

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADİOTROFİK BİR FUNGUS OLAN *Alternaria alternata*'DA UV-C'NİN
BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİLERİ**

HANDE TURANCI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MALATYA

MAYIS 2013

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum “**Radiotrofik Bir Fungus Olan *Alternaria alternata*’da UV-C’nin Biyokimyasal Belirteçler Üzerine Etkileri**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Hande TURANCI

Her zaman yanımda olan birtanem anneme;

Tezin Başlığı: Radiotrofik Bir Fungus Olan *Alternaria alternata*'da UV-C'nin Biyokimyasal Belirteçler Üzerine Etkileri

Tezi Hazırlayan: Hande TURANCI

Sınav Tarihi: 03.05.2013

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

Sınav Jürisi Üyeleri:

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA



Prof. Dr. Dilek ASMA (Danışman)



Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL



Prof.Dr. Mehmet ALPASLAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RADİOTROFİK BİR FUNGUS OLAN *Alternaria alternata*'DA UV-C'NİN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Hande TURANCI

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

106 + xii sayfa

2013

Danışman: Prof. Dr. Dilek ASMA

ÖZET

Dünya üzerindeki yaşam sürekli bir radyasyon akışı içerisinde var olmaktadır. Funguslar, radyasyonla yeryüzündeki diğer canlılardan daha farklı bir etkileşim göstererek doğal ya da insan eliyle oluşturulmuş yüksek seviyedeki ultraviyole veya iyonize radyasyon ile başa çıkabilmektedir. 1986 yılında meydana gelen Çernobil felaketinden 10 yıl sonra, oldukça reaktif olan hasarlı reaktör duvarlarında gelişen ve robotlar yardımıyla toplanan siyah fungusların keşfiyle bu ekstrem canlılarla ilgili araştırmalar başlamıştır. Çernobil reaktörlerinden izole edilen mikobiyotada 37 tür 19 cins saptanmıştır ve çalışmamızda kullanılan *Alternaria alternata*' da bu izole edilen mikobiyota içerisinde yer almaktadır. Çernobil mikobiyotasındaki türler birbiriyle karşılaştırıldığında yüksek radyasyon ile kontamine alanlarda melanin içeren türlerin geniş yayılım gösterdiği belirlenmiştir.

Melanin bütün alemlerde bulunan ve çok çeşitli rolleri olan karmaşık bir pigmenttir. Melanin organizmayı düşük/yüksek sıcaklık, radyasyon, kimyasal stres (ağır metal ve okside ajanlar), biyokimyasal streslere karşı korur; çeşitli ilaçlara ve kimyasallara bağlanır, kamuflaj görevi görür. Melanin ayrıca enerji dönüştürücü olarak görev yapar ve yüksek antioksidan özellik gösterir. Melanin hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinin miktarında azalışa neden olarak organizmaya ekstrem çevre koşullarına karşı direnç kazandırmaktadır. Melanin elektron akseptörü olarak görev yaparak, peroxidaz gibi bazı enzimlere bağlanarak ya da suyun hidrolizine engel olarak ve bunun gibi birbirinden farklı pek çok mekanizmayı kullanarak radikal oluşumunu önlemektedir. Bu yüzden melanin çalışmanın temel bileşeninin oluşturmaktadır.

Literatür taramaları gösterdi ki; radiotrofik funguslarda UV-C'nin indüklediği reaktif oksijen türleri, bunların etkileri ve bunlara karşı hücrel savunma mekanizmaları ve reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinden sorumlu antioksidan sistemleri hakkında yeterince araştırma yapılmamıştır.

Bu amaçla radyotrofik bir fungus olan *Alternaria alternata*'ya inokülasyon işleminden hemen sonra, 9 günlük inkübasyondan sonra ve melanin sentez inhibitörü olan trisiklazol (Tc) fungusiti eklendikten sonra besiyeri içerisinde üretilmiş fungal kültürler belirli sürelerde UV-C'ye maruz bırakılarak enzim aktiviteleri ve glutatyon miktarları tesbit edilmiştir. Sonuçta melaninin antioksidan enzimler üzerine sinerjistik etkiye sahip olduğunu saptadık. Melaninin antioksidan özellikleri sayesinde hücrelerdeki süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon s-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerle beraber çalışarak antioksidan savunma sistemine katkıda bulunduğunu belirledik.

ANAHTAR KELİMELE: *Alternaria alternata*, melanin, UV-C radyasyon, trisiklazol, oksidatif stres, katalaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz, glutatyon S-transferaz.

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECT OF UV-C ON BIOCHEMICAL MARKERS OF THE RADIOTROPHIC FUNGUS *Alternaria alternata*

Hande TURANCI

Inonu University
Institute of Science
Department of Biology

106 + xii pages

2013

Supervisor: Prof. Dr. Dilek ASMA

Life on Earth exists within a continuous flow of radiation. As compared to the other living organisms fungi interact with radiation in a different way that allows them to withstand high levels of natural or man-made ultraviolet (UV-C) or ionized radiation. Ten years after 1986 Chernobyl disaster, it was discovered that black fungi could grow on the damaged reactor walls which were highly reactive and the research studies on these extreme organisms started. 37 species and 19 genera have been detected in the micobiota isolated from Chernobyl reactors and *Alternaria alternata*, that was used in our study, was among this micobiota. A comparison between species within Chernobyl micobiota has revealed that, melanin containing species dominated heavily contaminated sites.

Melanin is an enigmatic pigments found in all kingdoms of life has a variety of roles and functions. Melanin protects the organisms from low/ high temperatures, radiation, chemical stress (heavy metal and oxidizing agents) and biochemical stress; bonds with various drugs and chemicals and acts as a camouflage. Besides this, melanin functions as an energy transducer and shows high antioxidant properties. It leads to a decrease in the amount of reactive oxygen species in the cell and this gives resistance to the organisms under extreme environmental conditions. By acting as an electron acceptor, bonding with some enzymes such as peroxidase or prevent hydrolysis of water and using many different mechanisms, melanin inhibits radical formation. Because of all these melanin is the essential component in this research study.

Literature does not provide enough research on reactive oxygen species that are induced by UV-C, the effects of UV-C on radiotrophic fungi and its cellular defense mechanisms, and its antioxidant systems that are responsible for reactive oxygen species scavenging.

Within the study three groups of *A. alternata* have respectively been exposed to the procedures of an inoculation; nine days of incubation and an addition tricyclazole (Tc) fungicide which is a melanin synthesis inhibitor. After these fungal cultures have been exposed to certain doses of ultraviolet C and their enzymes activation and glutathion level has been observed. As a result of this study, we have determined that the production of melanin has a synergistic effect on antioxidant enzymes. Moreover, it has been found that due to its antioxidant activity in cells, melanin contributes to antioxidant defense system via collaborating with enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR).

KEYWORDS: *Alternaria alternata*, melanin, UV-C radiation, tricyclazole, oxidative stress, catalase, glutathione reductase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda benden her türlü yardım, öneri ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren, çalışmamın her aşamasında pratik ve teorik bilgilerinden faydalandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Dilek ASMA' ya;

Tez çalışmamda laboratuvarlarının imkanlarını kullanmamı sağlayan Prof. Dr. Sema ERDEMOĞLU' na, Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA' ya ve Prof. Dr. Hikmet GEÇKİL' e;

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan ve istatistiksel analizlerin yapılmasına katkıda bulunan Arş. Grv. Dr. Özlem DEMİRCİ' ye, radyasyon uygulaması için gerekli doz miktarlarının belirlenmesine yardımcı olan Öğrt. Grv. Süreyya NUR' a ;

Deneyisel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye, çalışma süresince hep yanımda olan değerli dostlarım Elif ÖZBEY ve Serkan KÖSTEKÇİ' ye;

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na;

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi Yüksek Lisans çalışmalarım süresince de beni destekleyen ve hep yanımda olan değerli aileme;

2011-121 no' lu proje ile bu araştırmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne;

EN İÇTEN DİLEKLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Ekstrem Çevre Koşulları.....	1
1.2. Ekstrem Çevre Koşullarına Karşı Mikroorganizma Adaptasyonları	3
1.3. Fungusların Genel Özellikleri.....	5
1.3.1. Fungi Imperfecti (Deuteromycetes)’nin Genel Özellikleri	6
1.3.2. <i>Alternaria alternata</i>	7
1.4. Melanin ve Melanin Pigmentinin Özellikleri.....	9
1.4.1. Melanin pigmentinin Kimyasal Yapısı	10
1.5. Radyotrofik Fungusların Habitatı	11
1.6. Melanin Tipleri ve Melanin Sentez Yolakları.....	15
1.6.1. Polyketid Sentaz Yolağı ve Trisiklazol.....	18
1.7. Melaninin Hücrelerdeki Yerleşimi.....	21
1.8. Ultraviyole Radyasyon.....	22
1.8.1. UV-C Radyasyon ile Melanize Fungus Habitatlarının İlişkisi.....	25
1.9. Melaninin reaktif oksijen türleri ve antioksidanlarla ilişkisi.....	27
1.10. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Oksidatif Stres	31
1.10.1. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Sınıflandırılması.....	32
1.10.1.1. Süperoksit Radikali	32
1.10.1.2. Hidrojen Peroksit	33

1.10.1.3. Hidroksil Radikali	34
1.10.1.4. Singlet (Tekil) Oksijen.....	35
1.10.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı.....	36
1.10.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri.....	38
1.11. Antioksidan Savunma Sistemleri	39
1.11.1. Enzimatik Antioksidanlar	41
1.11.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1)	41
1.11.1.2. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6).....	41
1.11.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9)	42
1.11.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR: EC 1.6.4.2)	42
1.11.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18).....	43
1.11.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	44
1.11.2.1. Glutasyon (GSH, γ -L-glutamil-L-sistein-glisin)	44
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	50
3.1. Araştırmada Kullanılan besiyerleri	50
3.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar	50
3.3. <i>Alternaria alternata</i> Stoklarının Hazırlanması ve Trisiklozol Eklenmesi	51
3.4. Fungusların UV-C radyasyona maruz bırakılması.....	51
3.5. Fungusların UV-C Uygulaması Sonrası Alınması: Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu	52
3.6. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması.....	53
3.7. Enzim Aktivite Tayini.....	53
3.7.1. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü.....	53
3.7.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü	54
3.7.3. Glutasyon S- Transferaz Aktivitesinin Ölçümü	54
3.7.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü.....	55
3.7.5. Glutasyon (GSH) Miktar Tayini.....	55

3.7.6. Total Protein Tayini	56
3.8. İstatiki Analizler.....	56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1. UV-C Radyasyona Maruz Bırakılan <i>Alternaria alternata</i> Fungusunun Antioksidan Enzimlerinin Aktiviteleri ve Glutasyon Miktarındaki Değişimler	57
4.1.1. Katalaz Aktivitesi.....	57
4.1.2. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi.....	63
4.1.3. Glutasyon S-Transferaz aktivitesi	68
4.1.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	73
4.1.5. Glutasyon (GSH) Miktar Tayini.....	78
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
6. KAYNAKLAR	90
EKLER	103
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil1.1.Fungusların sınıflandırılması	6
Şekil1.2. <i>Alternaria alternata</i> 'nın sınıflandırılması	7
Şekil1.3. 9 günlük <i>A.alternata</i> kültürü.....	8
Şekil 1.4. DHN melaninin kimyasal formülü.....	10
Şekil 1.5. Çernobil reaktörlerinin genel görüntüsü	12
Şekil 1.6. Çernobildeki 4 reaktörden alınan karışık kültürler	15
Şekil 1.7. Ömelanin sentez yolağı	16
Şekil 1.8. Feomelanin sentez yolağı	17
Şekil 1.9.A-Allomelanin sentez yolağı (DHN melanin sentezi)B-Tirozinazdan pyomelanin sentezi	17
Şekil 1.10. 1,8 DHN melanin üretim basamakları.....	19
Şekil 1.11. Fungusit olarak kullanılan trisiklazol polyketide sentez yolağıyla üretilen DHN melanin sentezini iki basamakta inhibe edebilir.....	20
Şekil 1.12. Elektromanyetik spektrum.....	24
Şekil 1.13. UV-C ışınlarının DNA üzerine etkisi.....	25
Şekil 1.14. Negev çölü merkezinde Nahal Nizana bölgesinden alınan örnekler	27
Şekil 1.15. Melaninin mikroorganizmalarda solunum zinciri sırasında elektron tutucu özelliğinin olası fonksiyonlarının şematik gösterimi.....	28
Şekil 1.16. Solunumsal patlama ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	37
Şekil 1.17. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların şeması	40
Şekil 1.18. Glutasyon redüktaz.....	43
Şekil 3.1. Fungusların UV-C' ye maruz bırakılması.....	52
Şekil 4.1. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan <i>A. alternata</i> 'nın katalaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	58
Şekil 4.2. <i>Alternaria alternata</i> 'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulaması sonucu CAT aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.3. Besiyerine trisiklazol eklenmiş <i>A. alternata</i> kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu CAT aktivite değişimlerinin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	60
Şekil 4.4. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubunun kontrol gruplarındaki katalaz aktivite değişimleri.....	61
Şekil 4.5. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulaması sonrasındaki katalaz aktivite değişimleri.....	62
Şekil 4.6. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan <i>A. alternata</i> 'nın glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	63
Şekil 4.7. <i>Alternaria alternata</i> 'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması	64
Şekil 4.8. Besiyerine trisiklazol eklenmiş <i>A. alternata</i> kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutasyon redüktaz aktivite değişimlerinin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	65
Şekil 4.9. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubu içerisindeki kontrol gruplarının GR aktivite değişimleri.....	66

Şekil 4.10. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulaması sonucu GR aktivite değişimleri.....	67
Şekil 4.11. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan <i>A. alternata</i> 'nın glutatyon S-transferaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	68
Şekil 4.12. <i>Alternaria alternata</i> 'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon S-transferaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.13. Besiyerine trisiklazol eklenmiş <i>A. alternata</i> kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon S-transferaz değişimlerinin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	70
Şekil 4.14. <i>A. alternata</i> 'nın kontrol gruplarının üç farklı uygulama için glutatyon S-transferaz aktivite değişimleri.	71
Şekil 4.15. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulanması sonucu glutatyon S-transferaz aktivite değişimleri.....	72
Şekil 4.16. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan <i>A. alternata</i> 'nın süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	73
Şekil 4.17. <i>Alternaria alternata</i> 'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması.....	74
Şekil 4.18. Besiyerine trisiklazol eklenmiş <i>A. alternata</i> kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması* ($p<0,05$).....	75
Şekil 4.19. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubu içerisindeki kontrol gruplarının süperoksit dismutaz aktivite değişimleri.....	76
Şekil 4.20. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulanması sonucu süperoksit dismutaz aktivite değişimleri.....	77
Şekil 4.21. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan <i>A. alternata</i> 'nın glutatyon miktarındaki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	78
Şekil 4.22. <i>Alternaria alternata</i> 'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon miktarındaki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması..	79
Şekil 4.23. Besiyerine trisiklazol eklenmiş <i>A. alternata</i> kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon miktarındaki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).....	80
Şekil 4.24. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubu içerisindeki kontrol gruplarının GSH miktarlarının değişimleri.....	81
Şekil 4.25. <i>Alternaria alternata</i> 'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulanması sonucu GSH miktarlarının değişimi.....	82
Şekil 4.26. Tc eklenmiş (solda) ve eklenmemiş (sağda) PDA' daki <i>A.alternata</i> ; Tc eklenmiş (solda) ve eklenmemiş (sağda) PDB' deki <i>A.alternata</i>	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Melanin patojenik fungusları çevresel stres faktörlerine karşı korumaktadır.....	9
Çizelge 1.2. Çernobil nükleer güç reaktörlerinin farklı radyasyon seviyelerinde kontamine olmuş 4 farklı reaktörden izole edilen mikrofungusların kontamine alanlarda bulunma sıklığı.....	14
Çizelge 1.3. Canlılarda radyasyon bozukluklarına yol açan olaylar.....	25
Çizelge 1.4. Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller.....	39
Çizelge 3.1. Uygulama süresine bağlı olarak uygulanan doz değerleri.....	54
Çizelge 1. İnokülasyon sonrası uygulama yapılan <i>Alternaria alternata</i> kültürlerinin her bir zaman diliminde UV-C' ye maruz kaldıktan sonraki enzim aktivite değişimleri.....	103
Çizelge 2. Her bir zaman diliminde UV-C' ye maruz kalan 9 günlük <i>Alternaria alternata</i> kültürlerinin enzim aktivite değişimleri.....	104
Çizelge 3. Tc eklendikten sonra uygulama yapılan <i>Alternaria alternata</i> kültürlerinin her bir zaman diliminde UV-C' ye maruz kaldıktan sonraki enzim aktivite değişimleri.....	105

SİMGELER VE KISALTMALAR

Molar(Mol/litre)	M
Milimolar	mM
Mikromolar	μ M
Celsius derece	$^{\circ}$ C
Gram	g
Mikrogram	μ g
Litre	L
Mililitre	ml
Mikrolitre	μ l
Ultraviyole C	UV-C
Watt	W
Mikrowatt	μ W
1,8-dihydroxynaphthalen	1,8 DHN
Optik Dansite	OD
Hidrojen İyon Konsantrasyonunun eksi logaritması	pH
Tricyclazole	Tc
Glutasyon	GSH
Glutasyon redüktaz	GSH-R
GlutasyonS-transferaz	GST
Reaktif Oksijen Türleri	ROT
Süperoksit dismutaz	SOD
Katalaz	CAT
Glutasyon peroksidaz	GSH-Px
Lipid hidroperoksitler	ROOH
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Süperoksit radikali	O ₂ ⁻
Hidroksil radikali	·OH
Reaktif oksijen türleri	ROT
Okside Glutasyon	GSSG
1-choloro,2-4 dinitro benzen	CDNB
5-5'-ditiyobis (2- nitrobenzoikasit)	DTNB
Etilendiamin tetra asetik asit	EDTA
Miliröntgen	mR

1. GİRİŞ

1.1. Ekstrem Çevre Koşulları

Mikroorganizmalar doğada çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadırlar. Bunlar ısı, basınç, elektrik akımı, ultrasonik dalgalar, ışık/radyasyon ve ozmotik şok gibi fiziksel stresler, asitler, tuzlar ve oksitleyiciler gibi kimyasal stresler, mikrobiyal metabolitler ve yarışmacı flora gibi biyolojik streslerdir. Canlılar bu koşullarda ya yaşamlarını yitirebilir ya da adaptasyon mekanizmalarına sahiplerse bu stresli çevrelerde yaşamlarını sürdürebilirler. Son yıllarda ekstrem olarak adlandırılan; yüksek veya düşük sıcaklık, pH, yüksek tuzluluk, yüksek basınç veya yüksek iyonize ve iyonize olmayan radyasyon koşullarında yaşayan birçok mikroorganizma çeşitliliği keşfedilmiştir. Bu canlılar, yaşabildiği çevresel parametreye bağlı olarak barofiller, halofiller, termofiller, asidofiller ve radiofiller olmak üzere farklı şekilde sınıflandırılmaktadırlar (Vigh vd., 1998).

Teknolojinin gelişmesi, bu gelişmeye bağlı olarak da enerji ihtiyacının artması gibi çeşitli nedenlerle doğadaki radyoaktif kirlilik her geçen gün artmaktadır. Radyoaktif maddelerin yaymış olduğu elektronların toprağa, havaya, suya, bitkilere, doğrudan ya da besin zinciri ile insan ve hayvanlara çok kolay ve hızlı bir şekilde aktarılması, radyoaktif kirlenmenin en tehlikeli özelliği olarak bilinmektedir. Radyoaktif kirleticiler özellikle insan, hayvan ve bitki sağlığını olumsuz yönde etkileyerek çevreyi ve ekolojik dengeyi bozmaktadır. Ayrıca canlıların yapısına giren fazla miktardaki elektronlar, canlı hücrelerdeki elektron dengesini bozmakta bunun sonucunda da hücreler, normal madde değişimi işlevlerini yerine getirememektedirler. Radyasyon tehlikesinin en korkunç yanı, ölümcül etkisinin çok uzun süre sonra ortaya çıkmasıdır. Bunun en çarpıcı örneklerinden biri 26 Nisan 1986'da meydana gelen Çernobil faciası olarak bilinmektedir (Dadachova vd., 2008).

Sadece günümüzde değil özellikle yeryüzünde canlılığın ortaya çıkmaya başladığı dönemlerde dünya çok daha yüksek miktarlardaki radyasyon seviyelerine maruz kalmaktaydı. Yüksek radyasyon miktarına karşın, erken yaşam formları canlılığını sürdürebilmek ve bu ekstrem çevre şartlarına rağmen varolabilmek için radyasyon direnç mekanizmasına sahip olmak zorundaydı. Bugün yeryüzündeki

mevcut radyasyon seviyesi canlılığın ortaya çıkmaya başladığı dönemdeki radyasyon miktarına kıyasla çok daha düşük olmasına rağmen bu mevcut radyasyon ortamında erken yaşam formları hala varolmayı başararak canlılığını devam ettirmektedir (Dadachova ve Casadevall, 2008). Günümüzde insanlar da dahil bütün canlılar hala belirli dozlarda radyasyona maruz kalmaktadır. Örneğin Amerika’da yaşayan bir kişi için yıllık radyasyon dozunun % 90’nı kozmik radyasyon ve radyoaktif kayalar gibi doğal kaynaklardan oluşmaktadır (Early ve Sodee, 1984) . Doğal kaynakların yanı sıra teknolojinin gelişimine de paralel olarak gün içinde maruz kaldığımız radyasyon miktarı ciddi boyutlara ulaşmıştır.

Çeşitli kaynaklar nedeniyle maruz kalınan bu iyonize ya da iyonize olmayan radyasyon sadece ekolojik dengeyi ve hücredeki madde alışverişini bozmakla kalmayıp; organizmada yüksek dozlarda oksidatif strese neden olmaktadır. Radyasyonun hücre içerisindeki moleküller ile etkileşimleri doğrudan veya dolaylı olarak ikiye ayrılmaktadır. Radyasyonun direkt etkisinde, radyasyon doğrudan biyolojik hedef moleküllerle etkileşime girip enerjisini direkt olarak transfer etmektedir. Dolaylı etkileşimde ise hücrelerin yüksek oranlarda su molekülü içermesinden dolayı suyun hidroliziyle açığa çıkan (hidroksil ve tekil oksijen) serbest radikaller diğer hücre molekülleriyle reaksiyona girer. Serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi sonucunda hücrelerde reaktif oksijen türleri-antioksidan sistem dengesinin bozulmasına ve hücrenin temel yapılarının oksidasyonuna neden olmaktadır. Hücrede oluşan oksidatif hasara bağlı olarak DNA’da; abazik alanlar, tek ve çift zincir kırıkları, baz modifikasyonları, karbonhidrat protein gibi organik molekül hasarları meydana gelebilmektedir (Kılınç vd., 2002).

Radyasyonun organizmaları öldürücü birçok etkisine karşın bazı ekstremofil canlılar yüksek radyasyon ile kontamine alanlarda yaşamını sürdürebilmektedir. Örneğin 20. yüzyılın en büyük radyoaktif faciaslarından biri olan Çernobil faciasından sonra yapılan araştırmalarda hasarlı reaktörlerde yüksek radyasyon dozlarına rağmen yaşayabilen 200’den fazla fungus türü izole edilmiştir (Zhdanova vd., 2000).

1.2. Ekstrem Çevre Koşullarına Karşı Mikroorganizma Adaptasyonları

Ekstremofil mikroorganizmalar bir stres faktörüne maruz kaldığında eğer genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, ilgili proteinleri üreterek korunmaya çalışır. Sentezlenen protein tek bir stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla stres faktörüne karşı da etkili olabilmektedir. Membranın protein içeriği, yağ asidi zincirinin uzunluğu veya yağ asitlerindeki cis-trans oranları, sıcak şoku proteinlerinin (HSP) sentezi, soğuk şok proteinlerinin (CSP) sentezi, melanin ya da karotenoid tipi pigmentlerin sentezindeki değişiklikler gibi birçok mekanizmayla sağlanmaktadır (Vigh vd., 1998). Örneğin soğuk şokuna karşı *E. coli*'de sitoplazmik membran, nükleik asitler ve ribozomlar duyarlıdır. Bunlar termosensör olarak görev yaparlar. Moleküler düzeyde inceleyecek olursak, bu olumsuz durumlarda hücrelerde düzenleyici şok proteinler sentezlenmektedir. Böylece bakteri, sentezlenen proteinler ile maruz kaldığı stresle baş edebilecek düzeye ulaşabilmektedir. Sıcaklık, biyolojik membranların kompozisyonu, organizasyonu ve fonksiyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Membranlar, kendi doymamış yağ asidi kompozisyonlarını çevresel sıcaklıklardaki değişimlere göre uyarlamaktadırlar (Phadtare vd., 1999).

Karotenoidler bakteri, alg, fungus ve bitkilerin büyük kısmında bulunmaktadır. Çok sayıda Antartik bakterinin membranlarında karotenoid tipi pigmentler içerdikleri bulunmuştur. Bu pigmentlerin membranda yerleşerek membran akışkanlığında tampon rolü oynadıkları ileri sürülmektedir. Çalışmalarda membrandaki stabilitenin polar, akışkanlığın ise non polar karotenoidlerle sağlandığı bulunmuştur. *Sphingobacterium antarcticus* ve *Micrococcus poseus* gibi Antartik bakterilerde karotenoid sentezinin üreme sıcaklığına bağlı olduğu, düşük sıcaklıklarda polar karotenoid sentezinin arttığı ve bu nedenle membran stabilitesinde artış meydana gelirken non polar karotenoid sentezinde düşme olduğu saptanmıştır (Jagannatham vd., 2000). Karotenoid pigmentinin aynı zamanda iyonize ve iyonize olmayan radyasyona karşı canlıları koruduğu da bilinmektedir.

Radyasyon serbest radikal oluşumunu tetikleyerek organizmada oksidatif stres oluşturmakta ve canlının biyomoleküllerinden genetik materyaline kadar pek çok bileşenine zarar vererek canlılığın sona ermesine doğru giden bir süreci başlatmaktadır. Yapılan çalışmalar fungusların radyasyona karşı verdikleri cevabın diğer organizmalardan farklı olduğunu göstermektedir. Genel olarak funguslar

özellikle de melaninli funguslar yüksek dozlardaki radyasyon seviyelerine oldukça dirençlidir (Saleh vd., 1988; Mirchink vd., 1972).

Melanin sayesinde oluştuğu düşünülen bu direnç pigmentin birbirinden farklı mekanizmalarla reaktif oksijen türlerinin miktarında azalışa neden olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Dadachova vd., 2008).

Günümüzde artan enerji ihtiyacına yanıt verebilmek için kurulan santraller ve bunların atıkları, nükleer silahlar ya da gün içinde maruz kaldığımız radyasyon sadece teknolojinin gelişmesi sonucu çağımızla ortaya çıkan bir sorun gibi görünse de aslında dünyanın oluşumu sırasında bile canlılar, bugün maruz kalınandan çok daha fazla miktarda radyasyona maruz kalmıştır. Kretase döneminde dünyanın kozmik radyasyona karşı mevcut kalkanının kaybıyla ve yeryüzündeki manyetik alan değişimi sonucunda birçok bitki ve hayvan türünün neslinin tükendiği bilinmektedir. Günümüze kadar geçen süre içerisinde bazı canlılar yok olurken bazılarının ise nasıl canlılığını devam ettirebildiği her zaman merak uyandırmış, bu konuda birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu geçmişten günümüze ulaşan birçok fungal fosilde melanin miktarının çok yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle melanize fungal sporların erken kretase döneminin sediment tabakasında oldukça yaygın olduğu saptanmıştır (Hulot ve Gallet, 2003). Buna ek olarak “Nemesis” adlı göktaşından yayıldığı düşünülen radyasyonun birçok canlının neslinin tükenmesine neden olduğu rapor edilmiş (Davis vd., 1985) ve kretase döneminin sonundaki bu kitlesel yok olmaya karşı melaninli fungusların canlılıklarını sürdürebildikleri saptanmıştır (Casadevall, 2005). Melaninli funguslar Antartika’daki ekstrem çevre koşullarına rağmen de yaşayabilmektedir (Robinson, 2001). Bu bilgilerin ışığında melaninin çok büyük ihtimalle seçilmiş atasal pigmentler olduğu düşünülmektedir. Çünkü geçmişten günümüze varlığını sürdürmüş bu pigment fungusların çok çeşitli çevre koşullarına karşı hayatta kalmasını sağlamaktadır (Dadachova vd., 2007).

Araştırmacılar uzun yıllardır ekstrem ortamlarda mikroorganizmaların nasıl yaşadıklarını ve aşırı stresli ortamlarda sonradan ortaya çıkan adaptasyon mekanizmalarını merak etmişlerdir. Melanin pigmenti bu bağlamda araştırmacılar için çok yeni ve dikkat çekici bir çalışma alanıdır. Çünkü doğanın dengesinin bozulmasıyla birlikte dünyamızda oluşan ve tüm canlıların maruz kaldığı ekstrem çevre şartlarına karşı çeşitli organizmaların geliştirdiği direnç mekanizmalarını

inceleyerek belki de insanoğluna bu koşullara karşı hayatta kalma yada daha sağlıklı bir yaşam sürme imkanı sağlanabilecektir.

Melaninin elektron akseptörü olarak görev yapması, peroxidaz gibi bazı enzimlere bağlanarak ya da suyun hidrolizine engel olarak birbirinden farklı pek çok mekanizmayla radikal oluşumunu önlemektedir (Shcherba vd., 2000).

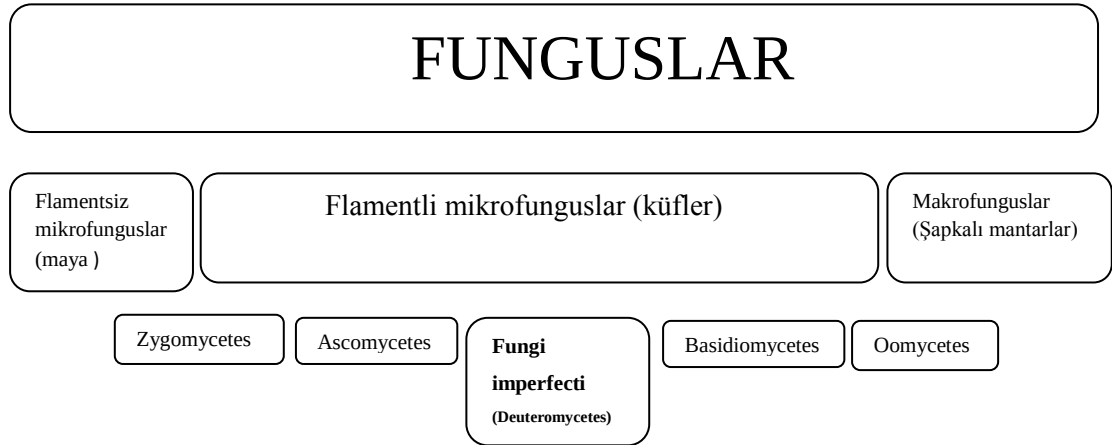
Biz de bu amaçla çalışmamızda yüksek miktarda melanin üreten radyotrofik bir fungus olan *Alternaria alternata*'ya farklı sürelerde UV-C uygulayarak radyasyon stresi altında antioksidan enzim ve glutatyon miktarındaki değişimlerini tespit ettik. Ayrıca trisiklazol (Tc) ile melanin üretimini inhibe ederek melaninin fungusun sahip olduğu antioksidan savunma sistemine olan katkılarını test etmeyi amaçladık.

1.3. Fungusların Genel Özellikleri

Doğada bilinen 250.000 tür fungus teşhis edilmesine karşın, bunların 150 türü insan ve hayvanlar için primer patojendir. Fungusların çoğunun tanısı morfolojik yapıya dayanmaktadır. Pek çoğu birbirine benzeyen küflerde, morfolojik tanı her zaman kolay değildir. Ancak, 18S RNA/DNA analizlerinin gelişimi ile fungusların tanımlanmasında büyük kolaylık sağlanmıştır (Mahuku ve Riascos, 2004; Akdağ, 2010).

Funguslar ökaryotik hücrelerdir ve ökaryot mikroorganizmalar içerisinde yer almaktadırlar. Fungusların sterolce zengin sitoplazma zarı yapısal olarak insan hücre zarına benzerlik göstermekte ve klorofil içermemeleri ile yüksek bitkilerden ayrılmaktadırlar. Fungus hücre duvarının yapısında bulunan kitin, fungusun bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmasını sağlar. Bakteri hücresindeki peptidoglikana karşılık, fungus hücre duvarında kitin (N-asetil glukozamin [NAG] birimlerinden meydana gelmiştir), mannanlar, glukonlar ve diğer kompleks yapılar mevcuttur (Mutlu vd., 1999). Fungal hücre duvarı genellikle polisakkarit, protein, lipid, polifosfat gibi bileşenlerden oluşmaktadır (Madigan vd., 1997). Fungusların hücre zarındaki iyon alışverişi ve enzim etkinliği gibi metabolizma işlevleri ortamın pH'sından etkilenmektedir. Fungusların optimal üreme pH'sı 5-6, optimal üreme ısıları ise 25-35 °C'dir.

Çalışmamızda kullanılan fungus, fungi imperfecti (Deuteromycetes) sınıfına dahil olup aşağıdaki gibi gösterilmektedir (Şekil 1.1).



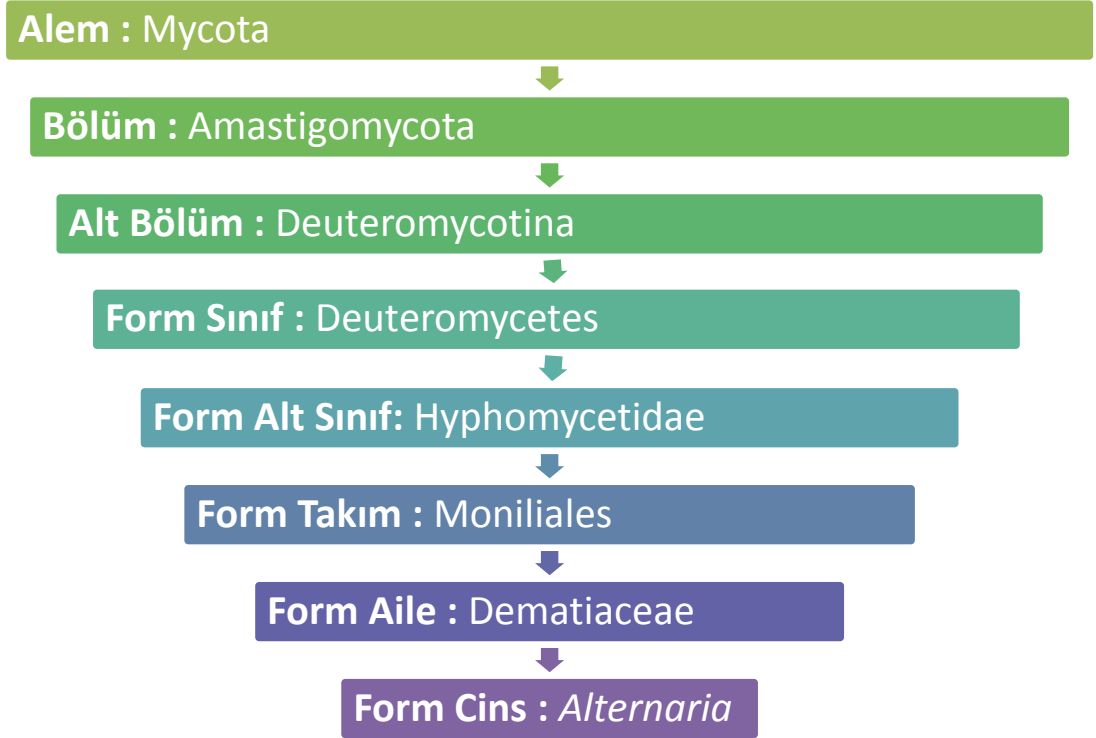
Şekil 1.1. Fungusların sınıflandırılması.

1.3.1. Fungi Imperfecti (Deuteromycetes)’nin Genel Özellikleri

Eşeyli üreme evreleri henüz bilinmeyen septalı miselyuma sahip ve konidyoforlar üzerinde konidyumlar meydana getirerek eşeysiz çoğalabilen funguslar bu sınıfta toplanmaktadır. Çoğunlukla konidyumlar aracılığıyla ürerler. Konidyosporlar renksiz veya değişik renklerde; küresel, oval, silindirik, iplik, sarmal, böbrek veya iğ şeklinde olabilmektedir. Büyüklük ve hücre sayısı bakımından da farklılık gösterebilirler. Konidyosporlar tek hücreli veya çok hücreli olabilirler. Spordan başka konidiyofor özellikleri de cins ve tür tanımlamalarında dikkate alınmaktadır. Bunlar konidyumları meydana getiren hücrelerin oluşum tarzı, renk, konidyumların yapısı ve yerleşim tarzı gibi karakterlerine bakılarak yapay bir sınıflandırma metoduyla sınıflandırılırlar. Konidyalar eşeysiz sporlardır ve çoğu zaman pigmentli olup kuraklığa dayanıklıdırlar. Konidyalar fungusların yeni habitatlara yayılışında görev yapmakta ve konidyalar olduğu zaman miselyumun beyaz rengi değişerek konidyaların siyah, mavi-yeşil, kırmızı, sarı veya kahverengi renkleri ortaya çıkmaktadır. Bu sporların varlığı misel tabakaya (miselyal mat) oldukça tozlu bir görünüm kazandırmaktadır (Çökmüş, 2010; Akdağ, 2010).

Funguslar ince uzun hif adı verilen flamentlerden oluşmaktadırlar. Hifler genellikle bir yüzey boyunca beraber büyüyerek miselyum denen ve mikroskopta kolayca görülebilen kompakt demetler oluştururlar. Tek tek bulunan hiflerin büyüdükçe dallanmalarından miselyumlar ortaya çıkar ve bu dallar bir araya gelerek

kompakt bir misel tabakası (mat) oluştururlar. Araştırmamıza konu olan *Alternaria alternata*'nın sistematiki şekil 1.2 de gösterildiği gibidir.

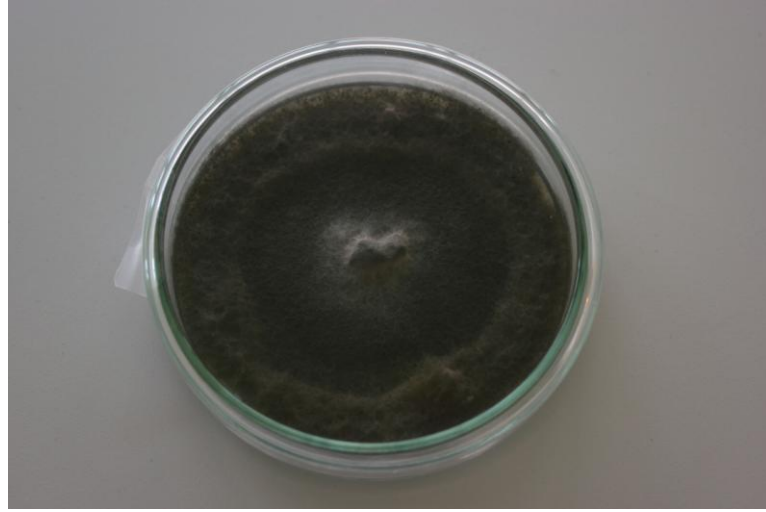


şekil 1.2. *Alternaria alternata* 'nın sınıflandırılması.

1.3.2. *Alternaria alternata*

Alternaria cinsinin kapsadığı türler her yerde bulunan, dünya genelinde çok fazla ekonomik kayıplara neden olan 50 saprofitik ya da bitki patojeni türleriyle iyi bilinen bir genustur. En yaygın türleri ise *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria cucumerina*, *Alternaria dendritica* ve *Alternaria solani*'dir (Frost 1988). *Alternaria alternata* nemli yerlerde ve özellikle organik maddeler üzerinde gelişmektedir. Bitkilerde hastalık yapan bu fungus ekonomik önemi olan birçok meyve ve sebzede çürümeye neden olmaktadır (Logriceo vd., 1990; Mitakakis, 1997; Beyoğlu, 2006). Sporları hava yolu ile yayılır (Hjelmroos, 1993). Kolonileri yaygın gri/koyu siyahımsı, kahverengi veya siyah, miselyumları kısmen yüzeysel, hifler kültür suresine bağlı olarak renksiz, zeytinimsi kahverengi veya kahverengidir (Ellis, 1971).

Alternaria kolonileri genelde koyu kahve veya koyu yeşil yapıdadır ve bu yapıyı saran ince beyaz bir halka bulunur. Mikroskopik olarak incelendiğinde ise koyu renkli ve septalı olan hifleri dikkat çekmektedir. Konidiyoforları septalı, koyu renkli basit ya da demet oluşturmuş yapıdadır. Bir ucu yumru olan sopaya benzer. Genel spor şekli eliptiktir. İnce duvarlı ve bazı türlerde tepe kısmı konik yapıda olup enine ve boyuna septalara sahiptir (Simmons, 1967; Akdağ, 2010). Yaklaşık 50 tür içeren *Alternaria* cinsi üyeleri türler arasında değişiklik göstermektedir. Boyutları 8-40x 15-200 (500) µm'dir (Frost, 1988; Beyoğlu, 2006).



Şekil 1.3. 9 günlük *A.alternata* kültürü.

Alternaria alternata 'nın çeşitli stres faktörlerine özellikle de radyasyona karşı melanin sayesinde dirençli olduğu birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Melanin pigmenti stres faktörlerine direnç mekanizmasında birincil rol oynamakta hatta bu sayede fungus Çernobil reaktörlerinde yüksek radyoaktif ışınımına rağmen hayatta kalabilmektedir. Bu nedenle melanin üretimi ile fonksiyonları çok sayıda araştırmacı ve mikologlar tarafından oldukça yeni ve popüler bir konu haline gelmiştir (Cunha vd., 2010). Birçok araştırmacı tarafından farklı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar sonucu melaninin çeşitli stres faktörlerine karşı koruyucu etkisi ile ilgili veriler aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Çizelge 1.1).

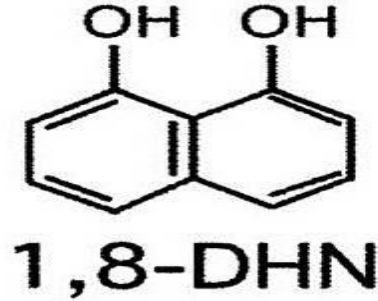
<u>Stres faktörü</u>	<u>Organizma</u>
Enzimatik degradasyon	<i>Cryptococcus neoformans</i> (Rosas ve Casadevall, 2001) <i>Aspergillus spp.</i> (Bloomfield ve Alexander, 1967; Bull, 1970; Kuo ve Alexander, 1967) <i>Exophiala dermatitidis</i> (Dixon ve Polak, 1991)
Radyasyon (UV, solar, gama)	<i>Alternaria alternata</i> (Kane vd., 1981; Mironenko vd., 2000) <i>C. neoformans</i> (Wang ve Casadevall, 1994; Rosas ve Casadevall, 1997) <i>Sporothrix schenckii</i> (Romero vd., 2000) <i>E. dermatitidis</i> (Dixon vd., 1991) <i>Cladosporium spp.</i> (Saleh vd., 1988; Zhdanova vd., 1973) <i>Pneumocystis spp.</i> (Icenhour, 2006)
Ağır metaller	<i>C. neoformans</i> (Garcia-Rivera ve Casadevall, 2001)
Termotolerans (sıcak ve soğuk)	<i>C. neoformans</i> (Wang ve Casadevall, 1994; Yang vd., 2002)

Çizelge 1.1. Melanin patojenik fungusları çevresel stres faktörlerine karşı korumaktadır (Nosanchuk ve Casadevall, 2006).

1.4. Melanin ve Melanin Pigmentinin Özellikleri

Melaninin omurgalılar, böcekler, bitkiler ve mikrobiyal organizmalarda önemli koruyucu rolleri bulunmaktadır. Melaninler kamuflaj görevi görerek organizmayı çevresel predatörlere karşı, sıcak-soğuk ve kuraklık stresine karşı, metal iyonlarına gösterdiği yüksek bağlanma kapasitesi sayesinde de ağır metallere karşı korumakta ayrıca sexual rol oynamaktadır (Castanet ve Ortonne, 1997). Ortaklaşmamış elektronların varlığından dolayı tipik elektron spin rezonans sinyalleri üreten serbest radikallere karşı stabiliteye sahiptir, ayrıca UV ve solar radyasyon gibi fiziksel ajanlara karşı fotoprotektör olarak koruyucu görev üstlenmektedir (Dadachova vd., 2007; Geng vd., 2008). Melaninin bu fonksiyonları

mikroorganizmaların ekstrem çevre koşullarına karşı hayatta kalma şanslarını arttırmaktadır (Nosanchuk ve Casadevall, 2003; Eisenman vd., 2007).



Şekil 1.4. DHN melaninin kimyasal formülü.

1.4.1. Melanin Pigmentinin Kimyasal Yapısı

Melanin Yunanca’da siyah anlamına gelen “melanos” kelimesinden köken almaktadır (Ruth vd., 2007). Melaninler hidrofobik yapıda, yüksek molekül ağırlıklı, negatif yüklü, suda veya organik sıvılarda çözünmeyen, aside dirençli, çeşitli biyolojik fonksiyonları olan, paramagnetik biyopolimerler olarak bilinen hidrofobik pigmentlerdir (Nosanchuk ve Casadevall, 2006).

Melaninlerin yapısına ilişkin kısıtlı bilgi bulunmakla birlikte polimerize fenolik ve/veya indolik bileşenlerden oluştuğu düşünülmektedir. Melaninlerin yapısının tanımlanmasındaki sorun, uygulanmakta olan biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemlerin, bu kompleks polimerlerin kimyasal bileşimini ortaya koyamamasından kaynaklanmaktadır. Ancak polimeri oluşturan monomerlerin tanımlanması ve melaninlerin özelliklerine ilişkin önemli bilgiler, çeşitli analitik yöntemlerle sağlanabilmektedir. Elektron paramagnetik rezonans (EPR) spektroskopisi özelliklerine göre melanin tanımlanabilmekte ve kısmi kimyasal degradasyonunu takiben yüksek performanslı sıvı kromatografi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) mikroanalizinin uygulanması ile melanin tipleri belirlenebilmektedir (Enochs vd., 2002; Alp, 2010).

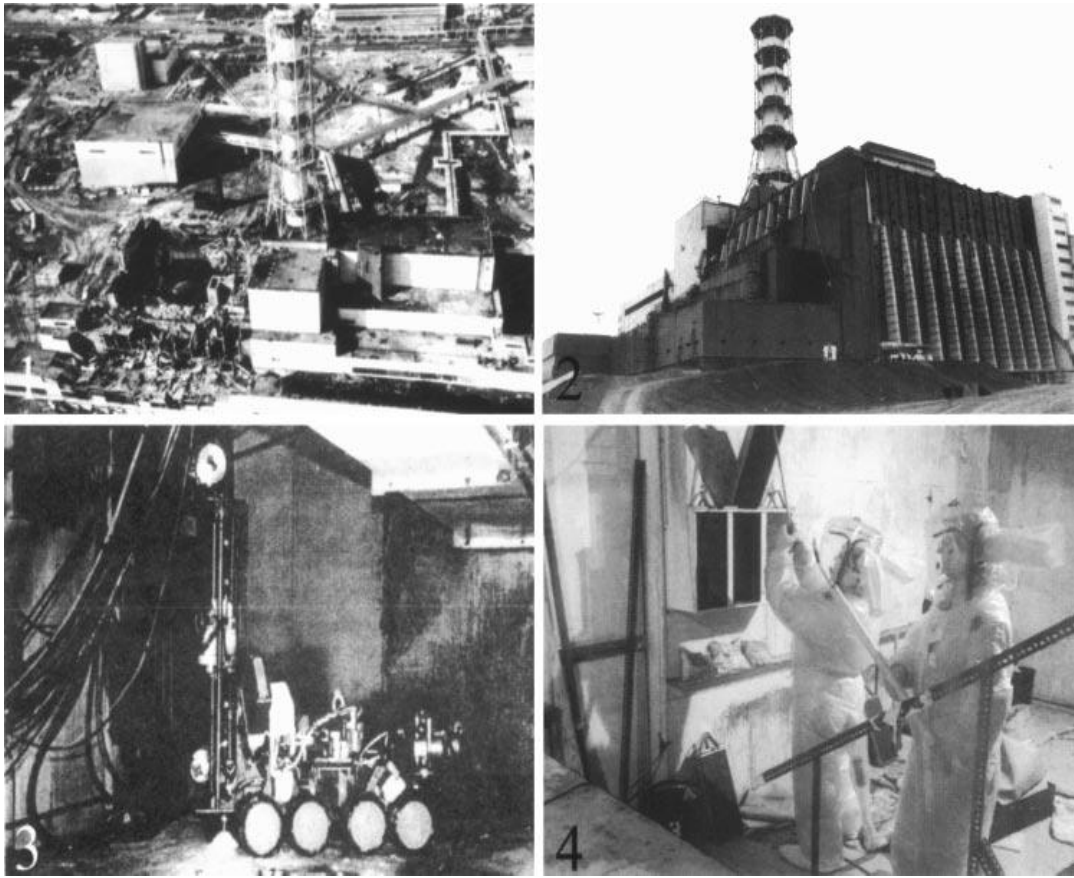
1.5. Radyotrofik Fungusların Habitatu

1986 yılında meydana gelen 20. yüzyılın ilk büyük nükleer kazası Çernobil felaketinden 15 yıl sonra bilim insanları “Çernobil Atomik Enerji İstasyonu” ve çevresinde araştırmalar yapmaya başlamıştır. Bugün bile oldukça radyoaktif olan Çernobil reaktörüne gönderilen bir robot, hasar görmüş reaktörün duvarında yaşayan, siyah melanince zengin fungus örnekleri ile dönmüştür. Bu durumla ilgilenen Casadevall ve arkadaşları çeşitli funguslar üzerinde çalışmalar yaparak melanin içeren iki türün (*Cryptococcus neoformans* ve *Wangiella dermatitidis*) standart iyonize radyasyona maruz kaldıklarında belirgin ölçüde hızlı bir şekilde ürediklerini göstermişlerdir. Araştırmada çalışan diğer bir araştırmacı olan Ekaterina Dadachova “Nasıl ki yeşil bitkilerdeki klorofil güneş ışığını kullanarak kimyasal enerji üretiyorsa, melanin de elektromanyetik spektrumun diğer bir kısmını kullanarak bunu içeren funguslara enerji sağlamaktadır” demiştir. Radyasyon melanin ile etkileşime girerek elektron yapısını değiştirmektedir. Bunun, radyasyonun tutulmasında ve besin yapımında kullanılan farklı bir formdaki enerjiye dönüştürülmesinde gerekli olan basamak olduğuna inanılmaktadır. Daha sonra da yapılan araştırmalar sonucu reaktörler ve çevresinde yüksek radyasyon seviyesine rağmen canlılığını devam ettirebilen 200 tür, 98 cins fungus izole edilmiştir (Zhdanova vd., 2004).

Melaninli fungusların habitatu, çok yüksek radyasyon seviyelerinin olduğu çevrelerdir. İnsan aktivitelerinden kaynaklanan yüksek radyasyonlu çevreler arasında iki bölge dikkat çekmektedir ve bu bölgelerde melaninli fungus türleri kolonize olmuştur. Birincisi Çernobil’de yüksek dozda radyasyona maruz kalan ve zarar görmüş reaktör duvarı, ikincisi ise soğuk su havuz reaktörleri olarak adlandırılan bölgedir. Bu alanlarda radyasyon seviyeleri öldürücü insan dozu seviyesinden 10.000 kez daha fazladır (Zhdanova vd., 2000) ve buna rağmen çok sayıda gram negatif ve gram pozitif basil ve kok bakterileri ile fungal türler kolonize olmuştur (Dadachova ve Casadevall, 2008). 2007’de keşfedilen bu mikroorganizmalarla daha sonra bilim insanları tarafından çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Bu alanlarda yaşayabilen mikroorganizmaların böylesine yüksek düzeyde radyasyonlu habitatlarda nasıl yaşayabildikleri konusu bilim insanlarınca ilgi odağı olmuştur. Bu ekstrem çevre koşullarına meydan okumanın moleküler ve hücresel boyutta incelenmesi sonucunda,

dayanıklılığın hücre duvarlarında lokalize olan melanin üretimi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Dadachova vd., 2007).

Çernobil kazası sonrası nükleer reaktörler içerisindeki mikrobiyota fungal melanogenesis ve bu fungal organizmaların ekstrem çevre koşullarında hayatta kalmasıyla ilgili çarpıcı ilişkileri göstermektedir (Mironenko et al 2000). Kazadan beri çernobil etrafındaki toprakta siyah fungusların yayılımı çarpıcı bir biçimde artmıştır. *Alternaria alternata*'nın da bulunduğu 37'nin üzerinde fungus türü hasarlı reaktörlerde tanımlanmıştır (Zhdanova vd., 2000).



Şekil 1.5. Çernobil reaktörlerinin genel görüntüsü. 1; Nükleer güç santrali: patlamadan hemen sonra 4 birimin helikopterden görüntüsü. 2;Yeniden onarılmış ve korumaya alınmış alanın dıştan görünümü 10 yıl sonra (1996). 3; Santralin iç kısmının genel bir görüntüsü. Sağ taraftaki duvarda fungal büyüme görünmekte. 4; İnceleme ve örnek alma işlemi (Zhdanova vd., 2000).

Nükleer güç santralinden tanımlanan funguslar radyoaktif kontaminasyon seviyesine ve yayılım sıklığına göre üç gruba ayrılmıştır (Çizelge1.2.);

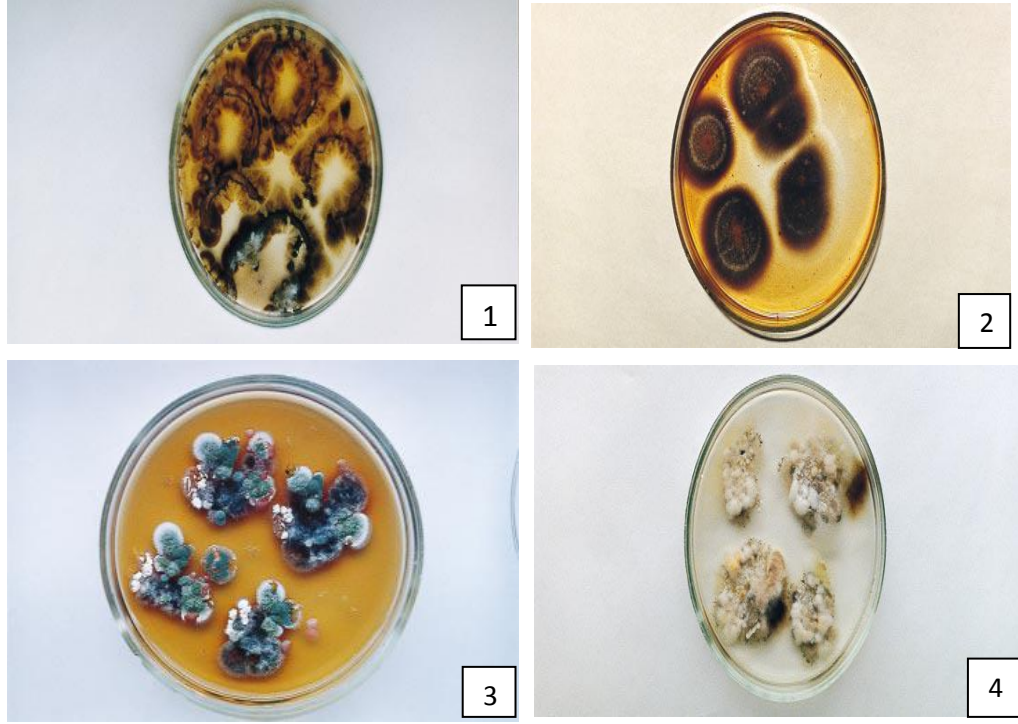
(1) Bütün radyoaktif seviyeler ile kontamine olmuş alanlarda sıklıkla bulunan funguslar: *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium* sp., *Doratomyces stemonitis*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, ve *Stachybotrys chartarum* ;

(2) Sadece çok yüksek radyasyon ile kontamine olmuş alandan izole edilen funguslar (40 ± 220 mR h⁻¹): *Alternaria alternata*, *Aspergillus avus*, *A. fresenii*, *A. ochraceus*, *A. ustus*, *Beauveria bassiana*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium citrinum*, ve *Phialophora melinii*

(3) Düşük radyasyon ile kontamine olmuş alandan izole edilen funguslar (1.5 ± 25 mR h⁻¹): *Chrysosporium pannorum*, *Fusarium merismoides*, *Geotrichum* sp., *Mucor plumbeus*, orange sterile mycelium, *Penicillium chrysogenum*, *P. hordei*, *P. ingelheimense*, *Sydowia polyspora* ve *Ulocladium botrytis* (Zhdanova vd., 2000).

	Frekans (%)	
	1.5-25 mR h ⁻¹	40-220 mR h ⁻¹
<i>Acremonium strictum</i>	33,5	22,2
<i>Alternaria alternata</i>	40,2	44,4
<i>Aspergillus avus</i>	-	11,1
<i>A. fumigatus</i>	6,7	11,1
<i>A. niger</i>	13,4	22,2
<i>A. ochraceus</i>	-	11,1
<i>A. ustus</i>	-	11,1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	20,1	44,4
<i>A. versicolor</i>	26,8	55,5
<i>Beauveria bassiana</i>	-	11,1
<i>Botrytis cinerea</i>	13,4	11,1
<i>Chaetomium globosum</i>	20,1	22,2
<i>Chrysosporium pannorum</i>	6,7	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	26,8	11,1
<i>C. herbarum</i>	20,1	44,4
<i>C. sphaerospermum</i>	73,7	99,9
<i>Cladosporium sp.</i>	6,7	11,1
<i>Doratomyces stemonitis</i>	6,7	11,1
<i>Fusarium merismoides</i>	6,7	-
<i>F. oxysporum</i>	6,7	11,1
<i>F. solani</i>	13,4	11,1
<i>Geotrichum candidum</i>	-	11,1
<i>Geotrichum sp.</i>	6,7	-
<i>Mucor plumbeus</i>	6,7	-
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	11,1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,7	-
<i>P. citrinum</i>	-	11,1
<i>P. hirsutum</i>	6,7	88,8
<i>P. hordei</i>	6,7	-
<i>P. ingelheimense</i>	-	-
<i>Phialophora melinii</i>	-	22,2
<i>Stachybotrys chartarum</i>	6,7	11,1
<i>Sydowia polyspora</i> (as the <i>Dothichiza</i> <i>anamorph</i>)	6,7	-
<i>Ulocladium botrytis</i>	6,7	-
Turuncu steril miseller (orange sterile mycelium)	13,4	-
Beyaz steril miseller (white sterile mycelium)	6,7	22,2

Çizelge 1.2. Çernobil nükleer güç reaktörlerinin farklı radyasyon seviyelerinde kontamine olmuş 4 farklı reaktöründen izole edilen mikrofungusların kontamine alanlarda bulunma sıklığı.



Şekil 1.6. Çernobil’deki 4 reaktörden alınan karışık kültürler (Zhdanova vd., 2000).

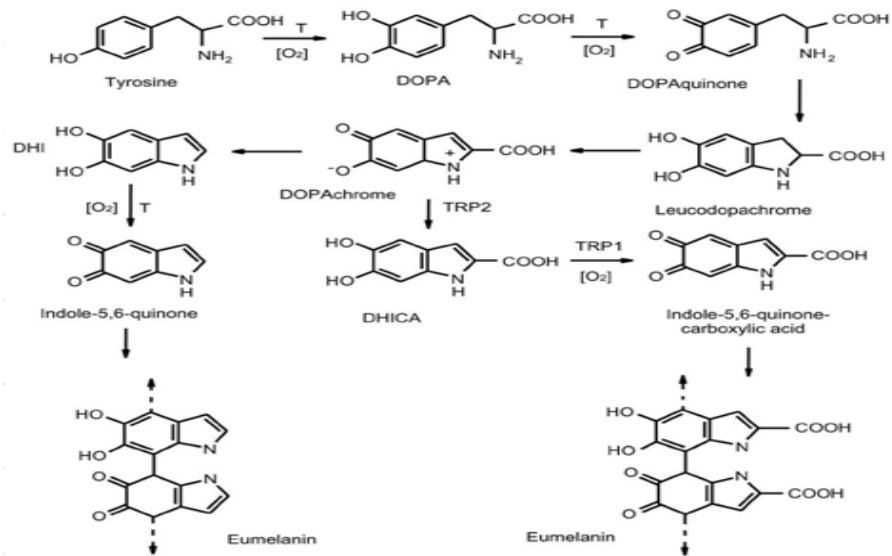
1. İncelenen lokasyonlarda sıklıkla bulunan funguslar: *Acremonium strictum* ve *Aureobasidium pullulans*.
2. Dördüncü reaktörden alınan kültür: *Sydowia polyspora*.
3. Kablo üzerinden izole edilen kültürler: *Penicillium chrysogenum*, *Stachybotrys chartarum*, *Chrysosporium pannorum*.
4. Düşük radyasyonla kontamine olmuş alandan izole edilmiş funguslar: *Penicillium hirsutum*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Alternaria alternata*.

1.6. Melanin Tipleri ve Melanin Sentez Yolakları

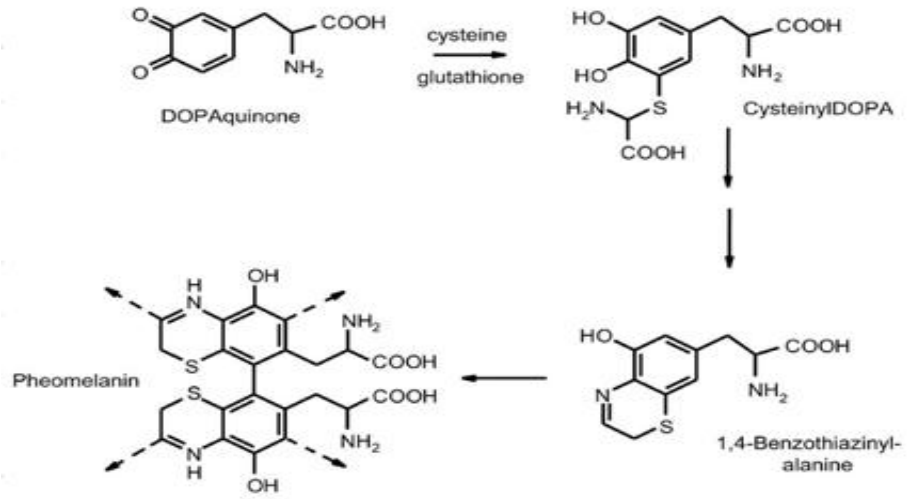
Melaninler, bütün biyolojik alemlerin içerisindeki türlerde bulunan multifonksiyonel pigmentlerdir (Hill, 1992). Organizmalarda bulunan melanin tür ve sentez yolakları açısından farklılık göstermektedir. Melanin prokaryotlardan ökaryotlara, bakterilerden insana kadar görülebilen canlılar arasında ortak olarak bulunan bir pigmenttir. Ama organizmalarda bulunan melanin tipleri ve sentez yolları birbirinden farklıdır.

Melaninler genellikle siyah veya kahverengi pigmentler olarak bilinse de diğer renkler de oluşturabilmektedir. L-DOPA’dan (3,4-dihidroksifenilalanin) köken alan pigmentler siyah veya kahverengidir ve ömelanin olarak tanımlanırlar. Sarı veya kırmızımsı melaninler, sistein ile L-DOPA içerirler ve feomelaninler olarak adlandırılırlar. Homojentisik asitten tirozinaz aracılığıyla sentezlenen kahverengimsi

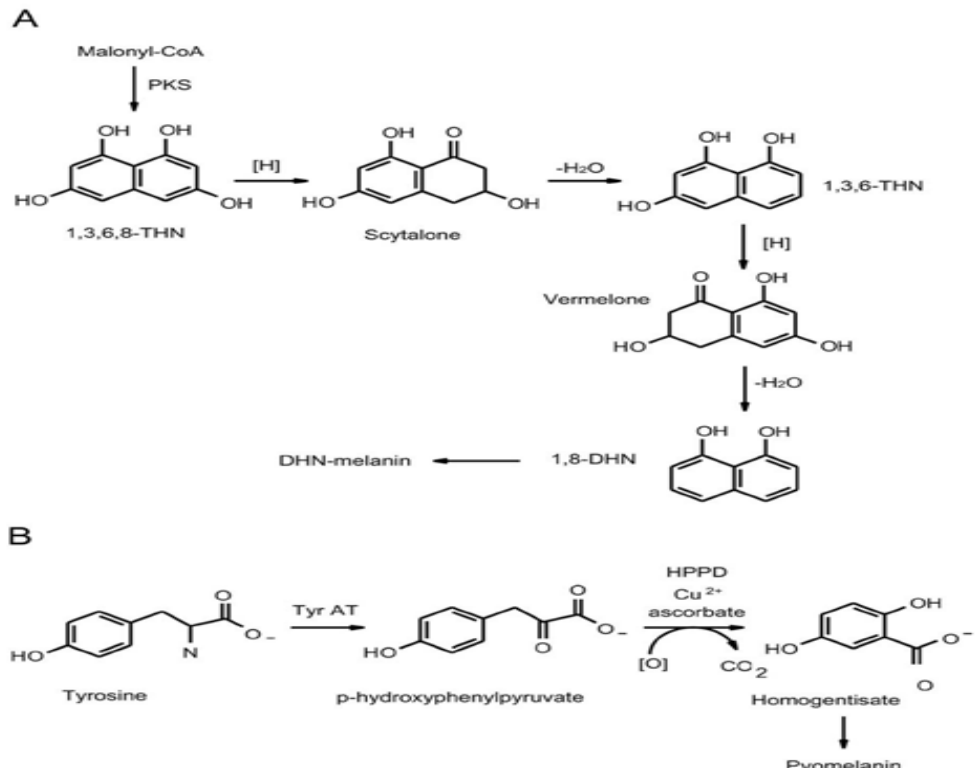
melaninler piyomelaninler olarak tanımlanır. Allomelaninler, di-hidroksinaftalenin di-(DHN) veya tetrahidroksinaftalenin (DHN) oksidasyonu ve polimerizasyonu ile ortaya çıkmış, melanin polimerlerinin en az incelenmiş ve bilinen en heterojen grubudur. Flaviolin üzerinden DHN melaninlerinin çeşitli renklerdeki polimerleri, homogentisic asit (pyomelaninler), γ -glutaminyl-4-hydroxybenzene, 4-hydroxyphenylacetic asit, katekollerin çeşitli renklerdeki polymerlerinin üretimi pentaketid yolak aracılığıyla sağlanmaktadır (Gibello vd., 1995; Kotob vd., 1995; Espin vd., 1999; Funa vd., 1999; Jacobson, 2000). Asetattan poliketid sentaz yolağı aracılığıyla sentezlenen allomelaninler ise genellikle siyah veya kahverengidir ve dihidroksinaftalen (DHN) melaninler olarak da bilinirler (Alp,2000). Funguslarda bulunan en önemli melanin tipleri 1,8-dihidroksinaftalen (DHN-melanin) ve DOPA-melanindir. Bazı funguslar (ör: *Cryptococcus neoformans*) ekosistemde varolan DOPA'nın oksidatif çapraz bağlarından melanin üretmektedir (Butler ve Day, 1998). Ama ekonomik olarak önemli ve geniş yayılım gösteren *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Colletotrichum*, *Gaeumannomyces*, *Magnaporthe* ve *Verticillium* gibi fungus türlerinin de içinde bulunduğu bitki patojenleri 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)'den melanin sentezlerler (Kubo ve Furusawa 1991; Tanabe vd., 1995). İnsan deri mukozlarına neden olan birçok fungus (ör.*Exophiala dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*) da DHN melanin üretmektedir (Dixon vd., 1991; Nosanchuk vd., 1998; Schnitzler vd., 1999).



Şekil 1.7. Ömelanin sentez yolağı (Plonka ve Grabacka, 2006).



Şekil 1.8. Feomelanin sentez yolağı (Plonka ve Grabacka, 2006).



Şekil 1.9. A- Allomelanin sentez yolağı (DHN melanin sentezi) B- Tirozinazdan pyomelanin sentezi (Plonka ve Grabacka, 2006).

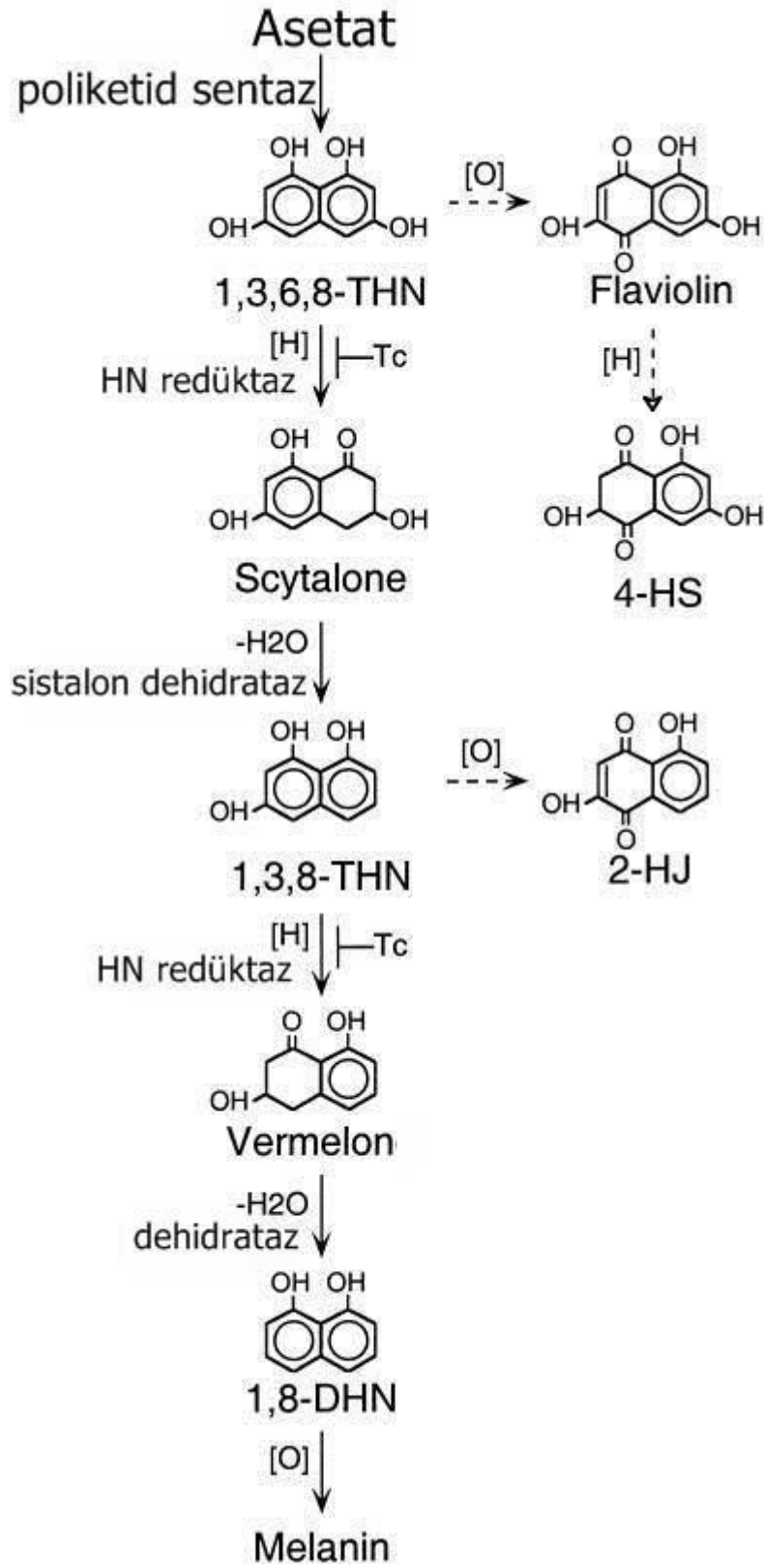
Memelilerde melanin sentezi, tirozinaz tarafından katalize edilmekte ve melanin sentez yolağında tirozin veya dihidroksifenilalanin kullanılmaktadır. Mikroorganizmalarda ise melanin, fenoloksidazlar (tirozinaz, lakkaz, katekolaz) ve/veya poliketid sentaz yolağıyla sentezlenmektedir. Tirozinazların aksine lakkazlar tirozini 3,4-dihidroksifenilalanine (L-dopa) dönüştüremez (Nosanchuk ve Casadevall, 2003). Lakkaz ise fenolik substratlardan melanin sentezini katalizlemektedir (Messerschmidt ve Huber,1990).

DHN melanin üreten funguslar bu sekonder metaboliti polyketid sentez yolağıyla yaparlar. Funguslarda bu yolla sentezlenen melaninin organizma içerisindeki konumu çok fazla bilinmemesine karşın 1,8 DHN'nin sitoplazma içerisinde sentezlendiği ve ardından hücre duvarı içerisine, oradan da lakkaz tarafından katalizlenen son polimerizasyon basamağı sonrasında ekstraselüler matrikse ihraç edildiği düşünülmektedir (Bell ve Wheeler, 1986; Butler ve Day,1998).

1.6.1. Polyketid Sentaz Yolağı ve Trisiklazol

Fungusların ticari açıdan önemli birçok tarım ürününe zarar verdiğinin anlaşılmasından beri funguslarda pigment biyosentezi ile ilgili birçok çalışma kahverengi ve siyah funguslar üzerine yoğunlaşmıştır. Bilinen bazı insan ve bitki patojenleri polyketid yolağıyla öncüllerden melanin sentezlemektedir. Bunlardan bazıları: *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium carionii*, *Exophiala jeikei*, *Fonsecaea compacta*, *F. pedrosoi*, *Hendersonulobuloidii*, *Phaeoanellomyces wernickii*, *Phialophorarichardsiae*, *P. verrucosa*, *Wangiella dermatitidis* ve *Xylohyphabantiana*'dır (Taylor vd., 1987; Wheeler, 1983; Wheeler ve Bell, 1988).

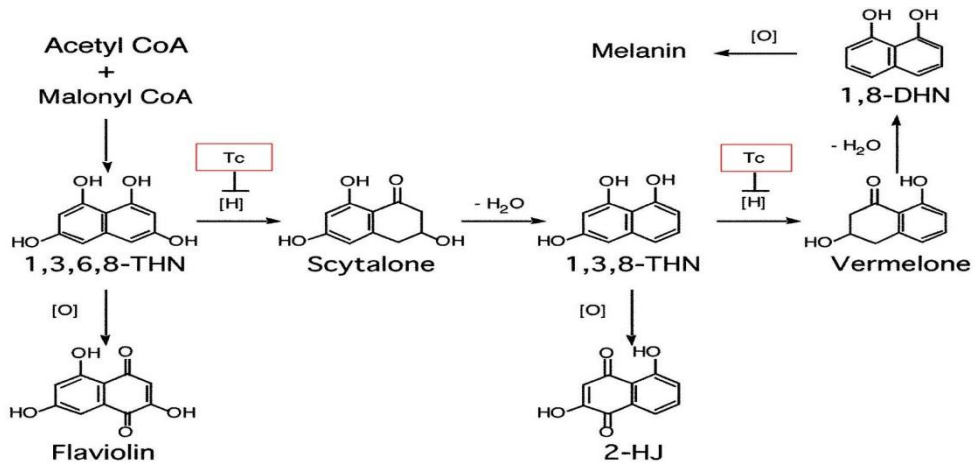
1,8-DHN melanin sentezinde ilk basamakta öncül madde olarak kullanılan asetattan 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen (tetrahydroxynaphthalene) (1,3,6,8-THN) sentezlenmektedir. Ardından sistalon'a (syctalona) indirgenir ve syctalonun dehidrasyonu sonucu da 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN) oluşmaktadır. 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN) redüksiyon ve dehidrasyon basamakları sonrası 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN) dönüşmektedir. Sonuç olarak da DHN melaninin polimerizasyonu ile 1,8-DHN melanin oluşumu tamamlanmaktadır (Tsai vd., 1999).



Şekil 1.10. 1,8 DHN melanin üretim basamakları (Tsai vd., 1999).

Melanin, patojen mikroorganizmaların virölansında artışa neden olarak bu organizmalarla mücadeleyi güçleştirmektedir. UV-C ve gama radyasyon gibi sterilizasyon için kullanılan ışınların bile melaninli fungusları yok etmede yetersiz kalması, insan patojeni olan pek çok fungusun gitgide antifungal ilaç duyarlılığının azalması sonucu fungusa direçlilik sağlayan melanin pigmentini inhibe ederek mücadele etme yöntemleri önem kazanmıştır. Sentetik melanin ile inkübe edilmiş amfoterisin B ve sentetik melanin ile inkübe edilmiş kaspofungin ile yapılan zamana bağlı letalite çalışmasında *C.neoformans* için belirlenen sağ kalım oranları, melanin ile işlem görmemiş amfoterisin B ve kaspofungin uygulandığında belirlenen sağ kalım oranlarına göre belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur (Nosanchuk ve Casadevall, 2006; Van vd., 2002). Özellikle uzak doğuda önemli bir besin kaynağı olarak prinç bitkileri kullanılmaktadır. Bu bitkilerde ekonomik kayıplara sebebiyet veren “rice blast hastalığı” etkeni *Magnaporthe grisea*’ya karşı fungusit olarak kullanılan isoprothiolane ve kitazin P (IBP) (phosphatidy choline biyosentezini inhibe eden bir organofosfata (Ou, 1985; Katagiri ve Uesugi, 1977) alternatif olarak trisiklazol (Tricyclazole) kullanılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Zhang vd., 2009).

DHN melanin sentezi inhibitörü trisiklazol (Tc) sentez sırasındaki iki redüktaz basamağını da inhibe eden bir agrokimyasaldır (Howard ve Valent, 1996).



Şekil 1.11. Fungusit olarak kullanılan trisiklazol (Tc) polyketide sentez yolağı vasıtasıyla üretilen DHN melanin sentezini iki basamakta inhibe edebilir (Howard ve Valent, 1996).

Trisiklozolün melanin üretimini inhibe etmesi sonucu oluşan turuncu kırmızı ve kahverengi birkaç pigment kimyasal olarak henüz tam anlamıyla belirlenememiştir ama trisiklozol varlığında üretilen fungusta DHN-melaninden salınan 2 -hydroxijuglon, flaviolin gibi bileşiklerin oksidasyon ürünlerinin artış gösterdiği belirtilmektedir (Butler vd., 2009; Okamoto vd., 2001).

1.7. Melaninin Hücrelerdeki Yerleşimi

Melaninin hücrelerdeki yerleşimi organizmalar arası farklılık göstermektedir. Memelilerde melanin, özel vakuoller olan melanozomlarda yer almaktadır (Nosanchuk ve Casadevall, 2003). Mikrobiyal melaninler ise hücre içinde veya hücre dışında bulunabilmektedir. *Alternaria* spp.'de DHN melanin sitoplazmada sentezlenmekte ve hücre duvarına taşınarak burada lakkaz tarafından polimerize edilmektedir (Thomma, 2003). Mikrobiyal melanin en fazla hücre duvarının dış tabakasında bulunmaktadır. Aynı zamanda *C. neoformans*, *Cochliobolus* sp. ve *Alternaria* sp. gibi türlerde ise melanin, konidyalarda da bol miktarda sentezlenmektedir (Takano vd., 1997).

Hücre duvarında bulunan melanin, aynı boyutta, çok sayıda farklı granüllerden oluşmakta ve bu granüler yapı çeşitli bileşiklere bağlanmaya olanak tanıyan yüzeyin geniş olmasını sağlamaktadır (Nosanchuk ve Casadeval, 2003). Bitkilerin patojenik fungal parazitleri, geliştirdikleri melanize konidyalara veya appresorya adı verilen özelleşmiş organelleri aracılığıyla, bitki yüzeylerine adezyonunu ve konakçı dokuları içine hiflerin penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır (Howard ve Valent, 1996). Ayrıca appresoryumlardaki melanin aracılığıyla gerçekleşen basınç artışı ve bu yüksek basıncın neden olduğu itici güç patojenin konakçı bitki içerisine mekanik penetrasyonunu da sağlamaktadır (Howard ve Ferrari, 1989). Melanin biyosentezinin inhibe edilmesi ile fungus yüksek basınç oluşturamaz ve böylece appresoryalar konakçı dış zarına penetre olamaz (Kubo ve Furusawa, 1991). Melanin çeşitli mekanizmalarla mikroorganizmaların virülansında artışa neden olarak tarımsal ya da tıbbi açıdan patojeniteye neden olan organizmalarla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. UV-C, gama radyasyon gibi sterilizasyon için kullanılan ışınların, kaspofungin ve amfoterisin B gibi antifungal

ilaçların mücadelede yetersiz kalması, melaninin etkili ilaç geliştirilmesinde ideal bir hedef molekül durumuna gelmesine neden olmuştur (Kubo ve Furusawa, 1991).

1.8. Ultraviyole Radyasyon

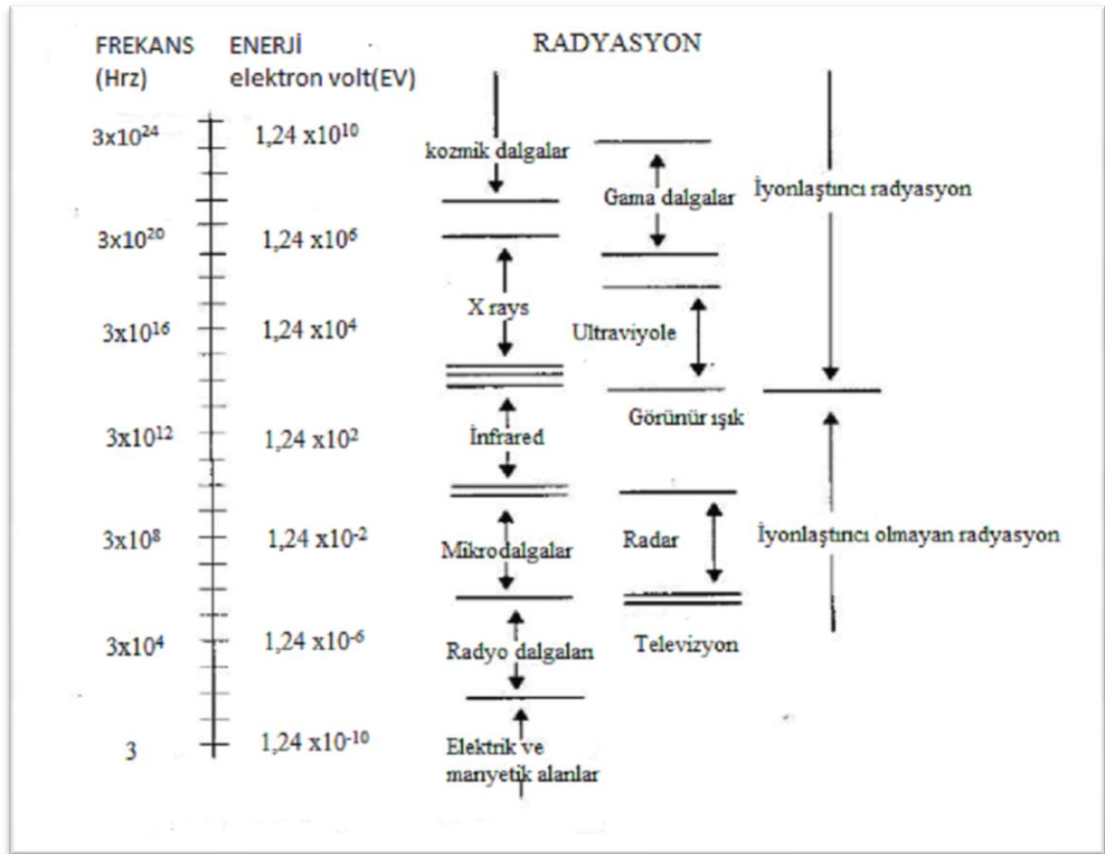
Elektromanyetik radyasyonun ana kaynağı güneştir. Gama, X, ultraviyole ışınları (mor ötesi), görünür ışık, infrared ışınlar, mikrodalgalar ve radyo dalgaları elektromanyetik radyasyonu oluşturmaktadır. Radyasyon iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İyonize radyasyon, parçacık olarak adlandırılan belli bir kütleye ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden parçacıklarla (alfa, beta ve nötron), belli bir enerjiye sahip ancak kütesiz olan dalga tipi radyasyondan (gama ve X ışınları) oluşmaktadır. İyonize olmayan radyasyonun (mikro dalgalar, görünür ışık, kızıl ötesi, radyo dalgaları, UV) ise sadece dalga tipi bulunmaktadır (Bülbül, 2003).

Ultraviyole (UV) radyasyon, güneşten gelen ışık enerjisinin bir şeklidir. Güneş elektromanyetik spektrum diye bilinen bir dizi enerji yayar. Enerjinin değişik şekilleri, dalga boylarına göre sınıflandırılmaktadır. En kısa dalga boylu radyasyon en fazla enerjik olandır. UV radyasyonu 320-400 nm arasında UVA, 280-320 nm arasında UVB ve 200-280 nm arasında UV-C olmak üzere üç kategoride sınıflandırılabilir (Boğaziçi, 2000). Ultraviyole (UV) radyasyon, yeryüzüne erişen güneş enerjisinin bir parçasıdır. Yeryüzüne ulaşan güneş radyasyonunun yaklaşık % 5' ini oluşturur ve dalga boyları 100-400 nm arasındadır. Aralığın % 95-98'i UVA, % 2-5'i UVB'dir, UV-C yeryüzüne ulaşmadan stratosferik ozon tabakasında emilmektedir. Eğer normalin üstünde miktarda UV dünyaya ulaşırdı, en kısa dalga boylu UV radyasyonu (UV-C) canlılar üzerinde çok ciddi boyutlarda biyolojik zarara neden olabilirdi (Karaduman, 1999). UVA, UV radyasyonun en az zararlı şeklidir ve ozon tabakasının içinden doğrudan geçerek dünyaya büyük oranlarda ulaşmaktadır. UVB radyasyon potansiyel olarak çok zararlıdır. Güneşin UVB radyasyonunun çoğu stratosferde ozon tarafından yutulur. UV-C radyasyon ise çok enerjik olduğundan canlılar üzerinde potansiyel olarak bilinen en zararlı iyonize olmayan ışındır (Berkow, 1997). Stratosferik ozondan başka güneş ışınlarının yeryüzüne eğik veya dik gelmesi, yeryüzüne ulaşan UV radyasyon miktarını etkileyen faktörlerden biridir. Bunun yanında, güneşin gün içerisindeki konum değişikliği de, atmosfer içerisinde

geçen UV radyasyon miktarını etkilemektedir. Güneş gökyüzünde alçak olduğunda, sabah ve akşam saatlerinde ışınlar atmosfer içerisinde daha uzun bir mesafe kat etmektedir ve su buharı ile diğer atmosferik bileşenler tarafından saçılmaya uğrayabilir ve yutulabilirler. Güneş kendisinin en yüksek noktasında olduğunda (öğlen), yani gün ortası civarında UV'nin daha büyük miktarları dünyaya ulaşır. Ayrıca topoğrafik yükseklik de etkilidir. Bulut dünya yüzeyine erişen UV radyasyonun miktarı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. İnce bulut örtüsünden çok daha fazla UV radyasyon geçişi olur (Boğaziçi, 2000). Yağış koşulları ve hava kirliliği de UV taşınım miktarını azaltmaktadır. Zararlı UVB radyasyonu stratosferik ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak yer yüzeyine ulaşır. UVB 'nin yer yüzeyine ulaşmasını stratosferik ozon, bulutlar, havada asılı kalan partiküller ve aerosoller engellemektedir. Bulutlar, UV ışınlarını değişik yönlerde absorbe edip dağıtmaktadırlar (Lubin, 2002; Mutlu vd., 2003).

1930 yılında Westinghouse UV lambalarının geliştirilmesi ve germisidal etkilerinin kanıtlanması için çalışmalar yapmıştır. Sonuç olarak ultraviyole ışınlarının bakteriler, virüsler, funguslar gibi organizmalar üzerinde inaktive edici etkisi olduğu kanıtlanmıştır. UV ışığı, ışık kaynağı olarak kullanılan lambalarda cam tüp içerisindeki düşük basınçlı civa buharının içinden akan elektrik akımı sayesinde üretilir. Elektromanyetik radyasyon mikroorganizmalar için zararlıdır. Gama, X ve UV ışınları gibi düşük dalga boylu, yüksek enerjili elektromanyetik radyasyonlar organizmaya temas ettiğinde enerji hücreler tarafından absorbe edilir ve hücreye zarar vererek hücre ölümüne neden olabilir (Özkütük, 2007).

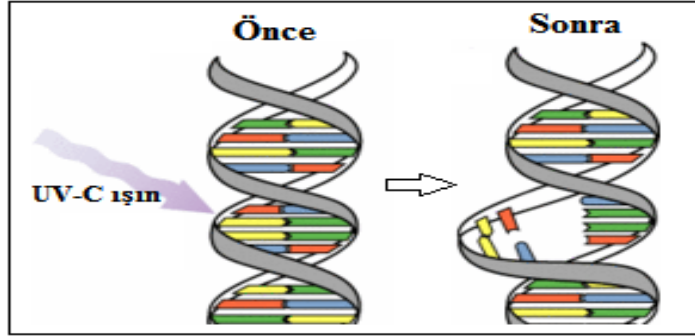
UV ışınları (germisidal) herhangi bir mikroorganizmayı öldürmek için ısıya gereksinim duymazlar bu sebeple mikrobiyal kontrollerde uzun süredir yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak funguslardaki radyasyon dirençliliği melaninli fungusların gıda sterilizasyonu için uygulanan gama radyasyon ya da UV-C gibi ışınlarla yok edilememesine yol açmaktadır (Dadachova ve Casadevall, 2008).



Şekil 1.12. Elektromanyetik spektrum (Güler 1991).

250-260 nm dalga boyu, UV ışınının en etkin olduğu bölgedir. DNA, bu dalga boyunu güçlü bir biçimde absorbe etmektedir. Absorbe edilen UV ışınının enerjisi, bitişik timin bazları arasında kovalent bağ oluşturarak timin dimerlerini meydana getirmektedir. Oluşan timin dimerleri DNA ipliklerinde katlanmalara neden olmakta, böylece DNA'nın helikal yapısı bozulmaktadır. Bu durumda hücre bölünmesi öncesi kromozom replikasyonu güçleşir. Kromozom, replikasyonu yapılabilsede dahi mutant hücreler meydana gelmektedir. Timin dimerleri, DNA replikasyonunu engellediğinde öldürücü olmaktadır. Bazı organizmalar DNA hasarını onarabilir ve tekrar üreyebileceği aktif bir duruma dönebilir. UV ışın şiddeti yoğun olduğunda hasar büyük olur ve onarım imkansızlaşır (Sizer ve Balasubramaniam, 1999; Guerrero ve Barbosa, 2004; Franz ve ark., 2009; Koutchma, 2009). Aynı zamanda UV ışınları serbest radikaller meydana getirerek hücrelerde oksidatif strese neden olurlar. Oluşan bu serbest radikaller hücrede

biyomoleküllere hasar vererek, hücrenin bütünlüğünün bozulmasına, yaşlanmasına ve hücre ölümüne neden olabilmektedirler.



Şekil 1.13. UV-C ışınlarının DNA üzerine etkisi (Herring, 2010).

UV ışınının ışıma süresi veya şiddeti arttıkça vejetatif hücre ölümü fazlalaşır. Birim alana verilen ultraviyole ışınının enerjisinin ölçü birimi mikrowattır. Sistemler genellikle $30.000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ - $40.000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ışın yoğunluğunu sağlayacak şekilde dizayn edilmektedirler.

Başlatıcı reaksiyonlar (Fiziksel Kademe)	Biyomoleküler bozukluklar (Kimyasal Kademe)	Biyolojik bozukluklar (Biyoloji Kademe)
İyonlaşmalar Uyarılmalar	Serbest radikaller Nükleik asitler ve proteinlerde hasarlar	Hücre ölümü Organizma ölümü Mutasyonlar Kanser oluşumu

Çizelge 1.3. Canlılarda radyasyon bozukluklarına yol açan olaylar (Özalpın, 2001).

1.8.1. UV Radyasyon ile Melanize Fungus Habitatlarının İlişkisi

Melanize funguslar ve sporları yeryüzünde çok geniş dağılım göstermektedir. Atmosfer sıklıkla yüksek oranda ($10^4/\text{m}^3$) fungal spor içermektedir ki bu bakteriyel hücre konsantrasyonlarından çok daha yüksek bir miktardır (Yanagita, 1990). Havada bulunan fungal sporların baskınlığı ve bulunma sıklığı tüm dünyada rapor edilmiştir. Örneğin İspanya’da baskın cins olarak *Cladosporium*, *Ustilago*, *Pleospora* (Herrero vd., 2006), İsrail ve Türkiye’de sırasıyla *Cladosporium*, *Alternaria* (Waisel

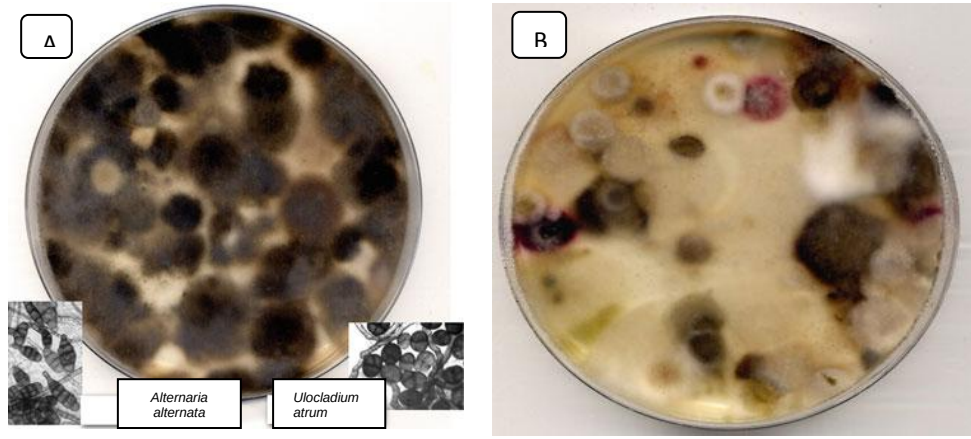
vd., 1997; Sen ve Asan, 2001), Litvanya’da *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus niger* (Lugauskas vd., 2003), Brezilya’da *Cladosporium*, *Leptosphaeria*, *Alternaria* (Zoppas vd., 2006), Afrika’da (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Arthrimum*, *A. niger* (Prospero vd., 2005) funguslarının sıklıkla bulunduğu rapor edilmiştir (Horikoshi, 2011). Hücre duvarlarındaki koruyucu melanin ve melanin benzeri pigmentasyon sayesinde fungal sporlar UV radyasyon hasarına bakteri hücrelerinden daha dirençlidir.

Bitki yaprakları çeşitli fungal biyotaların gelişimi için çok uygun bir ortam sağlamaktadır. Bitki yaprağı mikobiyotasındaki melanin içeren fungusların yüzdeleri hesaplandığında (Ellis ve Ellis’in Klasik kitabında) Britanya adalarındaki bitkiler üzerinde 4300 tür tanımlanmıştır; bu türler içerisinde melanize türlerin ezici bir çoğunlukta olduğu (% 95) belirlenmiştir (Ellis ve Ellis, 1997). Portekiz’in Akdeniz kıyılarındaki bitkilerden elde edilen mikrofungal komünitelerde (Pereira vd., 2002) ise melanin içeren türler (*Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Alternaria alternata*) toplam fungal izolatların % 80’ini oluşturmaktadır.

Bitki örtüsünden yoksun kayalık yüzeylerde, sıcak ve soğuk çöllerde aynı zamanda yüksek dağlarda görülen karasal yüzeyler, üzerinde yaşayan organizmaya ekstrem ve zorlu bir yaşam ortamı sağlamaktadır (Shilo, 1978). Ama bu ekstrem koşullara rağmen kayalık yüzeyler serbest yaşayan mikroskopik fungusların çok özelleşmiş bir grubu tarafından ısrarla yaşama alanı olarak kullanılmaktadır (Staley vd., 1982; Sterflinger ve Krumbien, 1995; Gorbushina, 2003). Kaya yüzeylerinde yaşayabilen bu funguslar MCF (microcolonial fungi) olarak adlandırılan çok küçük koloniler oluşturmaktadırlar. Mikrokoloniyal funguslar hücre duvarlarında yüksek konsantrasyonda siyah pigment bulundurarak yüksek UV radyasyona rağmen hayatta kalabilmekte hatta büyümeye devam edebilmektedir (Urzi vd., 1995).

UV radyasyonun toprağın sadece 100 mikron derinliğine nüfuz edebildiği bilinmektedir (Johnson, 2003). Ama toprağın güneş ışığına maruz kalan üst tabakası ise mikrofungal komüniteler için çok önemli bir yaşama ortamıdır. Hemen hemen analiz edilmiş tüm çöl topraklarında da koyu renkli mikrofungusların baskınlığının tesbit edilmesi şaşırtıcı olmamaktadır (Ranzoni, 1968; Christensen, 1981; Halwagy vd., 1982; Skujins, 1984; Abdullah vd., 1986; Hashem, 1991; Ciccarone ve Rambelli, 1998; Mulder ve El-Hendawy 1999, Zak, 2005). İsrail Gazze yakınlarındaki Negev çölünde incelenen mikrofungal türlerinin % 55’i melanin

içeren mikrofunguslardır ve yayılım sıklığı da çok yüksektir (% 58-77 farklı lokalitelerde). Bu funguslar *Ulocladium atrum*, *U. botrytis*, *A. alternata*, ve *A. chlamydospora* olarak belirlenmiştir (Ellis, 1971; Ellis, 1976). Fungusların çok hücreli spor morfolojileri ile birlikte melanin pigmentasyonu, çöldeki yüksek UV radyasyon, ekstrem sıcaklıklar ve kuraklığa rağmen çöl toprak mikrobiyotasının yaşayabilmesini sağlamaktadır.



Şekil 1.14. Negev çölü merkezindeki Nahal Nizana bölgesinden alınan örnekler; A. Toprak yüzeyindeki mikrofungal kominiteler (0-0,2 cm), B. 0,2-5cm lik derinlikten izole edilen mikrofungal kominite (Horikoshi, K., 2011).

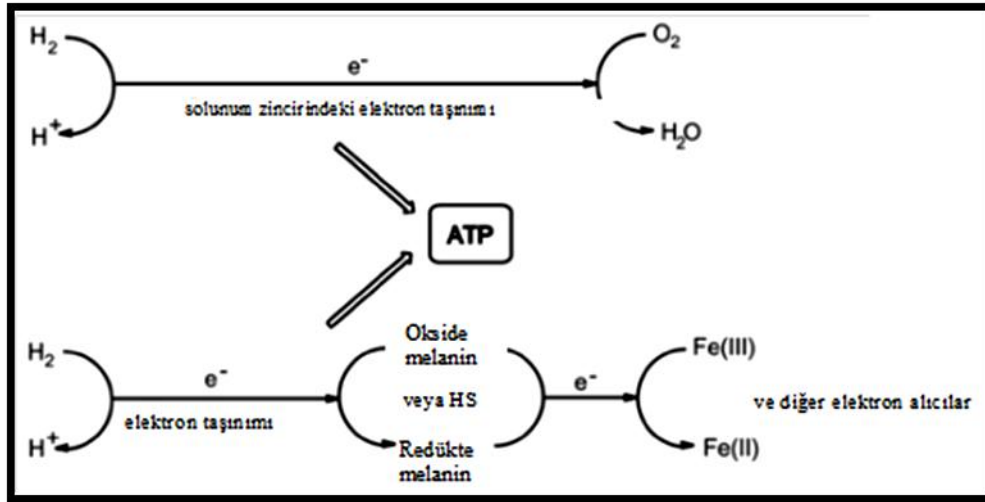
Çöl toprağının üst tabakasında yüksek sıcaklık ve UV radyasyon maruziyetine rağmen yaşayabilen çok hücreli konidyalı, melanin içeren fungus türleri bulunmakta (*U. atrum*, *A. alternata*, *Embellisia phragmospora*, *Stemphyllium*, *Pleospora tarda*) iken tabakanın sadece 0,2 cm altında ise açık renkli fungus türlerinin (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Mortierella*) kolonize olduğu görülmektedir (Horikoshi, K., 2011).

1.9. Melaninin Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidanlarla İlişkisi

Melaninin polimerik yapısı, oksidasyon ve redüksiyon olaylarının eş zamanlı gerçekleşmesini sağlamaktadır. Melanin pigmentinin kinon (quinon) kısımlarının pigmentin bu redoks potansiyelinden sorumlu olan kısımları olduğuna inanılmaktadır (Turick vd., 2011). İyonize ya da iyonize olmayan radyasyon melanin bulunduran fungus türlerinde pigmentin elektron yapısında değişiklikler meydana getirerek

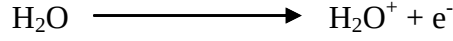
radasyunun neden olduğu ortaklaşmamış elektronlara karşı elektron tutucu (elektron akseptörü) olarak görev yapmaktadır (Coates vd., 2002). Melaninin elektron alıcı olarak görev alması serbest elektronların hedef biyomoleküllere enerji aktarımını engelleyerek moleküllerin yapısal olarak bozunmasını da önlemektedir. Melanin, radyasyon maruziyeti sonucu oluşan eşlenmemiş elektronları yakalayarak oksijenin tekil oksijene dönüşmesini de engelleyebilmektedir. Hatta melaninli funguslar radyasyon uygulandığında çok çeşitli ekstraselüler indirgeyiciler de üreterek hücre zarından melanine elektron transferi sırasında devam eden oksidasyon maruziyetine karşı pigmente yeterli redüksiyon gücü bile sağlamaktadır (Turick vd., 2011).

Gama radyasyon melaninin dönüşümlü oksidasyonuna neden olarak, melaninin NADH'a okside olabilme yeteneğini artırmaktadır (Dadachova vd., 2007). Bu sayede melanin miktarı fazla olan organizmaların ekstrem koşullara karşı dayanıklılığı da artmaktadır.

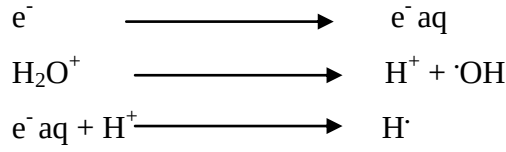


Şekil 1.15. Melaninin mikroorganizmalarda solunum zinciri sırasındaki elektron tutucu özelliğinin olası fonksiyonlarının şematik gösterimi (Plonka ve Grabacka, 2006).

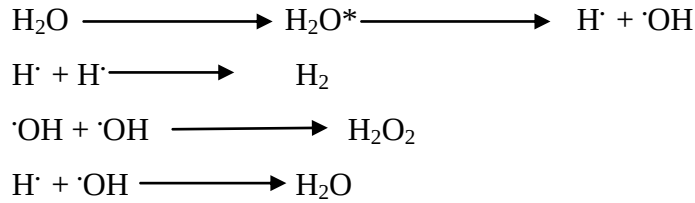
Canlılar ışınlandırıldıklarında radyasyon enerjisinin büyük oranda hücredeki su molekülleri tarafından absorplanması olasılığı çok yüksektir. Radyasyonun etkisi ile su molekülleri iyonlaşırlar ya da uyarılırlar. İyonlaşma ile pozitif yüklü bir iyon ve hızlı bir serbest elektron oluşur (Özalpan, 2001).



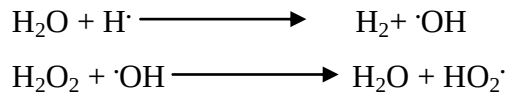
Bu olayı izleyen çeşitli sekonder reaksiyonlar ile değişik tipte serbest radikaller meydana gelirler. Yaklaşık 10^{-12} sn sonunda serbest elektron birçok sekonder iyonlaşma olayına yol açarak enerjisini kaybeder ve ortamda su molekülleri tarafından sarılarak hidrat elektron ($\text{e}^- \text{aq}$) haline geçer. Pozitif yüklü iyon ise, bir hidrojen iyonu ile bir hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) oluşturacak şekilde ayrılır. Bu olaylarla birlikte bir hidroksil radikali de meydana gelebilir (Özalpan, 2001).



$\cdot\text{OH}$ ve $\text{H} \cdot$ radikalleri su moleküllerinin uyarılması ve uyarılmış molekülün ayrılması ile de meydana gelebilir. Ayrıca oluşan bu reaktif türler kendi aralarında reaksiyona girerek hidrojen peroksit gibi çok reaktif bir molekül de oluşturabilirler (Özalpan, 2001).



Serbest radikaller diğer su molekülleri ile de reaksiyona girebilir ya da kendi aralarındaki reaksiyonlar sonunda ortaya çıkan ürünlerle de tekrar reaksiyona girebilir (Özalpan, 2001).



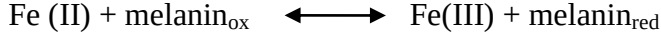
Sonuç olarak canlılar yaklaşık % 70-90 oranında su içerdiği için, indirekt etkiler direkt etkilerden daha önemlidir ve radyasyon hasarlarının büyük ölçüde indirekt yoldan olduğu kabul edilmektedir.

Melanin pigmenti güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir. Antioksidanlar çeşitli nedenlerle oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) ile denge sağlayarak, organizmayı oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu savunma patojenik mikroorganizmalar için çok daha büyük önem taşımaktadır; çünkü patojenler sadece kendi ürettikleri ROT' lara maruz kalmayıp buna ek olarak konakçının savunma için ürettiği ROT'lara da maruz kalır. Eğer bir parazit, konakçının dokularına zarar vermek amacıyla reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkisini kullanırsa ROT'ların kendi hücrelerine zarar vermesini engellemek için koruyucu mekanizmalarının patojen olmayan organizmalara göre çok daha güçlü olması gerekmektedir (Gessler vd., 2007). Bu yüzden oluşan yüksek radikal miktarına karşı organizmaların antioksidan mekanizmalarına ek olarak pigment oluşumu gibi adaptasyonlar geliştirme zorunluluğu doğmuştur. Melaninin bulunduğu organizmanın patojenitesini arttırması da bu nedenledir.

Melaninin peroksidaz aracılığıyla gerçekleşen oksidasyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girerek hidrojen peroksit miktarında azalışa neden olarak veya pigment enzimlere bağlanıp onları inhibe ederek engellemektedir (Shcherba vd., 2000). Yapılan başka bir çalışmada kurbağalarda ortaya çıkarılan bir mekanizmaya göre çeşitli stres koşulları altında melanin SOD' un görevlerini üstlenerek süperoksit iyonlarının dismutasyonunu katalizlemektedir (Jacobson vd., 1994). Ayrıca fenol oksidazın melanin üreten bir enzim olduğu ve melaninin süperoksit iyonlarını tükettiği göz önüne alındığında, melanin fizyolojik anlamda fenol oksidazın regülasyonunu sağlamakta ve SOD'un tamamlayıcısı olarak görev almaktadır (Geremia vd., 1984; Sichel vd., 1991).

Melanin birçok geçiş meteline bağlanabilmektedir (Swartz vd.,1992; Jacobson, 2000). Melaninin metallere bağlanması hücredeki serbest radikallerin konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca melanin pigmenti hücre için gerekli temel metalleri bağladığı için hücrelerde depo olarak görev almaktadır. Örneğin melanin Fe (II)'yi ekstraselüler sıvıda depolayabilmektedir. Pigmentin elektronları dönüştürücü rolleri sayesinde metalleri okside ya da redükte edebilir, tekil elektron transferini kolaylaştırır ya da inhibe edebilir. Bu sayede serbest radikal oluşumuna neden olan metalleri de etkili bir şekilde bağlayabilmektedir. Örneğin Fe (II), zayıf şelatör (ADP) varlığında melanine bağlanarak Fe (II)'den ve H_2O_2 'den oluşan hidroksil radikali oluşumunu inhibe edebilmektedir. EDTA (Etilendiaminetetraasetik asit) gibi güçlü şelatörler varlığında ise melanin Fe (II)'e

bağlanamaz, Fe (II) ve H₂O₂ reaksiyona girer böylece hidroksil oluşumu kaçınılmaz olur (Jacobson, 2000). EDTA şelatörü varlığında melanin Fe(III) miktarında da azalışa neden olur ama bunu Fe(III)'e bağlanarak yapmaz; Fe (II)'nin H₂O₂ ile reaksiyona girerek hidroksil radikali üretimi nedeniyle Fe (II)'nin ortamdan azalışı sonucu gerçekleşmektedir (Pilas vd., 1988; Jacobson, 2000).



Yapılan bu deneyler ve bilgiler ışığında melaninin antioksidan sisteme yardımcı görev üstlendiği kanıtlanmıştır. Ayrıca radyasyon koruyucu bir molekül olarak radyasyonun oksidasyon etkisine yıpranma olmaksızın ve uzun süreli bir koruma sağlaması belki de pigmentin en önemli özelliklerinden biri olarak gösterilmiştir (Turick vd., 2011). Melanin belirtilen bu mekanizmalarla organizma içerisinde oluşabilecek ROT'ları önleyerek hücreleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu da neden melanize fungusların radyoaktif izotoplarla kontamine topraklarda bol bulunduğunu (Dighton vd., 2008), hatta düşük dozlarda gama radyasyonun melanize fungus büyümesini stimüle ettiğini ve bazı çalışmalarda fungusların radyasyon kaynağına doğru büyüdüğünü de açıklamaktadır (Dadachova vd., 2007).

1.10. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denmektedir. Bu çiftlenmemiş elektron, serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA, nükleotid ve koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Koca ve Karadeniz, 2012).

Oldukça küçük bir anaerobik bakteri grubu hariç organizmaların çoğu için oksijen hayati bir önem taşımaktadır. Aerobik yaşamın vazgeçilmez elemanı oksijen, temel enerji seviyesindeki moleküler oksijenin (O₂) süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (HO[•]) dönüşümü nedeniyle toksik

etkilere de sahip olmaktadır (Fridovich,1998). Hücresel antioksidan düzeyinin çeşitli çevresel ya da biyolojik nedenlerle reaktif oksijen miktarlarına karşı yetersiz kalması sonucu toksik bir etkinin başlaması olayına oksidatif stres adı verilmektedir (Altınışık, 2000). Oksidatif stres, günlük yaşamda oksijenli solunumun kaçınılmaz sonuçlarındandır.

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki endojen reaksiyonlarla moleküler düzeyde reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bunlardan $O_2^{\cdot-}$ radikali iyonize radyasyon ve UV radyasyonu gibi hem çevresel etkenler hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle kolaylıkla fazla miktarlarda oluşmaktadır. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla $O_2^{\cdot-}$ 'nin birikmesine bağlıdır ve bir kere bu radikaller biriktikten sonra bir seri zincirleme radikal tepkimeler sonucu diğer radikallerin oluşumu da kaçınılmazdır (Kelly ve vd., 1998).

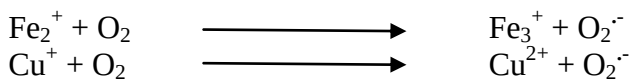
1.10.1. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Sınıflandırılması

Organizmada pek çok türde ROT oluşmaktadır.

1.10.1.1. Süperoksit Radikali

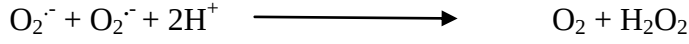
Canlılarda diğer radikallerin oluşumu çoğunlukla $O_2^{\cdot-}$ 'nin birikmesine bağlıdır ve bir kere bu radikaller biriktikten sonra bir seri zincirleme radikal tepkimeler sonucu diğer radikaller de oluşur (Kelly vd., 1998).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) neredeyse tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikalın asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.

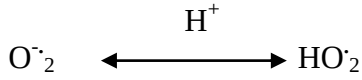


Orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (süperoksit radikali, $O_2^{\cdot-}$), iki elektron alması ile de peroksi anyonu (O_2^{2-}) oluşmaktadır (Halliwell ve

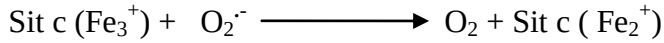
Gutteridge, 1990). $O_2^{\cdot-}$ bir oksitleyici gibi davranıp bir elektron daha aldığı zaman oluşan O_2^{2-} ortamdan iki proton alarak H_2O_2 oluşturabilir veya $O_2^{\cdot-}$ aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenip indirgeyici gibi davranabilir. Ya da iki $O_2^{\cdot-}$ birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri indirgenir, böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (Nordberg ve Arner, 2001).



$O_2^{\cdot-}$ 'nin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) oluşturmak üzere protonlanır.



Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitro blue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur (Özbey, 2009).

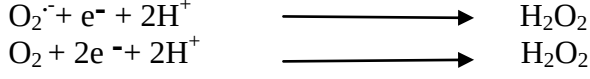


Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelmektedir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilmektedir. Peroksinitrit, azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilmektedir. Bu nedenle de nitrik oksitin ($NO^{\cdot}$) zararlı etkileri peroksinitritten kaynaklanmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002).

1.10.1.2. Hidrojen Peroksit

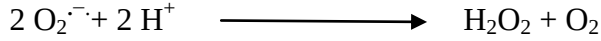
H_2O_2 , oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşmaktadır. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H_2O_2 'in oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 ve

Fe^{2+} varlığında Fenton reaksiyonu, süperoksitradikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında da Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$) oluşturmaktadır (Koca vd., 2012).



Hidrojen peroksit özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirmektedir (Halliwell, 1984).

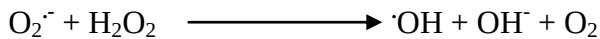
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülünün, dismutasyonu reaksiyonuyla iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturmaktadır (Özbey, 2009).



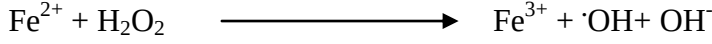
Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana getirdiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenmektedir.

1.10.1.3. Hidroksil Radikali

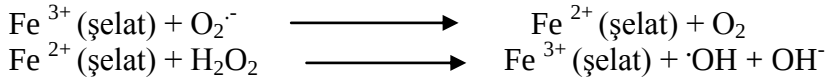
Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve toksik etkili olanı $\cdot\text{OH}$ 'dir. $\cdot\text{OH}$, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.



Redoks katalizör olarak işlev gören bir geçiş metali, örneğin şelat yapmış demir varlığında Haber-Weiss tepkimesinin biyolojik sistemlerde de çalıştığı ve önemli miktarda $\cdot\text{OH}$ üretildiği bilinmektedir (Ahmad, 1995). O_2^- 'nin bir kısmı kendiliğinden dismutasyon ile H_2O_2 oluşturmakta ve biriken H_2O_2 , O_2^- ile etkileşerek $\cdot\text{OH}$ yapmaktadır. İn vivoda $\cdot\text{OH}$ yapımına neden olabilen önemli tepkimelerden birisi Fenton tepkimesidir:



İN vivoda $\cdot\text{OH}$ üretimi bakımından en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. İn vivoda O_2^- 'nin H_2O_2 ile $\cdot\text{OH}$ üretmesi, şelat yapmış demir tarafından katalizlenir.

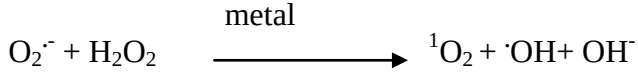


$\cdot\text{OH}$ üretildiği yerde hemen her molekül ile tepkimeye girip radikal tepkimelerini başlatabilir. $\cdot\text{OH}$ 'nin yüksek reaktivitesi nedeniyle istenmeyen toksik etkilerinin yanı sıra, üretimleri normal biyolojik fonksiyon için de gereklidir. Fagositoz ve pek çok enzimatik katalizin zorunlu bir parçası olarak $\cdot\text{OH}$ üretilir ve kataliz olayına doğrudan katılır. Bazı kimyasal bileşikler, canlıda radikal yapımına neden oldukları için toksik etkilidirler. (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

1.10.1.4. Singlet (Tekil) Oksijen

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilirler. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumunda dıştaki iki elektron ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilirler. Singlet oksijenin delta formunda iki elektron aynı orbitalde bulunur ve spinleri birbirine zıttır, diğer orbital boştur. $^1\text{O}_2$ in sigma formunda ise iki elektron ayrı ayrı orbitallerdedir ve dönüşümleri birbirine zıttır. Sigma formunun enerjisi daha fazladır, daha fazla stabildir. Delta formunun yarı ömrünün daha uzun olması (2×10^{-8} s) nedeniyle gözlenen kimyasal reaktivitelerden delta formunun sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Ahmad, 1995). $^1\text{O}_2$ 'in her iki formu da aldığı enerjiyi ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler (Yılmaz, 2010).

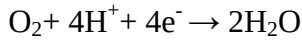
Haber-Weiss tepkimesi ile $^1\text{O}_2$ oluşumu



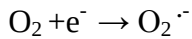
$^1\text{O}_2$ ve $\cdot\text{OH}$ 'nin üretimi tümüyle ortamda $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'in birikmesine bağlıdır (Khan ve Kasha, 1994; Yılmaz, 2010).

1.10.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Reaktif oksijen türleri organizmada eksojen ya da endojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklı radikal oluşum mekanizmasının başında elektron transport sistemi gelmektedir. Mitokondrial Elektron Transport Zincirinde makromoleküllerin yıkılmasıyla açığa çıkan elektronlar mitokondri iç membranında bulunan elektron taşıyıcıları aracılığıyla moleküler oksijene aktarılıp su oluşturulur.

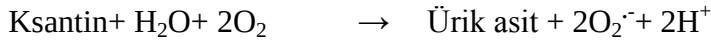
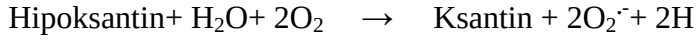


Elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur.

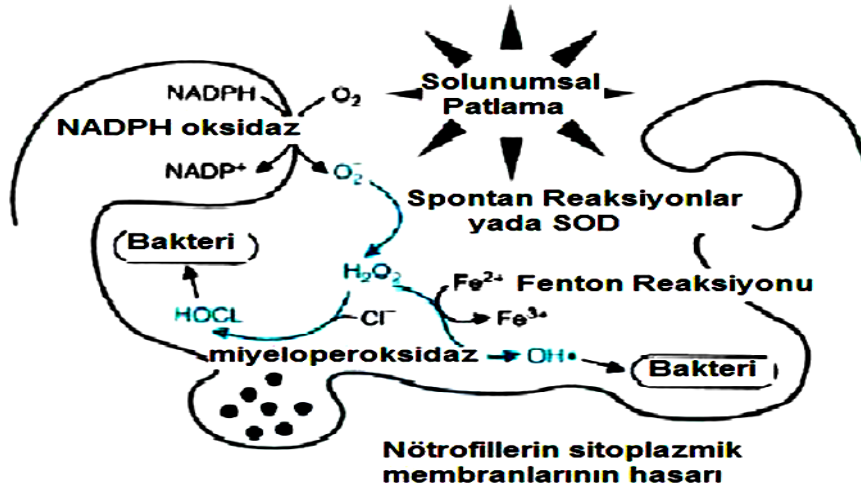


Mitokondriyal solunum zincirinde akan elektronların yaklaşık olarak %1-2'si bu şekilde toksik bir ürün oluşturmak üzere sızıntıya uğrar. Süperoksit radikallerinin üretimi ve salınımı iç mitokondri membranından sitozolik tarafa doğru olur (Kehrer, 1993).

Aminoasit oksidaz, sitokrom oksidaz, monoamin oksidazlar, ksantin oksidaz gibi enzimler de endojen radikal üreten kaynaklardandır. Bunlardan özellikle ksantin oksidaz pürin katabolizmasının en son iki reaksiyonunu katalizleyen enzim olarak iskemik koşullarda fazla miktarda $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretir (Tortop, 2007). Enzim, hipoksantini ksantine veya ksantini ürik aside oksitler. Bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijendir (Southorn ve Powis, 1988).

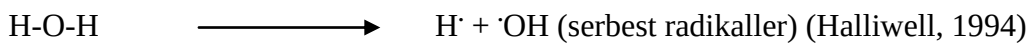


Solunum patlaması olayı da radikal üreten başka önemli bir endojen kaynaktır. Nötrofiller fagositoz sırasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdıkları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici HOCl gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virus, bakteri, mantar gibi patojenleri yok ederler. Bu işlemler sırasında hem ana hem de ara ürün olarak çok miktarda ROT oluşmaktadır (Babior, 2000; Tortop, 2007).

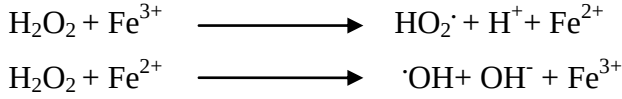


Şekil 1.16. Solunumsal patlama ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Altınışık, 2000).

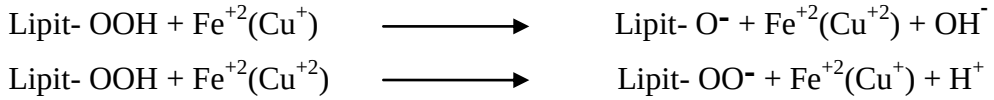
Eksojen serbest radikal kaynaklarının başında radyasyon gelmektedir. Radyasyonun indirekt etkisi atoma enerji transferi sonucu serbest radikaller oluşturarak molekülün parçalanmasını kapsamaktadır. Biyolojik sistemlerdeki temel molekül su olduğu için su genellikle radikal formasyonu ve çoğalması için ortam oluşturmaktadır. Su molekülü enerjiyi absorblayınca değerlik kabuğunda paylaşılmamış elektron olan tekil oksijen ve biyolojik sistemler için en tehlikeli olan $\cdot\text{OH}$ gibi iki serbest radikale ($\text{H}\cdot$ ve $\cdot\text{OH}$) ayrılmaktadır (Tortop, 2007).



Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa, kurşun gibi metal iyonları da serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Demir fenton reaksiyonu yoluyla en güçlü serbest radikal olan hidroksil radikallerinin ($\cdot\text{OH}$) oluşmasını sağlarken stabil lipit hidroperoksitlerinin peroksi ve alkoksi radikallerine dönüşümünü hızlandırmaktadır (Halliwell, 1994; Suzer vd., 2000).



Geçiş metalleri, lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını sağlar ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalizleyerek radikal oluşturmaktadır.



1.10.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

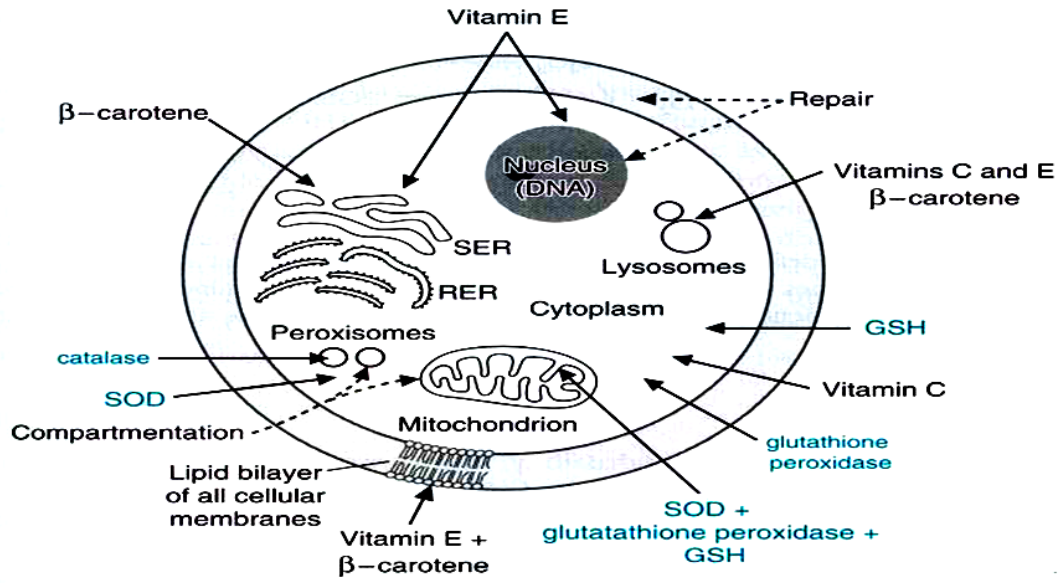
Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, nükleik asitler (DNA), karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$) ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Eğer serbest radikaller, radikal yok ediciler tarafından yakalanamazlar ise sitotoksiste ortaya çıkar.

Etkilenen bileşik	Sonuçlar
Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibisyonu Organ ve hücre geçirgenliğinde değişimler
Nükleik asit bazları	Hücre değişiminde gelişmeler Mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipitler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar

Çizelge 1.4. Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller (Akpoyraz ve Durak, 1994).

1.11. Antioksidan Savunma Sistemleri

ROT oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde olan endergonik ve ekzergonik kaynaklı, çok çeşitli bileşiklerdir. Bu bileşikler enzimatik olmayan antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, glutatyon (GSH), melatonin, selenyum-çinko gibi mineraller, koenzimQ10, karotenoidler, lutein, zeaksantin, astaksantin, likopen, flavonoller, lipoik asit, gibi), antioksidan enzimler (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, seruloplasmin gibi) ve bitkilerde yaygın şekilde bulunan çeşitli antioksidan fitonutrientlerdir (İşbilir, 2008).



Şekil 1.17. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların şeması (Altınışik, 2000).

Antioksidanlar etkilerini iki şekilde gösterirler:

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi;

- ✓ Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki
- ✓ Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonu azaltıcı etki
- ✓ Katalitik metal iyonları uzaklaştırıcı etki

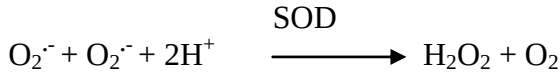
2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi;

- ✓ Toplayıcı (scavenging) etki: Reaktif oksijen türlerini (ROT) etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle dönüştürülmesi (örneğin: Enzimler),
- ✓ Bastırıcı (quencher) etki: Reaktif oksijen türleri (ROT) ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite göstermesi (örneğin: Vitaminler),
- ✓ Onarıcı (repair) etki: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamir edilmesi (örneğin: Glutatyon),
- ✓ Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Reaktif oksijen türlerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp (örneğin: Fe şelatörleri) zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (Özbey, 2009).

1.11.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.11.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1)

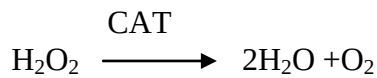
SOD, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan ve $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir (Fridovich, 1995).



Bütün canlılardaki SOD enzimleri, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre sınıflandırılmaktadır (Fridovich, 1995; Yılmaz, 2010). İntraselüler olarak; prokaryotlarda matrikste Mn-SOD, periplazmik boşlukta Fe-SOD, ökaryotlarda ise sitozol ve nukleusda Cu-Zn SOD bulunmaktadır (Kılıç, 1985). Cu-Zn SOD en yüksek katalitik aktiviteye sahip dismutazdır ve ökaryotik hücre sitozolüne ek olarak eritrositlerde de bulunmaktadır.

1.11.1.2. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6)

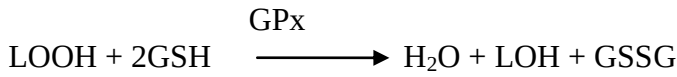
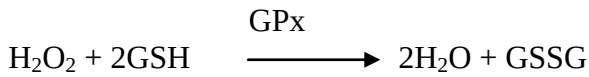
H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ radikalinin dismutasyon ürünlerinden birisi olup peroksidazlar ya da katalaz tarafından detoksifiye edilmektedir.



Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde bulunan CAT, birbirinin aynısı dört alt üniteden oluşan yaklaşık 240 kDa ağırlığında tetramerik bir moleküldür. Genellikle peroksizomlarda bulunan katalaz, SOD ve peroksidaz gibi enzimlerle birlikte aerobik hücrelerde süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit'e karşı savunmadan sorumludur (Sonntag, 1992). Bu yüzden de katalaz hücrelerin savunmasında SOD enzimi ile birlikte çok önemli bir görev yüklenmiştir (Kota ve Misra, 2005).

1.11.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9)

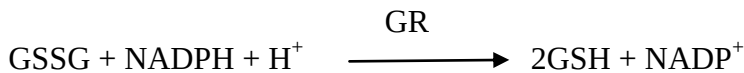
Sitosolik glutasyon peroksidaz sitosolde ve mitokondrial matriksde bulunur ve sitotoksik hidroperoksitlerin uzaklaştırılması için çok önemli bir enzimdir. Omurgalı türlerinde enzimin katalitik aktivitesi için bir hidrojen donörü olan glutatyon (GSH) mutlak gereksinimi vardır. Enzim H_2O_2 'i iki H_2O molekülüne ve membran peroksitlerini (ROOH/LOOH) H_2O ve herhangi bir etkisi olmayan bir molekül olan alkole (ROH/LOH) indirgemektedir.



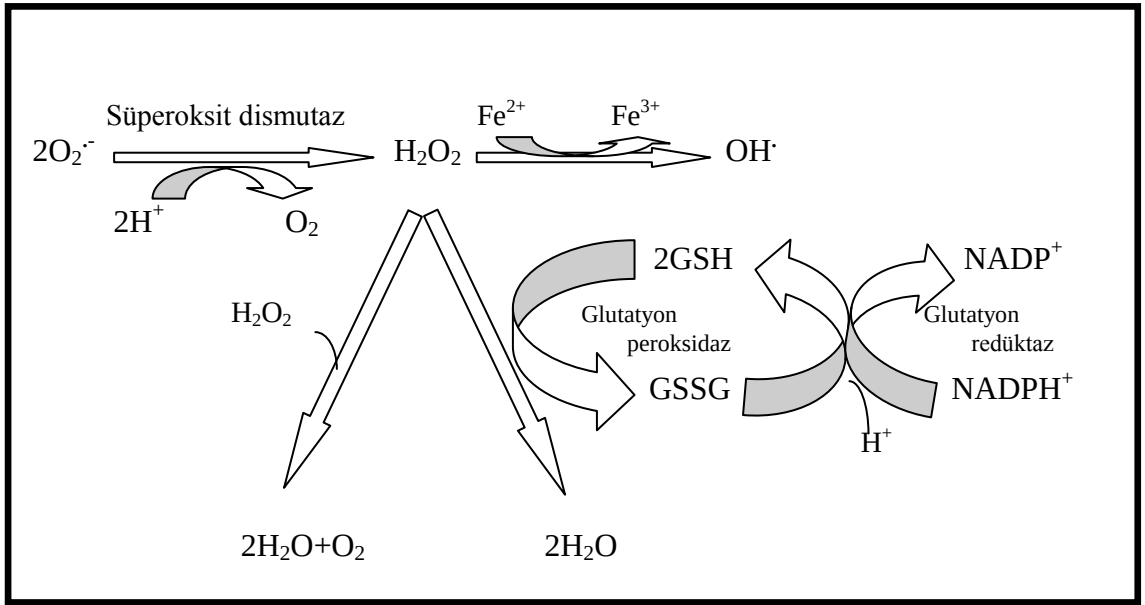
Enzim aynı inkübasyon koşullarında H_2O_2 , etil hidroperoksit, tertbutilhidroperoksit, kümene hidroperoksit, linoleik asit hidroperoksit ve nükleotid veya steroid türevli hidroperoksitleri birbirlerine yakın değerlerde indirgeyebilir. GPx 76-105 kDa ağırlığında tetramerik bir proteindir. Her bir molekül dört selenyum atomu içermektedir. Selenyum, enzimin katalitik merkezinde ve selenosistein selenolat olarak bulunur. Hidroperoksit reaksiyonlarının katalizlenmesi birkaç basamakta yürümektedir. Önce enzimin katalitik merkezi hidroperoksiti indirger ve enzim yükseltgenir, ikinci basamakta, okside enzim bir molekül GSH ile bir kompleks meydana getirir, üçüncü basamakta, kompleks başka bir molekül GSH'ı kullanarak enzim başlangıç durumuna dönüşürken iki molekül GSH, okside glutatyonu (GSSG) oluşturarak okside olmaktadır (Ahmad, 1995; Yılmaz, 2010).

1.11.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR: EC 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz, GPx vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize etmektedir.



GSH, çevredeki oksidan moleküllerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engellemektedir. Aynı zamanda oksijen radikallerinin biyolojik moleküllere saldırması sonucunda meydana gelen peroksitleri ortadan kaldırmak için bazı peroksidaz enzimler tarafından da kofaktör olarak kullanılmaktadır. Bunun sonucunda kendisi oksitlenerek okside glutatyona dönüşmekte ve oluşan bu okside glutatyonun da redükte glutatyon haline dönüşümü GR enzimi tarafından katalizlenmektedir (Özbey,2009).



Şekil 1.18. Glutasyon redüktaz.

1.11.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18)

Glutasyon S-transferazlar (GST), her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Glutasyon S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GPx aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.



Glutasyon S-transferazlar (GST) katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler (Özbey, 2009).

1.11.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.11.2.1. Glutasyon (GSH, γ -L-glutamil-L-sistein-glisin)

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır (Mascio vd., 1991; Koca ve Karadeniz, 2012). Glutasyon aynı zamanda hücre içinde $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir. Bu sayede hücreleri oksidatif hasara karşı korumakta aynı zamanda da aminoasitlerin transportunda görev almaktadır (Larson, 1988; Koca ve Karadeniz, 2012).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Jacobson ve arkadaşları 1995 yılında yaptıkları çalışmada, 1,8 DHN melanin üreten *A. alternata* ve *Wangiella dermatitidis* funguslarının yabanıl ve albino suşları oksidan ajan olarak permanganat, hipoklorit ve hidrojen peroksit maruz bırakılmıştır. Permanganat ve hipoklorit gibi oksidanları, yabanıl suşun albino suşundan daha fazla nötralize edebildiği ve daha yüksek dozlara dayanabildiği saptanmıştır. *Wangiella dermatitidis*'in yabanıl tipinde ise melaninin H₂O₂ oksidan ajanına karşı fungusu koruyamadığı belirlenmiştir (Jacobson vd., 1995).

Belozerskaya ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada *A. alternata*, *Cladosporium cladosporoides*, *Mucor hiemalis*, *Paecilomyces lilacinus* gibi Çernobil reaktörlerinden izole edilen radyotrofik fungusları, H₂O₂ ve düşük glukoz içeren besiyeri gibi çeşitli stres faktörlerine maruz bırakmışlardır. Oluşturulan yüksek oksidatif stres sonucu fungusların hifsel büyüme oranları, SOD ve CAT enzim değişimleri belirlenmiştir. Bu ektermofilik fungusların antioksidan enzim aktivasyonu ve melanin üretiminin arttığı tesbit edilmiş ayrıca SOD, katalaz ve melanin gibi antioksidan savunma sistemi mekanizmalarıyla çeşitli stres faktörlerine karşı çok dirençli oldukları belirlenmiştir (Belozerskaya vd., 2010).

Zhdanova ve arkadaşları 1997-1998 yılları arasında yaptıkları çalışmada; Çernobil reaktörlerinden *A. alternata* türünü de içeren 37 tür 19 cins barındıran fungus izole edilmiştir. Funguslar nükleer güç santrallerinde izole edildikleri bölgede maruz kaldıkları radyasyon düzeyine göre kıyaslanmıştır. Radyoaktif kontaminasyonun artışına bağlı olarak ağır kontamine alanlarda melanin bulunduran türlerin biyoçeşitliliğinin ve yayılımının arttığı tesbit edilmiştir (Zhdanova vd., 2000).

Braghini ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmaya göre tahıl bitkisi üzerine inoküle edilen *A. alternata* belirli dozlarda gama radyasyona maruz bırakılmıştır. Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre 4-6 kGy gıdalardaki fungus varlığını tamamen inhibe ettiği bilinmektedir, ama yapılan bu çalışmada *A. alternata*'nın 5 kGy lik radyasyon dozunda sadece büyümesi yavaşlamış, ancak 10kGy lik radyasyonda fungal büyüme tamamen inhibe olmuştur (Braghini vd., 2009).

Shcherba ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları çalışmada; makromycetes ve mikromycetes grubu içerisindeki bazı funguslardan melanin izole edilmiştir. O-dianisidine (DA) peroksidaz enzimi ile bakteriyofaj- λ DNA'sında hasar oluşturulmuştur. DNA daki bu oksidasyon hasarı nükleik asit moleküllerinin çapraz bağlanma hareketlerinin elektroforetik incelemesiyle saptanmıştır. İndirekt karsinojenlerden olan Benzidine (BD) ve methyl (3,3'-dimethylbenzidine, DMBD ve 3,3',5,5' tetramethylbenzidine, TMBD) türevlerinin de fungal melaninler tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. *A. alternata*'dan izole edilen fungal melaninler tarafından benzidine ve türevlerinin 200 $\mu\text{g/ml}$ sinin neden olduğu hasarı iki kat azaltabildiği gözlemlenmiştir (Shcherba vd., 1999).

Geng ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada; farklı dozlardaki UV radyasyonu sonucu DNA plazmiti üzerinde melaninin koruyucu rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Florometrik ölçümler melaninin, UVA radyasyonu sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini (SOR) pigment konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak nötralize edebildiğini gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda melaninin UVB radyasyonu altındaki DNA plazmitinin koruyucu etkisi, melanin tarafından korunmayan DNA'ya göre 10 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. UV-C radyasyonu sonucu oluşan DNA hasarı (zincir kırıkları), laser-induced fluorescence capillary electrophoresis yöntemi ile belirlenmiştir. UV-C altında melaninin koruyucu etkisi olmadan süperkoil plazmit yapısının bulunma yüzdesi % 80 den % 5'lerin altına düşmüştür. Bütün bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda bakteriyel melaninin UV radyasyonuna karşı DNA'da oluşabilecek hasarları önlediği bu çalışmayla saptanmıştır (Geng vd., 2008).

Yehia ve Mahmoud'un 2004 yılında yaptıkları çalışmada *Alternaria alternata*, *Fusarium verticillioides* ve *Aspergillus pulverulents* fungusları radyonüklid içeren besiyerlerinde üretilmiştir. Fungusların radyoaktif kobalt (Co-60) ve radyoaktif sezyum (Cs-137) alımları ve funguslardan ekstrakte edilen toplam pigment miktarları ayrıca radyoizotoplarla bağlanma yetenekleri de tesbit edilmiştir. *A. alternata*'nın ürettiği melaninin, eklenen toplam radioaktif madde miktarının % 60'ını bağlamayı başardığı saptanmıştır. Bu çalışmada *A.alternata* radyoizotop alınımları için diğer iki fungusa göre en etkin tür olarak belirlenmiştir (Yehia ve Mahmoud, 2004).

Allam ve Abd El-Zaher'in 2012 yılında yaptıkları çalışmada *Aspergillus fumigatus*'un miselleri kademeli olarak UV ye maruz bırakılmış ve transmisyon

elektron mikroskobu (TEM) ile konidya ve miselyumlar gözlenmiştir. Melanin *A. fumigatus*'u 60 dakikalık UVA maruziyetine karşı hayatta kalmasını sağlamıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında *Bjerkandera adusta*'dan izole edilen melaninler *Candidasis* saptanmış deney farelerine verilmiştir. Sonuçlar melaninin immünojenik olabileceğini, Ig M'ye takviyede bulunduğunu, immün sistemi uyarabileceğini ve böylece de enfeksiyon derecesini azaltabileceğini göstermiştir. Bu deneyle melanin yardımıyla candidasisin azaldığı ve enfeksiyona yakalanmış farelerde böbrek faaliyetlerini güçlendirdiği saptanmıştır (Allam ve Abd El-Zaher, 2012).

Singaravelan ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bu çalışma, İsraildeki (Carmel dağı) çeşitli zorlu mikroklimatik çevre koşulları altındaki adaptasyonların gözlenmesi ve doğal seleksiyon çalışmalarının yürütülebilmesi için ideal bir ortam olan "Evolution Canyon" (EC) mikrokozmos evrimsel sisteminde yürütülmüştür. "Evolution Canyon" iki farklı bölgeye ayrılmıştır; "African slope" (AS) 200 m'lik uzaklıktaki "European slope" (ES) a göre %200-800 daha yüksek solar radyasyon miktarına sahiptir. Kuzey ve güney bölgelerde bulunan AS ve ES arasında çevresel koşulların ve yükseklik farkından dolayı oluşan bu UV doz farkı *Aspergillus niger* 'de farklı melanin miktarları oluşmasına yol açmıştır. Bu çalışmada AS adı verilen bölgede yüksek UV miktarına bağlı olarak *A. niger*'de daha yüksek melanin üretildiği saptanmıştır (Singaravelan vd., 2008).

Tseng ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada; entomopatojenik bir fungus olan *Metarhizium anisopliae*'ye *Agrobacterium* aracılığıyla *A. alternata*'dan alınan DHN melanin biyosentez geni aktarılmış ve bu sayede *M. anisopliae*'nin melanin üretmesi sağlanmıştır. Uzun yıllardan beri böceklerle karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılan *M. anisopliae*'nin genetik müdahale sonucu ürettiği melanin sayesinde UV-B radyasyona, ekstrem sıcaklıklara ve su stresine karşı yabani tipten daha dayanıklı olduğu ve fungusun virulansında artış meydana getirdiği belirtilmiştir. Gen transferi yapılmış fungusla enfekte olan *Plutella xylostella* (lahana yaprak güvesi) larvalarının yabani tipte enfekte olanlara kıyasla ortalama ölüm süresinin LT₅₀ düştüğü de saptanmıştır. Fungusun artan anti-stres kapasitesi ve virulansı sayesinde daha etkin bir biyokontrol ajanı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Tseng vd., 2011).

Schweitzer ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada; radyoimmunoterapi boyunca radyotoksositeye karşı kemik iliğini korumak amacıyla deney farelerine intravenöz yolla melaninle kaplanmış nanopartiküller aktarılmıştır.

Farelerin vücudunun tamamına 125 cGy'lik radyasyon verilmiş ve sonuçta melaninle kaplanmış nanopartiküller eksternal radyasyon veya radyo immunoterapi sırasında hematolojik toksisiteyi azaltmış, bunun yanı sıra tümör hücrelerinde herhangi bir koruma rolünün olduğu gözlemlenmemiştir (Schweitzer, 2010).

Marcel ML Cunha ve arkadaşları (2010) insan patojeni olan melaninli fungus *Fonsecaea pedrosoi*'nin üretildiği besiyerine tricyclazole (Tc) (DHN melanin biyosentez yolağı inhibitörü) ekleyerek melanin üretimi inhibe edilmiş *F.pedrosoi* ile çalışmışlardır. Bu çalışmada *F. pedrosoi* ile enfekte olmuş fare makrofajların nitrik oksit (NO) üretimi, oksidatif patlama ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (i-NOS) aktivitesinin arasındaki ilişki belirlenmiş ayrıca fungusların H₂O₂ ve NO dirençlilikleri elektron spin rezonansla tespit edilmiştir. Sonuç olarak melanize *F. pedrosoi* hücreleri NO ve H₂O₂' ye karşı Tc ile muamele edilmiş fungustan daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Melaninin NO yakalama kapasitesi makrofajların oksidatif patlamasından kaçmak için önemli bir mekanizma ve virülans faktör olduğu belirtilmiştir (Cunha vd., 2010).

Bryan ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada; melanize ve melanize olmayan *Cryptococcus neoformans* hücrelerinin görünür ışık, UV, gama radyasyon maruziyeti sonucu enerji seviyelerindeki (ATP konsantrasyonu) değişimleri tespit edilmiştir. ATP miktarı lusiferaz ve lusiferinin ATP bağımlı reaksiyonunun yaydığı ışık miktarının ölçülmesiyle saptanmıştır. Tüm radyasyon formlarının melanize *C. neoformans* hücrelerinde ATP seviyesinin azalmasına neden olduğu gözlenmiştir. Ama melanize olmayan hücrelerde görünür ışık ATP seviyesinin artmasına neden olmuş, gama radyasyonun herhangi bir değişikliğe neden olmamasına karşın, UV'nin ATP miktarını arttırdığı saptanmıştır. Bu artışın melanize hücrelerdeki artıştan çok daha küçük miktarlarda olduğu da vurgulanmıştır (Bryan vd., 2011).

Jacobson ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptıkları çalışmada; *Cryptococcus neoformans*'ın yabanıl tipi ve melanin üretimi genetiği değiştirilerek inhibe edilmiş albino *C.neoformans* mutantı kullanılmıştır. 37 °C ve 25 °C de yabanıl ve albino suşlarının U/mg protein cinsinden SOD aktiviteleri tespit edilmiştir. Yabanıl türlerde SOD'un 25 °C'de arttığı, 37 °C'de ise herhangi bir aktivite artışına rastlanmadığı belirtilmiştir. Yabanıl türlerde SOD'un sıcaklıkla ters orantılı ve melaninle birbirini tamamlayan bir mekanizma olduğu saptanmış, albino suşta ise SOD'un sıcaklıkla

ilgili bir bağlantısının bulunmadığı gözlemlenmiştir. Böylece melaninin SOD ile karşılaştırılabilecek önemli bir antioksidan olduğu belirtilmiştir (Jacobson vd., 1994).

Sharma ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada; *A. alternata*, *Trichoderma virens* ve *Curvularia lunata* funguslarının ürettiği pigmentlerin tekstil boyası olarak kullanımı amaçlanmıştır. Kùltürler PDB (patates dekstrozu broth)'de 28 °C'de statik koşullar altında inkübe edilerek, her üç fungustan da izole edilen pigmentlerin ayrı ayrı ipek ve yün kumaşları boyayabildiği ayrıca bu pigmentlerle boyanmış kumaşların yıkama ve ovalamaya karşı da dirençli olduğu belirlenmiştir. Pigmentten elde edilen bu boyaların, kumaşların esnekliğine karşı hiçbir yan etkisi gözlemlenmemiştir; ayrıca insan patojeni olan *Trichoderma virens*'ten elde edilen pigmentin insan derisine toksik olmadığı da saptanmıştır. Yapılan bu çalışmayla melaninin de içinde bulunduğu bu pigmentlerin ucuz ve doğaya zararlı olmayan tekstil boyası olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Sharma vd., 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada yüksek düzeyde melanin üreten bir fungus olarak bilinen *A. alternata* ve besiyerine trisiklazol eklenerek melanin üretimi inhibe edilmiş *A.alternata*'ya farklı UV dozları uygulanarak, UV-C radyasyonunun fungusun antioksidan enzim aktivite düzeylerinde ve glutatyon miktarlarında meydana getirdiği değişiklikler tespit edilmiştir. Diğer taraftan melanin üretiminin antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri tartışılmıştır.

3.1.Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan *A. alternata* yabanıl tipi Ege Üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bölümü, Mikoloji Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Mikoloji laboratuvarlarından alınan fungus için besi ortamı olarak potato dextrose agar (PDA), sabouraud dextrose agar (SDA) ve sabouraud dextrose broth (SDB) kullanılmıştır.

Bütün besiyerleri inokülasyon işlemi öncesinde 20 dakika 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavize edilmiştir. Ayrıca tüm inokülasyon işlemleri steril koşullar altında yapılmıştır.

3.2.Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan potato dextrose agar (PDA) Lab M firmasından, sabouraud dextrose agar (SDA) ve sabouraud dextrose broth (SDB) besiyerleri Merck firmasından temin edilmiştir. Ksantin, ksantin oksidaz, sitokrom-c, GSH (Redükte Glutatyon), GSSG (Okside Glutatyon), BSA (Bovine Serum Albumin), DTNB (5-5' ditiyobis 2-nitro-benzoik asit), GSSG-redüktaz (Glutatyon Redüktaz), SOD (Süperoksit Dismutaz), NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) ve NaOH (Sodyum Hidroksit) Sigma'dan; KH₂PO₄ (Potasyum dihidrojen fosfat), K₂HPO₄ (Potasyum Hidrojen Fosfat), NaH₂PO₄ (sodyum dihidrojen fosfat), EDTA

(Etilendaimintetraasetik asit) ve H₂O₂ (Hidrojen peroksit) ise Merck firmasından temin edilmiştir. Ayrıca trisiklazol Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.3. *Alternaria alternata* Stoklarının Hazırlanması ve Trisiklozol Eklenmesi

Fungus stokları SDA içeren petrilere üretilmiş ve 5 günlük kültürler +4 °C’ de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Buzdolabında saklanan fungus steril koşullar altında yatık PDA’ya iğne uçlu öze yardımıyla batırma yöntemiyle ekilmiştir. 28°C’ de etüvde 5 gün boyunca inkübe edilen yatık agardaki kültürler steril distile su ve öze yardımıyla kazınarak pipetle 1ml/50ml olmak üzere SDB besiyerine ekimleri yapılmıştır. Bu kültürler 28 °C’de 150 rpm’de çalkalanarak 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. 4. günün sonunda oluşan peletler (homojenizatör ucu otoklavize edilmiş) homojenizasyon aşamasının ardından deneyin sonraki aşamalarında kullanılmak için pipetle SDB besiyerlerine belirli miktarlarda fungus ekilmiştir.

Trisiklozol eklenecek besiyerlerinin hazırlanması için ise her 50 ml’lik sıvı besiyerleri otoklavize edildikten sonra, 0,75 mg trisiklozol / 0,5 ml etanol çözeltisi steril koşullar altında erlenlere eklenmiştir.

3.4. Fungusların UV-C Radyasyona Maruz Bırakılması

- ✓ Deneyin birinci aşamasında, fungal peletler stoktan SDB besiyerine eklenir eklenmez (inokülasyon işleminden hemen sonra) UV-C radyasyona maruz bırakılmıştır.
- ✓ Deneyin ikinci aşamasında, melanin ihhibisyonu için besiyerlerine trisiklazol eklenen funguslar yine inokülasyon işleminden hemen sonra UV-C’ye maruz bırakılmıştır.
- ✓ Deneyin üçüncü aşamasında ise 9 günlük üretimleri yapılan yaşlı fungus kültürlerinde (Gopalakrishnan vd., 2010) meydana gelecek enzimatik değişimleri saptamak amacıyla radyasyona maruz bırakılmıştır.

Deneyin bu üç aşamasında da kültürler sıvı besiyerinde, statik koşullar altında ve 12, 24, 48 ve 72 saat boyunca UV-C radyasyon uygulanmıştır.

Bu çalışmada Philips TUV 15Watt/G15 T8 254 nm dalga boyuna sahip 45 cm boyunda UV-C lambası kullanılmıştır. Örnekler şekil 3.1. deki gibi lambadan 11 cm

uzaklığa yerleştirilmiştir. Tavana 6 cm mesafe ile yerleştirilmiş UV-C radyasyon kaynağı 45 cm uzunluğunda 254 nm dalga boyundadır. Işınlama için 90x60x70 cm boyutlarındaki alüminyum ile kaplı tahta bir kabin kullanılmıştır. Lamba üst ışınlama mesafesi lambanın yüzeyinden 11 cm uzaklıktadır. Lambanın yüzeyinden 1cm mesafede 15 w'lık bir gücünün olduğunu düşünürsek 11 cm mesafede güç değeri 0,124 watttır. 11 cm mesafedeki ışınlama için ise 46x13 cm'lik (0,46x0,13 m) bir yüzey alanı ışınlanmıştır. cm^2 başına güç ise $2,07 \times 10^{-4} \text{ watt/cm}^2$ dir (m^2 başına $2,07 \times 10^{-8} \text{ watt/m}^2$).

UV ile ışınlama süresi	Doz Değeri
12 saat (43200 saniye)	0,248 ($\mu(\text{Wh})/\text{m}^2$) - 8,9 ((Ws)/ cm^2)
24 saat (86400 saniye)	0,497 ($\mu(\text{Wh})/\text{m}^2$) - 17,9 ((Ws)/ cm^2)
48 saat (172800 saniye)	0,994 ($\mu(\text{Wh})/\text{m}^2$) - 35,8 ((Ws)/ cm^2)
72 saat (259200 saniye)	1,490 ($\mu(\text{Wh})/\text{m}^2$) - 53,7 ((Ws)/ cm^2)

Çizelge 3.1. Uygulama süresine bağlı olarak uygulanan doz değerleri.



Şekil 3.1. Fungusların UV-C'ye maruz bırakılması.

3.5. Fungusların UV-C Uygulaması Sonrası Alınması: Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifüjasyonu

UV-C uygulaması sonrası süresi bitip çıkarılan erlenlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- ✓ Alınan örnekler Whatman filitre kağıdından geçirilerek besiyerinden ayrıldı.
- ✓ Besiyerinden ayrılan örnekler tartılarak ağırlıkları alındı.

- ✓ Örnekler homojenizasyon tamponuyla (pH=7,4 PBS) ağırlığının 4 katı kadar sulandırdı.
- ✓ Buz içerisinde 10.000 devirde 15 dakika belirli aralıklarla homojenize edildi
- ✓ Homojenat buz içinde 30 sn aralıklarla 4 dakika (SONICS Vibra cell marka sonifikatör) sonifiye edildi.
- ✓ 15000 devirde/ 15 dk/ +4C’de santrifüj edildi.
- ✓ Süpernatant kısmı alınarak enzim aktivite ölçümlerinin yapılması için ependorflara konuldu.

3.6. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması

UV-C uygulaması sonrasında *A.alternata* için homojenizasyon, sonifikasyon ve santrifügasyon işlemlerinden sonra ependorflara alınan örnekler enzim tayininde kullanmak üzere -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.7. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi tayin işlemlerinde spektrofotometre (SHIMADZU UV-visible Spectrophotometer UV-1601) ve protein tayini için mikropipet okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax®) kullanılmıştır. Bütün enzimlerin aktiviteleri her uygulama için üç tekrarlı olarak ölçülmüştür.

3.7.1 Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz aktivitesi Luck (1963) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiştir (Luck, 1963). Enzim aktivitesi 1 dakika boyunca 240 nm dalga boyunda absorbans değişimi (Shimadzu-UV-1601, UV/visible) H₂O₂ tüketimine bağlı olarak tespit edildi. Bu amaçla 1ml kuvarz küvete pH=7 olan 1/15 M’lık Sodyum–Potasyum (KH₂PO₄ –NaHPO₄) tamponu ve 100 µl süpernatant pipetlenmiştir. Spesifik aktivite µmol/dk/mg protein cinsinden hesaplanmıştır.

3.7.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivite tayini Mc Cord ve Fridovich (1969) yöntemine göre yapılmıştır (Mc Cord ve Fridovich, 1969). Enzim aktivite tayini için pH= 7,8'lik 50 mM K_2HPO_4 tamponu, 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponu, 0,2 U/ ml ksantin oksidaz, 10 mM Ksantin ve 1 mM sitokrom-c çözeltileri kullanılarak A ve B çözeltileri hazırlanmıştır. A çözeltisi; 0,76 mg (5 mol) ksantin 10 ml 0,001 N NaOH'daki çözeltisine 24,8 mg (2 mol) sitokrom c'nin 100 ml 50 mM pH = 7,8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırılmıştır. B çözeltisi için taze olarak hazırlanan ksantin oksidaz (0,2 u/ml) 0,1 mM EDTA içerisinde hazırlanmıştır. Ölçüm ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokromc' yi indirgemesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanmaktadır. Bu amaçla 3 ml'lik kuvartz küvetine 2,9 ml A çözeltisi ve 50 µl örnek ilave edildikten sonra 50 µl B çözeltisi eklendi. 550 nm de 1 dakikalık absorbans değişikliği okundu. Kör için örnek yerine distile su eklenmiştir.

Kalibrasyon grafiği çizmek için saf SOD enzimiyle belli konsantrasyonlardaki ($5 \cdot 10^{-7}$ M) SOD çözeltilerinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl'deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bulunan değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite hesaplanmıştır.

3.7.3. Glutasyon S- Transferaz Aktivitesinin Ölçümü

Habig ve arkadaşlarının (1974) yöntemiyle yapılan glutasyon S-transferaz aktivite tayini için Tris-HCl tamponu (pH: 7,4) içerisinde hazırlanmış 0,002 M redükte glutasyon, etanol içerisinde hazırlanmış 0,15 M CDNB (1-chloro,2-4 dinitrobenzen) ve 0,1 M potasyum fosfat tamponu (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) (pH=6,5) kullanılmıştır. Spektrofotometrik yöntemle yapılan enzim aktivitesi tayini için; 1ml'lik küvete sırasıyla 400 µl potasyum fosfat tamponu, 400 µl redükte glutasyon, 50 µl süpernat ve 100 µl CDNB pipetlenmiştir. Daha sonra 344 nm'de 1 dakika süresince absorbansları okunmuştur (Habig vd., 1974). Kör olarak ise etanol kullanılmıştır. Örneklerin absorbansları okunduktan sonra mililitredeki enzimin ünite

sayısı hesaplanmıştır. Daha sonra enzimin ünite sayısı süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite hesaplanmıştır.

3.7.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon redüktaz aktivite tayini Carlberg ve Mannervik (1985) yöntemiyle yapılmıştır. Bunun için pH = 7.0'lık 0,2 M potasyum fosfat tamponu (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) (2 mM EDTA içinde) ve enzim aktivitesi ölçülürken taze olarak hazırlanan 2 mM NADPH/Tris HCl (pH =7.0) ve distile su içinde 20 Mm GSSG kullanılmıştır (Carlberg ve Mannervik, 1985). GR enzim aktivitesinin ölçümü için potasyum fosfat tamponu 30°C' de inkübe edilmiş, daha sonra kör tüp hazırlamak için 1 ml'lik küvete fosfat tamponundan 0,5 ml konulup, üzerine 100 µl NADPH, 100 µl GSSG ve son hacim 1 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Absorbans okunacak küvete ise kör tüpten farklı olarak 200 µl distile su, 100 µl örnek eklenip bir kez karıştırıldıktan sonra 340 nm' de 1dakika süresince absorbans okunarak glutasyon redüktaz aktivitesi hesaplanmıştır. Bu değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite hesaplanmıştır.

3.7.5. Glutasyon (GSH) Miktar Tayini

Redükte glutasyon miktar tayini, Akerboom ve Sies (1981) yöntemiyle yapılmış. Bunun için 6,3 mM EDTA içeren 125 mM'lık sodyum disülfat tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) hazırlanmıştır. Tampon redükte glutasyon tayini yapılacağı zaman mililitresinde 0,248 mg NADPH olacak şekilde taze olarak hazırlanmıştır (pH: 7,5). DTNB de, tamponun mililitresinde 2,378 mg olacak şekilde taze olarak hazırlanmıştır. Taze olarak hazırlanmış NADPH'lı tampondan 700 µl ve DTNB'den 100 µl olacak şekilde etiketlenmiş deney tüplerine aktarılmıştır. Bu deney tüpleri 30 °C'deki sıcak su banyosunda inkübe edilerek, kör tüp için 200µl, örnek tüpler için de 185 µl distile su eklenmiş ve pastör pipetle iki kez karıştırıldıktan sonra 10-12 dakika beklenmiştir. Daha sonra 700 µl NADPH, 100 µl DTNB, 180 µl distile su içeren karışım, 1 ml'lik spektrofotometre küvetine aktarıldıktan sonra 5 µl glutasyon redüktaz, 20 µl süpernatan eklenerek 412 nm'de 1 dakika süresince absorbansları okunmuştur. Daha sonra redükte glutasyon tayini yapmak için çizilen standart

grafikten süpernatantlardaki toplam glutasyon miktarı dikkate alınarak redükte hesaplamalar yapılmıştır (Akerboom ve Sies, 1981). Bulunan değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite hesaplanmıştır.

3.7.6. Total Protein Tayini

Bradford ve arkadaşlarının (1980) yöntemiyle, total protein tayini için 5 µl süpernatant mikrolakalara pipetlenip ve üzerine 250 µl Bradford reaktifi eklenerek reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu sistemi kullanılarak absorbansları ölçüldü (Bradford vd., 1980). Protein miktarları saptanırken BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırma yapılarak örnekteki total protein değerleri hesaplandı.

3.8. İstatiki Analizler

Enzim aktivite tayinlerinden elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistiksel paket program (MedCalc for Windows”) kullanılmıştır. Uygulama grupları arasında her bir zaman diliminde enzim aktiviteleri arasındaki farklılığın incelenmesi ve her bir uygulama grubundaki zamana bağlı değişimin test edilmesi amacıyla Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal Wallis testi sonrası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

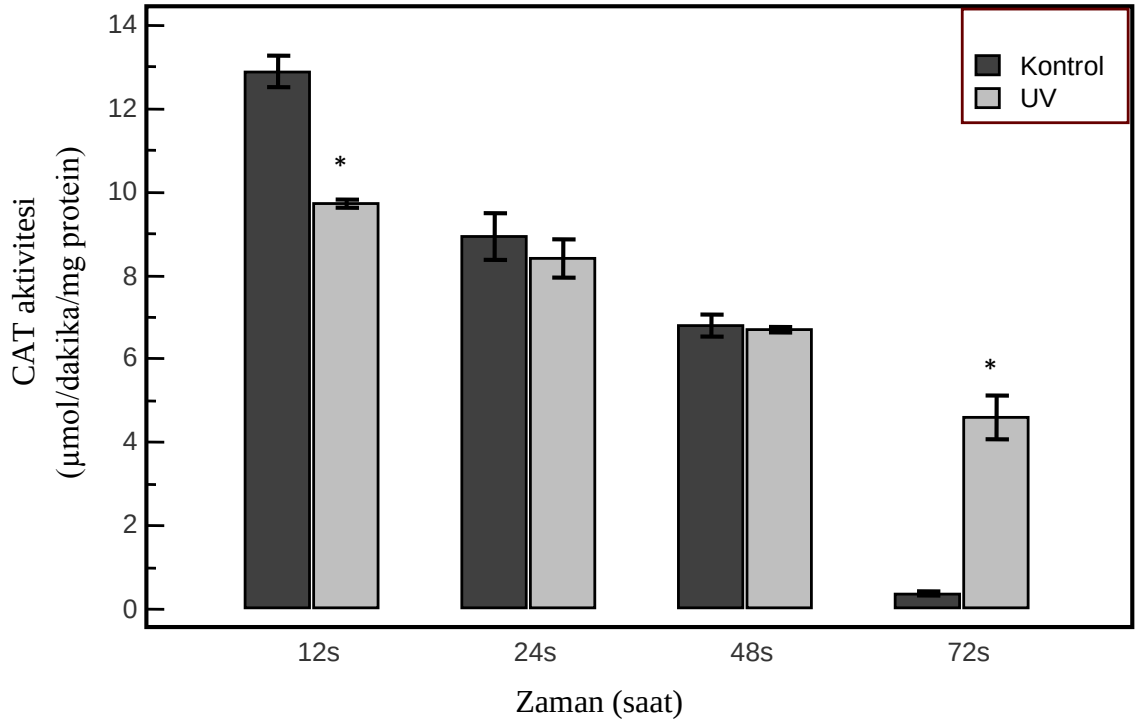
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. UV-C Radyasyona Maruz Bırakılan *Alternaria alternata* Fungusunun Antioksidan Enzimlerinin Aktiviteleri ve Glutasyon Miktarındaki Değişimler

Farklı dozlarda uygulanan UV-C radyasyonun antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, funguslar inokülasyon sonrası, 9 günlük kültürler ve trisiklazol eklenen kültürler ve her birinin kontrolleri olmak üzere UV-C'ye maruz bırakılan grupların enzim aktiviteleri ve glutasyon (GSH) miktarlarındaki değişimler saptanmıştır.

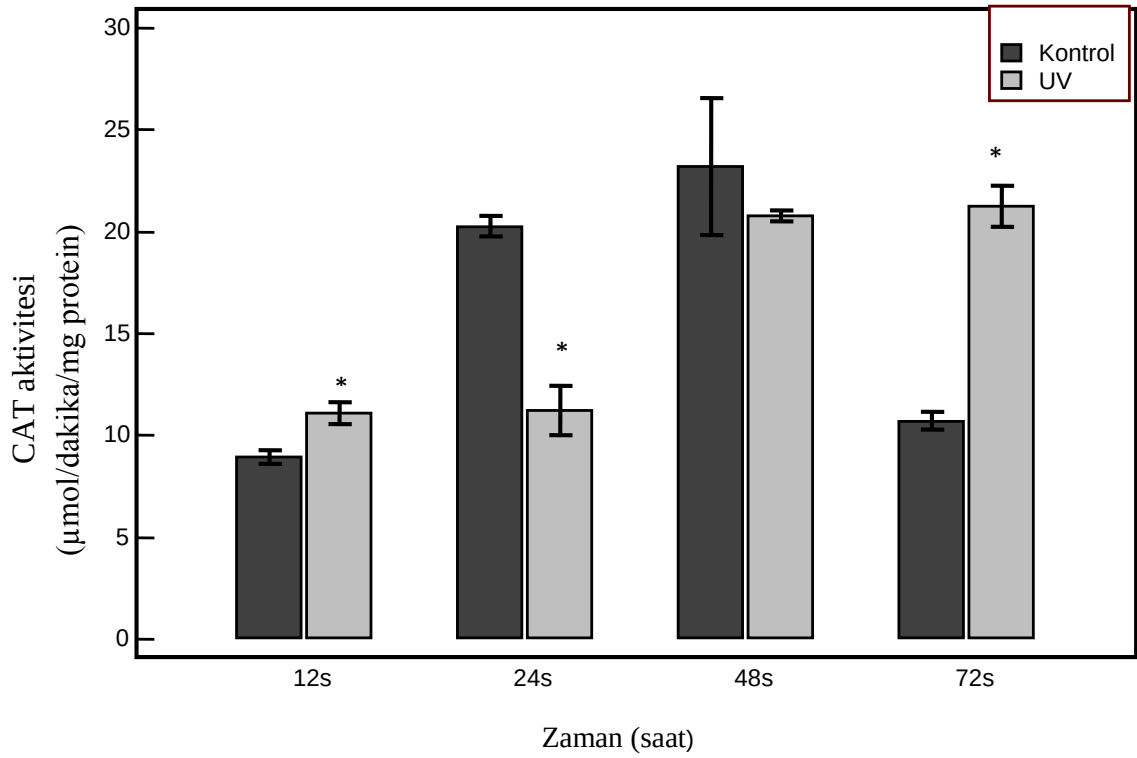
4.1.1. Katalaz Aktivitesi

İnokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C maruziyetinin katalaz enzimi üzerindeki etkileri incelendiğinde, hem kontrol hemde uygulama grubundaki enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak inhibe olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). 12 saatlik uygulamada kontrole göre UV-C uygulaması katalaz aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir ($p<0,05$). 24. ve 48. saatlerde kontrol ve uygulama grubu arasında istatistiksel anlamda bir fark gözlenmezken, 72. saatte ise uygulama grubunda CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Radyasyon uygulanmış gruptaki en yüksek CAT aktivitesi 12. saatte 9,7 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein iken, en düşük aktivite 72. saatte 4,6 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu gözlenmiştir.



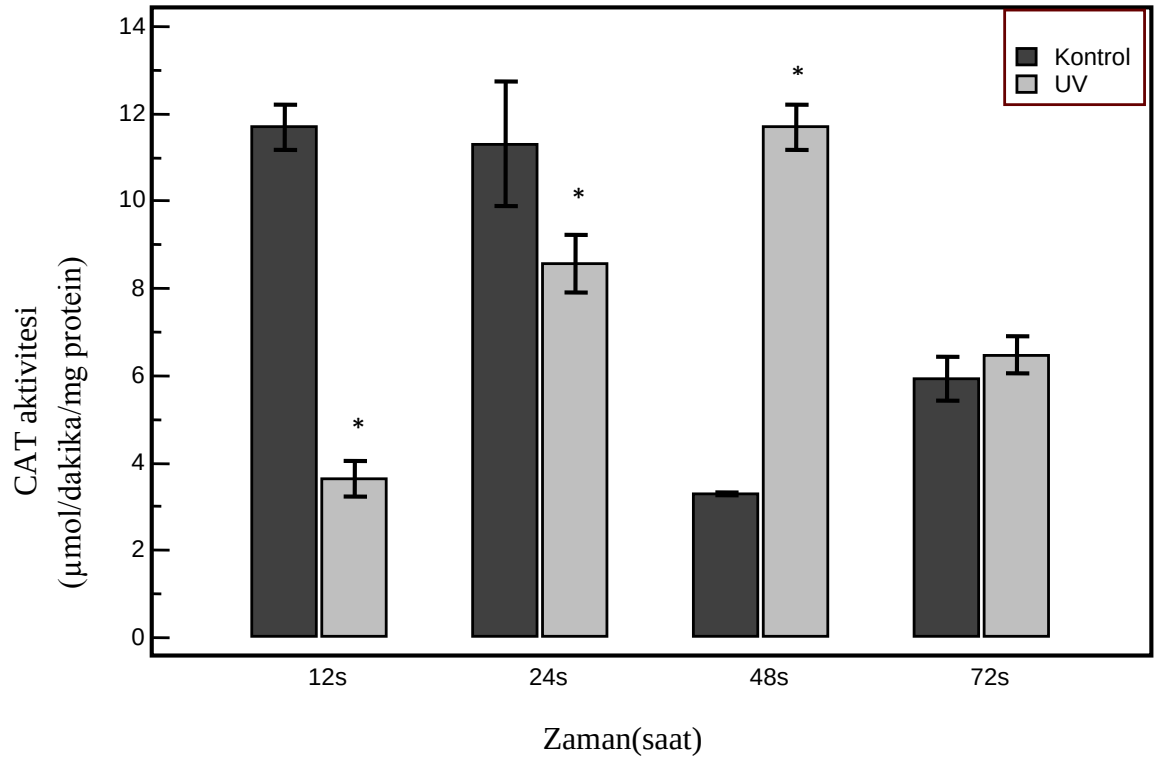
Şekil 4.1. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan *A. alternata*'nın katalaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

9 günlük kültürlerinin farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalması katalaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.2). Uygulama grupları karşılaştırıldığında UV-C'ye maruz kalma süresine paralel olarak enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12 ve 72 saatlik UV-C uygulamasında CAT aktivitesinin kontrole göre arttığı saptanmıştır ($p<0,05$). 24 saatlik uygulamada ise CAT aktivitesinin kontrole göre inhibe olduğu tesbit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.2. *A. alternata*'nın 9 günlük kültürlerine UV-C uygulanması sonucu CAT aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p < 0,05$).

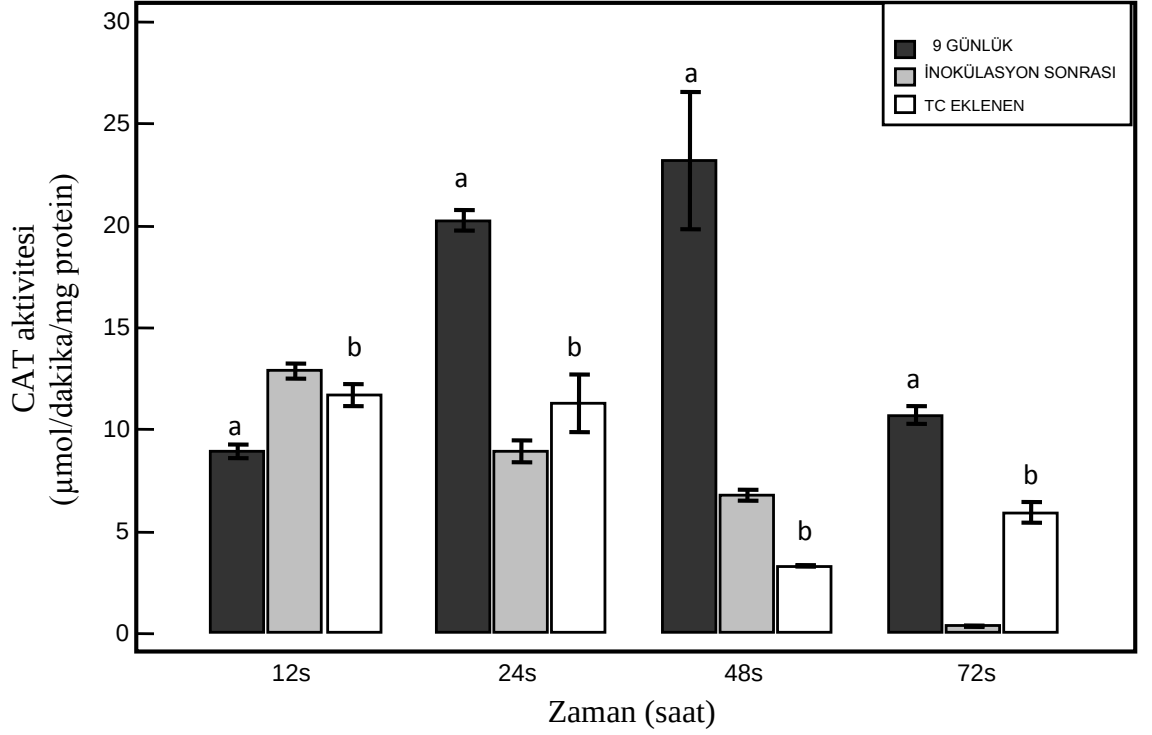
Besiyerine trisiklazol eklenmiş kültürlerde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın katalaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.3.). Kontrol gruplarında 12. ve 24. saatlerdeki aktivitenin 48 ve 72. saatlerdeki aktiviteye göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Uygulama gruplarında 48. saate kadar CAT aktivitesi artarak $11,698 \pm 0,5238$ μmol/dk/mg protein düzeyine ulaşmış, 72. saatte ise aktivitenin azaldığı saptanmıştır. Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında ise 12 saatlik ve 24 saatlik UV-C uygulamasının CAT aktivitesini inhibe ettiği tesbit edilmiştir ($p < 0,05$). 48. saatte ise kontrole göre önemli düzeyde aktivite artışı görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 4.3. Besiyerine trisiklazol eklenmiş *A. alternata* kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu CAT aktivite değişimlerinin kontrol ile karşılaştırılması * ($p < 0,05$).

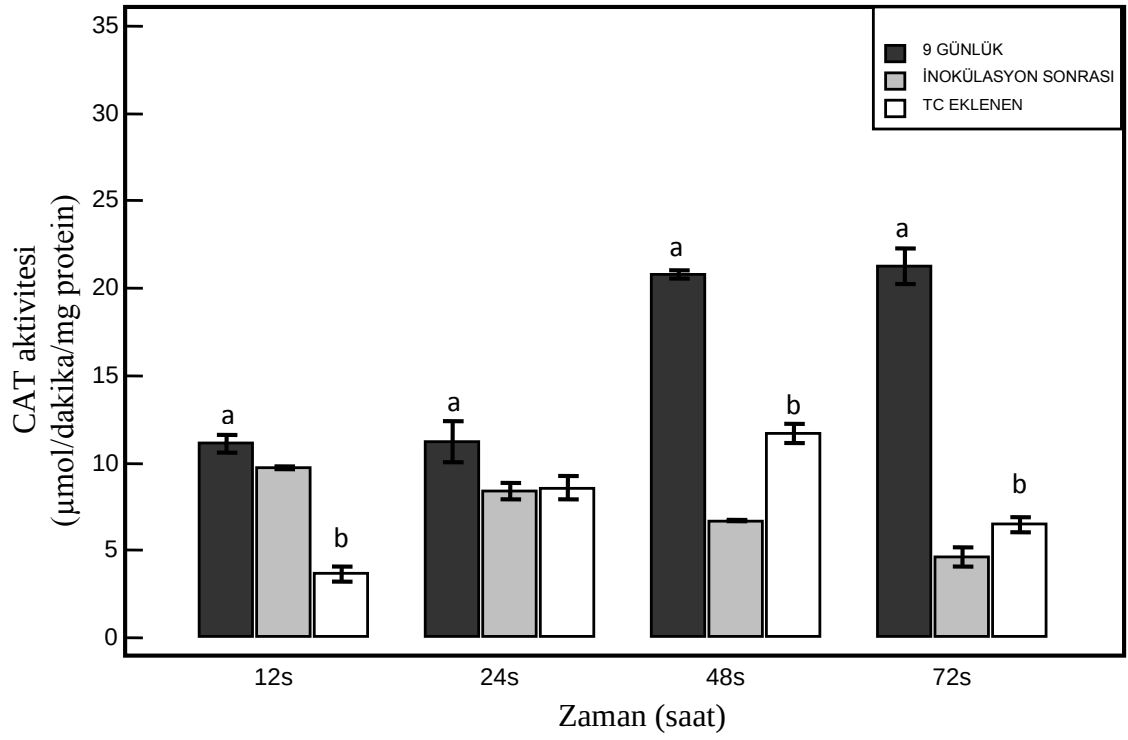
İnokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan, 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan ve Tc eklenen üç grubun kontrollerinin CAT enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4). 24., 48. ve 72. saatlerde 9 günlük kültürlerin enzim aktiviteleri diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksektir ($p < 0,05$). 12. saatte ise gruplar arası katalaz aktivite değeri çok farklı olmamakla birlikte, İnokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan grubun CAT aktivitesinin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Gruplar arası kontrol grupları karşılaştırıldığında en yüksek CAT aktivitesi 9 günlük inkübe edilen grupta 48.saatte $23,209 \pm 3,3381$ $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein düzeyine ulaşmış iken, en düşük

aktivite inkübasyondan hemen sonra uygulama yapılan grupta 72. saatte $0,370 \pm 0,05736 \mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubunun kontrol gruplarındaki katalaz aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

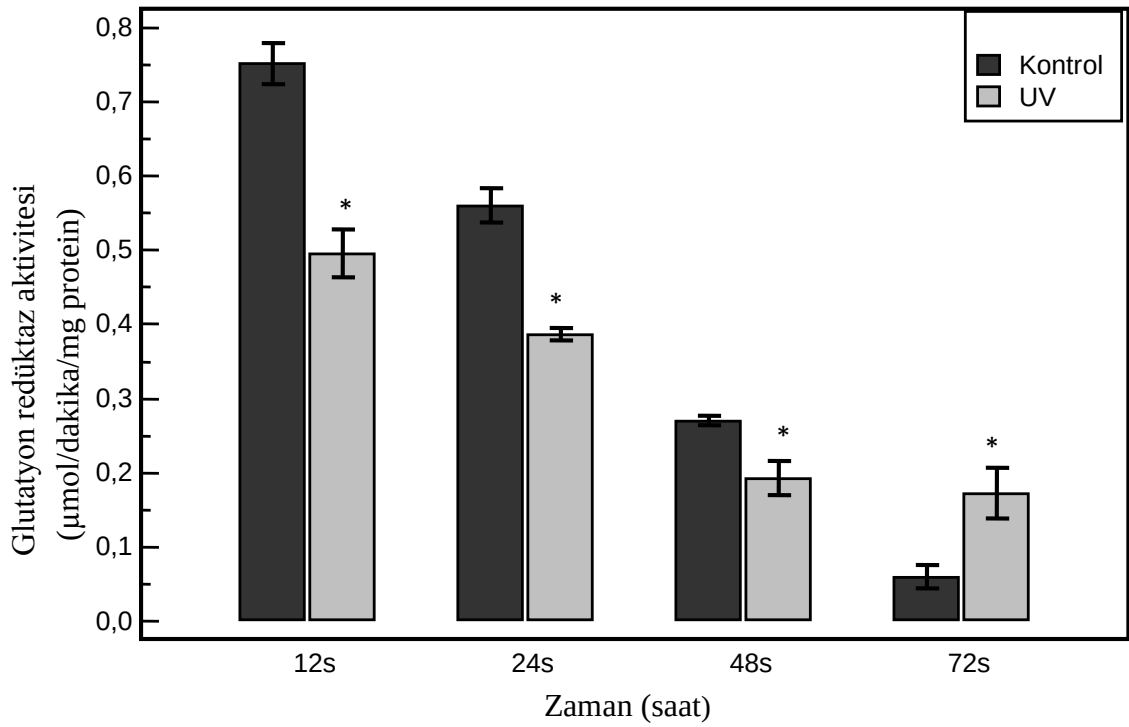
İnokülasyon işleminden hemen sonra, 9 günlük inkübasyondan sonra ve Tc eklenen besiyeri içerisinde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C uygulama yapılan üç grubun CAT enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5). Bütün uygulama sürelerinde 9 günlük kültürlerin enzim aktivitelerinin diğer gruplara göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.5. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulaması sonrasındaki katalaz aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p<0,05$)^a ; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p<0,05$)^b.

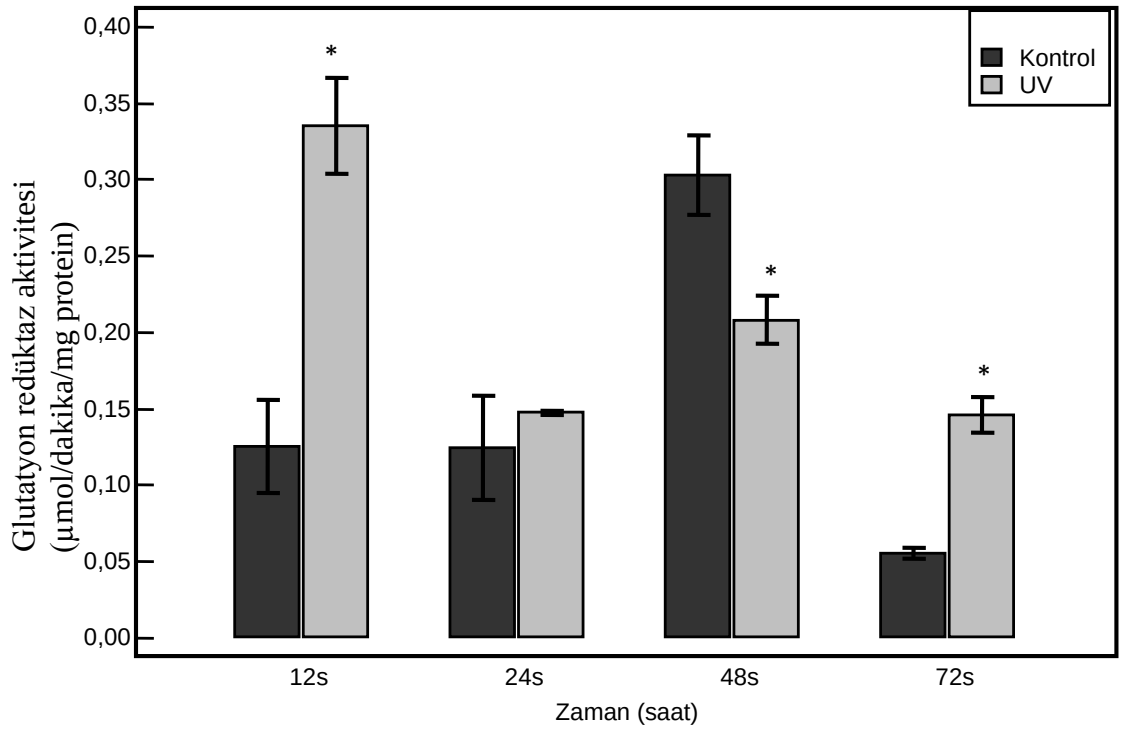
Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

İnokülasyon sonrası farklı sürelerde UV-C uygulamasının glutasyon redüktaz enzimi üzerindeki etkileri incelendiğinde (Şekil 4.6) hem kontrol hemde uygulama grubundaki enzim aktivitesinin zaman bağılı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). UV-C uygulaması yapılmış gruplar arasındaki en yüksek GR aktivitesi 12. saatte $0,496 \pm 0,0327$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak belirlenmiştir. 12, 24, 48 saatlik UV-C uygulanan gruplarda glutasyon redüktaz aktivitesinin kontrole göre inhibe olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 72. saatte ise uygulama grubunda glutasyon redüktaz aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı tesbit edilmiştir ($p<0,05$).



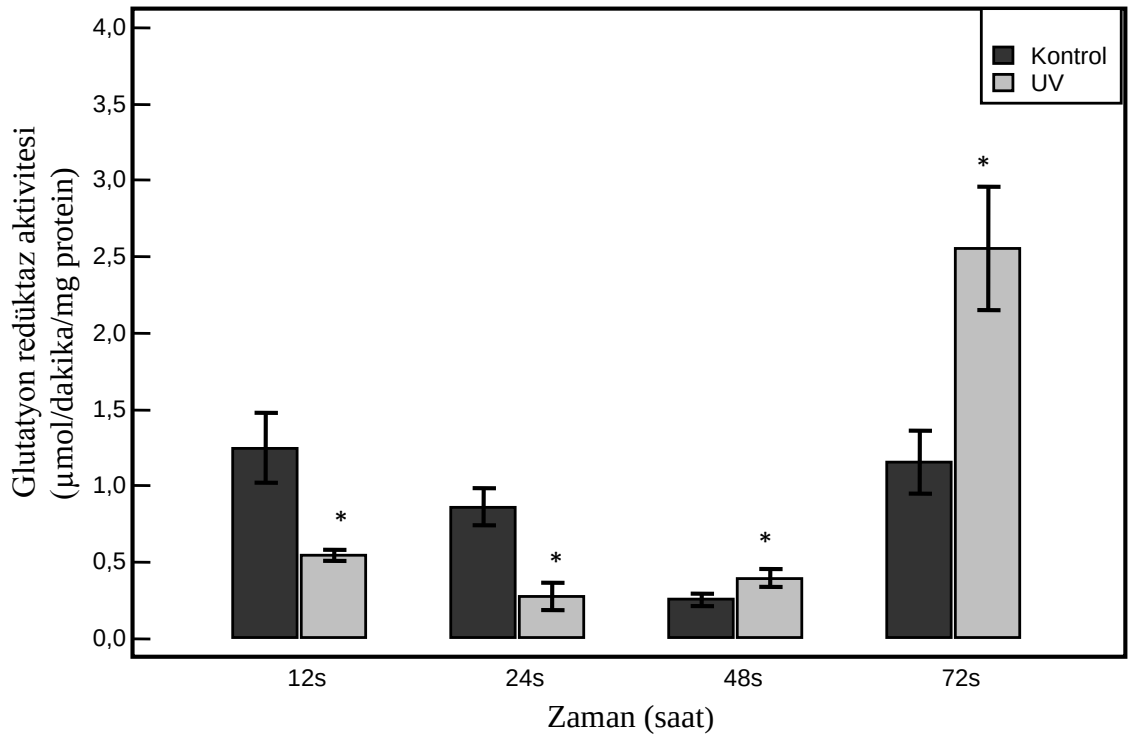
Şekil 4.6. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan *A. alternata*'nın glutasyon redüktaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

9 günlük kültürlerde farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.7). Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12. ve 72. saatte UV-C uygulaması enzim aktivitesinde artışa neden olurken ($p<0,05$), 48 saatlik uygulamanın aktiviteyi inhibe ettiği gözlenmiştir ($p<0,05$). 12 saatlik radyasyon uygulaması sonucunda en yüksek GR enzim aktivitesi $0,335 \pm 0,03172$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak saptanmıştır.



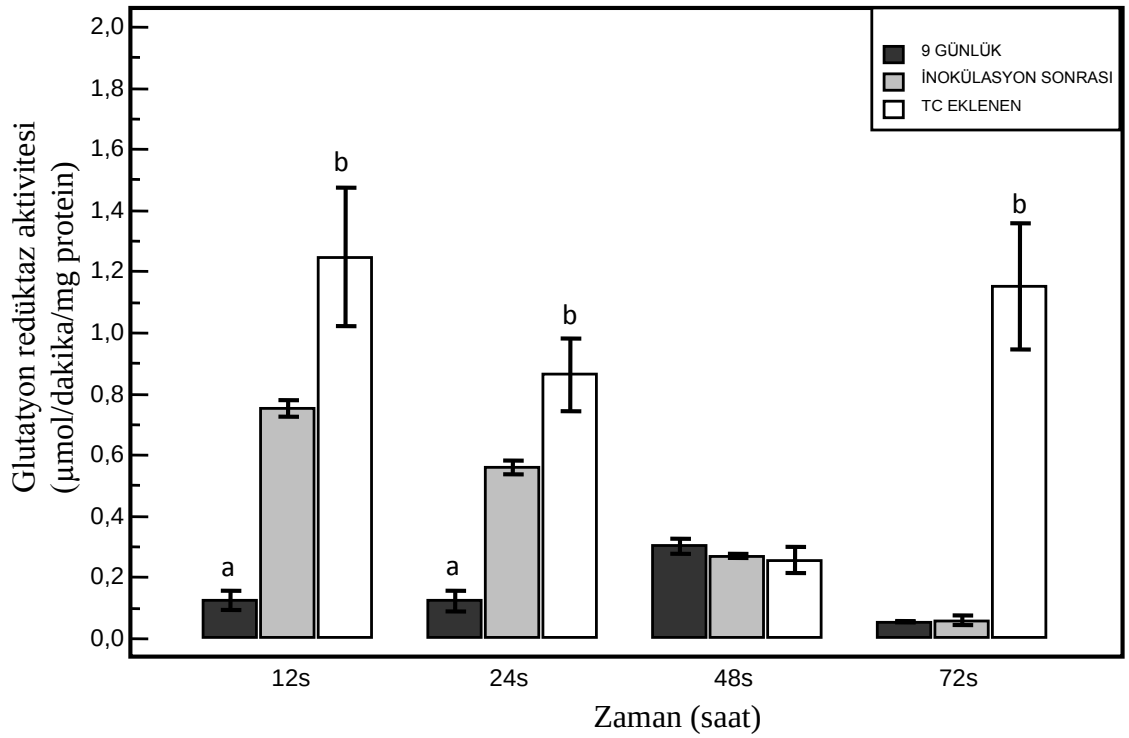
Şekil 4.7. *A. alternata*'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon redüktaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

Besiyerine trisiklazol eklenmiş kültürlerde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın glutatyon redüktaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.8). Kontrol gruplarında CAT enziminde olduğu gibi 48. saate kadar glutatyon redüktaz aktivitesi düşmüş, 72. saatte ise aktivitenin tekrar arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Uygulama gruplarında 12, 24 ve 48. saatler arasında istatistiksel anlamda önemli bir değişim olmazken 72. saatte aktivitenin arttığı tesbit edilmiştir. Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12 saatlik ve 24 saatlik UV-C uygulamasının CAT enziminde olduğu gibi glutatyon redüktaz aktivitesini de inhibe ettiği saptanmıştır ($p<0,05$). 48. ve 72. saatte ise uygulama grubundaki enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).



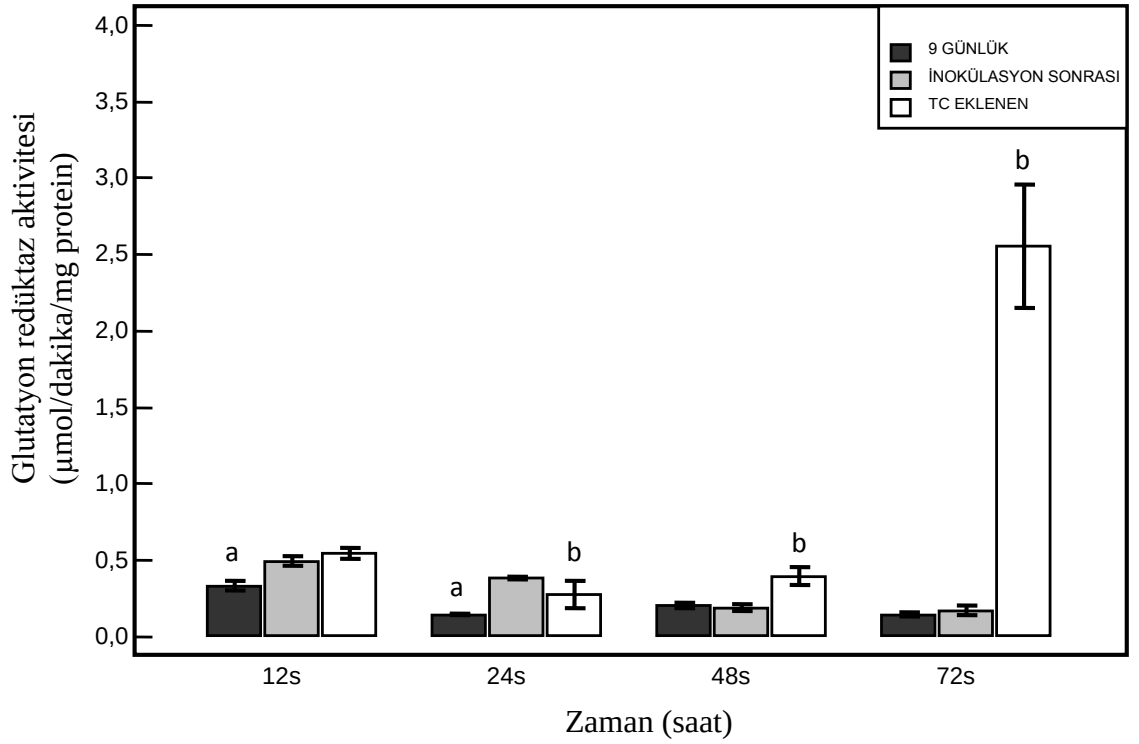
Şekil 4.8. Besiyerine trisiklazol eklenmiş *A. alternata* kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon redüktaz aktivite değişimlerinin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

İnokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan, 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan ve Tc eklenen üç grubun kontrollerinin GR enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.9). 12., 24. ve 72. saatlerde Tc eklenmiş besiyeri içerisinde üretim yapılan grubun enzim aktiviteleri diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Tc eklenmiş besiyeri içerisinde üretim yapılan grubun enzim aktiviteleri 12. saatte $1,248 \pm 0,2280$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein, 24. saatte $0,865 \pm 0,1190$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein, 72. saatte ise $1,153 \pm 0,2056$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.9. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubu içerisindeki kontrol gruplarının GR aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

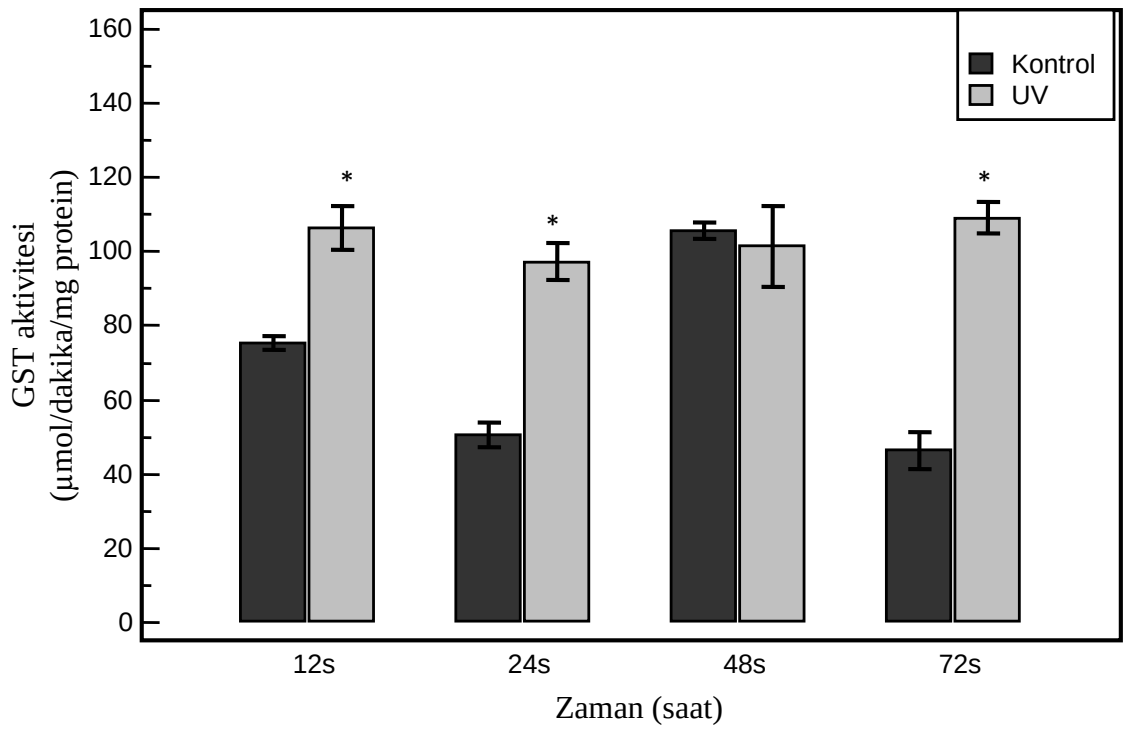
İnokülasyon işleminden hemen sonra, 9 günlük inkübasyondan sonra ve Tc eklenen besiyeri içerisinde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C uygulaması yapılan üç grubun GR enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.10). 12., 24., 48. saatler karşılaştırıldığında gruplar arası çok belirgin bir aktivite farkı gözlenmemiştir. 72. saatte ise Tc eklenmiş besiyeri içerisinde uygulama yapılmış grupta $2,554 \pm 0,4033$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein enzim aktivite değeri saptanmış ve enzim aktivitesinin diğer gruplara göre çok belirgin düzeyde indüklendiği tesbit edilmiştir.



Şekil 4.10. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulaması sonucu GR aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

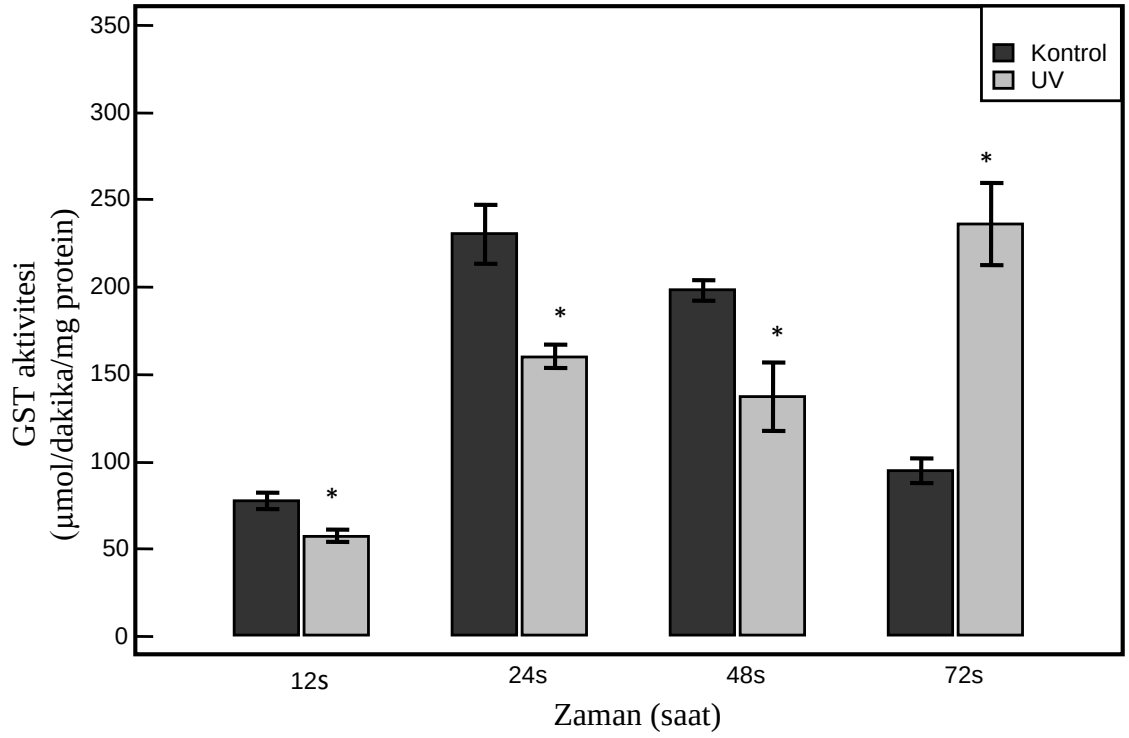
Glutasyon S-Transferaz aktivitesi

İnokülasyondan hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalan grupta, UV-C'nin glutasyon S-transferaz enzimi üzerindeki etkileri incelendiğinde (Şekil 4.11) 12, 24. ve 72. saatte UV-C uygulaması, kontrole göre enzim aktivitesinde önemli düzeyde artışa neden olurken ($p<0,05$), uygulamanın 48. saatte kontrole göre önemli bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir ($p> 0.05$).



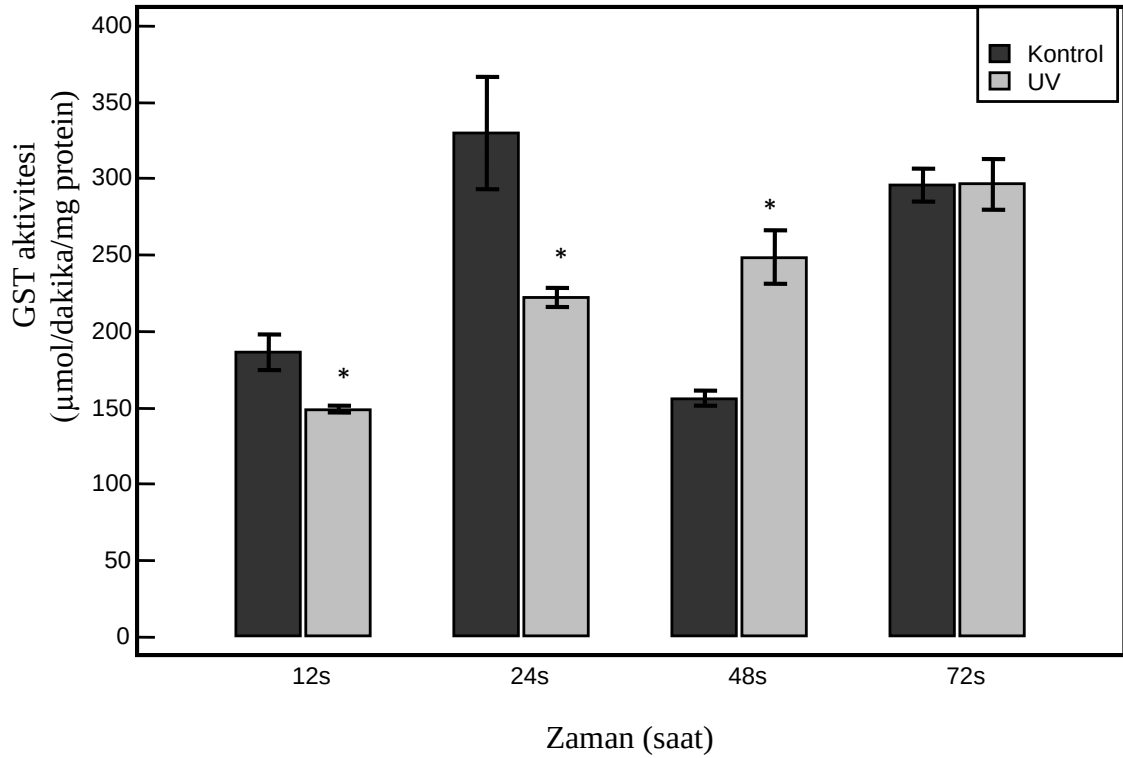
Şekil 4.11. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan *A. alternata*'nın sonucu glutasyon S-transferaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

9 günlük kültürlerin farklı sürelerde UV-C' ye maruz bırakılmasının, glutatyon S-transferaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.12). Uygulama grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 12, 24 ve 48 saatlik UV-C uygulamalarının glutatyon S-transferaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır ($p<0,05$). Kültürlerin 72 saat UV-C'ye maruz kalması ise enzim aktivitesinde $236,323 \pm 23,5440$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein değerine ulaşarak önemli düzeyde artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).



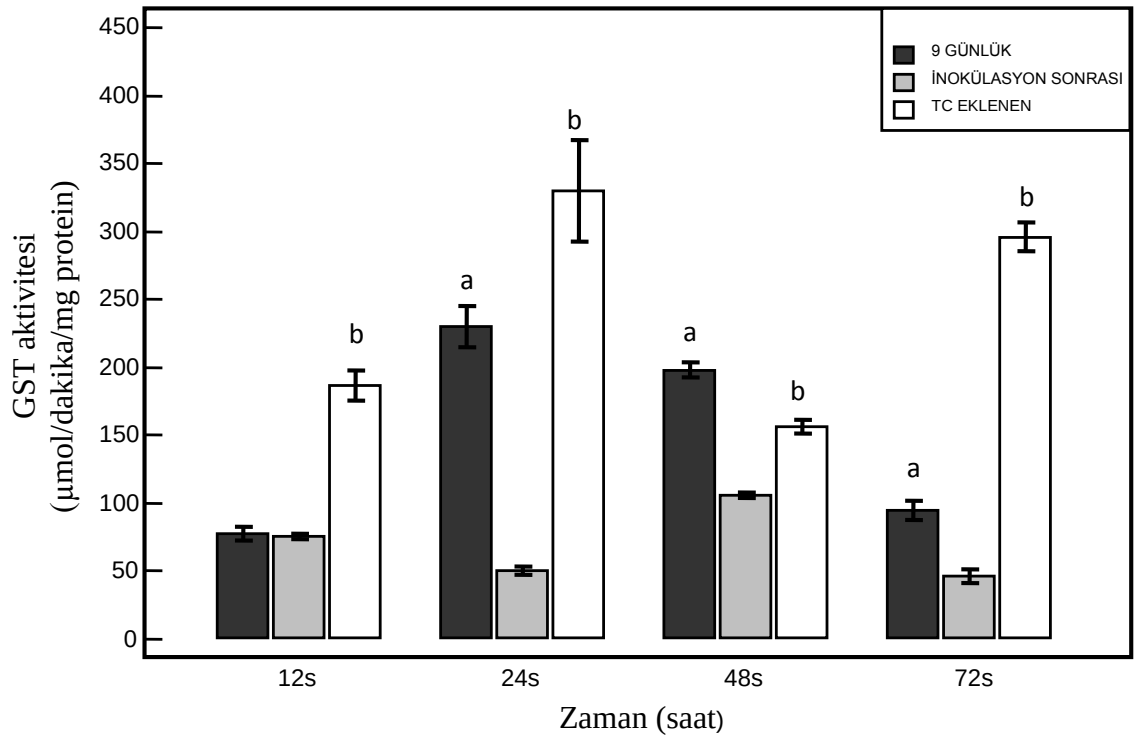
Şekil 4.12. *A. alternata*'nın 9 günlük kültürlerine UV-C uygulanması sonucu glutatyon S-transferaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

Besiyerine trisiklazol eklenmiş kültürlerde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C ye maruz kalmanın glutatyon S-transferaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.13). Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12 saatlik ve 24 saatlik UV-C uygulamasının enzim aktivitesini inhibe ettiği 48. saatte ise enzim aktivitesini arttırdığı tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Uygulama grupları arasındaki en düşük GST aktivitesi 12. saatte $149,112 \pm 2,0768$ $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$, en yüksek aktivite ise 72. saatte $296,478 \pm 16,6918$ $\mu\text{mol/dakika/mg protein}$ olarak belirlenmiştir. 72. saatte ise kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p> 0.05$).



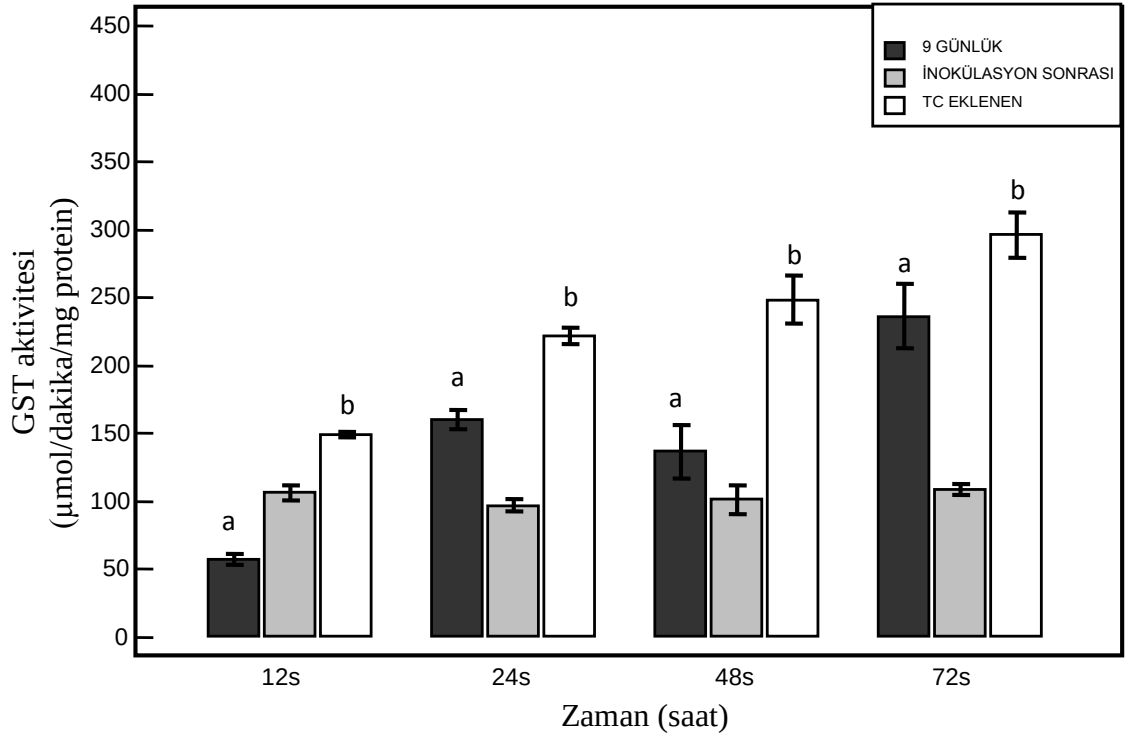
Şekil 4.13. Besiyerine trisiklazol eklenmiş *A. alternata* kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon S-transferaz değişimlerinin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

İnokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan, 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan ve Tc eklenen üç grubun kontrollerinin GST enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.14). 12., 24. ve 72. saatlerde glutatyon redüktaz enziminde olduğu gibi Tc eklenmiş besiyeri içerisinde üretim yapılan grubun enzim aktiviteleri diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). 48. saatte ise 9 günlük inkübasyon sonrası uygulama yapılan grubun kontrolünün enzim aktivitesinin diğer iki gruptan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.14. *A. alternata*'nın kontrol gruplarının üç farklı uygulama için glutatyon S-transferaz aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

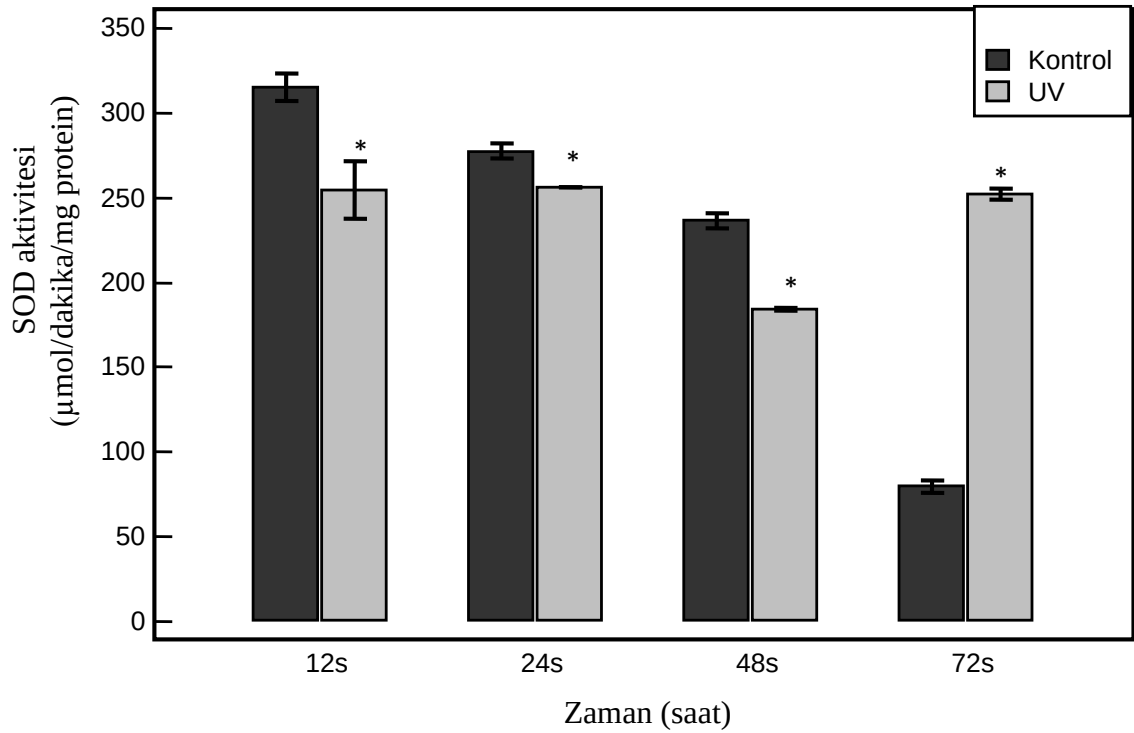
İnokülasyon işleminden hemen sonra, 9 günlük inkübasyondan sonra ve Tc eklenen besiyeri içerisinde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C uygulama yapılan üç grubun GST enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15.). Bütün uygulama sürelerinde Tc eklenmiş besiyeri içerisinde üretim yapılarak radyasyona maruz bırakılan grubun GST aktivitesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4.15. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulanması sonucu glutatyon S-transferaz aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

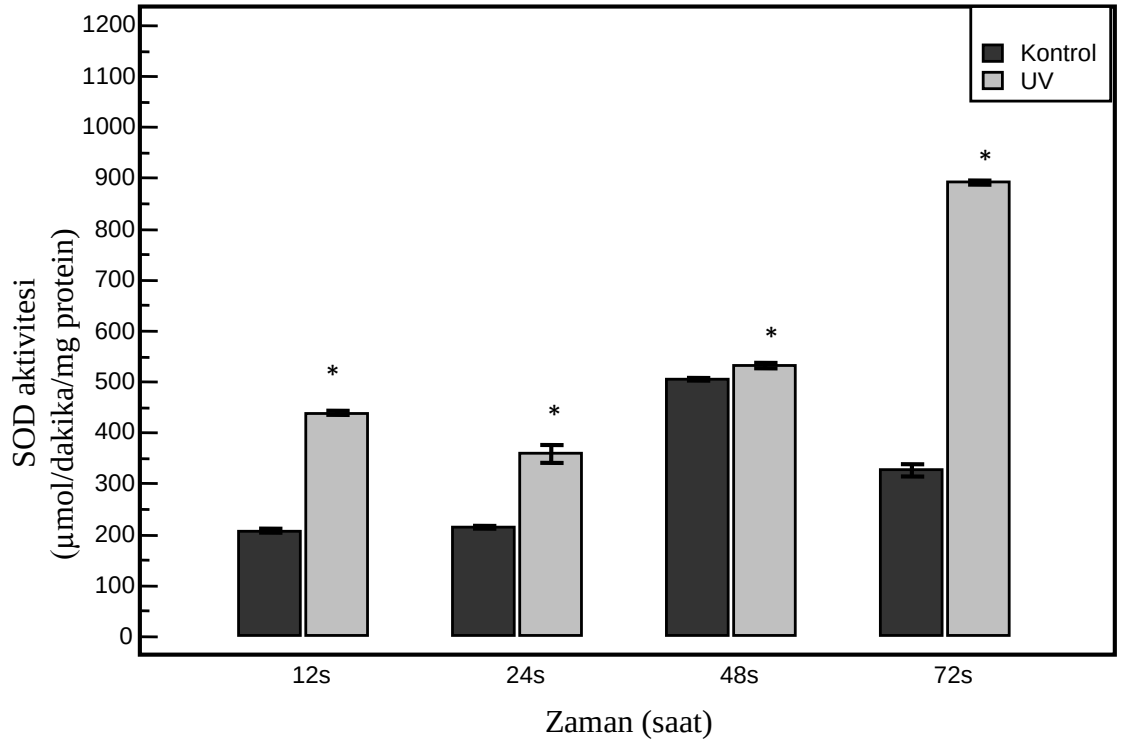
Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

İnokülasyondan hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın SOD enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.16). Kontroller kendi aralarında karşılaştırıldığında UV-C uygulama süresindeki artışa paralel olarak enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Uygulama grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında 12., 24., 72. saatlere göre 48. saatte enzim aktivitesinde azaldığı belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12., 24. ve 48. saatte uygulamanın enzim aktivitesinde inhibisyona neden olduğu, 72. saatte ise enzim aktivitesinin önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).



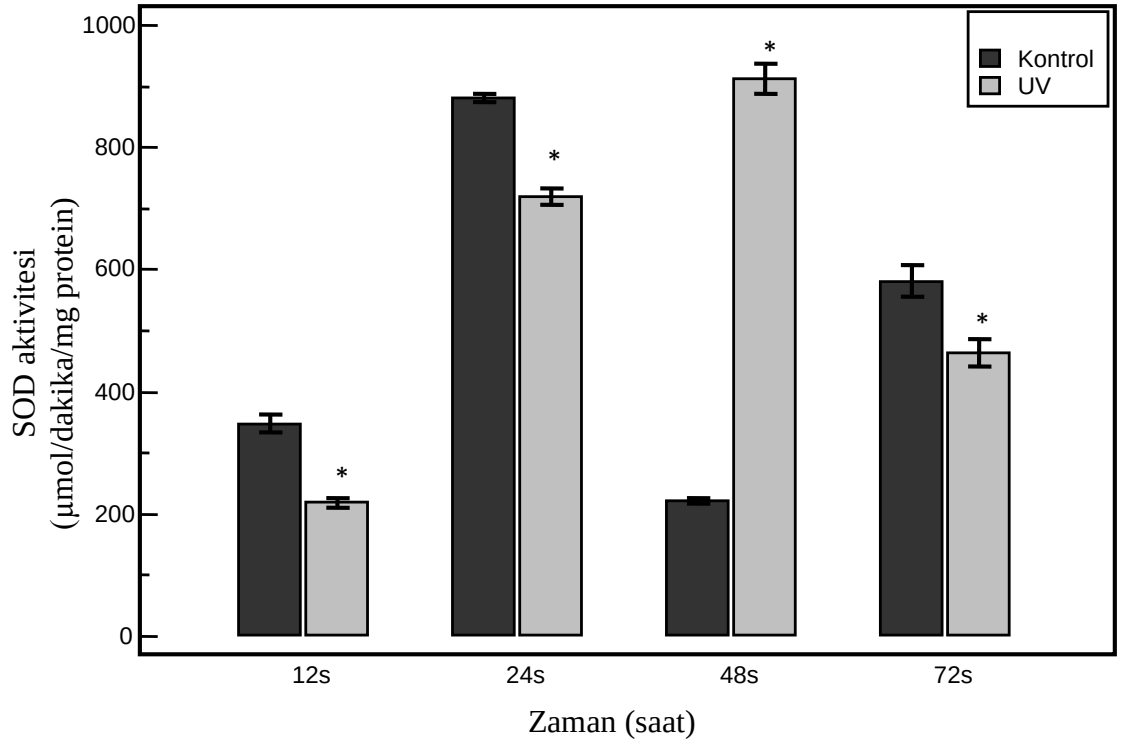
Şekil 4.16. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan *A. alternata*'nın süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

9 günlük kültürlerde farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın SOD enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.17). Uygulama grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bütün uygulama sürelerinde UV-C'nin SOD aktivitesini indüklediği tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Uygulama grupları arasındaki en yüksek SOD aktivitesi 72. saatte $892,497 \pm 4,2897$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak belirlenmiştir.



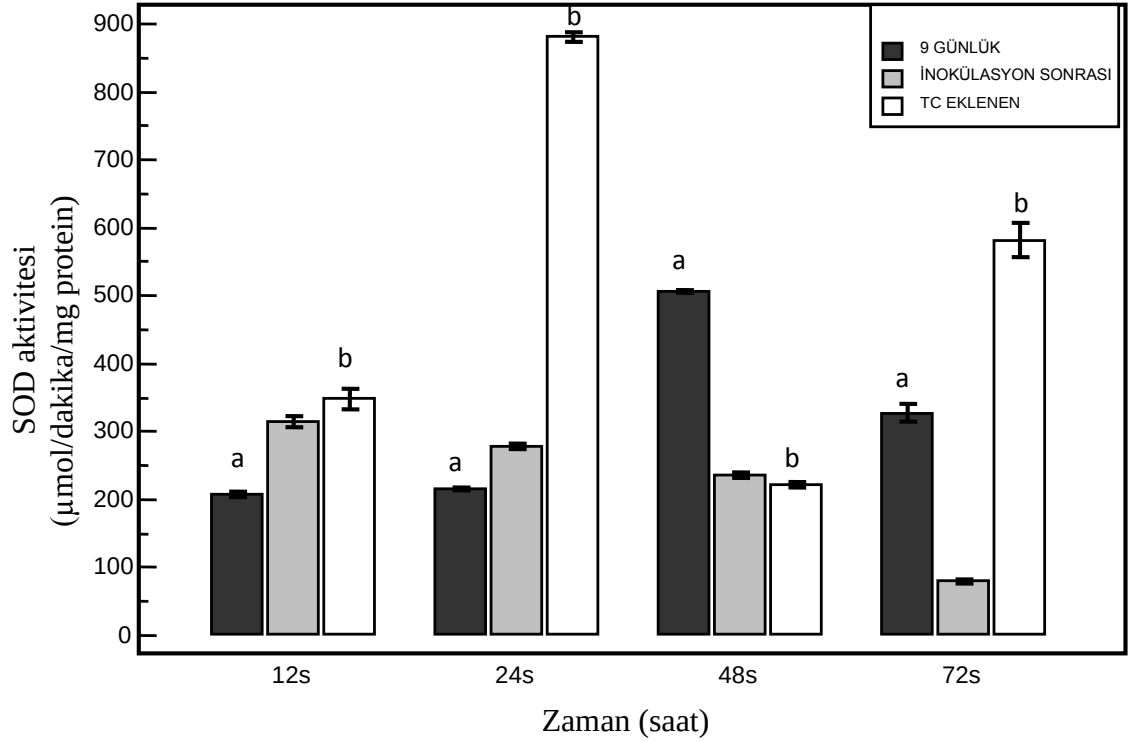
Şekil 4.17. *A. alternata*'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırması * ($p<0,05$).

Besiyerine trisiklazol eklenmiş kültürlerde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın SOD enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.18). Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12, 24 ve 72 saatlik UV-C uygulamasının enzim aktivitesini inhibe ettiği 48. saatte ise enzim aktivitesinde artışa neden olduğu tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Radyasyon uygulanmış gruptaki SOD enzim aktivitesi 48. saatte $913,044\pm24,4917$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein iken, en düşük aktivitenin $218,745\pm7,5072$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olduğu saptanmıştır.



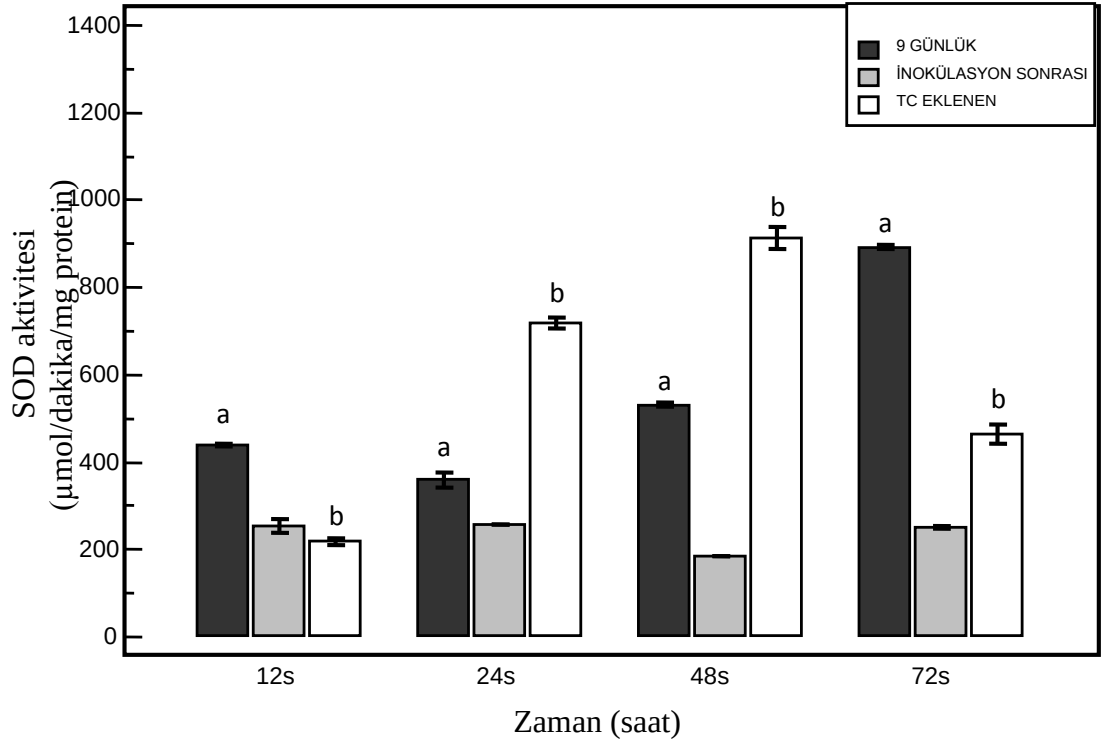
Şekil 4.18. Besiyerine trisiklazol eklenmiş *A. alternata* kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu süperoksit dismutaz aktivitesindeki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

İnokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan, 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan ve Tc eklenen üç grubun kontrollerinin SOD enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.19.). 12., 24. ve 72. saatlerde glutatyon redüktaz ve GST enzimlerinde olduğu gibi Tc eklenmiş besiyeri içerisinde üretim yapılan grubun SOD enzim aktivitelerinin diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek olduğu, 24. saatte aktivite değerinin $881,048 \pm 7,6929$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein değerine ulaştığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). 48. saatte ise 9 günlük inkübasyon sonrası uygulama yapılan grubun kontrolünün enzim aktivitesinin diğer iki gruptan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.19. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubu içerisindeki kontrol gruplarının süperoksit dismutaz aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

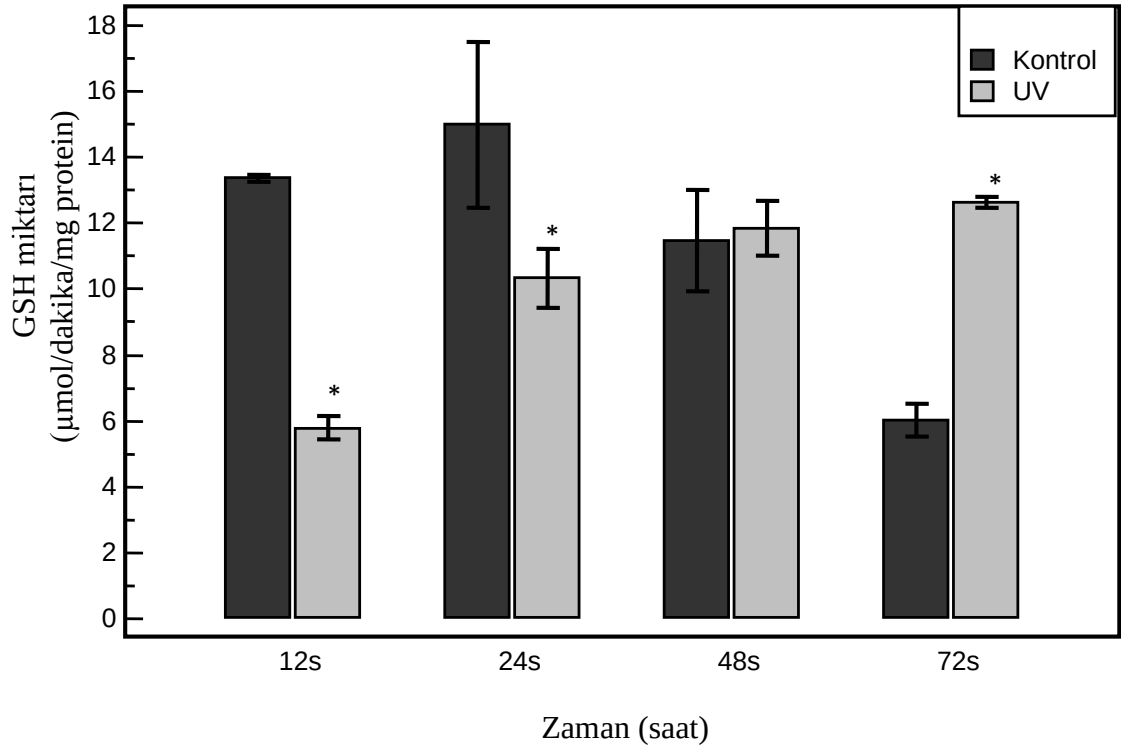
İnokülasyon işleminden hemen sonra, 9 günlük inkübasyondan sonra ve Tc eklenen besiyeri içerisinde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C uygulama yapılan üç grubun SOD enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.20.). 9 günlük inkübasyon sonrası UV-C uygulanan grupta 12. ve 72. saatteki enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tc eklenmiş besiyeri içerisinde üretim yapılarak radyasyona maruz bırakılan uygulama gruplarında ise 24. ve 48. saatteki SOD aktivitesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 4.20. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulanması sonucu süperoksit dismutaz aktivite değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

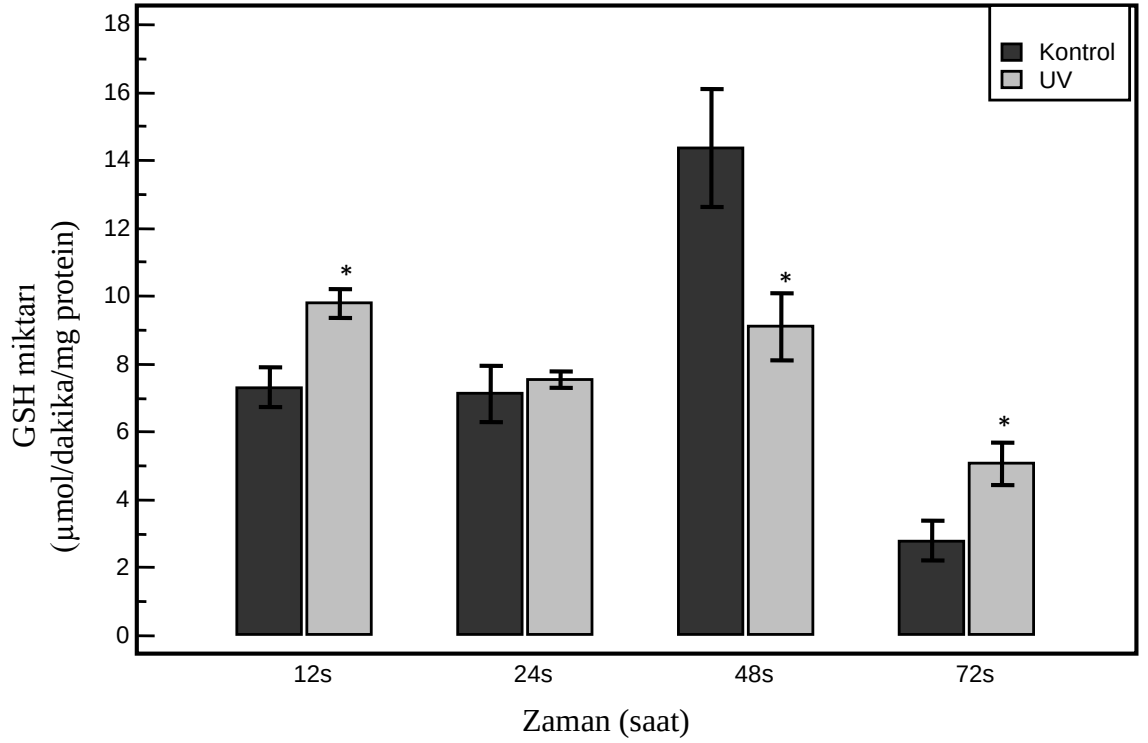
Glutasyon (GSH) Miktar Tayini

İnokülasyondan hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın glutasyon miktarı üzerindeki değişimleri incelenmiştir (Şekil 4.21). Uygulama grupları incelendiğinde UV-C'nin 48. saate kadar uygulama süresi artışına bağlı olarak GSH miktarını indüklediği gözlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında ise 12. ve 24. saatlerde uygulamanın GSH miktarında azalışa neden olduğu, 72. saatte ise glutasyon miktarını arttırdığı ($p<0,05$), 48. saatte ise anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).



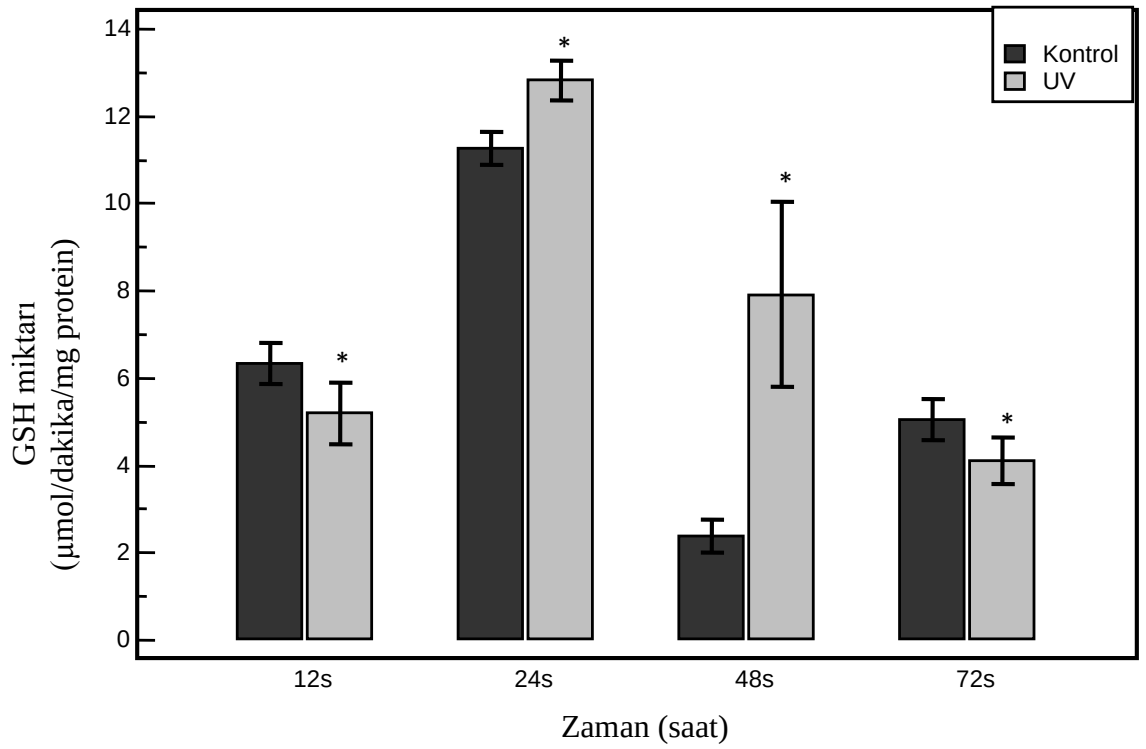
Şekil 4.21. İnokülasyon sonrası UV-C uygulanan *A. alternata*'nın glutasyon miktarındaki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

9 günlük kültürlerde farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın glutatyon miktarı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.22). Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12. ve 72. saatlerde UV-C'nin GSH miktarında artışa neden olduğu, 48. saatte ise azalışa neden olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 24. saatte ise önemli bir fark gözlenmemiştir ($p> 0.05$).



Şekil 4.22. *A. alternata*'nın 9 günlük kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon miktarındaki değişimlerin kontrol ile karşılaştırması * ($p<0,05$).

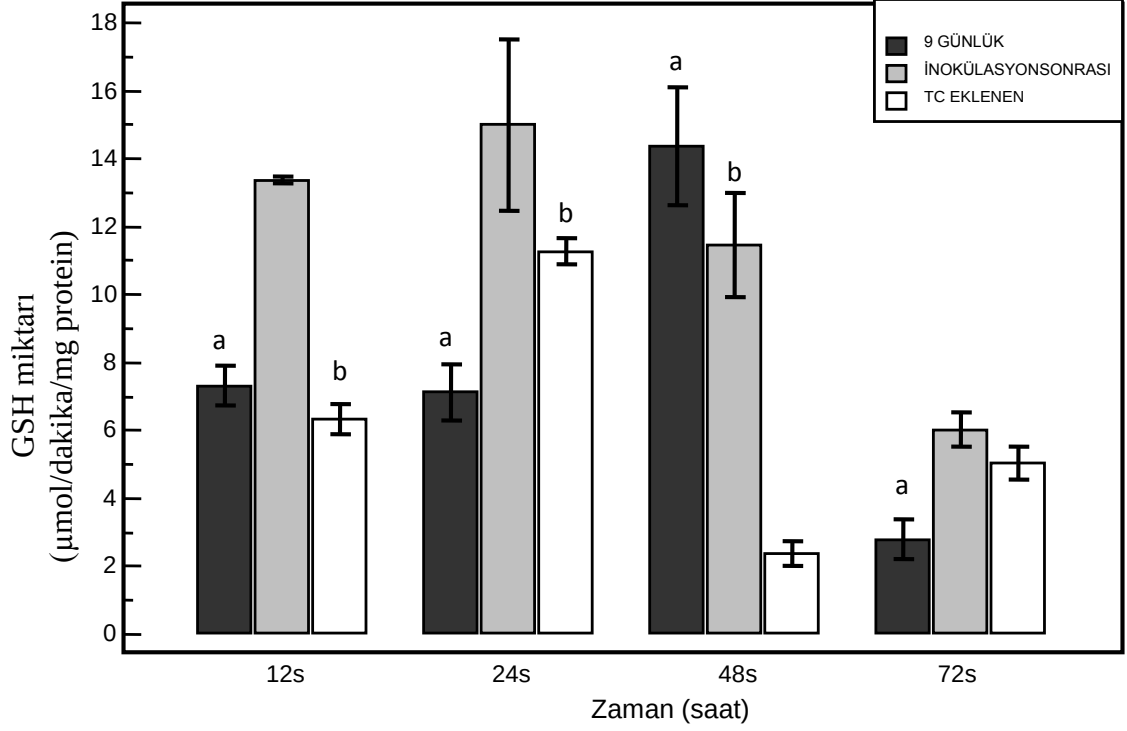
Besiyerine trisiklazol eklenmiş kültürlerde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C'ye maruz kalmanın GSH miktarı üzerindeki etkileri incelenmiştir (Şekil 4.23). Kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında 12. ve 72. saatte UV-C uygulamasının GSH miktarını inhibe ettiği, 24. ve 48. saatte ise GSH miktarını arttırdığı tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Uygulama grupları arasındaki en yüksek GSH miktarı $12,827 \pm 0,4603 \mu\text{mol/dakika/mg protein}$, en düşük GSH miktarı $4,120 \pm 0,5406 \mu\text{mol/dakika/mg protein}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. Besiyerine trisiklazol eklenmiş *A. alternata* kültürlerinin UV-C uygulanması sonucu glutatyon miktarındaki değişimlerin kontrol ile karşılaştırılması * ($p<0,05$).

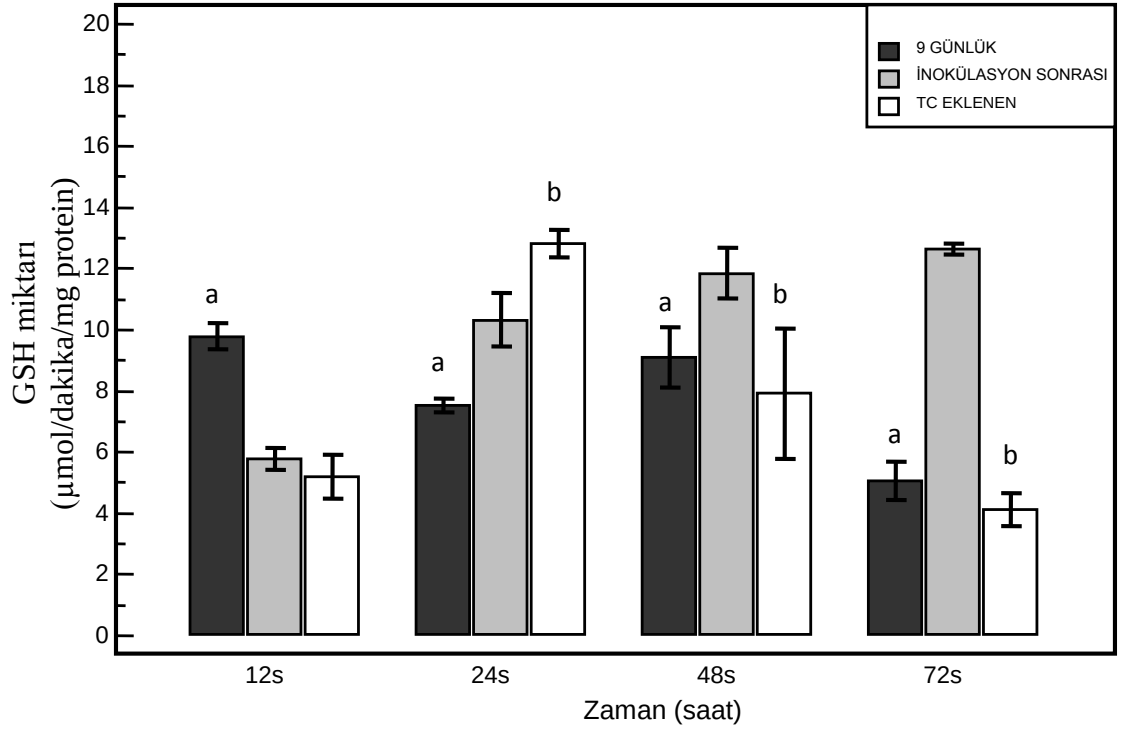
İnokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan, 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan ve Tc eklenen üç grubun kontrollerinin GSH miktarları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.24). 12., 24. ve 72. saatlerde inokülasyon sonrası uygulama yapılan grubun kontrolünün glutatyon miktarının diğer gruplara göre

önemli düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). 48. saatte ise 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan kontrol grubunun GSH miktarının diğer iki gruptan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



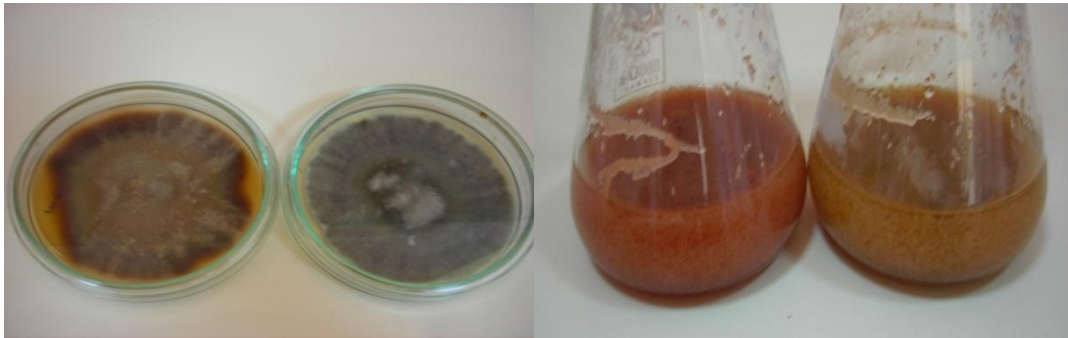
Şekil 4.24. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubu içerisindeki kontrol gruplarının GSH miktarlarının değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p < 0,05$)^b.

İnokülasyon işleminden hemen sonra, 9 günlük inkübasyondan sonra ve Tc eklenen besiyeri içerisinde inokülasyon işleminden hemen sonra farklı sürelerde UV-C uygulama yapılan üç grubun GSH miktarları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.25.). En yüksek GSH miktarının inokülasyon sonrası 48 ve 72 saat UV-C radyasyonuna maruz kalan gruplarda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.25. *A. alternata*'nın üç farklı uygulama grubunun UV-C uygulanması sonucu GSH miktarlarının değişimleri. 9 günlük kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p<0,05$)^a; Tc eklenen kültürün inokülasyon sonrası grubundan farkı ($p<0,05$)^b.

Tc eklenmiş kültürlerde melanin pigment inhibisyonu gerçekleşmiş ve flavoloin ve benzeri pigmentler sentezlediği için kontrole kıyasla hem katı besiyerindeki hem sıvı besiyerindeki kültürler kırmızımsı renkte görülmüştür.



Şekil 4.26. Tc eklenmiş (solda) ve eklenmemiş (sağda) PDA'daki *A.alternata*; Tc eklenmiş (solda) ve eklenmemiş (sağda) PDB'deki *A.alternata*.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Reaktif oksijen türleri ve oluşan ROT'ları temizleyen enzimler arasındaki denge pek çok abiyotik ya da biyotik stres faktörleri nedeniyle bozulabilmektedir. Bu faktörlerden biri olan UV radyasyon bu hassas dengeyi bozarak hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Organizmalar, maruz kaldıkları çeşitli stres faktörlerine rağmen canlılığını sürdürebilmek için birçok adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan biri de pigment oluşumudur. Melanin pigmenti üretebilen organizmalar karşılaştıkları ekstrem çevre koşullarına karşı direnç sağlayabilmektedirler. Melanin radyoprotektif özelliği sayesinde ROT oluşumunu engelleyerek organizmayı oksidatif hasarın neden olduğu olumsuzluklara karşı korumaktadır (Cox vd., 2003).

UV-C'nin neden olduğu oksidatif stresi belirlemek amacıyla kullanılan biyobelirteçlerden biri de antioksidan savunma sisteminde yer alan parametrelerdeki değişimlerin saptanmasıdır. UV-C uygulamasının antioksidan sistem üzerine etkisinin melanin pigmenti ile ilişkilendirilerek araştırdığımız bu çalışmada, inokülasyon sonrası uygulama yapılan, 9 günlük inkübasyondan sonra uygulama yapılan ve Tc eklenmiş besiyeri içerisinde inokülasyon işleminden hemen sonra uygulama yapılan üç grubun radyasyon süresine bağlı olarak antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH düzeylerinde meydana gelen değişiklikler tesbit edilmiştir.

Katalaz aktivitesi incelendiğinde 9 gün inkübe edilen yaşlı kültürlerde enzim aktivitesi hem kontrol hem UV-C uygulanmış gruplarda diğer iki uygulama grubuna göre daha yüksektir. Çünkü 9 günlük fungal kültürlerde üretilen yüksek düzeydeki melanin, UV-C radyasyonunun indüklediği reaktif oksijen radikallerini nötralize ederek bu radikallerin, katalaz enzimi üzerindeki oksidasyonu engelleyip enzimi olası hasarlara karşı korumaktadır. Maresca ve arkadaşlarının (2008) yaptığı bir çalışmada koyu pigmentli melonositlerin UV radyasyonunun zararlı etkilerine karşı organizmayı korumasının, melanin üretimi ve katalaz aktivitesinin sinerjistik olarak hareket etmesi sonucu ile ilgili olduğunu belirlemişlerdir. Bunun tersi olarak düşük düzeyde melanin üreten hücrelerde katalaz aktivitesinin de daha düşük olduğu tesbit edilmiştir (Maresca vd., 2008). Bu çalışma bulduğumuz sonucu desteklemektedir.

İnokülasyondan hemen sonra UV uygulanan grupta ise katalaz aktivitesinin kontrol gruplarına göre düşük olduğu saptanmıştır. Bu uygulama grubunda katalaz aktivitesinin 9 günlük uygulama gruplarının katalaz aktivitesinden de daha düşük olduğu bulunmuştur. CAT aktivitesindeki bu azalış melanin üretimi ile ilişkilendirilebilir. İnokülasyondan hemen sonra radyasyon uygulanan funguslar tarafından üretilen melanin, 9 günlük yaşlı kültürlerle göre daha düşük düzeyde olduğu için enzim, UV radyasyonunun neden olduğu oksidan zarara maruz kalarak inhibe olmuştur.

9 günlük yaşlı kültürler ve inokülasyon işleminden hemen sonra radyasyon uygulanan grupta da 72 saatlik UV-C uygulaması CAT aktivitesini çok belirgin bir biçimde arttırmıştır. Sonuçlarımıza paralel olarak, Steel ve Greer (2005) asma kallusunu belirli dozlarda UV-B radyasyona maruz bırakarak CAT aktivitesini tesbit etmişler ve uygulanan en yüksek dozda aktivitenin de buna paralel en yüksek miktarına ulaştığını belirlemişlerdir (Steel ve Greer, 2005).

İnokülasyon sonrası UV-C uygulaması yapılan grupta glutatyon redüktaz enzim aktivitesi incelendiğinde 72. saate kadar radyasyon uygulama süresi arttıkça kontrole göre enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Li ve arkadaşlarının (2012) bir makro alg türü olan *Sargassum thunbergii* üzerinde yaptığı çalışmada UV-B radyasyonuna maruz bırakarak, glutatyon redüktaz enzim aktivitesindeki değişimleri tesbit etmişlerdir. UV-B dozu ve süresi arttırıldıkça GR aktivitesinin kontrole göre düştüğünü belirlemişlerdir (Li vd., 2012). Melanin üretiminin yüksek düzeyde olduğu 9 günlük yaşlı kültürlerde ise inokülasyon sonrası uygulama yapılan grubun tam tersi UV maruziyet süresi arttıkça kontrole göre enzim aktivitesinin de arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç inokülasyondan hemen sonrasında UV-C uygulanan grubun melanin üretiminin daha az miktarda olmasıyla ilişkilendirilebilir.

Her üç grup için kontrol grupları arasında GR enzim aktivitesi değerleri karşılaştırıldığında melanin miktarı fazla olan 9 günlük yaşlı kültürlerde GR enzim aktivitesinin diğer gruplara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu yüzden en düşük GR aktivite değeri 9 günlük kültürlerde, en yüksek aktivite değeri de Tc eklenmiş besiyerinde üretilen funguslarda gözlenmiştir. Tc, melanin üretimini inhibe etmektedir ve UV-C uygulanan hücrelerde melaninin antioksidan koruyuculuğu olmayacaktır. Bu nedenle oluşan radikallerin temizlenmesinde antioksidan enzimler melaninin görevini üstlenecektir. Diğer taraftan Tc bir fungal ilaçtır. Fungusların detoksifikasyonları da GST ve GPX enzimleri tarafından glutatyon kullanılarak

yapılmaktadır. GSH'ın kullanılması sonucu oluşan GSSG'nin de tekrar GSH'a dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu dönüşümü yapan enzim de GR olduğu için Tc eklenen gruplardaki GR aktivitesi diğer gruplara göre daha yüksek olacaktır. Wu ve Von'un (2002) yaptığı bir çalışmada *Hordeum vulgare* L. bitkisine iki farklı fungusit uygulayarak glutatyon redüktaz enzimi aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda 2 farklı fungusitin de GR aktivitesinde artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Wu ve Von, 2002). Her üç grupta da hücrelerin 72 saat UV'ye maruz kalmaları GR enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttırdığı gözlenmiştir. GST'nin antioksidan aktivitesine ilave olarak ksenobiyotiklerin ve Tc gibi fungal pestisitlerin hem biyotransformasyonunda hem de detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. GST, nükleofilik glutatyon ile birlikte ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda ve Sitokrom P450 tarafından üretilen reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunda da önemli rol oynamaktadır. Çünkü reaktif ara ürünlerin aracılığı ile de bir toksisite oluşabilir. Reaktif ara ürünler ayrıca hücrel GSH depolarının da tükenmesine yol açabilmektedir. GR, hücre içi NADPH ve GSSG konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir. Oksidatif bir stres sonucu, GSSG'nin hücre içi seviyesi artınca (örneğin; UV-C radyasyonu) GR tekrar aktive olmaktadır.

9 günlük grupta GST aktivitesi kontrol gruplarına göre UV'ye maruz kalma süresine bağlı olarak azalmıştır. İnokülasyon sonrası uygulama yapılan grubun ise enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre UV uygulamasına bağlı olarak genel bir artış görülmüştür.

Glutatyon redüktaz enziminde olduğu gibi GST aktivitesi de gruplar arası incelendiğinde hem kontrol hemde UV uygulamalarında diğer iki gruba göre en yüksek aktivitenin Tc eklenmiş grupta olduğu tesbit edilmiştir. Tc eklenen grupta diğer iki uygulama grubuna göre GST üretiminde önemli düzeyde artış görülmüştür. Tc'nin fungusit özelliği düşünülecek olursa fungusitlerin detoksifikasyonunda görev yapan GST enzim miktarı da artacaktır. Tc eklenmiş grupta GST enzim aktivitesi 200-350 $\mu\text{mol} / \text{mg}$ total protein iken diğer gruplarda bu değer 50-250 arası $\mu\text{mol} / \text{mg}$ total protein arasında olduğu saptanmıştır. Mates (2000)'in yaptığı çalışmada çeşitli stres koşulları altında hücrelerde oksidatif stres oluşarak gen regülasyonunun indüklendiği ve böylece de antioksidan enzim sentezinde artış olduğu saptanmıştır (Mates, 2000).

İnokülasyon sonrası ve Tc eklenmiş grupta SOD aktivitesi için kontrol ve uygulama grubu karşılaştırıldığında genel olarak aktivitenin kontrole göre daha düşük olduğu saptanmıştır. UV-C uygulamasına bağlı olarak oluşumları indüklenen radikaller, radikal süpürücü enzimleri oksidasyona uğratarak fonksiyonel ve yapısal hasarlara neden olurlar. Diğer taraftan oksidatif strese neden olan radikaller, transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu da bozarak antioksidan enzimlerin sentezini inhibe edebilirler (Wood ve Schallreuter, 2008). Shindo ve arkadaşlarının (1994) yaptıkları çalışmada, fare cilt dokusu üzerine UV-A+UV-B uygulayarak dokulardaki antioksidan enzim aktivitelerini tesbit etmişlerdir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak, çalışmadan elde edilen verilere göre CAT, GR ve SOD enzimlerinin aktivitesi radyasyon uygulanan grupta düştüğü saptanmıştır. (Shindo vd., 1994).

9 günlük uygulama grubunda ise UV'ye maruz kalan hücrelerde SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çünkü 9 günlük fungal kültürlerdeki melanin üretimi yüksek düzeydedir. Melaninin, gerek peroksidaz gibi enzimleri radikallerin oksidasyonuna karşı koruyarak, yada SOD gibi radikal süpürücü enzimlerin görevlerini üstlenerek, gerekse de H_2O_2 ile reaksiyona girip, hidrojen peroksit miktarında azalışa neden olarak antioksidan enzimleri radikal hasarına karşı korudukları bilinmektedir (Shcherba vd., 2000). Lee ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları çalışmada, mayalara çeşitli dozlarda iyonize radyasyon uygulayarak SOD aktivitesinde meydana gelen değişimleri tesbit etmişlerdir. Çalışma sonucunda radyasyon dozu arttıkça SOD enzim aktivitesinde artış olduğunu saptamışlardır (Lee vd., 2001). Yapılan başka bir çalışmada ise kurbağalarda ortaya çıkarılan bir mekanizmaya göre çeşitli stres koşulları altında melanin SOD enziminin görevlerini üstlenerek süperoksit iyonlarının dismutasyonunu katalizlediği bildirilmiştir (Jacobson vd., 1994).

9 günlük uygulama grubundaki GSH miktarı UV uygulamasına bağlı olarak kontrole göre genel bir artış olduğu dikkat çekmiştir. Erkan ve arkadaşlarının (2008) yaptığı bir çalışmada, çilek bitkisine çeşitli dozlarda UV-C uygulayarak GSH miktarını tesbit etmişlerdir. UV-C uygulamasının GSH miktarında artışa neden olduğunu belirlemişlerdir (Erkan vd., 2008). İnokülasyon sonrası uygulama yapılan grupta ise kontrol grubuna göre 72. saate kadar bir azalma gözlenirken UV uygulama süresine bağlı olarak ise artış saptanmıştır. Tc uygulanan grupta ise 24 ve 48. saatlerde UV uygulaması GSH sentezini indüklemiştir.

Çalışmamızda GR aktivitesi ve GSH miktarı arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. GR enzimi okside glutatyonu redükte glutatyonla çeviren bir enzimdir. Redükte glutatyonun miktarı hücreleri radikal hasarına karşı korumada önemlidir. GSH hem detoksifikasyon hem de antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz ve GST enzimlerinin kofaktörü olmasından dolayı sürekli tüketilmektedir. GSH'ın hücre içindeki seviyesini belirli düzeyde tutmak için hücrede GR enziminin indüklenmesi gerekmektedir. GR enzimindeki artış GSH miktarındaki artışla paralel olmalıdır. Çalışmamızda da 9 günlük funguslara UV uygulamasından sonra UV'nin indüklediği reaktif oksijen türlerini nötralize etmek için gerekli olan GSH glutatyon redüktaz tarafından sağlanmıştır. GR aktivitesinin yüksek olduğu 9 günlük kültürlerde GSH içeriğinin de yüksek olduğu saptanmıştır.

Zhang ve arkadaşlarının (2005) yaptığı çalışmada koyu yeşil ve açık yeşil *Poa pratensis* L. bitkisi UV-B radyasyona maruz bırakılarak SOD ve CAT enzim aktiviteleri saptanmıştır. Klorofil ve karotenoid oluşumunun antioksidan enzim aktivitesiyle pozitif korelasyon gösterdiği, lipid peroksidasyonu ile ise negatif korelasyon gösterdiği tesbit edilmiştir (Zhang vd., 2005).

Yapılan birçok çalışmada çeşitli stres faktörlerine karşı hücrelerdeki GSH miktarının arttığı belirlenmiştir. Bu artışta da eksojen ve endojen pigmentasyonun önemli rol oynadığı bilinmektedir. Wang ve Li (2006); Kadioğlu ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışmalarda çeşitli stres koşullarında bitkilerdeki GSH miktarının arttığını ve antioksidan etkiye sahip salisilik asitin eksojen uygulamalarının da strese maruz kalmış bitkilerdeki GSH miktarını artırdığını saptamışlardır (Wang ve, Li, 2006; Kadioglu vd., 2011).

Çalışmamızda inokülasyon sonrası UV uygulanan gruptaki SOD ve CAT enzimlerinin kontrole göre düşüşü UV uygulamasının sonucu oluşumu indüklenen reaktif oksijen türlerinin bu enzimlerin aktivitelerini inhibe etmeleriyle açıklanabilir. Jiang ve Yang (2009) yaptıkları çalışmalarda buğday bitkisine uyguladıkları herbisit SOD ve CAT gibi radikal süpürücü enzimlerin aktivitelerindeki düşüşün herbisit uygulamasına bağlı biriken H₂O₂ ve süperoksit radikalının CAT ve peroksidaz gibi hem grubu içeren enzimlerin aktivitelerini inhibe etmeleriyle açıklamışlardır.

SOD, CAT, GPX, GR gibi enzimatik ve askorbat/C vitamini, GSH ve α tokoferol gibi enzimatik olmayan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar kompleks bir ağ içerisinde redoks balansını sürdürebilmek için çalışmaktadır. Bu kompleks ağ

içerisinde antioksidanlar, oksidanların nötralizasyonu, oksidatif hasarların inhibisyonu ve transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu kapsayan hücre iç dengesi ve fonksiyonlarını korumakla görevlidirler. (Wood ve Schallreuter, 2008).

Sonuç olarak melaninin, antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve bu özellikleri ile de antioksidan sistem elemanları ile korelasyon içinde çalıştığını söyleyebiliriz. Melaninin, antioksidan etkileri çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Melanin, peroksidaz gibi enzimleri radikallerin oksidasyonuna karşı korumaktadır. Diğer taraftan melanin, hem SOD gibi radikal süpürücü enzimlerin görevlerini üstlenerek, hem de SOD'un katalizlediği reaksiyonun ürünü olan H_2O_2 ile reaksiyona girerek, hidrojen peroksit miktarında azalışa da neden olmaktadır. Diğer taraftan melanin, radikal oluşturan enzimlere bağlanıp, radikallerin oluşumlarını da engellemektedir (Shcherba vd., 2000). Ayrıca fenol oksidazın melanin üreten bir enzim olduğu ve melaninin süperoksit iyonlarını tükettiği göz önüne alındığında, melanin fizyolojik anlamda fenol oksidazın regülasyonunu sağladığı ve SOD'un tamamlayıcısı olarak görev aldığı da bilinmektedir (Geremia vd., 1984; Sichel vd., 1991).

Melaninler, omurgalılar, böcekler, bitkiler ve mikrobiyal organizmalar dahil bütün biyolojik alemlerin içerisindeki türlerde bulunan multifonksiyonel bir pigmenttir. Melaninin önemli koruyucu rolleri bulunmaktadır. Melaninler kamuflaj görevi görerek organizmayı çevresel predatörlere karşı, sıcak-soğuk ve kuraklık stresine karşı, metal iyonlarına gösterdiği yüksek bağlanma kapasitesi sayesinde ağır metallerle karşı korumaktadır (Castanet ve Ortonne, 1997). Ayrıca UV ve solar radyasyon gibi fiziksel ajanlara karşı fotoprotektör olarak koruyucu görev üstlenmektedir. Hem literatürlerden elde edilen, hem de yaptığımız çalışmanın sonuçlarından elde ettiğimiz verilere istinaden melaninin, canlı organizmaları ekstrem çevre koşullarına karşı hayatta kalma şanslarını arttırdıklarını söyleyebiliriz.

Melaninli fungusların habitatı, çok yüksek radyasyon seviyelerinin olduğu çevrelerdir. 2007'de keşfedilen bu mikroorganizmalarla daha sonra birçok bilim adamı tarafından çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu alanlarda yaşayabilen mikroorganizmaların böylesine yüksek düzeyde radyasyonlu habitatlarda nasıl yaşayabildikleri konusu bilim adamlarınca ilgi odağı olmuştur. Bu ekstrem çevre koşullarına meydan okumanın moleküler ve hücresel boyutta incelenmesi sonucunda hücre duvarlarında lokalize olan melanin üretimine bağlı olduğu tesbit edilmiştir. Bu

nedenle melanin üretimi ile fonksiyonları çok sayıda araştırmacı ve mikologlar tarafından oldukça yeni ve popüler bir konu haline gelmiştir

Radiotrofik fungusların ağır metallere, oksidatif zararlara, ultraviyole radyasyonuna, sıcak ve soğuk stresine ve kuraklığa karşı ekstrem dayanıklılığının olması gibi çok sayıda dikkate değer özellikleri vardır. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda melaninli funguslar ve bakteriler ile çeşitli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Özellikle genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanı sıra, biyoremediasyonla ilgili çalışmalar ve ciddi çevre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır.

Çoğu bitki patojeni olan fungus da, uygun olmayan çevre koşullarına karşı canlı kalmalarını ürettikleri melanin pigmentine borçludurlar. Melanin, fungusları litik enzimlerden, ekstrem sıcaklıklardan ve kuraklıktan koruduğu gibi fungusit dirençliliğini de indüklemektedir. Bu bitki patojeni funguslar tarafından melanin üretimini etkileyen faktörlerin öğrenilmesi, potansiyel biyokontrol ajanı olarak kullanılmasına imkan sağlayacaktır.

Melanin, bazı insan patojeni olan funguslar için de antioksidatif, termostabil, antiradyoaktif, paramanyetik ve metal bağlayıcı özelliklerinden dolayı önemli bir virulans faktördür. Fungal melaninler, patojen fungusu konağın immün sistemine karşı korumaktadır.

Melanin üretiminin mekanizmasının anlaşılması ile yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi, kanser terapisi ve enerji transdüksiyonu gibi birçok alanda önemi giderek artmıştır. Melanin üretimini engelleyen çeşitli mekanizmaların fungal patojeniteyi azalttığı saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak melanotik mikroorganizmalarda melanin üretimini engelleyen ilaçlar önemli bir potansiyel antimikrobiyal ajan olmuştur. Daha ilginç funguslardaki melaninin yapısı bizim derimizdeki melaninden kimyasal olarak farklılık göstermemektedir. Fungal ve memeli melaninlerindeki benzerlik, melanoma tedavisinde önemli olan monoklonal antibadi üretiminde yol göstericidir. Aynı zamanda melaninin yüksek enerjili iyonize ışınları tutma özelliğinden dolayı, melanotik mikroorganizmalar için büyük avantaj sağlamaktadır.

Yapılan bu çalışmaların sonuçları ile Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji, Tıp ve Eczacılık alanında temel düzeyde yeni bilgiler sunacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdullah, S.K., Al-Khesraji, T.O., Al-Edany, T.Y. (1986), Soil mycoflora of the Southern Desert of Iraq. *Sydowia*. **39**, 8–16.
- Ahmad, S. (1995). *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman and Hall, New York, USA, 447 p.
- Akdağ P. (2010). *Adana’da Cladosporium ve Alternaria spor konsantrasyonlarının saptanması ve deri testinde kullanılacak mantar ekstraktlarının hazırlanması*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana
- Akerboom, T.P.M., Sies, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Method Enzymol.* **77**, 373-382.
- Akpoyraz, M., Durak, İ. (1994). Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)*. **48**, 253-262.
- Allam N.G., Abd El-Zaher E.H.F. (2012). Protective role of *Aspergillus fumigatus* melanin against ultraviolet (UV) irradiation and *Bjerkandera adusta* melanin as a candidate vaccine against systemic candidiasis. *African. J. Biotech.* **11(24)**, 6566-6577.
- Alp, Ş. (2010). Melanin ve *Cryptococcus neoformans*’ın virülansı üzerindeki rolü. *Mikrobiyol Bul.* **44**, 519-526.
- Altınışik, M. (2000). Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidanlar, ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı, Aydın.
- Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stres. *The Amer. J. Med.* **109(1)**, 33-44.
- Bell, A.A., Wheeler, M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 411-451.
- Belozerskaya, T., Aslanidi, K., Ivanova, A., Gessler, N., Egorova, A., Karpenko, Yu., Olishevskaya, S. (2010). Characteristics of Extremophylic Fungi from Chernobyl Nuclear Power Plant. *Micro Microbial Biotech.* **1**, 88-94.
- Berkow, R., Beers, M.D. (1997). *M. The Merck Manual of Medical Information*. Merc, U.S., 985-988 p.
- Beyoğlu S. (2006) *Cladosporium Link ve Alternaria Nees Ex Wallroth sporlarının Adana atmosferindeki miktarları ve meteorolojik faktörlerin spor miktarı üzerine etkisi*. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Bloomfield, B.J., Alexander, M. (1967). Melanins and resistance of fungi to lysis. *J. Bacteriol.* **93**, 1276–1280.

Boğaziçi. (2000). www.koeri.boun.edu.tr.

Braghini, R., Pozzi C.R., Aquino, S., Rocha, L.O., Corrêa, B. (2009). Effects of gamma-radiation on the fungus *Alternaria alternata* in artificially inoculated cereal samples. *Appl Radiat Isot.* **67(9)**, 1622-8.

Bryan, R., Jiang, Z., Friedman, M., Dadachova, E. (2011). The effects of gamma radiation, UV and visible light on ATP levels in yeast cells depend on cellular melanization. *Fungal Biology.* **115(10)**, 945-949.

Bull, A.T. (1970). Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 345–356.

Butler, M.J., Day, A.W. (1998). Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol.* **44**, 1115-1136.

Butler, M.J., Gardiner, R.B., Day, A.W. (2009). Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia.* **101(3)**, 296-304.

Bülbül, M.S. (2003) Radyasyon. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilimdalı Kars.

Carlberg, I., Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Method. Enzymol.* **113**, 484-490.

Casadevall, A. (2005). Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection?. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 98–106.

Castanet, J., Ortonne, J.R. Pigmentary changes in aged and photoaged skin. (1997) *Arch Dermatol.* **133**, 1296-9.

Christensen, M. (1981). Species diversity and dominance in fungal community (pp: 201-232). In: Carroll, G.W., Wicklow, D.T. (Ed.), *The fungal community, its organization and role in the ecosystem*. Marcell Dekker, New York, USA.

Ciccarone, C., Rambelli, A. (1998). A study on micro-fungi in arid areas. Notes on stress-tolerant fungi. *Plant Biosystems* **132**, 17–20.

Coates, J.D., Cole, K.A., Chakraborty, R., O'Connor, S.M., Achenbach, L.A. (2002). Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. *Appl Environ Microbiol.* **68(5)**, 2445-52.

Cox, G.M., Harrison, T.S., McDade, H.C., Taborda, C.P., Heinrich, G., Casadevall, A., Perfect, J.R. (2003). Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun.* **71(1)**, 173–180.

Charles, F., Ingrid, S., Gyu-Sung, C., Volker, G., Stahl, M.R. (2009). UV-C inactivation of Microorganisms in Naturally Cloudy Apple Juice Using Novel

Inactivation Equipment Based on Dean Vortex Technology. *Food Control*. **20**(12), 1103-1107.

Cunha, M.L., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, N.V., Borba, L.P., Souza, W., Rozental, S. (2010). Melanin in *Fonsecaea pedrosoi* : a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiology*. **10**, 80.

Dadachova, E., Casadevall, A. (2008). Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr Opin Microbiol*. **11**(6), 525–531.

Dadachova, E. (2007). Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS One*. **2**(5), e457.

Davis, M., Hut, P., Muller, R.A. (1985). Terrestrial catastrophism: Nemesis or Galaxy? *Nature*. **313**, 503.

Deepshikha, S., Charu, G., Sunita, A., Nitika, N. (2012). Pigment extraction from fungus for textile dyeing. *Indian J Fibre & Textile*. **37**, 68-73.

Dighton, J., Tugay, T., Zhdanova, N. (2008). Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiology Letters*. **281**(2), 109-20.

Dixon, L., Haas, G., Weiden, P., Sweeney, J., Frances, A. (1991). Drug abuse in schizophrenic patients: clinical correlates and reasons for use. *Am J Psychiatry*. **148**, 224-230.

Dixon, D.M., Szaniszló, P.J., Polak, A. (1991). Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of phaeohyphomycosis (pp: 297–318). In: G. Cole and H. Hoch (ed.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, USA.

Ellis, M.B., Ellis, J.P. (1997). *Microfungi on land plants: an identification handbook*. Slough Richmond Publishing, 686p.

Ellis MB (1976) *More dematiaceous hyphomycetes*. CABI publishing ,Kew Surrey, England, 635p.

Ellis MB (1971) *Dematiaceous hyphomycetes*. CABI publishing ,Kew Surrey, England, 608p.

Eric, S.J., Hove, E., Emery H.S. (1995). Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect immun*. **63**(12), 4944-5.

Erkan, M., Wang, S.Y., Wang, C.Y. (2008). Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. *Postharvest Biol Tec*. **48**, 163–171.

Espin, J.C., Jolivet, S., Wichers, H.J. (1999). Kinetic study of the oxidation of λ -L-glutaminy-4-hydroxybenzene catalyzed by mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *J Agric Food Chem*. **47**, 3495-3502.

Eisenman, I., Untersteiner, N., Wettlaufer J.S. (2007). On the reliability of simulated Arctic sea ice in global climate models. *Geophys. Res. Lett.* **34(10)**, doi:10.1029/2007GL029914.

Enochs W.S., Nilges, M.J., Swartz, H.M. (1993) A standardized test for the identification and characterization of melanins using EPR spectroscopy. *Pigment Cell Res.* **6**, 91-9.

Fridovich I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* **201**, 1203-1209.

Frost, A. (1988). Frequency of allergy to *Alternaria* and *Cladosporium* in a specialist clinic. *Allergy* **43**, 505-507.

Funa, N., Ohnishi, Y., Fuji, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Horinouchi, S. (1999). A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature.* **400**, 897-899.

Garcia-Rivera, J., Casadevall, A. (2001). Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med. Mycol.* **39**, 353–357.

Geng, J., Yu, S.B., Wan, X., Wang, X.J., Shen, P., Zhou, P., Chen, X.D. (2008). Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UVspectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *J Biochem Biophys Methods.* **70(6)**, 1151-1155.

Geremia, E., Corsano, C., Bonomo, R., Giardinelli, R., Pappalardo, P., Vanella, A., Sichel, G. (1984). Eumelanins as free radical trap and superoxide dismutase activities in amphibia. *Comp. Biochem. Physiol.* **79**, 67-69.

Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A., Belozerskaya, T.A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Mosc).* **72(10)**, 1091-109.

Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Cutuli, M.T., Domenech, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. (1999). Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 346-350.

Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* **48**, 909-930.

Gopalakrishnan, C., Manivannan, N., Vindhiyavarman, P., Thiyagarajan, K. (2010). Evaluation and Identification of *Alternaria* leaf spot resistant sunflower genotypes. *Electron J Plant Breeding.* **1(2)**, 177-181.

Gorbushina, A. (2003). Microcolonial fungi: survival potential of terrestrial vegetative structures. *Astrobiology.* **3**, 543–554.

Guerrero-Beltrán J.A., Barbosa-Cánovas G.V. (2004). Advantages and limitations on processing foods by UV Light. *Food Sci Technol Int.* **10**, 137-147.

Güler, Ç., Çobanoğlu, Z. (2001). *Elektromanyetik Radyasyon*. Çevre sağlığı temel kaynak dizisi, Ankara, Türkiye, 13p.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). The first enzymatic step in mercapturic acid formation glutathion s-transferases. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.

Halwagy, R., Moustafa, A.F., Kamel, S. (1982). Ecology of the soil mycoflora in the desert of Kuwait. *J Arid Environ.* **5**, 109–125.

Herrero, A.D., Ruiz, S.S., Bustillo, M.G., Morales, P.C. (2006). Study of airborne fungal spores in Madrid, Spain. *Aerobiologia.* **22**, 135-142.

Hashem, A.R. (1991). Studies on the fungal flora of Saudi Arabian soil. *Cryptogam Botany* **2(3)**, 179–182.

Hill, Z.H. (1992). The function of melanin or six blind people examine an elephant. *BioEssays.* **14**, 49-56.

Howard, R.J., Valent, B. (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol.* **50**, 491-512.

Horikoshi, K. (2011). Extremophiles Handbook (pp: 1136-1143). In: Grishkan, I. (Ed.) *Ecological Stress: Melanization as a Response in Fungi to Radiation*. Springer, Kent, UK.

Howard, R.J., Ferrari, M.A. (1989). Role of melanin in appressorium formation. *Exp. Mycol.* **13**, 403-418.

Hulot, G., Gallet, Y. (2003). Do superchrons occur without any palaeomagnetic warning?. *Earth Planetary Sci. Lett.* **210**, 191–201.

Icenhour, C.R., Kottom, T.J., Limper, A.H. (2006). *Pneumocystis* melanins confer enhanced organism viability. *Eukaryot. Cell.* **5**, 916–923.

Jacobson E.S., Jenkins, N.D, Todd J.M. (1994). Relationship between Superoxide Dismutase and Melanin in a Pathogenic Fungus. *Infect Immun.* **62(9)**, 4085-4086.

Jacobson, E.S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin microbiol rev.* **13**, 708-717.

Jagannatham, M.V., Cattopadhyay, M.K., Subbalakshmi, C., Vairamani, M., Narayanan, K., Rao, C.M., Shivaji, S., (2000). Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium. *Sphingobacterium antarcticus* and a mesophilic bacterium *Sphingobacterium multivorum*. *Arch. Microbiol.* **173**, 418-424.

Johnson, D. (2003). Response of terrestrial microorganisms to ultraviolet-B radiation in ecosystems. *Res Microbiol.* **154**, 315–320.

Kadioglu, A., Saruhan, N., Saglam, A., Terzi, R., Acet, T. (2011). Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf Rolling by inducing antioxidant system. *Plant growth regul.* **64**, 27-37.

Karaduman, A. (1999). www.saglik.tr.net.

Katagiri, M., Uesugi, Y. (1977). Cross-resistance between isoprothiolane and organophosphorus fungicides. *Jpn. J. Phytopathol.* **43**, 360.

Kawamura, C., Tsujimoto, T., Tsuge, T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**, 59–63.

Kehrer, J.P. (1993). Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Crit Rev Toxicology.* **23**, 21-48.

Kelly, K.A., Harvilla, C.M., Brady, T.C., Abrano K.H., Leveir, E.D. (1998). Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* **106**, 375-384.

Khan, A., Kasha, M. (1994). Singlet Molecular Oxygen in The Haber-Weiss Reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12365-12367.

Kılıç, K. (1985). Oksijen Radikallerinin Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi.* **2**, 60-89.

Kılınç, K., Kılınç, A. (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* **33(2)**, 110-118.

Koca, N., Karadeniz, F. (2012). Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi.* 32-37.

Kota, S., Misra, H.S. (2005). Molecular Biology of Stress Response and its Applications, Molecular Biology Division. *Bhabha Atomic Research Centre.* 19-21.

Kotob, S.I., Coon, S.L., Quintero, E.J., Weiner, R.M. (1995). Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*. *Appl Environ Microbiol.* **61**, 1620–1622.

Kubo, Y., Furusawa, I. (1991). Melanin biosynthesis: prerequisite for the successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals.* 205-218.

Kuo, M.J., Alexander, M. (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.* **94**, 624–629.

Koutchma, T. (2009). Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Foods. *Food Bioprocess Tech.* **2(2)**, 138-155.

Larson, R.A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. **27(4)**, 969-978.

Lee, J.H., Choi, I.Y., Kil, I.S., Kim, S.Y., Yang, E.S., Park, J.W. (2001). Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochim Biophys Acta*. **1526(2)**, 191-8.

Li, L.X., Zhao, J.Q., Tang, X.X. (2012). Effect of UV-B Radiation on GSH and GSH-Related Enzymes of Brown Alga *Sargassum thunbergii* (Mert.) O.Kuntze. *Advanced materials Research*. 518-523.

Logrieco, A., Visconti, A., Bottalica, A. (1990). Mandrain fruit rot caused by *Alternaria* and associated mycotoxins. *Plant Dis.* **74**, 415-417.

Lubin, D., Jensen, E.H. (2002). Effects of clouds and stratospheric ozone depletion on ultraviolet radiation trends. *Nature*. **377**, 710-713.

Luck, H. (1963). Catalase. methods of enzymatic analysis, 885–888.

Lugauskas, A., Sveistyte, L., Ulevicius, V. (2003). Concentration and species diversity of airborne fungi near busy streets in Lithuanian urban areas. *Ann Agric Environ Med*. **10**, 233–239.

Madigan, M.T., Marrs B.L. (1997). Extremophiles. *Scientific American*. 82-87.

Mahuku, G.S., Riascos, J.J. (2004). Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. *European journal of plant pathology*. **110**, 253-263.

Maresca, V., Flori, E., Briganti, S., Mastrofrancesco, A., Fabbri, C., Mileo, A.M., Paggi, M.G., Picardo, M. (2008). Correlation between melanogenic and catalase activity in in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21(2)**, 200-5.

Mascio, D.P., Murphy, M.E., Sies, H. (1991). Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 194-200.

Mates, J.M. (2000) *Effect of Antioxidant Enzymes in The Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology*, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Malaga, Toxicol, 153, 83-104.

McCord, J.M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte superoxide (hemocytin). *J. Biol. Chem.* **244(22)**, 6049–6055. November 25.

Messerschmidt, A., Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur J Biochem.* **187(2)**, 341-52.

Mirchink, T.G., Kashkina, G.B, Abaturov I.D. (1972). Resistance of fungi with different pigments to radiation. *Mikrobiologika*. **41**, 83–86.

Mironenko, N.V., Alekhina, I.A., Zhdanova, N.N., Bulat, S.A. (2000). Intraspecific variation in gamma-radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: a case study of strains inhabiting Chernobyl Reactor. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. **45**, 177–187.

Mitakakis, Z. (2001). The effect of local cropping activities and weather on the airborne concentration of allergenic *Alternaria* spores in rural Australia. *Grana*. **40(4-5)**, 230- 239.

Mulder, J.L., El-Hendawy, H. (1999). Microfungi under stress in Kuwait's coastal saline depressions. *J Sci Eng*. **26**, 157–172.

Mutlu, B., Şen, O., Toros, H. (2003). Ultraviyole radyasyonun insan sağlığı üzerine etkileri (pp:84-89). *III. Atmosfer Bilimleri Sempozyumu*, İTÜ, Mart 19-21, İstanbul.

Mutlu, S., Saber, R., Kocum, C., Piskin, E. (1999). An immunosensor: immobilization of anti HBs antibody on glow-discharge treated piezoelectric quartz crystal for HBs-Ag detection. *Anal. Lett*. **32**, 317-334.

Nordberg, J., Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. **31**, 1287–1312

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. **50(11)**, 3519-28.

Nosanchuk J.D., Casadevall A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*. **5(4)**, 203–223.

Okamoto, S., Sakurada, M., Kubo, Y., Tsuji, G., Fujii, I., Ebizuka, Y., Ono, M., Nagasawa, H., Sakuda, S. (2001). Inhibitory effect of aflastatin A on melanin biosynthesis by *Colletotrichum lagenarium*. *Microbiology*. **147(9)**, 2623-2628.

Ou, S.H. (1985) Rice Disease (pp: 252-327). *Commonwealth Mycological Institute*, Vol:2,Kew, UK.

Özalpan A. (2001). Temel tanımlamalar ve kavramlar (pp:13). *Temel radyobioloji*. Vol. 1, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul.

Özalpan A. (2001). İyonlaştırıcı radyasyonlar ve radyasyon enerjisinin absorpsiyonu (pp:31). *Temel radyobioloji*. Vol. 1, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul.

Özbey E. (2009). *Radyasyona Dirençli Deinococcus Radiodurans ile Escherichia Coli'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması*. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Özkütük, N. (2007). Ultraviyole Lambalarının Kullanımı (pp:490-496). 5. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, Celal Bayar Üniversitesi, Nisan 4-8, Antalya.

Pereira, P.T., de Carvalho, M.M., Girio, F.M., Roseiro, J.C., Amaral-Collaco, M.T. (2002). Diversity of microfungi in the phylloplane of plants growing in a Mediterranean ecosystem. *J Basic Microbiol.* **42**, 396–407.

Phadtare, S., Alsina, J., Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol.* **2**, 175-180.

Pilas, B., Sarna, T., Kalyanaraman, B., Swartz, H.M. (1988). The effect of melanin on iron associated decomposition of hydrogen peroxide. *Free Radical Biol.Med.* **4**, 285–293.

Plonka, P.M., Grabacka, M. (2006). Melanin sythesis in microorganisms biotechnical and medical aspects. *ACTA Biochim Pol.* **53**, 429-443.

Prospero, J.M., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia.* **21**,1–19

Przemyslaw M. P., Grabacka M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol.* **53(3)**, 429-443.

Ranzoni, F.V. (1968). Fungi isolated in culture from soils of the Sonoran desert. *Mycologia* **60**, 356–371

Robinson, C.H. (2001). Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New phytologist.* **151**, 341–353.

Rosas, A.L., Casadevall, A. (2001). Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia.* **151**, 53–56.

Rosas, A.L., Casadevall, A. (1997). Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**, 265–272.

Saleh, Y.G., Mayo, M.S., Ahearn, D.G. (1988).Resistance of some common fungi to gamma irradiation. *Appl Environm Microbiol.* **54**, 2134–2135.

Sarna, T., Pilas, B., Land, E.J., Truscott, T.G. (1986). Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochem. Biophys. Acta.* **883**,162-167.

Schnitzler, N., Peltroche-Llacsahuanga, H., Bestier, N., Zijndorf, J., Lütticken, R., Haase, G. (1999). Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) dermatitidis on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infection and Immunity.* **67**, 94-101.

Schweitzer, A.D., Revskaya, E., Chu, P., Pazo, V., Friedman, M., Nosanchuk, J.D., Cahill, S., Frases, S., Casadevall, A., Dadachova, E. (2010). Melanin-covered

nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* doi:10.1016/j.ijrobp.

Sen, B., Asan, A. (2001). Airborne fungi in vegetable growing areas of Edirne, Turkey. *Aerobiologia*. **17**, 69–75.

Shaw, C.E., Kapica, L. (1972). Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Appl. Microbiol.* **24**, 824-830.

Shcherba, V.V., Babitskaya, V. G., Kurchenko, V. P., Ikonnikova, N. V., Kukulyanskaya, T. A. (2000). Antioxidant properties of fungal melanin pigments. *Applied Biochem Micro.* **36(5)**, 491-495.

Shilo, M. (1978). *Strategies of microbial life in extreme environments*. Verlag Chemie, Weinheim, USA, 513p.

Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Tzeng, B., Aziz, T., Nguyen, L., Packer, L. (1994). Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* **10(5)**, 183-91.

Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A.J., Bonomo R.P. (1991). In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against. *Free Radical Biol. Med.* **11**, 1-8.

Singaravelan, N., Grishkan, I., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S., Nevo, E. (2008). Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at “Evolution Canyon”, Mount Carmel, Israel. *PLoS ONE*. **3(8)**, e2993.

Sizer, C.E., Balasubramaniam, V.M. (1999). New intervention processes for minimally processed juices. *Food Tech.* **53(10)**, 64-67.

Skujins, J. (1984). Microbial ecology of desert soils. *Adv Microb Ecol.* **7**, 49–91.

Sonntag, V. (1992). Some aspects of radiation-induced free-radical chemistry of biologically important molecules. *J. Rad. Appl. Inst.* **39(6)**, 477-483.

Southorn, P.A., Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clinic Proc.* **63(4)**, 390-408.

Staley, J.T., Palmer, F., Adams, J.B. (1982). Microcolonial fungi: common inhabitants on desert rocks. *Science*. **215**, 1093–1095.

Steel, C.C., Greer, L.A. (2005). Catalase activity and susceptibility of grapevine callus culture (cv. Cabernet Sauvignon) to *Botrytis cinerea* infection: Effects of UV-B exposure. *Vitis*. **44(3)**, 149–150.

Sterflinger, K., Krumbien, W.E. (1995). Multiple stress factors affecting growth of rock inhabiting black fungi. *Bot Acta*. **108**, 490–496.

Swartz, H.M., Sarna, T., Zecca, L. (1992). Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Ann. Neurol.* 32, 69-75.

Takano, Y., Kubo, Y., Kawamura, C., Tsuge, T., Furusawa, I. (1997). The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. *Fungal Genet Biol.* 21, 131-140.

Tanabe, Y., Roelink, H. Jessell, T.M. (1995). Induction of motor neurons by Sonic hedgehog is independent of floor plate differentiation. *Current Biology.* 5, 651-658.

Taylor, B.E., Wheeler, M.H., Szaniszló, P.J. (1987). Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. *Mycologia.* 79, 320–322.

Thomma, BPHJ. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol.* 4, 225-236.

Tortop N. (2007). *Demir toksisitesinde alfa tokoferolün etkisi*. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.

Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J. (1999). A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol.* 181(20), 6469-77.

Tseng, M.N., Chung, P.C., Tzean, S.S. (2011). Enhancing the Stress Tolerance and Virulence of an Entomopathogen by Metabolic Engineering of Dihydroxynaphthalene Melanin Biosynthesis Genes. *Applied and Environmental Microbiology.* 77(13), 4508–4519.

Turick, C.E., Ekechukwu, A.A., Milliken, C.E., Casadevall, A., Dadachova, E. (2011). Gamma radiation interacts with melanin to alter its oxidation–reduction potential and results in electric current production. *Bioelectrochemistry.* 82, 69–73.

Urzi, C., Wollenzien, U., Criseo, G., Krumbien, W.E. (1995). Biodiversity of the rock inhabiting microbiota with special reference to black fungi and black yeasts (pp: 289–302). In: Allsopp, D., Hawksworth, D.L., Colwell, R.R. (Ed.), *Microbial diversity and ecosystem function*. Oxford University Press, New York.

Van, D.D., Casadevall, A., Nosanchuk, J.D. (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 3394-400.

Vigh, L., Maresca, B., Harwood, J.L. (1998). Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?. *Trends Biochem Sci.* 23, 369–373.

Waisel, Y., Ganor, E., Glikman, M., Epstein, V., Brenner, S. (1997). Airborne fungal spores in the coastal plain of Israel: A preliminary survey. *Aerobiologia.* 13, 281–287.

- Wakamatsu, K., Ito, S. (2002). Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* **15**, 174-83.
- Wang, Y., Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to the fungicidal effects of ultraviolet light. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3864-3866.
- Wang, L.J., Li, S.H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. *Plant Science*, **170**, 685-694.
- Wheeler, M.H. (1983). Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **81**, 29-36.
- Wheeler, M.H., Bell, A.A. (1988). Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Curr. Top. Med. Mycol.* **2**, 338-387.
- Wood, J.M., Schallreuter, K.U. (2008). A plaidoyer for cutaneous enzymology: our view of some important unanswered questions on the contributions of selected key enzymes to epidermal homeostasis. *Experimental Dermatology*. **17(7)**, 569-578.
- Wu, Y.X., Von, T.A. (2002). Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environ Pollut.* **116(1)**, 37-47.
- Yanagita, T. (1990). *Natural microbial communities: ecological and physiological features*. Springer, Tokyo.
- Yang, Z., Pascon, R.C., Alspaugh, A., Cox, G.M., McCusker, J.H. (2002). Molecular and genetic analysis of the *Cryptococcus neoformans* *MET3* gene and a *met3* mutant. *Microbiology*. **148**, 2617–2625.
- Yehia, A., Mahmoud, G. (2004). Uptake of Radionuclides by Some Fungi. *Mycobiology*. **32(3)**, 110-114.
- Yılmaz M. (2010). *Bazı pestisitlerin sıçan dokularındaki asetilkolinesteraz ve antioksidan enzim aktiviteleri ile malondialdehit düzeyine etkileri*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Zak, J. (2005). Fungal communities of desert ecosystems: links to climate change (pp: 659-681). In: Dighton J, White JF Jr, Oudemans P (Ed.), *The fungal community, its organization and role in the ecosystem*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Zhang, C., Huang, X., Wang, J., Zhou, M. (2009). Resistance development in rice blast disease caused by *Magnaporthe grisea* to tricyclazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **94(1)**, 43–47.

Zhang, X., Ervin, E.H., Schmidt, R.E. (2005). The Role of Leaf Pigment and Antioxidant Levels in UV-B Resistance of Dark- and Light-green Kentucky Bluegrass Cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **130**(6), 836–841.

Zhdanova, N.N., Tugay, T., Dighton, J., Zheltonozhsky, V., McDermott, P. (2004). Ionizing radiation attracts soil fungi. *Mycological Research*. **108**, 1089-96.

Zhdanova, N.N., Gavriushina, A.I., Vasilevskaia, A.I. (1973). Effect of gamma and UV irradiation on the survival of *Cladosporium* sp. and *Oidiodendron cerealis*. *Mikrobiol. Zh.* **35**, 449–452.

Zoppas, B.C., Valencia-Barrera, R.M., Duso, S.M., Fernandez- Gonzalez, D. (2006). Fungal spores prevalent in the aerosol of the city Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, over 2-year period (2001–2002). *Aerobiologia*. **22**, 119–126.

EK 1.

İNOKÜLASYON SONRASI				
	Zaman	n	Kontrol	UV
CAT	12s	3	12,8890 ± 0,3798	9,7169 ± 0,0971 *
	24s	3	8,9344 ± 0,5575	8,4089 ± 0,4574
	48s	3	6,8016 ± 0,2583	6,6974 ± 0,05966
	72s	3	0,3703 ± 0,05736	4,6049 ± 0,5366 *
GR	12s	3	0,752 ± 0,02754	0,496 ± 0,0327 *
	24s	3	0,561 ± 0,02219	0,387 ± 0,008719 *
	48s	3	0,271 ± 0,00686	0,192 ± 0,02314 *
	72s	3	0,0597 ± 0,01523	0,173 ± 0,0335 *
GST	12s	3	75,340 ± 1,8589	106,506 ± 5,8704 *
	24s	3	50,624 ± 3,2617	97,313 ± 4,8824 *
	48s	3	105,751 ± 2,2032	101,514 ± 10,9548
	72s	3	46,377 ± 5,1289	109,179 ± 4,1813 *
SOD	12s	3	315,347 ± 8,2879	254,304 ± 17,0160 *
	24s	3	277,648 ± 4,1232	256,638 ± 0,0000 *
	48s	3	236,626 ± 4,2818	184,645 ± 0,8516 *
	72s	3	79,955 ± 3,6584	252,170 ± 3,2317 *
GSH	12s	3	13,375 ± 0,1037	5,7840, ± 3549 *
	24s	3	14,999 ± 2,5224	10,334 ± 0,8897 *
	48s	3	11,475 ± 1,5296	11,851 ± 0,8283
	72s	3	6,015 ± 0,5043	12,640 ± 0,1695 *

Çizelge 1. İnokülasyon sonrası uygulama yapılan *Alternaria alternata* kültürlerinin her bir zaman diliminde UV-C' ye maruz kaldıktan sonraki enzim aktivite değişimleri: * kontrolün uygulama gruplarından farkı (p<0,005).

9 GÜNLÜK KÜLTÜR				
	Zaman	n	Kontrol	UV
CAT	12s	3	8,915 ± 0,3355	11,115 ± 0,5356*
	24s	3	20,269 ± 0,5063	11,235 ± 1,1945*
	48s	3	23,209 ± 3,3381	20,800 ± 0,2634
	72s	3	10,722 ± 0,4603	21,264 ± 0,9996*
GR	12s	3	0,125 ± 0,0307	0,335 ± 0,03172 *
	24s	3	0,125 ± 0,03387	0,148 ± 0,001391
	48s	3	0,303 ± 0,02589	0,208 ± 0,0156 *
	72s	3	0,0554 ± 0,003544	0,146 ± 0,01171 *
GST	12s	3	77,718 ± 4,7796	57,609 ± 3,6458 *
	24s	3	230,410 ± 16,9362	160,352 ± 6,7280 *
	48s	3	198,257 ± 6,0439	137,039 ± 19,6246 *
	72s	3	95,126 ± 7,1974	236,323 ± 23,5440 *
SOD	12s	3	208,223 ± 4,0727	439,428 ± 3,8240 *
	24s	3	215,694 ± 2,6483	359,673 ± 17,9792 *
	48s	3	506,378 ± 2,4816	531,658 ± 5,6221 *
	72s	3	327,293 ± 13,0306	892,497 ± 4,2897 *
GSH	12s	3	7,319 ± 0,5834	9,796 ± 0,4281 *
	24s	3	7,134 ± 0,8275	7,532 ± 0,2413
	48s	3	14,352 ± 1,7393	9,115 ± 0,9914 *
	72s	3	2,792 ± 0,5782	5,078 ± 0,6210 *

Çizelge 2. Her bir zaman diliminde UV-C' ye maruz kalan 9 günlük *Alternaria alternata* kültürlerinin enzim aktivite değişimleri: * kontrolün uygulama gruplarından farkı (p<0,005).

Tc EKLENEN KÜLTÜRLER				
	Zaman	n	Kontrol	UV
CAT	12s	3	11,697 ± 0,5257	3,655 ± 0,4074*
	24s	3	11,312 ± 1,4313	8,582 ± 0,6614*
	48s	3	3,308 ± 0,03341	11,698 ± 0,5238*
	72s	3	5,942 ± 0,4970	6,479 ± 0,4342
GR	12s	3	1,248 ± 0,2280	0,546 ± 0,03316 *
	24s	3	0,865 ± 0,1190	0,276 ± 0,08745 *
	48s	3	0,256 ± 0,04289	0,399 ± 0,06037 *
	72s	3	1,153 ± 0,2056	2,554 ± 0,4033 *
GST	12s	3	186,668 ± 11,5527	149,112 ± 2,0768 *
	24s	3	329,861 ± 36,9444	222,176 ± 6,1895 *
	48s	3	156,207 ± 4,9070	248,648 ± 17,2874 *
	72s	3	295,923 ± 10,4667	296,478 ± 16,6918
SOD	12s	3	348,582 ± 15,2564	218,745 ± 7,5072 *
	24s	3	881,048 ± 7,6929	719,798 ± 12,6806 *
	48s	3	221,634 ± 4,2404	913,044 ± 24,4917 *
	72s	3	581,743 ± 25,0163	464,482 ± 21,7219 *
GSH	12s	3	6,341 ± 0,4578	5,196 ± 0,7032
	24s	3	11,272 ± 0,3760	12,827 ± 0,4603 *
	48s	3	2,385 ± 0,3795	7,921 ± 2,1193 *
	72s	3	5,053 ± 0,4829	4,120 ± 0,5406

Çizelge 3. Tc eklendikten sonra uygulama yapılan *Alternaria alternata* kültürlerinin her bir zaman diliminde UV-C' ye maruz kaldıktan sonraki enzim aktivite değişimleri: * kontrolün uygulama gruplarından farkı (p<0,005).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hande Turancı

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 26.10.1986

E-posta: handeturanci@gmail.com

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Bildiriler:

1. Turancı, H. ve Asma, D., UV-C'nin *Alternaria alternata*'nın üreme ve melanin üretimi üzerine etkilerinin belirlenmesi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 2012, İzmir.
2. Atalay, F., Asma, D., Yagmur, V., Turancı, H., Aydogmus, E., Kaya, H., The Fabrication of NiO Nanotubes Using Bacillus Subtilis Bacteria, 2013, Antalya.