

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AEROBİK OKSALAT BAKTERİLERİNİN YAŞAMINA STRES
FAKTÖRLERİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşen SARACALOĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28. 12. 2007

Tezin Savunulduğu Tarih : 02. 01. 2008

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Abdurrahman Üsâme TAMER

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. İhsan YAŞA

: Yrd. Doç. Dr. Uğur SIDAL

MANİSA 2008

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİL LİSTESİ	V
ÇİZELGE LİSTESİ	VI
TEŞEKKÜR	VII
TÜRKÇE ÖZET	VIII
YABANCI DİLDE ÖZET	IX
	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAKLARIN ÖZETİ	3
2.1. Oksalik Asit	3
2.2. Doğada Oksalat Varlığı	3
2.3. Oksalat Metabolizması	4
2.3.1. Oksalat Formasyonu	4
2.3.2 Oksalat Katabolizması	4
2.4. Oksalatın Biyosentezde Kullanımı	5
2.4.1. Gliserat Metabolik Yolu	5
2.4.2. Serin Metabolik Yolu	5
2.5. Doğadaki Oksalat Döngüsünden Sorumlu Bakteriler	7
2.5.1. Oksalatı Kullanabilen Anaerobik Bakteriler	7
2.5.2. Aerobik Bakteriler	8
2.6. Oksalatın Biyolojik Tehlikeleri	8
2.7. Oksalatın Kullanım Alanları	9
2.8. Bakterilerin Yaşamına Çevresel Stres Faktörlerinin Etkisi	9
2.8.1. Osmotik Stres ve Osmolarite	9
2.8.2. pH Stresi	10
2.8.3. Sıcaklık Stresi	11
2.8.4. Besin Stresi	12
2.8.5. Antibiyotik Stresi	13
3. MATERYAL VE METOD	14
3.1. MATERYAL	14
3.1.1. Organizmalar	14
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	14
3.2. METOD	17
3.2.1. Kültürlerin Aktivasyonu	17

<i>İçindekiler devamıdır</i>	Sayfa
3.2.2. Kullanılan Organizmaların Sağlık Kontrolü	17
3.2.3. Osmotik Stres Deneyi	17
3.2.4. pH Stresi Deneyi	17
3.2.5. Sıcaklık Stresi Deneyi	18
3.2.6. Besin Stresi Deneyi	18
3.2.7. Antibiyotik Stresi Deneyi	18
4. BULGULAR	19
4.1. Osmotik Stres Altındaki Organizmalarda Büyüme	19
4.2. pH Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme	20
4.3. Sıcaklık Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme	21
4.4. Antibiyotik Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme	22
4.5. Besin Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme	23
5. TARTIŞMA	24
6. KAYNAKLAR	26
ÖZGEÇMİŞ	32

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Oksalik Asidin Kimyasal Yapısı	3
Şekil 2.2. Oksalat Metabolizması	6
Şekil 4.1. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi.	19
Şekil 4.2. Farklı pH Değerlerinin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi.	20
Şekil 4.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi.	21
Şekil 4.4. Farklı Konsantrasyonlardaki Ampisillinin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi	22
Şekil 4.5. Farklı Konsantrasyonlardaki Potasyum Oksalatlı Besiyerinin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi.	23

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar	14
Çizelge 4.1. Osmotik Stres Etkisi	19
Çizelge 4.2. pH Stresi Etkisi	20
Çizelge 4.3. Sıcaklık Stresi Etkisi	21
Çizelge 4.4. Antibiyotik Stresi Etkisi	22
Çizelge 4.5. Besin Stresi Etkisi	23

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın yapılmasını öneren ve çalıőmalarımnda her türlü desteğini esirgemededen beni yönlendiren, değerli bilgilerinden yararlandığım tez danıőmanım, Hocam Sayın Prof. Dr. A. Üsame TAMER ile değerli zamanından ödün verip, çalıőmanın bazı laboratuvar ve yazım aőamasında őekillenmesini sağlayan, önerilerini aldığım ve tecrübelerinden faydalandığım Hocam Sayın Araő. Gör. Dr. Mustafa OSKAY' a teşekkür ederim. Araőtırma süresince yanımda, her türlü ihtiyaçlarım için seferber olan Hocalarım Sayın Araő. Gör. Dr. Evrim TAŐKIN' a ve Sayın Araő. Gör. Cem AZERİ' ye teşekkür ederim. Ayrıca öğrenim hayatım süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

TÜRKÇE ÖZET

Aerobik Oksalat Bakterilerinin Yaşamına Stres Faktörlerinin Etkisi

Gülşen SARACALOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Üsame TAMER

Ocak, 2008; 32+IX Sayfa

Bu çalışmada kullanılan aerobik oksalat bakterileri *Cupriavidus oxaliticus* OX1, *Oxalicibacterium flavum* TA17^T, *Xanthobacter sp.* NS14 ve *Cupriavidus necator* NS02 olup, Gram-negatif, çubuk şekillidirler. Özellikle toprakta bol miktarlarda bulunurlar. Oksalatı karbon kaynağı olarak kullanıp formata dönüştürürler. Yapılan çalışmayla, çevresel faktörlerden pH, osmolarite, sıcaklık, besin ve antibiyotik stresinin bu bakterilerin kültüre edilebilirliği ve canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Potasyum oksalat (PO)'lu besiyerinde kullanılan 4 organizmanın farklı konsantrasyonlardaki tuza karşı toleransları değişmekle beraber; OX1 ve NS14 %1' lik NaCl' da iyi büyüme göstermiştir. Diğer iki bakterinin bu ortamda büyümeleri zayıftır. Kullanılan aerobik oksalat bakterilerin optimum büyüme pH' ları değişmekle beraber, hemen hemen hepsi farklı pH' larda gelişme gösterebilmiştir. OX1 ve NS14 suşlarının pH; 8.5' deki büyümeleri oldukça yüksektir. Farklı sıcaklıkların bu bakteriler üzerine etkisine bakıldığında ise TA17^T ve OX1 45 °C' de iyi gelişme göstermişlerdir. NS02 suşunun sıcaklık değişimlerine karşı göstermiş olduğu büyüme şekli oldukça değişkendir. Organizmaların kullanılan Ampisillin antibiyotiklerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdikleri cevap benzer olup; 20 ve 30 µg/100 ml dozlarında hiçbirinde büyüme görülmemiştir. Potasyum oksalatın farklı konsantrasyonlarıyla yapılan koloni sayımlarında NS02 ve NS14' ün, %0.6'lık PO' da iyi gelişme gösterdikleri belirlenmiştir. Artan PO konsantrasyonlarındaki büyümeleri azalmaktadır. Kullanılan oksalat bakterilerin uygulanan çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri cevaplar farklılık göstermektedir. Çalışmada, özellikle yüksek pH ve sıcaklıkta büyüme gösterebilenlerin endüstriyel alanlarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Aerobik oksalat Bakterileri, Çevresel Stres Faktörleri, Oksalik Asit, Degradasyon, Patojenite. Koloni Oluşturan Birim.

YABANCI DİLDE ÖZET (ABSTRACT)

Effect of Stress Factors on Aerobic Oxalate Bacteria

Gülşen SARACALOĞLU
MSc. Thesis in Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. A. Üsame TAMER

2008,January; 32+IX Pages

Aerobic oxalate bacteria used in this project are *Cupriavidus oxaliticus* OX1, *Oxalicibacterium flavum* TA17^T, *Xanthobacter* sp. NS14 and *Cupriavidus necator* NS02 and gram negative and rod shaped. In the soil there are a large amounts of aerobic oxalate bacteria. They convert into format by using the oxalate as a source of carbon. It is stated that the environmental factors like pH , osmolarity , heat, nutrition and antibiotic stress can be cultured and the effects of liveliness with the help of this project.

The four organisms used in basal mineral medium with Potassium oxalate (PO) changes their tolerance against the salt in different concentrates and also OX1 and NS14 indicates a well grown up in %1 percent of NaCl. The other two bacteria have a weak growing in this environment. It shows that aerobic oxalate bacteria used in this project have changed their optimum growing pH and almost every one of them has grown up in different pH. It is high that OX1 and NS14 shows their good growing. When we deep in the effects of these bacteria in different heats TA17 and OX1 shows their good growing in 45 °C. The formation of growing showing against the changes of heating, strain NS02 is extremely changeable. Organisms reacts almostly the same as the reaction of ampicillin against different concentrations. It has not been examined to grow up in 20 and 30 µg /100ml. It is specified that the PO has a good growing up in the count of colony made by its different concentrations. Growing in the increasing PO concentrations has been decreased.

It shows that used oxalate bacteria differentiate the reactions to applied environmental factors. In this project we have thought that the bacteria can show its growing especially in high pH and the heat can be used in industrial areas.

Key words: Aerobic oxalate bacteria, Survival, Environmental Stress Factors, Oxalic Acid, Degradation, Pathogenite, CFU (colony forming unit)

1.GİRİŞ

Doğada bütün organizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için bir yarış ve rekabet içindedirler. Bunun sonucu olarak da yeni savunma ve rekabet mekanizmaları geliştirmişlerdir. Diğer taraftan çevresel stres faktörlerine karşı da uyum sağlamak için alkoller, yağ asitleri, toksinler, enzimler ve antimikrobiyal ajanlar üretirler. Bu tür maddeler yine o ortamda bulunan canlıların büyümesine negatif ya da pozitif etki yapabilir.

Mikroorganizmalar, doğal ortamlarda yaşamlarını devam ettirebilmek için, çevresel şartlara karşı koyacak yaşam stratejileri geliştirmek zorundadırlar. Spor, kist gibi dayanıklı formlar oluşturarak farklılaşma özelliği gösterebilen bakteriler, ekstrem şartları kolayca atlatırken, farklılaşma özelliği olmayan bakterilerde bu durum oldukça zordur. Bakterilerin yaşamını etkileyen çevresel stres faktörleri genellikle; pH, osmolarite, sıcaklık, besin, antibiyotik, ışık, ortamdaki toksik maddeler olarak bilinmektedir (Panoff et al. 1998).

Mikroorganizmalar doğal habitatlarında sınırlı besin kaynaklarının varlığında yaşama kapasitesine sahip olup, çevresel şartlara kolayca uyum sağlayabilirler. Bakteri büyümesi, enfeksiyon gücü ve patojenlik, tutunma gibi faaliyetlerini etkileyen önemli çevresel faktörler sıcaklık ve tuzluluktur. Atık su işleme alanları, endüstriyel atıklar, tarımsal faaliyetler sonucu sucul ortamlarda önemli çevresel parametrelerden pH' da büyük değişimler meydana gelir. Genellikle bu tür ortamlarda mikroorganizmalar yüksek pH' ya maruz kalır. Bakterilerin sınırlı besin kaynaklarının varlığında büyütüldüklerinde diğer çevresel stres faktörleri (sıcaklık, osmotik basınç, pH gibi) ne kolayca uyum sağlayıp yaşamlarını sürdürdükleri tespit edilmiştir. Asit adaptasyonunun *Salmonella typhimurium* ve *Vibrio parahaemolyticus*' u farklı çevresel şartlara karşı koruduğu (cross-protection)' da bilinmektedir (Koga et al. 2002).

Oksalik asit güçlü şelat aktivitesiyle, yüksek derecede okside edilen organik bileşimiyle, doğal yolla oluşur. Bu özelliğinden dolayı toprak metallerinin taşınmasında ve çözünmesinde temel bir bileşiktir. Alüminyum (Al) ve demirin (Fe) etkileşimiyle, topraktaki mevcut P, K, Mg ve Ca'un artmasıyla, oksalat bitki beslenmesinde büyük rol oynar (Şahin, 2001). Bakterilerin oksalatı diğer canlıların bağırsak sistemi ve sedimentlerde anaerobik olarak formata dönüştürdüğü uzun zamandan beri bilinmektedir. Oksalik asit ozon ile kağıt beyazlatılması işlemlerinde oluşabilmektedir. Ayrıca cam eşya yapımı esnasında kumdan demir ayrıştırılması sırasında da oluşmaktadır (Dinsdale et al. 2000). Ayrıca patojenik fungusların miseloyal büyüme esnasında oksalik asit ürettikleri bilinmektedir. Bu olayda oksalik asit kalsiyum iyonlarıyla birleşerek kalsiyum oksalat kristalleri şeklinde orta lamelde biriktirilir. Sonrasında oksalat kristalleri ortama salınarak bitki dokusunun enzimatik parçalanmasını hızlandırır. *Sclerotinia sclerotiorum*' un bazı mutantlarının oksalik asit üretimi azalmasına bağlı olarak fasulyelerde

beyaz küf hastalığını oluşturmadığı gözlenmiştir. *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia* ve *P. aeruginosa* bazı bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ancak zaman içinde bazı fungal patojenlerin *Pseudomas* türlerinin antimikrobiyal etkisini baskıladığı da ortaya çıkmıştır (Nagarajkumara et al. 2005).

Diğer taraftan oksalat içeren bitkilerin tüketilmesiyle bu madde hayvanların ve insanların kan ve idrarına geçer. Oksalat ve tuzları zehirli olup, yüksek konsantrasyonları insanlarda ve hayvanlarda ölüme sebep olur. Düşük konsantrasyonları ise hyperoxaluria, B6 vitamini eksikliği ve böbreklerde kalsiyum oksalat taşlarının oluşumuyla sonuçlanan rahatsızlıklara yol açar.

Mikroorganizmalar, gerek klasik gerekse moleküler biyoteknoloji alanındaki başarılı uygulamaların gerçekleştirilmesinde çok önemli bir yeri olan, biyoteknolojinin geleceğe yönelik potansiyeli için de belirleyici etkenler arasında olan bir canlı grubudur. Mikroorganizmaların ve üretme yeteneğinde oldukları moleküllerin çeşitliliği, ilgili gen kaynaklarının belirlenmesi ve korunmasına yönelik girişimlerin tüm dünyada artmasına neden olmuştur.

Dünyadaki mikrobiyal çeşitliliğin çok büyük kısmının henüz izole ve karakterize edilmediği, kaynak merkezlerinin temel rolünün biyo çeşitliliğin korunması olduğu belirtilmektedir. Türkiye’de, bilinen soyların korunmasının ötesinde, yerel ekosistemleri tarayarak endüstriyel önemi olan ürünleri üreten mikroorganizmaların ve onlardan türevlenen biyolojik materyalin tanımlandığı, nitelendirildiği, korunduğu ve arşivlendiği “ulusal” bir mikroorganizma kaynak merkezi bulunmamaktadır.

Organizmaların stres faktörlerine karşı verdikleri tepkiler ve değişimler uzun zamandan beri çalışılmaktadır. Çoğu bakteri oksalatı karbon kaynağı olarak kullanamaz. Aerobik oksalat bakterileri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır (Şahin 2001, Şahin et. al 2002, Tamer et. al. 2002). Mikroorganizmaların çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri tepki ve uyum esnasında ürettikleri enzimler endüstriyel öneme sahiptir. Yukarıda da açıklandığı gibi bu tür bakteriler biyolojik kontrol çalışmalarında, cevher zenginleştirilmesi, atık sulardan toksik maddelerin ayrıştırılması gibi işlemlerde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada çevresel faktörlerden pH, osmolarite, sıcaklık, besin ve antibiyotik stresinin bazı aerobik oksalat bakterilerinin kültüre edilebilirliği ve canlılığı üzerinde etkisini belirlemek, bu bakterileri ulusal kültür koleksiyonununa kazandırmak ve ayrıca bu konuda yapılacak çalışmalara ön kaynak oluşturmak amaç edinilmiştir.

2. KAYNAKLARIN ÖZETİ

2.1. Oksalik Asit

Oksalik asit (ethanedioic acid, $C_2H_2O_4$) hayvanlarda, bitkilerde ve doğada yaygın olarak bulunan bir bileşiktir. Bu bileşik iki karboksil grubu içine katılan kuvvetli bir organik asittir (Şekil 2.1.)

Oksalik asit diğer karboksilik asitlere göre kolayca okside edilir. İlk olarak *Oxalis* bitkisinden elde edildiği için, bu isimle adlandırılmıştır. Oksalik asit sodyum, potasyum, kalsiyum gibi minerallerle kuvvetli bağlar oluşturabilir. Bu durumda ortaya çıkan bileşikler, oksalat tuzları olarak adlandırılır. Sodyum ve potasyum oksalat tuzları suda çözünürken, kalsiyum oksalat suda çözünmez (Şahin, 2001).



Şekil 2.1. Oksalik asidin kimyasal yapısı

2. 2. Doğada Oksalat Varlığı

Oksalik asit bitkilerde, serbest asit veya oksalat tuzları şeklinde bulunur. Oksalat konsantrasyonu en fazla yapraklarda en az ise köktedir. Bitkilerdeki oksalat içeriği bitkinin yaşına, mevsime, toprağın tipine ve iklime göre değişiklik gösterir (Çalışkan, 2000). Bazı bitkilerin organ ve dokularında kalsiyum oksalatın birikimi, mikroskobik kristaller şeklinde olur. Kalsiyum oksalat kristallerinin miktarı türlere göre değişiklik gösterir. Bazı bitkilerin ise kuru ağırlıklarının % 85' inden fazlasını bu kristaller oluşturur. Kalsiyum oksalat kristalleri spesifik şekilleri ve bitkideki lokasyonlarından dolayı, bitki taksonomisi açısından da önemlidirler. Angiospermlerin ve gymnospermlerin 215'den fazla familyasında bulunduğu tespit edilmiştir.

Hayvanlar aleminde oksalik asit ve tuzları, memeli kanında ve idrarında bulunur. Oksalat, gliksalat ve askorbat oksidasyonu ile memeliler tarafından az miktarda sentezlenirken; oksalat varlığının çoğunluğu, oksalat içeren bitkilerin tüketilmesinden kaynaklanır.

Ascomycetes, *Basidiomycetes* ve *Zygomycetes* sınıfına ait mantarlar ile likenler hayat döngülerinin bazı evrelerinde kalsiyum oksalat kristalleri üretirler. Bakterilerde oksalatın varlığı *Mycobacterium*, *Acetobacter*, *Glucanobacter* ve *Lactobacillus* genuslarında tespit edilmiştir.

2.3. Oksalat Metabolizması

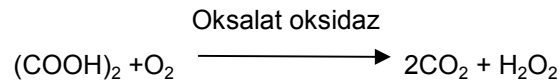
2.3.1. Oksalat Formasyonu

Bu konuda en çok mantarlar üzerinde çalışılmıştır. Özellikle *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium* ve *Gleopyhllum* genuslarına ait türler güçlü oksalik asit üreticisidirler. Funguslarda oksalat oluşumu için en uygun kültürel şartlar, karbonhidrat konsantrasyonunun yüksek, oksijenin yeterli, pH'nın düşük olduğu ve sınırlı miktarda inorganik maddenin bulunduğu koşullardır. Oksalat direkt olarak glioksalat oksidasyonu ile meydana gelmeyip, oksaloasetatın oksaloasetat hidrolaz enzimiyle hidroliziyle oluşur. Glioksalatın, oksalata oksidasyonu mikroorganizmalarda bulunan üç enzim ile katalizlenir. Bu enzimler: Laktat dehidrogenaz, ksantin oksidaz ve glioksalat dehidrogenaz enzimleridir.

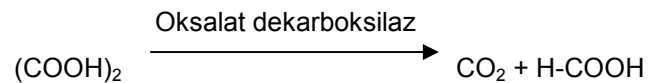
2.3.2 Oksalat Katabolizması

Pek çok bakteride oksalat katabolizmasının; 1.Oksidasyon, 2.Dekarboksilasyon, 3.Aktivasyon ve dekarboksilasyon olmak üzere üç yolu tespit edilmiştir:

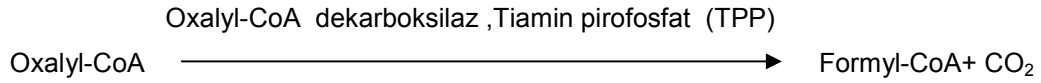
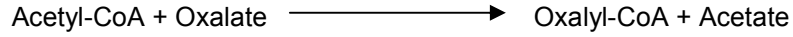
Oksalik asidin aerobik oksidasyonu, oksalat oksidaz enzimiyle katalizlenir. *Pseudomonas*'ın OX-53 suşu oksalatı, oksalat oksidaz enzimiyle CO₂ ve H₂O₂'ye okside eder. Bu bakteriden saflaştırılan enzim, bir flavoproteindir ve aşağıdaki reaksiyonu katalizler (Şahin, 2001).



Dekarboksilasyon reaksiyonunda; oksalat dekarboksilaz, oksalatı aerobik ortamda format ve CO₂ 'e dönüştürür. Bu enzim, bu reaksiyonda özel olarak rol oynar. Çünkü bu reaksiyonu katalizleyebilen oksalat dekarboksilazın diğer bir tipi yoktur. Oksalat dekarboksilaz *Flammula velutipes* fungusundan saf olarak izole edilmiştir. Ayrıca kobay karaciğerinde de bulunmuştur (Taner and Bornemann, 2000). Bu enzim, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında aktivitesini sürdürerek kararlılığını korur. Oksalik asidi dekarboksile ederek CO₂ ve formik asidin hücre içi değerlerini artırır.



Aktivasyon ve dekarboksilasyon işlemi ile oksalat degradasyonu daha karmaşıktır. Oksalat hücre içine transfer edilir. Oksalat, Formil-CoA'dan CoA'nın transferiyle oxalyl-CoA'ya aktive edilir. Oxalyl-CoA, formil-CoA ve CO₂'ye dekarboksile edilir ve CO₂ hücre dışına diffüzenir. Aerobik oksalat bakterilerinin çoğunluğunun aksine, anaerobik *Oxalobacter formigenes*, oksalat metabolizmasının son ürünü olarak format üretir.



2.4. Oksalatın Biyosentezde Kullanımı

Oksalat yüksek derecede okside edilen bir substrattır ve asimilasyonu bakteri hücreleri içinde indirgenmiş reaksiyonları içerir. Oksalat hücre içine taşınır ve oxalyl-CoA'ya aktive edilir. Oksalat, oxalyl-CoA redüktaz enzimiyle glioksalata indirgenir. Bu noktada, gliserat metabolik yolu ve serin metabolik yolu olmak üzere iki metabolik yol oluşur (Şekil 2.2.)

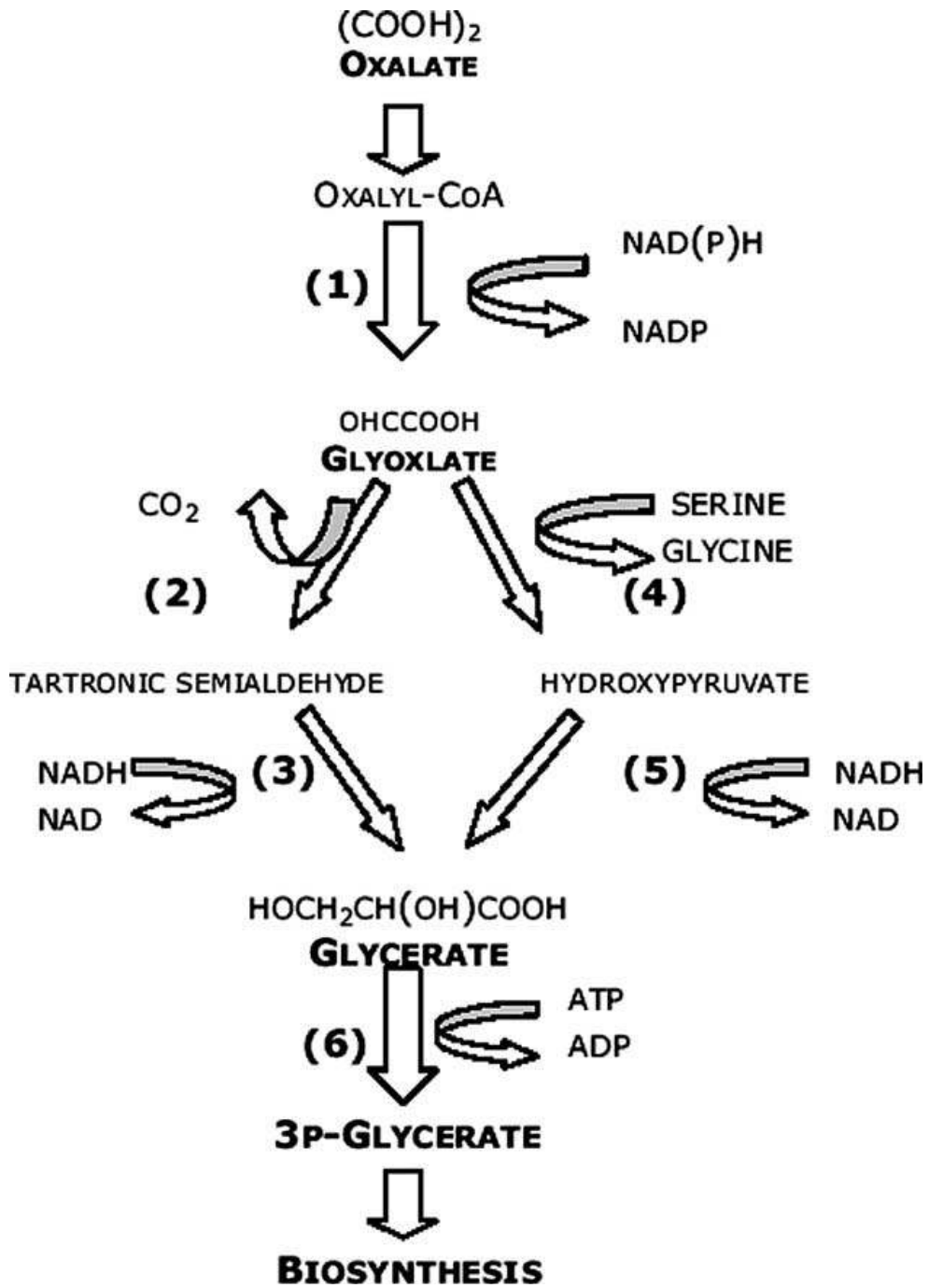
2.4.1. Gliserat Metabolik Yolu

Starkeya novella ve *Oxalobacter formigenes*'de gösterilmiştir. *Oxalobacter formigenes*, *Oxalobacter vibrioformis*, *Oxalophagus oxalicus* gelişebilmek için az miktarda asetata ihtiyaç duyar (Cornick and Allison, 1996a). Asetat, biyosentetik proses için gereklidir. Pembe pigmentli, fakültatif, metilotrofik bakteriler (PPFM) dışında *Pseudomonas sp.* (MOx suşu), oksalatı gliserat metabolik yolu ile asimile eder (Cornick and Allison, 1996b). Bu metabolik yolda anahtar enzim glioksalat karboligazdır. Gliserat metabolik yolu glioksalat, glisin gibi pek çok iki karbonlu bileşiğin asimilasyonunda kullanılır.

2.4.2. Serin Metabolik Yolu

Pembe pigmentli fakültatif metilotrof (PPFM) bakterilerinde, L-serin aminotransferaz ve hidroksipiruvat redüktaz enzimleri bulunur. Bu enzimler serin metabolik yolunun anahtar enzimleridir. Serin yolu ile sadece oksalatın asimilasyonu değil tek karbonlu bileşiklerin de asimilasyonu gerçekleşir.

Ammoniphilus spp. oksalatı serin metabolik yolu ile asimile eder. Çünkü bu bakteride L-serin aminotransferaz ve hidroksipiruvat redüktaz enzimleri bulunmuştur (Şahin, 2001).



Şekil 2.2. Oksalat Metabolizması (Şahin, 2003)

* Sol taraf: Gliserat metabolik yolu, Sağ taraf: Serin metabolik yolu. Reaksiyonlarda yer alan enzimler: 1, oxalyl-CoA reductase; 2, glyoxylate carboligase; 3, tartronic semialdehyde reductase; 4, serine-, glyoxylate aminotransferase; 5, hydroxypyruvate reductase; 6, glycerate kinase.

2.5. Doğadaki Oksalat Döngüsünden Sorumlu Bakteriler

Bakteriler, oksalatı kimyasal özellikleri (kuvvetli asit olması, tuzlarının suda zor çözünmesi vs.)'nden dolayı öncelikli besin kaynağı olarak kullanmazlar. Oksalat gibi diğer pek çok substratı fermente edebilen, bakteriler genel olarak nitelendirilirken, besin kaynağı olarak oksalatı kullanan bakteriler spesifiktirler (Şahin, 2001).

2.5.1. Oksalatı Kullanabilen Anaerobik Bakteriler

Oksalatı kullanabilen anaerobik bakterilerin habitatlarından biri hayvanların sindirim sistemidir. Dawson, anaerobik oksalat bakterilerinin ilk izolasyonunu koyun kalın bağırsağından yapmıştır. Elde edilen izolatlarla yapılan çalışmalar, *Oxalobacter formigenes* türünün tanımlanmasını sağlamıştır (Şahin, 2001). *Oxalobacter formigenes* tarafından oksalatın degradasyonu insan sağlığı açısından önemlidir. Çünkü bakterinin bu aktivasyonu böbrek taşı oluşumunu engellemeye yardımcı olur (Duncan et al. 2002). Anaerobik şartlarda insan dışkısından, oksalatı kullanabilen *Enterococcus faecalis* ve *Providencia sp.* türleri izole edilmiştir. Bu bakteriler sınırlı besin içeren ortamlarda gelişebilirler.

Anaerobik oksalat bakterileri sedimentlerden de başarılı bir şekilde izole edilebilmişlerdir. Smith ve arkadaşları (1985) oksalatı kullanabilen hem çubuk şekilli hem de spiral şekilli anaerobik bakterileri taze su birikintisi sedimentinden izole etmişlerdir. Spiral şekilli izolatın (Ox-8) herhangi bir taksona ait olmadığı gözlenirken, çubuk şekilli izolatın (SOx-4) *Oxalobacter formigenes* olduğunu tespit etmişlerdir. Kıvrık çubuk şekilli bakteriler, taze su sedimentinden izole edilmiş ve spiral şekilli izolat ile benzer olduğu görülmüştür. İki polar flagellalı hücreler, yeni bir tür olarak tayin edilmiştir. *Oxalobacter vibrioformis* olarak adlandırılmıştır. Ayrıca araştırmacılar gram pozitif, spor oluşturan, çubuk şekilli yeni bir bakteri izole etmişlerdir ve bu yeni türü de *Oxalophagus oxalicus* olarak adlandırmışlardır.

Termofilik habitatlarda da oksalatı kullanabilen anaerobik bakterilerin varlığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İki termofilik bakteri *Clostridium thermoaceticum* ve *C. thermoautotrophicum*'un oksalat içeren ortamda gelişebildiği görülmüştür. Son filogenetik çalışmalara göre bu türler 'Moorella' olarak tanımlanan genusa, *Moorella thermoacetica* ve *M. thermoautotrophica* olarak dahil edilmiştir. Bu iki zorunlu anaerobik bakteri, bugüne kadar izole edilen anaerobik bakterilerden farklı bazı özelliklere sahiptir. Diğer anaerobik bakteriler gelişebilmek için substrat olarak yalnızca oksalatı kullanırken, bu bakteriler oksalatla beraber diğer substratları da kullanabilirler.

Substrat olarak oksalata ihtiyaç duyan üç anaerobik bakteri tanımlanmıştır. Bunlar; *Oxalobacter formigenes* (Şahin, 2001), *Oxalobacter vibrioformis*, *Oxalophagus oxalicus*

bakterileridir. Bu türler aerobik oksalotrofik bakterilerden farklıdır. Çünkü son ürün olarak format üretilir. Bu bakteriler gelişmek için az miktarda asetata ihtiyaç duyar (Dehning and Schink, 1989; Collins et al. 1994).

2.5.2. Aerobik Bakteriler

Oksalat toprakta yaygın olarak bulunur ve bitki kök özsuğundan sağlanır. Topraktaki oksalat konsantrasyonu 10^{-3} ve 10^{-6} M arasındadır.

Oksalatı kullanabilen popülasyonlardan biri toprak bakterilerinden *Streptomyces* genusuna ait türlerdir. Bu grubunun topraktaki kalsiyum oksalatın dönüşümüyle ilgili yüksek aktivite gösterdiği düşünülmektedir.

Bassalik (1913), ilk kez literatürde tanımlanan, oksalatı kullanan *Methylobacterium* suşunu, yer solucanından izole etmiş ve *Bacillus extorquens* olarak isimlendirmiştir. Yine de bu organizmanın ve diğer pembe pigmentli fakültatif metilotrofların taksonomik pozisyonu kesin değildir.

Pembe pigmentli bakterilerin *Methylobacterium* genusunda bulunduğu önerilinceye kadar bu bakteriler farklı genoslara (*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Protomonas*) dahil edilmiştir. *Methylobacterium* ve ilgili suşları, oksalat gibi substratların yanında, metil ve metilamin gibi tek karbonlu bileşikler de kullanabilirler.

Starkeya novella, aerobik, fakültatif, kemolitotrof, metilotrof, gram negatif ve çubuk şekilli kükürt bakterisidir. Büyümesi için gerekli enerjiyi ya indirgenmiş kükürt bileşiklerinin (tiyosülfat veya sülfid) oksidasyonundan ya da format, metanol ve oksalatın oksidasyonundan elde eder.

Ralstonia eutropha oksalat gibi çeşitli organik bileşiklerde gelişebilen aerobik, gram negatif ve çubuk şekilli farklı bir gruptur. Bu mikroorganizma oksalatı gliserat metabolik yolu ile asimile eder.

Xanthobacter autotrophicus ve *Xanthobacter flavus* organik asitleri (oksalat gibi), kısa zincirli alkoller, aminoasitleri, bazı şekerleri kullanabilen iki türdür.

Ammoniiophilus oxaliticus ve *Ammoniiophilus oxalivorans* zorunlu oksalotrofik, halofil, alkali-tolerant bakterilerdir. Bu bakteriler *Rumex acetosa* bitkisinin köklerinden izole edilmiştir (Şahin 2001).

2.6. Oksalatın Biyolojik Tehlikeleri

Oksalat ve tuzları zehirlidir. Yüksek konsantrasyonları insanlarda ve hayvanlarda ölüme sebep olur. Düşük konsantrasyonları ise hyperoxaluria, pridoksin (B6 vitamini) eksikliği ve böbreklerde kalsiyum oksalat taşlarının oluşumuyla sonuçlanan rahatsızlıklara yol açar. Saf

oksalik asit için LD₅₀ değeri, 65 kg olan bir insan için 25 gr olarak saptanmıştır (Sidhu et al. 1997).

2.7. Oksalatın Kullanım Alanları

Oksalik asidin yüksek miktarlarda biyolojik üretimi, biyohidrometalurjik uygulamalar ile ilgilidir. Aerobik oksalotrofik bakteriler, atık sudan ve topraktan oksalatı uzaklaştırmak için kullanılırken, oksalik asit cevher ve minerallerden ağır metalleri uzaklaştırmak için kullanılabilir. Mürekkep, vernik, badana boyası gibi kimyasalların içeriğinde yer alır. Ayrıca oksalik asit diğer karboksilik asitlere göre kolay okside edildiği için çamaşırların beyazlatılmasında indirgeyici ajan olarak kullanılır (Çalışkan, 2000). Oksalik asidin çeşitli biyojeokimyasal döngülerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Braissant et al. 2002). Oksalik asit, akar türü olan, arı paraziti *Varroa destructor* ile kimyasal mücadelede kullanılmaktadır. Bu organik asit hidrofilik olduğu için balda kalıntı bırakmaz ve ayrıca balın yapısında da bulunmaktadır (Rademacher and Harz, 2006).

Oksalatı kullanabilen bakteri suşları, oksalat üreten fungal patojen enfeksiyonundan konak bitkiyi korumak için kullanılabilir. *Oxalobacter formigenes* insan ve hayvanların sindirim sisteminde bulunan en önemli fonksiyonel bakterilerden biridir. Yapılan çalışmalar bu bakterinin, böbrek taşları ve hyperoxaluria tedavisinde probiyotik olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Allison et al. 2001).

2.8. Bakterilerin Yaşamına Çevresel Stres Faktörlerinin Etkisi

Bakterilerin büyüme ortamlarında yeterli azot ve karbon kaynağı, sıcaklık, oksijen, uygun çözünen madde ve pH sağlanıyorsa maksimum büyüme gösterirler. Bu parametrelerdeki farklılıklar optimum büyümeyi etkileyebilir. Bakterilerin büyüme ortamları ve yakın çevresindeki bu tür parametrelerin değiştirilmesi sonucu bakteri büyüme oranı, bazı yapısal ya da metabolik ürün farklılıklarının gözlenmesi bakteriler için çevresel stres olarak ifade edilebilir. Bakterilerin değişen çevresel faktörlere yanıtı yaşamları için oldukça önemlidir. Aslında laboratuvar dışında maksimum büyümeye izin veren koşullar sürekli değişebileceğinden dolayı pek çok bakteri sürekli stres koşullarında yaşamaya uyum sağlamak zorundadır (Moat et al. 2002).

2.8.1. Osmotik Stres ve Osmolarite

Çözünen madde konsantrasyonu bakterilerin büyümesinde önemli rol oynar. Laboratuvar koşullarında pek çok bakteri düşük osmolariteye sahip kültür ortamında gelişebilir. Hipertonik koşullar, sitoplazmadan su kaybıyla sonuçlanırken, hipotonik şartlar ise sitoplazma içine su girişi ile sonuçlanır.

Bakteri membranı suyun geçişine kolaylıkla izin verir. Hücre içindeki su miktarı ile dışındaki su miktarı oldukça dengededir. Hücre duvarı ile bakteriler, hücre dışı ile ilgili yüksek sitoplazmik çözünen konsantrasyonunu koruyabilir. Bu durum hücre içinde daha düşük su aktivitesine dönüştürülür. Sitoplazmik membran tarafından hücre duvarı üzerinde gerçekleşen bu basınç turgor basıncı olarak adlandırılır (Moat et al, 2002). Bakteriyal hücreler büyümek ve bölünmek için itici bir güç olarak turgoru meydana getirmek zorundadırlar ve bu nedenle büyüme ortamından daha yüksek bir hücresel osmotik basınç sağlamaya gerek duyarlar (Csonka, 1989).

2.8.2. pH Stresi

Pek çok mikroorganizmanın maruz kaldığı önemli stres faktörlerinden biri de pH stresidir (Villarreal et al. 2000). Mikroorganizmalar hidrojen iyon konsantrasyonunun (pH) geniş aralıklarında gelişebilirler. Örneğin asidofilik bakteriler pH' nın 1 olduğu, asidik sülfür kaynaklarında gelişirken; alkalifilik bakteriler, soda gölü gibi pH' nın 11 olduğu şartlarda gelişim gösterir. Bununla birlikte yeryüzündeki pek çok bakteri nötral pH'ya yakın değerlerde yaşayabilirler ve nötrofilik olarak adlandırılırlar. Nötrofilik bakteriler pH 5 ve 9 arasında gelişme gösterirler. *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* nötrofilik bakterilerdir. Nötrofilik bakterilerin, gittikçe değişen pH değerlerinde adaptif geçişine izin verilirse, farklı pH'larda yaşayabilirler (Moat et al. 2002).

Bakteriler büyümeyi sağlayan yapısal ve fonksiyonel proteinlerin üretilmesi ve optimum aktivite göstermeleri için sitoplazmik pH' larını dengede tutmak zorundadırlar. Çoğu bakteri pH; 5.5- 9.0 aralığında büyüme gösterebilir ancak, sitoplazmik pH' ları 7.4-7.8 arasındadır. Bundan dolayı bu tür bakteriler buldukları ortamın durumuna göre sitoplazmalarını asitliğe ya da alkaliye kaydırabilirler.

Asidik metabolitleri, nötral metabolitlere veya nötral metabolitleri alkali ürünlere dönüştürebilen enzimler üreterek; asidik pH' ya yanıt veren mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu enzimlere en iyi örnek *E. coli'* de bulunan glutamat dekarboksilaz, lizin dekarboksilaz ve arjinin dekarboksilazdır. Bu enzimler hücre dışı asidik pH' da artan ifadeyi gösterirler. Gelişme süresince hücre içi pH' yı kontrol etmek için, gram negatif organizmalar K^+ / H^+ , Na^+ / H^+ antiporterlarında olduğu gibi, primer proton pompalarının değişimini içerir (Moat et al. 2002).

Salmonella typhimurium enterik bakterisi pH 5.5 ve 6' ya adapte olduğunda, bu bakterinin ekstrem düşük pH' da (pH 3 ve 4) yaşayabildiği gösterilmiştir (Foster, 1991). Hücrede meydana gelen genetik ve fizyolojik değişimlerde asit tolerans yanıtından (ATR) bahsedilir (Moat et al. 2002).

pH 5.5 ve 6' ya maruz kalma öncül şok olarak adlandırılır. ATR' nin tamamen indirgenmesi en az 50 yeni proteinin sentezlenmesiyle sonuçlanır. Bu proteinler asit şok

proteinleri olarak adlandırılır (Moat et al. 2002). Asit şoku süresince organizma üremeyi durdurur (Foster, 1991). *Listeria monocytogenes*' in kuvvetli asit (pH 3.5) stresinden sonra hücreleri koruyan ve pH 5.5' de büyütüldüğünde önemli bir adaptif asit tolerans yanıtı sergilediği gösterilmiştir (O' Driscoll et al. 1996).

Düşük pH' ya adaptasyon, gastrointestinal patojenler tarafından hastalık oluşumu için ön koşuldur. *E. coli* ile *Shigella*' nın kuvvetli asit direnci tıbbi bir durum ile ilgilidir. Çünkü bu durum, hastalıklara neden olan ve gastrik asit bariyerini aşmaya çalışan bu organizmalar tarafından ihtiyaç duyulan, enfeksiyon dozundaki farklılıkları açıklar. Bu farklılığın ilk nedeni *Salmonella .enterica* 'da bulunmayan glutamat dekarboksilaz üretimidir. Bu sistem γ - amino bütirik asidin ayrılmasıyla, daha fazla glutamat bağlayan spesifik antiportörleri içerir. Bu enzim için optimum p H 5'tir. Hücre içi pH' sı bu değere düşünceye kadar bu enzim rol oynamaz. pH 5'te, enzimin intrasellular protonları tükettiği ilk olarak düşünülmemesine rağmen bu sistemin pH 2' de hücreyi nasıl canlı tuttuğu açık değildir. Bu sistemi kullanan bir organizma da *Lactococcus lactis*' tir. *Lactococcus* glutamat dekarboksilaza ilaveten arjinin deaminaz (ADI) yolunu kullanır. ADI yolunu asit stresi boyunca ATP üretmek için kullanır.

Helicobacter pylori, ülsere ve mide kanserine yol açan bir bakteridir ve midede yaşayabilmek için kuvvetli asit direnç sistemini kullanır. Bu organizma üreyi kabondioksit ve amonyağa dönüştüren, nikel içeren bir metaloenzim olan üreaz üretir. Beklenenin aksine üreazın en etkin olduğu optimum pH 7.5' tur. pH 7.5' da hücrelerin neden gelişebildiğinin yanıtı, hücrelerin çok düşük üreaz aktivitesine sahip olmasıdır. *Yersinia enterocolitica* midede yaşayabilmek için üreazı kullanan diğer bir gram negatif patojendir (Moat et al. 2002).

2.8.3. Sıcaklık Stresi

Mikroorganizmalar, Farklı pH gibi farklı sıcaklık aralıklarında da gelişebilirler. Örneğin mikroorganizmalar, sıcaklığın 90 °C' ye ulaştığı sıcak su kaynaklarından (termofilik bakteriler) ve sıcaklığın 0°C' nin altında olduğu kutuplardan (psikrofil bakteriler) izole edilebilirler. *Pyrococcus furiosus* optimum 95°C'de (Weinberg et al. 2005), *Archaeoglobus fulgidus* ise 78°C'de (Rohlin et al. 2005) yaşarlar. Pek çok bakteri 20- 40 °C arasında büyümeyi tercih eder (Moat et al. 2002). Bu son grup *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* spp. gibi patojen bakterileri içerir. Termoregulasyon, patojenik bakterilerde virulans gen ekspresyonunda önemli rol oynar.

Organizmalar termal strese sıcaklık şok proteinleri (Hsps) olarak adlandırılan proteinlerin sentezini arttırarak yanıt verirler (Konkel et al. 1998). Sıcaklığın artması ile gelişen hücrelerde Hsps' nin pek çoğuna ihtiyaç duyulur. Bu uyarılan proteinler arasında DnaJ ve DnaK, RNA polimeraz σ^{70} altbirim (rpoD), GroEs, GroeL, Lon proteaz ve Lysu yer alır. *E. coli*' de

yaklaşık 50 Hsps tanımlanmıştır. Bu proteinler alternatif σ faktörleriyle ve iki bileşenli regülatör sistemler tarafından düzenlenen alt bölümlere ayrılabilir.

σ^H regülasyonu ile oluşturulan protein sitoplazmayı termal strese karşı korur. *E. coli* rpoH gen lokusu ile 32 kDa σ faktörünü şifreler. Promotor RNA polimerazın spesifitesini yeniden yönlendiren σ^H veya σ^{32} olarak adlandırılır. σ^H 34 Hsps'nin sentezlenmesini düzenler. Sıcaklık şokunun artması ile σ^H üretimi de artar. Bu prensip basit olmasına rağmen σ^H üretimini yöneten genetik mekanizmalar komplekstir. *E. coli*'de sıcaklığın 30 °C' den 40 °C' ye çıkması rpoH translasyonunun artması ile sonuçlanır. Cis-acting m-RNA bölgeleri rpoH mesajının 5' ucundaki ribozoma bağlı bölgeleri ayıran sıcaklığa duyarlı ikincil yapıları biçimlendirir. Yüksek sıcaklıklarda bu ikincil yapılar erir ve rpoH mesajının daha etkin translasyonunu sağlar. rpoH mesajının translasyonunun artmasına ilave olarak σ^H proteinin kendisi daha stabil olur. 30°C' de büyüme süresince σ^H proteini, FtsH, HslVU ve ClpAP'yi içeren birkaç proteaz tarafından parçalanabilir. Bununla birlikte, eğer σ^H RNA polimeraza bağlanırsa σ^H bu proteaz enziminden korunabilir. RNA polimerazdan σ^H yı ayıran hücreler düşük sıcaklıkta σ^H ile etkileşmek için DnaJ- DnaK –GrpE operon takımını kullanır. σ^H proteininin RNA polimeraza bağlanmaması, σ^H proteininin degradasyonunu ile sonuçlanır (Moat et al. 2002).

2.8.4. Besin Stresi

Açlık stresi de diğer çevresel faktörler gibi pek çok bakterinin yaşamı boyunca karşılaştığı faktörlerden biridir. Mikroorganizmalarda karbon kaynağı gibi önemli nutrientler kısıtlandığında, mikroorganizmalardaki 50 veya daha fazla proteinin ekspresyonu indirgenir. Hücrede açlık stres yanıtı (Starvation stres response, SSR) olarak adlandırılan genetik, fizyolojik bir programlama meydana gelir. SSR durumu, açlık durumunda bakterinin yaşamasına ve sıcaklık, pH ve osmolarite gibi diğer streslere karşı çapraz direnci sağlamaya izin verir.

Aç hücreler ile durgunluk fazı hücreleri arasındaki farkın iyi bilinmesi gerekir. Durgunluk fazı hücreleri, sınırsız besin ortamında büyümeyi durdururken, açlık stresinde ise hücreler, ortamda besin eksikliği olduğunda büyümeyi durdurur. Yani durgunluk fazı hücreleri tek bir stres faktörüne bile ihtiyaç duymazken, aç hücreler için büyümeyi sınırlandıran bir veya daha fazla stres faktörüne ihtiyaç vardır. Diğer bir anahtar farklılık da durgunluk fazı hücrelerinin, aç hücrelere göre, hücresel tepki ve hayatta kalma süresi üzerine önemli derece etkili olan daha fazla hücresel yoğunluğa sahip olmalarıdır.

Gram negatif bakteriler için aç hücreler, morfolojik ve fizyolojik olarak logaritmik faz hücrelerinden farklıdır. Sınırlı karbon kaynaklarına öncelikli yanıt, bu yanıtta adaptasyon ve ekspresyonun artmasıyla stresin önlenmesi şeklindedir. Açlık stresinin devam etmesi hücrenin direncinin ve metabolik aktivitenin azalması ile sonuçlanır. Bu durum cyclic 3'-5' adenosine monophosphate (cAMP) ve guanosine 3'-5' diphosphate (ppGpp) gibi iki hücresel nükleotidin

birikimiyle gerçekleşir. İlave olarak alternatif σ faktörleri σ^s ile σ^e , rpoS ve rpoE genleri tarafından şifrenilir. Bu regülatörler açlık stresinin kontrolünde yer alan genel faktörlerdir. Bununla birlikte, bu regülatörler bazı stres yanıt genlerinin regülasyonu için yeterli değildir. Bilinen regülatörler, spesifik genlerin regülasyonunda SSR için kompleks olma durumunun, ayırt edilmesinin saptanmasında görev alırlar. Fis (factor for inversion stimulation), FadR (Regulator of fatty acid metabolism), Lrp (Leucine-responsive protein), OxyR, SpvA/SpvR (regulators of the *Salmonella* plasmid virulence), PhoP (response regulator that controls virulence factors), IHF (integration host factor) gibi proteinler regülatör proteinlere örnektir.

SSR süresince meydana gelen bazı fizyolojik değişimler, hücrel RNA, proteinlerin ve yağ asitlerinin degradasyonunu, sitoplazmik membrandaki lipid komponentleri çeşidinin ve miktarlarının değişmesini, gram negatif bakterilerin dış membranındaki lipopolisakarit miktarındaki artışını ve hücreyi zarardan korumak için kromozomal DNA'nın yoğunlaşmasını içerir (Moat et al. 2002).

2.8.5. Antibiyotik Stresi

Çoğu bakteri türü antibiyotiklere karşı dirençlidir. Özellikle logaritmik büyüme fazının sonlarına doğru azalan karbon kaynağının da etkisiyle, NADH pirüvattan oluşturulur. Bu molekülden elde edilen enerji de elektron transportu esnasında kullanılır. NADH ve ATP üretimiyle beraber, bazı anti-faktör moleküllerinin ve proteaz enziminin üretimi hızlanır. Bu moleküller ise bakterinin çevresel stres faktörlerine karşı dirençliliğini artırır. Bazı bakterilerde ise çevresel şartlar değiştiğinde ATP üretimi azaltılır, koruyucu anti-faktör molekülleri ve enzimlerin üretimi hızlandırılır. Böyle bir durum *B. subtilis* ve *S. aureus*' da gözlenmiştir (Proctor and Humboldt 1998).

Mikroorganizmalar ilk kez karşılaştıkları antibiyotiklere karşı, kısa zamanda direnç genlerini oluştururlar. Bu genlerin oluşturulmasında o antibiyotiğin miktarı önemli olmaktadır. Bazı bakteriler ise antibiyotiğin yapısını bozan enzim üreterek onun etkisinden hücreyi korurlar. Ya da dış ortamdaki antimikrobiyal etkili maddenin hücre içine alınımını engellerler. Ancak mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı izlediği yol, daha çok direnç genlerinin buldukları ortamdaki plazmitlerden ya da yakın türlerden alınması şeklinde olmaktadır (Proctor and Humboldt 1998)

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Organizmalar

Bu çalışmada kullanılan organizmalar Muğla Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Bakteriler temin edildikten sonra aktiveleştirilmiş ve saf kültürler halinde çoğaltılarak +4 °C' de saklanmıştır. Çalışmamızda kullanılan 4 suş Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar

Strain	Koleksiyon No	Kaynak
<i>Cupriavidus oxaliticus</i> OX1	DSM 1105 ¹	Khambata and Bhat (1953)
<i>Oxalicibacterium flavum</i> TA17	NEU 98	Tamer et al. (2002)
<i>Xanthobacter sp.</i> NS14	NEU 1221	Şahin et al. (2002)
<i>Cupriavidus necator</i> NS02	NEU 1209	Şahin et al. (2002)

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri 1: Basal Mineral Ortam

NH ₄ Cl	1	Gram (g)
K ₂ HPO ₄	1	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1	g
NaCl	5	g
CaCl ₂	0.01	g
Ferric ammonium citrate	0.001	g
Distile su	1000	Mililitre (ml)
pH	7 ± 0,2	

Çalışmamızda yapılacak testler için kullanılacak diğer besiyerlerinin hazırlanmasında temel ortam olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Potasyum Oksalat Agar

Basal mineral ortam	1	Litre (L)
Potasyum oksalat	4	g
Bakteriyolojik Agar	17	g

Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda bakterilerin aktiveştirilmesi, büyütülmesi ve stok kültürlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Osmotik Stres Deneyinde Kullanılan Ortam

Basal mineral ortam	1	Litre (L)
Potasyum oksalat	4	g
NaCl	%1, %2, %2,5	

Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda bakterilerin belirtilen oranlardaki NaCl konsantrasyonlarında büyüme kabiliyetlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 4: pH Stresi Deneyinde Kullanılan Ortam

Basal mineral ortam	1	Litre (L)
Potasyum oksalat	4	g
pH	7 7.5 8 8.5	(pH 7 kontrol grubudur)

Ortam hazırlandıktan sonra 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sonra aseptik şartlar altında pH ayarlamasında, pH 8 ve 8.5 için 5 mM Tricine, 7.5 için 5 mM MOPS kullanılmıştır. HCl ve NaOH ile istenilen pH'ya ayarlama yapılarak organizmaların pH stres çalışmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 5: Antibiyotik Stresi Deneyinde Kullanılan Ortam

Test organizmaları ampicillin antibiyotiğine dirençli oldukları için bu antibiyotik seçilmiştir. Potasyum oksalat ilaveli basal mineral ortam (Besiyeri 2.) hazırlanarak 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sonrasında aseptik şartlar altında 100 ml besiyerine 10 µg, 20 µg ve 30 µg ampicillin ilave edilerek antibiyotik stres deneyinde kullanılmıştır.

Besiyeri 6: Besin Stresi Deneyinde Kullanılan Ortam

% 0.6, % 0.8 ve % 1 potasyum oksalat ($C_2H_2O_4 \cdot H_2O$) içeren besiyeri hazırlanarak 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Hazırlanan ortam bakterilerin besin stres deneylerinde kullanılmıştır. Bu çalışmada %0.4 potasyum oksalat içeren besiyeri kontrol olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 7: İz tuzlar solüsyonu

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.1	g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	g
Distile su	100	ml

İz tuzlar solüsyonu potasyum oksalat agarın 1 litresine 1 ml ilave edilerek bakteri büyümesini teşvik ve canlandırma için kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Fizyolojik Tuzlu Su

Distile suya %0.85 oranında NaCl ilavesiyle hazırlanarak, bakteri dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 9: Oksalat Nutrient Agar

Nutrient Agar	1	Litre (L)
Potasyum oksalat	4	g

Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Çalışmamızda stres denemelerinden sonra bakterilerin sayımlarında kullanılmıştır.

3.2. METOD

3.2.1. Kùltürlerin Aktivasyonu

Bakterilerin aktifleştirilmesi için potasyum oksalat ilave edilmiş, mineral ortam içeren besiyeri (Besiyeri 2.) kullanılmıştır. Potasyum oksalata ilave olarak kullanılan mineral ortam Schlegel'in basal mineral ortamıdır (Schlegel and Aragno, 1992). Ancak potasyum oksalat ilaveli bu ortamda gelişme gözlenmemiştir. Daha sonra gelişmeyi teşvik için 100 ml ortama 0.1 g yeast ekstrakt ve 0.1 ml iz tuzlar solüsyonu eklenmiştir.

Modifiye basal mineral ortam hazırlanarak deney tüplerine 7'şer ml aktarılmıştır. Tüpler 121°C' de 15 dk otoklavda sterilize edilmiş ve temin edilen test organizmalarından bu tüplere aşılama yapılarak 30 °C'de iki gün inkübasyona bırakılarak aktifleştirme işlemi tamamlanmıştır.

3.2.2. Kullanılan Organizmaların Saflık Kontrolü

3.2.1.' de anlatılan yöntemle elde edilen aktif kùltürlerden alınarak agar ilaveli modifiye ortama aktarılmış ve öze ile paralel çizgi çekme yöntemiyle ekimler yapılmıştır. 30 °C' de iki gün inkübasyondan sonra petride gelişen ve tek tek düşen bakteri kolonileri incelenerek herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. şüpheli durumlarda bu işlem tekrarlanmıştır.

3.2.3. Osmotik Stres Deneyi

%1, %2, %2,5 NaCl içeren potasyum oksalat ilaveli basal mineral ortam (Besiyeri 3.) hazırlanarak, 10'ar ml tüplere dağıtılmıştır. Sonrasında elde ettiğimiz aktif kùltürlerden de, bu ortamlara 1'er ml aktararak, tüpler 30 °C' de, çalkamalı inkübatörde 160 rpm hızda, iki gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir kùltürden 10⁻⁶ 'ya kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. 10⁻⁶ lık dilüsyondan 0,1 ml alınarak, % 0,4 potasyum oksalatlı nutrient agar (Besiyeri 9.) içeren petrilere aktararak yayma ekim yapılarak 30 °C' de iki gün inkübasyona bırakılmış ve sonrasında petrilere koloni sayımları gerekleştirilmifitir.

3.2.4. pH Stresi Deneyi

pH stresi deneyi için; 3.1.2.' de verilen besiyeri 4. hazırlanarak 10'ar ml tüplere aktarılmıştır. Sonrasında 3.2.3.' de anlatılan yöntemdeki adımlar aynen takip edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere koloni sayımları yapılmıştır.

3.2.5. Sıcaklık Stresi Deneyi

Potasyum oksalat ilaveli besiyeri (Besiyeri 2., agarsız)' nden tüplere 10'ar ml aktarılmış ve bu tüplere her bir organizmanın aktif kültürlerinden aşılantıdır. Test organizmaları 25°C, 30°C, 40°C ve 45 °C' de çalkamalı inkübatörde 160 rpm hızda, iki gün inkübasyona bırakılmış, inkübasyondan sonra her bir kültürlerden 10⁻⁶' ya kadar dilüsyonlar hazırlanarak 10⁻⁶'lık dilüsyondan 0,1 ml, % 0,4 potasyum oksalatlı nutrient agar içeren petrilere aktarılmıştır. Yayma plaka tekniği uygulandıktan sonra petrilere 30 °C'de iki gün inkübe edilmiş ve süre sonunda gelişen koloniler sayılmıştır.

3.2.6. Besin Stresi Deneyi

% 0,6, % 0,8 ve % 1 potasyum oksalat içeren besiyerinden tüplere 10'ar ml aktarılmış ve bu tüplere her bir organizmanın aktif kültürlerinden aşılantıdır. 30 °C'de, çalkamalı inkübatörde 160 rpm hızda, iki gün inkübasyona bırakılarak 10⁶'ya kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. 10⁻⁶' lık dilüsyondan 0,1 ml alınarak, % 0,4 potasyum oksalatlı nutrient agar içeren petrilere yayma ekim yapılarak 30 °C'de iki gün inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda petrilere koloni sayımları yapılmıştır.

3.2.7. Antibiyotik Stresi Deneyi

Farklı konsantrasyonlarda ampisilin antibiyotiği içeren potasyum oksalat ilaveli basal mineral ortam (Besiyeri 5.) hazırlanarak 10'ar ml tüplere aktarılmış ve 30 °C 'de, çalkamalı inkübatörde 160 rpm hızda, iki gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hazırlanan 10⁻⁶' lık dilüsyondan 0,1 ml, % 0,4 potasyum oksalatlı nutrient agar içeren petrilere ekilerek 30 °C'de iki gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrilere gelişen kolonilerin sayımları yapılmıştır.

4.BULGULAR

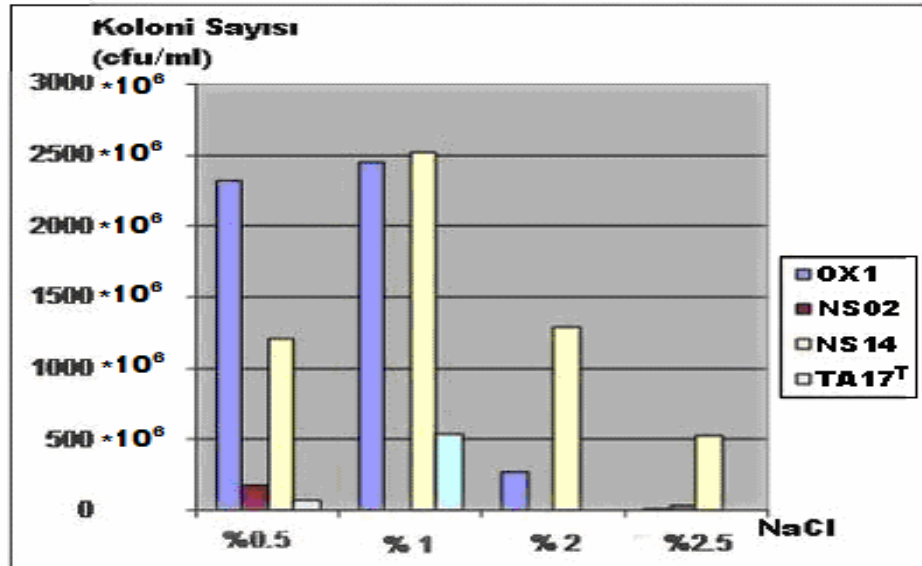
4.1. Osmotik Stres Altındaki Organizmalarda Büyüme

OX1 suşunun %1'lik NaCl bulunan ortamdaki koloni sayısı, kontrol grubuna (% 0,5 NaCl) göre artış göstermiştir. %2 ve %2,5 NaCl oranlarındaki koloni sayılarında ise azalma gözlenmiştir. NS02 ise %1 ve %2 NaCl oranlarında üreme göstermemesine rağmen, %2,5 NaCl oranında kontrole göre daha az üreme göstermiştir. NS14 suşunda %1 ve %2 NaCl oranlarındaki koloni sayısı kontrole göre yüksektir. %2,5 NaCl oranındaki koloni sayısı kontrole göre daha azdır. TA17^T suşunda ise %1 NaCl oranındaki koloni sayısı kontrole göre artmış olup, %2 ve %2,5 NaCl oranlarında üreme göstermemiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1.' ve Şekil 4.1.' de gösterilmiştir.(10⁶ seyreltme faktörü)

Çizelge 4.1. Osmotik Stres Etkisi

Strainler	NaCl (gr/L)			
	0.5 ^a	1	2	2.5
OX1	2320*10 ⁶	2450*10 ⁶	270*10 ⁶	11*10 ⁶
NS02	180*10 ⁶	-	-	40*10 ⁶
NS14	1210*10 ⁶	2520*10 ⁶	1290*10 ⁶	530*10 ⁶
TA17T	70*10 ⁶	540*10 ⁶	-	-

^a Koloni sayımları Koloni Oluşturan Birim (cfu)/ml olarak verilmiştir. "-" Negatif (Büyüme yok)



Şekil 4.1. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Test Bakterilerinde Büyüme Etki

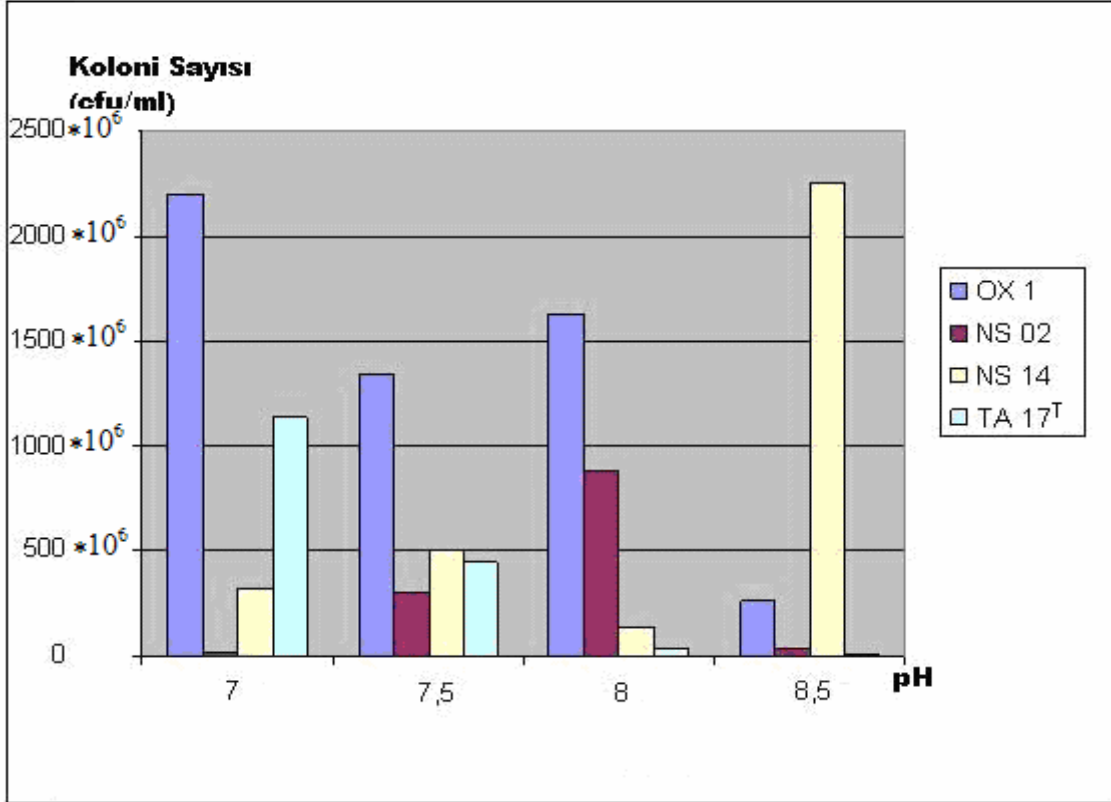
4.2. pH Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme

pH değeri arttıkça OX1 ve TA17^T suşlarının koloni sayısının azaldığı görülmüştür. NS 02 suşunda pH 7,5 ve 8 değerlerinde koloni sayısı artışı oldukça fazla iken pH 8,5 değerinde koloni sayısında azalma görülmüştür. NS 14'de pH 7,5 değerinde koloni sayısı artarken pH 8 değerinde azalmıştır. Ancak pH 8,5 değerinde koloni sayısında oldukça fazla artış olmuştur. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2. ile Şekil 4.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. pH Stresi Etkisi

Strainler	pH			
	7 ^a	7,5	8	8,5
OX 1	2200*10 ⁶	1350*10 ⁶	1630*10 ⁶	270*10 ⁶
NS 02	20*10 ⁶	300*10 ⁶	880*10 ⁶	40*10 ⁶
NS 14	320*10 ⁶	500*10 ⁶	140*10 ⁶	2250*10 ⁶
TA 17 ^T	1140*10 ⁶	450*10 ⁶	40*10 ⁶	10*10 ⁶

^a Koloni sayımları Koloni Oluşturan Birim (cfu)/ml olarak verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı pH Değerlerinin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi

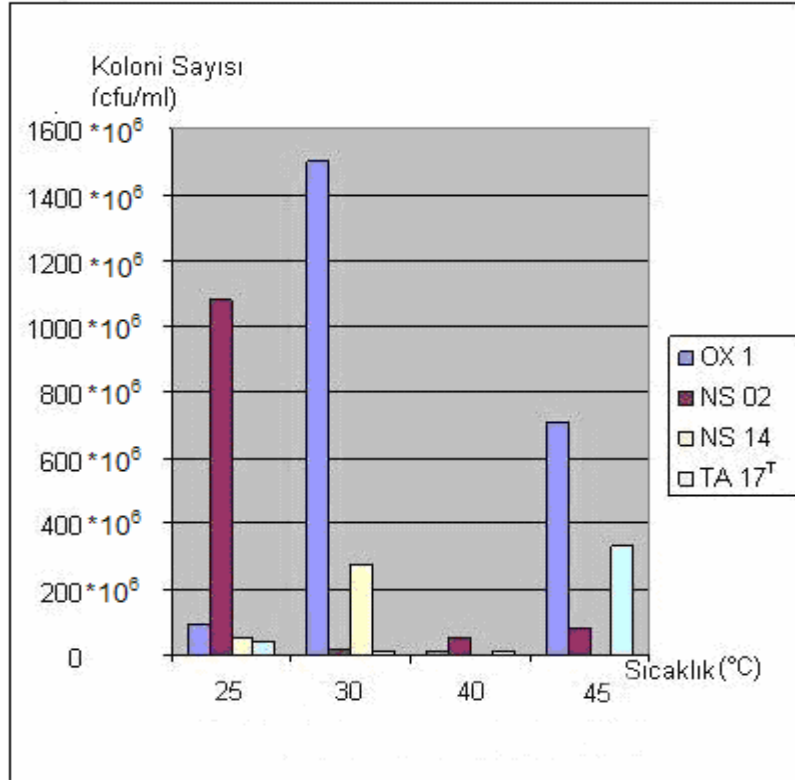
4.3. Sıcaklık Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme

Sıcaklık stresinde OX 1 suşu için 25°C' de koloni sayısı, kontrol olan 30°C ye göre oldukça azalmıştır (Şekil 4.3.). 40 °C' de ise koloni sayısının azaldığı görülmüştür. 45°C' de koloni sayısı tekrar artış göstermiştir. NS02'de 25 °C' de koloni sayısı, 30 °C 'ye göre oldukça artış göstermiştir. 40 °C' de ve 45°C' de koloni sayıları 30 °C' ye göre artış göstermiştir. NS 14 suşunda 25 °C' de 30 °C' ye göre koloni sayısı azalmıştır. 40 °C' de ve 45°C' de üreme gözlenmemiştir. TA17^T suşunda 25 °C' de koloni sayısı artış gösterirken, 30 °C ve 40 °C' deki koloni sayıları aynıdır. 45 °C' de ise TA17^T, diğer sıcaklık derecelerine göre oldukça fazla artış göstermiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Sıcaklık Stresi Etkisi

Strainler	Sıcaklık (°C)			
	25 ^a	30	40	45
OX 1	90*10 ⁶	1500*10 ⁶	10*10 ⁶	710*10 ⁶
NS 02	1080*10 ⁶	20*10 ⁶	50*10 ⁶	80*10 ⁶
NS 14	50*10 ⁶	270*10 ⁶	-	-
TA 17 ^T	40*10 ⁶	10*10 ⁶	10*10 ⁶	330*10 ⁶

^a Koloni sayıları Koloni Oluşturan Birim (cfu)/ml olarak verilmiştir. “-“ Negatif.



Şekil 4.3. Farklı Sıcaklık Değerlerinin Test Bakterilerinde Büyüme Etkisi.

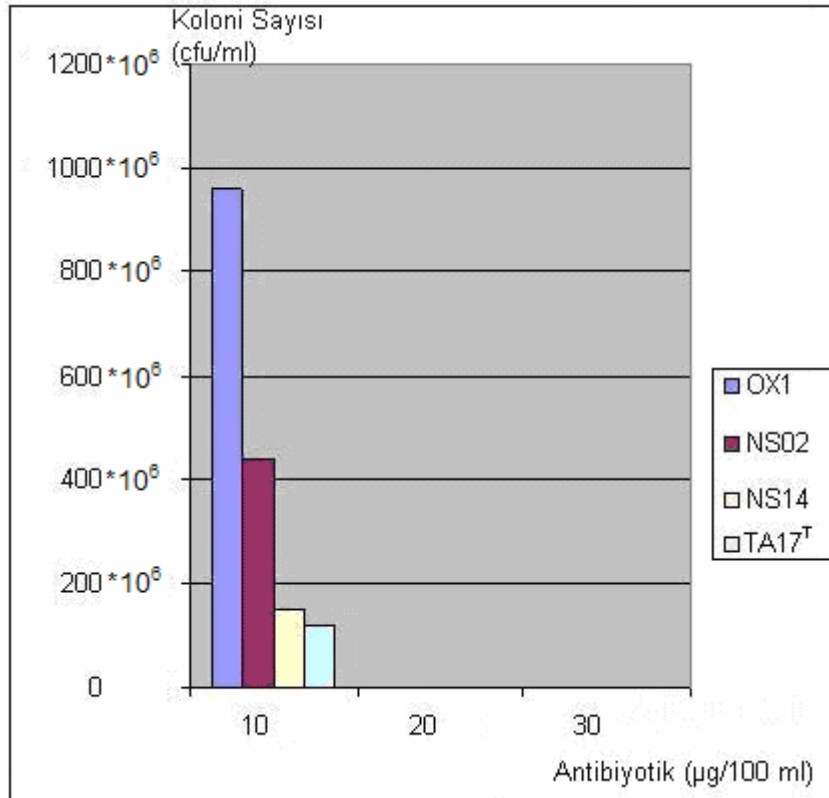
4.4. Antibiyotik Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme

Antibiyotik stresinde kontrol grubu 10 µg/100 ml antibiyotik içeren gruptur. Bütün şuşlar için kontrol grubunda üreme gözlemlenmiştir. 20 µg/100 ml ve üzerindeki ampisilin miktarında hiçbir organizma grubunda üreme gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.4.). Test sonuçları Şekil 4.4.'de şematize edilmiştir.

Çizelge 4.4. Antibiyotik Stresi Etkisi

Strainler	Antibiyotik (Ampisilin)		
	10 ^a	20	30
OX1	960*10 ⁶	-	-
NS02	440*10 ⁶	-	-
NS14	150*10 ⁶	-	-
TA17 ^T	120*10 ⁶	-	-

^a Koloni sayımları Koloni Oluşturan Birim (cfu)/ml olarak verilmiştir. “-“ Negatif. Dose; µg/100 ml



Şekil 4.4. Farklı Konsantrasyonlardaki Ampisilin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi

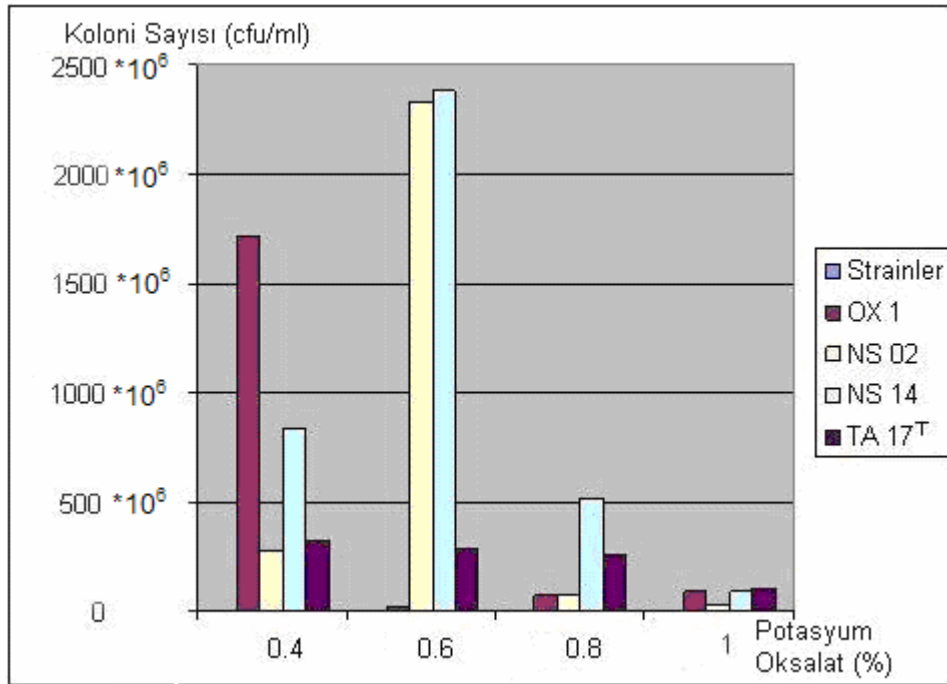
4.5. Besin Stresi Altındaki Organizmalarda Büyüme

Besin stresi deneyinde kontrol grubu, % 0,4 potasyum oksalat içeren büyüme ortamıdır. OX1 suşunda ortamdaki potasyum oksalat miktarı arttıkça koloni sayısında kontrole göre azalma olmuştur. % 0,8 ve %1' lik potasyum oksalatlı ortamdaki koloni sayısı, % 0,6' lığa göre yüksektir (Şekil 4.5.). NS02 suşu en iyi büyümeyi % 0,6' lık potasyum oksalatlı besiyerinde göstermiş olup; % 0,8 ve % 1 oranlarında kontrole göre koloni sayısında azalma olmuştur. NS 14 suşunda gözlenen durum, gözlenen değerler farklı olsa da NS02 ile aynıdır. TA 17^T suşunda ise potasyum oksalat miktarı arttıkça koloni sayısında azalma gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Besin Stresi Etkisi

Strainler	Potasyum Oksalat (gr/100 ml)			
	0,4 ^a	0,6	0,8	1
OX 1	1720*10 ⁶	20*10 ⁶	70*10 ⁶	90*10 ⁶
NS 02	280*10 ⁶	2330*10 ⁶	70*10 ⁶	30*10 ⁶
NS 14	840*10 ⁶	2380*10 ⁶	520*10 ⁶	90*10 ⁶
TA 17 ^T	330*10 ⁶	290*10 ⁶	260*10 ⁶	110*10 ⁶

^a Koloni sayımları Koloni Oluşturan Birim (cfu)/ml olarak verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı Konsantrasyonlardaki Potasyum Oksalatlı Besiyerinin Test Bakterilerinde Büyümeye Etkisi.

5.TARTIŞMA

Bakterilerin dış çevredeki osmotik değişimlere adapte olma yetenekleri önemlidir ve bunun için osmoadaptif mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalar aquaporin adı verilen su kanalları ile su akışının düzenlenmesi, sitoplazmada tuz konsantrasyonunun ayarlanması ve organik osmolitlerin sentezi veya taşınması olarak 3 kısma ayrılabilir. Osmotik adaptasyonun ilk cevabı K^+ konsantrasyonunun ayarlanmasıdır. İkinci cevabı ise osmotik koruyucu sentezi veya taşıma ile biriktirilmesidir. Bakteriyal osmoadaptasyon için 3 temel osmotik koruyucu tespit edilmiştir. Bunlar glisin betain, karnitin ve prolindir (Darcan, 2004).

Bazı bakteri türleri osmotik strese dayanıklı iken, bazıları da direnç gösteremezler. Çalışmamızda test organizmalarımızın farklı konsantrasyonlardaki NaCl değerlerinde canlılıkları incelenmiştir. Tüm test organizmalarımız için, NaCl konsantrasyonunun en fazla olduğu değerde (% 2,5), organizma sayılarının en az olduğu gözlenmiştir. *Vibrio cholerae* ile yapılan çalışmalarda da NaCl' nin yüksek olduğu değerde sayılarının azaldığı gözlenmiştir (Yıldız ve Schoonik, 1998). *Corynebacterium glutamicum* bakterisinin büyüme ortamına 1.5 M NaCl ilave edildiğinde yine sayısında azalma olmuştur (Farwick et al. 1995). *Rhizobium legüminosarum*' un ise gelişme ortamına 2.5 M NaCl eklendiğinde de azalma görülmüştür (Thorne and Williams, 1999). *Escherichia coli* için de ortamdaki NaCl miktarı arttıkça da sayısının azaldığı gözlenmiştir (Jenkins et. al. 1990) *Lactococcus lactis* (Molenaar et al. 1993) ve *Thermotaga neapolitana* (Martins et al. 1996) bakterileri için de aynı durumdan bahsedilmiştir.

Yukarıdaki durumların aksine *Listeria monocytogenes* osmotik strese dirençli bir patojendir (Rinkel et al.1994). *Lactobacillus plantarum*'un %8 NaCl içeren ortamda, sayısının arttığı gözlenmiştir (Russel et al. 1995). *Methanobacterium thermoautotrophicum* için NaCl miktarı 0,01 M' dan 0.65 M' a çıkarıldığında, organizma sayısının arttığı görülmüştür (Ciulla et al.1994). *Listeria monocytogenes* (Vasseur et al. 1999), *Bacillus subtilis* (Boch et al. 1996) organizmalarının osmotik stres adaptasyon mekanizmaları çalışılmış olup her iki bakterininde yüksek tuz oranlarında büyüyebildikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada farklı pH'nın oksalat bakterilerinin üremelerine etkisinin araştırılması için; tamponlar kullanılarak pH ayarlaması yapıldı. Farklı pH'da üreme gösteren organizmaların üremesine bakıldığında pH 8.5' da, NS02 ve NS14 suşlarının üremeleri kontrole göre artmıştır *Salmonella typhimurium*'un pH 7.7'de üremesi, pH 3.3'e göre oldukça yüksektir (Wilson and Foster, 1998). *Bacillus subtilis*'in pH 5.2'de üremesinin pH 4.3'e göre arttığı belirlenmiştir (Völker et al. 1999). *Listeria monocytogenes* için de durum aynıdır, pH 6'da, pH 4'e göre artış göstermiştir (Koutsoumanis and Sotos 2004). Ox1 ve TA17T suşlarının ise pH 8.5' da büyümelerinde azalma görülmüştür. Yabani tip *Escherichia coli*' nin pH 9'da, pH 7'ye göre büyümesi azalmıştır (Farrell and Finkel, 2003).

Potasyum oksalat ilave edilmiş besiyerinde gerçekleştirilen sıcaklık stresi deneyine bakıldığında test organizmaları için farklı değerler elde edilmiştir. OX1 suşunun kontrole göre 25°C, 40°C ve 45°C' de üremesi, kontrol grubuna göre azalmıştır. Ancak 25°C ve 45°C'de 40°C' ye göre daha iyi bir üreme gözlemlenmiştir. NS14 suşu içinse 25°C'de üremesi azalmış. 40°C ve 45°C' de üreme gözlemlenmemiştir. *Lactobacillus helveticus*'un ortam sıcaklığı 37 °C' den 52°C' ye çıkarıldığında büyümenin azaldığı gözlemlenmiştir (Smedset et al. 1998). *Myxococcus xanthus*'un optimum büyüme sıcaklığı 30°C'dir. Sıcaklık 40°C ve 42 °C' ye çıkarıldığında büyüme azalmıştır (Otani et al. 2005). *Salmonella typhimurium* için de sıcaklık 45°C'den 50°C'ye çıktığında üreme düşüş göstermiştir (Tosun and Gönül, 2003).

TA 17^T suşunda 45°C' de ve 25°C' de kontrole göre hücre sayısında artış olmuştur. Bu suş için en iyi üremenin 45°C' de olduğu gözlemlenmiştir. NS02 suşunun kontrole göre 25°C, 40°C ve 45°C' de üremesi artmıştır. Özellikle 25°C' de oldukça fazla artış göstermiştir. *Bacillus cereus* ile yapılan çalışmada da optimum üreme sıcaklığı 37 °C olmasına rağmen 49 °C' de iyi bir büyüme gösterdiği belirlenmiştir (Browne and Dowds, 2001). *Sphingomonas* hücrelerinin de 25°C' ye göre 56 °C' de sayılarının arttığı gösterilmiştir (Eguchi et al. 1996).

Farklı konsantrasyonda potasyum oksalat içeren ortam deneylerinde NS02 ve NS14 kontrole göre iyi gelişme göstermiştir. Bu iki suş için potasyum oksalat oranı azaldığında açlık stresi yanıtından söz edilebilir. Çünkü açlık stresine maruz kalan hücrelerin direncinin ve metabolik aktivitelerinin düştüğü gözlemlenmiştir (20). OX1 ve TA17^Tsuşlarının büyümeleri ise kontrol olan % 0.4' e göre azalmıştır. Potasyum oksalat zehirli bir bileşik olduğu için bitkiler ve hayvanlarda olduğu gibi bu iki organizma için de toksik olabilir. Bu konsantrasyonlardaki büyüme azalması öngörülerek bu iki suş için potasyum oksalatın letal değeri bulunabilir.

Test organizmaları ampisilin 10 µg/100 ml miktarında direnç gösterdikleri için bu değer kontrol kabul edilmiştir. Ancak ampisilin 20 µg/100 ml ve 30 µg/100 ml olduğunda suşların hiçbirinde üreme gözlemlenmemiştir. Dört suşda 10 µg/100 ml miktarında yanıt olarak direnç genleri oluştururken, ampisilin miktarı arttığında ise toksik etki yaratmıştır.

Yapılan çalışmada çevresel stres faktörlerinin kullanılan oksalat bakterilerinin kültüre edilebilirliği ve büyümeleri üzerilerine etkilerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, bu stres faktörlerinin etkisiyle bakterilerin morfolojileri ile ürettiği protein (enzim) lerin de tespit edilmesi gerekmektedir. Bu yolla aerobik oksalat bakterilerinden atık su arıtımı, çevre zenginleştirilmesi, kağıt sanayi, biyolojik kontrol çalışmaları, çevrede kalıcı maddelerin degradasyonu, tıpta özellikle böbrek taşlarının tedavisi gibi biyoteknolojinin farklı alanlarında kullanılabileceğini; elde edilen sonuçların ise diğer osmotik adaptif çalışmalarına katkıda bulunacağı inancındayız.

5. KAYNAKLAR

1. Allison, M., Sidhu, H., Chow, J., Clark, A., Peck, A., 2001. Rapid Reversal of Hyperoxaluria in Rat Model After Probiotic Administration of *Oxalobacter formigenes*, J Urol., 166:1487-1491
2. Basalik, K., 1913. Über die verarbeitung der oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n. sp., Jahrb. Wiss. Bot. 53:255-302
3. Boch, J., Kempf, B., Schmid, R. and Bremer, E., 1996. Synthesis of the Osmoprotectant glycine Betaine in *Bacillus subtilis* Characterization of the gbsAB genes. J. Bacteriol., 178:5121-5129.
4. Braissant, O., Verrecchia P.E. and Aragno, M., 2002. Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated?, Naturwissenschaften, 89:366-370.
5. Browne, N. and Dowds, B.C.A., 2001. Heat and Salt Stress in the Food Pathogen *Bacillus cereus*. J. Appl. Bacteriol., 91:1085-1084.
6. Ciulla, R., Clougherty, C., Belay, N., Krishnan, S., Zhou, C., Byrd, D. and Roberts, M.F., 1994. Halotolerance of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H and Marburg. J. Bacteriol., 176: 3177-3187.
7. Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hipe H. and Farrow, J.A.E., 1994. The Phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five genera and eleven species combinations, Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 812-826.
8. Cornick, N. and Allison, M.J., 1996a. Anabolic incorporation of oxalate by *Oxalobacter formigenes*. Appl. Environ. Microbiol., 62:3011-3013.
9. Cornick, N. and Allison, M.J., 1996b. Assimilation of oxalate, acetate and CO₂ by *Oxalobacter formigenes*. Can. J. Microbiol., 42:1081-1086.
10. Csonka, L.N., 1989. Physiological and Genetic Response of Bacteria to Osmotic Stress. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 53:121-147.

11. Çalışkan, M., 2000. The metabolism of oxalic acid. Turk J. Zool. 24:103-106.
12. Darcan, C., 2004. Karadeniz Suyunda pH, Osmolarite ve Açlık Stresinin *Escherichia coli*' nin Dış membran Porin Sentez Düzeyine Etkisinin Araştırılması. On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Samsun.
13. Dehning, I. and Schink, B., 1989. Two new species of anaerobic oxalate-fermenting bacteria *Oxalobacter vibrioformis* sp. nov. and *Clostridium oxalicum* sp. nov., from sediment samples. Arch. Microbiol., 153:79-84.
14. Dinsdale, R.M., Freda, M., Hawkes, R. and Dennis L. 2000. Anaerobic Digestion Of Short Chain Organic Acids In An Expanded Granular Sludge Bed Reactor. Wat. Res. Vol. 34, No. 9, pp. 2433-2438.
15. Duncan, S.H., Richardson, J., Kaul, P., Holmes, R.P., Allison, J.M. and Stewart C.S., 2002. *Oxalobacter formigenes* and Its Potential Role in Human Health, Appl. Environ. Microbiol., 68:3841-3847
16. Eguchi, M., Nishikawa, T., Macdonald, K., Cavicchioli, R., Gottschal, J.C. and Kjelleberg, S., 1996. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. Appl. Environ. Microbiol.,62: 1287-1294.
17. Farrell, M.J. and Finkel, S.E., 2003. The Growth Advantage in Stationary Phase rpoS Mutations Is Dependent on the pH and Nutrient Environment, J. Bacteriol.,185:7044-7052
18. Farwick, M., Siewe, R.M. and Kramer, R., 1995. Glycine Betaine Uptake After Hyperosmotic Shift *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol.,177: 4690-4695.
19. Foster, J.V., 1991. *Salmonella* Acid Shock Proteins Are Required for The Adaptive Acid Tolerance Response, J. Bacteriol.,173: 6896-6902
20. Jenkins, D.E., Chaisson S.A. and Matin A., 1990. Starvation Induced Cross Protection Against Osmotic Challenge in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 172:2279-2781.

21. Khambata, S.R., Bhat, J.V., 1953. Studies on a New Oxalate-decomposing Bacterium, *Pseudomonas oxalitica*, J. Bacteriol., 66:505-507
22. Koga, T., Katagiri, T. and Takumi, K. 2002. Alkaline adaptation induces cross-protection against some environmental stresses and morphological change in *Vibrio parahaemolyticus* Microbiol. Res., 157:249-255.
23. Konkell, M.F., Bong, J.K., Klena, J.D., Young, C.R. and Züprin, R., 1998. Characterization of the Thermal stress Response of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun., 66: 3666-3672.
24. Koutsoumanis, K.P. and Sotos, J.N., 2004. Comparative Acid Stress Response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O: 157: H7 and *Salmonella thyphimurium* After Habituation at Different pH Conditions. 38: 321-326.
25. Martins, L.O., Carreto, L.S., Costa, M.S., Santos, H., 1996. New Compatible Solutes Related to Di-myo-Inositol Phosphate in Members of the Order *Thermotogales*. J. Bacteriol., 178:5644-5651.
26. Moat, A.G., Foster, J.W. and Spector, M.P., 2002. Microbial Physiology, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Fourth edition, New York, 582-601.
27. Molenaar, D., Hagting, A., Alkema, H., Driessen, A.J., Konings W.N., 1993. Characteristic and Osmoregulatory Roles of Uptake Systems for Proline and Glycine Betaine in *Lactococcus lactis*, J. Bacteriol., 175: 5438- 5444.
28. Nagarajkumara, M., Jayaraj, J., Muthukrishnan, S., Bhaskarana, R. and Velazhahana, R. 2005. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. Microbiol. Res., 160:291-298
29. O' Driscoll, B., Gahan, C.G. and Hill, C., 1996. Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an Acid Tolerant Mutant which Demonstrate Increased Virulence, Appl. Environ. Microbiol., 62:1693-1698.
30. Otani, M., Ueki, T., Kozuka, S., Segawa, M., Sano, K. and Inouye, S., 2005. Characterization of a Small Heat Shock Protein Mxp Hsp 16.6, of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol., 187: 5236-524

31. Panoff, J.M., Thammavongs, B., Gueguen, M. and Boutibonnes, P. 1998. Cold Stress Responses in Mesophilic Bacteria. *Cryobiology*, 36:75–83.
32. Rademacher, E. and Harz, M., 2006. Oxalic acid for the Control of Varroosis in Honey Bee Colonies. *Apidologie*, 37: 98-120.
33. Rinkel, K.O., Smith, L.T. and Smith, G.M., 1994. Glycine Betaine Confers Enhanced Osmotolerance and Crytolerance on *Listeria monocytogenes*, *J. Bacteriol.*,176:426-431.
34. Rohlin, L., Trent, J.D., Salmon, K., Kim, U., Gunsalus, R.P. and Liao, J.C., 2005. Heat Shock Response of *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Bacteriol.*, 187: 6046-6057.
35. Proctor, A.R. and Humboldt, A. 1998. Bacterial energetics and antimicrobial resistance *Harcourt Brace & Co. Ltd. Drug Resistance Updates*, 22: 7-235.
36. Russel, N.J., Evans, R.I., Terstees, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. and Abee, A., 1995. Membranes as Target for Stress Adaptation, *Int. J. Food Microbiol.*, 28: 255-261.
37. Schlegel, H.G., Aragno, M.,1992. The Mesophilic Hydrogen-Oxidizing (Knallgas) Bacteria In: *The Prokaryotes. A Handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications.*2nd edition.(Eds.) Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Scheleifer, K-H. Pp 344-384. Springer-Verlag. Berlin,Heidelberg, New York. ISBN 3-540-97258-7.
38. Sidhu, H., Allison, M. and Peck, A.B., 1997. Identification and Classification *Oxalobacter formigenes* Strains by Using Oligonucleotide Probes and Primers, *Clinical Microbiol.*,35: 350-353.
39. Smeds, A., Varmenan, P. and Palva A., 1998. Molecular Characterization of a Stress-Inducible Gene from *Lactobacillus helveticus*. *J. Bacteriol.*, 180: 6148-6153.
40. Smith, R.L., Strohmaier, F.E., Oremland, R.S., 1985. Isolation of anaerobic oxalate degrading bacteria from freshwater lake sediments, *Arch. Microbiol.* 141: 8-13

41. Şahin, N., 2001. Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of Some New Oxalotrophic Bacteria. Dokuz Eylül Üniversitesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi Doktora Tezi, İzmir
42. Sahin, N., Gokler, I, Tamer, A. U., 2002, Isolation, Characterization and Numerical Taxonomy of Novel Oxalate-Oxidizing bacteria. J Microbiol 40:109-118.
43. Şahin, N, 2003, Oxalotrophic Bacteria, Res. Microbiol. 54: 399- 407
44. Tamer, A.U., Aragno, M., Sahin, N., 2002. Isolation and Characterization of a New Type of Aerobic, Oxalic Acid Utilizing Bacteria, and Proposal of Oxalicibacterium flavum gen. nov., sp nov. Syst Appl Microbiol 25: 513-519.
45. Tanner, A. and Bornemann, S., 2000. *Bacillus subtilis* YvrK is an Acid- Induced Oxalate Decarboxylase. J. Bacteriol., 182: 5271-5273.
46. Thorne H. S. and Williams H. D., 1999. Cell Density-Density Dependent Starvation Survival of *Rhizobium leguminosorum* bv *phaseoli*: Identification of the Role of an N-Acyl Homoserine Lactone in Adaptation to Stationary- Phase Survival. J. Bacteriol., 181: 981-990.
47. Tosun, H. and Gönül, Ş., 2003. Acid Adaptation Protects *Salmonella typhimurium* from Environmental Stresses, Turk J. Biol., 27: 31-36.
48. Vasseur, C., Baverel, L., Hebraud, M. and Labadie C., 1999. Effect of Osmotic, Alkaline, Acid or Thermal Stresses on the Growth and Inhibition of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol., 86: 469-476.
49. Villareal, L., Heredia, L. N. and Garcia, S., 2000. Changes in Protein Synthesis and Acid Tolerance in *Clostridium perfringens* type A in Response Acid Shock, Int. Microbiol. 3:113- 116.
50. Völker, U., Maul, B., Hecker, M., 1999. Expression of the σ^B - Dependent General Stress Regulon Confers Multiple Stress Resistance in *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., 181:3942-3948
51. Weinberg, M.V., Schut, G.C., Brehm, S., Datta, S. and Adams, W.M., 2005. Cold Shock of a Hyperthermophilic Archeon: *Pyrococcus furiosus* Exhibits Multiple Responses to a Suboptimal Growth Temperature with a Key Role for Membrane-Bound Glycoprotein. J. Bacteriol., 22: 336-348.

52. Wilson, L. and Foster, W.J., 1998, A low pH- Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella thyphimurium* against Inorganic Acid Stress. J. Bacteriol., 180: 2409-2417
53. Yildiz, H.Y. and Schoonik, G.K., 1998. Role of rpoS in Stress Survival and Virulence of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol., 180: 773-784.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Gülşen SARACALOĞLU
Doğum Tarihi	18.10.1982
Doğum Yeri	Kula/Manisa
Mezun Olduğu İlkokul	Kenan Evren İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Ortaokul	Kenan Evren İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Lise	Kula Lisesi
Okuduğu Fakülte	Celal Bayar Üni. Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü
Fakülte Bitirme Tarihi	2004
Aldığı Ünvan	Biyolog
Yüksek Lisans	CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı
Bitirme Tarihi	Ocak 2008
Yabancı Dil	İngilizce
Yazışma Adresi	Dört Eylül Mah. 234. Sokak No:7 Kula /Manisa
Telefon	0 236 816 35 43
e-mail	gulsen.saracal@hotmail.com
