

Bazı Stres Faktörlerinin Aerobik Oksalat Bakterinin Kültüre Edilebilirliği ve Canlılığı Üzerine Etkileri

Mustafa Oskay^{1*}, Abdurrahman Üsame Tamer¹, Gülşen Saracaloğlu²

¹ Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye Kampüsü, 45030 Manisa, TÜRKİYE.

Tel: 0236 201 3265, Faks: 0236 201 3040, e-mail: mustafa.oskay@cbu.edu.tr

² Kula Belediyesi, 4 Eylül Mah., Yunus Emre Cad., No: 96 Kula, Manisa, TÜRKİYE.

*İletişimden sorumlu yazar / Corresponding author

Geliş / Received: 13 Mart (March) 2016

Kabul / Accepted: 15 Mayıs (May) 2016

DOI: 10.18466/cbayarfb.280668

Özet

Çevresel faktörlerden sıcaklık, pH, besin, osmolarite ve antibiyotik stresinin Gram-negatif, çubuk şekilli aerobik oksalat bakterileri; *Cupriavidus oxaliticus* Ox1, *Oxalicibacterium flavum* TA17^T, *Xanthobacter* sp. NS14 ve *Cupriavidus necator* NS02' nin kültüre edilebilirliği ve canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Hemen hemen 4 oksalat bakterisinin 30 °C koloni sayımları çok yüksek olmasına rağmen 40 ve 45 °C' de, en iyi büyüme gösterebilen suş TA17^T dir. pH değeri arttıkça bütün bakteri suşlarının koloni sayısının dereceli olarak kontrole göre (pH:7) azaldığı görülmüştür. pH 8' de en fazla koloni sayısı Ox1 suşunda gözlemlenmiştir. Besin stresi denemelerinde en iyi bakteriyal büyüme NS02 ve NS14 suşları için %0.6 potasyum oksalat (PO) ilaveli ortamda tespit edilmiştir. 4 organizmanın farklı konsantrasyonlardaki tuza (NaCl) karşı toleransları değişmekle beraber; NS14 suşunun %2 NaCl oranındaki ortamda koloni sayısı kontrole göre yüksektir. Organizmaların ampisilin antibiyotiğinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdikleri cevap benzer olup; 2 µg/mL ve üzerindeki miktarlarında hiçbir suş üreme gösterememiştir. İndikatör olarak 2,3-5 trifenil tetrazolium klorit (TTC) kullanılarak yapılan canlılık belirleme testleri sonuçları ile koloni sayım sonuçları arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Kullanılan oksalat bakterilerin uygulanan çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri cevaplar farklılık göstermektedir. Çalışmada, özellikle yüksek pH ve sıcaklıkta büyüme gösterebilen oksalat bakterilerinin endüstriyel alanlarda kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler — Aerobik oksalat bakterileri, çevresel stres faktörleri, kalsiyum oksalat, degradasyon, patojenite. koloni oluşturan birim.

Effects of Some Stress Factors on Culturability and Viability of Aerobic Oxalate Bacteria

Abstract

The effects of environmental factors such as temperature, pH, nutrition, osmolarity and antibiotic stress for the determination of culturability and viability on gram negative rod shaped aerobic oxalate bacteria; *Cupriavidus oxaliticus* Ox1, *Oxalicibacterium flavum* TA17^T, *Xanthobacter* sp. NS14 and *Cupriavidus necator* NS02 was studied. Colony counts at 30 °C for almost 4 oxalate bacteria were very high whereas optimum growth at 40 and 45 °C was seen for strain TA17^T. Increasing the pH values were decreased the colony counts of all strains gradually, comparison with control (pH:7). The most colony count at pH 8 was observed with the strain Ox1. The nutrition stress experiments showed that the most bacterial growth was determined in the medium supplemented with 0.6% potassium oxalate (PO) for the strains NS02 and NS14. Tolerances of 4 organism at different concentrations of salt (NaCl) comparison with control were variable but colony counts of the strain NS14 was high at the 2% NaCl. Organisms reacts almost the same as the reaction against different ampicillin concentrations but at the 2 µg/mL and above no growth was observed for any strain. Comparison the colony count with viability test results that determined with the indicator 2,3-5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC); any correlations were not found. The used oxalate bacteria differentiate the reactions to applied environmental factors. It is foresighted that the oxalate bacteria capable growth especially at

high pH and temperature can be used in industrial areas.

Keywords — Aerobic oxalate bacteria, environmental stress factors, calcium oxalate, degradation, pathogenite, colony forming unit

1 Giriş

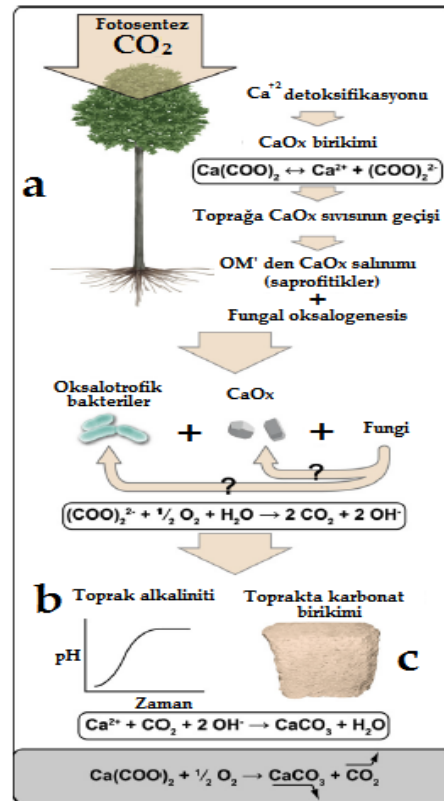
Mikroorganizmalar, doğal ortamlarda yaşamlarını devam ettirebilmek için, çevresel şartlara karşı koyacak yaşam stratejileri geliştirmek zorundadırlar. Spor, kist gibi dayanıklı formlar oluşturarak farklılaşma özelliği gösterebilen bakteriler, ekstrem şartları kolayca atlatırken, bu tür farklılaşma özelliği olmayan bakterilerde bu durum oldukça zordur. Bakterilerin yaşamını etkileyen stres faktörleri genellikle; pH, osmolarite, sıcaklık, besin, antibiyotik, ışık gibi çevresel koşullar olarak bilinmektedir [1].

Bakterilerin büyüme ortamlarında yeterli azot ve karbon kaynağı, sıcaklık, oksijen, uygun çözünen madde ve pH sağlanıyorsa maksimum büyüme gösterirler. Bu parametrelerin değiştirilmesi sonucu optimum büyüme etkilenebileceği gibi büyüme oranı, bazı yapısal ya da metabolik ürün farklılıklarının gözlenmesi ortaya çıkabilir ve bu durum çevresel stres olarak ifade edilmektedir. 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 [2].

Oksalat toprakta yaygın olarak bulunur ve bitki kök özsuğundan sağlanır. Organik materyalden ve fungal oksalogenesis yoluyla salınan kalsiyum oksalat (CaOx) funguslar ve oksalotrofik bakteriler tarafından metabolize edilebilir (Şekil 1). Topraktaki oksalat konsantrasyonu 10^{-3} ve 10^{-6} M arasındadır. Bassalik [3], ilk kez literatürde tanımlanan, oksalatı kullanan *Methylobacterium* sp. suşunu, yer solucanından izole etmiş ve *Bacillus extorquens* olarak isimlendirmiştir. *Ralstonia eutropha*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthobacter flavus*, *Ammoniiophilus oxaliticus* ve *Ammoniiophilus oxalivorans* zorunlu oksalat bakterileridir [4].

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.

Aluminyum ve demirin etkileşimiyle, topraktaki mevcut P, K, Mg ve Ca'un artmasıyla, oksalat bitki beslenmesinde büyük rol oynar [5]. Bakterilerin oksalatı diğer canlıların bağırsak sistemi ve sedimentlerde anaerobik olarak formata dönüştürdüğü uzun zamandan beri bilinmektedir. Oksalik asit ozon ile kâğıt beyazlatılması işlemlerinde de oluşabilmektedir. Ayrıca cam eşya yapımı esnasında kumdan demir ayrıştırılması sırasında da oluşmaktadır [6].



Şekil 1. Oksalat-karbonat yolundaki mikroorganizmalar ve kimyasal reaksiyonların şematik gösterimi (Kaynak 7 ve 8' den modifiye).

Oksalat üreticileri fungusların çevrimdeki katkıları ve bakterilerle ilişkisi tam olarak bilinmediği için (?) işareti ile belirtilmiştir. CaOx = Kalsiyum oksalat, OM = organik materyal. a = bitki ve funguslarda CaOx oluşumu, ok işaretleri ile gösterilen bakteriler tarafından CaOx oksidasyonu ve fungusların katkısı bilinmemektedir; b = CaOx' ın zamanla

toprak pH' sını yükseltmesi; c = oksalat-karbonat yolizinin son ürünleri.

Patojenik fungusların miseliyal büyüme esnasında oksalik asit ürettikleri bilinmektedir. Bu olayda oksalik asit kalsiyum iyonlarıyla birleşerek CaOx 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 oluşturamadığı 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 [9]. 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 CaOx taşlarının oluşumuyla sonuçlanan rahatsızlıklara yol açar. Saf oksalik asit için LD₅₀ değeri, 65 kg olan bir insan için 25 gr olarak saptanmıştır [10]. 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 [11].

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 [5, 12, 13]. Mikroorganizmaların çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri tepki ve uyum esnasında ürettikleri enzimler endüstriyel öneme sahiptir.

Bu çalışmada çevresel faktörlerinden pH, osmolarite, sıcaklık, besin ve antibiyotik stresinin bazı aerobik oksalat bakterilerinin kültüre edilebilirliği ve canlılığı üzerinde etkisini belirlemek, bu bakterileri ulusal kültür koleksiyonuna kazandırmak ve ayrıca bu konuda yapılacak çalışmalara ön kaynak oluşturmak amaç edinilmiştir.

2 Materyal ve Metot

2.1 Bakteri Suşları ve Kültür Şartları

Çalışmada kullanılan organizmalar Muğla Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Bakteriler temin edildikten sonra aktifleştirilmiş ve saf kültürler halinde çoğaltılarak +4 °C' de saklanmıştır (Çizelge 1). Bakterilerin aktifleştirilmesi, büyütülmesi ve stok kültürlerinin oluşturulmasında Potasyum Oksalat Agar [Basal Mineral Ortam: (NH₄Cl 1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄.7H₂O 1 g, NaCl 1 g, CaCl₂ 0.01 g, Ferrik amonyum sitrat 0.001 g, distile su 1 L), potasyum oksalat 4 g, agar 17 g, pH: 7±0.2] kullanılmıştır [14]. Ancak potasyum oksalat (PO) ilaveli bu ortamda gelişme zayıf olduğundan, gelişmeyi teşvik için 100 mL ortama 0.1 g yeast ekstrakt ve 0.1 mL iz tuzlar solüsyonu (FeSO₄.7H₂O 0.1 g, MnCl₂.4H₂O 0.1 g, ZnSO₄.7H₂O 0.1 g, distile su 100 mL) eklenmiştir. Modifiye PO ortamına aktarılan suşlar 30 °C' de 48 saat (h) inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan aerobic oksalat bakterileri.

Strain	Koleksiyon No	Kaynak
<i>Cupriavidus oxaliticus</i> Ox1	DSM 1105	[15]
<i>Oxalicibacterium flavum</i> TA17 ^T	NEU 98	[13]
<i>Xanthobacter</i> sp. NS14	NEU 1221	[12]
<i>Cupriavidus necator</i> NS02	NEU 1209	[12]

2.2 Bakteriyal Stres Koşulları

Oksalat bakterilerinin farklı besin (PO, %0.4-1.0), sıcaklık (25-45 °C), pH (7-8.5), osmotik (NaCl, %0.5-2.5) ve antibiyotik (Ampisilin, 0.1-0.3 mg/100 mL) stres koşullarına karşı denemeler kısım 2.1' de verilen modifiye potasyum oksalatlı sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. pH denemelerinde pH 8 ve 8.5 için 5 mM Tricine, 7.5 için 5 mM MOPS kullanılmıştır. Her bir stres şartları için ayrı ayrı hazırlanan 10 mL sıvı ortama yaklaşık hücre sayısı 1.0 × 10⁶ cfu/mL olan aktif kültürlerden 0.1 mL aktararak 30 °C' de, çalkamalı inkübatörde 160 rpm hızda, 48 h inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda elde edilen 4 farklı oksalat bakteri kültürleri canlı/koloni oluşturabilen hücre sayıları açısından incelenmiştir.

2.3 Kültüre Edilebilirlik/Canlılık Testleri

Kısım 2.2'deki işlemler sonucu elde edilen oksalat bakteri kültürleri zaman kaybetmeden canlılık ve

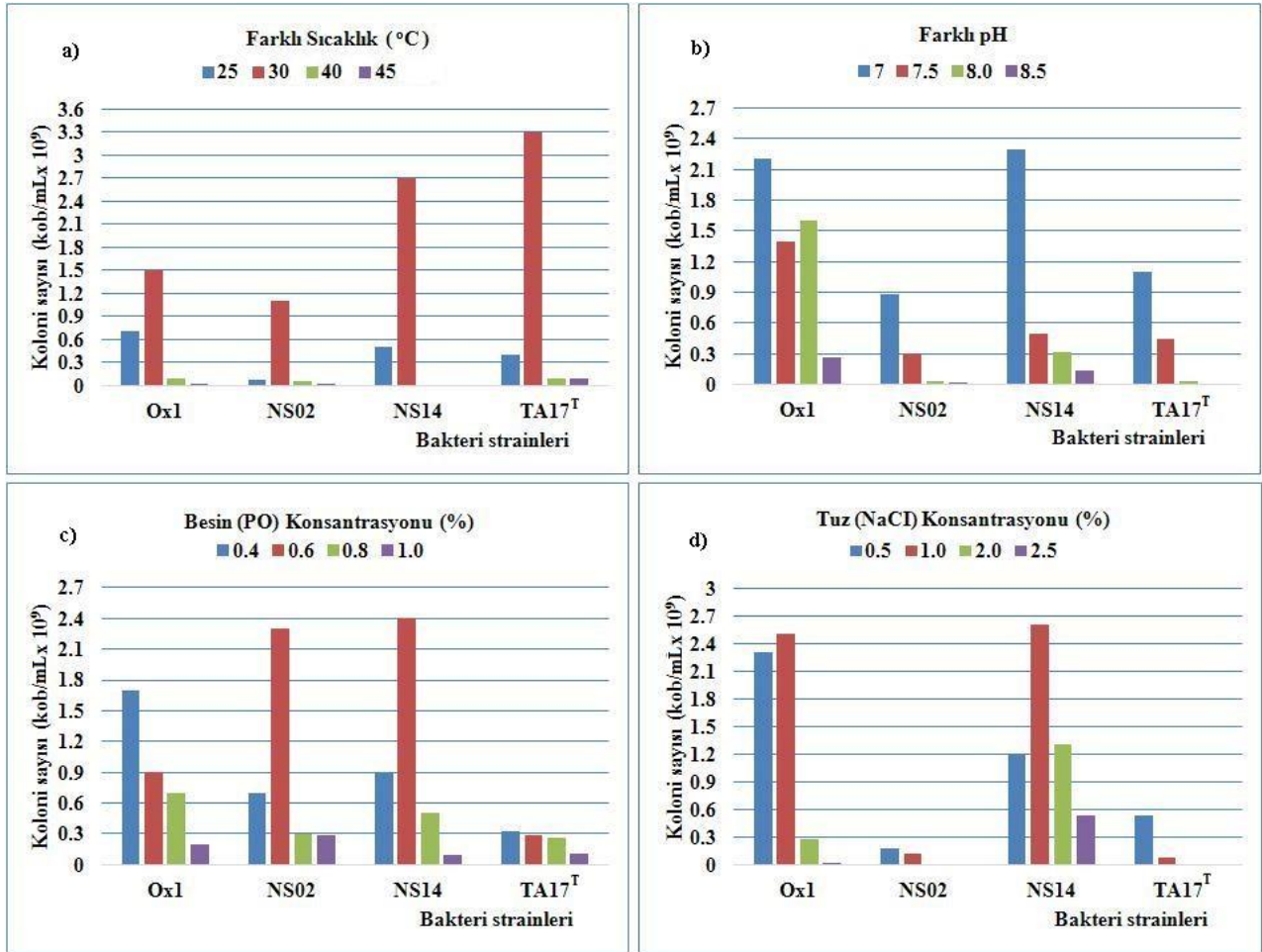
kültüre edilebilirlik testlerine tabi tutulmuştur. Her bir ayrı kültürden alınan 1 mL bakteriyal örnek 12.000 rpm, 4 °C' de 5 dakika (m) santrifüjlenmiş, steril distile suyla yıkanarak ringer solüsyonunda tekrar çözülmüş ve 3 h bu şekilde 30 °C' de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda steril distile suyla 1:10' luk seyreltmeleri oluşturularak %0.4 potasyum oksalatlı Nutrient Agar'a 0.1 mL kültürlerden aktararak 30 °C' de 24 ya da 48 h inkübasyonla koloni oluşturabilen hücre sayıları (cfu/mL) bağımsız 3 deneme sonucu ortalama değerler olarak hesaplanmıştır.

Canlılık testleri için indikatör olarak TTC (Merck K35881980) kullanılmıştır. TTC 0.018 g/L olacak biçimde steril distile su ile hazırlanarak 0.22 µm polikarbonat filtre (Sartorius) ile filtrasyon sonucu sterilize edilmiştir. Farklı stres koşullarına tabi tutulan bakteriyal kültürlerden 1 mL alınarak 10.000 rpm, 4 °C' de 15 m santrifüjlenmiş, steril distile suyla yıkanarak ringer solüsyonunda tekrar çözülmüş ve 3 h bu şekilde 30 °C' de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda steril distile suyla farklı seyreltmeleri oluşturularak her birinden 100 µL alınarak 15 µL TTC ile karıştırılmış ve 37 °C' de 1 h reaksiyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda bu seyreltmelerin

her biri 0.22 µm polikarbonat filtre (25 mm çaplı) ile filtrasyon işlemine tabi tutularak filtre üzerindeki metabolik olarak aktif bakteri hücreleri (menekşepembe ya da bazı durumlarda tuğla kırmızısı) mikroskop ile 20 farklı alanda sayılarak canlı hücre sayıları hesaplanmıştır.

3 Bulgular ve Tartışma

PO ilave edilmiş besiyerinde gerçekleştirilen sıcaklık stresi çalışmalarına bakıldığında test organizmaları için farklı değerler elde edilmiştir. Sıcaklık stresinde Ox1 suşu için 25 °C' de koloni sayısı, kontrol olan 30 °C' ye göre oldukça azalmıştır (Şekil 2.a). 40 °C' de ise koloni sayısının oldukça azaldığı görülmüştür. Hemen hemen 4 oksalat bakterisinin 30 °C koloni sayımları çok yüksek olmasına rağmen 40 ve 45 °C' de, en iyi büyüme gösterebilen suş TA17^T dir. *Lactobacillus helveticus*'un ortam sıcaklığı 37 °C' den 52 °C'ye çıkarıldığında büyümenin azaldığı gözlenmiştir [16]. *Myxococcus xanthus*'un optimum büyüme sıcaklığı 30 °C'dir. Sıcaklık 40 °C ve 42 °C' ye çıkarıldığında büyüme azalmıştır [17].



Şekil 2. Oksalat bakterilerinin farklı sıcaklık (a), pH (b), besin (c) ve tuz (d) konsantrasyonlarında koloni sayımları.

Ülkemizde sıcak su kaynaklarından izole edilen mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklıkları da yüksek tespit edilmiş [18, 19], bunlardan elde edilen enzimlerin (β -mannanaz) endüstriyel olarak önemli, özellikle de meyve suyu berraklaştırılmasında etkin oldukları ortaya çıkarılmıştır [20-22]. *Bacillus cereus* ile yapılan çalışmada da optimum büyüme sıcaklığı 37 °C olmasına rağmen 49 °C' de iyi bir büyüme gösterdiği belirlenmiştir [23]. *Sphingomonas* sp. hücrelerinin de 25 °C' ye göre 56 °C' de sayılarının arttığı gösterilmiştir [24].

Bu çalışmada farklı pH'nın oksalat bakterilerinin üremelerine etkisinin araştırılması için; tamponlar kullanılarak pH ayarlaması yapılmış ve farklı pH değerlerinde büyüme ortamları hazırlanmıştır. pH değeri arttıkça bütün bakteri suşlarının koloni sayısının dereceli olarak kontrole göre (pH: 7) azaldığı görülmüştür. pH 8' de en fazla koloni sayısı Ox1 suşunda gözlemlenmiştir (Şekil 2.b). *Salmonella typhimurium*'un pH 7.7'de koloni sayısı, pH 3.3'e göre oldukça yüksektir [25]. *Bacillus subtilis*'in pH 5.2'de

üremesinin pH 4.3'e göre arttığı belirlenmiştir [26]. *Listeria monocytogenes* için de durum aynıdır, pH 6'da, pH 4'e göre artış göstermiştir [27]. Ox1 ve TA17^T suşlarının ise pH 8.5' da büyüme azalma görülmüştür. Yabani tip *Escherichia coli*' nin pH 9'da, pH 7'ye göre büyümesi azalmıştır [28]. Farklı ekstrem ortamlardan izole edilen mayaların da (özellikle *Yarrowia lipolytica*) alkalın ve asit proteaz, lipaz, ribonükleaz, ve fosfataz üreticileri olduğu, ortam koşullarındaki karbon ve azot kaynakları ile pH' nun bu enzimlerin üretimlerini etkilediği belirtilmektedir [29, 30].

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 sulcul ortamlarda önemli çevresel parametrelerden pH' da büyük değişimler meydana gelir. Genellikle bu tür ortamlarda mikroorganizmalar yüksek pH' ya maruz kalır. Bakteriler sınırlı besin kaynaklarının varlığında büyütüldüklerinde diğer

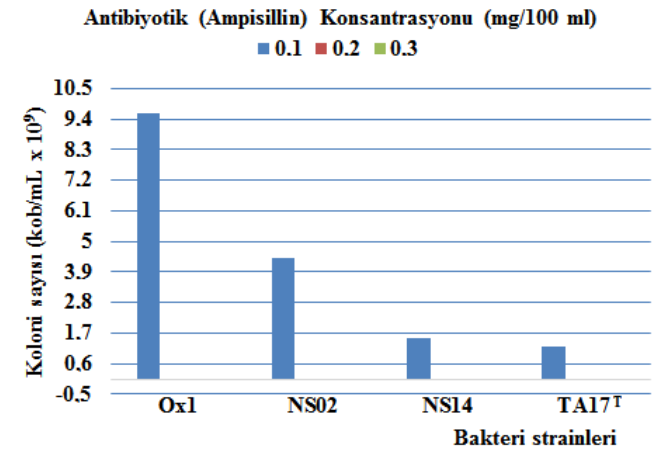
çevresel stres faktörleri (sıcaklık, osmotik basınç, pH gibi)' ne kolayca uyum sağlayıp yaşamlarını sürdürdükleri tespit edilmiştir. Asit adaptasyonunun *Salmonella typhimurium* ve *Vibrio parahaemolyticus'* u farklı çevresel şartlara karşı koruduğu (cross-protection)' da bilinmektedir [31].

Besin stresi deneyinde kontrol grubu, %0.4 PO içeren büyüme ortamıdır. Ox1 suşunda ortamdaki PO miktarı arttıkça koloni sayısında kontrole göre azalma olmuştur. Ancak %0.8 ve %1' lik PO'lu ortamdaki koloni sayısına göre yüksektir. Bu denemelerde en iyi bakteriyal büyüme NS02 ve NS14 suşları için %0.6 PO ilaveli ortamda tespit edilmiştir (Şekil 2.c). Bu iki suş için PO oranı azaldığında açlık stresi yanıtından söz edilebilir. Çünkü açlık stresine maruz kalan hücrelerin direncinin ve metabolik aktivitelerinin düştüğü gözlenmiştir. Ox1 ve TA17^T suşlarının büyümeleri ise kontrol olan %0.4' e göre azalmıştır. PO zehirli bir bileşik olduğu için bitkiler ve hayvanlarda olduğu gibi bu iki organizma için de toksik olabilir.

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 üç kısma ayrılabilir. Osmotik adaptasyonun ilk cevabı K⁺ konsantrasyonunun ayarlanmasıdır. İkinci cevabı ise osmotik koruyucu sentezi veya taşıma ile biriktirilmesidir. Bakteriyal osmoadaptasyon için üç temel osmotik koruyucu tespit edilmiştir. Bunlar glisin betain, karnitin ve prolindir [32]. Bazı bakteri türleri osmotik strese dayanıklı iken, bazıları da direnç gösteremezler. Çalışmamızda test organizmalarımızın farklı konsantrasyonlardaki NaCl değerlerinde koloni oluşturabilme kapasiteleri incelenmiştir. Ox1 ve NS14 suşlarının %1'lik NaCl bulunan ortamdaki koloni sayısı, kontrol grubuna (%0.5 NaCl) göre artış göstermiştir (Sırasıyla %109 ve %217). NS02 ise %2 ve %2.5 NaCl oranlarında üreme göstermemesine rağmen, %1 NaCl oranında kontrole göre daha az üreme göstermiştir (%66). NS14 suşunun %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 azalmış olup, %2 ve %2.5 NaCl oranlarında üreme göstermemiştir (Şekil 2.d). *Vibrio*

cholerae ile yapılan çalışmalarda da NaCl' nin yüksek olduğu değerlerde sayılarının azaldığı gözlenmiştir [33]. *Corynebacterium glutamicum* bakterisinin büyüme ortamına 1.5 M NaCl ilave edildiğinde yine sayısında azalma olmuştur [34]. *Rhizobium legüminosarum'* un ise gelişme ortamına 2.5 M NaCl eklendiğinde de azalma görülmüştür [35]. *Escherichia coli* için de ortamdaki NaCl miktarı arttıkça sayısının azaldığı gözlenmiştir [36]. *Lactococcus lactis* [37] ve *Thermotoga neapolitana* [38] bakterileri için de aynı durumdan bahsedilmiştir. Yukarıdaki durumların aksine *Listeria monocytogenes* osmotik strese dirençli bir patojendir [39, 40]. *Lactobacillus plantarum'* un %8 NaCl içeren ortamda, sayısının arttığı gözlenmiştir [41]. *Methanobacterium thermoautotrophicum* için NaCl miktarı 0.01 M' dan 0.65 M' a çıkarıldığında, organizma sayısının arttığı görülmüştür [42]. *Bacillus subtilis'* in osmotik stres adaptasyon mekanizmaları çalışılmış olup yüksek tuz oranlarında büyüyebildikleri belirlenmiştir [43].

Antibiyotik stresinde kontrol grubu 1 µg/mL (0.1 mg/100 mL) antibiyotik içeren gruptur ve bütün suşlar için bu grupta üreme gözlemlenmiştir. 2 µg/mL ve üzerindeki ampisilin miktarında hiçbir suş üreme gösterememiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Oksalat bakterilerinin farklı ampisillin konsantrasyonlarında koloni sayımları.

TTC ile mikroskopta yapılan canlı sayımları kültürel sayımları ile yapılan koloni sayımlarından yaklaşık olarak %20 oranında daha düşük çıkmıştır. Bunun sebebi olarak; TTC' nin metabolik olarak aktif/büyüyen kültürlerde daha iyi reaksiyon verdiğini ve bu kültürlerin TTC' yi daha iyi indirgeyebileceğini düşünmekteyiz.

4 Sonuç

Mikroorganizmaların çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri tepki ve uyum esnasında ürettikleri enzimler endüstriyel öneme sahiptir. Yapılan çalışmada çevresel stres faktörlerinin kullanılan oksalat bakterilerinin kültüre edilebilirliği ve canlılığı 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, cevher zenginleştirilmesi, kağıt sanayi, biyolojik kontrol çalışmaları, çevrede kalıcı maddelerin degradasyonu, tıpta özellikle böbrek taşlarının (CaOx) tedavisi gibi biyoteknolojinin farklı alanlarında kullanılabilirliğini; elde edilen sonuçların ise diğer osmoadaptif çalışmalara katkıda bulunacağı açıktır.

Teşekkür

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: 2006-013) kapsamında desteklenmiştir.

5 Referanslar

- [1] Panoff, J.M.; Thammavongs, B.; Gueguen, M.; Bou-tibonnes, P. Cold Stress Responses in Mesophilic Bacteria. *Cryobiol.* 1998; 36, 75-83.
- [2] Moat, A.G.; Foster, J.W.; Spector, M.P. *Microbial Physiology*, A John Wiley and Sons, Inc., Publication, 4th edition, New York, 2002; 582-601.
- [3] Basalik, K. Über die verarbeitung der oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n sp. *Jahrb. Wiss. Bot.* 1913; 53, 255-302.
- [4] Şahin, N. Oxalotrophic bacteria. *Res. Microbiol.* 2003; 154, 399-407.
- [5] Şahin, N. Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of Some New Oxalotrophic Bacteria. Dokuz Eylül Üniversitesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi, Doktora Tezi, 2001, İzmir.
- [6] Dinsdale, R.M.; Freda, M.; Hawkes, R.; Dennis L. Anaerobic Digestion of Short Chain Organic Acids in an Expanded Granular Sludge Bed Reactor. *Wat. Res.* 2000; 34, 2433-2438.
- [7] Aragno, M.; Verrecchia, E. The oxalate-carbonate pathway: a reliable sink for atmospheric CO₂ through calcium carbonate biomineralization in ferralitic tropical soils. In

Microorganisms in Environmental Management. Satyanarayana, T.; Johri, B.N.; Prakash, A. (eds). Dordrecht: Springer, 2012; pp. 191-200.

- [8] Martin, G.; Guggiari, M.; Bravo, D.; Zopfi, J.; Cailleau, G.; Aragno, M.; Job, D.; Verrecchia E.; Junier P. Fungi, bacteria and soil pH: the oxalate-carbonate pathway as a model for metabolic interaction. *Environ. Microbiol.* 2012; 14, 2960-2970.
- [9] Nagarajkumara, M.; Jayarajb, J.; Muthukrishnanb, S.; Bhaskarana, R.; Velazhahana, R. Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Microbiol. Res.* 2005; 160, 291-298.
- [10] Sidhu, H.; Allison, M.; Peck, A.B. Identification and Classification *Oxalobacter formigenes* Strains by Using Oligonucleotide Probes and Primers. *Clin. Microbiol.* 1997; 35, 350-353.
- [11] Allison, M.; Sidhu, H.; Chow, J.; Clark, A.; Peck, A. Rapid Reversal of Hyperoxaluria in Rat Model After Probiotic Administration of *Oxalobacter formigenes*. *J. Urol.* 2001; 166, 1487-1491.
- [12] Şahin, N.; Gokler, I.; Tamer, A.U. Isolation, Characterization and Numerical Taxonomy of Novel Oxalate-Oxidizing bacteria. *J. Microbiol.* 2002; 40, 109-118.
- [13] Tamer, A.U.; Aragno, M.; Şahin, N. 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.* 2002; 25, 513-519.
- [14] 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. Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Scheleifer, K-H. (Eds.). Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1992; pp 344-384.
- [15] Khambata, S.R.; Bhat, J.V. Studies on a New Oxalate-decomposing Bacterium, *Pseudomonas oxaliticus*. *J. Bacteriol.* 1953; 66, 505-507.
- [16] Smeds, A.; Varmenan, P.; Palva A. Molecular Characterization of a Stress-Inducible Gene from *Lactobacillus helveticus*. *J. Bacteriol.* 1998; 180, 6148-6153.

- [17] Otani, M.; Ueki, T.; Kozuka, S.; Segawa, M.; Sano, K.; Inouye, S. Characterization of a Small Heat Shock Protein Mxp Hsp 16.6, of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 2005; 187, 5236-5241.
- [18] Adıgüzel, A.; Özkan, H.; Barış, O.; İnan, K.; Güllüce, M.; Şahin, F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. J. Microbiol. Met. 2009; 79, 321-328.
- [19] Adıgüzel, A.; İnan, K.; Şahin, F.; Arasoğlu, T.; Güllüce, M.; Beldüz, A.O.; Barış, Ö. Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). Turk. J. Biol. 2011; 35, 267-274.
- [20] Adıgüzel, G.; Sönmez, Z.; Adıgüzel, A.; Nadaroğlu, H. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4 mannanase from *Weissella viridescens* LB37 and its application in fruit juice clarification. European Food Res. Technol. 2016; 242, 769-776.
- [21] Nadaroğlu, H.; Adıgüzel, A.; Adıgüzel, G. Purification and characterisation of β -mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its applications in some fruit juices. Int. J. Food Sci. Technol. 2015; 50, 1158-1165.
- [22] Adıgüzel, A.; Nadaroğlu, H.; Adıgüzel, G. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices. J. Food Sci. Technol. 2015; 52, 5292-5298.
- [23] Browne, N.; Dowds, B.C.A. Heat and Salt Stress in the Food Pathogen *Bacillus cereus*. J. Appl. Bacteriol. 2001; 91, 1085-1084.
- [24] Eguchi, M.; Nishikawa, T.; Macdonald, K.; Cavicchio, R.; Gottschal, J.C.; Kjelleberg, S. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62, 1287-1294.
- [25] Wilson, L.; Foster, W.J. A low pH- Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella thyphimurium* against Inorganic Acid Stress. J. Bacteriol. 1998; 180, 2409-2417.
- [26] Völker, U.; Maul, B.; Hecker, M. Expression of the σ^B -Dependent General Stress Regulon Confers Multiple Stress Resistance in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 1999; 181, 3942-3948.
- [27] Koutsoumanis, K.P.; Sotos, J.N. Comparative Acid Stress Response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O:157:H7 and *Salmonella thyphimurium* After Habituation at Different pH Conditions. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 38, 321-326.
- [28] Farrell, M.J.; Finkel, S.E. The Growth Advantage in Stationary Phase rpoS Mutations Is Dependent on the pH and Nutrient Environment. J. Bacteriol. 2003; 185, 7044-7052.
- [29] Akpınar, O.; Uçar, F.; Yalçın, H.T. Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of *Yarrowia lipolytica* strains isolated and identified from different cheeses in Turkey. Ann. Microbiol. 2011; 61, 907-915.
- [30] Yalçın, H.T.; Çorbacı, C.; Uçar, F.B. Molecular characterization and lipase profiling of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum. J. Basic Microbiol. 2014; S85-S92.
- [31] Koga, T.; Katagiri, T.; Takumi, K. Alkaline adaptation induces cross-protection against some environmental stresses and morphological change in *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol. Res. 2002; 157, 249-255.
- [32] Darcan, C. 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, 2004, Samsun.
- [33] Yıldız, H.Y.; Schoonik, G.K. Role of rpoS in Stress Survival and Virulence of *Vibrio cholera*. J. Bacteriol. 1998; 180, 773-784.
- [34] Farwick, M.; Siewe, R.M.; Kramer, R. Glycine Betaine Uptake after Hyperosmotic Shift *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 1995; 177, 4690-4695.
- [35] Thorne H.S.; Williams H.D. 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. 1999; 181, 981-990.
- [36] Jenkins, D.E.; Chaisson S.A.; Matin A. Starvation Induced Cross Protection against Osmotic Challenge in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1990; 172, 2279-2781.

- [37] Molenaar, D.; Hagting, A.; Alkema, H.; Driessen, A.J.; Konings W.N. Characteristic and Osmoregulatory Roles of Uptake Systems for Proline and Glycine Betaine in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 1993; 175, 5438-5444.
- [38] Martins, L.O.; Carreto, L.S.; Costa, M.S.; Santos, H. New Compatible Solutes Related to Di-myo-Inositol Phosphate in Members of the Order *Thermotogales*. J. Bacteriol. 1996; 178, 5644-5651.
- [39] Rinkel, K.O.; Smith, L.T.; Smith, G.M. Glycine Betaine Confers Enhanced Osmotolerance and Crytolerance on *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 1994; 176, 426-431.
- [40] Vasseur, C.; Baverel, L.; Hebraud, M.; Labadie C. Effect of Osmotic, Alkaline, Acid or Thermal Stresses on the Growth and Inhibition of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 1999; 86, 469-476.
- [41] Russel, N.J.; Evans, R.I.; Terstees, P.F.; Hellemons, J.; Verheul, A.; Abee, A. Membranes as Target for Stress Adaptation. Int. J. Food Microbiol. 1995; 28, 255-261.
- [42] Ciulla, R.; Clougherty, C.; Belay, N.; Krishnan, S.; Zhou, C.; Byrd, D.; Roberts, M.F. Halotolerance of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. J. Bacteriol. 1994; 176, 3177-3187.
- [43] Boch, J.; Kempf, B.; Schmid, R.; Bremer, E. Synthesis of the Osmoprotectant glycine Betaine in *Bacillus subtilis* Characterization of the gbsAB genes. J. Bacteriol. 1996; 178, 5121-5129.