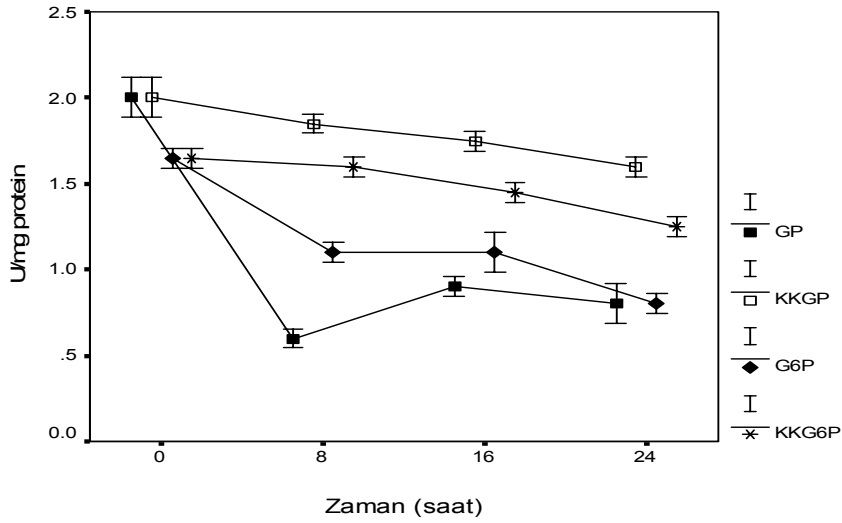
Şekil 3.79 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *S.typhimurium*'un glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



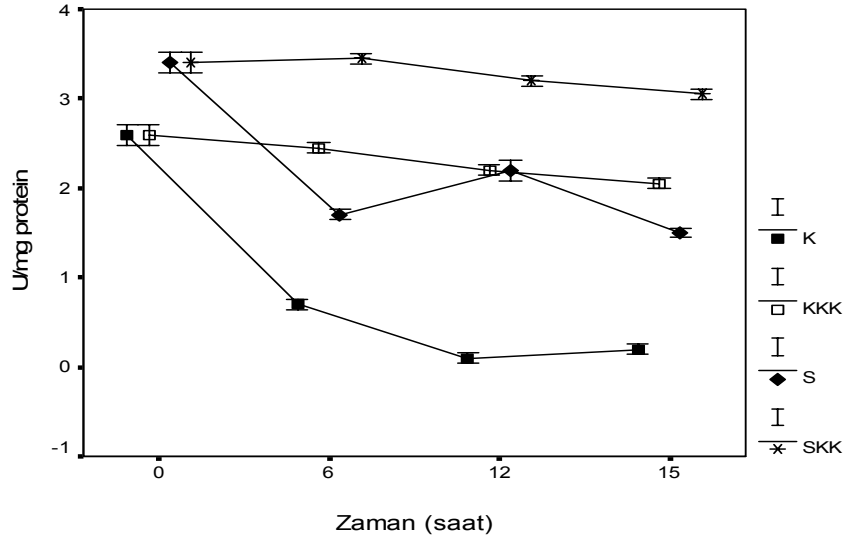
Şekil 3.80 Deniz suyunda farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında *S.typhimurium*'un glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



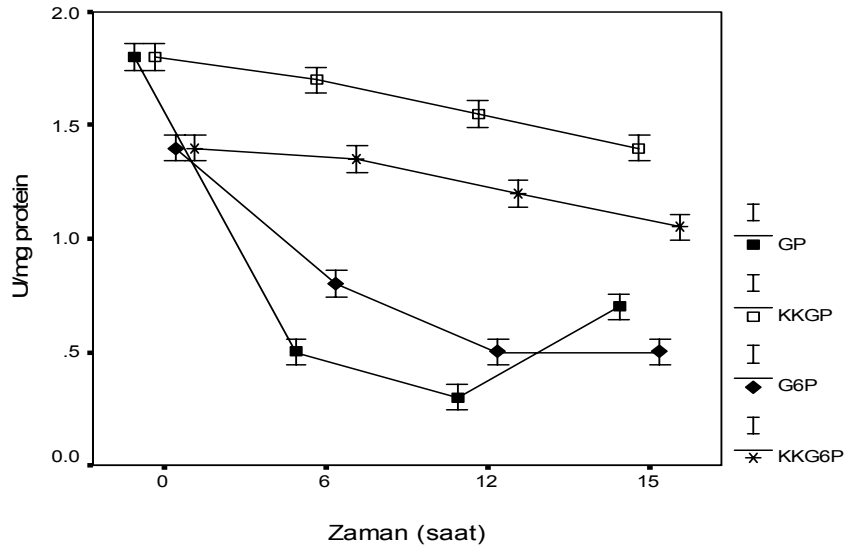
Şekil 3.81 Deniz suyunda kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *S.typhimurium*'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz; S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz)



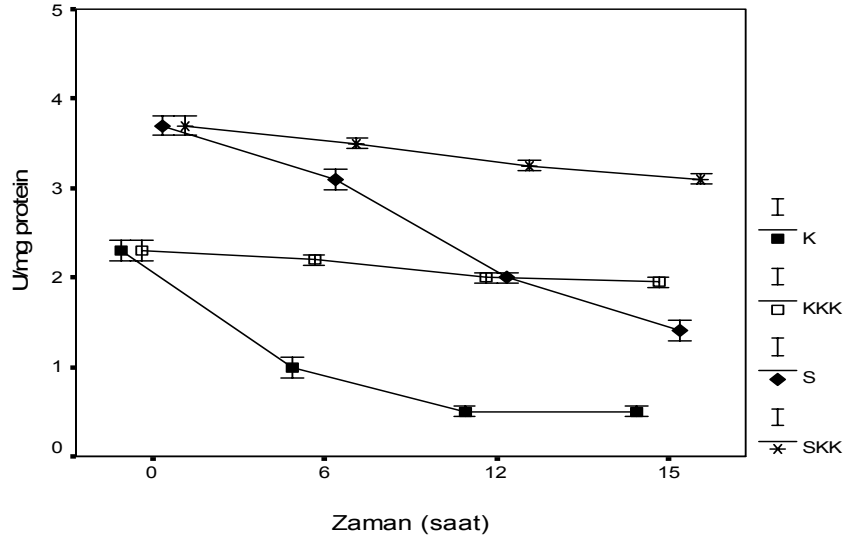
Şekil 3.82 Deniz suyunda kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *S.typhimurium*'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutathion peroksidaz, KKG: Karanlık kontrol glutathion peroksidaz, G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)



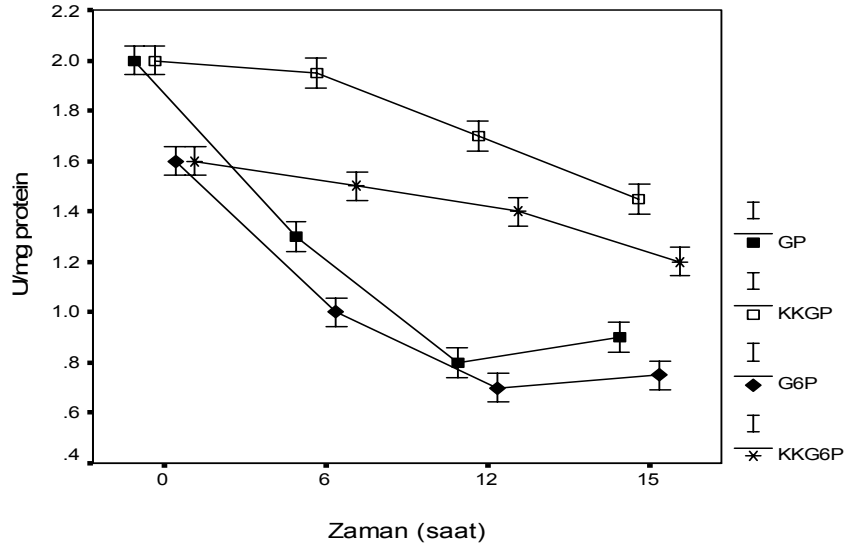
Şekil 3.83 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz)



Şekil 3.84 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutathion peroksidaz, KKGP: Karanlık kontrol glutathion peroksidaz, G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)



Şekil 3.85 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *S.typhimurium*'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol katalaz, S: Superoksit dismutaz, SKK: karanlık kontrol superoksit dismutaz)



Şekil 3.86 Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *S.typhimurium*'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (GP: Glutathione peroksidaz, KKG: Karanlık kontrol glutathione peroksidaz, G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)

Deniz suyunda UV-A'nın etkisi altında *S.typhimurium*'un oksidatif stres enzim aktivitelerinde azalmalar olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.85 de katalaz enzim seviyesinde %80 azalma olmasına rağmen sod aktivitesinde %60 oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Glutation peroksidaz aktivitesinde %60 oranında, glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim miktarında ise %50 oranında azalmalar olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.86). UV-A'nın diğer ışık kaynaklarından daha kısa sürede enzim miktarlarında azalmaya sebep olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir.

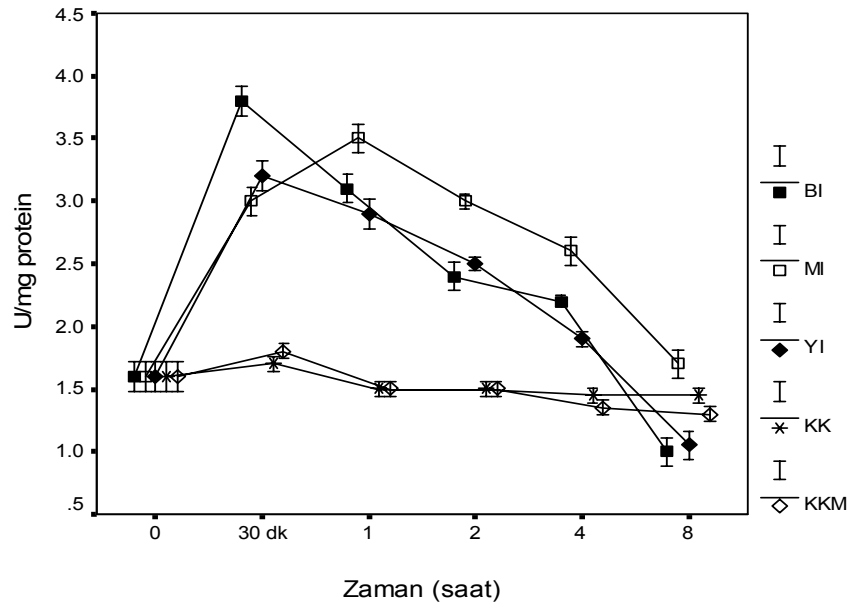
3.2.3. Deniz Suyu Ortamında Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda 8 Saat Esnasında *E.coli* ve *S.typhimurium*'un Oksidatif Stres Enzimlerinden Olan Katalaz, Süperoksit Dismutas, Glutathion Peroksidas ve Glukoz-6-P-Dehidrogenaz Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişim

Uzun süreli yapılan çalışmada enzim miktarında hızlı ve çok miktarda azalma olduğu tespit edilmiştir. Nitekim görünür dalga boyunda yapılan çalışmada beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynağının etkisi altında enzim miktarlarında ilk 16 saat içinde azalmanın çok fazla olduğu belirlenmiştir. Acaba ilk 16 saat süre içinde enzim seviyelerinde nasıl bir değişiklik olmaktadır. Burada yapılan çalışmada diğerlerini destekler nitelikte olup, 8 saat içinde enzim miktarlarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır.

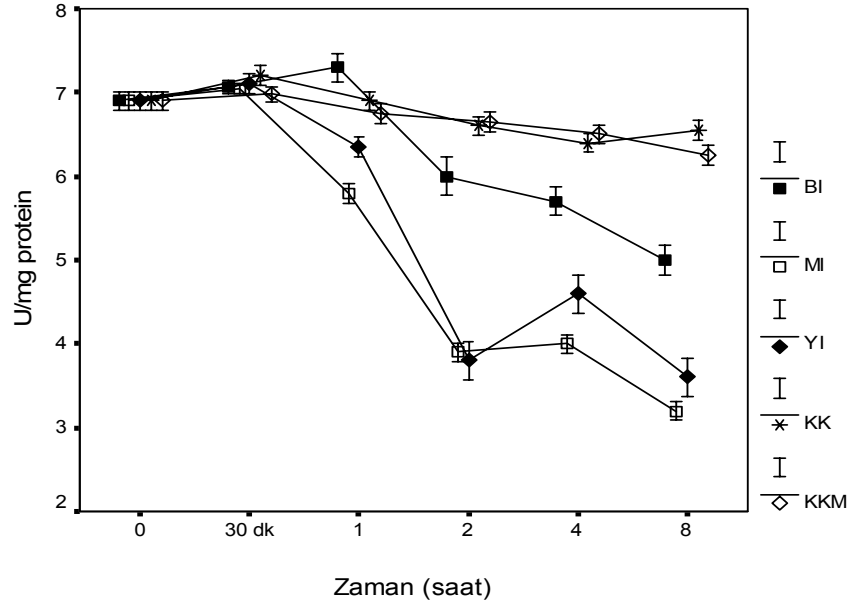
Farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisini ilave edilen deniz suyu ortamında yapılan bu çalışmada enzim seviyelerinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.87 de görüldüğü gibi *E.coli* bakterisinin katalaz enzim miktarında, beyaz ışık altında ilk 1 saat süre içinde %140 oranında, mavi ışık altında %120 oranında ve yeşil ışığın etkisi altında %90 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. Fakat 8 saat sonunda başlangıç değerine yakın bir seviyeye geldiği görülmüştür. Kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında ise bakterinin ilk 1 saat süre içinde kontrol örneklerinde enzim miktarında fazla bir artış olmadığı tespit edilmiştir. Bu da bize oksidatif

stres esnasında bakterinin savunmaya yönelik enzim miktarını arttırdığını göstermektedir. Ortama bir fotosensitizer ilave edilen örneklerde sod aktivitesinde beyaz ışığın etkisi altında %25, mavi ışığın etkisi altında %20 ve yeşil ışığın etkisi altında %20 oranında artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.88). Şekil 3.89 de görüldüğü gibi glutation peroksidaz enzim miktarında da değişiklikler olduğu belirlenmiştir. Beyaz ışığın etkisi altında %23, mavi ışık altında %25 ve yeşil ışığın etkisi altında %25 oranında artışlar olduğu tespit edilmiştir. Glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim seviyesinde beyaz ışığın etkisi altında %15, mavi ışığın etkisi altında %20 ve yeşil ışık kaynağının etkisi altında %10 artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.90). Kontrol örneklerine bakıldığında ise artışın bu kadar fazla olmadığı görülmüştür.

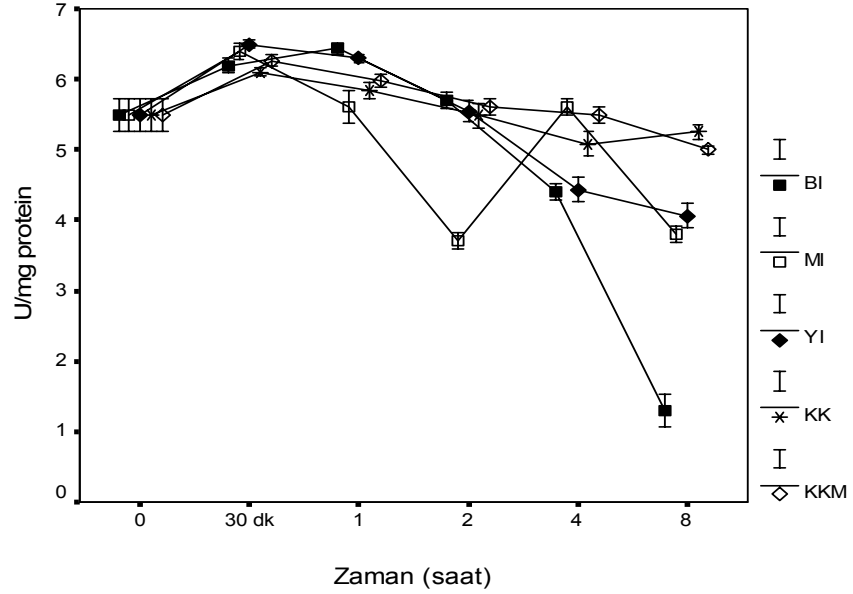
Kırmızı ışığın da bakteri enzim miktarında bazı değişikliklere sebep olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.91 de ilk saatlerde katalaz aktivitesinde %15, sod aktivitesinde ise %100'e yakın artışlar görülmüş fakat daha sonra ise önemli derecede azalmalar olduğu belirlenmiştir. ilk saatlerde glutation peroksidaz enzim miktarında %150, glukoz-P-dehidrogenaz enzim miktarında ise 8 saat süre esnasında herhangi bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.92).



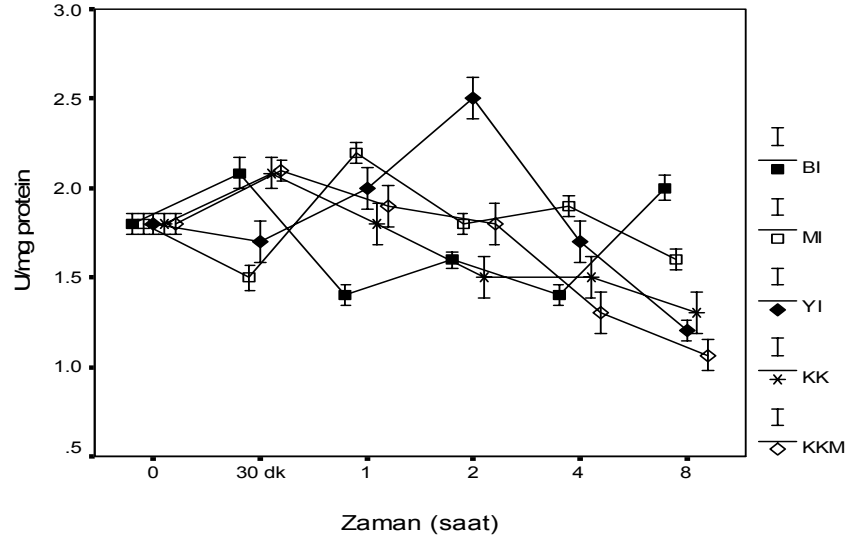
Şekil 3.87 *E.coli*'nin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



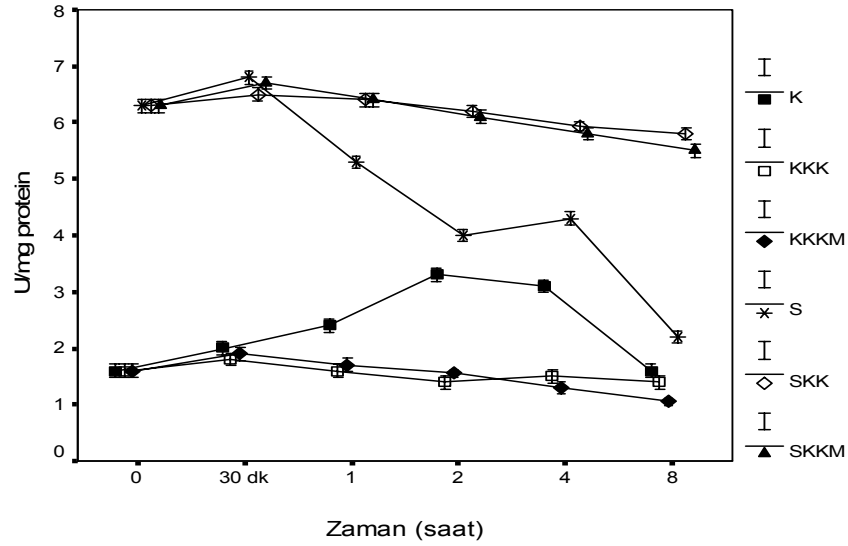
Şekil 3.88 *E.coli*'nin superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



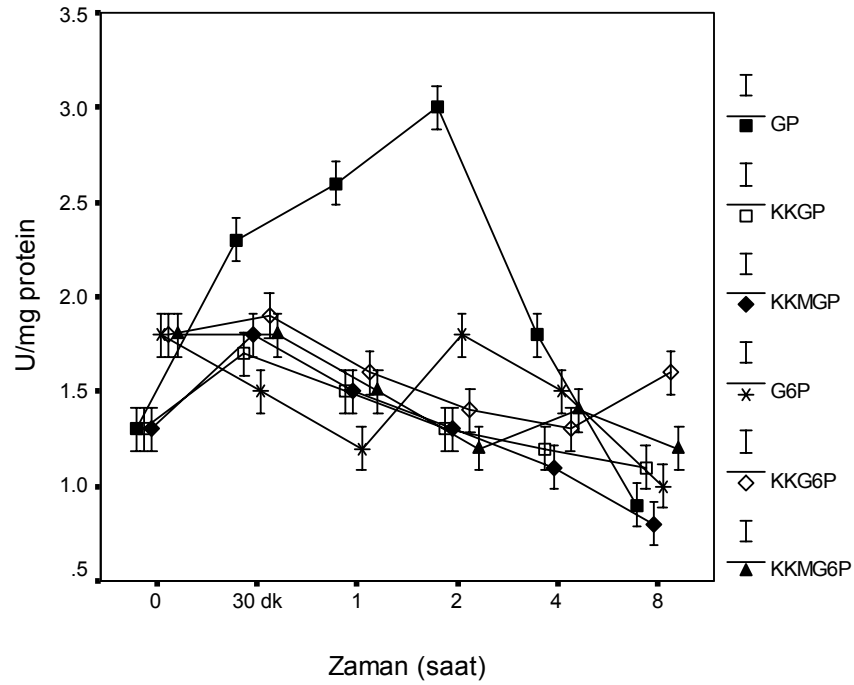
Şekil 3.89 *E.coli*'nin glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



Şekil 3.90 *E.coli*'nin glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

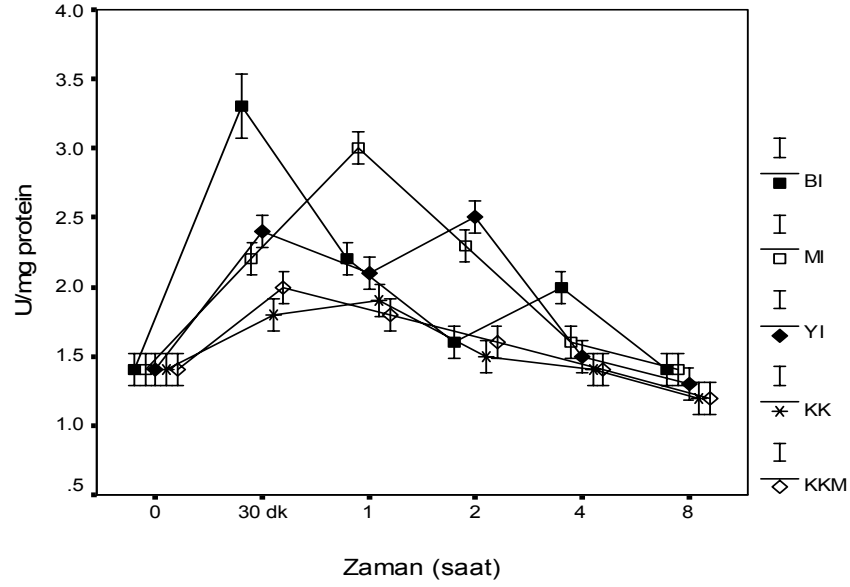


Şekil 3.91 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *E.coli*'nin katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol, KKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; S: Superoksit dismutaz, SKK: Karanlık kontrol, SKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

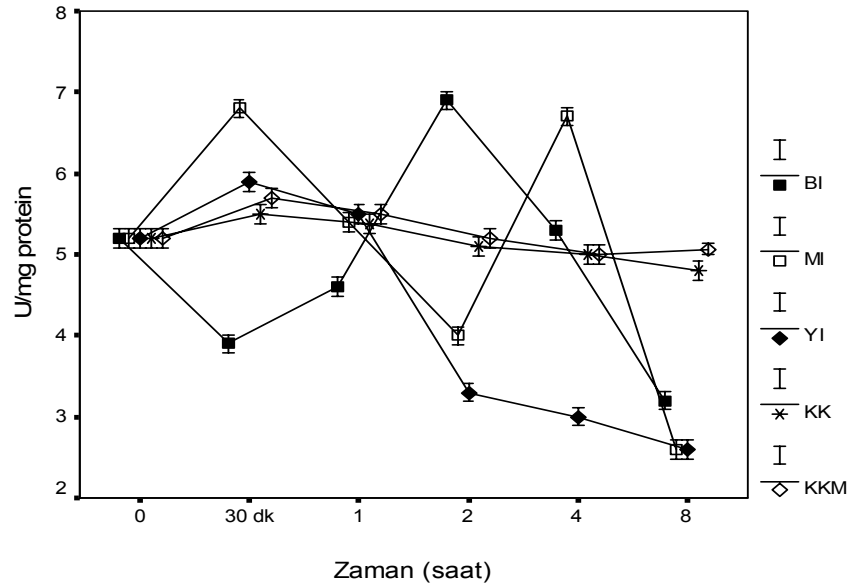


Şekil 3.92 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *E.coli*'nin glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitelerinde meydana gelen değişim (GP: Glutathione peroksidaz, KKGP: Karanlık kontrol, KKMGP: metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol, KKMGP6P: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol glukoz-6-P-dehidrogenaz)

S.typhimurium ile yapılan enzim çalışmaları da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 3.93 de ilk 4 saat içinde katalaz enzim miktarında beyaz ışığın etkisi altında %140, mavi ışığın etkisi altında %110 ve yeşil ışığın etkisi altında %90 oranında artış olduğu daha sonra ise azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Karanlık kontrol örneklerinde ise gözle görülür değişiklikler tespit edilememiştir. Sod enzim miktarında beyaz ışığın etkisi altında %20, mavi ışığın etkisi altında %30 ve yeşil ışığın etkisi altında %5 artışlar olduğu bunun yanında kontrol örneklerinde önemli derecede değişiklikler olmadığı ve bakterinin oksidatif strese karşı koyabilmek için bu enzimlerin miktarında artışlar gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.94).

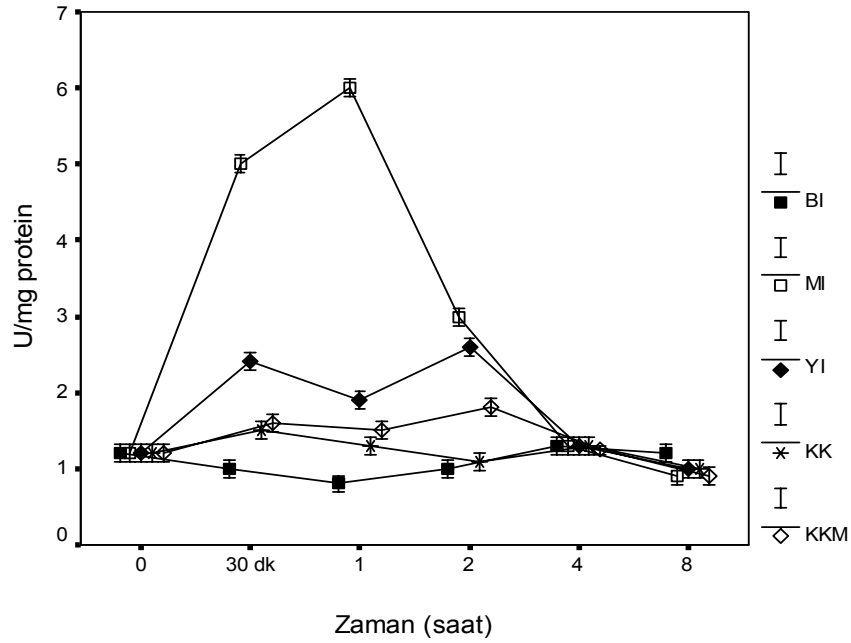


Şekil 3.93 *S.typhimurium*'un katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

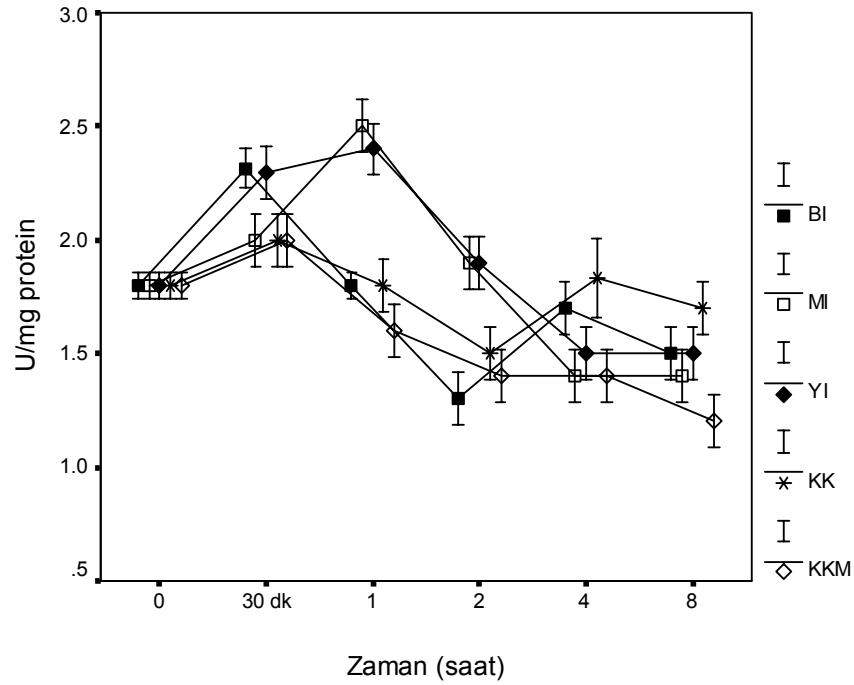


Şekil 3.94 *S.typhimurium*'un superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Fotosensitizerin bulunduğu deniz suyu ortamında *S.typhimurium* bakterisinin glutation enzim miktarında beyaz ışığın etkisi altında herhangi bir değişikliğin olmadığı, mavi ışığın etkisi altında %300 oranında ve yeşil ışığın etkisi altında %60 oranında artışlar olduğu belirlenmiştir. Fakat 8. saatin sonunda azalmalar olduğu bunun yanında kontrol örneklerinde herhangi bir değişime rastlanmadığı görülmüştür (Şekil 3.95). Glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim miktarında ise beyaz ışığın etkisi altında %70 oranında artış gözlenirken mavi ışığın etkisi altında %95 ve yeşil ışığın etkisi altında %80 oranında artışlar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.96). Bu artışın ilk saatlerde genellikle ilk 4 saat içinde meydana geldiği daha sonra ise tekrar azalmaya başladığı görülmüştür.

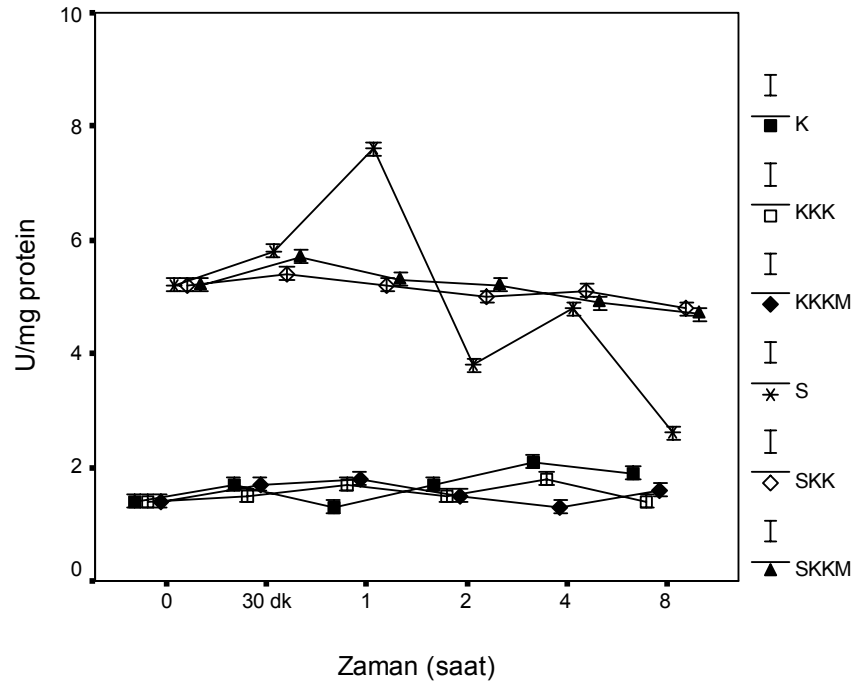


Şekil 3.95 *S.typhimurium*'un glutation peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



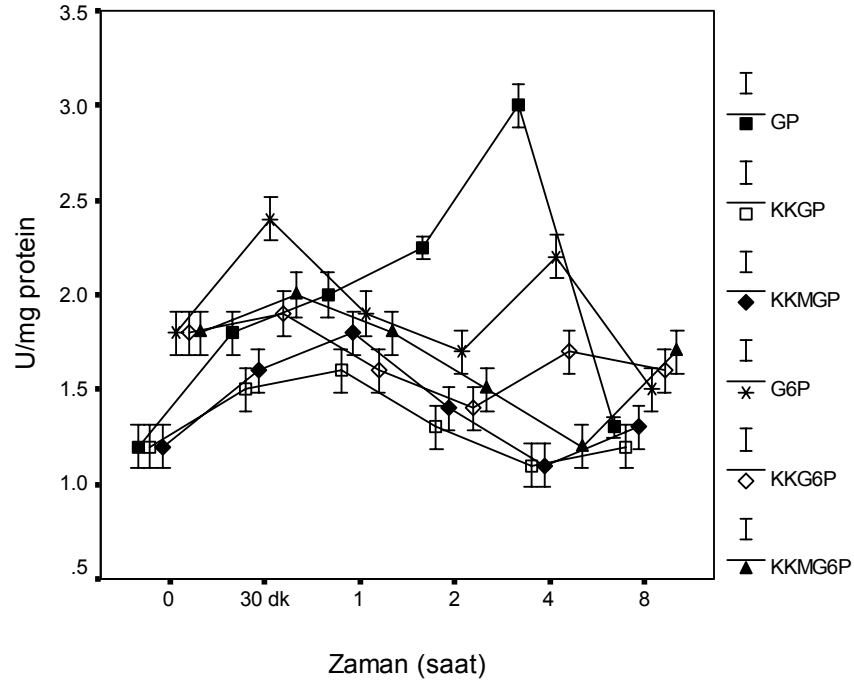
Şekil 3.96 *S.typhimurium*'un glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

Kırmızı ışığın etkisi altında yapılan çalışmada *S.typhimurium* bakterisinin oksidatif stres enzim miktarında bazı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.97 de görüldüğü gibi kırmızı ışığın etkisi altında katalaz enzim miktarında %65 oranında artış olmasına rağmen sod miktarında %45 oranında artış belirlenmiştir. Glutation peroksidaz enzim miktarında %60 oranında, glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim miktarında ise %20 oranında bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.98). Kontrol örneklerine bakıldığında ise bu süre içinde gözle görülür bir değişikliğin olmadığı görülmüş ve ışık kaynaklarının etkisi altında enzim miktarlarında meydana gelen artışın oksidatif stres sonucunda meydana gelen serbest radikallere karşı savunma amacıyla olduğu açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 3.97 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında

S.typhimurium'un katalaz ve superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişim ((K: Katalaz, KKK: Karanlık kontrol, KKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; S: Superoksit dismutaz, SKK: Karanlık kontrol, SKKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



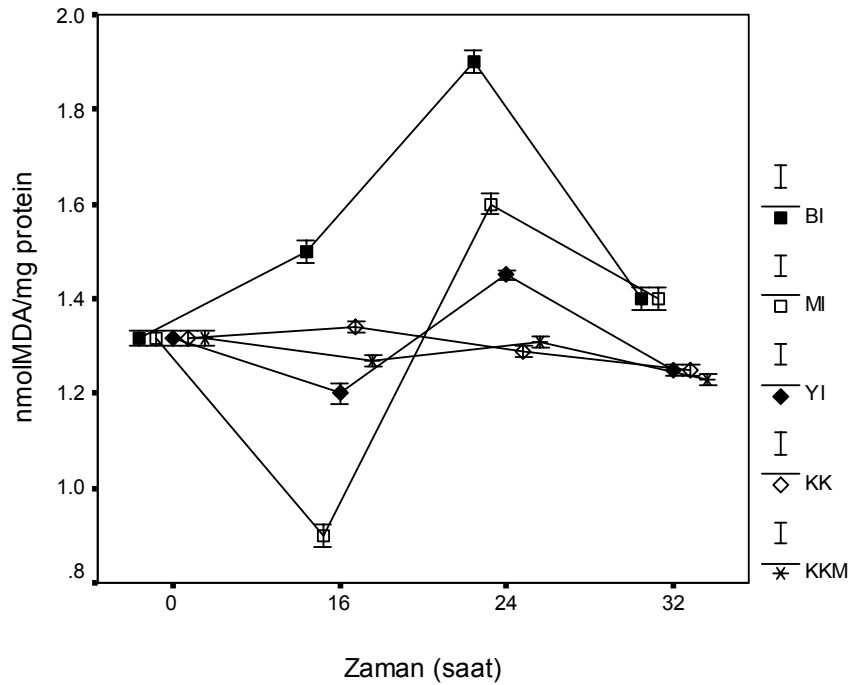
Şekil 3.98 Kırmızı dalgı boyunda ışık kaynağının etkisi altında

S.typhimurium'un glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitesinde meydana gelen değışim (GP: Glutation peroksidaz, KKGp: Karanlık kontrol, KKMGP: metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol; G6P: Glukoz-6-P-dehidrogenaz, KKG6P: Karanlık kontrol, KKMGP6P: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)

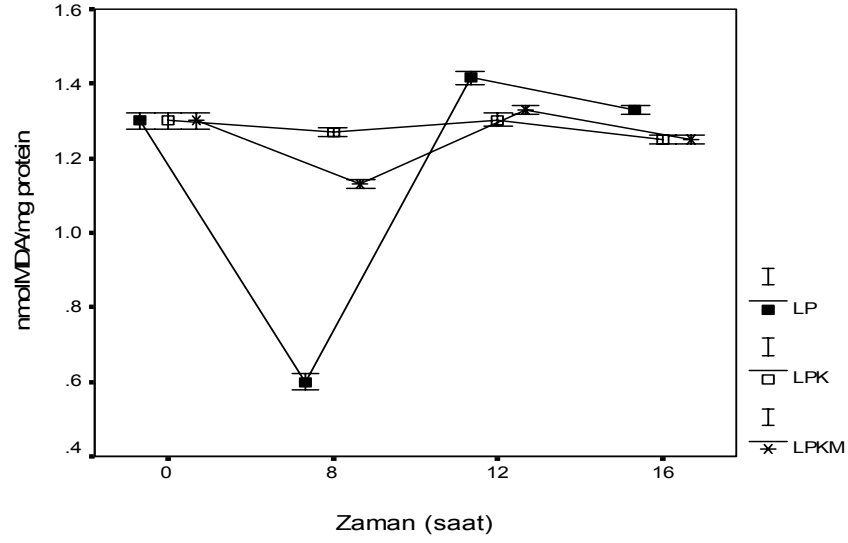
3.3 Deniz Suyu Ortamında Farklı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında *E.coli* ve *S.typhimurium* Bakterilerinde Lipit Peroksidasyon Miktarında Meydana Gelen Değişim

3.3.1. Metilen Mavisinin Bulunduğu Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium* Bakterilerinde Lipit Peroksidasyonunda Meydana Gelen Değişim

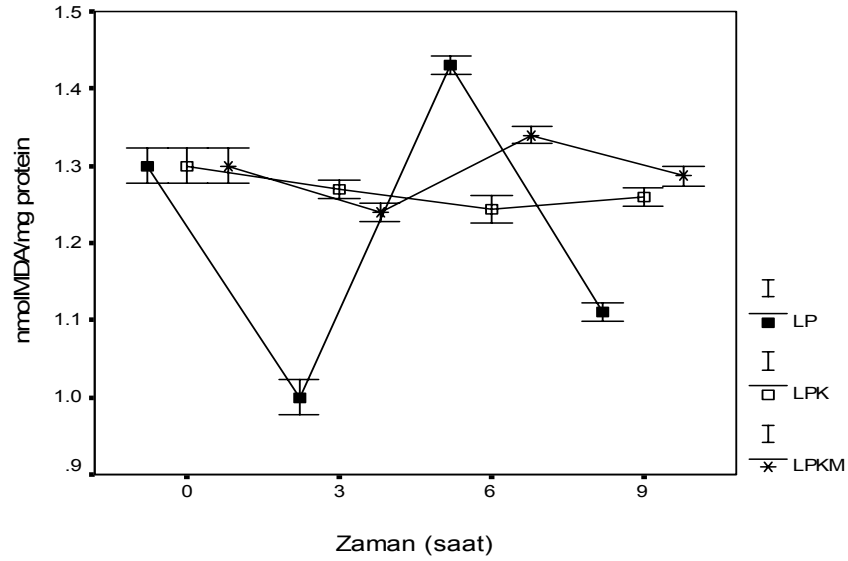
Oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikaller lipitlere saldırıp lipit peroksidasyonuna sebep olmaktadır. *E.coli*'de yapılan bu çalışmada beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında 16 saat esnasında, kırmızı ışığın etkisi altında ise 8 saat esnasında lipit peroksidasyon miktarında azalmalar olduğu, fakat beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında 24 saatte ve kırmızı ışığın etkisi altında ise 12 saatte peroksidasyon miktarında önemli artışlar olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.99, 3.100). Bunun yanında karanlık kontrol örneklerinde ise herhangi bir değişime rastlanmamıştır. UV-A'nın etkisi altında ise ilk 3 saat içinde lipit peroksidasyon miktarında azalma meydana geldiği fakat daha sonra lipit peroksidasyon miktarında artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.101).



Şekil 3.99 *E.coli*'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisini ilave edilen karanlık kontrol)

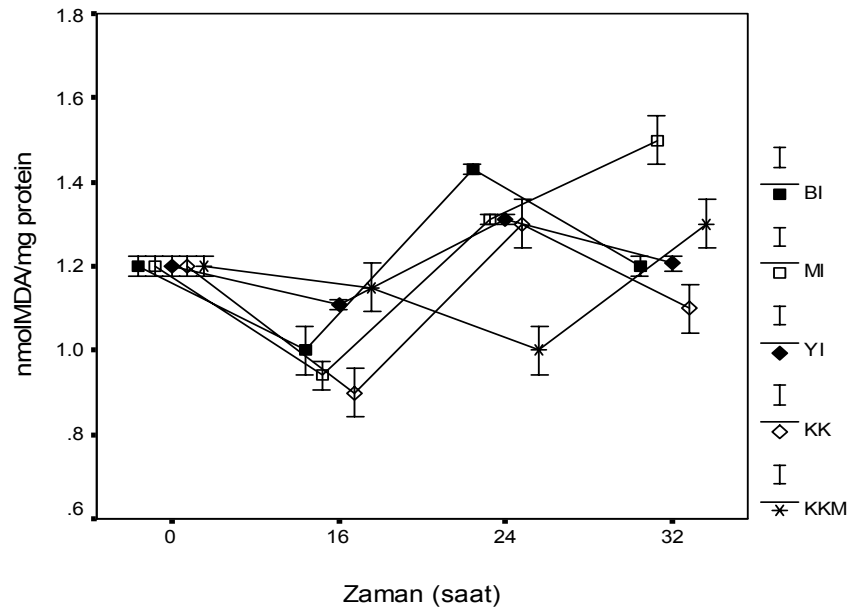


Şekil 3.100 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında *E.coli*'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LP: Lipit peroksidasyonu, LPK: Karanlık lipit peroksidasyonu, LPKM: Karanlık ortamda metilen mavisi ilave edilen örnekte lipit peroksidasyonu)

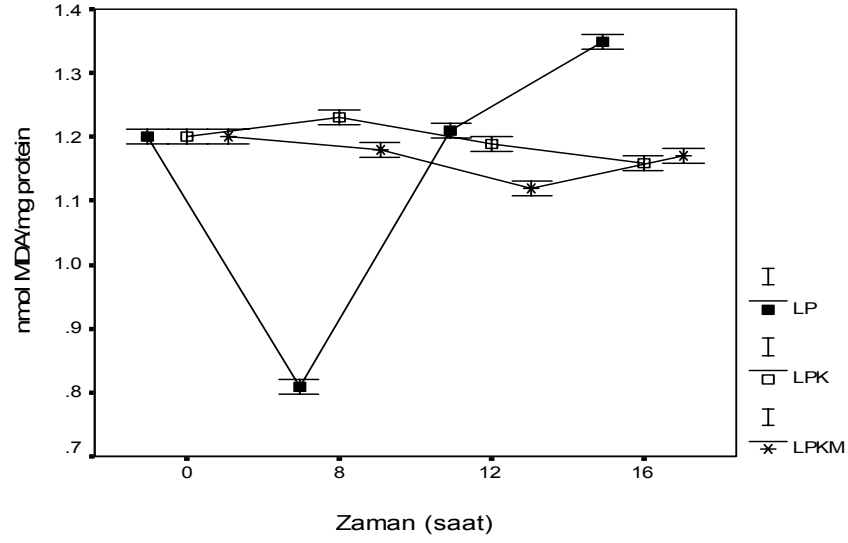


Şekil 3.101 UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LP: Lipit peroksidasyonu, LPK: Karanlık lipit peroksidasyonu, LPKM: Karanlık ortamda metilen mavisi ilave edilen örnekte lipit peroksidasyonu)

S.typhimurium ile yapılan çalışmada dalga boyuna bağlı olarak lipid peroksidasyon miktarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmada lipid peroksidasyon miktarında beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 16 saatte, kırmızı ışığın etkisi altında ise 8 saatte gözle görülür bir değişim olmadığı hatta azalma olduğu, fakat 32 saat sonunda beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında, 16 saatte ise kırmızı ışık kaynağının etkisi altında peroksidasyon miktarında önemli artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.102, 3.103). UV-A'nın etkisi altında lipid peroksidasyon miktarında daha kısa sürede önemli miktarda artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.104). Karanlık kontrol örnekleri göz önüne alındığında ise lipid peroksidasyon miktarında gözle görülür bir değişikliğin olmadığı belirlenmiştir. Görünür dalga boyunu içeren ışık kaynaklarının etkisi altında lipid peroksidasyon miktarındaki artışın en kısa sürede kırmızı ışığın etkisi altında meydana geldiği daha sonra ise beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında meydana geldiği görülmüştür.

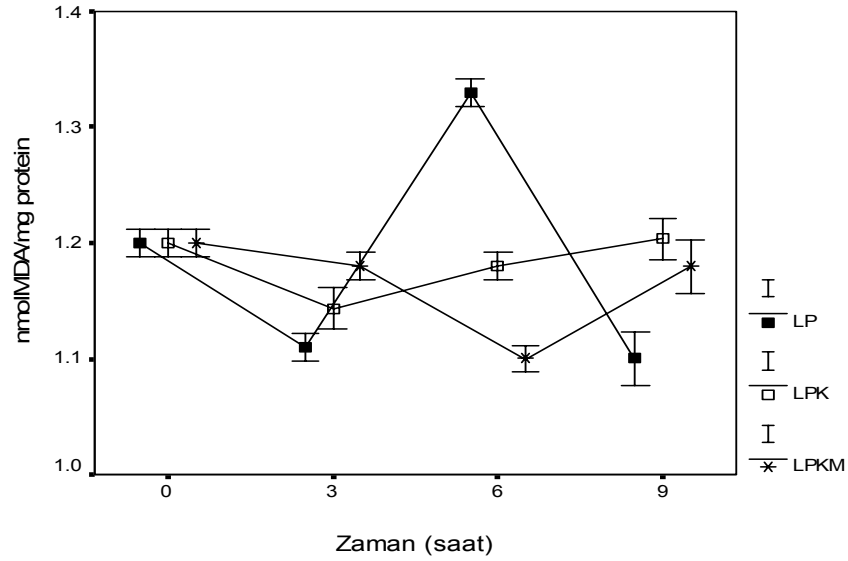


Şekil 3.102 *S.typhimurium*'da lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol, KKM: Metilen mavisi ilave edilen karanlık kontrol)



Şekil 3.103 Kırmızı dalga boyunda ışık kaynağının etkisi altında

S.typhimurium'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LP: Lipit peroksidasyonu, LPK: Karanlık lipit peroksidasyonu, LPKM: Karanlık ortamda metilen mavisi ilave edilen örnekte lipit peroksidasyonu)

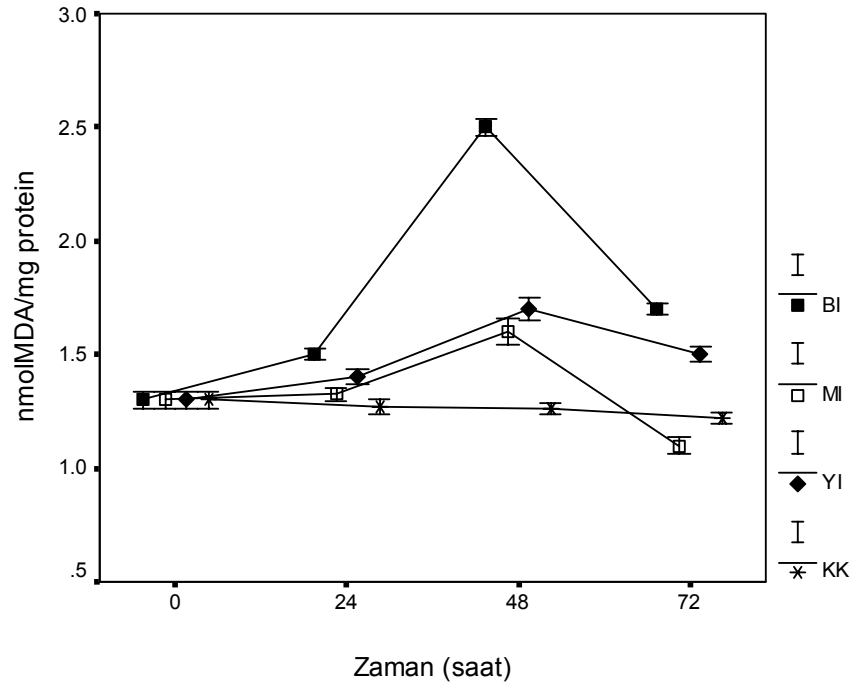


Şekil 3.104 UV-A'nın etkisi altında *S.typhimurium*'da lipit peroksidasyonunda

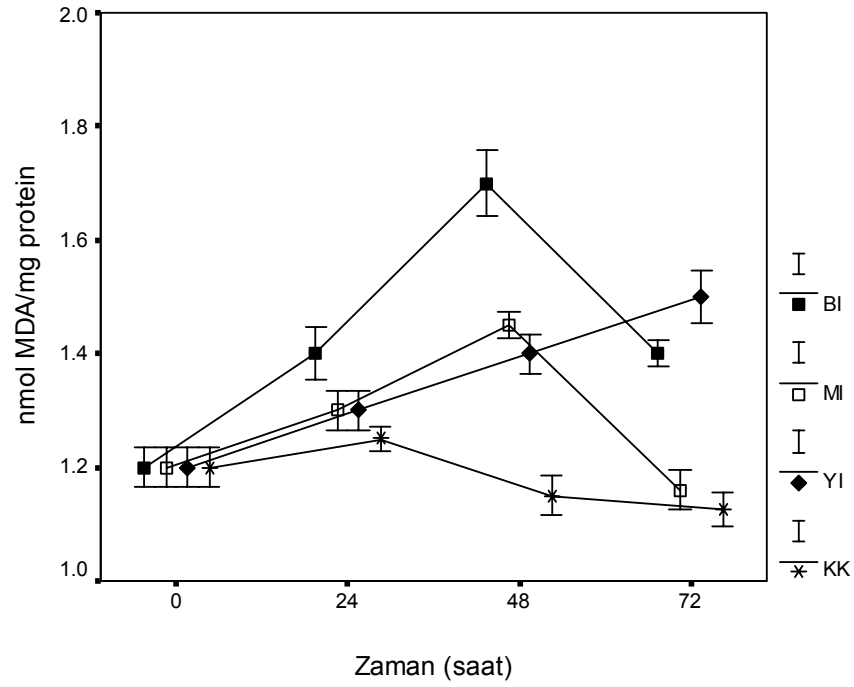
meydana gelen değişim (LP: Lipit peroksidasyonu, LPK: Karanlık lipit peroksidasyonu, LPKM: Karanlık ortamda metilen mavisi ilave edilen örnekte lipit peroksidasyonu)

3.3.2. Metilen Mavisinin Bulunmadığı Ortamda *E.coli* ve *S.typhimurium* Bakterilerinde Lipit Peroksidasyon Miktarlarında Meydana Gelen Değişim

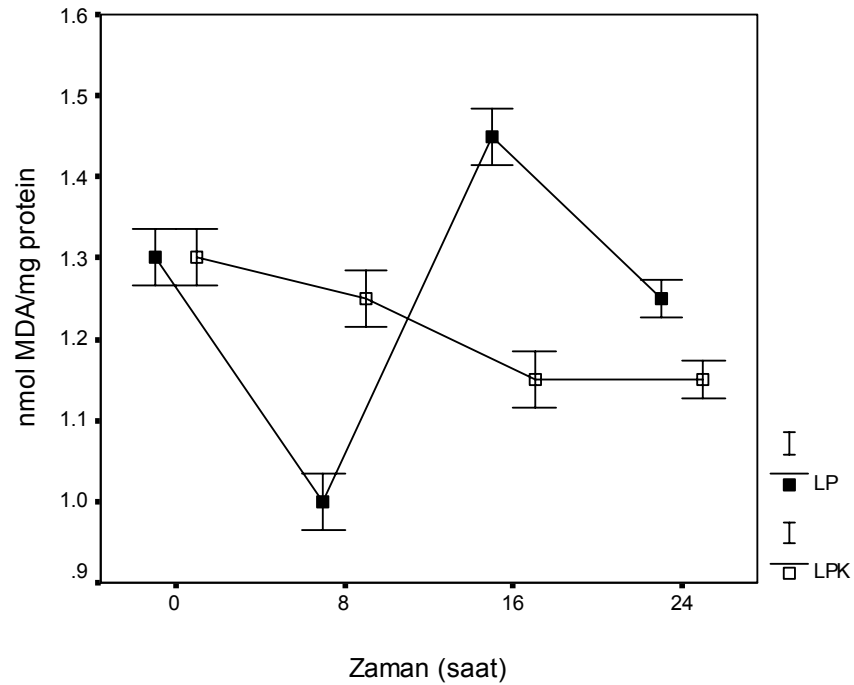
Beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saat, kırmızı ışığın etkisi altında ise 24 saat süre ile alınan örneklerde *E.coli*'nin lipit peroksidasyon miktarında artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.105, 3.107). Bu artışların beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında en fazla 48 saat sonunda, kırmızı ışığın etkisi altında ise 16 saat esnasında meydana geldiği görülmektedir. Zamana bağlı olarak yapılan çalışmada lipit peroksidasyon miktarının en hızlı kırmızı ışığın etkisi altında daha sonra ise beyaz ve diğer ışık kaynaklarının etkisi altında meydana geldiğinde tespit edilmiştir.



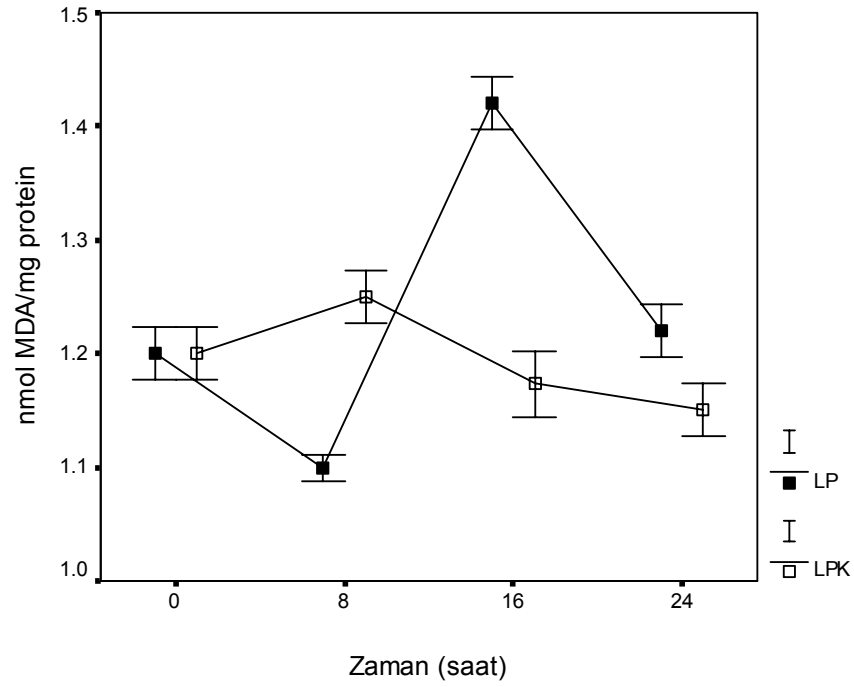
Şekil 3.105 *E.coli*'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



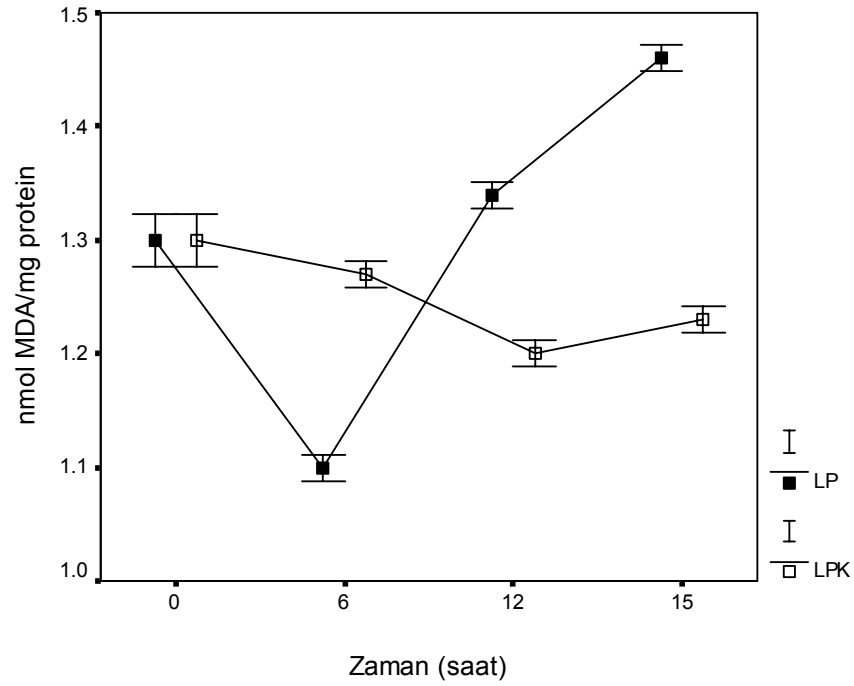
Şekil 3.106 *S. typhimurium*'da lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişim (BI: Beyaz ışık, MI: Mavi ışık, YI: Yeşil ışık, KK: Karanlık kontrol)



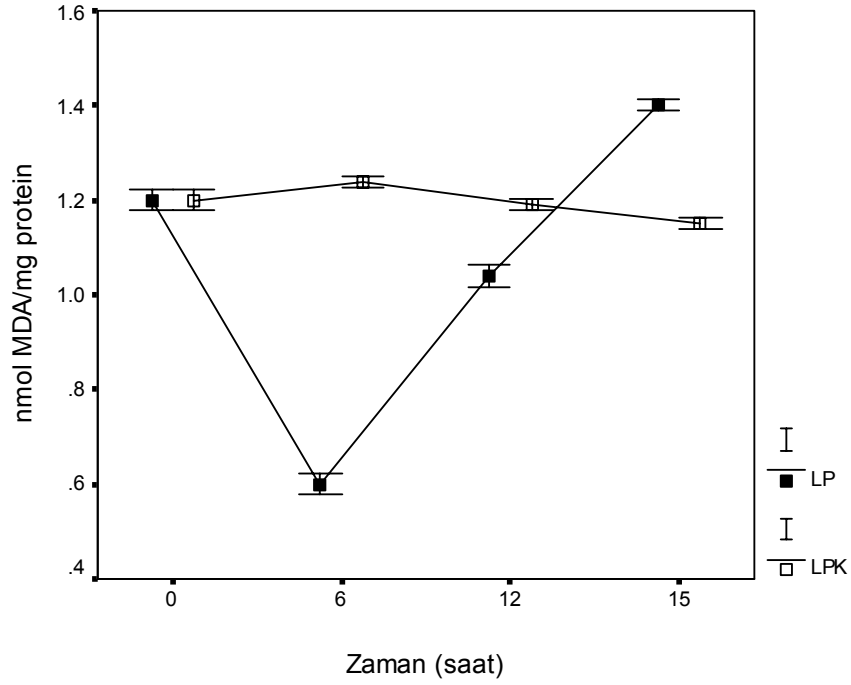
Şekil 3.107 Kırmızı ışık kaynağının etkisi altında *E. coli*'de lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LPK: Karanlık kontrol)



Şekil 3.108 Kırmızı ışık kaynağının etkisi altında *S.typhimurium*'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LPK: Karanlık kontrol)



Şekil 3.109 UV-A'nın etkisi altında *E.coli*'de lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LPK: Karanlık kontrol)



Şekil 3.110 UV-A'nın etkisi altında *S.typhimurium*'da lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim (LPK: Karanlık kontrol)

Şekil 3.106 ve 3.108'de *S.typhimurium*'un lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim araştırılmıştır. Bakterinin bütün ışık kaynaklarının etkisi altında lipit peroksidasyon miktarında gözle görülür artışlar meydana geldiği, bunun yanında karanlık kontrol örneklerinde herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Burada da bakterinin beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 48 saatte lipit peroksidasyon miktarında önemli artış olduğu, bunun yanında kırmızı ışığın etkisi altında bu artışın 16 saat sonunda meydana geldiği gözlenmiştir. İlk 8 saat esnasında her iki bakteri türünde de kırmızı ışık kaynağının etkisi altında lipit peroksidasyon miktarında önemli azalmalar olduğu daha sonra ise artış olduğu tespit edilmiştir.

UV-A'nın etkisi altında 15 saat yapılan çalışmada ise ilk 6 saat esnasında her iki bakteri örneğinde önemli derecede azalmalar olduğu daha sonra ise gözle görülür bir artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 3.109, 3.110).

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Mikroorganizmalar farklı ekolojik ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmek için ortamın değişken olabilen etkenlerinden kendilerini korumak zorundadırlar. Bazı bakteriler zor ve değişken çevresel etkenlere karşı korunmak için spor, kist veya bazıları farklı düzeyde moleküler yaşam stratejilerine sahiptirler. Deniz suyunda yaşayan mikroorganizmalarda bu gibi değişik çevresel etkenlerle karşılaşmakta ve bu şartlar altında yaşamak zorunda kalmaktadırlar. Deniz suyunda mikroorganizmaların yaşamını etkileyen en önemli faktörler arasında doğal güneş ışığı, solar radyasyon ve fotosensitizer maddelerin varlığı önemli bir yer tutmaktadır (Kussovski ve ark., 2002; Sinton ve ark., 2002; Kömerik ve ark. 2002).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, güneş ışığı ve farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının deniz suyu ortamında mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılmasında etkili oldukları ifade edilmiştir (Özkanca ve ark., 2002; Matevski ve ar., 2003). Bilhassa son yıllarda mikroorganizmaların ortamdaki elimine edilmesi amacıyla farklı ışık kaynakları kullanılmaya başlanmıştır. Mavi, yeşil, beyaz ve kırmızı ışık kaynakları bunlardan sadece birkaçıdır. Bunların direk etkisinin yanı sıra ortama bir fotosensitizer ilave edildikten sonra etkisinin nasıl olduğunda önemli konular arasında yer almaktadır. Çünkü PDT yani fotodinamik terapi son yıllarda oldukça önem kazanan ve mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılması anlayışını içeren yeni bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır (Gabor ve ark., 2001; Floyd ve ark., 2004). Bu yolla bir fotosensitizer ve ışık kaynağı vasıtasıyla mikroorganizmaların eliminasyonu sağlanmaktadır (Chan ve ark., 2003).

Bu çalışmada, deniz suyunda farklı dalga boyunda ışınların etkisi altında ortama bir fotosensitizer ilave edilerek veya sadece deniz suyu ortamında bakterilerin yaşamında, oksidatif stres enzimlerinde ve lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Bilindiği gibi ışık kaynaklarının etkisi altında ortamda serbest radikaller oluşmakta ve bunun sonucunda da oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres esnasında bakterilerin yaşamında nasıl bir değişiklik olduğu araştırılmıştır.

Metilen mavisinin bulunduğu deniz suyu ortamında bakterilerin beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saat süre ile yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. Bu esnada koloni sayılarında 2 logaritmadan daha fazla düşüş olduğu tespit edilmiştir. Kırmızı ışık kaynağının etkisi altında ise bakterilerin 16 saat yaşamına devam ettiği belirlenmiş ve koloni sayıları göz önüne alındığında bu ışık kaynağının diğer ışık kaynaklarından daha etkili olduğu görülmüştür. Yani görünür bölge ışık kaynakları içerisinde bakterilerin ölümünde en fazla etkili olan ışık kaynağının kırmızı olduğu belirlenmiştir. Fakat direk bakteri sayıları göz önüne alındığında bakterilerin beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32, kırmızı ışık kaynağının etkisi altında ise 16 saatten daha fazla yaşamına devam ettiği görülmüştür. Yani bakteri koloni oluşturmamasına rağmen solunum yapmaya devam etmektedir. Bu da bize bakterilerin ışık kaynaklarının etkisi altında canlı fakat kültürü yapılamayan bir durum içersine girdiğini göstermektedir. Burada bakterilerin en hızlı kırmızı ışık altında dormanta girdiği diğer ışık kaynaklarında ise daha uzun sürede dormanta girdiği belirlenmiştir.

Sadece deniz suyu ortamında ışık kaynaklarının etkisi araştırıldığında ise bakterilerin en fazla kırmızı ışıktan etkilendiği daha sonra ise beyaz, mavi ve yeşil ışıktan etkilendiği görülmüştür. Beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saat yaşamına devam eden bakterilerin kırmızı ışığın etkisi altında 24 saatte ortamdan kaybolduğu tespit edilmiştir. Solunum yapan bakteri sayısı göz önüne alındığında ise bakterilerin daha uzun süre yaşamına devam ettiği görülmüştür. Bu da bize bakterilerin ışık kaynaklarının etkisi altında canlı fakat kültürü yapılamayan bir durum içine girdiğini göstermektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda (Gourmelon ve ark., 1995; Pommepuy ve ark., 1996; Troussellier ve ark., 1998; Özkanca ve ark. 2002) deniz suyunda doğal güneş ışığı veya solar radyasyonun etkisi altında bakterilerin toplam sayı ve direk bakteri sayısında fazla bir değişim olmamasına rağmen koloni oluşturma yeteneğinde azalma olduğu hatta sayılamayacak bir seviyeye geldiği ifade edilmiştir.

UV-A (320-400 nm) görünür bölge ışınlarından daha etkili dalga boyunu içermektedir. Metilen mavisinin bulunduğu ortamda 10 saat süre ile yapılan

Çalışmada bakterilerin koloni sayısında 2 logaritmadan daha fazla azalma olduğu görülmüştür. Burada fotosensitizerin etkisinin yanı sıra UV-A'nında bakteri yaşamında öldürücü etkiye sahip olduğu tahmin edilmektedir. Çünkü bakteriler bu ışıık kaynağının etkisi altında diğer ışıık kaynaklarından daha kısa sürede koloni oluşturma yeteneğini kaybetmiştir. Sadece deniz suyu ortamında yapılan çalışmada ise bakterilerin 15 saat süre ile koloni oluşturma yeteneklerini korudukları tespit edilmiştir.

Burada koloni sayısında meydana gelen düşüşün bakterilerde ölüm sonucundamı meydana geldiği sorusu sorulabilir. Bu sorunun cevabını alabilmek için bakterilerin solunum aktivitelerinde meydana gelen değişim araştırılmış ve solunum yapan bakteri sayısının bütün ışıık kaynaklarında koloni sayısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta bakterinin koloni oluşturamadığı fakat solunum yapmaya devam ettiği direk bakteri sayımlarıyla belirlenmiş ve bakterinin bütün ışıık kaynaklarında aktif fakat kültürü yapılamayan (VBNC) bir durum içine girdiği görülmüştür.

Metilen mavisinin bulunduğu deniz suyunda bakteriler UV-A'nın etkisi altında 10 saatte dormanta girerken kırmızı ışııkta 16 saatte diğer ışıık kaynaklarında ise 32 saatte aktif fakat kültürü yapılamayan bir forma girdikleri görülmüştür. Sadece deniz suyu ortamında yapılan çalışmada ise bakteriler UV-A'nın etkisi altında 15 saatte dormanta girdiği, kırmızı ışıığın etkisi altında 24 satte diğer ışıık kaynaklarında ise 72 satte dormanta girdiği belirlenmiştir. Burada, ortama ilave edilen fotosensitizerin bakterilerin yaşamında etkili olduğu görülmekte ve bakterilerin fotosensitizer ilave edilen deniz suyunda daha kısa sürede gözden kaybolduğu tespit edilmiştir.

Ortamda bir fotosensitizer varken bakterilerin daha kısa sürede ortamdan kaybolmasının sebebinin ışııkla fotosensitizer arasında meydana gelen etkileşimden olduğu ifade edilmektedir. Fotosensitizer tarafından ışıığın absorpsiyonuyla ortamda serbest radikaller meydana gelmekte ve oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres ne kadar hızlı meydana gelirse bakterilere etkisi de o kadar hızlı olmaktadır. Bu sebepten ortamda bir fotosensitizer varken bakteriler daha hızlı bir şekilde gözden kaybolmaktadır. Farklı fotosensitizerler kullanılarak yapılan çalışmalarda ortamda bir fotosensitizer varken bakterilerin

daha hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırıldığı ifade edilmekte (Minnock ve ark., 1996; Nitzan ve ark., 2001; Gabor ve ark., 2001; Usacheva ve ark., 2001; Özkanca ve ark., 2002; Usacheva ve ark., 2003) ve buda bizim yaptığımız çalışmaları destekler niteliktedir.

Kontrol örnekleri ile yapılan çalışmalarda ise yani karanlık ve karanlık artı metilen mavisinin bulunduğu ortamda ise bakterilerin yaşamında önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu da bize. ışığın ve fotosensitizerin birlikte bakterilerin gözden kaybolmasında etkili olduğunu göstermektedir. Sadece fotosensitizerin bulunduğu ortamda ışık kaynağı yoksa bakterilerin yaşamında önemli bir değişiklikler olmadığı görülmektedir. Fakat ışık kaynağına maruz bırakıldıktan sonra bakterilerin yaşamında hızlı ve önemli azalmalar olduğu belirlenmiştir.

E.coli ve *S.typhimurium* ile yapılan yaşam deneylerinde koloni sayılarına bakıldığında iki bakteri arasında yaşam açısından farklılıklar olduğu her iki çalışmada da görülmüştür. Metilen mavisini ilave edilen deniz suyunda 32 saat sonunda beyaz ışığın etkisi altında *E.coli*'de 2.98 log., *S.typhimurium*'da ise 2.75 log., mavi ışığın etkisi altında *E.coli*'de 2.69 log., *S.typhimurium*'da 2.52 log., yeşil ışığın etkisi altında *E.coli*'de 2.39 log., *S.typhimurium*'da 2.2 log. azalma olduğu belirlenmiştir. 600-700 nm dalga boyunu (Kırmızı ışık) içeren ışık kaynağının etkisi altında *E.coli* ve *S.typhimurium* bakterilerinin 16 saat yaşamına devam ettiği ve koloni sayımlarında *E.coli*'nin 16 saat sonunda 3.02 log azalma gösterdiği, bunun yanında *S.typhimurium*'un 2.58 log azalma gösterdiği belirlenmiştir. UV-A'nın etkisi altında ise 10 saat yapılan çalışmada koloni sayısı göz önüne alındığında *E.coli*'de 2.36 log azalma, *S.typhimurium*'da ise 2.26. log azalma olduğu tespit edilmiş ve *S.typhimurium*'un *E.coli*'den daha uzun süre yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. *E.coli* sucul sistemlerde kirliliğin belirleyicisi olan indikatör bir bakteridir. Fakat burada elde edilen sonuçlara göre *E.coli*, *S.typhimurium* için indikatör olarak kullanıldığında risk oluşturmaktadır. Çünkü indikatör olan mikroorganizmadan daha uzun yaşama özelliğine sahiptir. Bu da bize deniz suyu gibi sucul ortamlarda *E.coli*'nin indikatör olarak kullanıldığında insan sağlığı açısından önemli bir risk oluşturacağını açık bir şekilde göstermektedir.

Görünür dalga boyunda ışığın etkisi altında yapılan çalışmada ortamda bir fotosensitizer varken bakterilerin en fazla kırmızı ışıktan etkilendiği görülmüş. Ve sırası ile kırmızı ışık, beyaz ışık, mavi ışık ve yeşil ışık bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmasında etkili rol oynamıştır.

Açlıkla Ön Muamele Edilen Bakterilerin Farkı Dalga Boyunda Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Yaşamı

Doğal çevrelerde yaşayan bakteriler hayatlarını devam ettirebilmek için besin eksikliği (açlık) ve diğer bazı stres şartlarına karşı adaptasyon geliştirmek zorundadırlar. *Salmonella spp* (Spector ve ark., 1998) ve *E.coli* (Jenkins ve ark., 1988; Ferenci ve ark., 2001) gibi bakteriler böyle durumlara karşı programlı olarak intraselular organizasyonlarında yeniden düzenleme yaparak karşı koymaya çalışmaktadırlar. Bu programlı düzenleme bir seri fizyolojik ve genetik değişikliği içermektedir ki buda hücrelerin uzun süre yaşaması için gerekli olan çoklu-stres (multi-stres) direncini ortaya çıkarmaktadır (McDougald ve ark., 1999).

Bu çalışmada, farklı günler açlığa bırakılan bakterilerin deniz suyu ortamında oksidatif strese dayanıklılığında meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Açlığa bırakıldıktan sonra farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında koloni sayılarında meydana gelen değişim araştırılarak çoklu-strese direnç olayının bakterinin yaşamında nasıl bir değişikliğe sebep olduğu tespit edilmeye çalışılmıştır.

5 gün açlıkla ön muamele edildikten sonra metilen mavisi ilave edilen deniz suyu ortamına bırakılan örneklerde bakterilerin kontrol örneklerine oranla kısa sürede ortamdan uzaklaştığı görülmüştür. Bunun yanında 10, 20 ve 30 gün açlığa bırakıldıktan sonra ışık kaynaklarının etkisi altında bakterilerin daha uzun süre yaşadığı tespit edilmiştir. *E.coli* beyaz ışığın etkisi altında 30 gün açlıkla ön muamele edilen örneklerde, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında 10 ve 20 gün açlığa bırakılan örneklerde, kırmızı ışıpta ise 20 gün açlığa bırakılan örneklerde diğerlerine oranla daha uzun süre yaşamına devam etmiştir. UV-A'nın etkisi altında ise 30 gün açlığa bırakılan örneklerde bakterinin daha uzun süre yaşamına devam ettiği görülmüştür. *S.typhimurium* örnekleri göz önüne

alındığında beyaz ışığın etkisi altında 20 ve 30 gün açlığa bırakılan örneklerde, mavi, yeşil ve kırmızı ışığın etkisi altında ise 10 ve 20 gün açlığa bırakılan örneklerde bakterinin daha uzun süre yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. UV-A'nın etkisi altında ise bakterinin 30 gün açlığa bırakılan örneklerde diğerlerine oranla daha uzun süre yaşadığı tespit edilmiştir. 5 gün açlığa bırakıldıktan sonra farklı dalga boyunda ışınların etkisi altında bakterilerin kontrol örneklerine oranla kısa sürede ortamdan kaybolduğu yapılan koloni sayımlarında belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda daha açlıkla ön muamelenin oksidatif strese dayanıklılığı arttırdığı ifade edilmiştir (Thiam ve ark., 1984; Gong ve ark., 2002). Thiam ve Gong tarafından yapılan çalışmalarda, açlığa maruz bırakılan bakterilerin oksidatif strese karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Troussellier (1998) 6 gün karanlıkta açlıkla ön muamele ettiği bakteriyi ışığa maruz bıraktığında kontrol örneklerine oranla daha uzun süre yaşadığını belirlemiştir. Açlıkla ön muamelenin oksidatif strese karşı direnci arttırdığını ifade etmiştir. Bakteriler tarafından çevresel şartlara cevap olarak ortaya konan bir çok genin sentezi, RpoS global stres faktörü olarak adlandırılan bir sigma faktörün kontrolü ile çalışmaktadır (Repoila ve ark., 2003). *rpoS* geninin transkripsiyonel düzenlenmesi oldukça kompleks olup, RpoS regülonu, genel stres direnci, (UV ışınlar, hiperosmolarite, asit şoku, oksidatif ve sıcaklık stresi), karbon metabolizması, hücre zarf ve morfolojisi gibi çok farklı fonksiyonlarda görev alan genleri içerir (Notley ve ark., 1996; Repoila ve ark., 2003). Açlık esnasında bakteriler savunma amaçlı ppGpp birikmektedirler. ppGpp birikimi *E.coli* bakterisinde bir çok stres-direnç geninin ekspresyonunu uyaran RpoS'nin sentezini aktive etmektedir (Gentry ve ark., 1993, Loewen ve ark., 1998). Örneğin RpoS tarafından düzenlenen gen *dps* (açlık esnasında DNA bağlama proteini kodlar) oksidatif strese direkte önemli rol oynamaktadır (Almiron ve ark., 1992). Dolayısıyla bir çok strese karşı direnç oluşturan RpoS ile ilgili yapılan çalışmalarda açlığın oksidatif strese karşı direnç sağlamada bakteriye avantaj sağladığı ifade edilmektedir (Gong ve ark., 2002). Elde edilen sonuçlar bizim yaptığımız çalışmaları destekler nitelikte olup açlığa bırakılan örneklerde bakterilerin oksidatif strese daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

Farklı günler açlığa bırakılan örneklerde dahi bakterilerin oksidatif strese dayanıklılığında değişiklikler olduğu belirlenmiştir.

Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Oksidatif Stres Enzimlerinde Meydana Gelen Değişimler

H₂O₂, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri hem çevresel ajanlar hemde aerobik metabolizma tarafından üretilmektedir. Bu reaktif oksijen türleri DNA, proteinler ve membran lipitlerine zarar vermekte ve mutagenesis, büyümenin inhibisyonu ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır.

E.coli oksidatif zarardan hücreleri koruyan bir çok savunma sistemine sahiptir. Bunlar oksidatif strese karşı savunma amacıyla ortaya çıkmakta ve oksijen radikallerinin üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki dengeyi sağlamaktadırlar. *E.coli* hücrelerinde *oxyR* sistemi H₂O₂'ye tepkide uyarılmakta ve *katG* tarafından kodlanan katalaz hidroperoksidaz (HPI), *ahpFC* tarafından kodlanan NADPH bağımlı alkil hidroperoksidaz, *gorA* tarafından kodlanan glutathion redüktaz ve diğer bir çok geni içermektedir.

Hücre içi süperoksidin ortaya çıkması ile *soxRS* sistemi aktive olmakta ve *sodA* tarafından kodlanan MnSOD ve *nfo* tarafından kodlanan DNA tamir endonükleaz IV ve *zwf* tarafından kodlanan glukoz 6-P-dehidrogenazı içermektedir. Mikroorganizmalar oksidatif stresin zararlı etkisinden kurtulmalarını bu gibi sistemler vasıtasıyla korumaktadırlar.

Yapılan çalışmada, farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında deniz suyu ortamında oksidatif stres enzimlerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Bilindiği gibi fotosensitizer ve ışık kaynağı birlikte oksidasyonun temelini oluşturmaktadır. Dolayısıyla oluşan serbest radikallerin öldürücü etkisine karşı bakteriler savunma amacıyla, enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimlerle karşılık vermektedirler. Nitekim şimdiye kadar mutant örneklerle veya yabanıl türlerle yapılan çalışmalarda bakterilerin oksidatif stresin etkisine karşı oksidatif stres enzim aktivitelerini arttırdığı tespit edilmiştir.

Işık kaynaklarının etkisi altında yapılan bu çalışmada katalaz, süperoksit dismutaz, glutathion peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. *E.coli* ve *S.typhimurium*

ile yapılan bu çalışmada, metilen mavisi ilave edilen deniz suyu ortamında beyaz, mavi ve yeşil ışıktaki 32 saat süre ile kırmızı ışıktaki 16 saat ve UV-A'nın etkisi altında 9 saat süre ile enzim örneklerinde zamana bağlı olarak azalmalar olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* ile yapılan çalışmada beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saat sonunda katalaz miktarında %76-80 arasında, kırmızı ışığın etkisi altında 16 saatte %85 ve UV-A'nın etkisi altında ise 9 saatte %60 oranında azalmalar olduğu görülmüştür. Aynı süreler göz önüne alınarak yapılan çalışmada SOD miktarında da azalmalar olduğu ve bu azalmanın beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında %66-72 arasında, kırmızı ışığın etkisi altında %75 ve UV-A'nın etkisi altında %78 olduğu tespit edilmiştir. Glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim miktarlarında da azalmalar olduğu ve bu azalmanın beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında %60-80 arasında, kırmızı ışığın etkisi altında %80-82 ve UV-A'nın etkisi altında ise %70-75 arasında olduğu belirlenmiştir. *S.typhimurium* ile yapılan çalışmada da enzim miktarlarında önemli derecede azalmalar olduğu görülmüştür. 32 saat süre esnasında alınan örneklerde beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında katalaz seviyesinde %85-89, kırmızı ışığın etkisi altında 16 saat süre ile yapılan çalışmada %84 ve 9 saat UV-A'nın etkisi altında yapılan çalışmada %66 oranında azalma meydana geldiği, bunun yanında aynı sürelerde SOD miktarında da benzer azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Glutation peroksidaz miktarında ise beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında %60-88, kırmızı ışığın etkisi altında %75 ve UV-A'nın etkisi altında ise %50 azalmalar olduğu belirlenmiştir. Glukoz-6-P-dehidrogenaz ile yapılan çalışmada beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında %86-90, kırmızı ışığın etkisi altında %75 ve UV-A'nın etkisi altında %40 civarında azalmalar olduğu görülmüştür. Karanlık kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında ise bu süreler esnasında enzimlerin miktarında herhangi bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Enzim miktarlarında beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saat süre esnasında meydana gelen azalmanın miktarı ile kırmızı ışığın etkisi altında 16 saatte ve UV-A'nın etkisi altında 9 saatte meydana gelen azalmanın birbirine yakın olduğu görülmektedir. Burada enzim aktivitelerinde meydana gelen azalmanın ışık kaynakları ile alakalı olduğu ortaya çıkmaktadır.

Çünkü beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 32 saatte meydana gelen azalmanın, kırmızı ışıktaki 16 saatte ve UV-A'nın etkisi altında ise 9 saatte meydana geldiği belirlenmiştir. Buda bize bu azalmanın ışık kaynakları ile alakalı olabileceğini göstermesi açısından önemli bir bulgudur.

Sadece deniz suyu ortamında yapılan çalışmada farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında oksidatif stres enzim miktarında da bazı değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. *E.coli* ve *S.typhimurium* ile yapılan çalışmada bakteriler beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında 72 saat, kırmızı ışığın etkisi altında 24 saat ve UV-A'nın etkisi altında ise 15 saat ışık kaynakları ile muamele edilmiş ve oksidatif stres enzim miktarında zamana bağlı olarak azalmalar olduğu belirlenmiştir. *E.coli* ile yapılan çalışmada beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saatlik bir süre esnasında katalaz seviyesinde %85-90 arasında azalmalar olmasına rağmen kırmızı ışıktaki bu azalmanın 24 saatte ve UV-A'nın etkisi altında ise 15 saatte gerçekleştiği görülmüştür. SOD miktarında beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında %60-95 arasında azalmalar olduğu bunun yanında kırmızı ışığın etkisi altında 24 saatte % 50, UV-A'nın etkisi altında ise 15 saatte %60 oranında azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Glutathion peroksidaz aktivitesinde de mavi, beyaz ve yeşil ışığın etkisi altında %75-95 arasında azalmalar olduğu bunun yanında kırmızı ışığın etkisi altında %60, UV-A'nın etkisi altında ise %55 oranında azalmalar olduğu belirlenmiştir. Burada glukoz-6-P-dehidrogenaz enzim miktarında meydana gelen azalmanın diğerlerinden daha az olduğu görülmüştür. Beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saatte %40-85 arasında, kırmızı ışığın etkisi altında 24 saatte %40 ve UV-A'nın etkisi altında ise 15 saatte %60 oranında bir azalma olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada *S.typhimurium* bakterisinde oksidatif stres enzim miktarlarında meydana gelen değişime bakılmıştır. Beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 72 saatlik süre sonunda katalaz aktivitesinde %75-95 arasında azalmalar olduğu, bunun yanında kırmızı ışığın etkisi altında 24 saatlik bir sürede %75 ve UV-A'nın etkisi altında 15 saatte %80 oranında azalmalar olduğu görülmüştür. Aynı sürede SOD aktivitesinde beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında %55-70, kırmızı ışığın etkisi altında %60 ve

UV-A'nın etkisi altında %60 oranında azalmalar olduğu belirlenmiştir. Glutation peroksidaz ve glukoz-6-P-dehidrogenaz aktivitelerinde de buna benzer sonuçlar elde edilmiş ve bakteri örneğinde enzim seviyelerinde azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Burada da diğer çalışmaya benzer sonuçlar elde edilmiş ve bakterilerdeki enzim seviyelerinde azalmalar olduğu, beyaz, mavi ve yeşil ışıpta 72 saatte meydana gelen azalmanın kırmızı ışıpta 24 saatte, UV-A'nın etkisi altında ise 15 saatte meydana geldiği görülmüştür. Yani görünür bölge ışık kaynaklarının etkisi altında kırmızı ışığın diğerlerinden daha kısa sürede enzim miktarını etkilediği belirlenmiştir. Burada bulunan sonuçlar şimdiye kadar yapılan çalışmalarla çelişmektedir. Çünkü mikroorganizmalar enzim aktivitelerinde meydana gelen artışla oksidatif stresin zararlı etkilerinden kendilerini korumaktadırlar (Storz ve ark.,1990; Demple ve ark., 1991). Bu konuda yabanıl ve mutant örneklerle yapılan çalışmalarda, SOD ve katalaz bakımından eksik olan mutantlarda yabanıl türlere oranla mutantların daha kısa sürede ortamdan kaybolduğu tespit edilmiştir (Niederhoffer ve ark., 1990; Touati ve ark.,1995; Polack ve ark.,1996). Buda bize oksidatif strese karşı korumda enzim sentezinin önemli olduğunu göstermektedir. Fakat deniz suyunda oksidatif stres esnasında oksidatif stres enzim miktarlarında meydana gelen değişimle ilgili çok az çalışma vardır. Bu konuyla ilgili olarak Troussellier (1998) ve arkadaşları *E.coli* ve *S.typhimurium* ile deniz suyunda yaptıkları çalışmada, ışıkla muameleden sonra süperoksit anyonu (SOD) ve hidrojen perokside (Katalaz) karşı enzimatik aktivitede karanlık kontrol örnekler ile karşılaştırıldığında enzim miktarlarında önemli bir değişiklik olmadığını hatta zamana bağlı olarak azalmalar meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim bulduğumuz sonuçları destekler nitelikte olup, burada enzimlerin ya yıkıldığı ya da deniz suyu ortamında sentezlenemediği ifade edilmektedir.

Enzimlerle ilgili yapılan çalışmada alınan örnekler arasındaki sürenin uzun olması sonuçların değerlendirilmesi açısından sakıncalar doğurabilir düşüncesiyle ikinci bir çalışma yapılarak, alınan örnekler arasındaki süre oldukça kısaltılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. 8 saat süre ile yapılan çalışmada metilen mavisi ilave edilen deniz suyu ortamında bakterilerin enzim aktivitelerinde ilk 2 saat süre esnasında bir artış olduğu daha sonra ise

azalmaya başladığı görülmüştür. Bakteriler oksidatif stresle karşılaştıkları zaman ilk 2 saat içinde enzim aktivitelerini arttırarak oksidatif stresin zararlı etkisinden kendisini korumaya çalışmıştır. Fakat yukarıda da ifade edildiği gibi enzimler ışığın etkisi altında zamanla ya sentez edilememeye yada zarar görmeye başladığından azalmalar meydana gelmiştir. Bu yüzden deniz suyu ortamında ışık kaynaklarının etkisi altında yapılacak enzim aktivitesi çalışmalarında, azalmanın sebebinin ne olduğu sorusuna cevap bulmaya yönelik çalışmalar daha uygun olacaktır.

Işık Kaynaklarının Etkisi Altında Oksidatif Stres Esnasında Lipit Peroksidasyonunda Meydana Gelen Değişim

Oksidatif stresi meydana getiren araçlara reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilmektedir. Bu araçların büyük bir kısmı radyasyonla muameleden sonra ortaya çıkmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Oksijen büyük oranda DNA'ya, RNA'ya, proteinlere ve lipitlere zarar vermektedir. Proteinler bu ataklardan zarar gören ana hedeflerden biridir. Oksijen radikalleri fosfolipitlerdeki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmektedir. Lipit peroksidasyonunun karbonil ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) meydana gelmektedir. Lipit peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikalin etkisi sonucu membran yapısında bulunan poli doymamış yağ asiti zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaşması ile başlar. Sonuçta yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesi ve daha sonra lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikali meydana gelir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna sebep olur. Bunun sonucu, deformasyon, iyon geçişi, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi farklı şekillerde membran özelliklerini değiştirir.

Bu çalışmada, farklı dalga boyunda ışık kaynaklarının etkisi altında bir fotosensitizer olan metilen mavisinin bulunduğu ortamda veya sadece ışık kaynağının etkisi altında deniz suyunda *E.coli* ve *S.typhimurium* bakterilerinin lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişim araştırılmıştır. Lipit peroksidasyonu bir ürün olan malondialdehit oluşumuna bağlı olarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Metilen mavisinin bulunduğu ortamda

beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında *E.coli*'de 24 saatte, kırmızı ışığın etkisi altında 12 saatte ve UV-A'nın etkisi altında ise 6 saatte lipit peroksidasyonunda artış olduğu belirlenmiştir. *E.coli*'de beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında metilen mavisi ilave edilen deniz suyunda 24 saatte yaklaşık %30-40 arasında, kırmızı ışığın etkisi altında 12 saatte %33 ve UV-A'nın etkisi altında ise 6 saatte %30 oranında artış olduğu belirlenmiştir. *S.typhimurium* örneklerinde de *E.coli*'ye benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Burada ışık kaynaklarının etkisine bağlı olarak lipit peroksidasyonunda da değişiklikler görülmüştür. Peroksidasyonun en hızlı UV-A'nın etkisi altında daha sonra kırmızı, beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında olduğu görülmüştür. Sadece görünür ışık kaynakları göz önüne alındığında ise kırmızı ışığın etkisi altında 16 saatte, beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarında ise 32 saatte lipit peroksidasyonu yaklaşık aynı oranda artış meydana gelmiştir. Kırmızı ışığın peroksidasyon hızını arttırdığı ve bunun sebebinde kırmızı ışığın etkisi altında oksidasyonun daha hızlı meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hidroksil radikallerinin lipit peroksidasyonun başlattığı ve bunun sonucunda zararın meydana geldiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (McCord ve ark.,2000).

Sadece ışık kaynaklarının etkisi altında her iki bakteri türünde de beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında 48 saat, kırmızı ışığın etkisi altında 16 saat ve UV-A'nın etkisi altında ise 15 saat sonunda lipit peroksidasyonunda gözle görülür artışlar olduğu belirlenmiştir. *E.coli*'de, beyaz, mavi ve yeşil ışığın etkisi altında 48 saatte %40-50, kırmızı ışığın etkisi altında 16 saatte %35 ve UV-A'nın etkisi altında ise yaklaşık %40 oranında lipit peroksidasyonunda artışlar olduğu tespit edilmiştir. *S.typhimurium*'da lipit peroksidasyonunda beyaz, mavi ve yeşil ışık kaynaklarının etkisi altında %25-35, kırmızı ışık kaynağının etkisi altında %30 ve UV-A'nın etkisi altında ise %25 oranında artışlar olduğu görülmüştür. Burada *E.coli*'de *S.typhimurium*'dan daha fazla lipit peroksidasyonu meydana geldiği belirlenmiştir. Radikaller tarafından meydana gelen oksidatif stres esnasında lipit peroksidasyonunda artışlar olduğu yapılan birçok çalışmada belirlenmiştir. Bakterilerle yapılan bu çalışmada da lipit

peroksidasyonunda meydana gelen artış şimdiye kadar yapılan şalışmaları destekler nitelikte olması ağıısından önemlidir.

Metilen mavisinin etkisi altında radikallerin daha kısa sürede oluşması sebebiyle lipit peroksidasyonu daha kısa sürede meydana gelmektedir. Sadece ışık kaynağıının etkisi altında ise radikallerin meydana gelme hızı daha yavaştır. Bu nedenle lipit peroksidasyon hızının daha yavaş olduğu görülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Aas, P., Lyons, M. M., Pledger, R. J., Mitchell, D. L., and Jeffrey, W.H., 1996.** Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* 11, 229-238.
- Aebi, H., 1984.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, Vol 105, 121-126.
- Akkuş, İ., 1995.** Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri, S.Ü., Tıp Fak., Biyokimya ABD, Konya.
- Almiron, M., Link, A.J., Furlong, D., Kolter, R., 1992.** A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *E.coli*. *Genes Dev.* 6, 2646-2654.
- Amabile-Cuevas, C.F., Demple, B., 1991.** Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 19, 4479-4484.
- Anderson, S. M., and Krinsky, N. I., 1973.** Protective action of carotenoid pigments against photodynamic damage to liposomes. *Photochem. Photobiol.* 18, 403-408.
- Aono, R., Tsukagoshi, N., Yamamoto, M., 1998.** Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *E.coli* K-12. *J Bacteriol.* 180, 938-944.
- Aruoma, O., Halliwell, B., 1998.** Molecular biology of free radicals in human diseases. Saint Lucia:OICA International, 1998.
- Ariza, R.R., Li, Z., Demple, B., 1995.** Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. *J Bacteriol.* 177(7), 1655-1661.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., et al., 2003.** Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Inter. J. Food Microbiol.* 89, 31-39.
- Bailey, C. A., Neihof, R. A., and Tabor, P. S., 1983.** Inhibitory effect of solar radiation on amino acid uptake in Chesapeake Bay bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 44-49.
- Baker, K.S., Smith, R.C., 1982.** Spectral irradiance penetration in natural

waters. Plenum, New York. pp. 233-246.

- Batra, P.P., and Skinner , A., 1990.** A kinetic study of the photochemical inactivation of adenylate kinases of *Mycobacterium marinum* and bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1038, 52-59.
- Bellin, J.S., and Grossman, L.I., 1965.** Photodynamic degradation of nucleic acids. *Photochem. Photobiol.* 4, 45-53.
- Bertoloni, G., Salvato, B., Dall'Acqua, M., Vazzoler, M., Jori, M. G., 1984.** Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis* . *Photochemistry and Photobiology.* 39, 811-816.
- Bertoloni, G., Rossi, F., Valduga, G., Jori, G., Ali, H., va Lier , J. E., 1990.** Photosensitizing activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters.* 59, 149-155.
- Bertoloni, G., Rossi, F., Valduga, G., Jori, G., Ali, H., va Lier , J. E., 1992.** Photosensitising activity of water-and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotik microbial cells. *Microbios.* 71, 33-46.
- Bhatti, M., MacRobert, A.J., Meghji, S., Henderson, B., Wilson, M., 1998.** A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 68, 370-376.
- Bilgehan, H., 1994.** Klinik mikrobiyoloji. İzmir
- Bogosian, G., Morris, P. J. L. and O'neil, J. P., 1998.** A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5), 1736-1742.
- Braux, A. S., Minet, J., Shacoori, Z. T., Riou, G. and Cormier, M., 1997.** Direct enumeration of injured *Escherichia coli* cells harvested onto membrane filters. *J. Microbiol. Methods,* 31, 1-8.
- Butler, C., Seward, H., Greenwood, C., Thomson, A., 1997.** Fast cytochrome bo from *E.coli* binds two molecules of nitric oxide at CuB. *Biochemistry.* 36, 16259-16266.
- Cedet, J. And Vigny, P., 1990.** The photochemistry of nucleic acids, in H. Morrison (ed), *Bioorganic Photochemistry. The Photochemistry of Nucleic Acids.* 1-272.

- Calkins, S., Barcelo, J.A., 1982.** The role of solar ultraviolet radiation in marine ecosystems. Plenum press, New York. Pp. 143-150.
- Carre, V., Gaud, O., Sylvain, I., Bourdon, O., Spiro, M., Blais, J., et al., 1999.** Fungicidal properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Photochemistry and Photobiology B. 48, 57-62.
- Caruso, G., Mancuso, M. and Crisafi, E., 2003.** Combined fluorescent antibody assay and viability staining for the assessment of the physiological states of *Escherichia coli* in seawaters. J. Appl. Microbiol. 95, 225-233.
- Chacon, J.N., McLearn, J. and Sinclair, R.S., 1988.** Singlet oxygen yields and radical contributions in the dye-sensitized photooxidation in methanol of esters of polyunsaturated fatty acids (oleic, linolenic and arachidonic). Photochem. Photobiol. 47, 647-656.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F., 1995.** Formation of viable but nonculturable *Salmonella* during starvation in chemically defined solutions. Lett. Appl. Microbiol. 20, 380-384.
- Chan, Y., Lai, C.H., 2003.** Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. Lasers Med. Sci. 18, 51-55.
- Chauiere, J., Feraari-Iliou, R., 1999.** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food and Chemical Toxicology. 37, 949-962.
- Chen, L., Xie, Q., Nathan, C., 1998.** Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. Mol Cell. 1, 795-805.
- Christensen, J. P., Owens, T. G., Devol, A. H. and Packard, T. T., 1980.** Respiration and physiological state in marine bacteria. Marine Biology, 55, 267-276.
- Christman, M.F., et al., 1989.** OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *E.coli* and *S.typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3484-3488.

- Clements, P., Wells, C.H.J., 1992.** Pestic Sci. 34, 163-166.
- Clifton, J., Leikin, J.B., 2003.** Methylen blue. Am. J. Ther. 10, 289-291.
- Colwell, R. R., Knight, I. T., Somerville, C., Shults, S. and Kaspar, C. W., 1989.** Viable but non-culturable phenomenon in relationship to starvation/survival, "Injury", and strategies for survival of bacteria in the environment. Recent Advances in Microbial Ecology, 5th International Symposium on Microbial Ecology, Japan, p 85-88.
- Compan, ., Touati, D., 1993.** Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *E.coli* K-12. J Bacteriol. 175, 1687-1696.
- Cruickshank, R. Duguid, J. P. and Swain, R. H. A., 1973.** "Medical Microbiology. Vol I Microbial Infections". 12th. ed. Churchill, Livingstone, Edinburgh, UK.
- Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P and Swain, R., H., A., 1975.** "Medical Microbiology: The practise of Medical Microbiology. Vol 2. 12th. ed. Churchill, Livingstone, Edinburg, UK.
- Cunningham, L., Gruer, M., Guest, J., 1997.** Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *E.coli*. Microbiology. 143, 3795-3805.
- Curtis, T.P., Mara, D.D. and Silva, S.A. 1992.** Influence of pH, oxygen and humic substances on aqabeylity of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1335-1343.
- Davies, C.M., Evison, L.M., 1991.** Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. J. Appl. Bacteriol. 70, 265-274.
- Davies, C. M., long, J. A., Donald, M. and Ashbolt, N. J., 1995.** Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1888-1896.
- De Groote, M.N., et al., 1997.** Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci. 1997 94, 13997-14001.
- Demple, B. And Amibile-Cuevas, C.F., 1991.** Redox redux: the control of oxidative stres responses. Cell. 67 (5), 837-839.

- Ding, H., Demple, B., 1996.** Glutathione-mediated destabilization in vitro of [2Fe-2S] centers in the SoxR regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci.* 93(18), 9449-9453.
- Dougherty, T.J., Gomer, C. J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbely, M., et al., 1998.** Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute.* 90, 889-905.
- Dukan, S., Touati, D., 1996.** Hypochlorous acid stress in *E.coli*: Resistance, DNA damage, and comparison, with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol.* 178, 6145-6150.
- Epe, B., Hegler, J. And Wild, D., 1989.** Singlet oxygen as an ultimately reactive species in *Salmonella typhimurium* DNA damage induced by methylene blue/visible light. *Carcinogenesis.* 10, 2019-2024.
- Ferenci, T., 1999.** Regulation by nutrient limitation. *Current Opinion in Microbiology,* 2, 208-213.
- Ferenci, T., 2001.** Hungry bacteria – definition and properties of a nutritional state. *Environ. Microbiol.* 3, 605-611.
- Fernandez De Henestrosa, A. R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H. and Woodgate, R., 2000.** Identification of additional genes belonging to the *lexA* regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35:1560–1572.
- Ferrante, A., Augliera, J., Lewis, K., Klivanov, A., 1995.** Cloning of an organic solvent-resistance gene in *E.coli*: the unexpected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7617-7621.
- Fiksdal, L., Tryland, I., 1999.** Effect of u.v. light irradiation, starvation and heat on *E.coli* β -D-galactosidase activity and other potential viability parameters. *Journal of Applied Microbiology.* 87, 62-71.
- Fink, S.P., Reddy, G.R., Marnett, L.J., 1997.** Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 8652- 8657.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Wong, P.K., Altmiller, D.H. and Rickard, R.C.,**

- 1986.** Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Rad. Res. Commun.* 1, 163-172.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L. and Schneider, J.E., 1989.** Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 106-111.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L. and Schneider, J.E., 1990.** mediation of 8-hydroxy-guanine formation in DNA by thiazin dyes plus light. *Free Rad. Biol. Med.* 8, 327-330.
- Floyd, R.A., Schneider, J. E., Dittmer, D. P., 2004.** Methylene blue photoinactivation of RNA viruses. *Antiviral Research.* 61, 141-151.
- Folhe, L., and Otting, F., 1984.** Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology.* 105, 93-104.
- Foote, C.S., 1976.** Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. *Free Radicals in Biology.* Academic Press, Baton Rouge. pp, 85-124.
- Foote, C.S., 1991.** Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991 Nov;54(5)659.
- Fridovich, I., 1995.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97-112.
- Friedberg, E.C., 1995.** Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci.* 20(10), 381.
- Friedmann, T. and Brown, D.M., 1978.** Base-specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue-sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine, *Nucleic Acids Res.* 5, 615-622.
- Gabor, F., Szocs, K., Maillard, P., Csik, G., 2001.** Photobiological activity of exogenous and endogenous porphyrin derivatives in *Escherichia coli* and *Enterococcus hirae* cells. *Radiat Environ Biophys.* 40, 145-151.
- Garcia-Lara, J., Martinez, J., Vilamu, M. and Vives-Rego, J., 1993.** Effect of previous growth conditions on the starvation-survival of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1425-1431.

- Garcia-Pichel, F., 1994.** A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreen. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1704-1717.
- Gardner, P., Costantino, G., Szabo, C., Salzman, A., 1997.** Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *J. Biol. Chem.* 272, 25071-25076.
- Gaudu, P. and Weiss, B., 1996.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10094-10098.
- Gauthier, M. J., Munro, P. M. And Breittmayer, V. A., 1988.** Influence of prior conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater. *Can. J. Microbiol.* 35, 379-383.
- Gauthier, M. J., Flatau, G. N., Le Rudulier, D., Clement, R. L. and Combarro, M. P., 1991.** Intracellular accumulation of potassium and glutamate specifically enhances survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 272-276.
- Gentry, D.R., Hernandez, V.J., ve ark., 1993.** Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175, 7982-7989.
- Girotti, A.W., Lyman, S. and Deziel, M.R., 1979.** Methylene blue-sensitized photo-oxidation of hemoglobin: evidence for cross-link formation. *Photochem. Photobiol.* 29, 1119-1125.
- Girotti, A.W., 1990.** Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 51, 497-505.
- Gisela, S. And Imlay, J., 1999.** Oxidative Stress. *Current Opinion in Microbiology.* 2, 188-194.
- Goldstain, S., Squadrito, G., Pryor, W., Czapski, G., 1996.** Direct and indirect oxidations by peroxynitrite, neither involving the hydroxyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 965-974.
- Gonzales-Flecha, B., 1995.** Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 13681-13687.
- Gong, L., Takayama, K., Kjelleberg, S., 2002.** Role of *spoT*-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria. *Microbiology.* 148, 559-570.
- Gort, A., Imlay, J., 1998.** Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J. Bacteriol.* 180, 1402-1410.

- Gort, A., Ferber, D., Imlay, J., 1999.** The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *E.coli*. Mol. Microbiol. 32, 179-191.
- Gourmelon, M., Cillard, J., Pommepuy, M., 1994.** Visible light damage to *E.coli* in seawater oxidative stress. Journal of Applied Bacteriol. 77 (1), 105-120.
- Gourmelon, M., Touati, D., et al., 1997.** Survival of *E.coli* exposed to visible light in seawater: analysis of *rpoS*-dependent effects. Can. J. Microbiol. 43, 1036-1043.
- Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josphy, D.P. and Demple, B., 1990.** Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci. 87, 6181-6185.
- Grimes, D. J. and Colwell, R. R., 1986.** Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semi tropical ocean water. FEMS Microbiol. Lett. 34, 161-165.
- Grossweiner, L.I., 1976.** Photochemical inactivation of enzymes. Curr. Topics Radiat. Res. Quart. 11, 141-199.
- Grossweiner, L.I. and Grossweiner, J.B., 1982.** Hydrodynamic effects in the photosensitized lysis of liposomes. Photochem. Photobiol. 35, 583-586.
- Halliwell, B., J:M:C., 1984.** Oxygen toxicity and oxygen radicals. Transition Metals and Disease Biochem. J. 219, 1-4.
- Hatzinger, P. B., Palmer, P., Smith, R. L., Penarrieta, C. T. and Yoshinari, T., 2003.** Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. J. Microbiol. Methods, 52, 47-58.
- Hausladen, A., Fridovich, I., 1994.** Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. J. Biol. Chem. 269, 29405-29408.
- Hausladen, A., Privalle, C., Keng, T., DeAngelo, J., Stamler, J., 1996.** Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. Cell. 86, 719-729.
- Herndl, G.J., Müller-Niklas, G. and Frick, J., 1993.** Major role of ultraviolet-B in

controlling bacterioplankton growth in the surface layer of the ocean. Natur. 361, 717-719.

Hidalgo, E., Demple, B., 1994. An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. EMBO J. 13, 138-146.

Hidalgo, E., Ding, H., Demple, B., 1997. Redox signal transduction via iron-sulfur clusters in the SoxR transcription activator. Trends Biochem Sci. 22(6), 207-210.

Hidalgo, E., Demple, B., 1997. Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. EMBO J. 16, 1056-1065.

Hidalgo, E., Leautaud, V., Demple, B., 1998. The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. EMBO J. 17(9), 2629-2636.

Hoigne, J., Faust, J., Haag, B.C., Scully, F.E., Rrank, E. and R. Zepp, R.G., 1989. Adv. Chem. Sci. 218, 363-381.

Hylemon, P.B. and Phibbs Jr. P.V., 1972. Independent regulation of hexose catabolizing enzymes and glucose transport activity in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 1041-1048.

Imlay, J., Linn, S., 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. Science. 240, 640-642.

Imlay, J., Fridovich, I., 1991. Assay of metabolic superoxide production in *E.coli*. J. Biol. Chem. 266, 6957-6965.

Imlay, J., 1995. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *E.coli*. J. Biol. Chem. 270, 19767-19777.

Ito, T., 1983. Photodynamic agents as tools for cell biology. Photochem. Photobiol. Rev. 7, 141-186.

Ito, T., 1977. Toluidine blue: The mode of photodynamic action in yeast cells. Photochem. Photobiol. 25, 47-53.

Jamieson, D., Storz, G., 1997. Transcriptional regulators of oxidative stress

responses. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Edited by J Scandalios. Cold Spring Harbor, N Y. Cold Spring Harbor Laboratory. 91, 115.

Jeffrey, W.H., Aas, P., Lyons, M.M., Coffin, R.B., Pledger, R.J. and Mitchell, D.L., 1996. Ambient solar radiation-induced photodamage in marine bacterioplankton. *Photochem. Photobiol.* 64, 419-427.

Jeffrey, W.H., Aas, P., Pledger, R.J., Coffin, R.B., Mitchell, D.L., Hager, S. and Von Haven, R., 1996. Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137, 283-291.

Jenkins, D.E., Schultz, J.E., Matin, A., 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 3910-3914.

Joux, F., Leboran, P. and Trouselier, M., 1997. Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecology*, 22, 65-76.

Kaiser, E. and Herndl, G.J., 1997. Rapid recovery of marine bacterioplankton activity after inhibition by UV radiation in coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4026-4031.

Kapuscinski, R.B. and Mitchell, R., 1981. Solar radiation induces sublethal injury in *E.coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 670-674.

Kasai, H. and Nishimura, S., 1991. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. *Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, New York. Pp, 99-116.

Kato, T. and Nakano, E., 1981. Effects of the *umuC36* mutation on ultraviolet-radiation-induced base-change and frameshift mutations in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 83, 307-319.

Kawanishi, S., Inoue, S. and Sano, S., 1986. Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as a mediator. *J. Biol. Chem.* 261, 6090-6095.

Kayser, R.H. and Young, R.H., 1976. The photoreduction of methylene blue by

amines. I. A flash photolysis study of the reaction between triplet methylene blue and amines. *Photochem. Photobiol.* 24, 359-401.

Kayser, R.H. and Young, R.H., 1976. The photoreduction of methylene blue by amines. II. An investigation of the decay of semireduced methylene blue. *Photochem. Photobiol.* 24, 403-411.

Kelly, J.M., van der Putten, W.J.M., McConnell, D.J., 1987. Laser flash spectroscopy of methylene blue with nucleic acids. *Photochem. Photobiol.* 45, 167-175.

Keyser, K., Imlay, J., 1997. Inactivation of dehydratase (4Fe-4S) clusters and disruption of iron homeostasis upon cell exposure to peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 272, 27652-27659.

Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N., 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25, 415-420.

Kömerik, N., Wilson, M., 2002. Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *Journal of Applied Microbiology.* 92, 618-623.

Kussovski, V.K., Hristov, A.E. and Radoucheva, T.S., 2001. Proflavine-mediated inactivation of *Salmonella Dublin* exposed to visible sunlight in natural fresh water. *Microbios.* 105, 119-125.

Laflamme, C., Lavigne, S., Ho, J. and Duchaine, C., 2004. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *J. Appl. Microbiol.* 96, 684-692.

Lalwani, R., Maiti, S. and Mukherji, S., 1990. Visible light induced DNA-protein cross-linking in DNA-histone complex and sarcoma-180 chromatin in the presence of methylene blue. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 7, 57-73.

Lalwani, R., Maiti, S. and Mukherji, S., 1991. Role of methylene blue and chromatin proteins in the formation of DNA-protein crosslinking induced by visible light. *Indian J. Phys. B*, 65B. 629-634.

Lambrecht, B., Mohr, H., Knuver-Hopf, J., Schmitt, H., 1991. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Von Sang.*, 207-213.

- Lebaron, P. and Joux, F., 1994.** Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1384-1390.
- Leopold, F. and Wolfgang, A.G., 1984.** Assays of glutathione peroxide. Methods in Enzymology. 77, 114-121.
- Lesne, J., Berthet, S., Binard, S., Rouxel, A. and Humbert, F., 2000.** Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions. Inter. J. Food. Microbiol. 60, 195-203.
- Li, Z., Demple, B., 1994.** SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. J Biol Chem. 269(28), 18371-18377.
- Liu, X. and Ferenci, T., 2001.** An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. Microbiolgy, 147, 2981-2989.
- Loewen, P., Hu, B., Strutinsky, J., Sparling, R., 1998.** Regulation in the *rpoS* regulon of *E.coli*. Can. J. Microbiol. 44, 707-717.
- Lushchak, V.I., 2001.** Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. Biochemistry (Moscow). 66, 476-489.
- Malik, Z.J., Hanania, J. and Nitzan, Y., 1990.** Photochem-Photobiol. B. 5, 209-244.
- Malik, Z.J., Ladan, H., Nitzan, Y., 1990.** Bactericidal effects of photoactivated porphyrins- an alternative approach to antimicrobial drugs. J. Photochem. Photobiol. B. 5, 281-293.
- Macone, A. B., Pier, G. B., Pennington, J. E., Matthews, W. J. And Goldman, D. A., 1881.** Mucoid *Escherichia Coli* in cystic fibrosis. New England J. Med., 304, 1445-1449.
- Mathews, R.M.M., 1993.** Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. Annals of The New York Academy of Sciences. 691, 127-138.
- Matevski, D., Weersink, R., Tenenbaum, H.C., Wilson, B., Ellen, R.P.,**

- Lepine, G., 2003.** Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res.* 38, 428-435.
- McCambridge, J. and McMeekin, T.A., 1981.** Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of faecal and other bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1083-1087.
- McDougald, D, Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2000.** New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia.* 54, 617-623.
- McCord, J.M., 2000.** The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stres. PhD Thesis. University of Colorado.
- Merchat, M., Spikes, J.D., Bertoloni, G. and Jori, G., 1996.** Studies on the mechanisms of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 35, 149-157.
- Merchat, M., Bertoloni, G., Giacomini, P., Villanueva, A., Jori, G., 1996.** Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizer of gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Photochemistry. Photobiology. B-Biology.* 32 (3), 153-157.
- Messner, K.R., Imlay, J., 1999.** The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *E.coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 10119 – 10128.
- Miller, P., Sulavik, M., 1996.** Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *E.coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 441-448.
- Millson, C.E., Wilson, M., MacRobert, A.J., Bown, S.G., 1996.** Ex-vivo treatment of gastric *Helicobacter* infection by photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 32, 59-65.
- Minnock, A., Vernon, D. I., Schofield, J., Griffiths, J., Parish, J. H., Brown, S. B., 1996.** Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B.* 32, 159-164.
- Mitchell, D.L. and Karentz, D., 1993.** The induction and repair of DNA photodamage in the environment. *Environmental UV Photobiology* .

Plenum New York. p, 345-377.

- Mohr, H., Bachmann, B., Klein-Struckmeier, A., Lambrecht, B., 1997.** Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem. Photobiol.* 65, 441-445.
- Muela, A., Garcia-Bringas, J. M., Arana, I. and Barcina, I., 2000.** The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: the relative roles of UV-B, UV-A, and photosynthetically active radiation. *Microb. Ecol.* 39, 65-71.
- Mukai, F.H., Goldstein, B.D., 1976.** Mutagenicity of malondialdehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science.* 191, 868_ 869.
- Muller-Runkel, R., Blais, J. and Grossweiner, L.I., 1981.** Photodynamic damage to egg lecithin liposomes. *Photochem. Photobiol.* 33, 683-687.
- Munro, P. M., Gauthier, M. J., Breittmayer, V. A. and Bongiovanni, J., 1989.** Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2017-2024.
- Munro, P. M., Flatau, G.N., Clement, R.L., Gauthier, M.J., 1995.** Influence of the RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1853-1858.
- Müller-Niklas, G., Heissenberger, A., Puskerie, S. and Herndl, G.J., 1995.** Ultraviolet-B radiation and bacterial metabolism in coastal waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 9, 111-116.
- Nakajima, H., Kobayashi, H., Negishi, T., Aono, R., 1995.** *soxRS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *E.coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59, 1323-1325.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., Fee, J.A., 1990.** Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol.* 172(4), 1930-1938.
- Nilsson, R., Merkel, P.B. and Kearns, D.R., 1972.** Unambiguous evidence for the participation of singlet oxygen in photodynamic oxidation of amino acids. *Photochem. Photobiol.* 16, 117-124.
- Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z., Ehrenberg, B., 1992.** Inactivation of

Gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*. 55, 89-96.

Nitzan, Y., Wexler, H., Finegold, S.M., 1994. Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin. *Current Microbiology*. 29 (3), 125-131.

Nitzan, Y., Dror, R., Ladan, H., Malik, Z., Kimel, S., Gottfried, V., 1995. Structure-activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol.* 62, 342-347.

Nitzan, Y., Ashkenazi, H., 2001. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *E.coli B* by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. *Current Microbiol.* 42, 408-414.

Nunoshiba, T., Demple, B., 1993. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res.* Jul 15;53(14), 3250-3252.

Nussbaum, E.L., Lige, L., Mazzulli, T., 2002. Effects of 810 nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: Comparison of continuous wave and frequency modulated light. *Lasers in Surgery and Medicine*. 31. 343-351.

Notley, M. L. and Ferenci, T., 1996. Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: What level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*? *J. Bacteriol.* 178 (5), 1465-1468.

Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G. C., Wang, Z. and Woodgate, R., 2001. The Y-family of DNA polymerases. *Cell* 8:7–8.

Oliver, J. D. and Bockian, R., 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (7), 2620-2623.

Öner, M., 1987. Mikrobial ekoloji. Ege üniversitesi basım evi. İzmir. Sayfa, 25-36.

- Özkanca, R. and Flint, K. P., 2002.** The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. Lett. Appl. Microbiol. 35, 533-537.
- Özkanca, R., Şahin, N., Işık, K., Kariptaş, E., Flint, K.P., 2002.** The effect of toluidine blue on the survival, dormancy and outer membrane porin proteins (OmpC and OmpF) of *Salmonella typhimurium* LT2 in seawater. Journal of Applied Microbiology. 92, 1-8.
- Pakulski, J.D., Aas, P., Jeffrey, W.H., Lyons, M.M., Von Waasenberger, L., Mitchell, D.L. and Coffin, R.B., 1998.** Influence of light on bacterioplankton production and respiration in a subtropical coral reef. Aquat. Microb. Ecol. 14, 137-148.
- Papeschi, G., Monici, M. and Carla, M., 1982.** Use of an amperometric sensor in the study of photosensitized oxidation of proteins. Ann. Chim. (Rome). 72, 247-254.
- Pham, P., Bertram, J. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F., 2001.** A model for SOS-lesion-targeted mutations in *Escherichia coli*. Nature 409:366–370.
- Pichereau, V., Hartke, A. and Auffray, Y., 2000.** Starvation and osmotic stress induced multiresistances influence of extracellular compounds. Inter. J. Food Microbiol. 55, 19-25.
- Pickup, R.W., 1991.** Development of molecular methods for the detection of specific bacteria in the environment. J. Gen. Microbiology. 137, 1009-1019.
- Polack, B., Dacheux, D., Delic-Atree, I., Toussaint, B., Vignais, P.M., 1996.** Role of manganese superoxide dismutase in a mucoid isolate of *Pseudomonas aeruginosa*: adaptation to oxidative stress. Infect Immun. 64(6), 2216-2219
- Pommeuy, M., Butin, M., Derrien, A., Gourmelon, M., Colwell, R. R., et al., 1996.** Retention of Enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. Appl. Environ. Microbiol. 62 (12), 4621-4626.

- Proctor, L. M. and Souza, A. C., 2001.** Method for enumeration of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) active cells and cell specific CTC activity of benthic bacteria in riverine, estuarine and coastal sediments. *J. Microbiol. Methods*, 43, 213-222.
- Radi, R., Beckman, J., Bush, K., Freeman, B., 1991.** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 266, 4244-4250.
- Ramalho, R., Cunha, J., Teixeira, P., and Gibbs, P. A., 2001.** Improved methods for enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *J. Microbiol. Methods*, 44, 97-103.
- Rengel, R. G., Barisic, K., Pavelic, Z., et. Al., 2002.** High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15, 441-448.
- Repoila, F., Majdalani, N. and Gottesman, S., 2003.** Small non coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.* 48 (4), 855-861.
- Reuven, N. B., Arad, G., Maor-Shoshani, A. and Livneh, Z., 1999.** The mutagenic protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD, RecA and SSB and is specialized for translesion replication. *J. Biol. Chem.* 274:31763–31766.
- Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H. F., 1992.** Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (6), 1801-1808.
- Roszak, D. B. and Colwell, R. R., 1987a.** Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51 (3), 365-379.
- Rozen, Y., Beklin, B., 2001.** Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol Rev.* Dec;25(5), 513-529
- Sancar, A., 1994.** Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry*. 33, 2-9.
- Schmidt, H., Al-Ibrahi, A., Dietzel, U. and Bieker, L., 1981.** On the acridine and thiazine dye sensitized photodynamic inactivation of lysozyme-singlet oxygen self-quenching by the sensitizers. *Photochem-Photobiol.* 33, 127-130.

- Schaule, G., Flemming, H. C. and Ridgeway, H. F., 1993.** Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3850-3857.
- Simon, M.I. and Van Vunakis, H., 1962.** The photodynamic reaction of methylene blue with deoxyribonucleic acid. *J.Mol. Biol.* 4, 488-499.
- Sinton, L.W., Daves-Colley, R.J., Bell, R. j., 1994.** Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl Environ Microbiol.* Jun;60(6):2040-2048.
- Sinton, L.W., Finlay, R.K. and Lynch, P.A., 1999.** Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl.Environ. Microbiol.* 65, 3605-3613.
- Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A. and Daves-Colley, R.J., 2002.** Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *App. Environ. Microbiol.* p. 1122-1131.
- Soukos, N.S., Socransky, S.S., Mulholland, S.E., Lee, S., Doukas, A.G., 2000.** Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharmaceut Res.* 17, 405-409.
- Speck, W.T., Rosenkranz, S. and Rosenkranz, H.S., 1976.** Further observations on the photooxidation of DNA in the presence of riboflavin. *Biochim. Biophys. Acta.* 435, 39-44.
- Spector, M.P., 1998.** The starvation-stress response of *Salmonella*. *Adv. Microbiol. Physiol.* 40, 233-279.
- Steinborn, G., 1978.** *Uvm* mutants of *Escherichia coli* K12 deficient in UV mutagenesis. I. Isolation of *uvm* mutants and their phenotypic characterization in DNA repair and mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* 165:87-93.
- Steveninck, J.V. and Dubbelman, T.M.A.R., 1984.** Photodynamic intramolecular crosslinking of myoglobin, *Biochim. Biophys. Acta.* 791, 98-101.
- Storz, G., Tartaglia, L.A., Farr, S.B., Ames, B.N., 1990.** Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.* 6(11), 363-8.

- Tamarit, J., Cabiscol, E. And Ros, J., 1998.** Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells Exposed to Oxidative Stres. J. Biol. Chem. 273: 3027 – 3032.
- Tanaka, Y., Yamaguchi, N. and Nasu, M., 2000.** Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry. J. Appl. Microbiol. 88, 228-238.
- Tang, M. J., Bruck, I., Eritja, R., Turner, J., Frank, E. G., Woodgate, R., O'Donnell, M. and Goodman, M. F., 1998.** Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD₂C mutagenic complex and RecA protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9755–9760.
- Tao, K., Fujita, N., Ishiama, A., 1993.** Involvement of the RNA polymerase alpha subunit C-terminal region in co-operative interaction and transcriptional activation with OxyR protein. Mol Microbiol. 7(6), 859-864.
- Tao, K., Zou, C., Fujita, N., Ishiama, A., 1995.** Mapping of the OxyR protein contact site in the C-terminal region of RNA polymerase alpha subunit. J Bacteriol. 177(23), 6740-6744.
- Tao, K., 1997.** *oxyR*-dependent induction of *E.coli grx* gene expression by peroxide stres. J Bacteriol. 179, 5967-5970.
- Thiam, K., Favre, A., 1984.** Role of the stringent response in the expression and mechanism of near-ultraviolet growth delay. J Biochem. 145, 137-142.
- Troussellier, M. et al., 1998.** Responses of enteric bacteria to environmental stres in seawater. Oceanol. Acta. 21 (6), 965-981.
- Tuite , E.M. and Kelly, J.M., 1993.** Photochemical interaction of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrate. Journal of Photochemistry and Photobiolgy. 21, 103-124.
- Türe,T., 1998.** Akut myokard infarktusunda superoxide dismutase ve glutathion peroxidase enzimleri ile E ve C vitamini düzeyleri. Sağlık Bakanlığı, İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Biyokimya A.B.D Uzm. Tezi.

- Ullrich, S. Karrasch, B., Hoppe, H. G., Jeskulke, K. and Mehrens, M., 1996.** Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Appl. Env. Microbiol.* 62 (12): 4587-4593
- Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, K. and König, H., 2004.** Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *J. Appl. Microbiol.* 96, 560-568.
- Usacheva, M.N., Teichert, M.C. and Biel, M.A., 2001.** Comparison of methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers in Surgery and Medicine.* 29, 165-173.
- Usacheva, M.N., Teicher, M.C., Biel, M.A., 2003.** The role of methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 71, 87-98.
- Valenzano, D.P., 1987.** Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 46, 147-160.
- Van Elsas, J. D., Kastelein, P., De Vries, P. M., and Van Overbeek, L. S., 2001.** Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Can. J. microbiol.* 47, 842-854.
- Varshney, R. and Kale, R.K., 1990.** Effects of calmodulin antagonists on radiation induced lipid peroxidation in microsomes. *Int. J. Rad. Biol.* 58, 733-743.
- Vever-Bizet, C., Dellinger, M., Brault, D., Rougee, M. and Bensasson, R.V., 1989.** Singlet molecular oxygen quenching by saturated and unsaturated fatty-acids and by cholesterol. *Photochem. Photobiol.* 50, 321-325.
- Villarino, A., Toribio, A. L., Brena, B. M., Grimont, P. A. D. and Bouvet, O. M. M., 2003.** On the relationship between the physiological state of bacteria and rapid enzymatic assays of fecal coliforms in the environment. *Biotechnology Letters*, 25, 1329-1334.
- Wagner, S.J., Robinette, D., Storry, J., Chen, X.Y., Shumaker, J., Benade,**

- L., 1994.** Differential sensitivities of viruses in red cell suspensions to methylene blue photosensitization. *Transfusion*. 34, 521-526.
- Wainwright, M., Phoenix, D.A., Marland, J., Wareing, D.R., Bolton, F.J., 1997-a.** A study of photobacterial activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 19, 75-80.
- Wainwright, M., 1997-b.** Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 25, 351-359.
- Wainwright, M., Phoenix, D.A., Laycock, S. L., Wareing, D.R. and Wright, P. A., 1998.** Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*. 160, 177-181.
- Wakayama, Y., Takagi, M. and Yano, K., 1980.** Photosensitized inactivation of *E.coli* cells in toluidine blue-light system. *Photochem-Photobiol.* 32, 601-605.
- Weichart, D., McDougland, D., Jacobs, D. and Kjelleberg, S., 1997.** In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), 2754-2758.
- Weiss, B. And Wu, J., 1994.** In frontiers of reactive oxygen species in biology and medicine. *Excerpta Medica*, New York. pp, 241-249.
- Whitlam, G.C., Codd, G.A., 1986.** *Spec Publ. Soc. Gen. Microbiol.* 17, 129-169.
- Wilson, M., Dobson, J., Sarkar, S., 1993 (a).** Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol. Immunol.* 8, 182-187.
- Wilson, M., Mia, N., 1993 (b).** Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J. Oral Pathol. Med.* 22, 353-357.
- Wilson, M., Pratten, J., 1994.** Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus*. *Microbios.* 78, 163-168. *Environ. Microbiol.* 62, 4621-4626.
- Wu, J., Weiss, B., 1991.** Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 2864-2871.
- Wu, J., et al., 1995.** Overproduction and physical characterization of SoxR, a

(2Fe-2S) protein that governs an oxidative response regulon in *E.coli*. J. Biol. Chem. 270, 10323-10327.

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwel, R. W., Grimes, D. J., et al., 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbial Ecology, 8, 313-323.

Yokomaku, D., Yamaguchi, N. and Nasu, M., 2000. Improved direct viable count procedure for quantitative estimation of bacterial viability in freshwater environments. Appl. Environ. Microbiol. 66 (12), 5544-5548.

Yu, F. P. and McFeters, G. A., 1994. Physiological responses of bacteria in biofilms to disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2462-2466.

Yu, W., Dodds, W. K., Banks, M. K., Skalsky, J. and Strauss, E. A., 1995. Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3367-3372.

Zheng, M., Aslund, F., Storz, G., 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science. 279, 1718-1721.

Zimmerman, R., Iturriaga, R. and Becker-Birek, J., 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. Appl. Environ. Microbiol. 36, 926-935.

6. ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Giresun'un Güveç köyünde doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Giresun'da tamamladım. 1988 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım. 1997 yılında yüksek lisansımı aynı yerde tamamladım. 1996 yılında Amasya Eğitim Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen görevime devam etmekteyim. Evliyim, bir erkek ve bir kız çocuk babasıyım.