



**T.C.  
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
HAZIRLAMA VE DEĞERLENDİRME YÖNERGESİ  
SONUÇ RAPORU FORMU**

**T.C.  
BİLECİK ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
RAPORU**

***Escherichia coli*'de Açlık Stresi Altında Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Duruma  
(VBNC) Geçişte CusS-CusR İki Bileşikli Sisteminin Rolünün Araştırılması**

**PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ:** Prof. Dr. Cihan DARCAN

**ARAŞTIRMACILAR:** Öğr. Gör. Özge KAYGUSUZ

**BAŞLAMA TARİHİ:** 15-02-2019

**BİTİŞ TARİHİ:** 15-02-2020

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ  
BİLECİK, 2020**

## ÖZET

Canlı fakat kültürü yapılamayan hücre (VBNC) durumu, bir hücrenin büyümenin normal olarak desteklendiği şartlarda bölünemediği, fakat metabolik olarak aktif olduğu farklılaşma halidir. Bu durum, stres şartları altında canlı kalabilmek için bir yaşam stratejisi olarak görülmektedir. Konuyla ilgili araştırmalar yıllardır sürmesine rağmen, mekanizma hala tam olarak aydınlatılamamıştır. VBNC durumun moleküler mekanizmasını aydınlatmaya yönelik şimdiye kadar bazı proteinler tespit edilmiş olup, bunlardan bir tanesi EnvZ-OmpR iki bileşikli fosforlama sisteminin, sensörü olan EnvZ'dir.

İki bileşikli fosforlama sistemleri, dış çevresel uyarıları algılayan ve adaptasyon için gerekli genleri regüle eden bir sinyal iletim sistemidir. Her iki bileşikli fosforlama sistemi, bir sensör protein (HK) ve bir cevap regülatöründen (RR) oluşur. Bu sistemlerin sensörleri çevrede meydana gelen değişimleri hisseder. Bu sinyaller regülatör proteinler vasıtasıyla gerekli gen bölgelerine aktarılır. *Escherichia coli* genomunda toplam 30 histidin kinaz ve 34 tane cevap regülatörü bulunmuş ve bunlardan bazılarının fonksiyonları belirlenmiştir. Bu çalışmada da CusS-CusR iki bileşikli fosforlama sisteminin alkali pH da VBNC ile ilişkisi araştırılmıştır.

CusS-CusR iki bileşikli fosforlama sistemi mutant hücreleri ile alkali pH fosfat tampon ortamında 30 gün süren yaşam deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda *cusS-cusR* mutant hücrelerde yabancı tipe oranla bir azalma saptanmıştır. Meydana gelen bu azalmanın hücre ölümünden mi yoksa VBNC durumundan mı olduğunu tespit etmek için floresan mikroskopta incelemeler yapılmış ve elde edilen sonuçlara göre mutantlardaki azalma hücrelerin VBNC forma girmesi dolayısı ile olduğu tespit edilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

|  |     |
|--|-----|
| ÖZET.....  | i   |
| İÇİNDEKİLER.....   | ii  |
| TABLolar VE ŞEKİLLER .....                                     | iii |
| 1. GİRİŞ .....   | 1   |
| 1.1 Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (Dormansi=VBNC)..... | 1   |
| 1.2 VBNC'nin Tespitinde Kullanılan Yöntemler .....             | 3   |
| 1.3 İki Bileşikli Fosforlama Sistemleri.....                   | 5   |
| 1.4 CusS/ CusR İki Bileşikli Fosforlama Sistemi.....           | 7   |
| 2. MATERYAL METOD .....  | 9   |
| 2.1 Kullanılan <i>E. coli</i> Suşları.....                     | 9   |
| 2.2 Koloni PZR.....  | 9   |
| 2.3 Agaroz Jel Elektroforezi.....                              | 10  |
| 2.4 Fosfat Tampon Hazırlanması.....                            | 10  |
| 2.5 Yaşam Deneyleri .....                                      | 11  |
| 2.6 Membran Bütünlüğüne Sahip Bakterilerin Sayımı .....        | 11  |
| 2.7 Direkt mikroskopik bakteri sayımı .....                    | 12  |
| 2.8 Solunum yapan bakterilerin sayımı .....                    | 12  |
| 3. BULGULAR.....   | 13  |
| 3.1 Mutantların Doğrulanması.....                              | 13  |
| 3.2 VBNC Bakterilerin Floresan Mikroskopta Tespiti.....        | 14  |
| 3.3 Yaşam Deneyi Sonuçları .....                               | 15  |
| 4. SONUÇ.....  | 19  |
| KAYNAKLAR.....   | 21  |

## TABLOLAR VE ŞEKİLLER

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1.</b> Çalışmada kullanılan yabancı tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutant suşları.....                                   | 9  |
| <b>Tablo2.</b> Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı. ....  | 10 |
| <b>Tablo 3.</b> PZR reaksiyonunda kullanılan primerler. ....   | 10 |
| <b>Tablo 4.</b> PZR döngü koşulları.....   | 10 |
| <br>   |    |
| <b>Şekil 1</b> Yabancı tip <i>E. coli</i> ve <i>cusS</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü. ....                       | 13 |
| <b>Şekil 2</b> Yabancı tip <i>E. coli</i> ve <i>cusR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....                        | 13 |
| <b>Şekil 3</b> <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::cusS</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü..                | 14 |
| <b>Şekil 4</b> <i>E. coli</i> BW25113 plazmidi ve <i>pnt3::cusR</i> mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü..                | 14 |
| <b>Şekil 5</b> Floresans mikroskopta membran bütünlüğüne sahip bakterilerin görüntüsü. ....                                    | 14 |
| <b>Şekil 6</b> Floresans mikroskopta DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)-CTC boyama ile solunum yapan bakterilerin görüntüsü..... | 15 |
| <b>Şekil 7</b> Nalidiksik asit- Acridine orange direk mikroskopik sayım (* uzayan bakteri).....                                | 15 |
| <b>Şekil 8</b> Yabancı tip <i>E. coli</i> ve mutantların yaşamına alkali pH (8.5) etkisi.....                                  | 16 |
| <b>Şekil 9</b> Yabancı tip <i>E. coli</i> nin alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları.....   | 16 |
| <b>Şekil 10</b> Yabancı tip <i>E. coli</i> de membran bütünlüğüne sahip bakterilerin tespiti.....                              | 17 |
| <b>Şekil 11</b> <i>cusS</i> mutantının alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları .....   | 17 |
| <b>Şekil 12</b> <i>cusS</i> mutantta membran bütünlüğüne sahip bakterilerin tespiti .....                                      | 18 |
| <b>Şekil 13</b> <i>cusR</i> mutantının alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları.....  | 18 |
| <b>Şekil 14</b> <i>cusR</i> mutantta membran bütünlüğüne sahip bakterilerin tespiti.....                                       | 18 |

## 1. GİRİŞ

### 1.1 Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (Dormansi=VBNC)

VBNC durumu, ilk olarak Xu vd. (1982)'nin *Escherichia coli* ve *Vibrio cholerae* ile deniz suyunda yaptıkları çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Deniz suyundaki bakterilerin kültürel ortamda yapılan sayımlarında, sayılarının hızlı bir azalma gösterdiğini, fakat mikroskopik sayılarının azalmadığını tespit etmişler ve bu sonuçlardan VBNC durum ile ilgili ilk görüşleri ortaya koymuşlardır. Daha sonraki çalışmalarda da VBNC fenomeni çeşitli yazarlar tarafından ortaya konulmuştur (Kjelleberg vd., 1987; Linder ve Oliver, 1989). Colwell vd. (1989), VBNC veya dormant durumdaki bir bakteriyi, büyümeyi normal olarak destekleyen şartlarda bölünemeyen, fakat metabolik olarak aktif bir hücre olarak tanımlamışlardır. Bu durum zor yaşam şartlarında canlı kalabilmek için bir yaşam stratejisi olarak görülmektedir.

İlk kez Xu vd., (1982) tarafından tanımlanan VBNC hücreleri, daha sonraki yıllarda yapılan birçok çalışma ile farklı bakteri türlerinde de gözlenmiştir (Millet ve Lonvaud-Funel, 2000; Suzuki vd., 2006; Lemke ve Leff, 2006).

Oliver (2005) yazdığı derleme makalede birçok bakteride VBNC durumun gözlemlendiğini ve bu bakterilerin 52 tane olduğunu ifade ederek derlemesinde listelemiş, 5 yıl sonra yazdığı diğer derlemede de VBNC duruma girdiği belirlenen 4 yeni türü daha listesine eklemiştir (Oliver, 2010). Son olarak ise Pinto vd.'nin 2013 yılında yazdığı derlemeye göre, 12 tane daha bakteri eklenmesi ile toplamda 68 bakteri türünde VBNC durum belirlenmiştir. Ayrıca bu derlemelerde adı geçmeyen 2 tür (Ben Abdallah vd. 2008; Mukamolova vd. 2010) daha VBNC açısından çalışılmıştır. Son eklenen yayınlardan elde edilen türler ile toplam 85 türde VBNC durumun belirlendiği ve bu türlerden de 51 tanesi insanda patojen olan bakterilerdir. (Li vd 2014).

VBNC durumu türler arasında geniş bir dağılım göstermesinin yanı sıra, VBNC'nin belirlendiği ortamlarda da geniş bir çeşitlilik görülmektedir. VBNC hücreleri, ilk olarak Xu vd.'nin 1982 yılında yaptıkları çalışmada deniz ve nehir ağız sularda belirlenmiştir. Daha sonra, başka bilim adamları tarafından da yapılan birçok çalışmada farklı ortamlar da VBNC durumu tespit edilmiştir.

Pommepuy vd. (1996), çalışmalarında Fransa'daki Morlaix nehrinde bulunan ve güneş ışığına maruz kalan *E. coli* hücrelerinin VBNC durumunu belirlemişlerdir. Daha sonra Maalej

vd. 2004 yılındaki çalışmalarında deniz suyunda düşük sıcaklıklara maruz kalmış olan *Aeromonas hydrophila* hücrelerinin VBNC duruma geçtiğini gözlemlemişlerdir.

Oliver vd. (1995) tarafından yapılan çalışmada sıcaklık 15°C'nin altına düştüğünde nehir ağızı sularında bulunan *Vibrio vulnificus* hücrelerinin VBNC' ye girdiği ve bu hücrelerin sıcaklığın 21°C'nin üstüne çıkması ile tekrar eski haline geri döndüğü belirlenmiştir.

Pawlowski vd. (2011), musluk suyu mikrokosmunda düşük sıcaklıklarda 21 gün bekletilmesi ile *Yersinia pestis* hücrelerinin VBNC duruma geçtiğini gözlemlemişlerdir.

Magarinos vd. (1994), deniz ve sediment mikrokosmlarında farklı sıcaklıklarda (6 ve 20°C) 1 ay boyunca *Pasteurella piscicida* strainlerinin varlığını araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda 6°C'deki hücrelerin VBNC duruma girdiğini belirlemişlerdir.

Reissbrodt vd. (2000), önemli bir gıda kaynaklı patojen olan *Salmonella enterica serotip typhimurium* ile çalışmışlardır. Çalışmaları sonucunda toprak ve su mikrokosmlarında kültüre edilebilme özelliklerini kaybettiğini, yani hücrelerin VBNC durumuna geçtiğini ve bunların ferriokzamin E ile strese maruz bırakılması sonucunda tekrar kültüre edilebilme özelliklerini kazandığını göstermişlerdir.

Tanaka vd. (2000), çalışmalarında Japonya'daki Argawa nehrinden alınan su örneklerinde geleneksel metodlar ile yapılan koloni sayımlarında bakteri izole edemediklerini, fakat direkt floresans boyamalar ile aynı nehir suyu örneklerinde 10<sup>3</sup>/ml kadar aktif bakterinin olduğunu göstermişler, buna göre bakterilerin büyük oranda VBNC durumda olduğunu ifade etmişlerdir.

Ultee vd.'nin 2004 yılında yaptıkları çalışmalarda yer altı sularında bulunan bakterilerden yalnızca %1'inin farklı kültürel ortamlarda tespit edilebildiğini ve birçok bakterinin solunum aktivitesi göstererek VBNC durumda olduğunu tespit etmişlerdir.

Gavriel vd. (1998), *Aeromonas hydrophila* ile yaptıkları çalışmada, bu türün yaz aylarında 20-25°C'deki su sıcaklıklarındaki sayıları yüksek çıkarken, kışın düşük sıcaklıklarda oldukça azaldığını hatta gözden kaybolduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca bu durumun bakterilerin ölümü yüzünden olmadığı, dormant durumları nedeni ile tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Defives vd. (1999), Fransa kaynaklı doğal mineral suyun mikroflorasında çalışarak bakteri sayısını hesaplamaları sonucunda bakterilerin VBNC duruma geçerek canlılıklarını devam ettirdiğini belirlemişlerdir.

Liu vd. (2008), Kanada'nın göl ve içme suları ile yapılan çalışmalarında *Escherichia coli* O157:H7 hücrelerin VBNC durumda olduğunu tespit etmişlerdir.

Nicolo vd. (2011), üzümlü meyve sularında gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların VBNC durumunu belirtmişlerdir.

Ordax vd. (2009), gül bitkileri ve yumuşak çekirdekli meyvelerde ateş yanıklığı etmeni olan *Erwinia amylovora* bakterisinin meyve saklama koşulları altında olgun elmaların kaliksleri içinde VBNC durumda hayatta kaldığını gözlemişlerdir.

Birçok patojen bakteri türlerinde VBNC hücreleri belirlenmiş ve onların varlığının göz ardı edilemeyecek kadar insan sağlığı için bir risk olduğu vurgulanmıştır (Dinu ve Bach, 2011; Dwivedi ve Jaykus, 2011; Siegumfeldt ve Arneborg, 2011; Pinto vd., 2013). Ayrıca birçok makale de VBNC durumundaki hücrelerin virulans etkisini ve bu durumdan çıkarak kültüre edilebilme yeteneklerini koruduğu belirtilmiştir (Rahman vd., 1996; Pommepuy vd., 1996; Cappelier vd., 1999; Makino vd., 2000). Buna rağmen çok az araştırmacı gıda ve tarım sistemlerinde VBNC durumunun potansiyel güvenlik risklerine odaklanmıştır (Artz vd., 2006; Dinu ve Bach, 2011).

Dinu ve Bach (2011) tarafından yapılan çalışmada düşük sıcaklıklar altında insan patojeni olan *Escherichia coli* O157:H7 bakterisinin marul fillosferi üzerindeki durumunu araştırmışlar ve bu stress koşulları altında indüklenen VBNC hücrelerinin potansiyel zararlarını değerlendirmişlerdir.

Dreux vd. (2007) çalışmalarında düşük nemli ortamlarda maydonoz yaprakları üzerinde *Listeria monocytogenes* bakterisinin VBNC durumdaki varlığını belirlemişlerdir.

Mukamolova vd. (2010) çalışmalarında insan kaynaklı klinik örneklerden biri olan *Mycobacterium tuberculosis*'de de VBNC durumu raporlandırmıştır. M. tuberculosis ile tüberküloz olan bir hastada yıllar sonra dışardan bir enfeksiyon kapmadan vücut içinde sessiz kalan bakteri nedeniyle hastalık yeniden ortaya çıkmaktadır. Bu sessiz haldeki durumun VBNC durumdan kaynaklandığı ortaya atılmıştır. Literatür özeti olarak yukarıda verilen ve yer verilemeyen birçok makaledeki sonuçlarda görüldüğü üzere birçok ortamda bakteriler VBNC duruma girmektedir.

## 1.2 VBNC'nin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

Kültürü yapılamayan hücrelerin, uygun floresans probalar, flow sitometri veya epifloresan mikroskop kullanılarak, besin alımı, solunum, membran permeabilitesi, enzimatik aktiviteleri içeren hücresel fonksiyonların ölçülmesi ile canlılıkları ortaya konulabilmektedir

(Joux vd., 1997). Buna rağmen VBNC durumu belirleyen çalışmaların çoğunluğu tek bir hücre fonksiyonunun ölçülmesini temel aldığı için kültürü yapılabilen ve canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) arasındaki geçiş durumunun mekanizması hala anlaşılammıştır. Kültürü yapılamayan hücrelerin canlılığını ölçmek için birçok metod önerilmiş ve uygulanmıştır. Ancak bütün çevresel şartlarda ve bütün bakterilerde uygulanabilecek bir metod geliştirilememiştir. Kullanılan metodlar ya hücresel aktiviteleri ya da hücre bütünlüğünü temel almıştır. Bu metodları kullanmış yazarların çalışmalarından bazıları hakkında kısaca bahsedecek olursak;

Substrat cevabı veren bakterilerin mikroskopik sayım metodu (DVC) ilk kez Kogure vd. (1979) tarafından uygulanmıştır. Bu metod, bakterilerin besin maddesi ile birlikte DNA sentezini engelleyen bir antibiyotik (nalidixic asit gibi) ilave edilerek belirli bir sıcaklıkta inkübe edilmesi ile gerçekleştirilir. Sonucunda besin kullanarak metabolik fonksiyonlarını yerine getiren, ancak bölünemeyen, dolayısı ile normalden oldukça uzamış olan hücreler elde edilmektedir. Bu hücreler floresan bir boya olan Acridin orange ile boyanarak mikroskopta gözlenmektedir. Joux vd. (1997) yaptığı çalışmalarda uzamış hücrelerin oranının kültürü yapılabilen hücrelere göre bir fark göstermemiş, bu durum metabolik aktivite kaybı ve kültürünün yapılabilişliğinin kaybı arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Elektron taşıma sistemi (ETS) canlılığın bir göstergesi olarak düşünüldüğünde, solunum aktivitesi ölçülerek canlılık tespiti yapılmaktadır. INT başta olmak üzere CTC, TTC, XTT gibi redoks boyaları yıllardır mikroorganizmaların solunum aktivitelerini ölçmek için kullanılmıştır. Elektron taşıma aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan tetrazolium tuzlarından INT(2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride)'yi Zimmerman vd. (1978), Baltık Deniz'inden elde edilen su örneklerinde VBNC duruma geçen bakterileri belirlemek için çalışmalarında kullanmışlardır. Rodriguez vd. (1992) çalışmalarında ise bir redoks boyası olan CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)'yi solunum aktivitesini gösteren bakterileri belirlemede kullanmışlardır. Hatzinger vd. (2003), INT ve CTC boyalarının bir elektron akseptörü olduğunu, INT formazan ve CTC formazan olarak hücre içinde elektron taşıma zincirindeki dehidrogenaz enzimleri ile redüklendiğini göstermişlerdir. Daha sonraları Rodriguez vd. (1992) çalışmalarında tetrazolium redoks boyaları, ETS bileşikleri ile mikrobiyal oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında elektronları topladığı ve intrasellüler olarak renklenmiş formazan çöktürleri şeklinde, metabolik olarak aktif mikroorganizmalarda biriktiğini belirtmişlerdir. Bu renklenmiş

çökeltir, direkt epifloresans mikroskopta veya spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Ayrıca bu metod, Oliver ve Bockian (1995) tarafından uygulanmış olan sağlam nükleik asitlerin göstergesi olan akridin orange boyası ile veya Ullrich vd. (1996) tarafından uygulanan DAPI boyası ile birlikte kullanılmıştır.

Canlılık ölçümlerinde ayrıca membran permeabilite özelliğide kullanılmaktadır. Live/Dead BacLight kiti bakteriyal membran bütünlüğünü ölçen iki renkli floresan bir boyadır ve nükleik asit boyaları içerir. Bu boyaların spektral karakterleri ve sağlıklı hücre membranından penetre olabilme yetenekleri farklıdır. Yeşil boya sağlam bakterilerden geçebilir, kırmızı boya ise 668 Da ağırlığında (propidium iodide) daha büyük bir moleküldür ve hasarlı membrandan geçebilir. Bakteriyal aktivitenin ölçülmesi için membran permeabilitesini temel almış bir boyama yöntemidir, Laflamme ve Lavigne'nin 2004 yılındaki çalışmasında kullanılmıştır.

VBNC durumunda bakterilerin canlılığını ölçmek için flow sitometri ile birlikte membran potansiyelinin bir indikatörü olarak Kaprelyants ve Kell'in 1992 yılındaki çalışmalarında Rhodamine 123, Fiksdal ve Tryland'ın 1999 yılındaki çalışmalarında Oxonol boyalarının kullanıldığı yöntemler de geliştirilmiştir. Ayrıca yine literatürden bilinen birçok floresans özellikli boyalarla farklı yöntemler geliştirilmiştir (Lopez Amarosvd., 1995; Fiksdal ve Tryland, 1999; Tanaka vd., 2000; Lesne vd., 2000).

Doğru ve güvenilir, her laboratuvarında uygulanan ucuz bir metodun çevresel örneklerdeki canlı bakterilerin toplam sayısını tahmin etmede hala geliştirilememesi halk sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle dormansinin mekanizmasının çözülmesi ve bu durumdaki bakterilerin tespiti için her şartta ve her bakteri grubu için uygulanabilecek güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yöntemlerin geliştirilebilmesi içinde dormansi olayının moleküler mekanizmasının çözülmesi gerekmektedir.

### **1.3 İki Bileşikli Fosforlama Sistemleri**

İki bileşikli sistemler, bütün hücrel formlarda yaygın olarak kullanılan bir sinyal iletim yoludur. Genel olarak iki bileşikli sistemler, dış etkenlerden gelen sinyalleri algılayan bir sensörden ve ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir cevap regülatöründen oluşur (Hoch, 2000). Bakterilerde iki bileşikli sistemler, arkealar ve ökaryotların aksine sinyal iletiminin en temel sistemidir (Egger vd., 1997). Bakterilerin iki bileşikli fosforlama sistemlerinin sensörlerinin çoğu, membranla ilişkili histidin kinazlardır. Bu sensörler çevreden gelen sinyalleri algılamada kendinde korunmuş olan histidin rezidüsünü fosforlar.

Transmitter alan olarak adlandırılan histidin kinazın sitoplazmik bölgesinin karboksil ucu, ATP bağlama alanı ve kendini fosforillemesi için korunmuş olan histidin rezidüsünü içeren H kutusu alanı içerir. Sonuç olarak histidin kinaz, histidine bağlı fosforil grubunu, cevap regülatörü üzerindeki spesifik aspartat rezidüsüne transfer eder. Aktive olmuş bu cevap regülatörü çoğu zaman çevreden gelen sinyallere cevap olarak bir seri genin transkripsiyonunu indükler veya baskılar (Yamamoto vd., 2005). Oshima vd. (2002), *E. coli* genomunun dizilenmesi ile toplam 30 histidin kinaz (HK) ve 34 tane cevap regülatörü (RR) olduğunu belirtmişlerdir (Oshima, vd., 2002).

*E. coli*'de bulunan iki bileşikli sistemlerin birçoğu karakterize edilmiş ve temel olarak çeşitli stres faktörlerine cevap vermeden sorumlu oldukları belirlenmiştir. Tanımlanan iki bileşikli sistemlerden ArcB/ArcA'nın, anaerobik koşullar altında solunum ve fermantasyon metabolizmasında (Luchi ve Lin, 1988;1991), PhoR/PhoB'nin fosfat metabolizmasında (Wanner, 1993;1996; Stock vd., 1989; Baek ve Lee, 2007), NtrB/NtrC (GlnG/GlnL)'nin, azot asimilasyonunda (Zimmer vd., 2000), AtoS/AtoC'nin, asetoasetat metabolizmasında (Jenkins ve Nunn, 1987), BarA/UvrY'nin karbon metabolizmasında (Pernesting vd., 2003), CreC/CreB'nin minimal medyumlarda glikolitik karbon kaynaklarını fermente etmede (Cariss vd.,2008), CusS/CusR'nin, metal direncinde (Munson vd., 2000; Sigman vd., 1991), BasS/BasR'nin anaerobik ve asidik şartlarda gelişimde ve metallere cevap oluşturmada (Hagiwara vd., 2004; Lee vd., 2005), DcuS/DcuR'nin, fumarat solunumunda (Zientz vd., 1998; Golby vd.,1999; Janausch vd., 2002), CitA/CitB'nin, anaerobik şartlarda sitrat metabolizmasında (Kaspar ve Bott, 2002; Yamamoto vd., 2008), iki histidin kinaz sensörü (NarX ve NarQ) ve iki cevap regülatöründen (NarL ve NarP) oluşan Nar sisteminin, elektron yakalayıcısı olan nitrit ve nitrate cevap oluşturmada (Lee vd., 1999; Bearson vd., 2002; Stewart vd., 2002), TorS/TorR'nin, trimetilamin oksit (TMAO) varlığında TMAO redüktaz solunumunda (Me'jean vd., 1994), EnvZ-OmpR'nin ozmosensör olarak dış membran proteinlerin sentezinde (Norioka vd., 1986; Forst vd., 1990; Russo vd., 1993), PhoP/PhoQ'nun, Mg<sup>+2</sup> taşınmasında (Kato vd., 1999; Groisman, 2001), UhpB/UhpA'nın, glikoz 6 fosfatın taşınmasında (Webber ve Kadner, 1997), KdpD/KdpE'nin potasyum taşınmasında (Walderhaug vd., 1992; Gassel vd., 1999), BaeS/BaeR'nin, çoklu ilaç direncinde (Baranova ve Nikaido, 2002; Nagakubo vd., 2002), RcsC/RcsB'nin kapsül oluşumunda (Laubacher ve Ades, 2008), CpxA/CpxR'nin bazik pH, biyofilm oluşumu ve aşırı sentezlenen salgı proteinleri gibi hücre zarf stresleri ile ilişkili şartlarda (Danese ve Silhavy,1998; Langen

vd., 2001; Snyder vd., 1995) ve ayrıca hücre yüzeyindeki bozulmalarda (Otto ve Silhavy, 2002; Danese vd., 1995), EvgS/EvgA'nın, logaritmik fazdaki hücrelere asit direnci kazandırmada (Itou vd., 2009; Ma vd., 2004; Masuda ve Church, 2002; 2003), hücrelerarası haberleşmeden sorumlu olan QesC/QesB'nin flagella regülasyonunun ekspresyonunda (Sperandio vd., 2002), CheA/CheB'nin kemotaksis düzenlenmesinde, CheA/CheY'nin flagellanın hareketinde ve HydH/HydG (ZraS/ZraR)'nin, çinko ve kurşun varlığına duyarlı olup bu maddelere karşı direnç mekanizmasında (Noll vd., 1998) görevli oldukları belirlenmiştir. Ayrıca tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen YehU/YehT'nin çalışmasının siklik AMP (cAMP), cAMP reseptör proteinine (CRP) bağlı olduğu (Kraxenberger vd., 2012) ve YpdA/YpdB'nin ise hücre dışındaki pirüvat tarafından uyarılarak direnç proteini olduğu düşünülen yhjX geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde (Fried vd., 2013) görev almaktadır. Tanımlanan iki bileşikli sistemler arasında bulunan YedW/YedV, RstB/RstA, YfhK/YfhA'nın ise hangi şartlarda hangi genleri kontrol ettikleri henüz tespit edilememiştir.

Daha önce Tübitak 113T003 nolu proje ile CusS/R iki bileşikli sisteminin farklı stres şartlarında rolleri araştırılmıştır. Çalışılan *cusS/R* genlerinin pH stresi ile ilgili rolü olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bu proje kapsamında da CusS/R iki bileşikli sistemi mutantlarında pH stresi varlığında VBNC ye girişte bir rolünün olup olmadığı sorusuna yanıt aranmaktadır.

#### **1.4 CusS/ CusR İki Bileşikli Fosforlama Sistemi**

Bakır (Cu), bakterilerde birçok solunum sisteminde ve metabolizmada görev alan enzimler için esansiyel bir metal olması, dioksijen ve reaktif oksijen türlerinin zararlarının azaltılmasında bir rol oynamasına rağmen fazlalığı oldukça toksik olan bir metaldir. Toksik özelliği nedeni ile tarımsal alanlarda birçok antifungal ve antibakteriyel kimyasalın yapısında kullanılmaktadır. Aynı zamanda bakır yıllardır klinik ve klinik olmayan mikroorganizmaların baskılanmasını sağlayan antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden Cu toksisitesinden korunmak için bakteriler bir homeostatik mekanizmaya sahiptirler (Gudipaty vd. 2012).

*Escherichia coli*'de, hücrelerden fazla bakırın detoksifikasyonunda görevli iki tane kromozomal sistem olarak Cue ve Cus sistemlerinin olduğu belirlenmiştir. Bu sistemlerden ilki cue sistemi olup, *copA* ve *cueO* genlerini Cu düzenleme proteini olan CueR'nin regüle ettiği sistemdir. Diğeri ise CusSR iki bileşikli fosforlama sistemidir. Bu iki bileşikli

fosforlama sistemi Cu konsantrasyonuna göre CusCFBA genlerini kontrol ederek hücrenin Cu toksisitesinden korunmasında görev alır. (Munson vd. 2000; Petersen ve Moller 2000; Stoyanov vd. 2001; Grass ve Rensing 2001; Rensing ve Grass 2003).

CusSR aynı zamanda gümüş tarafından da indüklenerek gümüşe karşı korunmada da rol oynar. İki sistemin aerobik ve anaerobik şartlarda farklı çalıştıkları belirlenmiştir (Outten vd. 2001). Düşük ve orta düzeydeki bakır toksisitesinde cue sistemi, yüksek bakır düzeylerinde ise cus sistemi devreye girmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmada zarf stres cevabını düzenleyen CpxR-CpxA ikili sisteminin bakır homeostatik genlerin düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir. (Yamamoto ve Ishihama 2006). İki bileşikli fosforlama sistemlerinin çapraz düzenlemelerde rol aldığı düşünüldüğünde bu sistemin antibiyotik gibi kimyasal maddelere karşı direnç gösterilmesinde görev alabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sıcaklık, pH ve diğer stres koşullarında nasıl tepki gösterdiği bilinmemektedir.

## 2. MATERYAL METOD

### 2.1 Kullanılan *E. coli* Suşları

Çalışmada kullanılan *Escherichia coli* mutant suşları Tübitak 113T003 nolu projemizde elde edilmiş ve Tablo 1' de gösterilmiştir. Oluşturulan bu mutantlar ve yabani tip *E. coli* çalışmada kullanılmak üzere %40 gliserol (Merck) içeren LB besiyerinde -80 °C'de derin dondurucuda (Panasonic) saklanmaktadır. Çalışmalar sırasında derin dondurucudan çıkarılarak kanamisin antibiyotiği içeren LB agar petrilere tek koloni ekimi yapılarak kullanılmıştır.

### 2.2 Koloni PZR

Derin dondurucudan çıkarılarak yeniden canlandırılan mutantların doğrulamasında koloni PZR yöntemi kullanılmıştır. Bunun için mutantlar 20 ul distile su içinde süspanse edildi ve 2,5 µl si 0,2ml'lik PZR tüpüne konuldu. Bakteri süspanasyonu üzerine Tablo 2 de ki reaksiyon karışımından 7,5 µl dağıtıldı. Her bir genin doğrulaması için uygun primerler de Tablo 3 gösterildi.

PZR reaksiyonu hazırlandıktan sonra Tablo 4 de ki reaksiyon döngü koşullarına göre PZR yapıldı.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan yabani tip *E. coli* W3110 ve mutant suşları.

| Suşlar            | Genotip                          | Kaynak   |
|-------------------|----------------------------------|--|
| W3110             | Yabani tip W3110                 | Lab stok   |
| JW5082            | BW25113 <i>cusS::km</i>          | Keio Koleksiyonu                                     |
| JW0560            | BW25113 <i>cusR::km</i>          | Keio Koleksiyonu                                     |
| OK102             | W3110 <i>cusS::km</i>            | TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 nolu projede elde edildi. |
| OK103             | W3110 <i>cusR::km</i>            | TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 nolu projede elde edildi. |
| OK106             | W3110 <i>cusS::km pnt3::cusS</i> | TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 nolu projede elde edildi. |
| OK107             | W3110 <i>cusR::km pnt3::cusR</i> | TÜBİTAK 1002 kodlu 113T003 nolu projede elde edildi. |
| <b>Plazmitler</b> |                                  |  |
| JW5082            | <i>pnt3::cusS</i>                | ASKA Klone   |
| JW0560            | <i>pnt3::cusR</i>                | ASKA Klone   |

Çalışmada kullanılacak olan mutantların koloni PZR yöntemi ile tekrar doğrulaması yapılmıştır. Her bir genin doğrulaması için kullanılan primerler Tablo 2'de gösterilmiştir. PZR reaksiyonu Tablo 3' deki döngü koşullarına göre yapılmıştır.

**Tablo2.** Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.

|  |               |
|--|---------------|
| 10x ThermoPol Reaksiyon Buffer(Biolab)                 | 1,0 µl        |
| 10mM dNTP Mix  | 0,2 µl        |
| 10µM ileri primer (İnvitrogen)                         | 0,5 µl        |
| 10 µM geri primer (İnvitrogen)                         | 0,5 µl        |
| 2mM Mg <sup>2+</sup> içeren MgCl <sub>2</sub> (Biolab) | 0,6 µl        |
| 0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)                       | 0,05 µl       |
| dH <sub>2</sub> O                                      | 4,65 µl       |
| <b>Total</b>   | <b>7,5 µl</b> |

**Tablo 3.** PZR reaksiyonunda kullanılan primerler.

|                           |                               |
|---------------------------|-------------------------------|
| Evrensel K1 geri primeri  | 5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT 3'    |
| W3310::cusS ileri primeri | 5' TATGCCGCCAACTTTACTCG 3'    |
| W3310::cusR ileri primeri | 5' GTAGCTTCCCAGCAACAGTT 3'    |
| pnt3::cusS ileri primeri  | 5' GCCGTCAGTAAGCCATTCAGCG 3'  |
| pnt3::cusS geri primeri   | 5' CCAGCGGGTAATGTGATAACAAA 3' |
| pnt3::cusR ileri primeri  | 5' GCCAAACTGTTGATTGTCGAAGA 3' |
| pnt3::cusR geri primeri   | 5' CCCTGACCATCCGGCACCTCAAG 3' |

**Tablo 4.** PZR döngü koşulları.

|       |       |          |
|-------|-------|----------|
| 94 °C | 3dk   | 1 döngü  |
| 94 °C | 1dk   | 30 döngü |
| 58 °C | 1dk   |          |
| 72 °C | 1,5dk |          |
| 4 °C  | 10dk  | 1 döngü  |

### 2.3 Agaroz Jel Elektrofrez

%1'lik agaroz hazırlamak için 1 g agaroz (Sigma) ve 100 ml 1x TBE kullanıldı. Mikrodalga'da ısıtılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Üzerine 10 mg/ml EtBr (Sigma) stoğundan 1 µl EtBr eklendi. Elektrofrez cihazının tankına hazırlanan agaroz jeli döküldü. Donduktan sonra 5 µl DNA 1 µl loading dye (Sigma) ile karıştırılarak jele yüklendi.

### 2.4 Fosfat Tampon Hazırlanması

Tamponlar 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) ve 0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) hazırlandı. Bunlar belirli oranlarda karıştırılarak 10 mM pH 8.5 tampon hazırlandı.

## 2.5 Yaşam DeneYleri

+4 °C' de buzdolabında muhafaza edilen petrilere tek koloni bakteriler 20 ml'lik LB broth besiyeri içeren erlenlere ekildi. 37 °C' de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bakterilerin spektrofotometrede OD600'de yoğunluğu ölçüldü. Bakterilerin yoğunluğu 1.0' a ayarlanarak 1,5 ml'lik ependorflara 1 ml alındı ve 10.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, 2 kez ringer ile yıkanarak süspansiyon edilen bakteri tekrar santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından supernatant kısım ependorftan tekrar uzaklaştırıldı ve ependorfa 1 ml ringer eklendi. Daha sonra bu süspansiyondan 100 µl alınarak başlangıç sayısı yaklaşık  $2.5 \times 10^6$  olacak şekilde bakteriler pH 8.5 tampon içeren erlenlere ayrı ayrı ilave edildi. Başlangıç saatindeki (0. Saat) bakteri sayısını belirlemek için erlenlerden 100 µl alınarak 900 µl ringer solüsyonu bulunan ependorfa aktarıldı ve seri dilüsyon metodu ile sayımları yapıldı. Bu arada erlenler 37 °C deki çalkalama olmaksızın inkübatöre kaldırıldı ve 30 gün inkübasyon yapıldı. 10 ar gün aralıklarla seri dilüsyonla sayım yapabilmek için 100 er µl örnek alındı ve petrilere sayımları yapıldı. Petri sayımları için, erlenlerden ringer solüsyonuna alınan bakteriler  $10^4$ 'e kadar seri sulandırma yapıldı ve nütrient agar besiyerine drigalski spatülü yardımı ile yayıldı ve 37 °C bir gece inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra petrileredeki bakteri kolonileri sayıldı. Ayrıca örnek alımı sırasında VBNC ye giren bakteri sayısını da belirlemek için erlenlerden 1 ml örnek alındı ve VBNC ye giren bakteri sayısı live dead baclight kiti ile aşağıda anlatıldığı gibi boyandı ve floresans mikroskopta incelendi.

## 2.6 Membran Bütünlüğüne Sahip Bakterilerin Sayımı

Ticari yolla temin edilen LIVE/DEAD bakteriyal kitin içerisindeki metoda göre bakteri sayımı gerçekleştirildi. Bu kit içinde 2 farklı boya olup bu boyaların spektral karakterleri ve hücre membranlarından geçiş özellikleri farklıdır. Bu boyalardan propidium iyodid (kırmızı floresanlı nükleik asit boyası) ile hasarlı membrana sahip olan yani ölmüş bakterileri boyarken, SYTO 9 (yeşil floresanlı nükleik asit boyası) ile sağlam membrana sahip olan yani canlı hücreleri boyamaktadır. Deney öncesinde iki boya 1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı. Sayımı yapılacak olan örneklerden tüplere 1'er ml alındı ve üzerine 3 µl DMSO ve 3 µl Live/Dead karışımından ilave edildi. Karışım 15 dk. karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra bakteriyal süspansiyon polikarbonat filtrelerden süzülerek bakteriler filtre üzerine aktarıldı ve filtreler havada kurutuldu. Kurutulan filtreler ile epifloresans mikroskopta uygun filtre küpleri ile incelendi ve bakterilerin sayımı yapıldı. En az 10 farklı alanın sayımı yapılacak ve ortalaması alındı. Elde edilen değer ile filtrenin alanından ml'deki bakteri sayısına ulaşıldı.

### 2.7 Direkt mikroskopik bakteri sayımı

Bu sayımda Nalidixic asit kullanılarak bakterilerin replikasyonları engellenerek ve substrata cevaplarına göre epifloresans mikroskopta sayımları yapılmıştır (Kogure vd., 1979). Nalidixic asit genellikle gram (-) bakterilerde kullanılan, replikasyonu engelleyen bir antibiyotiktir. Yaşam deneyi erlenlerinden alınan örnekler ilave edilen Nutrient broth ile bakterilerin beslenmesi sağlanırken, bu antibiyotik ile bölünmeleri engellenerek besini alıp kullanabilen fakat bölünemeyen bakterilerin sayımları yapılacaktır. Bakteriler besini alıp kullanırken bölünemedikleri için normalden daha uzun hücreler oluşmaktadır. Örneklerden 1 veya 5'er ml alınarak steril deney tüplerine konuldu. Üzerine %10 Nutrient brot ve 10 µg/ml son konsantrasyonu olacak şekilde Nalidixic asit (0.1 mg/ml stoktan) ilave edilen örnekler alimünyum folyo ile kaplandı ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 160 rpm hızda 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde %37'lik formaldehit ilave edilerek bakterilerin ölmesi sağlandı. Örnekler steril enjektör yardımı ile Swinnex filtre kutuları arasına yerleştirilmiş polikarbonat membran filtrelerden geçirilerek bakterilerin filtrelerde kalması sağlandı ve filtreler daha sonra 0.5 ml Acridine orange (%0.01 stoktan) ile 10 dk. boyandı. Sayımlar epifloresan mikroskopta UV ışığı altında özel filtre ile yapıldı Elde edilen sayılar logaritmik değerlere çevrilerek kullanılacaktır.

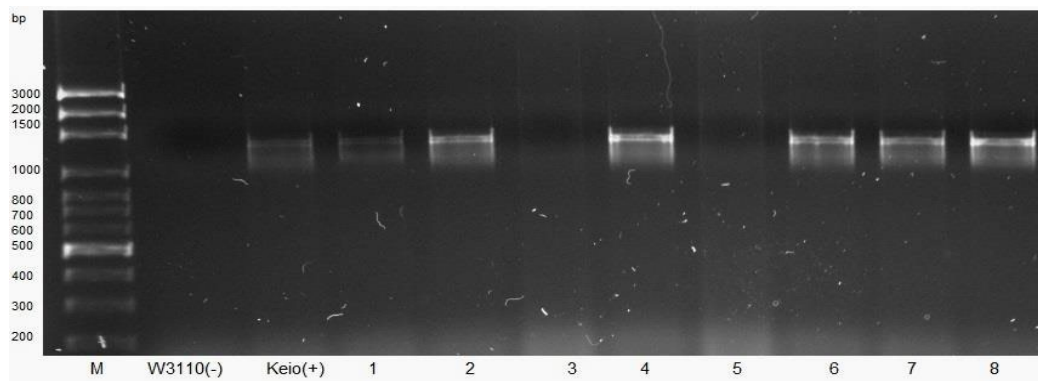
### 2.8 Solunum yapan bakterilerin sayımı

Solunum yapan bakteri sayımı CTC ile Rodriquez vd. (1992)'nin uyguladığı yöntem ile gerçekleştirildi. CTC stok solüsyonunun hazırlanması için 100 mg 5-Cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride (CTC) 6.6 ml iki kez distile edilmiş saf suda çözündürüldükten sonra alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta 4 °C'de saklandı. Son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde CTC stoğundan, su örneklerine ilave edildi. CTC sayımı için pH 8,5 fosfat tampon örneklerinden 1 veya 2 ml örnek alınarak steril deney tüplerine aktarıldı. Üzerine 40 µl CTC stoğundan ilave edilerek tüpler alüminyum folyo ile kaplanarak çalkalamalı inkübatörde 160 rpm hızda, 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 5 µl formaldehit ilave edilerek bakterilerin ölmesi sağlandı. 4,6-Diamidino-2-phenylindole.2HCl (DAPI) stok solüsyonu 2,5 mg/ml olacak şekilde iki kez distile edilen saf su ile hazırlanacak ve karanlıkta -20 °C'de saklandı. Hazırlanan DAPI, son konsantrasyonu 15 µg/ml olacak şekilde sulandırılarak bakterilerin boyanmasında kullanıldı. Örnekler polikarbonat filtrelerden geçirildikten sonra filtreler DAPI ile 10 dk boyandı. Sayımlar epifloresan mikroskopda (Olympus BX51) gerçekleştirilecektir. UV ışığının zararlı etkisini azaltmak için filtre küpler kullanılacaktır.

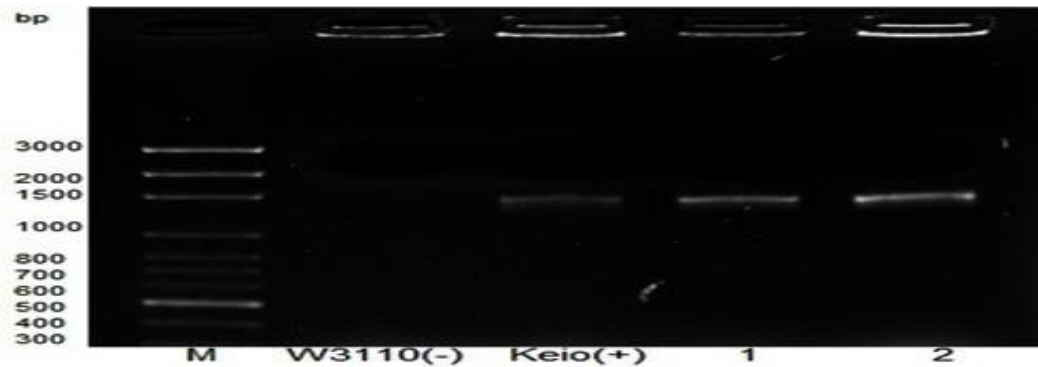
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Mutantların Doğrulanması

Her bir gen için kendisine ait ileri primer ve k1 primerleri kullanılarak PZR yapıldı. Elde edilen mutantların PZR görüntüleri Şekil 1-2' de verilmiştir. Negatif kontrol olarak yabancı tip *E. coli* W3110 kullanılırken pozitif kontrol olarak her bir genin keio koleksiyondan alınan *E. coli* BW25113 suşundaki mutantlar kullanıldı. Şekilde görüldüğü gibi f-k1 primerleri ile elde edilen *cusS::km* mutanını 1306 bp (Şekil 1) iken *cusR::km* 1403 bp bant büyüklüğüne sahip (Şekil 2) PZR ürünü elde edilmiştir.



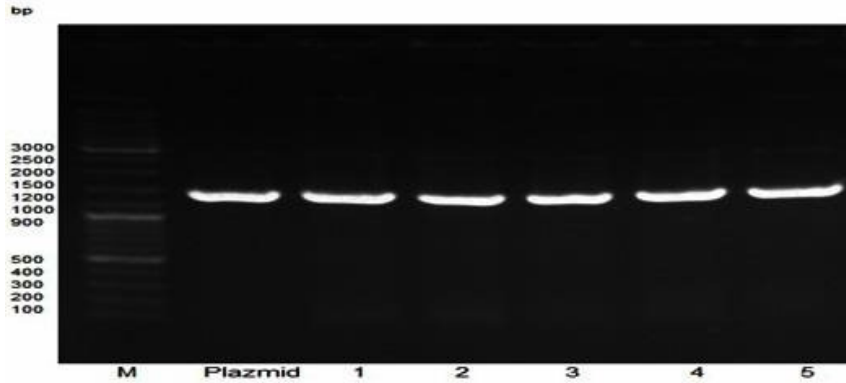
Şekil 1 Yabancı tip *E. coli* ve *cusS* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.



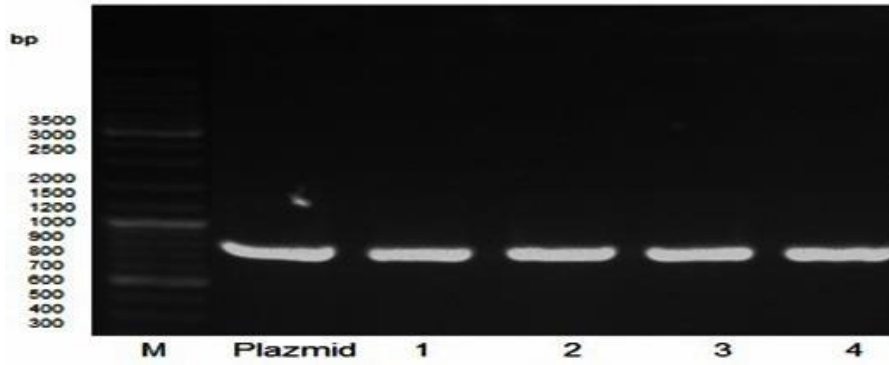
Şekil 2 Yabancı tip *E. coli* ve *cusR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

Tamamlama testleri için yukarıda elde ettiğimiz mutantlara keio koleksiyondan temin edilen ilgili genleri içeren plazmitler izole edilip transforme edilmiştir. Transformasyon sonrasında oluşan tamamlanmış mutant hücrelerde her bir gen için kendisine ait olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR ile doğrulanmış ve Tablo 2' de gösterilmiştir. Elde edilen mutantların ve pozitif kontrol BW25113 plazmidinin PZR görüntüleri Şekil 3-4' de

verilmiştir. Elde ettiğimiz mutantlardan *pnt3::cusS* mutantı 1489 bç (Şekil 3) iken *pnt3::cusR* mutantı 730 bç (Şekil 4) bant büyüklüğüne sahiptir.

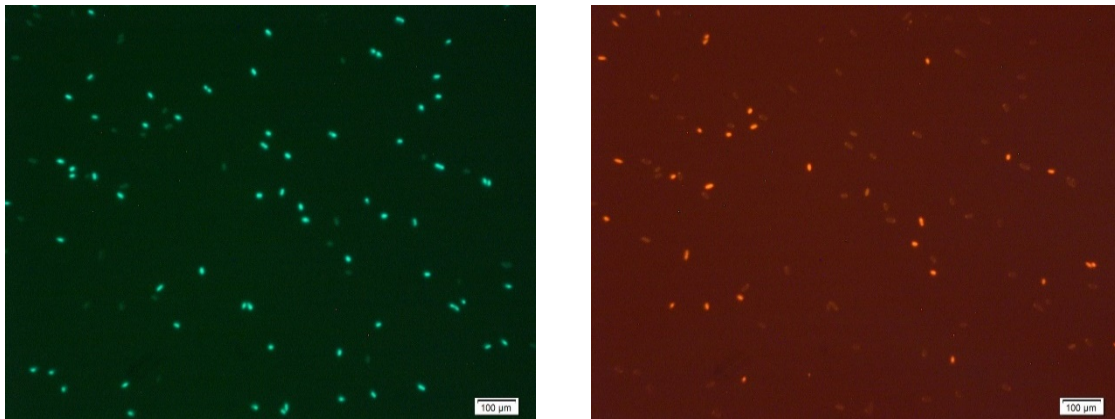


Şekil 3 *E. coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::cusS* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.

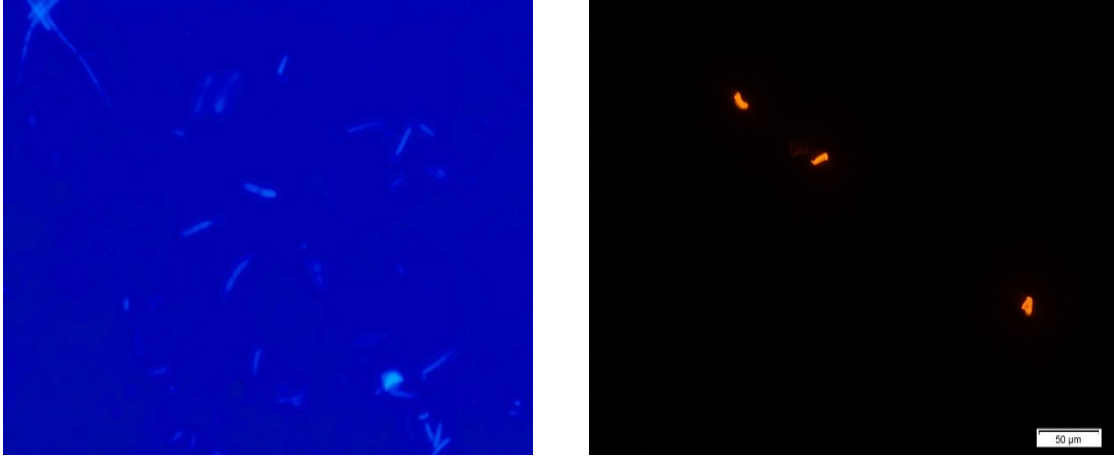


Şekil 4 *E. coli* BW25113 plazmidi ve *pnt3::cusR* mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü

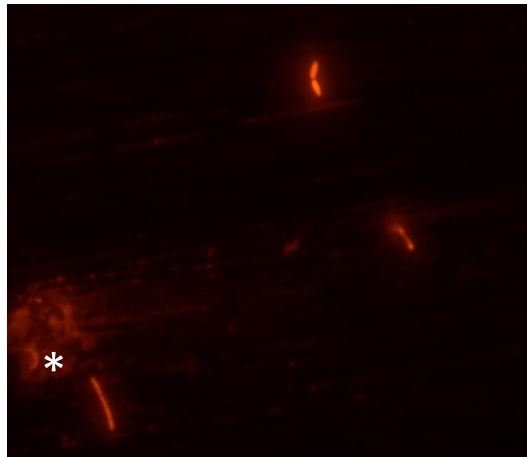
### 3.2 VBNC Bakterilerin Floresan Mikroskopta Tespiti



Şekil 5 Floresans mikroskopta membran bütünlüğüne sahip bakterilerin görüntüsü. (green floresan SYTO 9 (sağlam membran bütünlüğüne sahip hücre) ve propidyum iyodid(hasarlı membrana sahip hücre.)



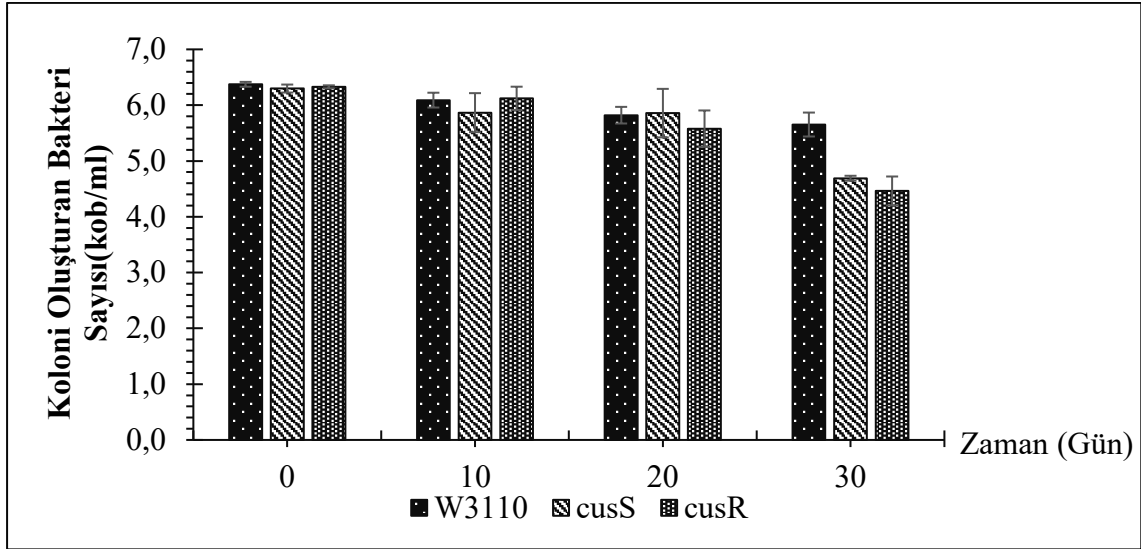
**Şekil 6** Floresans mikroskopta DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)-CTC boyama ile solunum yapan bakterilerin görüntüsü



**Şekil 7** Nalidiksik asit- Acridine orange direk mikroskobik sayım (\* uzayan bakteri)

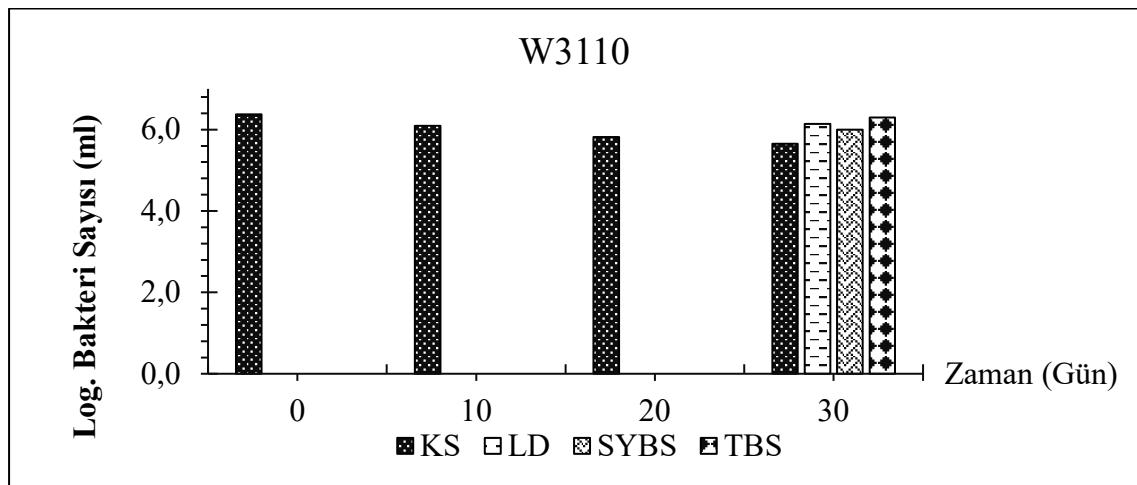
### 3.3 Yaşam Deneyi Sonuçları

Alkali pH da yapılan yaşam deneyleri plak sayımları sonucunda Şekil 8 de görüldüğü gibi *E. coli* de 6.37 logaritmadan 5.65 logaritmaya azalma görülürken, *cusS* mutant *E. coli* de 6.30 dan 4.69 logaritmaya, *cusR* mutant *E. coli* de ise 6.33 den 4.46 logaritmaya azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *cusS* ve *cusR* mutant *E. coli* hücreleri yabancı tipten daha kısa sürede azalmaktadır.

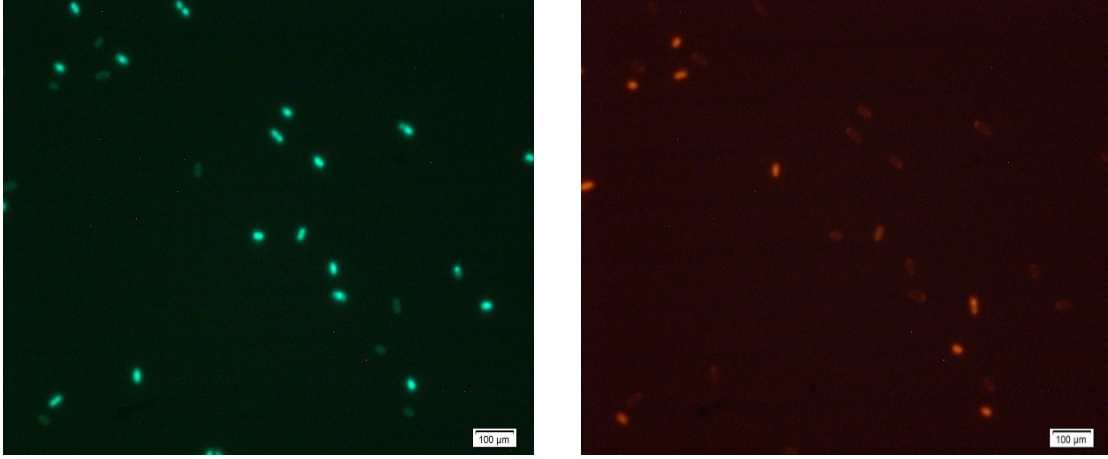


Şekil 8 Yabani tip *E. coli* ve mutantların yaşamına alkali pH (8.5) etkisi

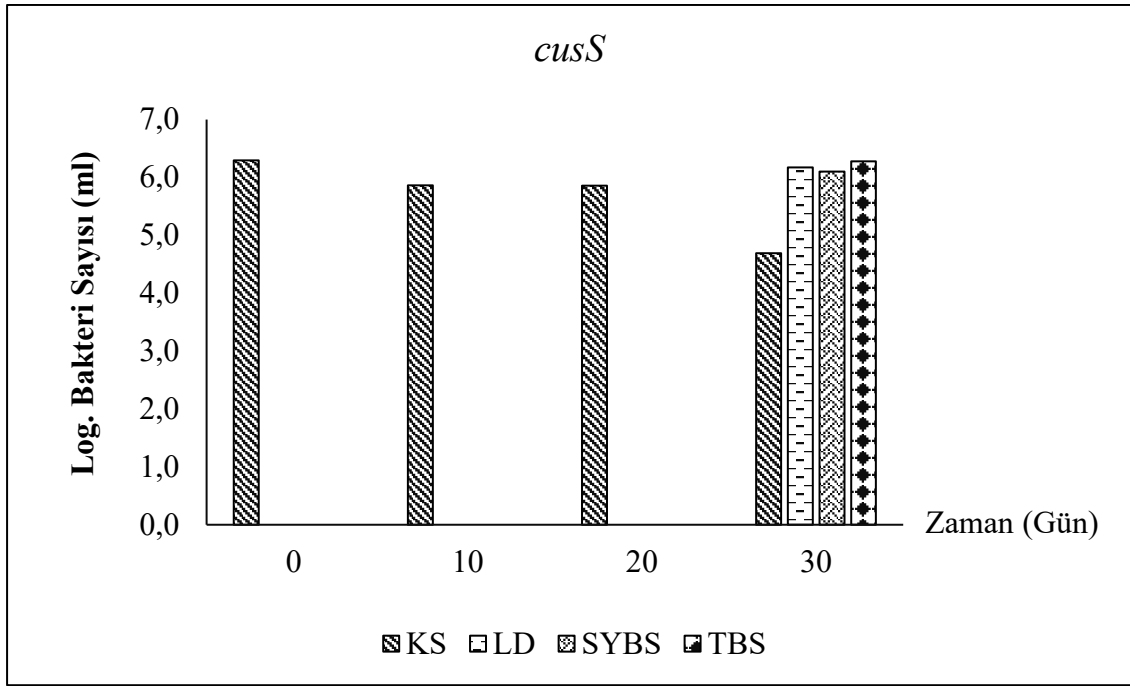
Yabani tip ve *cusS/R* mutantları ile alkali pH da yapılan çalışmanın 30.gün floresan mikroskop sayım sonuçları Şekil 9, 11 ve 13 de grafik olarak verilmiş olup, şekil 10, 12 ve 14 de de ölü ve canlı hücre fotoğrafları yer almaktadır. Live Dead sayım sonuçlarına göre yabani tip *E. coli* 0.3 log. hücre VBNC ye girerken *cusS* mutant 1,41 log. *cusR* mutant ise 1.7 log. hücre VBNC ye girmiştir. CTC sayım sonuçlarına göre yabani tip *E. coli* 0.5 log. hücre VBNC ye girerken *cusS* mutant 1,5 log. *cusR* mutant ise 1.69 log. hücre VBNC ye girmiştir. Bu sonuçlar plak sayımında meydana gelen azalmanın ölümden değil, hücrelerin VBNC ye girmesinden kaynaklandığını göstermektedir.



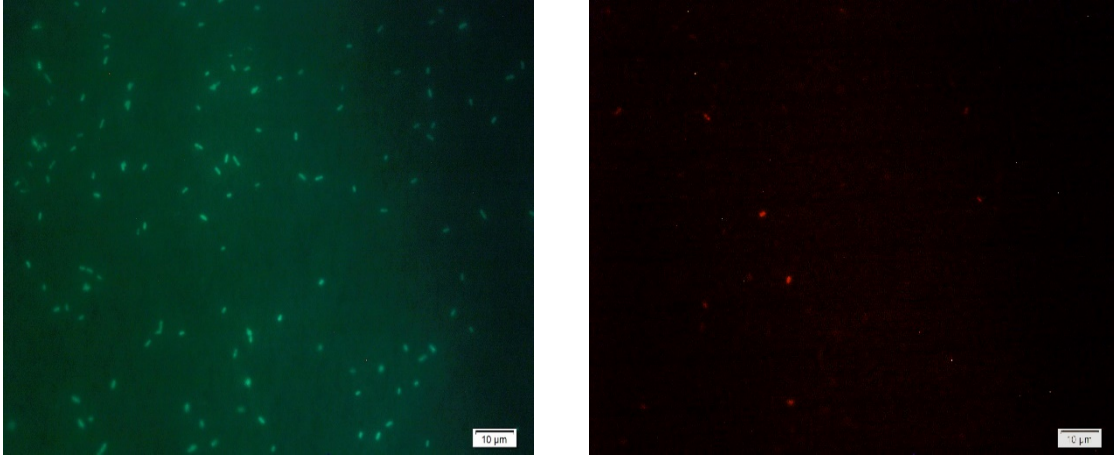
Şekil 9 Yabani tip *E. coli* nin alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları (KS: koloni sayımı, LD: Live Dead sayımı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



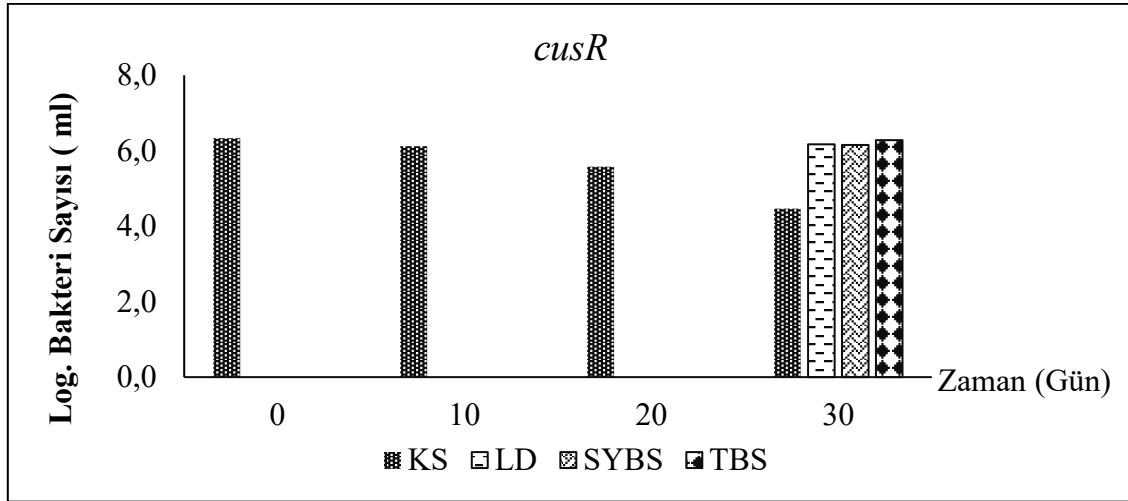
Şekil 10 Yabani tip *E. coli* de membran bütünlüğüne sahip bakterilerin tespiti



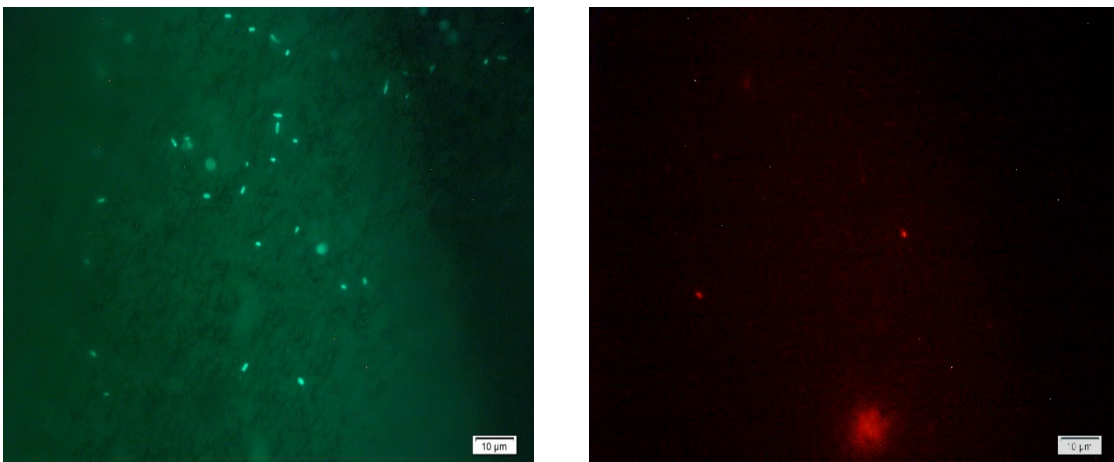
Şekil 11 *cusS* mutantının alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları (KS: koloni sayımı, LD: Live Dead sayımı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 12 *cusS* mutantta membran bütünlüğüne sahip bakterilerin tespiti



Şekil 13 *cusR* mutantının alkali pH (8.5)'da bakteri sayıları (KS: koloni sayımı, LD: Live Dead sayımı, SYBS: Solunum yapan bakteri sayısı, TBS: Toplam bakteri sayısı)



Şekil 14 *cusR* mutantta membran bütünlüğüne sahip bakterilerin tespiti

#### 4. SONUÇ

Bakteriler doğal ortamlarda osmolarite, hidrostatik basınç, sıcaklık, bazı kimyasal maddeler, açlık ve pH gibi birçok stres faktörüne maruz kalmaktadır. Bu tür durumlarda mikroorganizmalar hayatta kalabilmek için stresle ilişkili cevap regülatörlerini devreye sokarak gen ekspresyonlarını düzenler ve strese karşı bir yanıt oluşturarak hayatta kalırlar (Matin, 1991; Nyström ve diğerleri, 1992). Bu stratejilerden biriside VBNC formudur.

Bu çalışmada, daha önceki projemizde asidik ve alkalin pH da açlık ortamında yaşam için rolü olduğu tespit edilmişti. TÜBİTAK 1002 kapsamında yapılan çalışmada ve bu çalışmadan elde edilen yüksek lisans tezinde *cusS* ve *cusR* mutantlarının yabani tipe göre asidik ve alkali şartlara duyarlı olduğu belirlenmişti. *E. coli* yabani tip alkali ortamda (pH 8.5) t99 değerine göre 57 günde 2 log azalma gösterirken, *cusS* mutant 31, *cusR* mutant 34 günde 2 log azalma gösterdiği tespit edildi. Bu bulgulardan sonra bu azalmanın bakterilerin VBNC forma girişindenmi kaynaklandığını belirlemek için bu proje gerçekleştirilmiştir. Dolayısı ile *cusS/R* iki bileşikli sisteminin VBNC ile ilişkisi araştırılmıştır. *E. coli* *cusS/R* iki bileşikli sistemi, *CusCFBA* genlerini kontrol ederek hücrenin Cu ve Ag toksisitesinden korunmasında görev alan bir sistemdir. (Munson, vd., 2000; Stoyanov, vd., 2001; Grass ve Rensing, 2001; Rensing ve Grass, 2003). Bu iki bileşikli sistemin pH homeostazi ve açlık stresi ile bir ilişkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlara göre yabani tip *E. coli* alkali pH da 6.37 log. değerinden 30 gün sonunda 5,65 log. ya azalırken *cusS* 6.30 log. dan 4.69 log. ya, *cusR* ise 6.33 log. dan 4.46 ya azalmıştır. Bu sonuçlar *cusSR* iki bileşikli sisteminin alkali pH da açlık ortamında hücrenin yaşamı için gerekli olduğunu göstermiştir. Çalışmanın devamında bakterilerde meydana gelen bu azalmanın ölümden mi yoksa VBNC ye girmesinden dolayı mı olduğunu anlamak için hücreler özel floresan boyalar ile boyanarak VBNC durumları araştırılmıştır.

Birçok mikroorganizmanın çeşitli stres durumlarında VBNC'ye girdiği bilinmektedir. J. E vd. (2015) alkali sodyum tamponunda yapmış oldukları çalışmada pH 9 ve 11 de *E. faecalis*'in çok kısa sürede VBNC duruma girdiğini göstermişlerdir (J.E. vd., 2015). Nowakowska ve Oliver (2012) *Vibrio vulnificus*'un 2 farklı genotipi ile yapmış oldukları çalışmada hücrelerin alkali ortamda VBNC duruma indüklendiğini tespit etmişlerdir. Ancak yine aynı çalışmada aynı türün farklı genotipleri arasında VBNC durumun değişiklik gösterdiğini de vurgulamışlardır (Nowakowska ve Oliver 2012).

Literatürde yapılan birçok çalışma, gerek sodyum-potasyum tamponları gerekse doğal veya yapay deniz sularında mikroorganizmaları VBNC duruma indükleyen etkenin

tuzluluğun yanı sıra pH daki alkalilik olduğudur (Carlucci ve Pramer, 1959; Rozen ve Belkin, 2001).

*E. coli*'de hücreler VBNC duruma geçtiğinde bazı proteinlerde artış görülmektedir. Bunların bazıları; uzama faktörü Tu, enolaz, D-3 fosfogliserat dehidrogenaz ve treonin sentazdır. Tüm bu proteinler açlık stresiyle ilişkilidir ve diğer stres koşullarıyla ortak özellik göstermektedir (Pinto vd., 2015; Heim, 2002).

Muela vd., (2008) nin çalışmalarında, gıda izolatu *E. coli* EHEC O157'nin VBNC duruma girişinde OmpW porin proteininin farklı ekspresyonunun etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Asakura vd (2008) nin makalesinde ise deniz suyu, suboptimal sıcaklık ve açlık stresleri gibi farklı stres şartları altında *E. coli*'nin dış membran proteinin (OmpW) sentezindeki değişimin VBNC durumun indüklenmesinde bir rolünün olduğunu ifade etmişlerdir. Ancak bu proteinlerin değişimi mekanizma ile ilişkili değildir. Çünkü bu proteinler kanal proteinleridir ve mekanizmayı tetikleyen ve kontrol eden bir özelliğe sahip değildir (Asakura et al., 2008; Muela et al., 2008).

Ayrıca RpoS (Boaretti vd., 2003; Kusumoto vd., 2012), EnvZ (Darcan vd., 2003; Darcan, 2005) ve polifosfat kinaz 1 (PPK1; Gangaiah vd., 2009) VBNC duruma geçişi indükleyen ve mekanizmayı kontrol eden genler arasında yer almaktadır. Darcan vd. *ompC* ve *ompF* genlerinin düzenlenmesinden sorumlu olan EnvZ-OmpR iki bileşikli sistemi ile açlık ve pH ortamında VBNC durumu çalışmış ve envZ' deki mutasyonun VBNC durumunu indüklediğini bulmuşlardır (Darcan vd., 2003; Darcan, 2005).

Bu çalışmada da EnvZ-OmpR iki bileşikli sistemi dışında başka bir iki bileşikli sistem olan CusSR sisteminin alkali pH da açlık ortamında VBNC ile ilişkili bir rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonunda floresan mikroskop altında belirlenen canlı hücre sayısının koloni oluşturan hücre sayısından fazla çıktığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar hücrelerdeki sayısal azalmanın ölümden değil, hücrelerin VBNC forma geçtiklerinin bir göstergesidir. Dolayısı ile envZ nakavt edildiğinde VBNC forma girmezken, *cusS* ve *cusR* nakavt edildiğinde VBNC forma girdikleri belirlenmiştir. Dolayısı ile, yabancı tipten daha kısa sürede plak sayımındaki azalmanın nedeni ölüm değil, VBNC forma giriş olduğu tespit edilmiştir.

Literatür araştırmaları sonucunda CusS ve CusR iki bileşikli sistemin VBNC ile ilişkisine dair bir veriye rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu genler nakavt olduğunda hücrede meydana gelen azalmanın VBNC durumdan kaynaklandığını ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir.

## KAYNAKLAR

- 1 Artz, R.R.E., Avery, L.M., Jones, D.L. ve Killham, K. 2006. "Potential pitfalls in the quantitative molecular detection of *Escherichia coli* O157: H7 in environmental matrices", *Can. J. Microbiol.* 52, 482--488.
- 2 Ben Abdallah, F., Lagha, R. ve Bakhrouf, A. 2008. "Resuscitation and morphological alterations of *Salmonella* bovismorbificans cells under starvation in soil", *World J. of Microbiol. Biotechnol.* 24, 1507--12.
- 3 Cappelier, J.M., Minet, J., Magras, C., vd. 1999. "Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation", *Appl. and Environ. Microbiol.* 65, 5154--7.
- 4 Carlucci A. F. AND Pramer D. 1959." An Evaluation of Factors Affecting the Survival of *Escherichia coli* in Sea Water"II. Salinity, pH, and Nutrients", *apblemicro.* 8 247-250.
- 5 Colwell, R.R., Knight, I.T., Somerville, C., Shults, S. ve Kaspar, C.W. 1989. "Viable but non-culturable phenomenon in relationship to starvation/survival, "Injury", and strategies for survival of bacteria in the environment", *Recent Advances in Microbial Ecology, 5th International Symposium on Microbial Ecology, Japan*, p 85-88.
- 6 Darcan C., Özkanca R., İdil Ö. ve Flint K.P. 2009a. "Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water", *Pol. J. Microbiol.* 58, 307--17.
- 7 Defives C., Guyard S., Oulare M.M., vd. 1999. "Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study", *J. Appl. Microbiol.*, 86, 1033--8.
- 8 Dinu, L.D. ve Bach, S. 2011. "Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor", *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8295--302.
- 9 Dreux, N., Albagnac, C., Federighi, M., vd. 2007. "Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state", *J. Appl. Microbiol.* 103, 1272--81.
- 10 Dwivedi, H.P. ve Jaykus, L.A. 2011. "Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions", *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 40--63.
- 11 Egger, L. A., Park, H. and Inouye, M., "Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay", *Genes Cells*, 2: 167-184 (1997).
- 12 Fiksdal, L. ve Tryland, I. 1999. "Effect of UV light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli*  $\beta$ -D-galactosidase activity and other potential viability parameters", *J. Appl. Microbiol.*, 87, 62-71.
- 13 Flint, K.P., 1987. "The long-term survival of *Escherichia coli* in river water", *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 261-270.
- 14 Gavriel, A. A., Landre, J. P. ve Lamb, A. J. 1998. "Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland", *J. Appl. Microbiol.* 84, 383-392.
- 15 Gin, K.Y. ve Goh, S.G. 2013. "Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) *Enterococcus*", *Water Res.* 47(10), 3315-3328.
- 16 Grass G., Rensing C., "CueO Is a Multi-copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in *Escherichia coli*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286: 902--908 (2001).
- 17 Gudipaty A. S., Larsen A., S., Rensing C., McEvoy M.M., "Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS", *Published in final edited form as: FEMS Microbiol Lett.*, 330 (1): 30--37 (2012).
- 18 Hatzinger, P.B., Palmer, P., Smith, R.L. vd. 2003. "Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria", *J. Microbiol. Methods*, 52, 47-58.
- 19 Hoch, J.A., "Two component and phosphorelay signal transduction", *Current Opinion in Microbiol.* 3: 165-170 (2000).
- 20 J. E, Jiang Y.T., Yan P.F. and Liang J.P. 2015. "Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state" *Genetics and Molecular Research* 14 (4): 14790-14801.
- 21 Joux, F., Leboran, P. ve Trouselier, M. 1997. "Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms", *FEMS Microbiol. Ecology*, 22, 65-76.
- 22 Kaprelyants, A.S. ve Kell, D.B. 1992. "Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow-cytometry", *J. Appl. Bacteriol.* 72, 410--22.
- 23 Kjelleberg, S., Hermansson, M. ve Marden, P., 1987. "The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment", *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 25-49.
- 24 Kogure, K., Simidu, U. ve Taga, N. 1979. "A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria", *Can. J. Microbiol.*, 25, 415--20.
- 25 Kunkle DE, Bina XR and Bina JE.(2020) *Vibrio cholerae* *OmpR* contributes to virulence repression and fitness at alkaline pH *American Society for Microbiology*. doi:10.1128/IAI.00141-20
- 26 Laflamme, C. ve Lavigne, S. 2004. "Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes", *J. Appl. Microbiol.* 96, 684-692.
- 27 Lemke, M.J. ve Leff, L.G. 2006. "Culturability of stream bacteria assessed at the assemblage and population levels", *Microb. Ecol.* 51, 365--74.
- 28 Lesne, J., Berthet, S., Binard, S., Rouxel, A. ve Humbert, F. 2000. "Changes in culturability and virulence of *Salmonella typhimurium* during long-term starvation under desiccating conditions", *Inter. J. Food. Microbiol.* 60, 195-203.
- 29 Lewinson O, Padan E, Bibi E: Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:14073--14078.
- 30 Lewinson, O., Adler, J., Poelarends, G. J., Mazurkiewicz, P., Driessen, A. J. & Bibi, E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1667--1672.
- 31 Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver J.D. ve Faucher, S.P. 2014. "The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens", *Frontiers in Microbiology*, 5, 258.
- 32 Linder, K. ve Oliver, J. D. 1989. "Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (11), 2837-2842.

- 33 Liu, Y., Gilchrist, A., Zhang, J. ve Li, X.F. 2008. "Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water", *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1502--7.
- 34 Lopez, A. R., Comas, J. ve Vives, R. J. 1995. "Flow cytometric assessment of *E. coli* and *S. typhimurium* starvation survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide and oxonol", *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2521-2526.
- 35 Magarinos, B., Romalde, J.L., Barja, J.L. ve Toranzo, A.E. 1994. "Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment", *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 180--6.
- 36 Makino, S.I., Kii, T., Asakura, H., vd. 2000. "Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe?", *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5536--9.
- 37 Millet, V. ve Lonvaud-Funel, A. 2000. "The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136--41.
- 38 Muela, A., Garcia-Bringas, J.M., Arana, I. ve Barcina, I. 2000. "The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: the relative roles of UV-B, UV-A, and photosynthetically active radiation", *Microb. Ecol.* 39, 65-71.
- 39 Mukamolova, G.V., Turapov, O., Malkin, J., vd. 2010. "Resuscitation promoting factors reveal an occult population of tubercle bacilli in sputum", *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 181, 174--80.
- 40 Munson G., Lam D., Outten F. W., O'halloran T. V., "Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12", *Journal of Bacteriology*, 182 (20): 5864--5871(2000).
- 41 Nicolo, M.S., Gioffre, A., Carnazza, S., vd. 2011. "Viable but nonculturable state of foodborne pathogens in grapefruit juice: a study of laboratory", *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 11--7.
- 42 Nowakowska J. and Oliver J.D (2012) "Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state" *FEMS Microbiol Ecol*, 84, 213--222.
- 43 Oliver, J.D. 2005. "The viable but nonculturable state in bacteria", *J. Microbiology*, 43, 93--100.
- 44 Oliver, J.D. 2010. "Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria", *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 415--25.
- 45 Oliver, J.D. ve Bockian, R. 1995. "In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*", *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2620--3.
- 46 Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., vd. 1995. "Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment", *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2624--30.
- 47 Ordax, M., Biosca, E.G., Wimalajeewa, S.C., vd. 2009. "Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state", *J. Appl. Microbiol.* 107, 106--16.
- 48 Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V., "The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*", *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 33: 30670--30677 (2001).
- 49 Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA. 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim Biophys Acta* 1717:67--88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2005.09.010>.
- 50 Pawlowski, D.R., Metzger, D.J., Raslawsky, A., vd. 2011. "Entry of *Yersinia pestis* into the viable but nonculturable state in a low temperature tap water microcosm", *PLoS One*, 6, e17585.
- 51 Petersen, C., Moller, L. B., "Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator CopR", *Gene*, 261: 289--298 (2000).
- 52 Pinto, D., Almeida, V., Almeida, S. M. ve Chambel, L. 2011. "Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli", *J. Appl. Microbiol.* 110, 1601--11.
- 53 Pinto, D., Santos, M.A. ve Chambel, L. 2013. "Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms", *Crit. Rev. Microbiol.* 1-16.
- 54 Pompey, M., Butin, M., Derrien, A., vd. 1996. "Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight", *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4621--6.
- 55 Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A.R., Colwell, R.R. 1996. "Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1", *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 115--20.
- 56 Reissbrodt, R., Heier, H., Tschape, H., vd. 2000. "Resuscitation by ferrioxamine E of stressed *Salmonella enterica* serovar typhimurium from soil and water microcosms", *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4128--30.
- 57 Rensing C. and Grass G., "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment" *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 197-213 (2003).
- 58 Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K., ve Ridgway, H.F. 1992. "Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1801--8.
- 59 Rozen Y., and Belkin S. 2001. "Survival of enteric bacteria in seawater" *FEMS Microbiology Reviews* 25, 513-529.
- 60 Siegmund, H., ve Arneborg, N. 2011. "Assessment of survival of foodborne microorganisms in the food chain by fluorescence ratio imaging microscopy", *Trends Food Sci. Tech.* 22, S3--S10.
- 61 Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., Brown, N.L., "CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA", *Mol Microbiol.*, 39: 502--511(2001).
- 62 Suzuki, K., Iijima, K., Asano, S., vd. 2006. "Induction of viable but nonculturable state in beer spoilage lactic acid bacteria", *J. Inst. Brewing.* 112, 295--301.
- 63 Tanaka, Y., Yamaguchi, N. Nasu, M. 2000. "Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in natural river water determined by the use of flow cytometry", *J. Appl. Microbiol.* 88, 228-238.
- 64 Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H.G., vd. 1996. "Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride", *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4587--93.
- 65 Ultee, A., Souvatzi, N., Maniadi, K., König, H. 2004. "Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany", *J. Appl. Microbiol.* 96, 560-568.
- 66 Wanner, B. L., "Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacterial", *J. Bacteriol.*, 174: 2053--2058 (1992).

- 67 Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., vd. 1982. "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment", *Microb. Ecol.* 8, 313--23.
- 68 Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R, Ishihama A., "Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*", *J Biol Chem*, 280 (2): 1448-1456 (2005).
- 69 Yamamoto K., Ishihama A., "Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70 (7): 1688-1695 (2006).
- 70 Yohannes, E., Barnhart, D.M., and Slonczewski, J. L. (2004). "pH-Dependent Catabolic Protein Expression during Anaerobic Growth of *Escherichia coli* K-12" *Journal Of Bacteriology* 186, 192-199.
- 71 Zimmerman, R., Iturriaga, R. Becker-Birek, J. 1978. "Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number there of involved in respiration", *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 926-935.