



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Escherichia coli'NİN FARKLI pH'LARDA FOTOOKSİDATİF STRES
ALTINDA YAŞAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUSA CAN MANSUROĞLU

OCAK

MUSA CAN MANSUROĞLU	BİYOLOJİ ANABİLİM DALI	OCAK 2023
----------------------------	-------------------------------	------------------

***Escherichia coli*'NİN FARKLI pH'LARDA FOTOOKSİDATİF STRES
ALTINDA YAŞAMI**

Musa Can MANSUROĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Önder İDİL

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

Yüksek Lisans Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Musa Can MANSUROĞLU tarafından hazırlanan “*Escherichia coli*’nin Farklı pH’larda Fotooksidatif Stres Altında Yaşamı” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Önder İDİL

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Doç. Dr. Demet TATAR

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Hitit Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 25/01/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Musa Can MANSUROĞLU

25/01/2023

Escherichia coli'NİN FARKLI pH'LARDA FOTOOKSİDATİF STRES ALTINDA YAŞAMI

(Yüksek Lisans Tezi)

Musa Can MANSUROĞLU

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

Genelde koli basili olarak bilinen *Escherichia coli*, memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan enterik bakteri türlerinden biridir. *Escherichia coli*'de çevresel strese (asit şoku, baz şoku, açlık stresi, ozmotik stres, oksidatif stres ve DNA hasarı) karşı hücrel cevapta görevli olan genler eksprese edilmektedir. Bu genler'den arjinin dekarboksilaz adı, glutamat dekarboksilaz gad ve lisin dekarboksilaz cad asit direnç sistemi olarak bilinmektedir. Bu çalışmada, keio koleksiyonundan elde edilen *Escherichia coli* BW25113 suşlarından hedef 6 gen bölgesi için yabancı tip *Escherichia coli* W3110'a P1kc fajı ile transdüksiyon metodu kullanılarak aktarıldı. Yabancı tip olan *Escherichia coli* W3110'dan elde edilen ve *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB*, *cadC* mutantlarının metilen mavisi ve pH stresinin rolü araştırılmıştır. Ayrıca, aynı yöntemle temin edilen plazmitler aracılığıyla genlerin komplementerlerinin, stres koşullarındaki rolleri kontrol edilmiştir. Yabancı tip ve mutant suşlarda yaşam deneyleri 2 farklı pH' da (pH-6 ve pH-8), petri plaklarında koloni sayım metodu ile yapılmıştır. pH-6 fosfat tamponunda yabancı tip ve mutant suşlarda duyarlılık gözlenmeyip sadece pH-8 fosfat tamponunda etkili olduğu gözlenilmiştir. pH 8 metilen mavisi içeren tüm suşlarda 8 saatin sonunda 2 logaritmik düşüşün olduğu ancak en fazla azalmanın *adiA* mutantında görüldüğü, başlangıç değeri olan 6,59 logaritma değerinin 6 saat sonunda 2,25'e düştüğü belirlenmiş ve t_{99} değeri 2,76 saat olarak hesaplanmıştır. Yaşam süresi çoktan aza doğru olarak *cadA*>*gadC*>*cadC*>*gadB*>*cadB*>*adiA* mutantları olarak belirlenmiştir. Metilen mavisinin pH 6 fosfat tamponunda etikili olmadığı görülürken, pH 8 fosfat tamponu ortamında yabancı tipte ve bütün gen bölgelerinde etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar *adiA*, *gadB*, *cadB* ve *cadC* mutantlarının pH stresi ve metilen mavisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Sayfa Adedi	: 75
Anahtar Kelimeler	: <i>Escherichia coli</i> , Bakteri, pH, Oksidasyon, Stres
Danışman	: Doç. Dr. Önder İDİL

LIFE OF *Escherichia coli* UNDER PHOTOOXIDATIVE STRESS AT DIFFERENT pH
(M. Sc. Thesis)

Musa Can MANSUROĞLU

AMASYA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

Escherichia coli, commonly known as coli bacillus, is one of the enteric bacteria species living in the large intestine of mammals. In *Escherichia coli*, genes involved in the cellular response to environmental stress (acid shock, base shock, starvation stress, osmotic stress, oxidative stress and DNA damage) are expressed. Among these genes, arginine decarboxylase name, glutamate decarboxylase gad and lysine decarboxylase cad are known as acid resistance system. In this study, *Escherichia coli* BW25113 strains obtained from keio collection were transferred to wild type *Escherichia coli* W3110 for target 6 gene region using P1kc phage transduction method. The role of methylene blue and pH stress of mutants *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB*, *cadC* obtained from wild type *Escherichia coli* W3110 was investigated. In addition, the roles of complements of genes in stress conditions were controlled by plasmids obtained by the same method. Survival experiments on wild type and mutant strains were carried out at 2 different pH (pH-6 and pH-8), by colony counting method on petri plates. No sensitivity was observed in wild-type and mutant strains in pH-6 phosphate buffer, but it was observed to be effective only in pH-8 phosphate buffer. It was determined that in all strains containing pH 8 methylene blue, there was 2 logarithmic decrease at the end of 8 hours, but the maximum decrease was seen in the *adiA* mutant, the initial value of 6.59 logarithm decreased to 2.25 after 6 hours, and the t_{99} value was calculated as 2.76 hours. The lifetimes were determined from *cadA>gadC>cadC>gadB>cadB>adiA* mutants from best to lowest. While it was observed that methylene blue was not effective in pH 6 phosphate buffer, it was found to be effective in wild type and all gene regions in pH 8 phosphate buffer medium. These results show that *adiA*, *gadB*, *cadB* and *cadC* mutants are associated with pH stress and methylene blue.

Number of pages : 75

Keywords : *Escherichia coli*, Bacteria, pH, Oxidation, Stress

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Önder İDİL

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tezin yazılmasında beni yönlendiren, bana motivasyon sağlayan, araştırmalarımda yol gösterici olan desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Önder İDİL'e ve bakteri türlerimin elde edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Cihan DARCAN, Öğr. Gör. Özge KAYGUSUZ ve ekibine teşekkürü borç bilirim.

Tez yazım ve şekil düzenlenmesinde yardımcı olan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Emine ÇELİKOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Umut ÇELİKOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca her zamanda yanımda olan desteğini esirgemeyen değerli yüksek lisans arkadaşlarım Mesih TAŞ, Melike KARATAŞ, Habibe CENİKLİOĞLU, Merve KARAASLAN ve Canfide Merve YEMİŞ'e teşekkür ederim.

Maddi manevi desteğini esirgemeyen, her koşulda yanımda bulunan değerli aile üyelerim babaannem Ayşe MANSUROĞLU'na babam Ali MANSUROĞLU'na annem Meryem MANSUROĞLU'na abim Ümit Mansur MANSUROĞLU'na halam Fatma KURT'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. <i>Escherichia coli</i> Hakkında Genel Bilgiler	5
2.2. Stres	6
2.2.1. Stresin tanımı	6
2.2.2. Bakteriyel stres.....	7
2.3. Oksidatif Stres	8
2.3.1. Bakteriler oksidatif stres	9
2.4. Serbest Radikal.....	10
2.4.1. Serbest radikal tarihi	10
2.4.2. Serbest radikaller.....	11
2.4.3. Oksijen tarihi	12
2.4.4. Fotosentez ve oksijenin evrimi.....	13
2.4.5. Oksidatif stres tepkileri	14
2.4.6. Serbest radikallerin kaynakları.....	15

Sayfa

2.5. Serbest Radikallerin Etkileri	16
2.5.1. Lipidlerin üzerindeki etkisi	16
2.5.2. Karbonhidratlar üzerindeki etkisi.....	16
2.5.3. Proteinler üzerindeki etkisi	17
2.5.4. DNA üzerindeki etkisi.....	17
2.6. pH Stresi.....	17
2.6.1. Sitoplazmik pH ölçümü.....	20
2.6.2. Bakteriler pH etkisi	20
2.6.3. <i>Escherichia coli</i> asit direnç mekanizması	21
2.7. Bakterilerde Oksidatif Stres ve pH İlişkisi.....	22
2.8. Bakterilerde Fotooksidasyon.....	23
2.9. Metilen Mavisi ve Analoglarının DNA ve Diğer Biyolojik Substratlarla Fotokimyasal Etkileşimleri.....	23
2.10. Fotosensitizer Maddelerin Hücresel Proteinlere Olan Etkileri	24
2.10.1. Fotosensitizerlerin DNA'ya etkileri	25
2.10.2. Fotosensitizerlerin biyolojik membranlara etkisi.....	26
2.10.3. Fotosensitizerlerin organellere etkisi	27
2.10.4. Fotosensitizerlerin virüslere etkisi	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Suşlar.....	29
3.1.2 Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması	30
3.1.3. Işık kaynağı ve inkübatör	34
3.2. Yöntem.....	35

Sayfa

3.2.1. Bakterilerin inkübasyonu	35
3.2.2. OD(optik dansite) değeri ayarlama	35
3.2.3 Bakteri yaşam deneyleri	36
3.2.4 Yaşam deneylerinde değerlerin analizi	37
3.2.5. <i>Escherichia coli</i> W3110 mutantlarının eldesi	38
3.2.6. P1kc faji ile transdüksiyon	38
3.2.7. Plazmid izolasyonu	39
3.2.8. Miktar tayini	40
3.2.9. Transformasyon	40
3.2.10. Primer sulandırma	41
3.2.11. Koloni PZR	41
3.2.12. Agaroz jel elektroforezi	42
3.2.13. Komplementasyon testleri	43
4. BULGULAR	44
4.1. Mutantların Elde Edilmesi	44
4.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin Farklı pH'larda Fotooksidatif Stres Altında Yaşamı	48
4.2.1. Fotooksidatif stres altındaki <i>Escherichia coli</i> 'nin farklı pH'larda yaşamı	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> yabani tip ve mutant suşları.....	29
Çizelge 3.2. Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.....	41
Çizelge 3.3. Transdüksiyon ve transformasyon doğrulaması amacıyla PZR reaksiyonunda kullanılan primerler	42
Çizelge 3.4. PZR (Thermo) döngü koşulları.....	42
Çizelge 4.1. pH-6 ve 8’de yabani tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları	48
Çizelge 4.2. pH-6 ve 8’de yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri	50
Çizelge 4.3. pH-6 ve 8’de yabani tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları	51
Çizelge 4.4. pH-6 ve 8’de yabani tip ve mutantların t_{99} değerleri	53
Çizelge 4.5. pH-6 ve 8’de yabani tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda logaritmik koloni sayıları	54
Çizelge 4.6. pH-6 ve 8’de yabani tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda t_{99} değerleri.....	56
Çizelge 4.7. pH-8’de komplementerlerin metilen mavisi bulunan ortamda logaritmik koloni sayıları.....	57
Çizelge 4.8. pH-8’de metilen mavisi eklenen ortamda komplementerlerin t_{99} değerleri	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>E. coli</i> 'nin elektron mikroskopundaki görünümü	5
Şekil 2.2. Hücresel stres.....	7
Şekil 2.3. Oksidatif stres	8
Şekil 2.4. Hücrenin oksidatif strese maruz kalması.....	10
Şekil 2.5. Serbest radikal	12
Şekil 2.6. Serbest radikal kaynakları.....	16
Şekil 3.1. Eppendorf tüp içerisinde ringer çözeltisi	32
Şekil 3.2. Katı IPTG stoğu.....	33
Şekil 3.3. İnkübatör shaker (Innova43).....	34
Şekil 3.4. İnkübatör shaker cihazı.....	35
Şekil 3.5. Spektrofotometre (Thermo).....	36
Şekil 3.6. Dik tip buharlı otoklav (Nüve)	36
Şekil 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>adiA</i> mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.	44
Şekil 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>gadB</i> mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.	44
Şekil 4.3. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>gadC</i> mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü	45
Şekil 4.4. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>cadA</i> mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.	45
Şekil 4.5. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>cadB</i> mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.	45
Şekil 4.6. Yabani tip <i>E. coli</i> ve <i>cadC</i> mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.	46

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> BW25113 <i>adiA</i> plazmidi ve <i>pnt3::adiA</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü	46
Şekil 4.8. <i>E.coli</i> BW25113 <i>gadB</i> plazmidi ve <i>pnt3:: gadB</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü	47
Şekil 4.9. <i>E.coli</i> BW25113 <i>cadB</i> plazmidi ve <i>pnt3:: cadB</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.	47
Şekil 4.10. <i>E.coli</i> BW25113 <i>cadC</i> plazmidi ve <i>pnt3:: cadC</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü	47
Şekil 4.11. pH-6'da yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları	49
Şekil 4.12. pH-8'de yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları	50
Şekil 4.13. pH-6'da yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları	52
Şekil 4.14. pH-8'de yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları	53
Şekil 4.15. pH-6'da yabanıl tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda logaritmik koloni sayıları.....	55
Şekil 4.16. pH-8'de yabanıl tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda logaritmik koloni sayıları.....	56
Şekil 4.17. pH-8'de yabanıl tip ve mutantların komplementerlerinin logaritmik koloni sayıları	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
g	Gram
mg	Miligram
nm	Nanometre
L	Litre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
UV	Ultraviyole
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
Cfu	Koloni oluşum birimi
V	Volt
W	Watt
cm	Santimetre
dk	Dakika
s	Saniye
M	Molar

Kısaltmalar	Açıklama
rpm	Bir dakikadaki devir sayısı
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
M.M.	Metilen mavisi
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
KM	Kanamisin
UV	Ultraviyole
Mik	Minimum inhibasyon konsantrasyonu
OD	Optik dansite
TBE	Tris borat- EDTA
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
Gad	Glutamat dekarboksilaz
Cad	Lizin dekarboksilaz
Adi	Arginin dekarboksilaz

1.GİRİŞ

Mikroorganizmaların doğadaki yaşamları, dağılışları ve miktarları çevresel faktörlerin etkisi ve mevcudiyetine göre değişiklik gösterir. Mikroorganizmaların doğada çoğalma ve dağılışlarını etkileyen bu biyotik ve abiyotik faktörlere sıcaklık, osmotik basınç, oksijensizlik, güneş ışığı, ultraviyole (UV) ışınları, pH, ortamda bulunan toksik maddeler, fotosensitizer maddeler, açlık stresi, klorlama örnek olarak verilebilir (Batista ve diğerleri, 2021).

Güneş ışığı, bakterilerin yaşamı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Güneş radyasyonu, ultraviyole ve görünür ışık gibi farklı frekanslardaki ışıkların bakteriler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu ışıklar, bakterilerin DNA'sını mutasyona uğratabilir ve bakterilerin büyüme hızını etkileyebilir. Ayrıca, güneş ışığına duyarlı moleküller olan fotosensitizerler üzerindeki etkisi de önemlidir. Fotosensitizerler, güneş ışığının enerjisini emerek hücre içinde reaktif oksijen türleri oluşturabilirler. Bu reaktif oksijen türleri, bakteri hücrelerinde hasara neden olabilir veya bakterilerin büyümesini yavaşlatabilir. Elektromanyetik spektrumunda birbirinden farklı dalga boylarına sahip ışınlar vardır. Bunlar enerji yükleri bakımından karşılaştırıldıklarında kısa dalga boyunda olanların uzun dalga boyunda olanlara göre enerji yüklerinin daha büyük olduğu görülür. Yani ışık spektrumunda dalga boyu ile ışığın enerji miktarı arasında ters bir orantı vardır. Küçük dalga boyunun kuantum enerjisi yüksek, büyük dalga boyunun kuantum enerjisi ise düşüktür. Bundan dolayıdır ki kısa dalga boyundaki radyasyonların fotobiyolojik ve fotokimyasal yönden etkileri daha yüksek olmaktadır. Bu yüzden de ışığın sterilizasyon etkisi daha çok UV, X ve gama ışınları gibi küçük dalga boylu ışınlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Giannakis, Gamo, Darakas, Escalas-Cañellas ve Pulgarin, 2013).

Özellikle bazı dalga boylarındaki ışılardan çok kısa olanlar uzun dalga boylarına göre çok daha etkili antimikrobiyal ışılardır. Bunlardan en etkili olanı 200-310 nanometre(nm) dalga boyuna varan banttır ki bu da ultraviyole bölgesine denk düşmektedir. Özellikle 265 nm optimum öldürme seviyesine oldukça yakın bir değerdir. Bu manyetik bölge, yüksek bir öldürme kapasitesine sahip olup nükleik asitler ve proteinler tarafından en uygun şekilde absorbe edilen dalga boylarını içerir. Bu da organizmanın yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir. Emilen enerji pürinlerde ve primidinlerde birtakım değişikliklere sebep olup nükleik

asitlerdeki fonksiyonları zayıflatıp yapıya zarar verir. Örneğin timinler arasında timin dimerleri oluşturarak replikasyonun engellenmesidir. Uzun yıllar güneş ışığının mikrobiyal öldürme etkisinin tamamen ultraviyole ışınlarından kaynaklandığına inanılmaktadır. Oysaki güneşin ultraviyole radyasyonunun büyük bir kısmı atmosfer tarafından emilir. Güneş ışığının yeryüzündeki bakteriler üzerindeki etkisi tamamen başka bir mekanizma olan fotooksidasyona bağlıdır. Fotooksidasyon sürecinde, ultraviyole ışınlarının yaydığı enerji bakteriler tarafından emilir ve atmosferdeki oksijen ortamından kaynaklanan oksidasyon sürecinden dolayı ölüme yol açar (Nelson ve diğerleri, 2018).

Çevresel faktörlerin bir veya birkaçında, aşırı artma ve azalma gibi anormalliklerin görülmesi, canlı organizmaların yaşamı ve dağılışı üzerinde önemli değişikliklere neden olabilir ve stres ortamı yaratabilir. Organizma böyle bir durumda stres şartlarına karşı birtakım yeni yaşam stratejileri geliştirir. Bu stratejilerde ekzospore, endospore ve kist oluşumu görülür. Bu duruma örnek olarak genel stres proteinlerinin sentezi, özgün stres proteinlerinin sentezi (ısı, açlık, pH v.b), enzim aktivitesinde yavaşlama, hücre içi enerji kaynaklarının kullanılması ve dormansi verilebilir (Darcan, Özkanca ve İdil, 2009; Foster ve Spector, 1995; Özkanca ve Flint, 1997).

Bu stratejilerden özellikle dormansi oldukça önemlidir. Çoğu bakterilerin çevresel streslere maruz bırakıldıklarında "dormant" duruma girdikleri gözlenmiştir. Bakterilerde, canlı olarak tanımlanabildiği halde, kültür yapılamayan durum "dormansi" olarak adlandırılmıştır. Bu durum geçici bir canlılık kaybı olarak tanımlanmıştır. Bakteriler canlı fakat kültürü yapılamayan duruma girdikleri zaman büyüme kapasitelerini kaybetmelerine rağmen besin almaya, solunum yapmaya ve hücre membranından difüzyona karşı metabolitlerin tutulmasına devam etmektedirler. Dormansi durumu özellikle sucul sistemlerde dışkı koliform bakterilerinin tespiti için büyük bir problemdir. Örneğin *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi indikatör organizmaların ve su yoluyla bulaşan *Vibrio cholerae*'yi içeren patojenlerin sayılarının belirlenmesi için çok yaygın olarak kullanılan plak metodu yetersiz kalmaktadır. *E. coli* ve *Vibrio cholerae*'nin koloni sayımına göre tespit edilememiştir. Bununla birlikte direk sayım metoduna göre metabolik olarak aktif olduğu tespit edilmiştir. *E. coli*'nin ortamdaki kaybolduğu zannedilen bir araştırmada tavşan beynine enteropatojenik *E. coli* enjekte edilmesiyle, enfeksiyon olduğu yani bakterinin eski haline döndüğü görülmüştür (Colwell, Knight, Somerville, Shults ve Kaspar, 1989; Darcan, 2018).

Bu bakterinin doku kültüründe üreyebilmesi son derece şaşırtıcı olmasının yanı sıra insan sağlığı açısından tehdit edici bir durum arz etmektedir. Bu durumda dış kirliliğe sebep olan indikatör organizmalar su ortamında var olduğu halde agar plakları üzerinde görülmeyebilir. Bu durum dışkı kaynaklı patojenik bakterilerin normal miktarından daha az tespit edilmesine sebep olur. Bu insan sağlığı açısından riskli bir durum ortaya çıkarır (Bradley, Amend ve LaRowe, 2019).

Bu nedenle, fotooksidize mikroorganizma ölmüş veya dormant durumda olabilir. Bakteriler ozmotik strese maruz kaldıklarında yapılarında bir farklılık meydana gelir. Ozmotik stres koşulları altında, hücre suyu emerek hücre hacminin, zar geriliminin, turgor basıncının ve zar geçirgenliğinin değişmesine neden olur. Ek olarak aqua porinler (AqpZ), suyun hücreden alınmasından ve salınmasından sorumludur. Çözünenlerin taşınması, trehaloz, glisin-betain, prolin ve glutamat veya taşıyıcı genler gibi spesifik osmoprotektanların sentezi ile ilgili taşıma sistemleri vardır (Moat, Foster ve Spector, 2002; Darcan ve diğerleri, 2009).

Büyüme için gerekli olan uygun çevre koşullarındaki herhangi bir değişiklik mikroorganizmaları strese sokar ve mikroorganizmalar doğal büyüme koşullarında bu tür stresli koşullara maruz kalabilirler (Dikici, 2009; Russell ve diğerleri, 1995). Stres genel olarak biyolojik bir sistemin normal işleyişini bozan veya sistemin uyumluluğunu azaltan bir durum olarak tanımlanır. Stres faktörleri içsel (genetik stres ve yaşlanma) ve dışsal (çevresel) kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılır (Sørensen, Kristensen ve Loeschke, 2003). Mikroorganizmaların stres ile karşılaştıklarında canlı kalabilmeleri veya gelişim gösterebilmeleri, fizyolojik adaptasyon ve aklimasyon (alıştırma) mekanizmalarına sahip olmaları ile mümkündür (Schimel, Balser ve Wallenstein, 2007).

Stres şiddetinin büyüklüğü, organizmanın ölüm ve çoğalma oranlarındaki artışı ve azalışı lag süresi uzunluğunu belirlemektedir (Dikici, 2009; Russell ve diğerleri, 1995). Ölümcül olmayan stresten daha az (hafif) stres, mikroorganizmaların üreme yeteneğini yok etmez ancak büyüme hızını yavaşlatır veya durdurur. Orta derecede stres sadece mikropların büyümesini engellemekle kalmaz aynı zamanda bazı hücrelerin yaşlanma yeteneklerini kaybetmelerine de neden olur. Aşırı stres, hücreler üzerinde ölümcül bir etkiye sahiptir. Bu durum genellikle hücresel ölüme neden olabilir (Dikici, 2009; Yousef ve Courtney, 2003).

Çoğu mikroorganizma, çevresel parametrelerdeki küçük değişiklikleri tolere eder ve bu değişikliklere dakikalar, saatler veya günler içinde uyum sağlayabilir (Kristensen, Ketola ve Kronholm, 2020). Mikroorganizmaların sürekli değişen çevre koşullarına uyum sağlama yeteneğine “adaptasyon” denir. Adaptasyon bir anda olmaz, zamanla küçük değişiklikler meydana geldiğinde gerçekleşir. Stres faktörleri sonucu, mikroorganizmalar adaptasyon mekanizmalarını aktive edebilir. Bu mekanizmadan kaynaklı mikroorganizma çoğalabilir, ölebilir veya hayatta kalabilir. Mikroorganizmalar yaşadıkları stresin şiddetine göre farklı tepkiler verirler (Yousef ve Courtney, 2003). Bu yanıt sistemi, mikroorganizmaların aynı (spesifik uyarlanabilir yanıt) veya farklı (çoklu uyarlanabilir yanıt çapraz koruma) streslere karşı toleransını artırır. Bu durum, uyarlanabilir bir yanıt veya tolerans olarak tanımlanır (Isohanni, Huehn, Aho, Alter ve Lyhs, 2013).

Adaptasyon birincil tepki mekanizmasıdır; algılama mekanizmaları, düzenleyici proteinlerin işlevi (örneğin, RpoS), homeostaz stimülasyonu ve onarımı, şok protein sentezi ve hücre zarı değişiklikleri dahil olmak üzere hücresel savunma sistemlerini karakterize etmektedir. Bakteriyel stres tolerans yanıtı, hem hücredeki yapısal hem de hücredeki fizyolojik değişiklikleri kapsamakta aynı zamanda genetik düzenleyici mekanizma gibi de görev yapmaktadır (Isohanni ve diğerleri, 2013). Stres yanıt sistemleri patojenik organizmaların virülansında önemli bir rol oynayabilmektedir (Fuentes, Acuña ve Calderón, 2022).

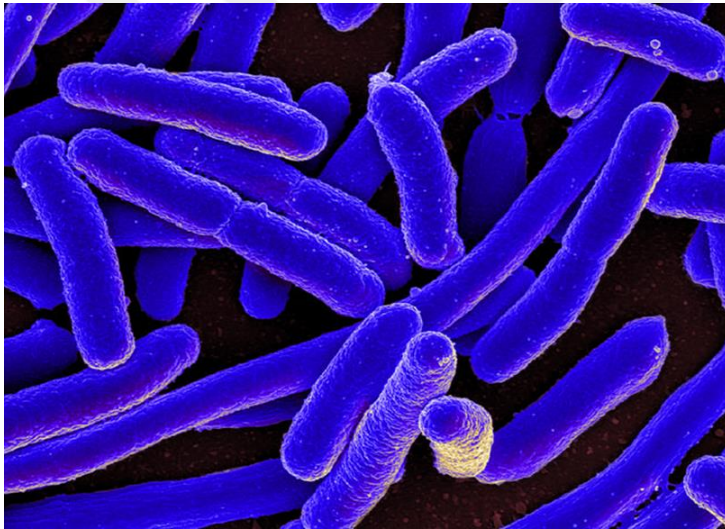
Çevresel streslere karşı direnç ve tepkiler, bakteriyel patojenlerin değişen ortamlarda hayatta kalması veya gelişmesi için gereklidir. Bu amaçla hücreler kendilerini stres faktörlerinden korumak veya hasarlarını onarmak için çeşitli yapılar geliştirmişlerdir. Asit direnç mekanizmaları bunlar arasında önemli rol oynamaktadır (Dahlsten, Lindström ve Korkeala, 2015).

Bu çalışma iki farklı pH’a ayarlanmış fosfat tamponları içerisinde gerçekleşmiştir. Sabit bir dalga boyunda, ortama metilen mavisi (fotosensitizer) eklenerek ve metilen mavisiz ortamda yabancıl tip olan *E. coli* W3110 ve bu suştan elde edilmiş *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB*, *cadC* mutantlarının yaşam deneyleri incelenmiştir. Fotooksidatif stres ve metilen mavisinin mutantlarla ilişkisi araştırılmıştır. İki farklı pH’da serbest radikal salınımının bazik (alkali) ve asidik ortamda bakteri direnç sistemlerinin moleküler mekanizmaları açıklanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli* Hakkında Genel Bilgiler

E. coli, 1885 yılında Theodor Escherich tarafından insan bağırsağında yaşadığı keşfedildi. 1950'lerden bu yana bilimsel çalışmalarda ve araştırmalarda en sık kullanılan bakteridir. Kısa zamanda birçok besiyeri ortamında büyüebilme özelliğinden dolayı moleküler çalışmalarda model organizma olduğu için çalışmalarda bu bakteri kullanılmaktadır. *E. coli*, Enterobacteriaceae familyasında bulunan Gram negatif (-) bakteri olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *E. coli*'nin elektron mikroskopundaki görünümü

1,1-1,5 x 2,0-6,0 μm boyutlarında, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, hareketli, fakültatif anaerobik bir bakteridir (Cruickshank, Duguid, Marmon ve Swain, 2004). Hareketli olmayan türleride vardır. 37°C'de 24 saat boyunca diferansiyel ve seçici besiyerlerinde nütrient agar, kanlı agar'da S şeklinde koloniler oluşturduğu görünür. Nitratı nitrite indirgeme özelliğine sahiptir. *E. coli*'de somatik (O), kamçı (H), pilus (Pilin) ve kapsüler (K) antijenleri bulunur. Pilus antijenleri ajanın hemagglütinasyon özelliklerini belirleyip *E. coli* fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı oldukça dirençli olmasını sağlar. Yaklaşık 170 O antijeni ve 50 den fazla H antijeni tesbit edilmiştir (Öngen, 2008; Abbott, O'Connor, Robin, Zimmer ve Janda, 2003).

2.2. Stres

Uzun yıllardır araştırmacılar, mikroorganizmaların ölümcül koşullar altında nasıl hayatta kalabilecekleri ve aşırı stres koşulları altında adaptasyon mekanizmalarının doğası ile ilgilendiler. Örneğin Fay, 1934'te ozmotik strese maruz bırakılmış bakterilerin termal adaptasyonlarını artırdığını bildirdi. Ölümcül olmayan streslere maruz kalan mikroorganizmalar, uygulanan streslere karşı direnç geliştirir. Bu duruma genellikle "stres adaptasyonu" denir (Fay, 1934; Şehriban ve Andiç, 2016).

2.2.1. Stresin tanımı

Stres ilgili olduğu alana göre farklı anlamlar taşır. Bir fizikçi için stres, bir alana uygulanan kuvveti ifade ederken, biyolog için yetersiz fiziksel koşullar, toksik kimyasalların kullanımı ve zararlı beslenme koşulları anlamına gelir. Mikroorganizmaların büyümesini veya çoğalmasını olumsuz etkileyen her türlü zararlı faktör/ortam stres olarak adlandırılır, ancak seviyeleri değişiklik gösterebilir (Neidhardt ve VanBogelen, 2000; Yousef ve Courtney, 2003; Guo ve Gross, 2014).

Bir mikroorganizma orta derecede strese maruz kaldığında, mikrobiyal büyümenin inhibisyonuna ek olarak, bakteriyel canlılıkta da bir azalma olur. Şiddetli (aşırı veya şiddetli) stres, bakteri popülasyonunun çoğunun ölümüne yol açan bakteri hücreleri için öldürücüdür (Şekil 2.2). Isı, ışık, radyasyon, elektrik akımı, basınç, ultrasonik dalgalar ve ozmotik şok fiziksel streslerdir. Asitler, tuzlar ve oksitleyiciler kimyasal streslerdir. Mikrobiyel metabolitler, antagonizma ve yarışmacı flora biyolojik streslerdir. Bakteriler yavaş yavaş veya ani olarak strese maruz kalabilir. Özellikle ani maruz kalma durumlarında “şok” adı verilen bir durum ortaya çıkar. Örneğin, gıda ile ilişkili bakteriler mide ortamında ani bir pH değişimi veya asit şoku yaşayabilmesine rağmen, gıda fermantasyonu sırasında kademeli olarak asitlik düzeyinin artışından kaynaklı stres yaşayabilirler (Yousef ve Courtney, 2003).

Genel stres yanıtı çeşitli stres faktörleri ile aktive edilebildiği gibi çoklu stres faktörleri tarafından da uyarılabilir. Genel stres tepkisi, farklı stres etkenleri tarafından aktive edilebilir ve birden fazla faktör tarafından uyarılabilir. Genel stres yanıtının aktivasyonu genellikle

büyümede yavaşlama sırasında veya durağan faz geçişi sırasında meydana gelir (Arsène, Tomoyasu ve Bukau, 2000; Cardoza ve Singh, 2022).

E. coli ve gram (-) bakterilerin, en iyi bilinen ortak stres tepki sistemleri, alternatif sigma faktörü (σ s) tarafından kontrolü sağlanmaktadır. Gram pozitif (+) bakterilerde σ B tarafından kontrol edilir. Alternatif sigma faktörü ve σ B tarafından uyarılan genlerin, hücreyi ozmotik ve oksidatif strese hazırlayarak DNA onarımı ve osmoprotektan etkiler sağladığı rapor edilmiştir (Bessaiah, Anamalé, Sung ve Dozois, 2022; Cronan, 2002).



Şekil 2.2. Hücresel stres

2.2.2. Bakteriye stres

Bakteriler doğal yaşam alanlarında çeşitli çevresel streslere maruz kalabilmektedir. Bakteriler strese maruz kaldıkları için ölebilir veya adaptif mekanizmaları aktive ederek hayatta kalabilirler. Aktive olan adaptasyon mekanizmaları ile uzun süre stresli koşullara dayanabilirler veya devam eden stres sonucu yaralanıp ölebilirler. Doğada bakteriler oksijen, ışık, deterjan, soğuk ve dezenfektanlar gibi streslerin yanı sıra düşük su aktivitesi, Eh (redoks potansiyeli), NaCl, asidik ortam, bazik ortam, ısı, gibi streslere maruz kalabilmektedir. Ölümcül olmayan streslere maruz kalan mikroorganizmalar, uygulanan streslere karşı direnç geliştirir. Bu durum için genellikle 'stres adaptasyonu' terimi olarak ifade edilir. Farklı streslere adapte olmuş patojenler gıdalarda hayatta kalabilir. Bu bakteriler mide gibi asidik pH koşullarına bile direnebilir (Dikici, 2009).

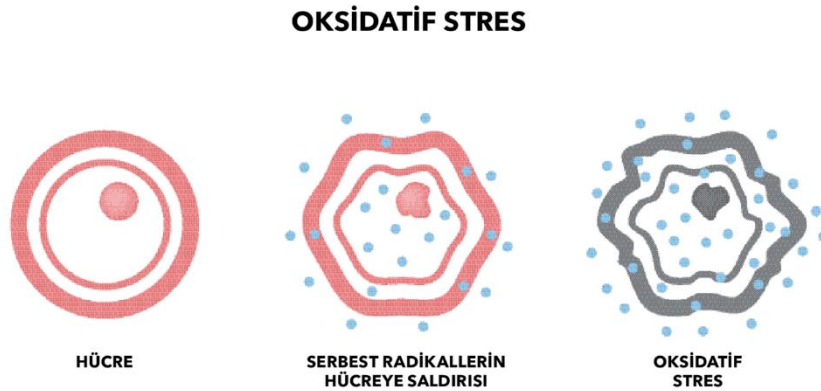
Bir bakteri hücresi bir stres faktörü ile karşılaştığında, genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa buna uygun proteinleri üreterek kendini korumaya çalışır. Stres altında mRNA, bakteriyel DNA'dan transkripsiyonla üretilir ve mRNA, karşılık gelen stres düzenleyici proteinini sentezler. Pek çok protein, bakteri fizyolojisini etkiler ve ilişkili

streslerle savaşır. Sentezlenmiş bir protein, bir veya daha fazla strese karşı etkili olabilir. Oluşan strese karşı her bakterinin harekete geçirdiği direnç mekanizması aynı veya farklı olabilir. Ayrıca aynı bakterinin aynı streslere karşı direnç mekanizması farklı büyüme evrelerinde (lag fazı, logaritmik faz, durağan faz) farklılık gösterebilir (Arsene ve diğerleri, 2000; Cronan, 2002; Yousef ve Courtney, 2003).

Stres faktörleri bakterilerin duyarlı olan bölgelerinde, hücresel fonksiyonların bozulmasına neden olan değişikliklere sebep olabilir. Bu değişiklikler arasında hücre membranının geçirgenliğindeki artışlar ve azalmalar, protein yapısındaki bozulmalar, ribozomal hasarlar ve nükleik asitler üzerinde olumsuz etkiler bulunabilir (Yousef ve Courtney, 2003).

2.3. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri olarak bilinen serbest radikallerin antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik hali oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.3). Bu dengesizlik hali dokulara hasar verebilir (Sies, Berndt ve Jones, 2017).



Şekil 2.3. Oksidatif stres

Serbest radikaller, birçok biyokimyasal süreçte genellikle bir yan ürünü olarak oluşur. Vücutta bulunan aktif nötrofiller çevreden gelen elektromanyetik radyasyon etkisi olarak serbest radikaller üretilir veya doğrudan azot dioksit ve ozon gibi oksitleyici kirleticilerle dışardan vücuda alınabilir. Vücut içerisindeki antioksidan savunma mekanizmasındaki

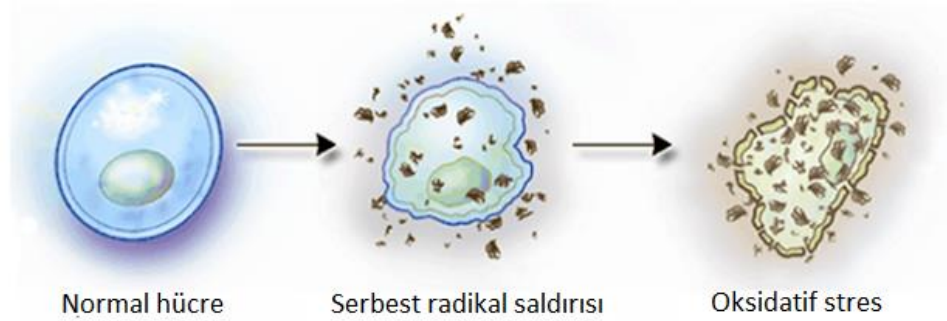
eksiklikten kaynaklı serbest radikallerin alınmasıyla dokular zarar görebilir (Betteridge, 2000).

2.3.1. Bakteriler oksidatif stres

Aerobik organizmalar, solunum için moleküler oksijen (O_2) kullanır. Enerji elde etmek için besinlerin oksidasyonu gerçekleşir. Reaktif yan ürünler Süperoksit anyon radikali gibi oksijen (O_2), hidrojen Peroksit (H_2O_2) ve yüksek reaktif hidroksil radikalleri (OH), aerobik olarak yetiştirilen hücrelerde serbest radikaller sürekli olarak üretilir. Bu tür ürünlerin çoğu, çeşitli membran bağlantılı solunum zincirinin enzimleri tarafından, katalize edilen moleküler oksijenin sıralı tek değerli indirgenmesinden elde edilir. Deneysel veriler göstermektedir ki, *E. coli*'de solunum zincirinde hidrojen peroksit (H_2O_2) üretiminin %87'sini oluşturmaktadır (González-Flecha ve Demple, 1995; Korshunov ve Imlay, 2010).

Organik maddelerin oksitlenmesinde elektronla beraber H^+ iyonunun da molekülden ayrıldığı görülür ki bu olay, dehidrojenizasyon olarak adlandırılır. Organik maddelerin indirgenmesinde ise elektron alınması, proton (H^+) alınmasıyla birlikte olur. Yani organik maddelerin oksidoredüksiyon reaksiyonlarında, bir organik molekül hidrojen donörü (vericisi) olarak rol alıp yükseltgenirken bir başka molekül ise hidrojen akseptörü (alıcısı) olarak rol alıp indirgenmektedir. Dehidrojenizasyon organik maddelerin yükseltgenmesi sırasında elektronlar ayrılırken H^+ iyonunda molekülden ayrılması olarak tanımlanmaktadır. Protonlardan gelen H^+ alınmasıyla organik maddelerin indirgenmesi gerçekleşir. Diğer bir deyişle, organik maddelerin oksiredüksiyon reaksiyonlarında, bir organik molekül hidrojen verici görevi görürken, başka bir molekül hidrojen alıcısı olarak indirgenir. Bakterilerin solunum sisteminde NADH ve NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid hidrit) dehidrojenazlarla çalışan elektron taşıyan koenzimlerdir. İyonlaştırıcı gibi çevresel ajanlar, UV radyasyonu veya hücre içi oksijen üreten çok sayıda bileşik olduğunda ortaya çıkan oksidatif stres nedeniyle hücrenin savunma kapasitesi aktif oksijen konsantrasyonu aşan bir seviyeye yükselir. NADPH oksidaz enzimini kullanan bazı bağışıklık hücreleri, patojenik bakteriler tarafından istila edildiğinde, fagositoz sırasında bir silah olarak oksidatif stresi de kullanır. Bu son derece reaktif oksijen için biyolojik hedef türleri DNA, RNA, proteinler ve lipitlerdir. Çoğu Hasar, Hidrojen Peroksit (H_2O_2)'ten üretilen hidroksil radikallerinden kaynaklanır (Kashef ve Hamblin, 2017; Fasnacht ve Polacek, 2021).

Sülfidhidril gruplarının oksidasyonu, disülfidlerin indirgenmesi, metal katalizli oksidasyon yoluyla metal bağlama bölgelerine yakın amino asit kalıntılarının oksidatif eklenmesi gibi stres faktörleri proteinlerin yapısını ve fonksiyonlarını bozarak oksidatif stresten kaynaklı modifikasyonlara yol açabilir. Tüm bu modifikasyonlar, zar ve proteinlerin fonksiyon kaybına yol açtığı ve DNA replikasyonunu bloke ettiği veya mutasyonlara neden olduğu için hücreye zarar verir (Ozougwu, 2016) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hücrenin oksidatif strese maruz kalması

2.4. Serbest Radikal

Dış yörüngelerinde tek elektron veya eşlenmemiş elektron taşıyan yüksek enerjili moleküller veya atomlar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (Bast, Haenen ve Doelman, 1991; Santo, Zhu ve Li 2016). Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları için diğer maddelerle kolayca reaksiyona girebilirler. Elektronları eşleştirilmiş (atom) veya molekülleri kararlı bir yapıya sahip olduklarından, diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimleri serbest radikaller kadar yüksek değildir. Bu nedenle, kararlı olan, eşleşmemiş elektronları olmayan ve diğer maddelerle radikallere göre daha zayıf reaksiyon gösteren moleküllere nonradikal denir (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Valko ve diğerleri, 2007).

2.4.1. Serbest radikal tarihi

Son yıllarda, çeşitli fizyolojik durumlardaki önemli rolleri ve çeşitli hastalıklardaki rolleri nedeniyle serbest radikallerin biyolojideki rolünün araştırılmasına ilgi artmıştır. Michigan Üniversitesi'nde kimya profesörü olan Moses Gomberg, canlı sistemlerde organik bir serbest

radikal olan trifenil metil radikalının ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$) varlığını ilk kez 1900'de keşfetti (Gomberg, 1902).

Daha sonra 1954'te Gershman, oksijen toksisitesinin serbest radikallerin oluşma yeteneğine bağlı olduğunu belirten "serbest radikal oksijen toksisitesi" teorisini önerdi (Gershman, Gilbert, Nye, Duer ve Fenn, 2001). Commoner ve arkadaşları tarafından aynı yıl elektron paramanyetik rezonans (EPZ) ile ilgili çalışmalar yaptı (Commer ve diğerleri, 1954).

Biyolojik materyallerde serbest radikallerin varlığını doğrulandıktan sonra Denham Harman 1956'da serbest radikallerin yaşlanma üzerine etkisinin olduğunu belirten "serbest radikal teorisi" önerdi. Serbest radikal araştırmalarının ikinci dönemi, 1969'da süperoksit anyonuna, süperoksit dismutaza karşı ilk enzim savunma sistemini keşfeden McCord ve Fridovich ile başladı (McCord ve Fridovich, 1969).

Loschen, 1971'de ilk kez, Nohl ve Hegner tarafından desteklenen hücrel metabolik solunumda reaktif oksijen türlerinin üretildiğini belirtti (Nohl ve Hegner, 1978; Loschen, Flohe ve Chance, 1971).

1977'de Mittal ve Murad, hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$)'nın, guanilat siklaz enzimini aktive ederek ikinci haberci siklik GMP oluşumunu indüklediğini bildirdi (Mittal ve Murad, 1977). Daha sonra 1989'da Halliwell ve Gutteridge, reaktif oksijen türlerinin (ROT) serbest radikal ve radikal olmayan oksijen türlerini içeriyor olduğunu keşfetti (Halliwell, 1989).

2.4.2. Serbest radikaller

Hücre içerisindeki serbest radikaller bulunmasının sebebi hücre metabolizması sonucunda açığa çıkan ürünlerdir. Serbest radikal, değerlik kabuğundaki veya yörüngesindeki bir elektron, birbiriyle kesişen ve bilinen eşleştirilmemiş bir elektron atomu veya molekülüdür. Bir serbest radikalın tek elektron sayısı onu stabil halde olmayan, kısa ömürlü ve oldukça tepkime girme isteği yüksek hale getirir. Reaktivitelerinin yüksek olması nedeniyle, kararlı hale dönmek için eşlenmemiş elektronu bulunmayan bileşiklerden elektronları ayırabilirler (Şekil 2.5). Saldırıya uğrayan bileşik elektronunu kaybettiği için stabilitesini kaybederek

serbest radikal haline dönüşüp canlı hücreye zarar veren bir zincir reaksiyonu saldırısı başlatır (Phaniendra, Jestadi ve Periyasamy, 2015).



Şekil 2.5. Serbest radikal

2.4.3. Oksijen tarihi

Oksijen, Dünya atmosferinde her zaman mevcut değildi. Siyanobakteriler ve bitkiler tarafından üretilen oksijenin, dünya atmosferinde yaklaşık 2,8 milyar yıl önce ortaya çıktığını ve yaklaşık 2,45 milyar yıl önce ikamet ettiğini göstermektedir. Toksisitesi nedeniyle oksijen, antioksidan sistemler geliştiremeyen canlı organizmaları yok etti. Darwinist bir evrimsel süreç, çevrelerine en uygun organizmaları seçti. Sadece reaktif oksijen türlerini (ROT) kullanabilen ve nötralize edebilen organizmalar oksijenle ilgili toksisite hayatta kalabildi. Ökaryotik hücreler, bu sürecin bir bileşeni olarak ROT oluşumu ile enerji üretmek için oksijen kullanabilen bakterileri yuttu. Hücrelere dahil edildikten sonra, bu simbiyotik bakteriler, ROT üretimi yoluyla oksijenden büyük miktarda enerji üretebilen mitokondri olarak evrimleşti (Searcy, 2003). Önemli olan, mitokondrinin bu ROT ile ilişkili oksidatif yaralanmalara karşı kendilerini koruyabilen düzenleyici sistemler geliştirmesidir (Huss ve Kelly, 2005).

Oksijenin kendisi 1772'de İsveçli kimyager Scheele tarafından keşfedildi ve tanımlandı; 2 yıl sonra Priestley, bitkiler tarafından oksijen üretimini bildirdi; 1778'de Lavoisier, ortam havasında oksijen varlığını keşfetti. Yanmada oksijenin rolü açıklandı. 1927'de, atmosferde yüksek konsantrasyonlarda (%70'in üzerinde) mevcut olduğunda çeşitli hayvan türlerinde oksijenin toksik etkileri bildirilmiştir (Hancock, 2022).

1950'lerin ortalarında, radyasyona bağlı toksisite ile oksijene bağlı hasarlar arasındaki benzerlikler bildirilmiştir. Gerschman ve arkadaşlarının 1954'te yayınlanan serbest radikal oksijen toksisitesi teorisi, oksijenin toksisitesinin “kısmen azaltılmış” oksijen formlarından kaynaklandığını öne sürdü daha sonra ROT olarak tanımlandı. Oksijen ve reaktif oksijen türlerinin ikili rolleri farklı deneysel ve klinik ortamlarda vurgulanmaktadır. Oksidatif stresin fizyolojik ve patojenik rolleri ile ilgili bölümlerde tartışılmıştır. Buna paralel olarak, reaktif oksijen türleri olarak oksijenin aktivasyonunun çeşitli yönleri aşamalı olarak çözülmüştür (Gerschman, Gilbert, Nye, Dwyer ve Fenn, 1954).

Reaktif oksijen türleri arasında hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2\cdot^-$), alkoksil ($\text{RO}\cdot$) peroksil ($\text{ROO}\cdot$) ve lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$) radikalleri içerir. Öte yandan Reaktif nitrojen türlerini ise nitrojen dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) ve nitrik oksittir ($\text{NO}\cdot$). Reaktif oksijen türleri ve RNS diğer nonradikal reaktif türlere kolaylıkla diğer radikal olmayan reaktif türlere dönüşecektir. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit (HOCl), ozon (O_3), nitrik asit (HNO_2), dinitrojen trioksit (N_2O_3), lipid peroksit (LOOH) ve peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) genellikle oksidan serbest radikaller arasında gösterilmemiştir. Bu oksidan türler, canlı organizmalar tarafından patolojik ve fizyolojik koşullar altında üretilip canlı organizmalarda serbest radikal reaksiyonlara neden olabilirler (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Martemucci, 2022; Valko ve diğerleri, 2007).

2.4.4. Fotosentez ve oksijenin evrimi

Fotosentetik organizmalar O_2 üretirerek Dünya'nın atmosferini ve sürdürülebilecek yaşam biçimlerini büyük ölçüde değiştirdiler. Özellikle atmosferik O_2 birikimi, oksijen azalmasını bir proton radyanı oluşumuna bağlayan aerobik solunum gibi biyoenerjik yolların evrimine yol açtı (Raymond, Zhaxybayeva, Gogarten ve Blankenship, 2003; Shimada, 2022).

Aerobik solunumun gelişimi, hayvanlar ve bitkiler dahil olmak üzere karmaşık organizmaların evrimi izledi (Blankenship ve Hartman, 1998). Reaktif oksijen atmosferik O_2 'nin varlığından elde edilen enerjik kazanımlara rağmen, solunum ve diğer reaksiyonlarda geliş güzel ROT oluşumu nedeniyle ciddi sonuçlar ortaya çıktı (Imlay ve Pathways, 2003; Halliwell, 2006).

O₂'nin tek elektron transfer indirgenmesi, genellikle süperoksit olarak adlandırılan bir süperoksit radikal anyonu (O₂•-) üretir. Süperoksite bir elektron transfer reaksiyonu, biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit (H₂O₂) olarak bulunan bir peroksit anyonu (O₂-) üretir. Buna karşılık H₂O₂, Fenton reaksiyonunda bir hidroksil radikali (OH•) üretmek için demir (Fe₂⁺) ile reaksiyona girer (Halliwell, 2006).

Uyarma enerjisinin temel duruma (veya üçlü) O₂'ye transferi, en dıştaki elektronların yeniden düzenlenmesine neden olarak iki ¹O₂ formundan birini üretebilir. 1Δg olarak adlandırılan biyolojik olarak ilgili ¹O₂ durumu, O₂'nin spin hizalı, eşleşmemiş elektronları birbirleriyle eşleştğinde ortaya çıkar, böylece bir orbitalin çift elektronlara sahip olduğu ve diğer orbitalin boş olduğu bir dış p orbital yapısı üretir (Briviba, Klotz ve Sies, 1997; Halliwell, 2006). Bu elektron yeniden düzenlenmesi, dönüş kısıtlamasını ortadan kaldırarak O₂'yi ¹O₂'ye dönüştürür ve ¹O₂'yi oksijen türlerinin en reaktif hale getirir (Briviba ve diğerleri, 1997; Ziegelhoffer ve Donohue, 2009).

İn vitro çalışmalar, ROT'un çeşitli biyomoleküllere zarar verdiğini göstermiştir. Öncelikle (O₂•-) ve H₂O₂ oksidasyon yoluyla proteinlere zarar verir (Imlay, 2003). Oysa (OH•) DNA1,2'ye zarar vererek potansiyel olarak mutajenik ve hatta öldürücü olabilecek çeşitli bozulmalara neden olur (Imlay, 2003). Hücreler, zarlar, proteinler ve DNA dahil olmak üzere in vitro çok sayıda hücre sel bileşenle reaksiyona girdiği gösterilen ¹O₂ tarafından öldürülür. Bu ROT'lardan her biri hücrelere zarar verebilir, ancak hangi kimyasal reaksiyonların meydana geldiği ve bireysel reaksiyonların hangi oranlarda meydana geldiği konusunda bazı anlaşmazlıklar vardır (Imlay, 2003; Juan ve diğerleri, 2021).

2.4.5. Oksidatif stres tepkileri

ROT molekülleri H₂O₂ ve (O₂•-) solunum zinciri bileşenlerinin fotooksidasyonu, çeşitli endojen aktiviteler veya eksojen ajanlar 1–3 ile aerobik olarak yetiştirilmiş bakterilerde üretilir. ROT, DNA'ya, proteinlere ve zarlara zarar verebileceğinden, hızlı bir yanıt oluşturmak hayatta kalmak için çok önemlidir. H₂O₂ ve O₂'ye bakteriyel adaptif veya stres tepkileri, düşük dozlarda H₂O₂ veya O₂•- (paraquatın biyolojik aktivasyonu ile oluşturulan) *Salmonella enterica* ve *E. coli* gibi mikroorganizmalarda stres tepkileri farklı şekilde ortaya çıkabilir. Ancak, daha yüksek dozlarda maruz kaldıklarında bu mikroorganizmalar için

ölümcül hale gelebilir (Farr, Natvig ve Kogoma, 1985; Merrikkh, Ferrazzoli, Bougdour, Olivier-Mason ve Lovett, 2009; Ziegelhoffer ve Donohue, 2009).

Daha ileri çalışmalar, ilgili transkripsiyon faktörlerini (H_2O_2 için OxyR ve O_2 için SoxRS), hedef genlerini ve aktivitelerinin nasıl düzenlendiğini tanımladı. OxyR aktivitesi, H_2O_2 ile artar. OxyR regulonu, oksidan eliminasyonunda (*katG*, *ahpC* ve *ahpF*), tiol grupları ve disülfid bağları arasındaki dengenin korunmasında (*gorA*, *grxA* ve *trxC*) ve en aza indirmek için Fe^{2+} kullanılabilirliğini (*dps* ve *fur*) sınırlandırmada yer alan genleri içerir. Bu genler Fenton reaksiyonunun oluşumu. SoxR, ($O_2^{\bullet-}$) ile etkinleştirildiğinde, doğrudan soxS'nin transkripsiyonunu uyarır. SoxS, gen transkripsiyonunu doğrudan aktive etmek için O_2 'ye ikinci bir transkripsiyonel yanıt kademesinde etki eder. SoxRS regulonu, ($O_2^{\bullet}$) eliminasyonunda (manganez süperoksit dismutaz (*sodA*)), DNA onarımında (endonükleaz IV (*nfo*)) ve glutatyona bağlı onarım reaksiyonları için indirgenmiş piridin nükleotidlerin artan hücresel havuzlarında (glukoz) yer alan genleri içerir. SoxRS regulon üyeleri arasında, krebs döngü fonksiyonunun devam etmesini sağlayan *fur*, süperoksite dirençli fumaraz (*fumC*) ve aconitase (*acnA*) izozimleri ve ürünleri azaltma açısından önemli olduğu tahmin edilen birkaç flavodoksin geni (*fpr*, *fldA* ve *fldB*) bulunur. Fe-S kümeleri 3. hem OxyR hem de SoxRS regulonları, hücreleri reaktif nitrojen türleri ve organik çözücüler dahil olmak üzere diğer zararlı kimyasallardan korur (Kaur ve Benov, 2020; Zheng ve Storz, 2000).

2.4.6. Serbest radikallerin kaynakları

Serbest radikaller vücutta farklı biyokimyasal işlemle üretilir; moleküler aerobik solunum sırasında oksijen veren süperoksit ve hidroksil radikalleri oluşturabilir. Oksidasyon gibi kimyanın yan ürünleri katekolaminlerin ve araşidonik asidin aktivasyonu moleküler oksijeni azaltabilen ürün elektronları süperoksit oluşturabilir. Süperoksit ve hipokloröz asit ($HOCl$) üretimi, aktifleştirilmiş fagositler tarafından güçlü bir oksidan oluşturabilir. Nitrik vasküler endotelyum ve diğer hücreler tarafından oksit üretimi içinde ek olarak, harici radikallere yanıt olarak serbest radikaller üretilir. Güneş ışınları, elektromanyetik radyasyon ve yaşlanma serbest radikal kaynakları olarak gösterilebilir (Şekil 2.6) (Betteridge, 2000).



Şekil 2.6. Serbest radikal kaynakları

2.5. Serbest radikalleri etkileri

2.5.1. Lipidlerin üzerindeki etkisi

Membranın lipid bileşenleri, serbest radikallerin etkisiyle oksitlenir. Lipidlerin peroksidasyonu sırasında, ‘ikinci mesajcılar’ gibi davranan çok sayıda toksik yan ürün de oluşur. Lipidler üzerinde neden olduğu hasar, hücrenin işleyişi için son derece zararlıdır. Yağların bazı ürünleri, örneğin malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE), 2-alkenaller ve izoprostanlar toksikolojik açıdan önemlidir (Devasagayam, Bolloor ve Ramasarma, 2003).

2.5.2. Karbonhidratlar üzerindeki etkisi

Kararlı haldeki karbon atomu üzerindeki rastgele bir hidrojen atomunu kopararak karbon merkezli bir radikal oluşturur. Bunu sonucunda örneğin (OH $\cdot$) gibi serbest radikaller tarafından bağ yapmaya açık hale gelecektir. Bu olay, hyaluronik asit gibi moleküllerde zincir kopmalarına neden olur (Sharma, 2014).

2.5.3. Proteinler üzerindeki etkisi

Serbest radikaller, enzim aktivitesine ve yapısal proteinlerin işlevine doğrudan müdahale edip proteinlere doğrudan zarar verebilir. Proteinlerin reaktif nitrojen türleri (RAT) ve reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından yükseltgenmesi sırasında, özellikle geçiş metali iyonları ile etkileşime girdiğinde, hidroperoksitler gibi kararlı ve reaktif ürünlerin üretimine yol açan serbest radikaller üretebilir. Temel olarak, bu oksitlenmiş protein formları çıkarılır ancak belirli bir süre boyunca birikimleri hastalıkların yanı sıra yaşlanma ile ilişkili olarak hasara sebep olabilir (Phaniendra, Jestadi ve Periyasamy, 2015).

2.5.4. DNA üzerindeki etkisi

Serbest radikal saldırısı, DNA'da DNA parçalanması gibi çeşitli değişikliklere neden olur ve bu da poli (ADP-riboz) sentetaz enziminin aktivasyonuna neden olur. Bu, DNA'nın onarılmasına yardımcı olmak için NAD^+ 'yı böler. Aşırı hasar durumunda, NAD^+ seviyeleri tamamen tükenebilir, bu da hücresel hasarın türüne bağlı olarak nekroz veya apoptozdan kaynaklanabilecek hücre ölümüne neden olabilir. Hücre zarının veya organelin serbest radikallerle hasar görmesi onu savunmasız hale getirir ve bu da tüm hücreyi riske atabilir (Sharma, 2014).

2.6. pH Stresi

Sulu çözeltilerde pH, H^+ veya OH^- konsantrasyonlarının birleşik logaritmik ifadesi olup yani hidrojen iyonlarının aktivitesini ifade eder. Organizmaların büyüme gelişmesi için belirli bir pH gerekir buna en uygun ortam gerekli ortamda mikroorganizmaların büyümesi, pH ile doğrudan ilişkilidir. Mikroorganizmaların yaşadığı pH yönünden incelendiğinde 3 tipe ayrılır. Alkalifiller yüksek pH'ta, nötr ortamda yaşayanlar nötr pH'ta ve asidofiller düşük pH'ta, en iyi büyüme ve gelişmeyi gösterir (Jin ve Kirk, 2018).

Bakteriler, çevrelerinin pH'ındaki değişiklikleri algılama ve bunlara uyum sağlama yeteneğine sahip pH homeostasis mekanizması sahiptir. Bu mekanizma, dış pH'daki değişikliklere karşı sitoplazmik pH'ın nötr değerlere yakın olmasını sağlar (Krulwich, Sachs ve Padan, 2011).

Proton itici gücü sayesinde bakteri sitoplazması pH stresine karşı önemli etkindir. Bu nedenle, bakterilerin hayatta kalması ve gelişmesi için sitoplazmik pH'ın kontrol edilmesi gerekir (Nazzaro, Fratianni, Martino, Coppola ve Feo, 2013).

Bakteri membranları hidrojen iyonlarına karşısında tamamen geçirgen değildir. Bu nedenle dış ortamda gerçekleşen pH değişikliklerin bakteriyi etkilemez. Örneğin, *E. coli*'nin sitoplazmik pH'ı sadece 0,1 birim değişirken, dış ortamın pH'ı 4,5 ile 7,9 arasında değişmektedir (Martinez ve diğerleri, 2012).

Bununla birlikte, pH homeostazı üreten tüm bu sistemler, bakterileri pH stresinden etkili bir şekilde koruyamaz. Asidik koşullarda büyüme ve hayatta kalma ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, alkali ortama adaptasyon mekanizması hala belirsizliğini koruyor. Bakterilerin K(Na)/H antiporterleri 5 ile alkali ortamlara uyum sağlayabildikleri bilinmektedir (Saito ve Kobayashi, 2003).

Bakteriler, metabolik aktiviteleri nedeniyle asidik ürünler üretebilir ve bu ürünler ortamın asidikliğini artırabilir. Bu nedenle, bakteriler asit stresine maruz kaldıklarında, vücutlarındaki çeşitli yapıları etkileyen mekanizmalar geliştirirler. Bu mekanizmalar, pH düzeyindeki değişikliklerden proton hareketini etkileyen kuvvetlere, enzim aktivitesinden protein katlanmasına kadar çeşitlilik gösterir. Örneğin, bakteriler asit stresine maruz kaldıklarında, flagella hareketlerini değiştirebilirler veya asidik ortamda çalışan enzimler üretebilirler. Bu sayede, bakteriler asit stresine dayanıklılık kazanarak yaşamlarını sürdürebilirler (Yousef ve Courtney, 2003).

Asit ortamlar, bakterilerin hücre zarının permeabilitesini etkileyerek pH dengesini bozar. Bu nedenle, bakteriler asit şok proteinleri üreterek kendilerini koruma mekanizması geliştirirler. Asit şok proteinleri, bakterilerin hücre zarının permeabilitesini azaltarak, asit etkisinden korunmalarını sağlar. Bu mekanizma, düşük pH değerlerinde mikroorganizmalar tarafından üretilerek kendilerini korumaya yönelik bir önlemdir. Bu mekanizma sayesinde, bakteriler pH etkisinden korunmayı başarırlar (Dikici, 2009).

Son araştırmalar, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *Salmonella spp.* gibi patojenik bakterilerin asidik koşullara uyum sağlama mekanizmalarına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu

bakteriler orta derecede asidik ortamlara maruz kaldıklarında, spesifik genler tarafından kontrol edilen asit şok proteinleri üreterek yüksek asitli ortamlarda hayatta kalabilirler. Bu mekanizma sayesinde, bu patojenik bakteriler asidik koşullara uyum sağlayabilirler (Foster, 1991; Peng, Tasara, Hummerjohann ve Stephan, 2011).

Bakteriler, asit ortamlarda yaşamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Asidik pH etkisinden korunmada görevli olan bu mekanizmalardan biri, asit direnç sistemleridir. Örneğin, *E. coli* bakterisinde 5 farklı asit direnç sistemi bulunur: glukoz bağımlı AR1, glutamat bağımlı (gad) AR2, arjinin bağımlı (adi) AR3, lisin bağımlı (cad) AR4 ve ornitin bağımlı (spef) AR5. *E. coli* bakterisinde dış membran porin proteinleri de asidik pH etkisinden korunmayı sağlar. Örneğin, OmpF, OmpC ve LamB gibi porin proteinlerinin sentezi asidik pH koşullarında değişiklik gösterir. Bu proteinler, nötral ve asidik pH koşullarında da görev alırlar. Asidik pH koşullarında *E. coli*'nin OmpF, LamB porin proteinlerinin ve 30 kDa'lık proteinlerin sentezinde azalma, OmpC sentezinde ise artış olur (Brameyer, Schumacher, Kuppermann ve Jung, 2022; Heyde, Lazzaroni, Magnouloux ve Portalier, 1987).

E. coli bakterisinde, EnvZ proteininin çalışmalarında, iki farklı mutasyonun porin sentezindeki kontrolünün değiştiği görülmüştür. Bu mutant suşların birisi, OmpF ve OmpC genlerinin pH bağımlı düzenlenmesini oldukça etkilemiştir. Ancak nötral pH koşullarında, her iki mutasyonda da bir değişim gözlenmemiştir ve OmpR sentezinin pH'dan etkilenmediği ortaya konmuştur. Bu bulgular, *E. coli* bakterisinde porin proteinlerinin sentezinin asidik pH koşullarında önemli rol oynadığını gösterir (Brameyer ve diğerleri, 2022).

E. coli bakterisinde, pH bağımlı porin düzenlenmesi hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel düzeyde olmaktadır (Darcen, 2012; Heyde ve diğerleri, 1987). OmpF ve OmpC genlerinin sentezi üzerinde hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel düzeyde pH'ya bağlı olarak regülatör etkinin EnvZ bağımlı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, ompF sentezi için ayrıca bir düzenlemenin de varlığı vurgulanmıştır. Asidik pH koşullarında ise OmpC porin sentezinin EnvZ'den bağımsız başka bir mekanizma ile çalıştığı ortaya konmuştur. Ancak bu mekanizmanın ne olduğu konusunda bilgi bulunmamaktadır. *E. coli* bakterisinde, pH ve osmolarite gibi faktörler porin proteinlerinin sentezini etkiler.

Örneğin, sabit osmotik koşullar altında yapılan çalışmalar, asidik pH koşullarında OmpC porininin sentezinin arttığını, fakat OmpF porininin ise nötral pH koşullarında daha fazla sentezlendiğini göstermiştir. Ortamın osmolaritesinin arttırılması durumunda ise OmpC porininin sentezi hem nötral hem de asidik pH koşullarında arttı, ancak bu arttırma pH'dan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleşmiştir. Ayrıca, farklı karbon kaynaklarının kullanılması durumunda OmpC porininin sentezinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak gliserol içeren ortamda, glukoz kullanımına göre OmpC porininin sentezinde bir azalma görülmüştür (Chakraborty ve Kenney, 2018; Thomas ve Booth, 1992).

Çalışmaların devamında, cAMP'nin pH 6,0'da OmpC protein sentezini artırdığı, ancak OmpF protein sentezine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, OmpC proteininin osmotik düzenlemesinin ortamdaki karbon kaynağından bağımsız olduğu belirlenmiştir (Chakraborty ve Kenney, 2018; Thomas ve Booth, 1992).

Daha önceki çalışmalarda kompleks ortamlarda üreyen hücrelerde pH bağımlı porin düzenlenmesi ortaya konmuşken. Önceki çalışmalar, kompleks ortamlarda üreyen hücrelerde pH'ya bağlı porin düzenlenmesini ortaya koymuştur (Chakraborty ve Kenney, 2018; Thomas ve Booth, 1992).

2.6.1. Sitoplazmik pH ölçümü

Bakteri hücreleri çok küçük olduğundan, bir pH elektrotu kullanarak sitoplazmik pH'ın doğrudan ölçümü zor olmasından dolayı iki farklı yöntemler geliştirilmiştir. Birincisi floresan kullanmayı içeren problemler ile gerçekleştirilmiştir (Sträuber ve Müller, 2010). İkincisi, konsantrasyona dayalı olarak sitoplazma ve dış arasındaki zayıf bazlar veya asitlerin gradyanı ile dahili pH'ı hesaplanır (Casey, Grinstein ve Orlowski, 2010). Son yaklaşım, kimyasal protonasyonuna bağlı olan bir nükleer manyetik rezonansı (NMR) sinyalinin kayması ile ölçülmüştür (Loiselle ve Casey, 2010).

2.6.2. Bakteriler pH etkisi

Bakteriler, farklı habitatlarda hayatta kalabilmek için değişen çevresel koşullarla başa çıkmak zorundadır. pH değeri önemli bir belirleyicidir. Besinlerin ve demir gibi eser

elementlerin çözünürlüğü ve genel olarak hücresel metabolizma üzerinde bir etkisi vardır. Çoğu bakteri, asidik veya alkali koşullara maruz kaldığında nötr veya hafif alkali bir iç pH'ı korur. Bu pH homeostazı, tüm hücresel enzimlerin işlevleri ve stabiliteleri için önemlidir (Krulwich, Sachs ve Padan, 2011).

Çok çeşitli organizmalar üzerinde yapılan çalışmaların bir sonucu olarak, bakteriyel pH homeostazı hakkında bir takım genellemeler yapılabilir. İlk olarak, tüm organizmaların ulaşmayı amaçladığı belirli bir iç pH değerinin olmadığı açıktır. Böylece, asidofillerin pH-6,5 ila 7,0 aralığında pH değerleri sergiledikleri, nötr ortamda yaşayan bakterilerin pH değerleri 7,5 ila 8,0 ve alkalifillerin pH değerlerinin 8,4 ila 9,0 olduğu kabul edilmektedir (Krulwich ve diğerleri, 2011).

pH değerlerindeki bu farklılık, bu aralıklarda çalışan enzim sistemlerini geliştirmek için dikkate değer bir kapasiteyi yansıtmaktadır. İkincisi, organizmaların sitoplazmik pH'larını düzenlemek için farklı kapasiteler sergiledikleri açıktır. Birçok organizmada, yaşadığı pH dışındaki pH'da her bir pH birimi değişikliği başına yalnızca 0,1 birim kadar değişirken, diğerlerinde çok daha büyük pH değişiklikleri gözlemlenmiştir (Krulwich ve diğerleri, 2011).

Bu genellemeye dışında, sadece nadiren sitoplazmik pH, hücrelerin optimum düzenleyici kapasiteyi göstermesi beklenebileceği büyüme koşulları altında ölçülmüştür. Üçüncüsü, fermentatif organizmalar, metabolizmanın solunum modu olan organizmalardan daha fazla büyümenin gerçekleşeceği bir pH değeri sergiler. Dördüncüsü, bir bakımdan alkalofiller, asidofillerden ve nötr ortamda yaşayanlardan farklıdır. Yani pH_i'nin düzenlenmiş değeri dış ortam pH'ından düşüktür (Parker, Schneegurt, Lister ve Forster, 2016).

2.6.3. *Escherichia coli* asit direnç mekanizması

Dört farklı amino aside bağımlı asit direnç sistemi karakterize edilmiştir ve her birinin iki bileşeni vardır. Asit direnci sistemleri (ADS), bakterilerin asit koşullarına dayanıklılığını sağlamak için gerekli olan mekanizmalardır. ADS, farklı tabanlarda çalışır ve farklı molekülleri kullanır. Örneğin, glutamik asit tabanlı asit direnci sistemi (GDAR), glutamik asit dekarboksilaz enzimleri GadA/GadB ve glutamat/y-aminobütirik asit (GABA)

antiporterleri GadC'yi içerir. Arginin tabanlı asit direnci sistemi (ADAR), indüklenebilir arginin dekarboksilaz AdiA ve arginin/agmatin antiporterini içerir. Lizin tabanlı asit direnci sistemi (LDAR), indüklenebilir lizin dekarboksilaz LdcI ve lizin/kadaverin antiporterini içerir. Asit tolerans yanıtı (ATY), bakterilerin asit koşullarına dayanıklılığını arttırmak için gerekli olan bir mekanizmadır. ATY, ölümcül asit stresine karşı direnç mekanizması oluşturur (Kanjee ve Houry, 2013).

2.7. Bakterilerde Oksidatif Stres ve pH İlişkisi

Bakteriler ne olursa olsun sabit bir dahili pH'ı korur. (*E. coli* pH-7,6). Ancak, çoğu bakteri pH-3 ile 7 arasındaysa yaşayabilir. Hücrenin geniş fizyolojik parametrelerinin hareketliliği dış boyut, şekil, hücre zarı, zar geçirgenliği ve hücre içi süper-oksit konsantrasyonu gibi faktörlere bağlıdır. Genel klinik modelde gram (-) *proteobacterium* ve *E. coli*'nin boyutu ve şekli hücreler pH stresine karşı çok hassastır, hatta daha fazla duyarlıdır. Stresini takiben membran parametrelerindeki değişiklikler, hücre boyutu ve şeklini etkilenmez. Fizyolojik anlamda çeşitli florokromlar serisi suşların karakterizasyonu açısından önemli bir fark ortaya koymaktadır. pH stresine karşı dirençte *C. metallidurans* membran seviyesindeki pH stresini hücrenin iç kısmında algılamaktadır. Çelişki olarak, *E. coli* hücreleri pH'daki değişikliklere küçülerek tepki vermekte olup sadece sınırlı olarak içini koruyor gibi görünen etkilerden kaynaklı hücre sınır seviyesinde veya hücre içinde gerçekleşir. Bununla birlikte, her iki suşta da bazılarında ortaya çıkan histogramlar, iki tepe noktasına karşılık gelen iki popülasyonu yansıtan iki ayrı bakteri popülasyonunun değişken duyarlılığının varlığını gösterir, bu da pH stresinin mevcudiyetini belirtir. Yüksek ve çok düşük pH'da gözlenen floresan hücrenin bir bölümünün lokalize hızlı yırtılması zar veya hücrenin tamamen yok edilmesi olarak gözlenmektedir. Ayrıca, sonuçlarımız şu düşüncayı desteklemektedir: Hücre zarı, pH hasarının önemli bir hedefidir. Bu, membran prop-belirlenmesinde önemli bir faktör olabilir. Farklı bakteri suşlarının stres direnci yine de öldürücü etkinin doğası ve zarın rolü pH direncini belirlemede yapı ve muhtemelen diğer stresler için hala açıklığa kavuşturulmalıdır. Sonuç olarak, akış sitometrisinin hakkında bilgi edinmenin ilginç bir yoludur. Bakteri suşlarının fizyolojik durumu ve metabolizması pH stresinden hücre bilgisi sağlar aksi takdirde herhangi bir şekilde elde etmek neredeyse imkansızdır. Çeşitli streslerin (örneğin: sıcaklık, X ışınları, UV ışınları, basınç, açlık ve oksidatifstres) homojen veya heterojen

popölasyonlar üzerindeki etkisi gözlemlenmelidir (Baatout, Leys, Hendrickx, Dams ve Mergeay, 2007).

2.8. Bakterilerde Fotooksidasyon

Uzun yıllar güneş ışığının mikrobiyal öldürme etkisinin tamamen ultraviyole ışınlarından kaynaklandığına inanılmaktadır. Oysaki güneşin ultraviyole radyasyonunun büyük bir kısmı atmosfer tarafından emilir. Güneş ışığının yeryüzü üzerindeki bakteriye etkisi tamamen başka mekanizma olan fotooksidasyona bağlıdır. Fotooksidasyon sırasında ultraviyolede uzun olan dalganın yaydığı enerji mikroplar tarafından emilir ve atmosferdeki oksijenden kaynaklı ölüme yol açan bir oksidasyon oluşur (Nelson ve diğerleri, 2018).

Çevresel faktörlerden biri veya birden fazla görülecek aşırı artma ve azalma gibi anormallikler canlı organizmanın yaşamı ve dağılışı üzerinde oldukça önemli değişiklikler yaparak oluşan stres ortamına karşı birtakım yeni yaşam stratejileri geliştirir. Bu stratejiler ekzospore oluşumu (örn: *Actinomyces* ve *Streptomyces*), endospore oluşumu (örn: *Bacillus* sp.), kist oluşumu (örn: *Azotobacter* sp.) olarak görülür (Hamedi ve Poorinmohammad, 2017).

2.9. Metilen Mavisi ve Analoglarının DNA ve Diğer Biyolojik Substratlarla Fotokimyasal Etkileşimleri

Metilen mavisi ve bununla bağlantılı fenotiazinyum boyaları biyolojik substratlarla ışık uyarımlı reaksiyonlara girerler. Boyaların ışık etkisi ile nükleik asitleri, proteinleri, lipidleri, biyolojik membranları, organelleri, virüsleri ve bakterileri etkiledikleri görülmüştür. Histolojide hücre parçalarını boyamada kullanılan boyaların mikroskopla aydınlatma şartlarında bile mikroorganizmaları etkisiz hale getirdikleri bakterilerin fotooksidasyonu kantitatif araştırmalarla bildirilmiştir (Khadieva ve diğerleri, 2021; Tardivo ve diğerleri, 2005).

Azur B, Azur C, thionin ve toludin mavisi kullanılarak, bu boyalar sayesinde DNA ışığa duyarlı hale getirilebilir (Paul ve Kumar, 2013). Özellikle, böyle bir fotodinamik hareketin oksijen eşliğinde gerçekleştirilmesi sonucunda, direkt olarak elektron transferi gibi bir

reaksiyon ya da hidrojenin ayrılması gibi bir tepki ya da dolaylı olarak singlet oksijen ve serbest atom kökleri gibi aktif türlerin oluşumu meydana gelebilir (Wang, 2012).

Işık ile uyarılmış boya, triplet uyarım durumuna geçer. Bu, bir yükseltgenme halidir. Bu triplet durumları, moleküler oksijen ile bastırılır ve bu bastırma sonucunda, singlet oksijen oluşur (Vatansever ve diğerleri, 2013). Triplet uyarım durumlarının yaşam sürelerinin uygun olması bunların metal kompleksleridir (Erickson ve diğerleri, 2015).

2.10. Fotosensitizer Maddelerin Hücresel Proteinlere Olan Etkileri

Fenotiazinyum boyaları aminlerinin fotooksidizasyonu bir süredir bilinen bir olgudur. Bu, aynı zamanda bazı aminoasitler için de geçerlidir (Moreira ve diğerleri, 2012). Dış mernbran proteinleri ile toluidin mavi etkisine maruz bırakıldı, floresan ışığı altındaki *E. coli* bakterisinin dış membran proteinlerinde ciddi değişikliklerin olduğu ve dormansi durumunda olduğunu ortaya koymuştur. Bu reaksiyon yolu hem koşullara hem de özel aminoaside bağlı olmaktadır. Örneğin, O₂ mekanizmaları özellikle histidin için kullanılır. Bu tepkimeler, sadece izole aminoasitlerle değil, aynı zamanda, proteinler, peptidler ve enzimlerle meydana gelebilir (Darcan, Özkanca, Idil ve Flint, 2009; Grossweiner, 1976).

Fenotiazinyum boyaları kullanılarak yapılan enzimlerin fotoinaktivasyonu çalışmaları, işleminden geçmiş proteinlerde en sık görülen kimyasal değişikliklerin peptid bağlarının uyarılmasından ziyade, bazı aminoasit yan zincirlerinin (özellikle histidin ve triptofan tortularının) parçalanması olduğunu göstermiştir (Wainwright ve Giddens, 2003). Bu değişiklikler, metilen mavisi gibi maddelerin hemoglobin hormonal aktivitesini, antijenlerin özgüllüğünü, çözünürlüğünü ve enzim aktivitesini etkileyebileceği belirtilmiştir (Henry, Summa, Patrick ve Schwartz, 2020).

Bazı proteinler, miyoglobin gibi belirli alt birimler içindeki çapraz bağları ışığa duyarlı hale getirir ve bu durumda, izole edilmiş proteinler zarar görebilir. Ayrıca, bu tür proteinler, kromatindeki DNA protein bağlantılarını da ışığa duyarlı hale getirebilir (Jiang, Hägglund, Carroll, Rasmussen ve Davies, 2021).

MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değeriindeki bu etki ve proteinlerde görülen bozunma bakterinin bölünüp çoğalmasını etkileyebilir ve neticede dormansiye sebep olabilir. Yapılan araştırmaların çoğunda hayatta kalma ya da inaktivasyon ölçüsü olarak kültürlenebilme özelliği kullanılmıştır. Hücrelerden çoğunun kültürlenemez olabileceği fakat yine de canlı kalabileceği ihtimali düşünülmemiştir. İnaktivasyon çoğunlukla lizis'e sebep olmadığından zara gelen herhangi bir hasar hücreleri kültürlenemez duruma getirir. Bu konuda daha önce yapılan bir çalışmada bunu göstermiştir (Gutiérrez-Cacciabue, Cid ve Rajal, 2016).

Salmonella typhimurium ve inaktive edici oksijen türü olarak saf singlet oksijen kaynağı kullanılmıştır. Fotosensitizer olarak toluidin mavisi ile kaplı cam taneciklerden kırmızı ışık geçirilerek bu ışık hücrelere uygulanmıştır. Kırmızı ışığın uygulandığı bu hücreler önceki araştırmalardakine benzer hayatta kalma eğrileri göstermişlerdir. İşlem gören hücreler mikroskopik incelemeye alındığında, rhomadin 123 boyası ile boyama yapıldıktan sonra canlı hücrelerin bulunduğu görülmüştür. Kullanılan rakamların koloni oluşturma birimlerine bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Kontrol gruplarıyla yapılan karşılaştırmalar, canlı fakat kültürlenebilir olmayan hücrelerin bulunduğunu göstermiştir (Dahl, Dahlsten, Lindström ve Korkeala, 2015).

2.10.1. Fotosensitizerlerin DNA'ya etkileri

Fotosensitizasyonun, ışık ile aktive edilen bir süreçtir ve DNA'da guanin bazlarını tahrip edebilir. Bu tahribat, hem immunolojik olarak hem de termal denatürasyon sıcaklığında bir değişikliğe yol açar. Bu değişiklikler sonucunda, sensitizen olan DNA'nın ısıtılması tek dizi kırılmaları yol açabilir. Ayrıca, indirgenme oranı, DNA'daki (G-C) baz çiftlerinin mol fraksiyonu ile artmaktadır. Metilen mavisi sensitizasyonu sonucu, DNA'ya verilen zarar, hem denatürasyon öncesinde hem de sonrasında boyanın yoğunluğunda meydana gelen değişikliklerle kontrol edilebilir (Epe, 2012).

Jel elektroforez yöntemleri ve 5-32 P grubu repatriksiyon fragmanlarının kullanılması sonucu, metilen mavisi ile sensitized olan DNA'nın sıcak periodin ile işleme tabi tutulması, guanin tortularında tek dizi kırılmaları yol açmıştır. Bu kırılmalar, tüm guanin tortularında görülebilir (Friedmann ve Brown, 1978; Wang ve diğerleri, 2021).

Son olarak, tek ve çift sarmallı DNA'nın ısı sırasında bu şekilde bölünebileceği gösterildi. Bu, hematoporfirin davranışının tersidir ve hematoporfirin iyi bir oksijen kaynağı olmasına rağmen, yalnızca tek sarmallı DNA'yı hassaslaştırabilir. Nükleobaz hasarının B ve Z DNA tiplerine metilen mavisine bağlılığını belirlemek için hasar tanıma füzyon proteini kullanıldı. Bu protein, tek işlevli yapıdaki hasarı tespit edip genellikle baz eşleşmesini veya baz eşleşmesini engeller. Ancak apuridik veya apirimidin bölgelerine, pirimidin kalıntılarına veya tek sarmallı DNA'ya bağlanmaz. Bu deneyler, hasarın poli[d(A-T)] yerine G içeren DNA'da olduğunu doğruladı (Dahlmann, Vaidyanathan ve Sturla, 2009).

Histidin ile yapılan bastırma ve D20 ile yapılan artırma işlemleri oksijenin rolünü doğrulamıştır. Tek dizi kırılmaları ve apuridik bölgeler bu hasarın sadece yüzde birkaçını açıklayabilmiştir. Tek dizi kırılma oranı bir saat süreyle 37°C 'de inkübasyonla artmamıştır. Bu, kesintilerin temel değişikliklerden kaynaklanmadığını göstermektedir. DNA'daki oksidatif hasarın daha iyi anlaşılmasını sağlayan önemli bir gelişme, polimerdeki 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG12) merkezinin keşfedilmesiydi. Bunlar, iyonlaştırıcı radyasyon veya kimyasal hidroksil radikal kaynakları ile işlenmiş DNA'nın enzimatik ekstraktlarında yüksek performanslı sıvı kromatografi teknikleri ve hassas elektrokimyasal tespit yöntemleri ile tespit edildi. Biyolojik olarak 8-OH-dG12 bölgesi, tek iplikçik kırılmasından daha önemli bir bölge olabilir çünkü kırılma hücre tarafından kolayca tamir edilebilirken, 8-OH4G12 bölgesi tamir sırasında uyumsuzluklara neden olabileceği için mutajeniteye neden olabilir (Cannan ve Pederson, 2016; Floyd, West, Eneff ve Schneider, 1989).

8-OHdG12'nin, metilen boyasının varlığında DNA'nın hava ile teması olan solüsyonlarında fotoliz sonucunda oluştuğu görüldü. Diğer fenotiazinyum boylarının beyaz ışık karşısında DNA'daki 8-OH-dG12 bölgelerinin oluşumuna neden olmuştur (Floyd ve Marcotte, 2022).

2.10.2. Fotosensitizerlerin biyolojik membranlara etkisi

Gerçek biyolojik membranlar, fosfolipid ve lipozom kolesterolü yanı sıra protein içerirler ve bu üç bileşik fotosensitizasyon sonucu meydana gelen değişikliklere karşı duyarlıdır. Bununla birlikte, glikoproteinlerin ve glikolipidlerin karbonhidrat kalıntıları önemli ölçüde etkilenmez. Amino asit yan zincirlerindeki değişiklikler, gerçek zar sistemlerinde hücre parçalanmasına neden olan faktör olabilir. Tekli oksijen aktif tür ise bu durum tekli oksijenin

proteinlerle ve yağ asitleriyle reaksiyonlarındaki farklılıklardan olabilir. Singlet oksijeninin hücreler üzerinde etkileri araştırılmış ve hücre zarlarının hücre hasarına en fazla uğrayan bölge olduğu kabul edilmiştir (Bacellar ve diğerleri, 2014; Matik, Hanania ve Nitzan, 1990).

2.10.3. Fotosensitizerlerin organellere etkisi

E. coli ribozomları metilen mavisi fotodinamik işlemi ile etkisiz hale getirilirler. Bu arada zarar verici ara madde olarak O₂ kullanılır. Zarar veren tür O₂ ise proteinlerin zarar göreceği en önemli hedefler olması beklenen bir durumdur. Proteinlerin ve aminoasitlerin O₂'ni indirmek konusunda nükleik asitler ve nükleotidlerden daha etkili oldukları görülmüştür. İzole mitokondrinin tionin fototoksik etkisi incelenirken boyanın yaklaşık %10'unun zarla etkileşim kuracağı hesaplanmış ve inaktivasyonun O₂ kaynaklı olduğu öne sürülmüştür (Bunting, 1992; Wang, Li ve Yoon, 2021).

2.10.4. Fotosensitizerlerin virüslere etkisi

Tam olarak hücre türü oluşturmaları da, bakteriofajlar, bitki ve hayvan virüsleri nispeten basit yapılarından dolayı, biyolojik sistemlerdeki fotodinamik etkileri araştırmak amacıyla uzun süredir kullanılmaktadırlar. Önceden yapılan araştırmalarda bazı bakteriofajların ve virüslerin geri dönülmez bir şekilde etkisiz hale getirilmesi sırasında ışık, O₂ ve boyaya genellikle ihtiyaç duyulduğu görülmüştür (Perdrau ve Todd, 1993; Sadraei, Zhang, Aavani, Biazar ve Jin, 2022).

Fakat virüslerin hepsi, metilen mavisi ile yapılan fotodinamik harekete karşı duyarlılık göstermemişlerdir. Virüsler canlı hücreleri enfekte ettiklerinde (bakteri veya hayvan) ölü hücreler herhangi bir korunma sergilememişler fakat canlı olanları fotodinamik inaktivasyona karşı koruma sağlamıştır. Virüs aşılandıktan sonraki 12-24 saat içinde metilen mavisi ile fotodinamik işlem yapıldığında canlı hayvanlarda *herpes* ve *vaccinia* virüslerinin sebep olduğu yüzey hasarlarının oluşmasını önlemek mümkündür. Böylece canlı hücreler virüsün etkisiz hale gelmesini sağlayabilmektedir. Bazı virüslerle yapılan benzer bir işlemde protein-RNA ve viral RNA'nın bozulmasına sebep olmuştur (Sobotta ve diğerleri, 2013).

Son zamanlarda yapılan araştırmaların amacı, virüslerin aşılar ya da tedavi preparatlarında

potansiyel kullanım için fotoinaktive edilmeleri olmuştur. Virüslere metilen mavisi ile yapılan fotodinamik işlemin viral nükleik asitleri son derece etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle bu boyaların virüs inaktivasyonu için aşılarında kullanılması tavsiye edilmemiştir (Elikaei, Sharifi, S. Hosseini, Latifi ve M. Hosseini 2014; Lytle ve diğerleri, 1989).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Suşlar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *E. coli* yabancı tip ve mutant suşları

Suş numarası	Genotip	Kaynak
W3110	Yabancı tip	Lab stok
JW5731	BW25113 <i>adiA</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1488	BW25113 <i>gadB</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW1487	BW25113 <i>gadC</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW4092	BW25113 <i>cadA</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW4093	BW25113 <i>cadB</i> ::km	Keio Koleksiyonu
JW4094	BW25113 <i>cadC</i> ::km	Keio Koleksiyonu
MCM100	W3110 <i>adiA</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
MCM101	W3110 <i>gadB</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
MCM102	W3110 <i>gadC</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
MCM103	W3110 <i>cadA</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
MCM104	W3110 <i>cadB</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
MCM105	W3110 <i>cadC</i> ::km	Bu çalışmada yapıldı
MCM106	W3110 <i>adiA</i> ::km pnt3:: <i>adiA</i>	Bu çalışmada yapıldı
MCM107	W3110 <i>gadB</i> ::km pnt3:: <i>gadB</i>	Bu çalışmada yapıldı
MCM108	W3110 <i>cadB</i> ::km pnt3:: <i>cadB</i>	Bu çalışmada yapıldı
MCM109	W3110 <i>cadC</i> ::km pnt3:: <i>cadC</i>	Bu çalışmada yapıldı
Plazmitler		
JW5731	pnt3: <i>adiA</i>	ASKA Klone
b1493	pnt3: <i>gadB</i>	Mobil Plazmit
b4132	pnt3: <i>cadB</i>	Mobil Plazmit
b4133	pnt3: <i>cadC</i>	Mobil Plazmit

Çalışmada kullanılan *E. coli* yabancı tip ve mutant suşları yurt dışından temin edildi (Japon Ulusal Genetik Merkezi). Suşlardan elde edilen mutantlar üzerine çalışma yapıldı. Bu çalışmada kullanılan suşlar Çizelge 3.1’de gösterildi. Suşların antibiyotik dirençleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle doğrulanmıştır. %20 gliserol (Merck) içeren LB stokları hazırlandı ve -80 °C’de bir derin dondurucuda (Panasonic) muhafaza edildi.

3.1.2 Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması

Kültürler için kullanılan besiyerleri

Nutrient broth

8 g nutrient broth (Sigma) 1 L saf su içerisinde çözülerek hazırlanıp 100 mL erlenmayer içerisine mezürle ölçülerek 60 mL olarak eklendikten sonra otoklav içerisinde 121°C de 20 dk steril olduktan sonra gerekli koşullarda saklanmıştır.

Nutrient agar

20 g nutrient agar (Sigma) 1 L saf su içerisinde çözülerek hazırlanıp 200°C 24 saat boyunca steril edilip sterilizasyona bırakılmış petri kablarına alev eşliğinde aktararak soğumaya bırakılmıştır.

LB agar besiyeri

Transdüksiyon ve transformasyon deneylerinde, ayrıca mutant suşların +4°C’de buzdolabında saklanması için kullanılmak üzere, 25 g LB (Merck) ve 15 g agar (Merck) 1 L saf suda çözdürülerek 121°C’de 15 dakika (dk) otoklavda sterilize edildi.

LB broth besiyeri

Transdüksiyon ve transformasyon deneyleri için kullanılmak üzere, 25 g LB 1 L saf suda çözdürülerek 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edildi

Soft agar

Transdüksiyon deneyi için kullanılmak üzere, 0,5 g yeast extract (Merck), 1 g tripton (Merck), 0,7 g agar ve 0,6 g KCl (Merck) 100 mL saf suda eritilerek 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Yaklaşık 35-40°C ulaşıldığında çözeltiye 0,2 mL 1 M CaCl₂ (Merck) ve 1 mL %50 glukoz (Riedel-de haen) ilave edildi.

DM agar

Transformasyon testinde kullanılacak 200 mL 1,4 g K₂HPO₄ (Merck), 0,1 g Na₃C₆H₅O₇ (Merck), 0,4 g KH₂PO₄ (Merck), 0,2 g (NH₄)₂SO₄ (Merck) ve 3 g agar yarı distile su ve 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Oda sıcaklığında 0,4 mL 1M MgSO₄ (Merck), 2 mL 10 mM FeSO₄ (Merck), 0,8 mL %50 glukoz solüsyonu, 0,2 mL 20 mg/mL tiamin (Sigma) ve uygun antibiyotik bir kez ilave edilip petri kaplarına yeterli miktarda döküldü.

IPTG ve X-GAL'li Besiyeri Hazırlama

20 mg/mL X-gal stoğundan 40 µL alınarak 0,1 M IPTG stoğundan 20 µL alınarak 15 mL' lik LB besiyerine eklendi

Deney içerisinde kullanılan çözeltiler

10 mM pH-8 fosfat tamponu

27,8 g 0,2 M NaH₂PO₄ (sigma) 1 L Saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 28,41 g Na₂HPO₄ (sigma) 1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 5,3 mL NaH₂PO₄, 94,7 mL NaH₂PO₄ alınarak 1900 mL saf su eklenerek toplam hacim 2000 mL 10 mM, 0,1 M HCl veya KOH ile pH ayarlanmıştır

10 mM pH-6 fosfat tamponu

27,8 g 0,2 M NaH₂PO₄ 1 L Saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 28,41 gr Na₂HPO₄ 1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 87,7 mL NaH₂PO₄, 12,3 mL NaH₂PO₄ alınarak 5,3 mL NaH₂PO₄,

94,7 mL NaH_2PO_4 alınarak 1900 mL saf su eklenerek toplam hacim 2000 mL 10 mM, 0,1 M HCl veya KOH ile pH ayarlanmıştır.

Ringer

Bu solüsyon bakteri sayısının belirlenmesinde dilisyon (seyreltme) amacıyla kullanıldı. 500 mL saf suya ringer Solüsyonu (LAB) hazır tabletlerinden 1 adet atılarak hazırlandı. Eppendorf tüplere (Şekil 3.1) 1 mL eklenip ağzıları kapatılıp folyo ile sarıldı. 121°C'de 20 dk otoklav yapıldı. Deneyde kullanılmak üzere saklandı.



Şekil 3.1. Eppendorf tüp içerisinde ringer çözeltisi

IPTG (izopropil β -D-tiogalalaktopiranosid)

0,1 M katı IPTG (Sigma) (Şekil 3.2) olarak hazırlandı. 0,238 g IPTG, 9,9 mL distile suda çözülerek filtre edildi ve steril hale getirildi. Sonra, steril edilmiş eppendorf tüplerine 1 mL'lik bir miktar alındı ve tüpler folyo ile sarılarak -20°C'de saklandı.



Şekil 3.2. Katı IPTG stoğu

IPTG ve Tampon Hazırlama

0,1 M IPTG stoğunda 80 μ L alınarak 60 mL lik fosfat tamponuna eklendi.

Metilen Mavisi Solüsyonu

0,031986 gr Metilen mavisi alınarak 100 mL saf suda çözülerek stok solüsyonu elde edildi.

SOB medium

Transformasyon testi için kullanılmak üzere, 1 g maya ekstraktı, 4 g Bacto tripton (BD), 0,25 mL 2M KCl ve 0,4 mL 5 M NaCl (Emsure) 200 mL saf suda çözülerek pH metre (Ohaus) ile pH-7'ye ayarlandı. Sonra 121°C'ye ısıtıldı ve sabitlendi. Otoklavda 15 dk sterilize edildi.

SOC medium

Transformasyon deneyinde kullanılan örnekler için 1,96 mL steril SOB medium içerisine 20 μ L 2 M mg (Merck) ve 14,4 μ L % 50' lik glukoz çözeltisi eklenerek hazırlandı.

Yıkama Tamponu

Transdüksiyon deneyi için kullanılan çözelti için 9,88 mL LB brot, 0,1 mL %50 glukoz çözeltisi ve 20 μ L CaCl_2 'den oluşmaktadır. Bu çözelti steril bir şekilde hazırlanıp eklendi.

TBE Hazırlama

TRİS (Ultrapure) ve borik asit (Merck) kullanılarak, pH-8 EDTA'lı 0,5 M 10x TBE hazırlandı. Bu karışıma 500 mL saf su eklendi.

TE Hazırlama

2 mL 1 M Tris-HCl ve 400 μ L 0.5 M EDTA, son konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde konuldu ve üzerine 200 mL saf su eklendi.

Tris-HCl Hazırlama

15,76 g/mol Tris-HCl tartılarak, üzeri 100 mL distile su ile tamamlanarak 1 M Tris-HCl hazırlandı.

3.1.3. Işık kaynağı ve inkübatör



Şekil 3.3. İnkübatör shaker (Innova43)

Fotosensitizerlerin ışık karşısında bakterilere olan etkilerinin incelendiği deneylerde, içinde saf su, bakteri ve fotosensitizerlerin bulunduğu beherler inkübatör shaker (Şekil 3.3) içerisinde tutuldu. Philips TL-D 18W/12K Snow White 3 floresans lamba kullanıldı. İnkübatör shaker içerisinde ışık 900 nm dalga boyuna sabitlendi. Ekimi yapılan beherler ise inkübatörde 6 gün ve 8 saat olmak üzere beyaz ışık altında bırakıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin inkübasyonu

E coli W3110 ve *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB*, *cadC* mutantları 150 mL'lik erlenlere 60 mL'lik nutrient broth besiyeri eklenerek hazırlandı. Ekimleri yapıldıktan sonra 100 rpm'de 1 gece süresince yaklaşık 18 saat boyunca 37°C de inkübatör shaker (Şekil 3.4) içerisinde bırakıldı.



Şekil 3.4. İnkübatör shaker cihazı

3.2.2. OD(optik dansite) değeri ayarlama

Bakteriyel absorbans spektrofotometrede (şekil 3.5) ölçüldü ve 600 nm'de OD (optik yoğunluk) değerleri 0,5 olarak ölçüldü. Tüpten 500 uL çekildi ve önceden hazırlanmış 49 mL steril fosfat tamponuna eklendi.



Şekil 3.5. Spektrofotometre (Thermo)

3.2.3 Bakteri yaşam deneyleri

100 mL erlende 60 mL nutrient broth hazırlanıp 121°C 20 dk otoklavda (Şekil 3.6) steril edildi. Nutrient agar besiyeri 121°C 20 dk otoklavda steril edilip steril petri plaklarına 3/2 oranında alev eşliğinde dökülerek 24 saat bekletildi.



Şekil 3.6. Dik tip buharlı otoklav (Nüve)

Aynı gün 100 mL'lik beher içerisinde 49 mL fosfat tamponu 121°C 20 dk otoklavda bırakılıp steril edildi. Bakteriler 100 mL'lik erlen içerisindeki 60 mL'lik nutrient broth içerisine öze ile alınarak ekim yapıp 18 saat gelişmesi için 37°C inkübatör shaker içerisine bırakıldı.

Ertesi gün inkübasyon olan bakteriler OD absorbansı spektrofotometre ile 600 nm’de 0,500 A ayarlandı. 1 mL eppendorf tüplere alınan bakteriler santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısmı dökülerek fosfat tamponundan 1000 µL eklenerek 6 rpm ile vortekslenip 3 dk 6 rpm’de santrifüj yapıp iki defa aynı işlem yapılarak yıkama yapıldı. Kontrol grublarına 100 mL’lik beher içerisine sadece 49 mL fosfat tamponu ve 500 µL bakteri eklendi. Fotosensitizer içeren 100 mL’lik beherlere ise 49 mL fosfat tamponu, 500 µL bakteri örneğinin yanı sıra 75 µL metilen mavisi eklenerek çözeltiler oluşturuldu. Beherlerden 100 µL alınarak 900 µL ringer bulunan eppendorf tüplere aktarıldı. Eppendorf tüplerinde 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} lik dilisyon yapıldı. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} lik deney tüplerinden 100 µL alınarak cam petri plaklarında steril olarak hazırlanan agarlar üzerinde yayma plak metoduna göre 0, 2, 4, 8 ve 10. saatler için ekimler yapıldı. Aynı aşamalar metilen mavisi içermeyen beherlerde 0, 3, 6, 9 ve 12. gün için ekimler yapıldı. Ekimler sırasında her bir dilisyon için 3 adet ekim yapıldı. Ekimi yapılan plaklar 37°C’de 24 saat inkübatörde bırakıldı. Bakteri yaşam deneyinde, fotosensitizer ve fotooksidasyonun etkilerini gözlemlemek için örnekler 900 nm ışık altında tutuldu. Oluşan koloniler sayılarak kaydedildi. Mutant bakterilerden *adiA*, *cadB*, *cadC* ve *gadB* komplementerlerinin etkisini görebilmek için yapılan deneylerde 100 mL’lik beherler içerisine 49 mL fosfat tamponu, 500 µL bakteri, 80 µL IPTG ve 75 µL metilen mavisi eklenip streç film ile kaplandıktan sonra aynı işlemler yapıldı. Eppendorf tüplerde 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} lik dilisyon yapıldı. 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} lik eppendorflardan 100 µL alınarak cam petri plaklarında steril olarak hazırlanan agarlar üzerinde yayma plak metoduna göre 0, 2, 4, 6 ve 8. saatler için ekimler yapıldı. Koloni sayıları logaritmik değerlere dönüştürülerek çizelge ve şekilleri çizildi. Ekim saatleri arasında geçen sürelerde beherler ışık kaynağı içerisinde inkübatör shaker içerisinde 24°C’de 70 rpm 900 nm ışık dalga boyunda sabit tutulmuştur. Aydınlık + fotosensitizer ve aydınlık kontrol olmak üzere 2 bazda ve 2 farklı pH’da yapıldı. Ekimi yapılan plaklar 37°C’de 24 saat inkübatörde bırakıldı. Oluşan koloniler sayılarak kaydedildi. Logaritmik değer üzerinden hesaplanarak çizelge ve şekilleri çizildi.

3.2.4 Yaşam deneylerinde değerlerin analizi

Yaşam testlerinden alınan örneklere ilişkin tablo ve şekiller oluşturulmuştur. Örneklerin örnekleme zamanına göre bakterilerin günlük değerleri hesaplanmış ve 2 log azalmaya karşılık gelen t_{99} değerleri grafik ve şekillerde gösterilmiştir. Koloni sayımı sonuçları

logaritmik değerlere dönüştürülerek -K ve T₉₉ değerleri Chandran Abhirosh (2012) tarafından verilen formüllere göre hesaplanarak grafiği çizildi. Grafiklerdeki değişiklikler logaritmik olarak gösterilmiştir.

3.2.5. *Escherichia coli* W3110 mutantlarının eldesi

Çizelge 3.1’de verilen *E. coli* BW25113 suşlarından hedef 6 gen bölgesi yabani tip *E.coli* W3110’a Sato vd. (2000) nin kullandığı P1kc fajı ile transdüksiyon metodu kullanılarak aktarıldı. Çalışmada kullanılan 6 mutant *E. coli* W3110 da elde edildi. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlar deneyde kullanıldı. Yapılan deneylerde *E. coli* W3110 ve *AdiA*, *GadB*, *GadC*, *CadA*, *CadB*, *CadC* mutantları kullanıldı. Organizmaların pasajları her ay nutrient agar besiyerinde çizgi ekim metodu ile yapıldı ve 37°C’de 24 saat inkübatörde bırakıldı. Gerektiğinde kullanmak üzere +4°C de buzdolabında saklandı. Gerektiği zaman uygun besiyerlerinde üretilerek laboratuvar çalışmalarında kullanıldı.

3.2.6. P1kc fajı ile transdüksiyon

2,5 mM’lık bir nihai konsantrasyona kadar 1 M CaCl₂ ve 25 mg/mL’lik bir nihai konsantrasyonda antibiyotik kanamisin (Sigma) 4 mL LB brot ilave edildi. Çizelgede 3.1.’de verilen W3110 tarafından kodlanan *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB* ve *cadC* suşlarının her birinin 37°C’de çalkalamalı inkübasyon yapılmıştır. Kolani ekim yöntemlerinden tek koloni ekim yöntemiyle ekim yapılp O.D₆₀₀ değeri 0.4-0.45’lik bir absorbans değerine ulaşana kadar inkübasyon gerçekleştirildi.

İnkübasyon sonrası steril cam tüpe O.D₆₀₀ değeri 0,2–0,45 olan 0,2 mL bakteri alındı ve 10 µL P1kc fazı eklendi. 20 dk 37°C’de inkübasyon sonrasında, 2,5 mL soft agar ve yaklaşık 50°C’de 25 µL %50 glukoz eklendi ve karıştırıldıktan sonra LB agar üzerine dökülerek yzeyeye yayıldı. Petri kabı oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra gece boyunca 37°C’de inkübe edildi.

İnkübasyondan 2-3 damla kloroform (Merck)ve sonra petri kabına 2 mL LB besiyerinden eklendi. Daha sonra 2 saat boyunca 4°C’ de aralıklarla çalkalama işlemi yapılarak bekletildi. Petri kabındaki 1 mL sıvı bakteri kültürü 1,5 mL’lik eppendorf tüplere aktarıldı, 50 mL

kloroform ilave edildi ve 4°C'de 5 dk 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant (P1kc) +4°C'de saklandı.

P1kc fazı kullanılarak bir yabancı tip *E. coli* W3110 suşu kolonisi elde edildi ve 5 mL LB suyu içine aşılandı. O.D₆₀₀ değeri 0,3'e ayarlandı ve 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra 1,5 mL'lik Eppendorf tüplerine 1 mL aktararak 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj (termal) yapıldı. Santrifüj yapıldıktan iki ayrı bölümden süpernatant kısmı atık kutusuna atılıp pellet üzerine 1 mL steril yıkama tampon çözeltisi eklenerek tekrardan 10 dk 0°C' de 10000 rpm' de santrifüj yapıldı. Benzer şekilde süpernatant kısmı çıkarılıp pellete 1 mL yıkama tamponu eklendi.

Hücreye yeterli miktarda P1kc fazı eklendikten sonra yabancı tip *E.coli* W3110, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Vortex (Wisemix) kullanılarak 4°C'de 12 000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve kalan bellete 0,1 mL yıkama tamponu çözeltisi eklenip hücreler, DM ile Km besi ortamı agara aktarıldı. DM agar sıvı emilinceye kadar oda sıcaklığında bir süre bekletildi. Yaklaşık 18 saat inkübe edilene kadar 37°C'de bekletildi. Ekimden sonraki gün, üreyen bakteriler, DM ile Km agar besisi ortamından LB agar besisi ortamına aktarıldı. Bir gece 37°C' de inkübasyon kaldı. Lm agar üzerinde Km ile büyütülen bakteriler, Km-Xgal-IPTG içeren LB agar üzerinde yeniden kültürlendi ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra mavi renkli koloniler seçimi sağlandı. Çizelge 3.3'te listelenen primerler kullanılarak PZR antikorları gözlenir.

3.2.7. Plazmid izolasyonu

LB broth besisi ortamı içerisine Çizelge 3.1'de belirtilen plazmidlerden her biri tek bir koloni olarak içeren 5 mL'lik çözeltiler oluşturdum. Bunları çalkalamalı inkübatöre yerleştirdim ve bir gece boyunca 37°C'de inkübasyona bıraktım. İnkübasyondan sonra elde ettiğim bakteri kültürlerini her biri 1,5 mL'lik 5 ependorf tüp içerisine, 10 000 rpm'de 3 dk santrifüleyip süpernatantı ayrıştırdım. Kit olarak İnvitroGen Purelink Quick Mini Prep plazmid izolasyon maddesini kullanarak, ticari olarak satın alınan kitin prosedürünü takip ederek plazmid izolasyonu gerçekleştirip izole edilen plazmidlerden bir kısmını miktar tayini için kullandım ve geri kalan plazmidleri -20°C'de saklamak üzere bekletmeye bıraktım.

3.2.8. Miktar tayini

1 uL yükleme boyası ile boyandıktan sonra, 5 uL izole edilmiş plazmit bir agaroz jel (Klewer) üzerinde çalıştırıldı ve bir jel görüntüleyici ile görselleştirildi. Bant boyutları ve kalınlıkları GeneRuler marka DNA Ladder mix (Thermo) marker ile karşılaştırıldı ve plazmit miktarı belirlendi.

3.2.9. Transformasyon

LB broth besi ortamı içine 25 mg/ml kanamisin'den 2 µL ekleyerek, Çizelge 3.1'de verdiğimiz W3110 mutantlarını tek tek ekledim. 37°C'de bir gece boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe ettim ve transformasyon için 2 ön kültür hazırladım. Ekimden sonra steril 9,9 mL SOB medium içine steril 100 µL 2 M Mg²⁺, 10 µL 25 mg/ml kanamisin ve hazırlanmış ön kültürden 50 µL ekledim ve O.D₆₀₀ değerinin 0,3'e ulaşana kadar 37°C'de çalkalamalı inkübasyon cihazında beklettim. Aseptik koşullar içerisinde hücreleri steril 10 ayrı santrifüj tüpüne aktardım ve 5 dk içinde buz içerisinde soğutmaya bıraktım. 5 dk süreyle 12 000 rpm'de 4°C'de santrifüj ettim ve süpernatant kısımlarını atıp 2 adet santrifüj tüp içine 1 mL 0,1 M soğuk yapıdaki CaCl₂ ekledim.

10 farklı santrifüj tüpündeki peletleri 2 ayrı santrifüj tüp içine topladım ve tekrardan süspanse ettim. 10 dk içinde buz içerisinde beklettim. 12 000 rpm'de 5 dk süreyle 4°C'de santrifüj ettim ve süpernatantı attım. Her tüp için 0,1 M soğuk halde bulunan 200 µL CaCl₂ ekledikten sonra tekrardan süspanse ettim. 30 dk buzda beklettim. 2 santrifüj tüpünde 200 µL kapasiteli hücrelere 2 farklı konsantrasyonda plazmit (10-100 ng) ilave edip 30 dkdan fazla buz üzerinde beklettim. Daha sonra hücre süspanسیونlarını cam tüplere aktardım ve 42°C'de 2 dk ısı şoku uyguladım. 2 dk daha buz üzerinde tuttum ve 0,8 mL SOC medium ekledim ve 60 dk 37°C'de inkübe ettim. Pasajlanan hücrelerin 0,5 mL'lik bir alikotu 1,5 mL'lik bir eppendorf tüpünde toplanıp 1 dk 4°C'de 5000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatantı bölümünü atıp ve 100 µL SOC medium ekleyip süspanse yapıp uygun antibiyotikleri içeren LB agar besi ortamına yaydım ve gece boyunca inkübe ettim.

3.2.10. Primer sulandırma

pH-7,5'e ayarlanan TE solüsyonu, 10 mM Tris-HCl (Merck) ve 1 mM EDTA (Sigma) kullanılarak hazırlandı. +4°C'de saklandıktan sonra primerler çıkarıldı ve nanomol cinsinden 10 kat seyreltildi. Astarların erimesi için 5-10 dk beklenir, ardından küçük dairesel hareketlerle uygulanır. Bir eppendorf tüpü kullanılarak 10 µL numune alınır ve 10 mM pH-7,5'te 90 µL Tris-HCl eklenir. Örnekler -20°C'de bir dondurucuda saklandı.

3.2.11. Koloni PZR

Transdüksiyon ve transformasyon sonrasında elde ettiğimiz örnekleri 20 distile su içinde süspansiyon hale getirerek 0,2 mL tüp içine 2,5 µL PZR ekledik. Bu işlem ile mutantların doğruluğunu koloni PZR yöntemi ile kontrol ettik. Örnekler için Çizelge 3.1'de belirtilen reaksiyon karışımından 7,5 µL ekledik ve Çizelge 3.2'de belirtilen primerleri kullandık. PZR reaksiyonu, Çizelge 3.3'te belirtilen koşullar çerçevesinde gerçekleştirildi ve mutantların doğruluğunu kontrol etmek için koloni PZR yöntemi kullandık.

Çizelge 3.2. Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı

10x ThermoPol Reaksiyon Buffer(Biolab)	1,0 µL
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µL
10 µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µL
10mM dNTP Mix	0,2 µL
2mM Mg ⁺² içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µL
dH ₂ O	4,65 µL
0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µL
Bakteri süspansiyonu	2,5 µL
Total	10 µL

Çizelge 3.3. Transdüksiyon ve transformasyon doğrulaması amacıyla PZR reaksiyonunda kullanılan primerler

Evrensel KT geri primeri	CGGCCACAGTCGATGAATCC
W3310:: <i>adiA</i> ileri primeri	CCTTCATAACCGGGTAAGCA
W3310:: <i>adiA</i> geri primeri	CGTTGCCATACTCAAAAGGC
W3310:: <i>gadB</i> ileri primeri	ACACGAGTCCTTTGCACTTG
W3310:: <i>gadB</i> geri primeri	GCTAATGCCAGTGAACAGAC
W3310:: <i>gadC</i> ileri primeri	GTCTGTTCACTGGCATTAGC
W3310:: <i>gadC</i> geri primeri	GCGATGAATTATCGCTCCCT
W3310:: <i>cadA</i> ileri primeri	TTTTCCGAGGCTCCTCCTTT
W3310:: <i>cadA</i> geri primeri	CACTTCCCTTGTACGAGCTA
W3310:: <i>cadB</i> ileri primeri	TATCGCCAGTTTGGTCTGGT
W3310:: <i>cadB</i> geri primeri	AAAGGAGGAGCCTCGGAAAA
W3310:: <i>cadC</i> ileri primeri	CCGAACCTCAACCAGATTCTC
W3310:: <i>cadC</i> geri primeri	AACAACACCGGTACAGGCAA

Çizelge 3.4. PZR (Thermo) döngü koşulları

94 °C	1dk	1 döngü
94 °C	3dk	30 döngü
72 °C	1dk	30 döngü
58 °C	1dk	30 döngü
4 °C	1,5dk	1 döngü

3.2.12. Agaroz jel elektroforezi

1 g agaroz (Sigma) ve 100 mL 1x TBE kullanılarak %1 agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga ile çözüldü ve 1 µL 10 mg/mL EtBr (Sigma) stok solüsyonu eklendi. Hazırlanan agaroz jel elektroforez makinesinin hücreğine dökülerek donması beklendi. Jel, 5 µL DNA ve 1 µL yükleme boyası (Sigma) karıştırılarak yüklendi.

3.2.13. Komplementasyon testleri

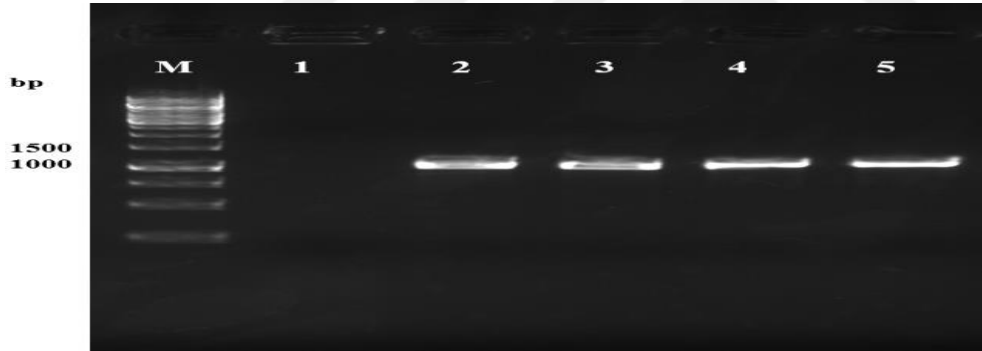
Plazmit taşıyan plazmitler, ek deneyler yoluyla stres koşulları altında istatistiksel olarak anlamlı genleri doğrulamak için plazmit izolasyon yöntemiyle (tuz liziz yöntemi) *E. coli*'den izole edildi. Bu plazmitler, transformasyon (Miller, 1992) yoluyla W3110 mutant *E. coli* suşlarına aktarıldı Böylece primer kromozom üzerindeki mutant gen bölgesi plazmada eksprese edilerek tamamlandı ve mutasyona uğrayan genin tamamlanması stres koşulları altında gerçekleştirildi.



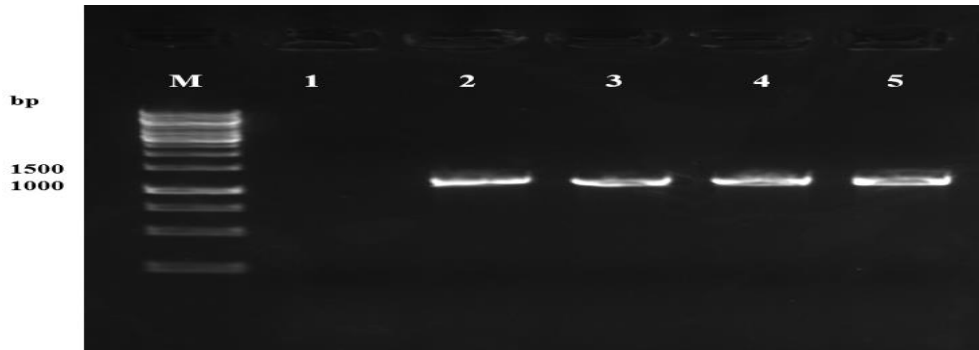
4. BULGULAR

4.1. Mutantların Elde Edilmesi

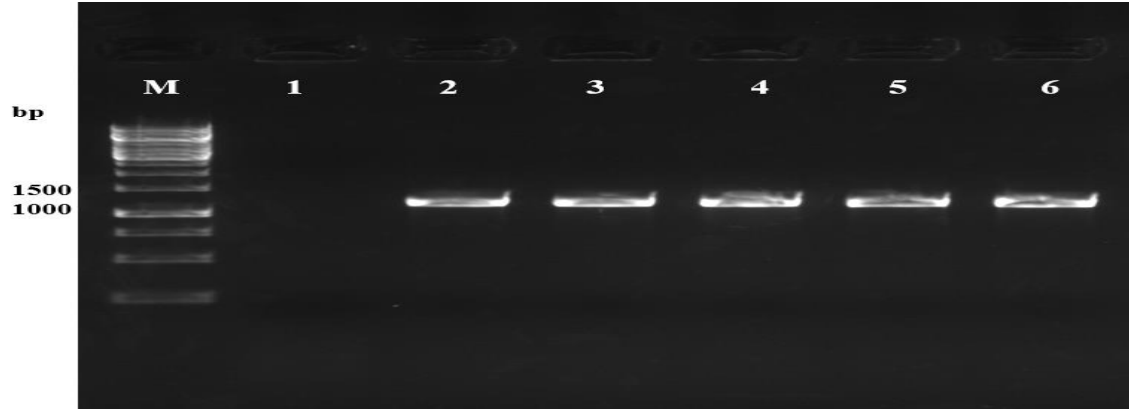
Çizelge 3.3'te listelenen her bir gen için, Xgal-IPTG ortamında mavi koloniler veren seçilmiş bakteri kolonileri üzerinde PZR gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2'deki ileri primerler ve KT primerleri kullanıldı. Elde edilen mutantların PZR görüntüleri Şekil 4.1 ile 4.6'da verilmiştir. Yabani tip *E. coli* W3110, pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her genin Keio koleksiyonundaki *E. coli* BW25113 suşundan mutantlar, negatif kontroller olarak kullanıldı. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, kuyu 3-5 f-kt primerleri ile elde edilen *adiA::km* mutantının 1082 bp bant büyüklüğüne sahip PZR elde edildi. Benzer şekilde *gadB::km* (Şekil 4.2) 1141 bp bant büyüklüğünde, *gadC::km* (Şekil 4.3) 1592 bp bant büyüklüğünde, *cadA::km* (Şekil 4.4) 1131 bp bant büyüklüğünde, *cadB::km* (Şekil 4.5) 1143 bp bant büyüklüğünde ve *cadC::km* (Şekil 4.6) 1592 bp bant büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.



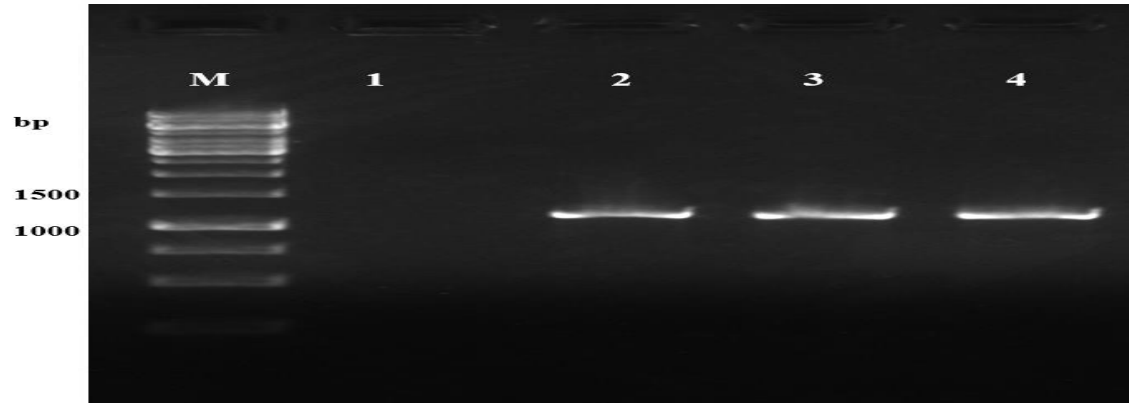
Şekil 4.1. Yabani tip *E. coli* ve *adiA* mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.



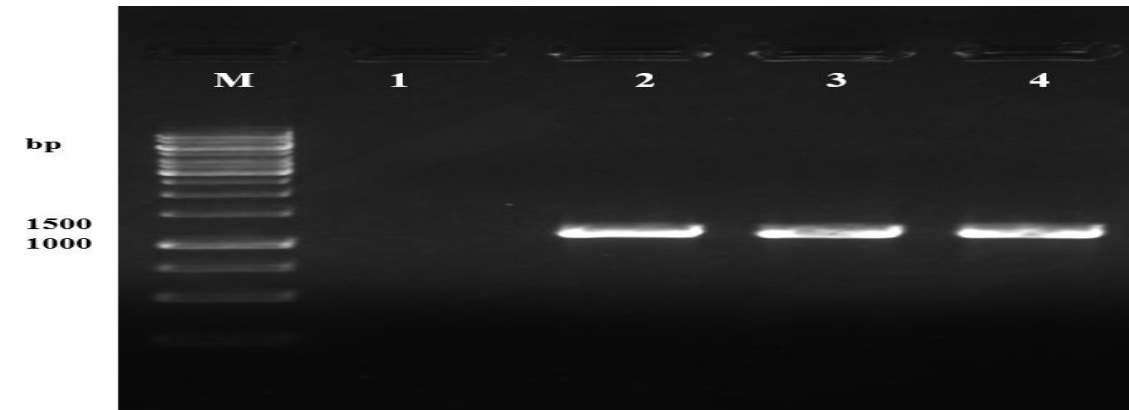
Şekil 4.2. Yabani tip *E. coli* ve *gadB* mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.



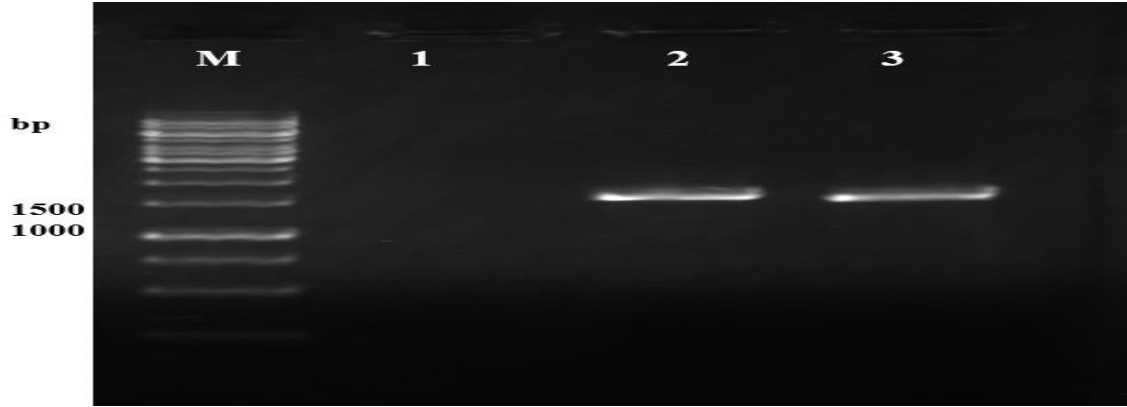
Şekil 4.3. Yabani tip *E. coli* ve *gadC* mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.4. Yabani tip *E. coli* ve *cadA* mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü



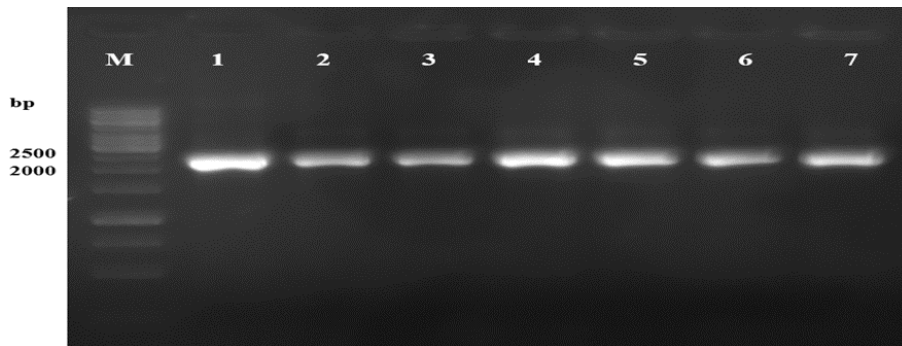
Şekil 4.5. Yabani tip *E. coli* ve *cadB* mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü



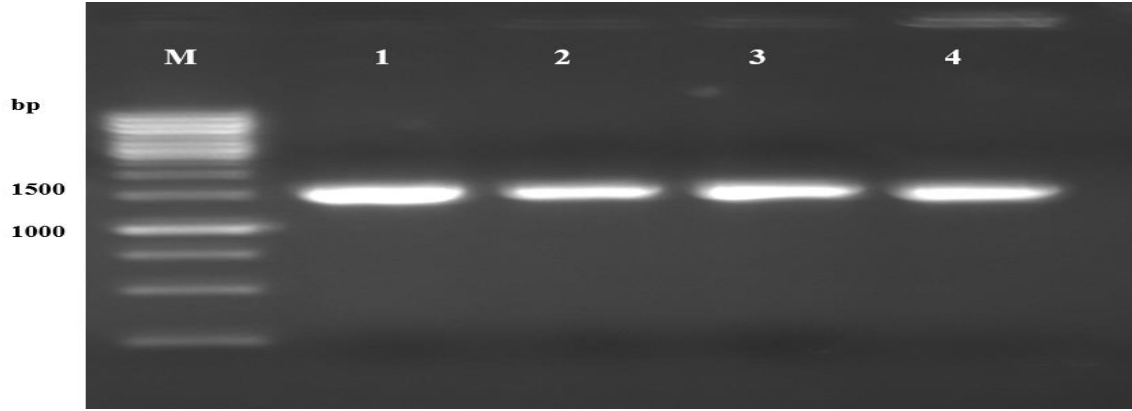
Şekil 4.6. Yabani tip *E. coli* ve *cadC* mutantlarının f-kt primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.

Şekil 4.1-4.6’da elde edilen jel görüntüleri incelendi. Her bir genle ilişkili olan mutant seçilip Çizelge 3.1’de gösterilen suş numaraları verildi. Elde edilen saf kültürler için gliserol stokları hazırlanıp -80°C’de muhafaza edildi.

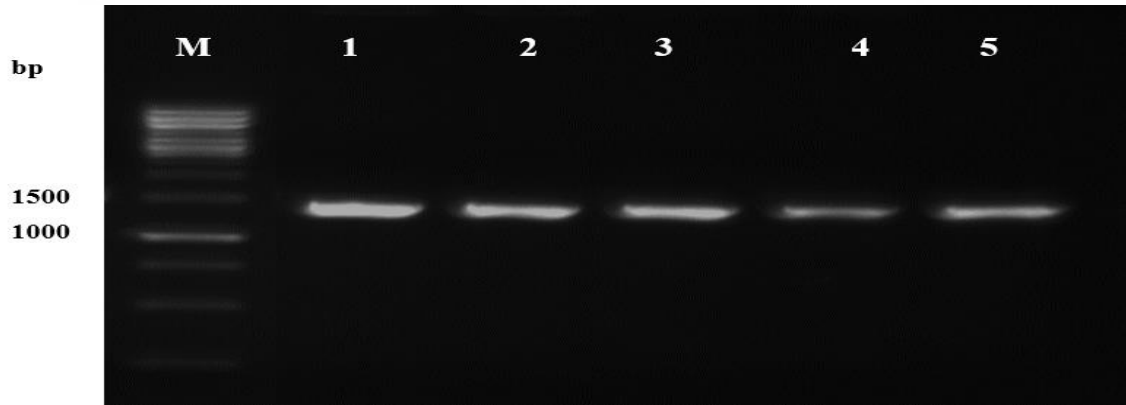
Tamamlama testleri için keio koleksiyonundan karşılık gelen genleri içeren plazmitler izole edildi ve yukarıda elde edilen mutantlara dönüştürüldü. Transformasyondan sonra oluşan koloniler, uygun antibiyotik kontrolünden sonra PZR ile doğrulandı. Seçilen kolonilerden Çizelge 3.2’deki her bir gen için kendisine ait olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR ile doğrulama yapıldı. Mutantların ve pozitif kontrol BW25113 plazmidinin PZR görüntüleri Şekil 4.7-4.10’ da verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlardan *pnt3::adiA* mutantı 2314 bp (Şekil 4.7), *pnt3::gaB* mutantı 1463 bp (Şekil 4.8), *pnt3::cadB* mutantı 1397 bp (Şekil 4.9), *pnt3::cadC* mutantı 1598 bp (Şekil 4.10) bant uzunluğuna sahiptir.



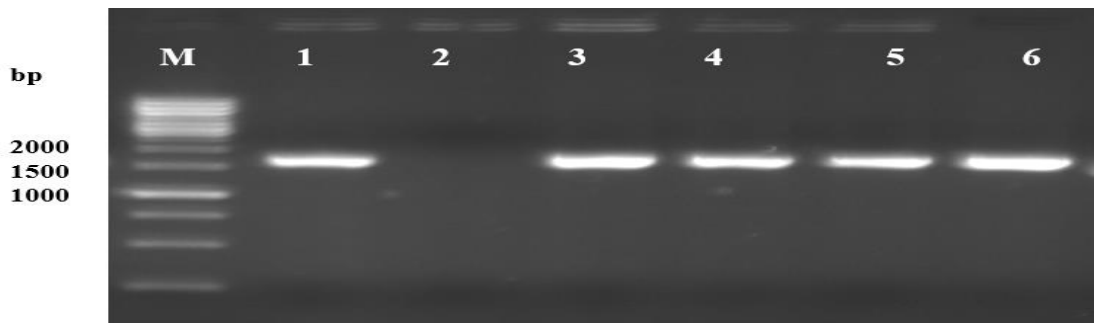
Şekil 4.7. *E. coli* BW25113 *adiA* plazmidi ve *pnt3::adiA* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.8. *E.coli* BW25113 *gadB* plazmidi ve *pnt3:: gadB* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.9. *E.coli* BW25113 *cadB* plazmidi ve *pnt3:: cadB* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.10. *E.coli* BW25113 *cadC* plazmidi ve *pnt3:: cadC* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

4.2. *Escherichia coli*'nin Farklı pH'larda Fotoooksidatif Stres Altında Yaşamı

4.2.1. Fotoooksidatif stres altındaki *Escherichia coli*'nin farklı pH'larda yaşamı

Bu çalışmada, *E. coli*'nin fotoooksidatif stres altında yaşamında asit ve baz direnç mekanizmalarındaki proteinlerin önemi araştırıldı. Ayrıca, fotoooksidatif stresin bakterilerin asit direncine etki edip etmediği de belirlendi. Çizelge 4.1'de farklı pH'larda yabancı tip *E. coli*'nin logaritmik bakteri sayıları verilmiştir. Kontrol gruplarının tekrarları kalabalık bir görüntü oluşumunu engellemek için ortalamaları alınmıştır. Elde edilen verilerin logaritma (log) değerleri kullanarak t_{99} değerlendirme sistemine göre hesaplamaları yapılarak analiz edildi.

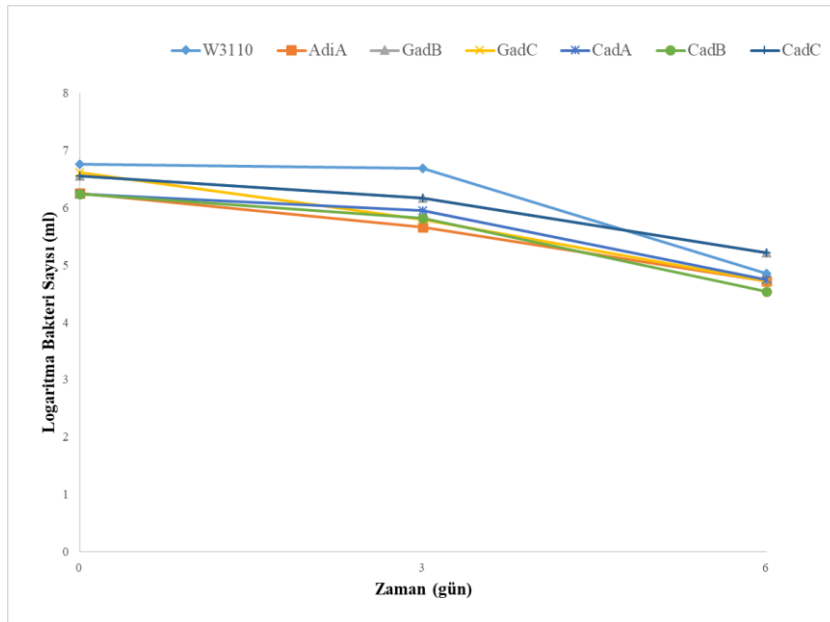
Çizelge 4.1. pH-6 ve 8'de yabancı tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları

Fosfat Tamponu		0.gün	3.gün	6.gün	9.gün	12.gün
<i>E. coli</i> W3110	pH-6	6,75	6,68	4,85	5,09	5,45
	pH-8	6,85	6,77	6,36	5,81	5,53
<i>adiA</i>	pH-6	6,25	5,66	4,71		
	pH-8	6,50	5,75	4,84		
<i>gadB</i>	pH-6	6,55	6,16	5,21		
	pH-8	6,36	5,72	5,04		
<i>gadC</i>	pH-6	6,61	5,79	4,71		
	pH-8	6,50	6,02	5,04	4,07	
<i>cadA</i>	pH-6	6,23	5,95	4,74	4,47	
	pH-8	6,30	5,74	5,09	2,77	2,47
<i>cadB</i>	pH-6	6,23	5,81	4,53		
	pH-8	6,36	5,55	5,16		
<i>cadC</i>	pH-6	6,55	6,16	5,21	4,69	3,41
	pH-8	6,36	5,72	5,04		

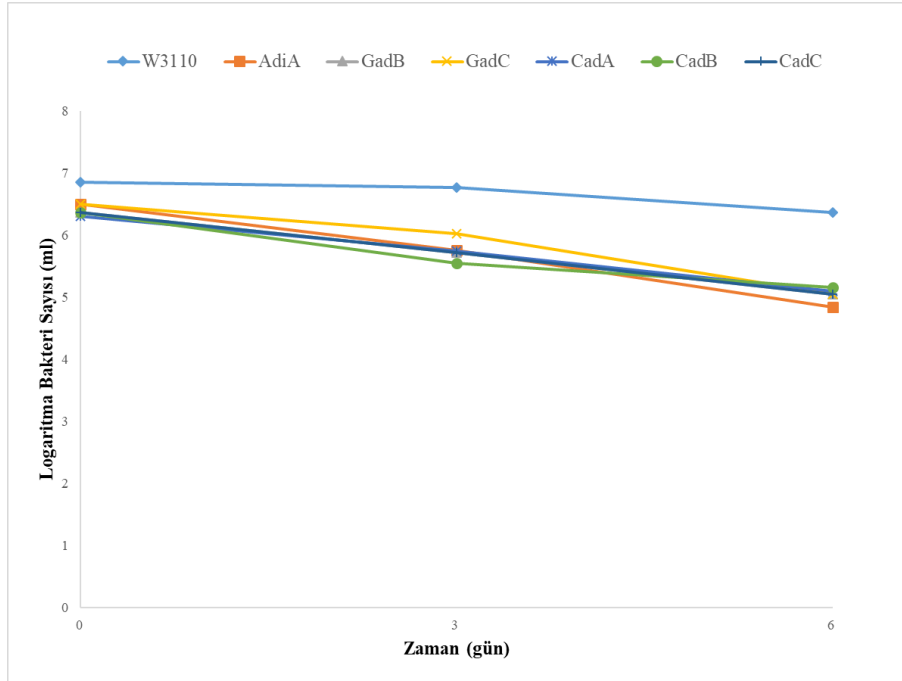
Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi pH-6 ve 8'de yabancı tip ve mutantların üzerine yaşamı yaklaşık 12 gün boyunca takip edilmiştir.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi pH-6'da yapılan çalışmada bakterilerin koloni sayılarının logaritma değeri yabanıl tip *E. coli* W3110 için 0. gün değeri 6,75 log değerinden 12. gün sonunda 5,45 log değerine düşüş gözlenmiştir. Mutantlar ile yapılan çalışmada ise *adiA* için 0. gün değeri 6,25 log değerinden 6. gün sonunda 4,71 log değerine, *gadB* için 0. gün değeri 6,55 log değerinden 6. gün sonunda 5,21 log değerine, *gadC* için 0. gün değeri 6,61 log değerinden 6. gün sonunda 4,71 log değerine, *cadA* için 0. gün değeri 6,23 log değerinden 9. gün sonunda 4,47 log değerine, *cadB* için 0. gün değeri 6,23 log değerinden 6. gün sonunda 4,53 log değerine, *cadC* için 0. gün değeri 6,55 log değerinden 12. gün sonunda 3,41 log değerine düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.11).

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi pH-8 de yapılan çalışmada bakterilerin koloni sayılarının logaritma değeri yabanıl tip *E. coli* W3110 için 0. gün değeri 6,85 log değerinden 12. gün sonunda 5,53 log değerine düşüş gözlenmiştir. Mutantlar ile yapılan çalışmada ise *adiA* için 0. gün değeri 6,50 log değerinden 6. gün sonunda 4,84 log değerine, *gadB* için 0. gün değeri 6,36 log değerinden 6. gün sonunda 5,04 log değerine, *gadC* için 0. gün değeri 6,50 log değerinden 9. gün sonunda 4,07 log değerine, *cadA* için 0. gün değeri 6,30 log değerinden 12. gün sonunda 2,47 log değerine, *cadB* için 0. gün değeri 6,36 log değerinden 6. gün sonunda 5,16 log değerine, *cadC* için 0. gün değeri 6,36 log değerinden 6. gün sonunda 5,04 log değerine düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. pH-6'da yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları



Şekil 4.12. pH-8’de yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları

Çizelge 4.2. pH-6 ve 8’de yabanıl tip ve mutantların t_{99} değerleri

Fosfat Tamponu		-K değeri	t_{99}
<i>E. coli</i> W3110	pH-6	0,108333333	>12
	pH-8	0,11	>12
<i>adiA</i>	pH-6	0,256666667	7
	pH-8	0,276666667	7
<i>gadB</i>	pH-6	0,223333333	8
	pH-8	0,22	9
<i>gadC</i>	pH-6	0,316666667	6
	pH-8	0,27	7
<i>cadA</i>	pH-6	0,195555556	10
	pH-8	0,319166667	6
<i>cadB</i>	pH-6	0,283333333	7
	pH-8	0,02	10
<i>cadC</i>	pH-6	0,261666667	7
	pH-8	0,213333333	9

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi pH-6’da yapılan deneye bakıldığında *E. coli* W3110 >12 gün, *adiA* 7 gün, *gadB* 8 gün, *gadC* 6 gün, *cadA* 10 gün, *cadB* 7 gün ve *cadC* 7 gün yaşadığı görülmüştür (Çizelge 4.2). *E. coli* W3110 ve mutantların pH-6’da yaşam grafiğine bakıldığında bakterilerin pH-6’da yaklaşık 6 günden daha fazla yaşamına devam ettiği görülmektedir.

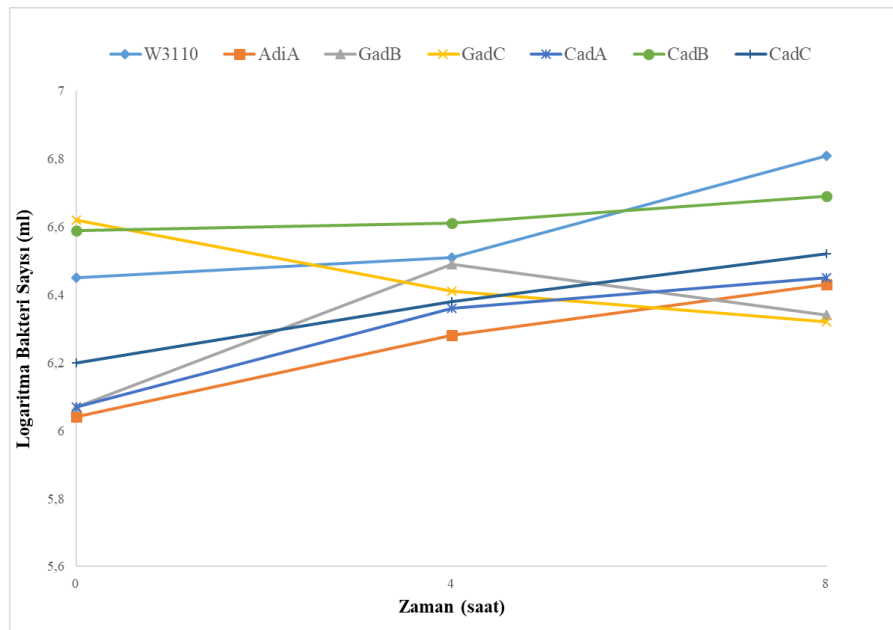
Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi pH-8’de yapılan çalışma incelendiğinde; *E. coli* W3110 >12 gün, *adiA* 7 gün, *gadB* 9 gün, *gadC* 6 gün, *cadA* 6 gün, *cadB* 10 gün ve *cadC* 9 gün yaşamına devam ettiği görülmektedir. *E.coli* W3110 ve mutantların pH-8’de 7 günden daha fazla yaşamına devam ettiği görülmektedir.

Çizelge 4.3. pH-6 ve 8’de yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları

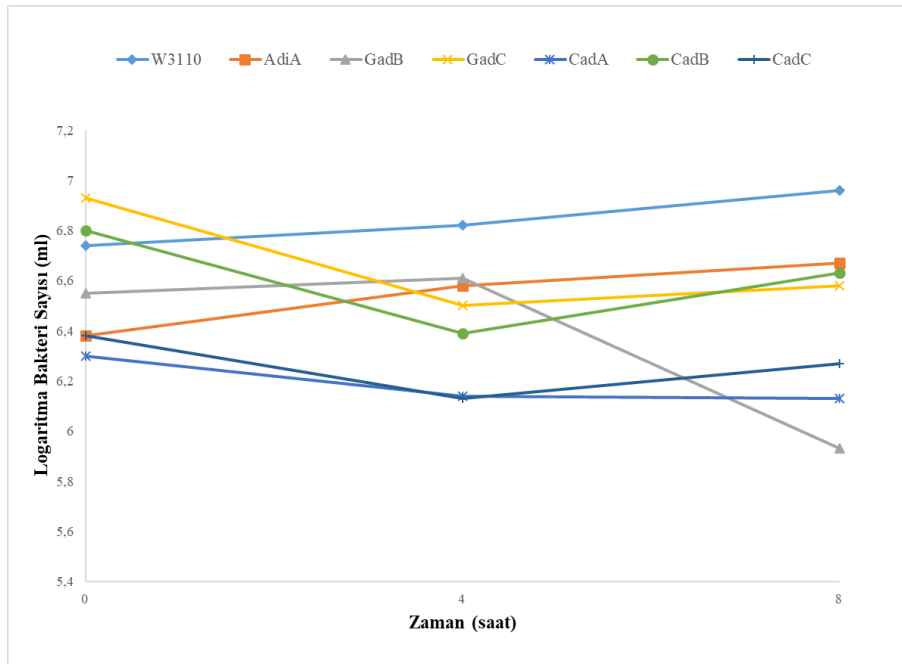
Fosfat Tamponu		0.saat	4.saat	8.saat
<i>E. coli</i> W3110	pH-6	6,45	6,51	6,81
	pH-8	6,74	6,82	6,96
<i>adiA</i>	pH-6	6,04	6,28	6,43
	pH-8	6,38	6,58	6,67
<i>gadB</i>	pH-6	6,07	6,49	6,34
	pH-8	6,55	6,61	5,93
<i>cadC</i>	pH-6	6,62	6,41	6,32
	pH-8	6,93	6,50	6,58
<i>cadA</i>	pH-6	6,07	6,36	6,45
	pH-8	6,30	6,14	6,13
<i>cadB</i>	pH-6	6,59	6,61	6,69
	pH-8	6,80	6,39	6,63
<i>cadC</i>	pH-6	6,20	6,38	6,52
	pH-8	6,38	6,13	6,27

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi pH-6'da yapılan çalışmada bakterilerin koloni sayılarının logaritma değeri yabanıl tip *E. coli* W3110 için 0. saat değeri 6,45 log değerinden 8. saat sonunda 6,81 log değerine artış gözlenmiştir. Mutantlar ile yapılan çalışmada ise *adiA* için 0. saat değeri 6,04 log değerinden 8. saat sonunda 6,43 log değerine, *gadB* için 0. saat değeri 6,07 log değerinden 8. saat sonunda 6,34 log değerine, *cadA* için 0. saat değeri 6,07 log değerinden 8. saat sonunda 6,45 log değerine, *cadB* için 0. saat değeri 6,59 log değerinden 8. saat sonunda 6,69 log değerine, *cadC* için 0. saat değeri 6,20 log değerinden 8. saat sonunda 6,52 log değerine artış gözlemlenirken, *gadC* için 0. saat değeri 6,62 log değerinden 8. saat sonunda 6,32 log değerine düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.13).

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi pH-8 de yapılan çalışmada bakterilerin koloni sayılarının logaritma değeri yabanıl tip *E. coli* W3110 için 0. saat değeri 6,74 log değerinden 8. saat sonunda 6,96 log değerine artış gözlenmiştir. Mutantlar ile yapılan çalışmada ise *adiA* için 0. saat değeri 6,38 log değerinden 8. saat sonunda 6,67 log değerine artış gözlemlenirken, *gadB* için 0. saat değeri 6,55 log değerinden 8. saat sonunda 5,93 log değerine, *gadC* için 0. saat değeri 6,93 log değerinden 8. saat sonunda 6,58 log değerine, *cadA* için 0. saat değeri 6,30 log değerinden 8. saat sonunda 6,13 log değerine, *cadB* için 0. saat değeri 6,80 log değerinden 8. saat sonunda 6,63 log değerine, *cadC* için 0. saat değeri 6,38 log değerinden 8. saat sonunda 6,27 log değerine düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.14)



Şekil 4.13. pH-6'da yabanıl tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları



Şekil 4.14. pH-8'de yabancı tip ve mutantların logaritmik koloni sayıları

Çizelge 4.4. pH-6 ve 8'de yabancı tip ve mutantların t_{99} değerleri

Fosfat Tamponu		-K değeri	t_{99}
<i>E. coli</i> W3110	pH-6	0,045	>8
	pH-8	0,0275	>8
<i>adiA</i>	pH-6	0,04875	>8
	pH-8	0,03625	>8
<i>gadB</i>	pH-6	0,03375	>8
	pH-8	0,0755	>8
<i>gadC</i>	pH-6	0,0375	>8
	pH-8	0,04375	>8
<i>cadA</i>	pH-6	0,0475	>8
	pH-8	0,02125	>8
<i>cadB</i>	pH-6	0,0125	>8
	pH-8	0,02125	>8
<i>cadC</i>	pH-6	0,04	>8
	pH-8	0,01375	>8

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi pH-6 ve 8 fosfat tamponunda yabancı tip ve mutantların yaşamı 8 saat boyunca takip edilmiştir. pH-6'da yapılan çalışmada, *E. coli* W3110, *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA* ve *cadC* 8 saatten fazla yaşamına devam ettiği belirlenmiştir. pH-8'de ise *E. coli* W3110 saat, *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB* ve *cadC* 8 saatten fazla yaşamına devam ettiği belirlenmiştir.

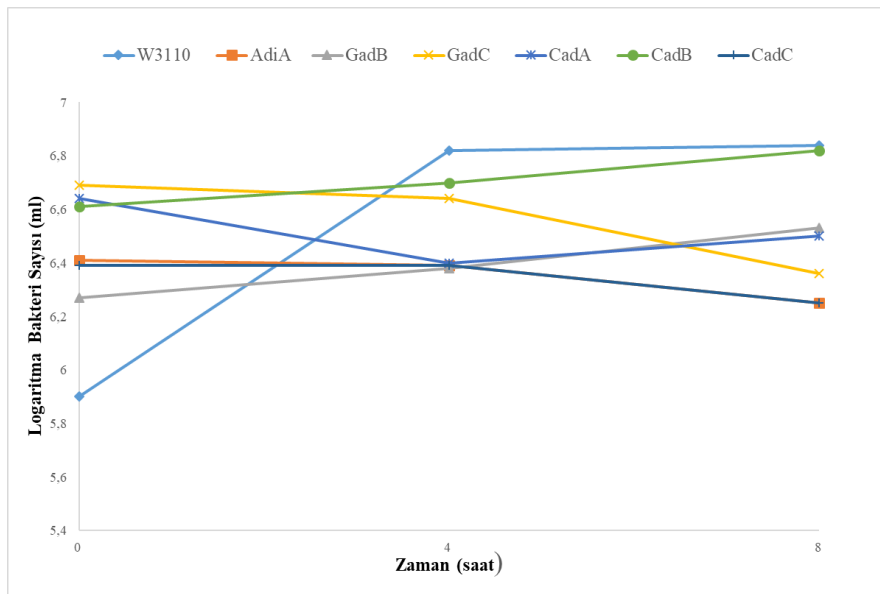
Çizelge 4.5. pH-6 ve 8'de yabancı tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda logaritmik koloni sayıları

Fosfat Tamponu		0.saat	2.saat	4.saat	6.saat	8.saat
<i>E. coli</i> W3110	pH-6	5,90		6,82		6,84
	pH-8	6,39	6,74	5,90	5,12	4,09
<i>adiA</i>	pH-6	6,41		6,39		6,25
	pH-8	6,59	5,89	4,83	2,25	
<i>gadB</i>	pH-6	6,27		6,38		6,53
	pH-8	6,92	6,63	5,97	5,43	3,65
<i>gadC</i>	pH-6	6,69		6,64		6,36
	pH-8	6,82	6,34	6,00	5,30	4,34
<i>cadA</i>	pH-6	6,64		6,40		6,50
	pH-8	6,39	6,24	5,76	4,80	4,00
<i>cadB</i>	pH-6	6,61	6,65	6,70	6,80	6,82
	pH-8	6,89	6,50	5,13	4,60	2,70
<i>cadC</i>	pH-6	6,39		6,39		6,25
	pH-8	6,07	5,21	4,06	3,90	3,30

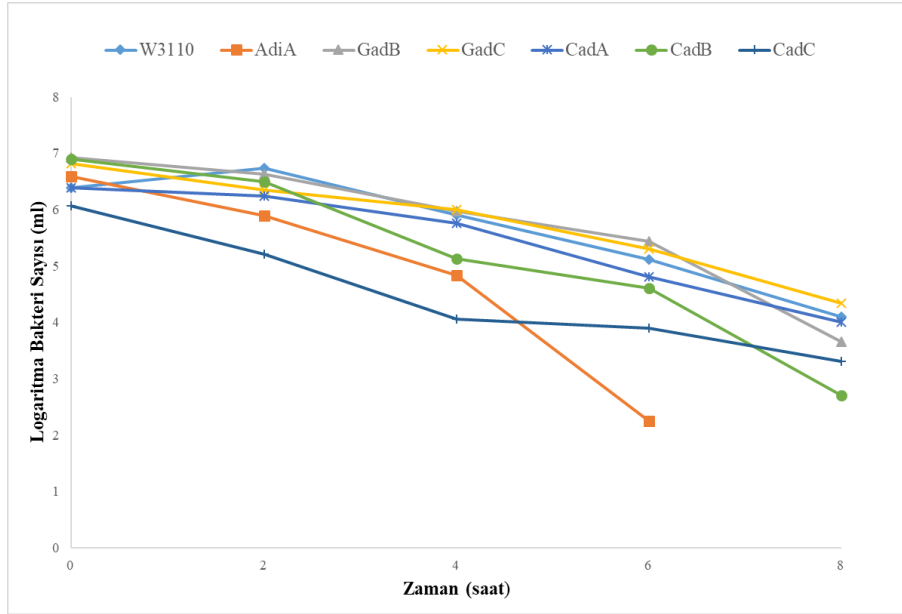
Çizelge 4.5'te farklı pH'larda ortama metilen mavisi eklenerek yapılan deneyde yabancı tip *E. coli* ve mutantların bakteri sayıları logaritmik değerleri gösterilmiştir. Bu çalışma 8 saat takip edilmiştir.

Çizelge 4.5'te pH-6'da yapılan çalışmada bakterilerin koloni sayılarının logaritma değeri yabanıl tip *E. coli* W3110 için 0. saat değeri 5,90 log değerinden 8. saat sonunda 6,84 log değerine artış gözlenmiştir. Mutantlar ile yapılan çalışmada ise *gadB* için 0. saat değeri 6,27 log değerinden 8. saat sonunda 6,53 log değerine, *cadB* için 0. saat değeri 6,61 log değerinden 8. saat sonunda 6,82 log değerine artış gözlenirken, *adiA* için 0. saat değeri 6,41 log değerinden 8. saat sonunda 6,25 log değerine, *cadA* için 0. saat değeri 6,64 log değerinden 8. saat sonunda 6,50 log değerine, *cadC* için 0. saat değeri 6,39 log değerinden 8. saat sonunda 6,25 log değerine artış gözlemlenirken, *gadC* için 0. saat değeri 6,69 log değerinden 8. saat sonunda 6,36 log değerine düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.15).

Çizelge 4.5'te pH-8'de yapılan çalışmada bakterilerin koloni sayılarının logaritma değeri yabanıl tip *E. coli* W3110 için 0. saat değeri 6,39 log değerinden 8. saat sonunda 4,09 log değerine düşüş gözlenmiştir. Mutantlar ile yapılan çalışmada ise *adiA* için 0. saat değeri 6,59 log değerinden 6. saat sonunda 2,25 log değerine, *gadB* için 0. saat değeri 6,92 log değerinden 8. saat sonunda 3,65 log değerine, *gadC* için 0. saat değeri 6,82 log değerinden 8. saat sonunda 4,34 log değerine, *cadA* için 0. saat değeri 6,39 log değerinden 8. saat sonunda 4,00 log değerine, *cadB* için 0. saat değeri 6,89 log değerinden 8. saat sonunda 2,70 log değerine, *cadC* için 0. saat değeri 6,07 log değerinden 8. saat sonunda 3,30 log değerine düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. pH-6'da yabanıl tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda logaritmik koloni sayıları



Şekil 4.16. pH-8’de yabancıl tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda logaritmik koloni sayıları

Çizelge 4.6. pH-6 ve 8’de yabancıl tip ve mutantların metilen mavisi eklenen ortamda t_{99} değerleri

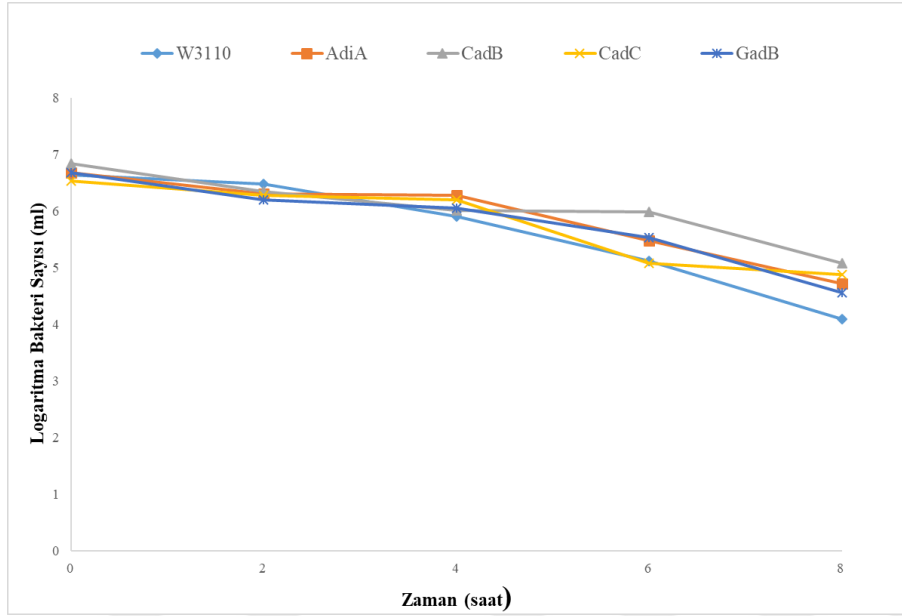
Fosfat Tamponu		-K değeri	t_{99}
<i>E. coli</i> W3110	pH-6	0,145	>8
	pH-8	0,2875	6
<i>adiA</i>	pH-6	0,02	>8
	pH-8	0,7233333	2
<i>gadB</i>	pH-6	0,0325	>8
	pH-8	0,40875	4
<i>gadC</i>	pH-6	0,04125	>8
	pH-8	0,31	6
<i>cadA</i>	pH-6	0,0175	>8
	pH-8	0,29875	6
<i>cadB</i>	pH-6	0,02625	>8
	pH-8	0,52375	3
<i>cadC</i>	pH-6	0,0175	>8
	pH-8	0,34625	5

Çizelge 4.6'da pH-6'da yapılan çalışmada *E. coli* W3110, *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadA*, *cadB* ve *cadC* 8 saatten daha fazla yaşadı. pH-8'de yapılan çalışmada *E. coli* W3110 6,95 saat, *adiA* 2,76 saat, *gadB* 4,89 saat, *gadC* 6,45 saat, *cadA* 6,69 saat, *cadB* 3,81 saat ve *cadC* 5,77 saatten daha fazla yaşamıştır. Yaşam süresi çoktan aza doğru olarak *cadA*, *gadC*, *cadC*, *gadB*, *cadB*, *adiA* mutantlarıdır.

Çizelge 4.7. pH-8'de komplementerlerin metilen mavisi bulunan ortamda logaritmik koloni sayıları

pH-8 Fosfat Tamponu	0.saat	2.saat	4.saat	6.saat	8.saat
<i>E. coli</i> W3110	6,63	6,47	5,90	5,12	4,09
<i>adiA</i>	6,68	6,30	6,28	5,47	4,71
<i>cadB</i>	6,84	6,34	6,01	5,98	5,07
<i>cadC</i>	6,53	6,27	6,20	5,07	4,88
<i>gadB</i>	6,68	6,20	6,05	5,53	4,55

Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi pH-8'de yapılan çalışmada bakterilerin log koloni sayıları yabancıl tip *E. coli* için 0. saat 6,63 log değerinden 4,09 log değerine 8. saatte düştüğü gözlemlenmiştir. Mutantların komplementerleri için ise *adiA* için 0.saat 6,68 log değerinden 8. saat sonunda 4,71 log değerine, *cadB* için 0.saat 6,84 log, değerinden 8. saat 5,07 log değerine, *cadC* mutantı için 6,53 log değerinden 4,88 log değerine, *GadB* için görülen değişim 6,68 log değerinden 4,55 log değerine düşüş gerçekleşmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.18. pH-8’de yabanıl tip ve mutantların komplementlerinin logaritmik koloni sayıları

Çizelge 4.8. pH-8’de metilen mavisi eklenen ortamda komplementlerin t_{99} değerleri

pH-8 Fosfat Tamponu	-K değeri	t_{99}
<i>E. coli</i> W3110	0,3175	6
<i>adiA</i>	0,24625	8
<i>cadB</i>	0,24625	8
<i>cadC</i>	0,20625	>8
<i>gadC</i>	0,26625	7

Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi pH-8’de yabanıl tip ve komplementlerin yaşam süresi *E. coli* W3110 6 saat, *adiA* 8 saat, *gadC* 7 saat, *cadB* 8 saat ve *cadC* 8 saatten fazla yaşamına devam ettiği görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakterilerin büyüme ve gelişme için uygun bir pH aralığı vardır ve bu aralık içinde mikroorganizmaların en iyi şekilde büyüdüğü ve geliştikleri pH değerine "optimum büyüme pH" denir. Ancak, bu sadece mikroorganizmaların çevrelerindeki pH değerini ifade eder, çünkü hücre içindeki pH değeri nötr yakın bir değerdir. Bu, makro moleküllerin hasar görmemesi için önemlidir. Çünkü asidik ve bazik koşullarda hücre içindeki bu moleküller zarar görebilir. Moleküler çalışmalarda gen fonksiyonlarını belirlemek için besiyeri bakımında zengin bir ortamda çalışmalar yapılmaktadır. Ancak doğada yaşam ile ortam koşulları aynı değildir. Bu yüzden deney açlık ortamı olan fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Bakteriler, çeşitli pH değerlerine sahip çeşitli ortamlarda yaşayabilirler ve bu ortamlardaki pH değişimlerine karşı direnç gösterebilirler. Bu direnci sağlamak için bakteriler, çeşitli mekanizmalar kullanırlar (Jin ve Kirk, 2018; Stancik, 2002).

Bakteriler çeşitli ortamlarda yaşayabilir ve bu ortamlardaki zorlu koşullara uyum sağlayabilir. Bununla birlikte, alkali koşullar altında bakterilerin adaptasyon mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Çeşitli araştırmalar, bakterilerin farklı ortamlarda hayatta kalabilme ve bu ortamlardaki zorlu koşullara uyum sağlama mekanizmalarını incelenmiştir. Bu çalışmaların çoğunda, asidik koşullar altında bakteriyel büyüme ve hayatta kalma mekanizmalarını araştırılmıştır (Lund ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, alkali koşullara uyum mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Bakterilerin alkali koşullarda hayatta kalmak için farklı mekanizmalar kullandığı düşünülmektedir. Bakteriler, hücrelerindeki proteinler ve enzimler aracılığıyla pH dengesini düzenleyebilirler. Bu proteinler ve enzimler, sabit bir hücre içi pH'ı korur ve hücre içi pH dengesini korur. Ek olarak, bakteriler hücre zarlarındaki proteinler aracılığıyla pH değişikliklerine karşı koyabilirler. Bu proteinler, hücrenin iç ve dış ortamları arasındaki pH dengesini korur ve hücre içindeki pH dengesinin bozulmasını engeller (Lund ve diğerleri, 2020; Saito ve Kobayashi, 2003).

TorS/TorR fosforilaz sistemi, *E. coli* gibi mikroorganizmaların alkali stres koşullarına karşı hayatta kalma ve adaptasyon mekanizmalarını düzenleyen bir sistemdir. Bu sistem,

trimetilamin N-oksit gibi bileşiklerin varlığında aktive olur ve bu bileşiklerin etkisi altında birçok geni indükler. Bu genler, asidik stres koşullarına adaptasyonu ve hayatta kalmayı destekleyen çeşitli mekanizmalardır. TorS/TorR sistemi tarafından düzenlenen *tnaA* operonu, asidik stres koşulları altında *E. coli*'nin hayatta kalmasını destekler. Bununla birlikte, tuz stresi koşulları altında TorS/TorR sistemi tarafından düzenlenen diğer genler hakkında hiçbir bilgi mevcut değildir. Bu nedenle, mide stresi altında hayatta kalmak için TorS/TorR sisteminin diğer genlerle etkileşimleri ve bu genlerin hangi mekanizmaları kodladığı bilinmemektedir (Bordi, Théraulaz, Méjean ve Jourlin, 2003; Li ve Yao, 2022).

Bakteriler, farklı asit direnç sistemleri kullanarak asidik pH değerlerine uyum sağlayabilirler. Bu sistemler, hücre içi pH dengesini düzenlemek ve sabit bir hücre içi pH değerini korumak için kullanılır. Örneğin AR2, GadA, GadB, GadC ve GadE gibi proteinleri içeren bir glutamat dekarboksilaz sistemidir. AR4 bir lizin dekarboksilaz sistemidir ve CadA, CadB, CadC ve LysP gibi proteinleri içerir. AR5, SpeF ve PotE gibi proteinleri içeren bir ornitin dekarboksilaz sistemidir. AR3, AdiA ve AdiC gibi proteinleri içeren bir arginin dekarboksilaz sistemidir. AR1, en az bilinen asit direnç sistemidir. Bu asit direnci sistemleri, hücre içi pH dengesini kontrol etmek ve sabit bir hücre içi pH'ı korumak için çalışır. Böylece bakteriler asidik koşullarda hayatta kalabilir ve zorlu koşullara uyum sağlayabilir (Peng ve diğerleri, 2011).

Bakterilerde, pH stresine karşı hücrenin korunması için beş ana mekanizma vardır. Bu mekanizmalar, hücre içinde proton taşıyan proteinlerin sentezi, hücre içinde proton pompalayan enzimlerin aktivitesi, hücre içinde proton taşıyan moleküllerin sentezi, hücre zarında bulunan proton geçirgen proteinlerin sentezi ve hücre içinde bulunan proton geçirgen proteinlerin aktivitesini düzenler. Bu mekanizmalar, hücrenin pH stresine direkt olarak karşı korunmasında rol oynar. Ancak, pH stresine karşı hücrenin direkt olarak korunmasında da mekanizmalar vardır. Örneğin, pH'a göre metabolizmanın ayarlanması ve hareketin düzenlenmesi gibi mekanizmalar, pH stresine karşı hücrenin korunmasında görev alır. Bu mekanizmalar, dış membranda bulunan OmpC ve OmpF porin proteinlerinin ekspresyon seviyelerini değiştirerek çalışır (Darcan, Özkanca ve İdil, 2009).

RpoS (sigma faktörü S), bakterilerde küresel bir stres faktörüdür ve birçok farklı stres koşulunda gen ekspresyonunu düzenler. RpoS düzenlemesi, genel stres direncine yardımcı

olan genlerin yanı sıra karbon metabolizması, hücre döngüsü ve morfoloji gibi çoklu işlevlere sahip genleri içerir. RpoS ayrıca açlık stresi, durağan faz geçişi ve ozmotik stres gibi durumlarda da rol oynar. RpoS geninin transkripsiyonel regülasyonu oldukça karmaşıktır. UV ışınları, hiperozmolarite, asit şoku, oksidatif stres ve ısı stresi gibi çeşitli stres koşullarından etkilenir. Bu koşulların tümü, RpoS düzenlemesinin işleyişini ve gen ekspresyonunu etkileyebilir (Landini, Egli, Wolf ve Lacour, 2014; Repoila, Majdalani ve Gottesman, 2003).

E. coli, çeşitli pH aralıklarında fotooksidatif stres altında yaşayabilir. Fakat genellikle en iyi pH ortamında daha az fotooksidatif stres altında yaşar. Örneğin, *E. coli* için ideal pH ortamı genellikle 7,0 ila 7,5 arasındadır. Bu pH değerlerinde, hücreler daha az oksijen tüketir ve daha az oksidatif stres altında yaşarlar. Düşük pH değerlerinde (örneğin, pH 6,5 veya daha düşük), *E. coli* hücreleri daha fazla oksijen tüketir ve daha fazla oksidatif stres altında yaşarlar. Bu, hücrelerin daha az sağlıklı olmasına ve daha az üremesiyle sonuçlanabilir. Yüksek pH değerlerinde (örneğin, pH 8,0 veya daha yüksek), *E. coli* hücreleri de daha fazla oksidatif stres altında yaşayabilir, ancak bu durum genellikle düşük pH değerlerinden daha az yaygındır (Monteagudo-Cascales ve diğerleri, 2022; Wilks ve Slonczewski, 2007).

Genel olarak, üç pasif AR sistemi, farklı seviyeleriyle aynı şekilde etkinleştirildi. Cad sistemi, üç sistem arasında en yüksek homojenlik dağılımını (pH 5.8) gösterirken, Gad ve Adi sistemleri farklı koşullar altında karşılaştırılabilir değerler gösterdi. Gad sistemi, durağan faz sırasında en çok indüklenirken, Adi sistemi, güçlü asit stresleri (pH 4.4) tarafından indüklenerek aktive edildi (Brameyer ve diğerleri, 2022).

Bu çalışmada Çizelge 4.2 pH-6'da 12 günlük deney incelendiğinde mutantlar ve yabanıl tip arasında farklı yaşam süreleri olduğu tespit edilmiştir. *adiA*, *gadB*, *gadC*, *cadB* ve *cadC* mutantlarının yaklaşık yaşam değerlerinin benzer olduğu belirlenmiştir. Yabanıl tip asidik ortamda önceki çalışmaları destekler nitelikte asit direnç mekanizmalarının aktif olması ile stres ortamında hücre metabolizmasını korumaktadır. Ancak mutantlar daha kısa yaşam süresine sahip olması asidik ortamda bu mekanizmaların önemli olduğu göstermektedir.

E. coli hücrelerinin fotooksidatif stres altında nasıl yaşadığını belirleyen birçok faktör vardır. Bu faktörler arasında, hücrelerin mevcut oksijen seviyesi, hücrelerin yaşadığı ortamın doğal

ışık seviyesi ve hücrelerin genetik yapısı sayılabilir. Bu nedenlerden dolayı, *E. coli* hücrelerinin farklı pH değerlerinde fotooksidatif stres altında nasıl yaşadığını tam olarak belirlemek zordur.

AdiA, *E. coli* bakterisi için bir protein kodlayan genin adıdır. Bu gen, *E. coli*'nin asit stresine karşı korunmasına yardımcı olan bir protein kodlar. Glutamat dekarboksilaz (GAD), *E. coli* bakterisi için önemli bir enzimdir. GAD, glisin aminoasidinden glutamat aminoasidine dönüşümünü katalizler ve bu reaksiyon, glisinin asetil-CoA'ya dönüştürülmesiyle sonuçlanır. *E. coli*, glisinin asetil-CoA'ya dönüştürülmesini kullanarak enerji üretir ve bu nedenle GAD, *E. coli*'nin enerji üretiminde önemli bir rol oynar. Ayrıca, GAD, *E. coli*'nin glisin ve glutamat arasında dengesini koruma gibi önemli bir fonksiyonu vardır. *E. coli*, asit stresine maruz kaldığında, GAD aktivitesi artar ve bu sayede hücrenin iç pH'sını düzenler ve asit stresine karşı korunmasına yardımcı olur (Kanjee ve Houry, 2013).

Genetik Düzenleme Asit Redüksiyon Sistemi (GDAR), Asit Düzenleme Asit Redüksiyon Sistemi (ADAR) ve Lizin Düzenleme Asit Redüksiyon Sistemi (LDAR) sistemleri, bakterilerde asit stresine karşı korunma mekanizmalarıdır. GDAR sistemi, bakterilerin durağan faza girdiğinde indüklenir, ancak asitli ortamda üstel büyüme sırasında da aktive olabilir. GDAR genleri, kapsamlı düzenlemeye tabi olan bir asit direnç mekanizması bulunup diğer asit stres yanıt genleriyle birlikte RpoS sigma faktörünün kontrolü altındadır. ADAR sistemi, karmaşık ortamda anaerobik, asidik koşullar altında büyüme sırasında maksimum olarak indüklenir ve AdiA, AdiY ve AdiC gibi genler kromozom üzerinde bulunur. LDAR sistemi ise fazla lizin içeren zengin ortamda pH 5,5'te anaerobik büyüme koşulları altında optimal olarak indüklenir. CadA ve CadB gibi genler CadBA operonunda bulunur ve CadC tarafından düzenlenir. Bu sistemler, bakterilerin asit stresine karşı dayanıklılığını artırmak ve büyüme koşullarını optimize etmek için kullanılır (Kanjee ve Houry, 2013).

Bu deney metilen mavisi içeren iki farklı pH'da gerçekleştirilmiştir. Mutantlar pH-6'da incelendiğinde yaşam sürelerinin yabani tiple benzerlik göstermediği ve mutantların daha uzun süre yaşadığı gözlemlendi. Yabani tip *E. coli*, *gadC* ve *cadA* yaklaşık olarak yaşam sürelerinin yaklaşı olarak değerleri benzer olduğu görülmüştür.

En az yaşam değeri gösteren *adiA*'nın pH-8'de önemli bir etkiye sahip olduğu bulundu. *E. coli* W3110 ve mutantların, fotosensitizer içeren pH-8 ortamında diğer ortamlardan daha kısa süre yaşama sahip olduğu verilerin karşılaştırılması sonucunda ulaşılmıştır Metilen mavisi, bir kimyasal maddedir ve genellikle mikrobiyolojide kullanılır. Metilen mavisi, Gram pozitif bakterilerin hücre zarını kırmak için kullanılır ve böylece bakterilerin morfolojisini göstermek için kullanılır. Ayrıca, metilen mavisi, bakterilerin kolonileşmesini göstermek için de kullanılır. Ayrıca ışık ile tepkimesi sonucunda serbest radikal oluşumu görülmektedir (Wang, Zhao, Qi ve Liu, 2019).

Çalışmada 2 farklı pH'da fosfat tamponu içerisinde aydınlık gruplarda ortama metilen mavisi eklenerek ve metilen mavisiz ortamda yaşam deneyleri incelenmiştir. Fotooksidatif stres ve metilen mavisi mutantlara ilişkisinin araştırılmıştır. İki farklı pH'da serbest radikal salınımının alkali ve asidik ortamda bakteri direnç mekanizmalarının moleküler mekanizması açıklanmaya çalışılması amaçlanmıştır. Kullandığımız metilen mavisi boyasının farklı pH'larda, farklı mutantlar üzerinde toksik etki oluşturduğu gözlemlenmiştir. Metilen mavisinin mutantların yaşımı üzerine etkili olduğu görülmüştür. pH-8'de daha çabuk ölümüne neden olduğu verilerden ulaşılmıştır. Mutantların grafik ve karşılaştırmalar sonucunda *adiA* 'nın 2,76 saatlik en az yaşam değerine sahip olduğu ve *adiA*'nın en kısa sürede ortamda uzaklaştığı belirlenmiştir. Mutantların, farklı pH koşullarında yaşam süresi üzerinde etkisi olduğu anlaşılmıştır. pH'nın singlet oksijen ve radikal oluşumunda büyük bir etkiye sahip olması nedeniyle, bakteri inaktivasyonunda da önemli olabileceğini düşünülmektedir. Bu nedenle, pH-9'da gram (+) ve gram (-) bakteri inaktivasyon oranının pH-5'teki orandan 25 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir (Chen, Cesario ve Rentzepis, 2011).

Sonuç olarak, *E. coli* bakterisi farklı pH değerlerinde fotooksidatif stres altında yaşayabilir, ancak en iyi pH ortamında daha az fotooksidatif stres altında yaşarlar. pH-6 ve 8'de, hücreler oksidatif stres altında farklı yaşam süresi gösterir. Çizelge 4.5. ve 4.6.'da gösterildiği gibi, fosfat tamponu ve metilen mavisi kullanılarak yapılan çalışmada, yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantlarının pH-6 ve 8 ortamlarında yaşam süreleri incelenmiştir. Çalışmada gözlenen sonuçlara göre, yabani tip *E. coli* W3110 pH-6'da yaşam süresinin daha uzun olduğu görülürken pH-8 alkali ortamda yaşam süresi daha kısa olmuştur. Ancak, pH-6 asidik ortamında mutantların yaşam süreleri yabanıl tiple benzerlik göstermemiş ve daha kısa süre

yaşadıkları gözlemlenmiştir. Alkali fosfat tamponlu ortamda metilen mavisi kullanımında ise, *AdiA*, *CadB*, *CadC* ve *GadB* mutantların yaşam süresi daha kısa olduğu görülmüştür. pH-8 fosfat tamponunda metilen mavisi etkili olduğunu sonuçlar göstermektedir. Metilen mavisi, ışık etkisiyle serbest radikallerin oluşumuna neden olan fotosensitizer bir boyadır. Metilen mavisi, bir bakterisit olarak kullanılır ve bakterilerin DNA'sının sentezini inhibe eder. Bu sırada, metilen mavisi molekülü fotonları absorbe eder ve bu enerji molekülün içine depolar. Bu enerji, molekülde bir elektronun hareketine neden olur ve elektron serbest hale gelir. Bu serbest elektron, bir serbest radikal oluşturur. Bazik ortamda *E. coli* ve mutantların yaşam süresini azalttığı söylenebilir. Aynı zamanda, membran geçirgenliğindeki değişikliklere bağlı olarak hücre iç ve dış pH değişikliğinde sorumlu direnç sistemlerinin kontrolünde olabileceği varsayılmaktadır (Balraj, Hussain ve King, 2016).

Elde edilen verilerin doğruluğunu test etmek için yapılan komplementer testlerinin sonuçları da değerlendirilebilir. Bu testlerde, genlerin yabani tipte benzer sonuçlar vermesi, rollerinin kontrolü açısından önem taşımaktadır. Bu verilere dayanarak, metilen mavisi kullanımının alkali ortamda *E. coli* ve mutantların gen bölgeleri oksidasyona uğrar. Serbest radikallerin yaşam sürelerine etkisi olduğu ve pH ortamının bu etkinin önemi üzerinde bir rol oynadığı söylenebilir. Bu çalışma *E. coli* ve mutantların yaşam süresinin pH faktörü ve metilen mavisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Asit direncinin mekanizmalarını aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışma, hedef genlerin asit direnç mekanizmalarını aydınlatmak için gelecekte yapılacak araştırmalar için bir rehber görevi görecektir.

KAYNAKLAR

- Abbott, S. L., O'Connor, J., Robin, T., Zimmer, B. L., and Janda, J. M. (2003). Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *Journal of clinical microbiology*, 41(10), 4852-4854.
- Arsène, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 3-9.
- Baatout, S., Leys, N., Hendrickx, L., Dams, A., and Mergeay, M. (2007). Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. *Acta Astronautica*, 60(4-7), 451-459.
- Balraj, B., Hussain, Z., and King, K. (2016). Experimental study on non sporulating *Escherichia coli* bacteria in removing methylene blue. *Int J Pharm Bio Sci*, 7(1), 629-37.
- Bacellar, I. O., Pavani, C., Sales, E. M., Itri, R., Wainwright, M., and Baptista, M. S. (2014). Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers. *Photochemistry and photobiology*, 90(4), 801-813.
- Bast, A., Haenen, G. R., and Doelman, C. J. (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American journal of medicine*, 91(3), S2-S13.
- Batista, A. M., do Valle, D., Dias, D. F., Sinischachi, L. A., Lopes, B. C., von Sperling, M., vd. (2021). Relationships between abiotic and biotic variables in a maturation pond and their influence on *E. coli* removal. *Water Science and Technology*, 84(10-11), 2903-2912.
- Bessaiah, H., Anamalé, C., Sung, J., and Dozois, C. M. (2022). What flips the switch? Signals and stress regulating extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbriae (pili). *Microorganisms*, 10(1), 5.
- Bordi, C., Théraulaz, L., Méjean, V., and Jourlin-Castelli, C. (2003). Anticipating an alkaline stress through the Tor phosphorelay system in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 48(1), 211-223.
- Bradley, J. A., Amend, J. P., and LaRowe, D. E. (2019). Survival of the fewest: Microbial dormancy and maintenance in marine sediments through deep time. *Geobiology*, 17(1), 43-59.
- Brameyer, S., Schumacher, K., Kuppermann, S., and Jung, K. (2022). Division of labor and collective functionality in *Escherichia coli* under acid stress. *Communications Biology*, 5(1), 327.
- Briviba, K., Klotz, L. O., and Sies, H. (1997). Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological chemistry*, 378(11), 1259-1265.

- Cannan, W. J., and Pederson, D. S. (2016). Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. *Journal of cellular physiology*, 231(1), 3-14.
- Cardoza, E., and Singh, H. (2022). Involvement of CspC in response to diverse environmental stressors in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 785-801.
- Casey, J. R., Grinstein, S., and Orlowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(1), 50-61.
- Chakraborty, S., and Kenney, L. J. (2018). A new role of OmpR in acid and osmotic stress in *Salmonella* and *E. coli*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2656.
- Chen, J., Cesario, T. C., and Rentzepis, P. M. (2011). Effect of pH on methylene blue transient states and kinetics and bacteria photoinactivation. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(13), 2702-2707.
- Colwell, R. R., Knight, I. T., Somerville, C., Shults, S., and Kaspar, C. W. (1989). Viable but nonculturable phenomenon in relationship to starvation/survival, "injury", and strategies for survival of bacteria in the environment. *Microb. Ecol.(ISME-5)*, Kyoto, Aug.
- Commoner, B., Townsend, J., and Pake, G. E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature*, 174(4432), 689-691.
- Cronan Jr, J. E. (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 5(2), 202-205.
- Dahl, T. A., Midden, W. R., and Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of bacteriology*, 171(4), 2188-2194.
- Dahlmann, H. A., Vaidyanathan, V. G., and Sturla, S. J. (2009). Investigating the biochemical impact of DNA damage with structure-based probes: abasic sites, photodimers, alkylation adducts, and oxidative lesions. *Biochemistry*, 48(40), 9347-9359.
- Dahlsten, E., Lindström, M., and Korkeala, H. (2015). Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in *Clostridium botulinum*. *Research in microbiology*, 166(4), 344-352.
- Darcan, C. (2012). Expression of OmpC and OmpF porin proteins and survival of *Escherichia coli* under photooxidative stress in Black Sea water. *Aquatic Biology*, 17(2), 97-105.
- Darcan, C. (2018). Bakterilerde Yaşam Stratejisi Olarak Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum ve Önemi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1), 108-122.

- Darcan, C., Özkanca, R., and İdil, Ö. (2009). The role of RpoS, H-NS and AcP on the pH-dependent OmpC and OmpF porin expressions of *Escherichia coli* at different pH. *African Journal of Biotechnology*, 8(9).
- Darcan, C., Özkanca, R., İdil, Ö., and Flint, K. P. (2009). Viable but Non-Culturable State of *Escherichia coli* Related to EnvZ under the Effect of pH, Starvation and Osmotic Stress in Sea Water. *Polish journal of microbiology*, 58(4), 307.
- Devasagayam, T. P. A., Boloor, K. K., and Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits.
- Dikici, A. (2009). Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4(3), 59-68.
- Elikaei, A., Sharifi, Z., Hosseini, S. M., Latifi, H., and Hosseini, M. K. M. (2014). Inactivation of model viruses suspended in fresh frozen plasma using novel methylene blue based device. *Iranian journal of microbiology*, 6(1), 41.
- Epe, B. (2012). DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 11(1), 98-106.
- Erickson, P. R., Walpen, N., Guerard, J. J., Eustis, S. N., Arey, J. S., and McNeill, K. (2015). Controlling factors in the rates of oxidation of anilines and phenols by triplet methylene blue in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry A*, 119(13), 3233-3243.
- Farr, S. B., Natvig, D. O., and Kogoma, T. (1985). Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 164(3), 1309-1316.
- Fasnacht, M., and Polacek, N. (2021). Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 671037.
- Fay, A. C. (1934). The effect of hypertonic sugar solutions on the thermal resistance of bacteria. *J. Agr. Research*, 48, 453-468.
- Floyd, B. M., and Marcotte, E. M. (2022). Protein sequencing, one molecule at a time. *Annual review of biophysics*, 51, 181-200.
- Floyd, R. A., West, M. S., Eneff, K. L., and Schneider, J. E. (1989). Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. *Archives of biochemistry and biophysics*, 273(1), 106-111.
- Foster, J. W. (1991). Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of bacteriology*, 173(21), 6896-6902.
- Friedmann, T., and Brown, D. M. (1978). Base-specific reactions useful for DNA sequencing: Methylene blue-sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine. *Nucleic acids research*, 5(2), 615-622.

- Fuentes, D. E., Acuña, L. G., and Calderón, I. L. (2022). Stress response and virulence factors in bacterial pathogens relevant for Chilean aquaculture: current status and outlook of our knowledge. *Biological Research*, 55(1), 1-9.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., and Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119(3097), 623-626.
- Giannakis, S., Gamo, A. I. M., Darakas, E., Escalas-Cañellas, A., and Pulgarin, C. (2013). Impact of different light intermittence regimes on bacteria during simulated solar treatment of secondary effluent: Implications of the inserted dark periods. *Solar Energy*, 98, 572-581.
- Gomberg, M. (1902). ON TRIVALENT CARBON. *Journal of the American Chemical Society*, 24(7), 597-628.
- Grossweiner, L. I. (1976). Photochemical inactivation of enzymes. *Current topics in radiation research quarterly*, 11(2), 141-199.
- Guo, M. S., and Gross, C. A. (2014). Stress-induced remodeling of the bacterial proteome. *Current biology: CB*, 24(10), R424–R434.
- Gutiérrez-Cacciabue, D., Cid, A. G., and Rajal, V. B. (2016). How long can culturable bacteria and total DNA persist in environmental waters? The role of sunlight and solid particles. *Science of the Total Environment*, 539, 494-502.
- Halliwell, B. (1989). Protection against oxidants in biological systems. The superoxide theory of oxygen toxicity. *Free radicals in biology and medicine*.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hamed, J., and Poorinmohammad, N. (2017). The cellular structure of Actinobacteria. *Biology and Biotechnology of Actinobacteria*, 5-28.
- Hancock, J. T. (2022). A Brief History of Oxygen: 250 Years on. *Oxygen*, 2(1), 31-39.
- Haslbeck, M., and Vierling, E. (2015). A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of molecular biology*, 427(7), 1537-1548.
- Henry, M., Summa, M., Patrick, L., and Schwartz, L. (2020). A cohort of cancer patients with no reported cases of SARS-CoV-2 infection: the possible preventive role of Methylene Blue. *Substantia*, 888-888.

- Huss, J. M., and Kelly, D. P. (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *The Journal of clinical investigation*, 115(3), 547-555.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 395-418.
- Isohanni, P., Huehn, S., Aho, T., Alter, T., and Lyhs, U. (2013). Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. *Food microbiology*, 34(2), 431-435.
- İnternet: *E. coli*'nin elektron mikroskopundaki görünümü URL: <https://www.microscopemaster.com/e-coli-under-microscope.html> Son Erişim Tarihi: 13.02.2023
- İnternet: Hücresel stres URL: <https://hidrogenadoragua.es/content/6-que-es-el-agua-hidrogenada> Son Erişim Tarihi: 13.02.2023
- İnternet: Oksidatif stres URL: <https://skinkraft.com/blogs/articles/free-radicals> Son Erişim Tarihi: 13.02.2023
- İnternet: Hücrenin oksidatif strese maruz kalması URL: <https://www.flaviotorresin.it/test-stress-ossidativo.html> Son Erişim Tarihi: 13.02.2023
- İnternet: Serbest radikal. URL: <https://corconinternational.com/antioxidants-and-the-antioxidants-network/?lang=it> Son Erişim Tarihi: 13.02.2023
- Jiang, S., Hägglund, P., Carroll, L., Rasmussen, L. M., and Davies, M. J. (2021). Crosslinking of human plasma C-reactive protein to human serum albumin via disulfide bond oxidation. *Redox Biology*, 41, 101925.
- Jin, Q., and Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 21.
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., and Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642.
- Kaur, S., and Benov, L. T. (2020). Methylene blue induces the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Chemico-Biological Interactions*, 329, 109222.
- Kálai, T., Hideg, É., Vass, I., and Hideg, K. (1998). Double (fluorescent and spin) sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(4), 649-652.
- Kanjee, U., and Houry, W. A. (2013). Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 67(1), 65-81.

- Kashef, N., and Hamblin, M. R. (2017). Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resistance Updates*, 31, 31-42.
- Khadieva, A., Mostovaya, O., Padnya, P., Kalinin, V., Grishaev, D., Tumakov, D., vd. (2021). Arylamine Analogs of Methylene Blue: Substituent Effect on Aggregation Behavior and DNA Binding. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5847.
- Korshunov, S., and Imlay, J. A. (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 75(6), 1389-1401.
- Kristensen, T. N., Ketola, T., and Kronholm, I. (2020). Adaptation to environmental stress at different timescales. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1476(1), 5-22.
- Krulwich, T. A., Sachs, G., and Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 330-343.
- Landini, P., Egli, T., Wolf, J., and Lacour, S. (2014). sigma S, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environmental microbiology reports*, 6(1), 1-13.
- Li, G., and Yao, Y. (2022). TorR/TorS Two-Component system resists extreme acid environment by regulating the key response factor RpoS in *Escherichia coli*. *Gene*, 821, 146295.
- Loiselle, F. B., and Casey, J. R. (2010). Measurement of intracellular pH. *Membrane transporters in drug discovery and development: methods and protocols*, 311-331.
- Loschen, G., Flohe, L., and Chance, B. (1971). Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS letters*, 18(2), 261-264.
- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., vd. (2020). Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in microbiology*, 11, 556140.
- Lytle, C. D., Carney, P. G., Felten, R. P., Bushar, H. F., and Straight, R. C. (1989). Inactivation and mutagenesis of herpes virus by photodynamic treatment with therapeutic dyes. *Photochemistry and photobiology*, 50(3), 367-371.
- Malik, Z., Hanania, J., and Nitzan, Y. (1990). New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins—An alternative approach to antimicrobial drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 5(3-4), 281-293.
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., and D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.

- Martinez, K. A., Kitko, R. D., Mershon, J. P., Adcox, H. E., Malek, K. A., Berkmen, M. B., vd. (2012). Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Applied and environmental microbiology*, 78(10), 3706-3714.
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Merrikh, H., Ferrazzoli, A. E., Bougdour, A., Olivier-Mason, A., and Lovett, S. T. (2009). A DNA damage response in *Escherichia coli* involving the alternative sigma factor, RpoS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), 611-616.
- Mittal, C. K., and Murad, F. (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), 4360-4364.
- Moat, A. G., Foster, J. W., and Spector, M. P. (Eds.). (2002). *Microbial physiology*. John Wiley and Sons.
- Monteagudo-Cascales, E., Martín-Mora, D., Xu, W., Sourjik, V., Matilla, M. A., Ortega, Á., and Krell, T. (2022). The pH robustness of bacterial sensing. *Mbio*, 13(5), e01650-22.
- Moreira, L. M., Lyon, J. P., Romani, A. P., Severino, D., Rodrigues, M. R., and de Oliveira, H. P. (2012). Phenothiazinium dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): spectroscopic properties and photochemical mechanisms. *Advanced aspects of spectroscopy*, 14, 393-422.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., and De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Neidhardt, F. C. (2000). Proteomic analysis of bacterial stress responses. *Bacterial stress responses*.
- Nelson, K. L., Boehm, A. B., Davies-Colley, R. J., Dodd, M. C., Kohn, T., Linden, K. G., vd. (2018). Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 20(8), 1089-1122.
- Nohl, H., and Hegner, D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *European journal of biochemistry*, 82 2, 563-7.
- Ozougwu, J. C. (2016). The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research*, 1(8).
- Öngen, B. (2008). *E. coli* ishallerinin laboratuvar tanısı. *ANKEM Derg*, 22, 197-210.

- Özkanca, R., and Flint, K. P. (1997). Relationship between respiratory enzymes and survival of *Escherichia coli* under starvation stress in lake water. *Journal of Applied Microbiology*, 82(3), 301-309.
- Parker, N., Schneegurt, M., Tu, A. H. T., Lister, P., and Forster, B. M. (2016). The Effects of PH and Temperature on Microbial Growth. *Microbiology*, 1, 317-323.
- Paul, P., and Kumar, G. S. (2013). Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B to DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107, 303-310.
- Peng, S., Tasara, T., Hummerjohann, J., and Stephan, R. (2011). An overview of molecular stress response mechanisms in *Escherichia coli* contributing to survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during raw milk cheese production. *Journal of food protection*, 74(5), 849-864.
- Perdrau, J. R., and Todd, C. (1933). The photodynamic action of methylene blue on certain viruses. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 112(777), 288-298.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30, 11-26.
- Raymond, J., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., and Blankenship, R. E. (2003). Evolution of photosynthetic prokaryotes: a maximum-likelihood mapping approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1429), 223-230.
- Repoila, F., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Small non-coding RNAs, coordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Molecular microbiology*, 48(4), 855-861.
- Russell, N. J., Evans, R. I., ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., and Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food microbiology*, 28(2), 255-261.
- Sadraeian, M., Zhang, L., Aavani, F., Biazar, E., and Jin, D. (2022). Photodynamic viral inactivation assisted by photosensitizers. *Materials Today Physics*, 100882.
- Saito, H., and Kobayashi, H. (2003). Bacterial responses to alkaline stress. *Science progress*, 86(4), 271-282.
- Santo, A., Zhu, H., and Li, Y. R. (2016). Free radicals: From health to disease. *React. Oxyg. Species*, 2, 245-263.
- Schimel, J., Balser, T. C., and Wallenstein, M. (2007). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88(6), 1386-1394.

- Searcy D. G. (2003). Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell research*, 13(4), 229–238.
- Sharma, N. (2014). Free radicals, antioxidants and disease. *Biology and Medicine*, 6(3), 1.
- Shimada, Y., Suzuki, T., Matsubara, T., Kitajima-Ihara, T., Nagao, R., Dohmae, N., vd. (2022). Post-translational amino acid conversion in photosystem II as a possible origin of photosynthetic oxygen evolution. *Nature communications*, 13(1), 4211.
- Sies, H., Berndt, C., and Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.
- Sobotta, L., Skupin-Mrugalska, P., Mielcarek, J., Goslinski, T., and Balzarini, J. (2015). Photosensitizers mediated photodynamic inactivation against virus particles. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 15(6), 503-521.
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., and Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6, 1025-1037.
- Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N., and Slonczewski, J. L. (2002). pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(15), 4246-4258.
- Stec, J., Kosikowska, U., Mendrycka, M., Stępień-Pyśniak, D., Niedźwiedzka-Rystwej, P., Bębnowska, D., vd. (2022). Opportunistic Pathogens of Recreational Waters with Emphasis on Antimicrobial Resistance A Possible Subject of Human Health Concern. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(12), 7308.
- Sträuber, H., and Müller, S. (2010). Viability states of bacteria—specific mechanisms of selected probes. *Cytometry Part A*, 77(7), 623-634.
- Şehriban, U., ve Andiç, S. (2016). Mikroorganizmalara etki eden başlıca stres faktörleri. *Gıda*, 41(6), 427-434.
- Tardivo, J. P., Del Giglio, A., De Oliveira, C. S., Gabrielli, D. S., Junqueira, H. C., Tada, D. B., vd. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2(3), 175-191.
- Thomas, A. D., and Booth, I. R. (1992). The regulation of expression of the porin gene *ompC* by acid pH. *Microbiology*, 138(9), 1829-1835.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39(1), 44-84.
- Vanbogelen, R. A., Kelley, P. M., and Neidhardt, F. C. (1987). Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 169(1), 26-32.

- Vatansever, F., de Melo, W. C., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., vd. (2013). Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species–bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS microbiology reviews*, 37(6), 955-989.
- Wainwright, M., and Giddens, R. M. (2003). Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and Pigments*, 57(3), 245-257.
- Wang, R., Li, X., and Yoon, J. (2021). Organelle-targeted photosensitizers for precision photodynamic therapy. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 13(17), 19543-19571.
- Wang, S. Y. (Ed.). (2012). *Photochemistry and photobiology of nucleic acids* (Vol. 1). Elsevier.
- Wang, X. X., Zhu, L. J., Li, S. T., Zhang, Y. Z., Liu, S. Y., Huang, K. L., vd. (2021). Fluorescent functional nucleic acid: Principles, properties and applications in bioanalyzing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 141, 116292.
- Wang, Z., Zhao, H., Qi, H., Liu, X., and Liu, Y. (2019). Free radical behaviours during methylene blue degradation in the $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ system. *Environmental technology*, 40(9), 1138-1145.
- Wilks, J. C., and Slonczewski, J. L. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *Journal of bacteriology*, 189(15), 5601-5607.
- Yousef, A. E., and Courtney, P. D. (2003). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. *Microbial stress adaptation and food safety*, 1, 1-30.
- Zheng, M., and Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochemical pharmacology*, 59(1), 1-6.
- Ziegelhoffer, E. C., and Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), 856-863.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Musa Can MANSUROĞLU

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1-) Mansuroğlu M. C., İdil, Ö., (2022, 11-13 October). Life Of *Escherichia coli* Under Photooxidative Stress At Different pH. 6. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Bilimlerindeki İlerlemeler Konferansı (ICANAS), Ağrı.

