

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**FARKLI STRES ŞARTLARINDA VBNC DURUMA İNDÜKLENEN *ESCHERİCHİA*
COLI W3110'DA MEYDANA GELEN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ÖZGE KAYGUSUZ İZGÖRDÜ

TEZ DANIŐMANI

PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2024

10664988

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**FARKLI STRES ŞARTLARINDA VBNC DURUMA İNDÜKLENEN *ESCHERİCHİA*
COLI W3110'DA MEYDANA GELEN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ÖZGE KAYGUSUZ İZGÖRDÜ

TEZ DANIŐMANI

PROF. DR. CİHAN DARCAN

BİLECİK, 2024

10664988

BEYAN

Farklı stres şartlarında VBNC duruma indüklenen *Escherichia coli* W3110’da meydana gelen morfolojik ve moleküler değişikliklerin araştırılması adlı doktora tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

| | | | |
|---|--|----------------------------|---|
| Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir. | | | |
| DESTEK ALINMIŞTIR | | DESTEK ALINMAMIŞTIR | X |
| Destek alındı ise; | | | |
| Destekleyen kurum; | | | |
| Desteğin Türü | | Proje Numarası | |
| 1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi) | | | |
| 2- TÜBİTAK | | | |
| Diğer; | | | |
| ETİK KURUL onayı var ise; | | | |
| ETİK KURUL karar tarih/sayı: | | | |

Öğrenci Adı ve Soyadı

Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ

Tarih

.../.../2024

İmza

.....

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın hazırlanması sürecinde bana rehberlik eden, sürekli olarak bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan, anlayış, destek ve teşvikleriyle bu sürecin en önemli yapı taşlarından biri olan değerli danışmanım Prof. Dr. Cihan DARCAN'a

Tez izleme komitesinde yer alan, çalışmam süresince beni her daim bilgi ve destekleriyle yönlendiren değerli hocalarım Prof. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ ve Doç. Dr. Ardahan ESKİ 'ye ayrıca tez savunma sınavıma katılan bilgi ve tecrübeleri ile tezimin son halini almasını sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ ve Prof. Dr. Önder İDİL'e

Tez çalışmam sırasında gerçekleştirdiğim ATR-FTIR sonuçlarının analizinde verdiği değerli destek ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Rafiq GURBANOV'a

Tez çalışmalarım sırasında SEM ve TEM deneylerini yapmamda bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nesil ERTORUN ve Doç. Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e

Eğitim hayatım boyunca üzerimde emeği olan tüm hocalarıma, ekip arkadaşlarıma ve hem aynı odayı hem de aynı laboratuvarı paylaştığım günün büyük bir kısmını beraber geçirdiğim değerli çalışma arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Osman TÜRKYILMAZ'a

Hayatımın her aşamasında ve özellikle de bu zorlu süreçte bana her zaman inanan, güvenen ve desteklerini esirgemeyen annem Gülbahar KAYGUSUZ, babam Atilla KAYGUSUZ, ablam Özlem KESKİN, kardeşim Ali KAYGUSUZ, ailemizin son üyesi neşe kaynağım, bal kızım Umay KESKİN'e ve

Son olarak tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, beni cesaretlendiren sevgili eşim Hüseyin İZGÖRDÜ'ye

Sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ

2024

ÖZET

FARKLI STRES ŞARTLARINDA VBNC DURUMA İNDÜKLENEN *ESCHERİCHIA COLI* W3110'DA MEYDANA GELEN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI

Canlı fakat kültürü yapılamayan (VBNC) durum, bakterilerin stres koşulları altında hayatta kalabilmek için geliştirdikleri bir yaşam stratejisi olarak kabul edilmektedir. Bu durumda bakteriler, koloni oluşturamaz ve rutin laboratuvar yöntemleriyle tespit edilemez, ancak patojenitelerini korurlar. VBNC bakteriler sucul çevreler, gıda işleme tesisleri, tarım ürünleri ve hastaneler gibi birçok ortamda bulunarak halk sağlığını tehdit etmektedirler. Bakterilerin bu duruma nasıl geçtiği ve bu durumun nasıl tersine çevrilebileceğini belirlemek için VBNC durumun altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması son derece önemlidir. Böylece enfeksiyonların önlenmesi ve tedavi edilmesi için yeni ve etkili stratejiler geliştirilebilecektir. Bu sebeple, çalışmamızda VBNC durumunun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak, hücre bölünmesi ve hücre zarf sistemi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada, *E. coli* W3110 suşu sıcaklık (42 °C), metal (CuSO₄) ve antibiyotik (Eritromisin) stresleri altında VBNC duruma indüklendi ve hücrelerin VBNC duruma geçişi plak sayım ve Live/Dead sayım sonuçlarıyla doğrulandı. VBNC duruma indüklenen hücrelerden RNA izolasyonları gerçekleştirildi ve elde edilen RNA'lardan cDNA sentezlenerek bölünme ve hücre zarf stres genleri ile Real Time PCR analizleri yapıldı. Ayrıca tüm stres faktörleri altında VBNC duruma indüklenen hücrelerin hücre iç yapısı ve morfolojisinde meydana gelen değişimleri tespit etmek amacıyla SEM ve TEM analizleri gerçekleştirildi. Bununla birlikte çalışılan stres faktörleri altında VBNC duruma indüklenen hücrelerde lipit peroksidasyonu ve ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak hücre moleküler yapısında meydana gelen değişiklikler analiz edildi.

Floresan mikroskop, SEM ve TEM analizleri, VBNC hücrelerin kontrol grubuna kıyasla küçüldüğü, sitoplazmik matrisin azaldığı ve hücre zarları arasında boşluk oluştuğunu gösterdi. Ayrıca, VBNC hücrelerde protein agregatlarının meydana geldiği de tespit edildi. VBNC duruma indüklenen hücrelerle gerçekleştirilen Real Time PCR analizleri sonucunda, bölünme ve hücre zarfı stresinden sorumlu 52 genin ekspresyon seviyesi incelenmiş ve bazı genlerin ekspresyon seviyelerinde stres koşullarına bağlı olarak artış, azalış veya değişiklik olmadığı belirlendi. Daha sonra yapılan analizler neticesinde tüm stres koşulları altında kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesi azalan *dicB*, *ymgF* ve *zapC* genleri önemli bulundu. Bu genlerin yanı sıra kontrol olarak *dicC* geninin de dahil edildiği dört rekombinant suş ile yabancı tip ve boş

vektör içeren *E. coli* suşları, aynı stres koşullarında yaşam deneylerine tabi tutuldu. Yaşam deneyleri sonucunda, sıcaklık stresinde DicB, YmgF ve ZapC, metal stresinde YmgF ve ZapC, antibiyotik stresinde ise sadece ZapC aşırı eksprese eden rekombinant suşların VBNC duruma geçişinin azaldığı ve hücrelerin VBNC duruma geçmek yerine öldüğü belirlendi. VBNC hücrelerde gerçekleştirilen lipid peroksidasyonu analizlerinde MDA miktarlarının arttığı tespit edildi. Yapılan ATR-FTIR analizleri sonucunda, VBNC durumun indüksiyonu sırasında RNA, protein ve nükleik asit konsantrasyonlarında biyomoleküler değişiklikler olduğu belirlendi. Özellikle 995 cm^{-1} RNA bandının VBNC durumun tespitinde güvenilir bir spektrokimyasal biyobelirteç olabileceği tespit edildi.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında ZapC'nin VBNC durum için önemli bir rol oynadığı belirlendi. Ayrıca, 995 cm^{-1} RNA bandının VBNC durumunun tespitinde kullanılacak önemli bir biyobelirteç olduğu tespit edildi. Bu bulgular, VBNC durumunun moleküler mekanizmasının anlaşılmasına ve tespitine önemli katkılar sağlamakta, aynı zamanda halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından büyük önem taşımakta olup, gelecekteki araştırmalar için de bir temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: VBNC, Sıcaklık stresi, Metal stresi, Antibiyotik stresi, ATR-FTIR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHANGES IN *ESCHERICHIA COLI* W3110 INDUCED INTO VBNC STATE UNDER DIFFERENT STRESS CONDITIONS

The viable but non-culturable (VBNC) state is recognized as a life strategy that bacteria develop to survive under stress conditions. In this state, bacteria are unable to form colonies and cannot be detected by routine laboratory methods, but retain their pathogenicity. VBNC bacteria are found in many environments such as aquatic environments, food processing plants, agricultural products and hospitals, threatening public health. Understanding the molecular mechanisms underlying the VBNC status is crucial to determine how bacteria adopt this strategy and how this can be reversed. Thus, new and effective strategies for the prevention and treatment of infections can be developed. Therefore, in our study, in order to elucidate the molecular mechanism of the VBNC state, its relationship with cell division and the cell envelope system was investigated.

In this study, *E. coli* W3110 strain was induced to VBNC state under temperature (42 °C), metal (CuSO₄) and antibiotic (erythromycin) stress and the transition of cells to VBNC state was confirmed by plate counting and live/dead counting results. RNA was isolated from the cells induced to VBNC state, cDNA was synthesised from the obtained RNAs and Real Time PCR analyses were performed with division and cell envelope stress genes. In addition, SEM and TEM analyses were performed to determine the changes in the internal cell structure and morphology of VBNC-induced cells under all stress factors. In addition, lipid peroxidation and changes in cell molecular structure were analysed using ATR-FTIR spectroscopy in cells induced to VBNC state under the stress factors studied.

Fluorescence microscopy, SEM and TEM analyses showed that VBNC cells collapsed, the cytoplasmic matrix was reduced and a gap was formed between the cell membranes compared to the control group. It was also found that protein aggregates were formed in VBNC cells. As a result of Real Time PCR analyses performed with VBNC state induced cells, the expression levels of 52 genes responsible for division and cell envelope stress were examined and it was determined that the expression levels of some genes increased, decreased or did not change depending on the stress conditions. As a result of the subsequent analyses, *dicB*, *ymgF* and *zapC* genes whose expression levels decreased compared to the control group under all stress conditions were found to be significant. In addition to these genes, four recombinant strains including the *dicC* gene as a control and *E. coli* strains containing wild type and empty vector

were subjected to life experiments under the same stress conditions. As a result of the life experiments, it was determined that the recombinant strains overexpressing DicB, YmgF, and ZapC under temperature stress, YmgF and ZapC under metal stress, and only ZapC under antibiotic stress had reduced transition to the VBNC state and the cells died instead of transitioning to the VBNC state. Lipid peroxidation analyses performed in VBNC cells revealed that MDA levels increased. ATR-FTIR analysis showed biomolecular changes in RNA, protein, and nucleic acid concentrations during the induction of the VBNC state. In particular, it was determined that the 995 cm^{-1} RNA band could be a reliable spectrochemical biomarker for detecting the VBNC state.

In conclusion, it was determined that ZapC plays an important role in the VBNC state within the scope of this thesis. In addition, it was determined that the 995 cm^{-1} RNA band is an important biomarker that can be used to detect the VBNC state. These findings provide significant contributions to the understanding and detection of the molecular mechanism of the VBNC state, and are also of great importance for public health and food safety, and provide a basis for future research.

Keywords: VBNC, Temperature stress, Metal stress, Antibiotic stress, ATR-FTIR

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ÖNSÖZ..... | i |
| ÖZET..... | ii |
| ABSTRACT..... | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| TABLolar LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | xi |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ..... | xiv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİ..... | 3 |
| 2.1. <i>Escherichia coli</i> | 3 |
| 2.2. Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (VBNC, Dormansi)..... | 3 |
| 2.3. VBNC Durumdaki Mikrobiyal Çeşitlilik..... | 4 |
| 2.4. VBNC Duruma Sebep Olan Faktörler..... | 5 |
| 2.4.1. Sıcaklık Stresi..... | 6 |
| 2.4.2. Metal Stresi..... | 7 |
| 2.4.3. Antibiyotik Stresi..... | 8 |
| 2.5. VBNC Tespit Yöntemleri..... | 10 |
| 2.6. VBNC Durumdaki Bakterilerde Patojenite..... | 15 |
| 2.7. VBNC Durumdaki Bakterilerin Yeniden Canlanması..... | 16 |
| 2.8. VBNC Hücrelerde Enzim Aktivitesi..... | 17 |
| 2.9. VBNC Durumda Bakterilerde Meydana Gelen Fiziksel ve Moleküler Değişiklikler..... | 18 |
| 2.10. VBNC Durumun Moleküler Mekanizması..... | 19 |
| 2.11. <i>E. coli</i> ' de Hücre Bölünme Mekanizması..... | 25 |
| 2.12. Hücre Bölünme Protein Kompleksi ZapABCDE..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 2.13. Hücre Bölünme Proteini YmgF..... | 28 |
| 2.14. Bölünme ile İlişkili Qin Profajı DicAC ve DicBF lokusları..... | 29 |
| 2.15. Çalışmanın Amacı | 31 |
| 3. MATERYAL METOD | 32 |
| 3.1. Materyal..... | 32 |
| 3.2. Kullanılan <i>E. coli</i> Suşları..... | 32 |
| 3.3. Besiyerleri ve Kimyasallar | 32 |
| 3.3.1. LB Agar Besiyeri | 32 |
| 3.3.2. LB Broth Besiyeri..... | 32 |
| 3.3.3. Nutrient Agar besiyeri..... | 32 |
| 3.3.4. SOB Medium | 32 |
| 3.3.5. SOC Medium | 33 |
| 3.3.6. 1X PBS..... | 33 |
| 3.3.7. Yapay Deniz Suyu..... | 33 |
| 3.3.8. IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosid)..... | 33 |
| 3.3.9. 2M Mg ⁺² | 33 |
| 3.4. Eritromisin Antibiyotiği MİK Değerinin Belirlenmesi..... | 33 |
| 3.5. Yaşam Deneyleri..... | 34 |
| 3.5.1. Farklı Stres Şartlarında Hücrelerin VBNC Duruma İndüklenmesi | 34 |
| 3.5.2. VBNC hücrelerde Plak Sayım ve Floresan Mikroskop Deneyleri..... | 35 |
| 3.6. Elektron Mikroskopisi..... | 36 |
| 3.6.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) | 36 |
| 3.6.2. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) | 36 |
| 3.7. RNA İzolasyonu..... | 37 |
| 3.8. RNA Saflaştırma | 37 |
| 3.9. Primer Tasarımı | 37 |
| 3.10. Primerlerin Sulandırılması | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.11. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) (cDNA Sentezi).. | 41 |
| 3.12. Real Time PCR (qPCR)..... | 41 |
| 3.13. <i>E. coli</i> Rekombinant Hücrelerinin Eldesi | 42 |
| 3.13.1. Koloni PCR | 42 |
| 3.13.2. Agaroz Jel Elektroforezi | 43 |
| 3.13.3. Ligasyon..... | 43 |
| 3.13.4. Transformasyon | 44 |
| 3.14. Büyüme Deneyleri | 44 |
| 3.15. <i>dicB</i> , <i>dicC</i> , <i>ymgF</i> ve <i>zapC</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Analizi | 45 |
| 3.16. <i>E. coli</i> DicB, DicC, YmgF ve ZapC Rekombinant Suşlarda VBNC Durumun Belirlenmesi..... | 45 |
| 3.17. Lipit Peroksidasyonu | 45 |
| 3.18. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)..... | 46 |
| 3.19. Kemometrik Analiz | 46 |
| 3.20. İstatistiksel Analiz | 47 |
| 4. BULGULAR..... | 48 |
| 4.1. <i>E. coli</i> 'nin Kültürlenebilirliği ve Canlılığı Üzerine Sıcaklık Stresinin Etkisi | 48 |
| 4.2. <i>E. coli</i> 'nin Kültürlenebilirliği ve Canlılığı Üzerine Bakır Stresinin Etkisi | 48 |
| 4.3. <i>E. coli</i> 'nin Kültürlenebilirliği ve Canlılığı Üzerine Eritromisin Antibiyotiği Etkisi | 49 |
| 4.4. Kültürlenebilir ve VBNC <i>E. coli</i> W3110 Hücrelerinde Elektron Mikroskopisi . | 51 |
| 4.5. Bölünme ve Hücre Zarf Stres Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi | 54 |
| 4.6. Aşırı Ekspresyon Plazmidleri Barındıran Rekombinant Bakteri Suşlarının Elde Edilmesi | 61 |
| 4.7. Çalışmada Kullanılan Yabani Tip <i>E. coli</i> W3110 ve Rekombinant Suşlarının Büyüme Deneyleri..... | 62 |

| | |
|---|----|
| 4.8. Yabani Tip <i>E. coli</i> W3110 ve Rekombinant Suşların Real Time PCR ile Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi..... | 63 |
| 4.9. Sıcaklık, Metal ve Antibiyotik Stresi Altında <i>E. coli</i> DicB, DicC, YmgF ve ZapC Rekombinant Suşlarının VBNC Hücre Oluşumu Üzerine Etkileri | 63 |
| 4.10. Lipit Peroksidasyonu | 67 |
| 4.11. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)..... | 68 |
| 4.11.1. Kalitatif Kemometrik Bulgular..... | 68 |
| 4.11.2. Kantitatif Spektrokimyasal Bulgular | 70 |
| 5. TARTIŞMA | 74 |
| 6. SONUÇ..... | 94 |
| KAYNAKÇA..... | 96 |

TABLULAR LİSTESİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Tablo 2.1. VBNC tespit yöntemleri | 11 |
| Tablo 3.1. Real Time PCR da Kullanılan Primer Dizileri | 38 |
| Tablo 3.2. Ligasyonda Kullanılan Primer Dizileri..... | 40 |
| Tablo 3.3. RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri..... | 41 |
| Tablo 3.4. RT-PCR Döngü Koşulları | 41 |
| Tablo 3.5. qPCR Bileşenleri | 42 |
| Tablo 3.6. qPCR Döngü Koşulları | 42 |
| Tablo 3.7. Koloni PCR Bileşenleri | 43 |
| Tablo 3.8. Koloni PCR Döngü Koşulları..... | 43 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1. <i>E. coli</i> 'de VBNC Durum Oluşumunda Rol Oynayan Bazı Proteinler | 24 |
| Şekil 2.2. <i>E. coli</i> 'de Bölünme Mekanizmasının Şematik Genel Görünümü | 26 |
| Şekil 2.3. Zap Proteininin FtsZ Proteini ile Etkileşimi | 28 |
| Şekil 2.4. YmgF Proteininin Fts Proteinleri ile Etkileşimi | 29 |
| Şekil 2.5. DicBF Operonunun DicA Tarafından Düzenlenmesi. dicAC lokusu, dicBF Operonunun Yukarısında Bulunur ve DicBF Operonunun Promotörü DicBp, DicA Tarafından Baskılanmaktadır..... | 30 |
| Şekil 2.6. Bölünme ile İlişkili Qin Profajı dicBF Lokusu Çalışma Modeli..... | 31 |
| Şekil 4.1. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında <i>E. coli</i> W3110 Hücrelerinin Yaşam Deneyi Sonuçları. | 48 |
| Şekil 4.2. Metal (CuSO ₄) Stresi Varlığında <i>E. coli</i> W3110 Hücrelerinin Yaşam Deneyi Sonuçları..... | 49 |
| Şekil 4.3. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında <i>E. coli</i> W3110 Hücrelerinin Yaşam Deneyi Sonuçları..... | 50 |
| Şekil 4.4. Floresan Mikroskop Altında <i>E. coli</i> W3110 Hücrelerinin Görüntüleri. | 50 |
| Şekil 4.5. Logartimik Faz Hücrelerinin Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. | 51 |
| Şekil 4.6. Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri..... | 52 |
| Şekil 4.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. | 52 |
| Şekil 4.8. Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri..... | 52 |
| Şekil 4.9. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. | 53 |
| Şekil 4.10. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. | 53 |
| Şekil 4.11. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Görüntüleri..... | 53 |
| Şekil 4.12. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>dicB</i> , <i>dicC</i> , <i>ymgF</i> ve <i>zapC</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 55 |
| Şekil 4.13. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>envZ</i> , <i>ompR</i> , <i>ompC</i> ve <i>ompF</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 55 |
| Şekil 4.14. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>zapA</i> , <i>zapB</i> , <i>zapD</i> ve <i>zapE</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 56 |
| Şekil 4.15. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>pal</i> , <i>tolA</i> , <i>tolQ</i> ve <i>tolR</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| Şekil 4.16. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>cedA</i> , <i>mukB</i> , <i>sulA</i> ve <i>cpoB</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 57 |
| Şekil 4.17. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>cpxA</i> , <i>cpxP</i> , <i>cpxR</i> ve <i>ycbC</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 57 |
| Şekil 4.18. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>damX</i> , <i>dedD</i> , <i>slt</i> ve <i>zipA</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 58 |
| Şekil 4.19. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>yfhA</i> , <i>yfhA</i> , <i>zraR</i> ve <i>zraS</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 58 |
| Şekil 4.20. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>dam</i> , <i>dnaA</i> , <i>recA</i> ve <i>seqA</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 59 |
| Şekil 4.21. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>ftsA</i> , <i>ftsB</i> , <i>ftsE</i> ve <i>ftsL</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 59 |
| Şekil 4.22. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>ftsN</i> , <i>ftsQ</i> , <i>ftsX</i> ve <i>ftsZ</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 60 |
| Şekil 4.23. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>envC</i> , <i>ftsP</i> , <i>mreB</i> ve <i>yedR</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 60 |
| Şekil 4.24. VBNC Duruma İndüklenen <i>E. coli</i> Hücrelerinde <i>spy</i> , <i>rpoE</i> , <i>rpoS</i> ve <i>ytfB</i> Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri..... | 61 |
| Şekil 4.25. Aşırı Ekspresyon Plazmidleri Barındıran <i>E. coli</i> W3110 Rekombinant Bakteri Suşları | 62 |
| Şekil 4.26. Rekombinant Hücrelerin Büyüme Grafiği..... | 62 |
| Şekil 4.27. DicA, DicC, YmgF ve ZapC Rekombinant Suşlarında Yabani Tip <i>E. coli</i> ve Boş Vektöre Göre <i>dicA</i> , <i>dicC</i> , <i>ymgF</i> ve <i>zapC</i> Gen Ekspresyon Seviyelerinin qPCR ile Tespiti. ... | 63 |
| Şekil 4.28. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında 6. Gün Yabani Tip <i>E. coli</i> , Vektör ve Rekombinant Suşlarla Gerçekleştirilen Yaşam Deneyi Sonuçları. | 64 |
| Şekil 4.29. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında 6. Gün Yabani Tip ve Rekombinant Hücrelerin Floresan Mikroskop Altında VBNC Durumun Görüntüleri. | 65 |
| Şekil 4.30. Metal (CuSO ₄) Stresi Varlığında 8. Gün Yabani Tip <i>E. coli</i> , Vektör ve Rekombinant Suşlarla Gerçekleştirilen Yaşam Deneyi Sonuçları. | 65 |
| Şekil 4.31. Metal (CuSO ₄) Stresi Varlığında 8. Gün Yabani Tip ve Rekombinant Hücrelerin Floresan Mikroskop Altında VBNC Durumun Görüntüleri..... | 66 |
| Şekil 4.32. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında 40. Gün Yabani Tip <i>E. coli</i> , Vektör ve Rekombinant Suşlarla Gerçekleştirilen Yaşam Deneyi Sonuçları. | 66 |

| | |
|--|-----------|
| Şekil 4.33. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında 40. Gün Yabani Tip ve Rekombinant Hücrelerin Floresan Mikroskop Altında VBNC Durumun Görüntüleri..... | 67 |
| Şekil 4.34. Farklı Stres Koşulları Altında VBNC Duruma İndüklenmiş <i>E. coli</i> Hücrelerinde Lipit Peroksidasyon (Malondialdehit/MDA) Seviyeleri. | 68 |
| Şekil 4.35. <i>E. coli</i> 'deki VBNC Durumuyla İlişkili Biyomoleküler Olayları Gösteren Temel Bileşen Analizi. | 69 |
| Şekil 4.36. <i>E. coli</i> 'deki VBNC Durumuyla İlişkili Biyomoleküler Olayları Gösteren Temel Bileşen Analizi. | 70 |
| Şekil 4.37. Sıcaklık (42 °C) (A-B), Metal (CuSO ₄) (C-D) ve Antibiyotik (Eritromisin) (E-F) Stres Koşulları Altında <i>E. coli</i> 'de VBNC Durumu için Spektrokimyasal Biyobelirteç Bandının Miktarının Belirlenmesi ve Doğrulanması. | 72 |
| Şekil 4.38. Sıcaklık (42 °C), Metal (CuSO ₄) ve Antibiyotik (Eritromisin) Stres Koşulları Altında <i>E. coli</i> 'de VBNC Durumu için Çeşitli Spektrokimyasal Bant Endekslerinin Ölçülmesi | 73 |

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AUC : Area under the curve

bp : Baz Çifti

°C : Santigrat Derece

cDNA : Komplementer DNA

cm⁻¹ : Dalga Sayısı

CTC : 5 - Siyano - 2,3 - Ditolil Tetrazolyum Klorür

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindol

dk : Dakika

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

DVC : Doğrudan canlı sayımı

E. coli : *Escherichia coli*

EMA : Etidyum monoazid

ERY : Eritromisin

EtBr : Etidyum Bromür

g : Gravite

g: Gram

GC : Guanin ve Sitozin

INT : 2 -p (Iyodofenil) -3 -p (Nitrofenil) 5 - Fenil Tetrazolyum Klorür

IPTG : İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit

KOB : Koloni Oluşturan Birim

LB : Luria Bertani

Log : Logaritmik

M : Molar

MDA : Malondialdehit

mg : Miligram

MİK : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

ml : Mililitre

mm : MiliMetre

MSK : Minimum Sidal Konsantrasyon

ng : Nanogram
nm : Nanometre
nmol : Nanomol
OD : Optik Yoğunluk
PBS : Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
PCA : Temel Bileşen Analizi
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEC : Profiling of *E. coli* Genome Veritabanı
pH : Potansiyel Hidrojen
PI : Propidium iyodür
PMA : Propidium monoazide
qPCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA : Ribonükleik Asit
ROC : Receiver operating curves
RPM : Dakikadaki Devir Sayısı
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
SOB : Super Optimal Broth (Hanahan's Broth)
SOC : Katabolit baskılamalı Süper Optimal besiyeri
TBA : Tiyobarbitürik Asit
TBARS : Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TBE : Tris-Edta Borik Asit
TCA: Triklorasetik asit
TE : Tris-Edta
TEM : Geçirimli Elektron Mikroskopisi
VBNC : Canlı ancak kültürü yapılamayan
 α : Alfa
 β : Beta
 μg : Mikrogram
 μl : Mikrolitre
 μM : Mikromolar

1. GİRİŞ

Bakteriler, mikrobiyolojik dünyada kritik öneme sahip canlılardır ve çevresel koşullara uyum sağlama ve hayatta kalma yetenekleriyle dikkat çeken mikroorganizmalardır (Robben vd., 2018). Besin eksikliği, yüksek tuz konsantrasyonu, pH değişikliği, sıcaklık, oksidatif stres, metal ve antibiyotik varlığı gibi zorlu çevresel şartlar bakterilerin, hayatta kalma stratejisi olan canlı fakat kültürü yapılamayan (Viable but Non-Culturable-VBNC) duruma indüklenmesine neden olur. VBNC durum, bakterilerin canlılıklarını sürdürebildikleri ancak geleneksel kültür yöntemleriyle çoğalamadıkları bir durumdur. Standart kültür teknikleriyle tespit edilemedikleri için gözden kaçabilmekte ve enfeksiyonların yayılmasına neden olmaktadır. Bu sebeple de VBNC durum özellikle patojenik bakterilerde halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır (Ayrapetyan vd., 2018; Dong vd., 2020; Yoon & Lee, 2020).

VBNC duruma geçen bakteriler, metabolik aktivitelerini minimum düzeye indirirler ve bu sayede stresli çevresel koşullara karşı direnç geliştirmiş olurlar. Ancak uygun koşullar tekrar sağlandığında yeniden aktif hale gelebilir ve çoğalmaya başlayarak hastalık yapabilirler. Dahası VBNC durumdaki hücreler yeniden aktif hale gelmeden de hastalık oluşturabilmektedirler. Çünkü VBNC durumdaki patojen mikroorganizmalarda her ne kadar yaşamsal faaliyetler minimuma indirilmiş olsa da virülans genler sentezlenmeye ve hastalık yapmaya devam etmektedir (Pinto vd., 2015; Robben vd., 2018, 2019; Wideman vd., 2021). Bu sebeple geleneksel yöntemler ile tespit edilemeyen ciddi bir halk sağlığı ve gıda güvenliği sorunu oluşturan VBNC durumun tespitine yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin temeli ilk olarak hücre boyama prosedürlerine dayanmış ve yıllar içerisinde tespiti yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Ding vd., 2017; Dong vd., 2020; Kogure vd., 1979; Wideman vd., 2021).

VBNC durum 40 yılı aşkın bir süredir literatürde geniş bir şekilde incelenmekte ve çeşitli stres faktörleri ile farklı mikroorganizmalar üzerinde çalışılmaktadır. Ancak, bu kadar kapsamlı araştırmalara rağmen, VBNC durumunun moleküler mekanizmasının tam olarak anlaşılması henüz mümkün olmamıştır. VBNC durumu indükleyen veya kontrol eden molekülü belirlemek için yapılan bazı çalışmalar neticesinde mekanizmayı kontrol eden ve VBNC hücre oluşum mekanizmasında rol oynadığı düşünülen bazı proteinler tespit edilmiştir. Örneğin, alkil hidroperoksit redüktaz alt birimi C (AhpC) (Asakura vd., 2007b; Wang vd., 2013), glutatyon S-transferaz (GST) (Abe vd., 2007), bir LysR tipi transkripsiyonel düzenleyici (OxyR) (Kong vd., 2004; Li vd., 2014), katalaz (KatA ve KatG), süperoksit dismutaz (SodA) (Noor vd., 2009; Zhao vd., 2016), RNA polimeraz sigma faktör (RpoS) (Boaretti vd., 2003; Kusumoto vd.,

2012), polifosfat kinaz 1 (PPK1) (Gangaiah vd., 2009), sensör histidin kinaz (EnvZ) ve dış zar proteinleri (OmpF, OmpC ve OmpW) (Darcan vd., 2003, 2005, 2009; Asakura vd., 2007b, 2008) gibi çeşitli proteinlerin VBNC durum ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalarda tespit edilen bu proteinler ile VBNC durumunun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılabilecek bir metabolik yolak ortaya konulamamıştır. Bir bölünememe durumu olan VBNC'nin tespit edilen proteinlerinde bölünme mekanizması ile bir ilişkisi gösterilmemiş ve VBNC durumda şu ana kadar bölünme mekanizması ile ilişkili bir sonuç ortaya konulamamıştır. Dolayısıyla, moleküler mekanizmanın çözülmesine yönelik çalışmaların devam etmesi, VBNC durumunun anlaşılması ve çözümü için son derece önemlidir. Bu sebeple bu tez çalışmasında, sıcaklık (42 °C), metal (CuSO₄) ve antibiyotik (eritromisin) stresi olmak üzere üç farklı stres koşulu altında VBNC duruma indüklenen *Escherichia coli* W3110 hücrelerinde meydana gelen fizyolojik ve moleküler değişiklikler araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. *Escherichia coli*

İlk kez Alman pediatrist Theodor Escherich tarafından keşfedilen *E. coli*, Enterobacteriaceae familyasına ait, spor oluşturmeyen, çubuk şekilli gram-negatif fakültatif anaerob bir bakteridir. Memeli, sürüngen, kuş ve balıkların bağırsak ve dışkılarında yayılış gösteren kommensal ve fırsatçı bir patojendir. Bu mikroorganizma bağırsaklarda zararsız bir şekilde kolonize olabildiği gibi bakteriyemi ve sepsis gibi ciddi invazif hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Bonten vd., 2021; Denamur vd., 2020; Friedmann, 2014). Hem kommensal hem de hastalık etmeni olan farklı patojenik varyantları içermesi sebebiyle çok yönlü bir bakteri türüdür. Bu nedenle de bakteriyel evrim, farklı büyüme koşulları, fizyoloji, biyokimya, konak-patojen etkileşimleri, moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarda en çok kullanılan model organizmadır (Leimbach vd., 2013; Tenaillon vd., 2010).

E. coli hem doğal çevrelerde hem de insan vücudunda önemli rol oynayan bir bakteri türüdür. Aynı zamanda bitkiler, besin maddeleri, toprak ve sucul ortamlar gibi farklı çevrelerde bulunabilmesi ve hayatta kalabilmesi *E. coli*'yi çevresel birçok süreçte önemli bir tür haline getirmiştir. Özellikle, tarım alanlarında ve su kaynaklarında bulunması, gıda güvenliği ve su kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Basavaraju & Gunashree, 2022; Somorin vd., 2016; Van Elsas vd., 2010). Fekal kökenli bir organizma olduğu için diğer çevrelerde yaşamının kısıtlanacağı düşünülse de besin maddelerinin varlığı ve abiyotik şartların elverişli olduğu ortamlarda uzun süre hayatta kalabilmektedir. Ayrıca zorlu çevresel şartlar altında hayatta kalmalarına yardımcı olabilecek çeşitli mekanizmalar geliştirdiği de bilinmektedir (Van Elsas vd., 2010; Wani vd., 2022). Bu mekanizmalar arasında 40 yılı aşkın bir süredir araştırılan "VBNC" (Viable But Non-Culturable-Canlı fakat kültürü yapılamayan) durumu da yer almaktadır.

2.2. Canlı Fakat Kültürü Yapılamayan Durum (VBNC, Dormansi)

Mikroorganizmalar besin eksikliği, sıcaklık, ozmotik stres, optimum olmayan pH, yüksek oksijen konsantrasyonu, ağır metaller, inorganik tuzlar ve antibiyotikler gibi çok çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadır (Darcan vd., 2009; Dong vd., 2020; Jia vd., 2020; Matilla, 2018; Pazos-Rojas vd., 2023). Bu tür stres koşulları veya olumsuz çevre şartlarına uyum sağlayarak hayatta kalmak için mikroorganizmalar, canlı fakat kültürü yapılamayan durum olarak bilenen bir duruma geçerler (Sachidanandham & Yew-Hoong Gin, 2009; Yamamoto,

2000). Bu durum çoğu araştırmacı tarafından bir hayatta kalma stratejisi veya çevresel streslere tepki olarak ön görölmektedir. VBNC durum, mikroorganizmaların çoğalma yeteneklerinin kaybolduğu ve geleneksel kÖltür yöntemleriyle üretilemedikleri bir durumdur. Bu durumdaki hücreler, sağlam bir membrana, hasar görmemiş bir genetik materyale ve sitoplazmik zara sahiptir. Dolayısıyla bu mikroorganizmalar hala canlıdır ve çeşitli molekÖler, fizyolojik ve metabolik aktiviteleri devam etmektedir (Ayrapetyan vd., 2018; Dong vd., 2020; Kim vd., 2018; Yoon & Lee, 2020). Bunun yanı sıra kÖltüre edilebilir hücrelere kıyasla VBNC durumdaki hücreler de çeşitli değişiklikler de söz konudur.

VBNC durumdaki hücrelerde hücre duvar yapısı ve hücre morfolojisinde önemli farklılıklar meydana gelmektedir. VBNC durumdaki hücrelerde hücre boyutlarında azalma ve morfolojide değişiklikler (çomak şekilli hücrelerin kok formuna, yay şekilli hücrelerin ise küresel forma geçişı) tespit edilmiştir (Signoretto vd., 2000; Takeda, 2011; Ye vd., 2020). Bu morfolojik değişiklikler, sitoplazmik membranlardaki ve hücre duvarındaki bileşenlerin değişimi ile yakından ilişkilidir (Dong vd., 2020; Progulske-Fox vd., 2022; Signoretto vd., 2000; Zhao vd., 2017). Ayrıca, VBNC durumdaki hücrelerde peptidoglikan sentezinde artış olduğu da belirlenmiştir. Peptidoglikan sentezinde meydana gelen bu artış nedeniyle VBNC hücrelerin, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı daha yüksek dirence sahip olduğu gözlenmiştir (Borkar vd., 2024; Fu vd., 2020; Hung vd., 2013; Robben vd., 2018, 2019). Dahası VBNC hücreler, kÖltüre edilebilir hücrelere kıyasla gen ekspresyonu, metabolizma, ATP sentezi, virölans potansiyeli, RNA miktarı ve protein profilleri açısından da farklılıklar sergilemektedir (Fu vd., 2020; Hung vd., 2013; Robben vd., 2018, 2019).

VBNC durumdaki hücreler, ortam şartları yeniden elverişli olduğunda veya bazı fiziksel ve kimyasal uyarılar sayesinde tekrar aktif ve kÖltürlenebilir bir duruma geri dönebilir. Bu durum yeniden canlanma olarak bilinmektedir (Dong vd., 2020; Fu vd., 2020; Wei & Zhao, 2018; Xu vd., 2022; Zeng vd., 2013). Bugüne kadar gıda, hava, toprak ve su kaynaklı birçok mikroorganizma türünde VBNC durum tespit edilmiştir (Dong vd., 2020; Oliver, 2005, 2010, 2016; Ou vd., 2021; Pinto vd., 2015; Zhang vd., 2020; Zhao vd., 2017). Ayrıca VBNC durumda bu bakteri türlerinin patojenitelerini devam ettirdiği dolayısıyla hastalık etmeni olabildikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Cervero-Aragó vd., 2019; Zhong & Zhao, 2019).

2.3. VBNC Durumdaki Mikrobiyal Çeşitlilik

İlk olarak 1982 yılında Xu vd., tarafından *E. coli* ve *Vibrio cholerae*'da tespit edilen VBNC durum, sonraki yıllarda yapılan birçok çalışma ile farklı bakteri türlerinde de

gözlenmiştir (Amel vd., 2008; Darcan vd., 2009; Lemke & Leff, 2006; Millet & Lonvaud-Funel, 2000; Suzuki vd., 2006; Xu vd., 1982; Zhang vd., 2021). Bugüne kadar bakteriler ve mantarlar da dahil olmak üzere 100'den fazla mikroorganizma türünün, çeşitli streslere maruz kaldığında VBNC duruma girdiği tespit edilmiştir. Tanımlanan mikroorganizmalar gıda güvenliği, çevresel uygulamalar ve tarımsal hastalıklar gibi farklı alandaki araştırmalardan elde edilmiştir (Dong vd., 2020; Oliver, 2016; Zhang vd., 2021). VBNC forma giren mikroorganizmalar listesinde *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *V. cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *Micrococcus luteus*, *Acidovorax citrulli* ve *Erwinia amylovora* gibi patojen olan veya olmayan birçok mikroorganizma türü yer almaktadır (Ayrapetyan vd., 2018; Capozzi vd., 2016; Dong vd., 2020; Liu vd., 2017; Ou vd., 2021; Pinto vd., 2015; Xu vd., 2022; Zhang vd., 2021; Zhao vd., 2017).

2.4. VBNC Duruma Sebep Olan Faktörler

VBNC durum, türler arasında geniş bir dağılım gösterirken, bu duruma neden olan indükleyici koşullarda da çeşitlilik görülmektedir. İlk kez deniz ve nehir ağzı (Xu vd., 1982) sularında tespit edilen durumun, yapılan birçok çalışma ile maden suyu (Defives vd., 1999; Klont vd., 2006), içme suyu (Fan vd., 2024; Guo vd., 2021; Liu vd., 2008,2009; Pawlowski vd., 2011) ve atık su (Kibbee & Örmeci, 2017) gibi diğer sucul ortamlarda, hava (Chang & Lin, 2018) ve toprak (Abdallah vd., 2008; Reissbrodt vd., 2000) gibi doğal çevrelerde de meydana geldiği belirlenmiştir (Maalej vd., 2004; Oliver & Bockian, 1995; Pommepuy vd., 1996; Xu vd., 1982). Dahası VBNC durum işlenmiş gıdalar (Asakura vd., 2002; Makino vd., 2000), deniz ürünleri (Makino vd., 2000; Pan vd., 2020), meyve suları (Nicolò vd., 2011; Pan vd., 2020), şarap (Capozzi vd., 2016; Millet & Lonvaud-Funel, 2000), bira (Liu vd., 2018; Suzuki vd., 2006; Xu vd., 2022) gibi gıda maddelerinde görülmektedir. Ayrıca literatürdeki mevcut bilgilere göre, sıcaklık (Bai vd., 2019; Li vd., 2014; Liu vd., 2020; Oliver, 2016), ışık (Besnard vd., 2002; Idil vd., 2010; Pommepuy vd., 1996), besin açlığı (Besnard vd., 2002; Darcan vd., 2009; Li vd., 2020; Pinto vd., 2011), artan tuzluluk (Li vd., 2020; Mascher vd., 2000), pH değişiklikleri (Bai vd., 2019; Capozzi vd., 2016; Darcan vd., 2009; Li vd., 2020), yüksek karbondioksit basıncı (Zhao vd., 2016), düşük oksijen miktarı (Bovill & Mackey, 1997; Pinto vd., 2011), kuruma (Dreux vd., 2007; Jameelah vd., 2018), ozmotik stres (Darcan vd., 2009), reaktif oksijen türleri (ROS) (Imazaki & Nakaho, 2009; Morishige vd., 2013), gıda

koruyucuları ve ağır metaller (Aurass vd., 2011; Del Campo vd., 2009; Grey & Steck, 2001a; Li vd., 2014; Ordax vd., 2006), antibiyotikler (Jia vd., 2020; Mangiaterra vd., 2020; Zhang vd., 2020), organik kirleticiler (Su vd., 2015), inorganik tuzlar (Li vd., 2020; Robben vd., 2018), klorlama (Chen vd., 2018; Lin vd., 2017; Noll vd., 2020; Oliver, 2005) ve UV radyasyonu (Zhang vd., 2015) gibi farklı stres şartlarında da mikroorganizmaların VBNC duruma girdiği bilinmektedir.

2.4.1. Sıcaklık Stresi

Bakteriler çevresel sıcaklık değişimlerine karşı oldukça hassas canlılardır ve çoğu bakteri, sıcaklığın sıklıkla değiştiği dinamik bir ortamda yaşamaktadır. Bu sebeple sıcaklık stresine karşı hızlı bir adaptasyon mekanizması geliştirmektedirler. Literatürde düşük sıcaklık seviyelerine tepki olarak mikroorganizmaların VBNC duruma indüklendiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıkların neden olduğu VBNC durum ve buna bağlı olarak gen ekspresyonu üzerine yapılmış çalışmalar sınırlıdır (Fan vd., 2023; Fan vd., 2024; Fu vd., 2020; Liu vd., 2020; Zhang vd., 2024).

E. coli K12 W3110 suşu ile yapılan çalışmada +4 °C'de yapay deniz suyu ve filtrelenmiş damıtılmış su ortamında hücrelerin VBNC duruma girdiği gözlenmiştir (Na vd., 2006). Benzer şekilde, Rigsbee vd. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, düşük sıcaklıklarda yapay deniz suyu ve nehir suyunda *E. coli* O157:H7'nin VBNC duruma girdiğini tespit edilmiştir (Rigsbee vd., 1997). *E. coli* O157:H7 ile nehir suyu ve PBS ortamında 4 °C'de yapılan deneylerde de hücrelerin VBNC durumuna girdiği rapor edilmiştir (Liu vd., 2008, 2009, 2010). Ayrıca açlık ortamında +4 °C ve +10 °C'de tutulan *E. coli* O157:H7 hücrelerinin VBNC duruma geçtiği Live/Dead kiti ile gerçekleştirilen floresan mikroskop sayımları ve plak sayım sonuçlarıyla doğrulanmıştır (Zhao & Matthews, 2000). Düşük sıcaklıklarda marul (+8 °C) yaprak yüzeyi üzerine aşılana *E. coli* O157:H7 hücrelerinin VBNC duruma girdiği belirlenmiştir (Dinu & Bach, 2011, 2013). *E. coli* O157:H7 ile -20 °C'de gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Zhong & Zhao, 2019). Yüksek sıcaklıklarda yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Petri plağında *E. coli* MC4100 hücreleri ile 50 °C de gerçekleştirilen bir çalışmada, hücrelerin %63'ünün VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Bruhn-Olszewska vd., 2018). Ayrıca *E. coli* O157:H7 ile yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen çalışmada 50 °C de kültüre edilebilir hücre sayısının etkili bir şekilde azaldığı ve yaklaşık 2 saat sonra petri plaklarında kültüre edilebilirliğini tamamen kaybettiği ve VBNC duruma geçtiği tespit edilmiştir (Fu vd., 2020). *E. coli* dışındaki bazı mikroorganizmalarda da sıcaklık stresi VBNC duruma sebep olmaktadır. Örneğin, nehir

ağız sularında *Vibrio vulnificus* ile Oliver vd. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada sıcaklığın 15 °C'nin altına düşmesi ile sularda bulunan hücrelerin VBNC'ye girdiği ve sıcaklığın 21 °C'nin üstüne çıkması ile tekrar eski haline geri döndüğü tespit edilmiştir (Oliver, 1995). *V. vulnificus* ile yapay deniz suyunda düşük sıcaklıklar da gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise petri plağındaki koloni sayısının çok kısa bir sürede azaldığı ancak yapılan mikroskopik sayımlarda hücre canlılığının devam ettiği, yani hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Abe vd., 2007). Musluk suyu mikrokozmanda düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen deneylerde ise 21 günlük inkübasyonun sonunda *Yersinia pestis* hücrelerinin VBNC duruma geçtiği gözlemlenmiştir (Pawlowski vd., 2011). Yüksek sıcaklıklarda *Rhodococcus bifenilivorans* ile gerçekleştirilen bir çalışmada hücrelerin VBNC duruma indüklendiği ve stres şartının ortadan kalkmasının ardından hücrelerin yeniden canlanabildiği belirlenmiştir (Fan vd., 2023). Bu çalışmalar bakterilerin hem düşük hem de yüksek sıcaklıklarda VBNC duruma geçebildiğini göstermektedir. Literatürde düşük sıcaklıklarla daha fazla çalışma yapılmış olması VBNC durumdaki hücrelerde fizyolojik değişikliklerin ve gen ekspresyon profillerinin daha ayrıntılı incelenmesine olanak sağlamıştır. Ancak yüksek sıcaklık stresine maruz kalan hücrelerde VBNC duruma ilişkin bu değişikliklerin daha iyi anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.2. Metal Stresi

Metaller doğal çevrelerin ayrılmaz bir parçasıdır ve doğada çeşitli şekillerde bulunabilmektedirler. Endüstriyel ve otomobil emisyonları, madencilik, silah geliştirme, pestisitlerin uygulanması, dezenfektan maddelerin yapısında bulunması ve fosfatlı gübreler gibi çok sayıda antropojenik faaliyet doğal çevrelerde metallerin konsantrasyonlarında artışa sebep olmaktadır. Ayrıca metal içeren kayaların aşınması ve volkanik patlamalar gibi doğal olaylar da metallerin çevreye salınmasına neden olmaktadır (Ali vd., 2019; Pal vd., 2022). Bu sebeple doğal çevrelerde mikroorganizmaların en sık karşılaştığı stres şartlarından bir tanesi de metal stresidir. Mikroorganizmalar, bu stres şartlarından korunmak ve hayatta kalabilmek için VBNC durum da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar geliştirmektedirler. VBNC durumun en çok çalışıldığı metal stresi bakır metalidir ve birçok mikroorganizma türünün bakır stresi altında VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Del Campo vd., 2009; Ku vd., 2008; Maertens vd., 2021; Ordax vd., 2006; Um vd., 2013).

E. coli ile bakır stresi altında gerçekleştirilen deneylerde hücrelerin birkaç gün içerisinde VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Aurass vd., 2011; Grey & Steck, 2001b). *E. coli* ile yapılan bir başka çalışmada ise LB besiyerinde 4 mg/L Cu²⁺ iyonuna maruz bırakılan yabancı

tip *E. coli* ve antibiyotik dirençli *E. coli* suşlarının VBNC duruma indüklendiği belirlenmiştir (Liu vd., 2023). Ayrıca, *E. coli* O157 ve *S. aureus* hücrelerinin de düşük sıcaklık stresi (+4 °C) ve bakır iyonu (15 µmol/L CuSO₄) kombinasyonu ile VBNC durumuna indüklendiği gözlenmiştir (Hu vd., 2019). Bakır stresi varlığında VBNC duruma indüklenen bir diğer mikroorganizma da *Salmonella typhi*'dir. *S. typhi* ile CuSO₄ varlığında gerçekleştirilen çalışmalarda hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Jiang, 2014; Zeng vd., 2013).

Bakır bazlı antimikrobiyal maddelerin tarımda kullanılması nedeniyle bakır stresi varlığındaki VBNC durum bitki patojeni mikroorganizmalar ile de çalışılmıştır. *A. citrulli*, *E. amylovora*, *Xanthomonas axonopodis*, *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum* ve *Ralstonia solanacearum* gibi birçok bitki patojeni mikroorganizmanın bakır stresi varlığında VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Alexander vd., 1999; Bai vd., 2022; Del Campo vd., 2009; Grey & Steck, 2001a; Jiang vd., 2016; Kan vd., 2019; Ordax vd., 2006; Um vd., 2013).

Sonuç olarak, bakır stresinin mikroorganizmaları VBNC duruma indüklediği tespit edilmiştir. Ancak, bakırın VBNC durumu üzerindeki etkilerinin ve bu süreçteki moleküler mekanizmaların daha derinlemesine incelenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.4.3. Antibiyotik Stresi

Antibiyotikler hastalıkların tedavisinde kullanılan en başarılı ilaçlar arasındadır. İnsanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonları önlemek veya tedavi etmek için kullanılmaktadırlar. Ayrıca antibiyotikler tedavinin yanı sıra çiftlik hayvanlarının daha hızlı büyümesini teşvik etmek için de kullanılmaktadır. Kullanılan bu antibiyotikler kısmen metabolize edilir ve metabolize edilmemiş %30 ila %90'lık kısmı ana bileşikler halinde dışkı yoluyla ya kanalizasyon arıtma tesislerine ya da doğrudan su veya toprağa boşaltılır. Bu durumun sonucu olarak da çevre kirliliği ve antibiyotiklere karşı bakteriyal direnç gelişmektedir (Xu vd., 2016; Zhao vd., 2021).

Bakteriler, antibiyotiklerin varlığında büyümeye devam edebilmek ve hayatta kalabilmek için genetik değişiklikler yoluyla dirençli hale gelmektedirler. Bu genetik değişiklikler arasında ilacın dışarı atılması, membran değişikliği, enzimatik inaktivasyon ve hedef değişikliği gibi çeşitli direnç mekanizmaları yer almaktadır. Bakterilerde antibiyotiklere direnç sadece kalıtsal genetik değişiklikler yoluyla değil genetik olmayan değişimler yoluyla da olmaktadır (Reygaert, 2018). Genetik olmayan bu değişim, mikroorganizmalar tarafından

antibiyotiklere karşı geliştirilen ve mikroorganizmaların hayatta kalmasını sağlayan VBNC durumudur. Antibiyotiklerin mikroorganizmaların VBNC duruma indüklenmesine sebep olduğuna ve VBNC durumdaki mikroorganizmaların antibiyotiklere dirençli olduğuna dair bulgular literatürdeki çalışmalarla da tespit edilmiştir.

Ampisilin antibiyotiği varlığında *E. coli* BW25113 ile gerçekleştirilen bir çalışmada, MİK değerinin 25 katı ampisilin antibiyotiği varlığında LB broth ortamında durağan faza geçen hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Bamford vd., 2017). VBNC durumdaki *E. coli* ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise VBNC hücrelerin antibiyotiklere karşı dirençli hale geldiği belirlenmiştir. Düşük klor seviyesiyle VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücreleri ampisilin, gentamisin ve rifampisin de aralarında bulunduğu dokuz farklı antibiyotiğe maruz bırakılmış ve kültüre edilebilir hücelere kıyasla VBNC durumdaki hücrelerin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dahası yine bu çalışmada Real Time PCR ile gerçekleştirilen analizler de ilaç atımından sorumlu genlerin (*tolC*, *acrD*, *acrF*, *emrA*, *macA* ve *macB*) VBNC hücrelerde kontrol grubu hücelere kıyasla daha yüksek ekspresyonu olduğu tespit edilmiştir (Lin vd., 2017). VBNC durumdaki bakterilerin antibiyotik direncini test etmek amacıyla yapılan bir başka çalışmada, VBNC duruma indüklenen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* ve *Bacillus cereus* suşlarının antibiyotik ve dezenfektan maddelere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Robben vd., 2019). Ayrıca eş zamanlı UV ve klora maruz bırakılarak VBNC duruma indüklendiği başka bir çalışmada antibiyotik dirençsiz *E. coli* K12, çoklu ilaca dirençli RP4 plazmidini taşıyan *E. coli* K12 ve *rpoB* geni mutasyona uğramış (Ser585phe) *E. coli* K12 suşlarında ilaç atımından sorumlu *tetA* ve *tetR* genlerinin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Zhang vd., 2024).

VBNC duruma indüklenen mikroorganizmalar hem tekrarlanan enfeksiyonların hem de antibiyotik direncinin gelişmesine sebep olmaktadır. *M. tuberculosis* de tekrarlayan enfeksiyonların sebebinin bu patojendeki VBNC durumdan kaynaklandığı ve hastalığın yıllar içinde yeniden tekrar ettiği gözlenmiştir (Shleeva vd., 2004; Young vd., 2009). *A. baumannii* ATCC 17978 ile yapılan bir çalışmada, yüksek dozda siprofloksasin antibiyotiği varlığında hücrelerinin VBNC duruma girdiği tespit edilmiştir (Nicol vd., 2019). Benzer şekilde, *Rhodococcus biphenylivorans* yapılan bir çalışmada, norfloksasin antibiyotiği varlığında hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Jia vd., 2020). *Cronobacter sakazakii* ile yapılan bir çalışmada, ampisilin antibiyotiğinin hücreleri VBNC duruma indüklediği gözlenmiştir (Zhang vd., 2020). Ayrıca, antibiyotik stresinin biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda da VBNC durumunu indüklediği gözlemlenmiştir. Biyofilm oluşumuna

sebepe olan *P. aeruginosa* ve *S. aureus* ile yapılan bir çalışma da ise biyofilm içerisine gömülü olan hücrelere uygulanan antibiyotiğin hücreleri VBNC duruma indüklediği tespit edilmiştir. Tobramisin ilavesinin, *P. aeruginosa* hücrelerini, vancomycin, quinupristin/dalfopristin uygulamasının ise *S. aureus* hücrelerini VBNC duruma indüklediği tespit edilmiştir. Dahası stres şartları ortadan kalktığında hücrelerin yeniden canlandığı da belirlenmiştir (Mangiaterra vd., 2020; Pasquaroli vd., 2013).

Sonuç olarak, antibiyotiklerin VBNC durum üzerindeki etkileri, bu hücrelerin çevresel streslere karşı geliştirdikleri bir hayatta kalma stratejisi olarak önem kazanmaktadır. VBNC duruma geçen bakteriler, antibiyotiklere karşı direnç geliştirme kapasitesine sahip olabilmekte ve bu durum, antibiyotik direncinin yayılmasını hızlandırmaktadır. Bu nedenle, antibiyotiklerin VBNC durum üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması, antibiyotik direnci ile mücadelede kritik bir öneme sahiptir.

2.5. VBNC Tespit Yöntemleri

VBNC durumdaki hücreler, patojenik özelliklerini sürdürebildikleri, uygun koşullar altında tekrar aktif hale gelebildikleri ve geleneksel kltr yöntemleri ile tespit edilemedikleri için önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadırlar. Gıda güvenliği ve halk sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri göz önüne alındığında, bu hücrelerin tespiti son derece önemlidir (Dinu & Bach, 2013; Ravel vd., 1995). Bu nedenle, gıda, hastane ve su kaynakları gibi çeşitli ortamlardaki mikrobiyal kontaminasyon seviyelerinin belirlenmesi, VBNC bakterilerin tespiti için uygun, hızlı, güvenilir tekniklerin geliştirilmesi ve kullanılması son derece kritiktir (Borkar vd., 2024; Ramamurthy vd., 2014; Zhang vd., 2023).

Kltre edilemeyen VBNC hücreleri l hücrelerden ayıran en önemli fark aktif bir metabolizmaya sahip olmaları ve hücre membran bütünlüğünün korunmuş olmasıdır. Bu sebeple VBNC hücrelerin tespitinde metabolizma, hücre membran bütünlüğü, solunum aktivitesi gibi çeşitli canlılık ölçüm metotları geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan VBNC tespit yöntemleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. VBNC tespit yöntemleri

| Yöntemin Türü | Yöntemin Adı | Prensip | Referanslar |
|---------------------------|----------------------------|---|--|
| Mikroskop /Boyama Temelli | Doğrudan Canlı Sayım (DVC) | DNA sentezini inhibe eden nalidiksik asit, aztreonam ve siprofloksasin gibi antibiyotiklerin varlığında uzayan hücrelerin akrinin orange ile boyanması temeline dayanmaktadır. | (Kogure vd., 1979; Xu vd., 1982; Yokomaku vd., 2000) |
| | Live/Dead BacLight | Nükleik asit temelli yeşil floresan probu SYTO 9, sağlam ve hasarlı hücre zarlarına nüfuz edebilir, böylece tüm hücreler yeşil floresan olur. Kırmızı floresan prob propidyum iyodür yalnızca hasarlı hücre zarlarına nüfuz edebilir ve zar geçirgen hücreleri işaretlemek için kullanılır. Böylece ölü hücreler kırmızı, canlı hücreler ise yeşil boyanmış olur. | (Boulos vd., 1999; Park & Kim, 2018; Zhao vd., 2013) |
| | CTC/DAPI | CTC, bakteriyel solunum aktivitesiyle oluşan NAD(P)H tarafından indirgenğinde formazan boyası üretir ve bu nedenle aktif bakterileri seçici olarak boyar. DAPI, DNA'nın AT dizisine özgü bir küçük oluk bağlayıcısıdır ve membran hasarından bağımsız olarak nükleik asitleri boyamak için bakterilere nüfuz eder. | (Severin vd., 1985; Wideman vd., 2021; Zimmermann vd., 1978) |
| qPCR temelli analizler | RT-qPCR | Canlı hücreler hala transkripsiyonel işlemlere sahiptir, ancak ölü hücrelerin transkripsiyon ürünü mRNA'nın yarı ömrü son derece kısadır, dolayısıyla bu yöntem tüm canlı hücrelerin varlığını tespit etmek için kullanılabilir. | (Coutard vd., 2007a; Wideman vd., 2021; Zhang vd., 2015) |
| | PMA/EMA-qPCR | Ölü hücre nükleik asitleri ile geri dönüşü olmayan bir şekilde bağlantı kurarak PCR amplifikasyonunu güçlü bir şekilde inhibe edebilen spesifik boyaların kullanıldığı bir yöntemdir. Sonuç olarak yalnızca sağlam zarlara sahip hücrelerin DNA'sı çoğaltılacaktır. | (Ding vd., 2017; Fu vd., 2020; Nocker vd., 2006; Nocker & Camper, 2006; Wideman vd., 2021) |

Tablo 2.1. Tablonun Devamı

| Yöntemin Türü | Yöntemin Adı | Prensip | Referanslar |
|---------------------------------|----------------------|---|--|
| Flow Sitometri | Live/Dead BacLight | Live/Dead BacLight boyama yöntemiyle birlikte kullanılmaktadır. | (Xu vd., 2022; Zhao vd., 2013) |
| Antikor ve Faj Temelli Yaklaşım | Biyosensör | Bu yöntemin temeli, faj veya türe özgü antikorlar ile manyetik nanopartiküllerin birlikte kullanılmasına dayanmaktadır. | (Bekir vd., 2015; Fernandes vd., 2013) |
| Protein Temelli Yaklaşım | 2D Jel elektroforezi | Her iki yöntemde de VBNC durumdaki hücrelerin proteomik profillerini oluşturan proteinlerin kütleli analizi yapılmakta ve normal hücrelerdeki ile ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmaktadır. | (Jia vd., 2013; Lai vd., 2009; Muela vd., 2008) |
| | İTRAQ | | |
| Spektroskopik Yaklaşım | Raman spektroskopisi | Mikroorganizmaların kimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, mikroorganizmaların hücresel bileşenlerindeki (hücre duvarı, protein, nükleik asit ve yağ asitleri gibi) moleküllerin titreşimlerini analiz ederek mikroorganizmaların türlerini ve durumlarını belirleme yeteneğine sahiptir. | (Jia vd., 2020; Niedźwiedz vd., 2020; Xie vd., 2021) |
| | ATR-FTIR | | |
| Metabolik Temelli Yaklaşım | ATP-lusiferaz | Ölü hücrelerde hızla azalan ATP seviyelerinin VBNC hücrelerinde yüksek kaldığı rapor edilmiştir, dolayısıyla ATP varlığı VBNC durumdaki hücrelerin iyi bir canlılık belirtecidir. Bu yöntemde hücrelerdeki ATP düzeyi tespit edilmektedir. ATP, lusiferaz enzimiyle reaksiyona girer ve bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ışık şiddeti, örnek içindeki mikroorganizmaların sayısını yansıtır. | (Lindbäck vd., 2010; Robben vd., 2019) |

Bakterilerde VBNC tespiti ile ilgili ilk çalışmalar, hücre boyama prosedürlerine dayanmaktadır. VBNC hücreleri tespit etmek için benimsenen ilk yöntem, mikroskopik bir yöntem olan doğrudan canlı sayımdır (DVC) (Kogure vd., 1979). Doğrudan canlı sayımında DNA sentezini inhibe eden nalidiksik asit, aztreonam ve siprofloksasin gibi antibiyotiklerin varlığında uzayan hücrelerin akridin turuncusu ile boyanmasına dayanır (Kogure vd., 1979; Xu vd., 1982). Bu yöntemde, canlı ve ölü hücreler boyutlarındaki farklılıklar nedeniyle mikroskop yoluyla ayırt edilmektedir (Kogure vd., 1979; Yokomaku vd., 2000).

VBNC hücrelerin tespitinde kullanılan bir başka yöntem de sitoplazmik membran bütünlüğünün değerlendirilmesidir. Bu yöntemde nükleik asit temelli SYTO-9 ve propidium iyodür olmak üzere iki farklı floresan boyanın kombinasyonu kullanılmaktadır. Bu boya ile hem floresan mikroskopta hem de flow sitometride ölü ve canlı hücrelerin ayrımı sağlanmaktadır. SYTO-9, bir popülasyondaki tüm bakterileri etiketleyen yeşil floresan renk verirken, propidium iyodür ise yalnızca zarar görmüş zarlara nüfuz etmekte ve kırmızı floresan renk vermektedir. Bu şekilde, sağlam membranlara sahip hücreler yeşil floresan, zarar görmüş zarlara sahip hücreler ise kırmızı floresan vermektedir (Boulos vd., 1999; Park & Kim, 2018; Pinto vd., 2015; Zhao vd., 2013).

VBNC hücrelerde hücreysel aktiviteyi tespit etmek için kullanılan bir diğer yöntemde CTC-DAPI boyamasıdır. Bu yöntem 5 - Siyano - 2,3 - Ditolil Tetrazolyum Klorür (CTC)-DAPI ve 2 -p (Iyodofenil) -3 -p (Nitrofenil) 5 - Fenil Tetrazolyum Klorür (INT)-DAPI olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Cappelier vd., 1997; Zimmermann vd., 1978). Bu formazan tuzları elektron alıcıları olarak davranır ve elektron taşıma zinciri sonunda elektronları alarak hücre içinde INT formazan veya CTC formazan olarak bir çökelti haline indirgenir. INT formazanın koyu kırmızı çökeltileri, optik bir mikroskopla görüntülenirken, CTC formazanın kırmızı floresan çökeltileri, epifloresans mikroskobu ile görüntülenmektedir (Fakruddin vd., 2013; Severin vd., 1985; Wideman vd., 2021).

Son yıllarda bakterilerde canlılık belirteci olarak nükleik asit temelli çeşitli yöntemler de geliştirilmiştir (Josephson vd., 1993). Ancak ölü bakterileri canlı bakterilerden normal PCR veya qPCR ile ayırt etmek mümkün değildir, çünkü bu yöntemler sadece DNA'yı hedefler. Bu sebeple de canlı hücrelerin DNA'larını ölçmek için gerçek zamanlı PCR'da etidyum monoazid (EMA) ve propidyum monoazid (PMA) kullanılmıştır (Inoue vd., 2008; Wideman vd., 2021). EMA ve PMA'nın ölü hücre DNA'larının çoğalmasını inhibe etme özelliğinden faydalanılmıştır (Ding vd., 2017; Gin & Goh, 2013; Nocker vd., 2006; Nocker & Camper, 2006; Wideman vd., 2021; Zhang vd., 2015; Zhong & Zhao, 2018). Ancak EMA'nın hatalı sonuçlar

verebildiği tespit edildiğinden dolayı PMA'nın kullanımı daha yaygındır (Fu vd., 2020; Hussein & Ghit, 2021; Pan & Breidt, 2007; Zhong & Zhao, 2018).

Moleküler tanı yaklaşımlarına dayanan başka bir yöntem de ters transkripsiyon-kantitatif PCR'dir. Bu yöntemde stabil olarak eksprese edilen hedef bir gen ve 16S, *relA*, *rpoS* gibi genler ve virülans genleri canlılık belirteçleri olarak kullanılmıştır (Coutard, vd., 2007a; Lothigius vd., 2010; Wideman vd., 2021; Zhang vd., 2015).

VBNC hücreleri tespit etmede kullanılan başka bir yöntemde biyosensör kullanılmasıdır. VBNC hücrelerin tespiti için manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı faj temelli bir biyoçip geliştirilmiştir. Bu yöntemde fajların yüzey bölgelerine *Salmonella*'ya özgü antikolar (anti-Salmonella) eklenmiş ve manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı faj bazlı bir biyoçip geliştirilmiştir (Fernandes vd., 2013). Yapılan başka bir çalışmada da Poliklonal anti-*S. aureus* antikoru altın elektrot üzerine immobilize edilerek bir immunosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensörün hem stresli hem de resüsitasyona uğramış patojenik *S. aureus*'ları tanımda oldukça hassas bir sensör olduğu tespit edilmiştir (Bekir vd., 2015).

VBNC hücrelerin tespitinde kullanılan başka bir yöntemde proteomik temelli yöntemlerdir. Bu yöntemlerden iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi VBNC durumdaki hücrelerin protein miktarındaki farklılıkların analiz edilmesine dayanmaktadır. Bu analiz sonrasında fazla miktarda bulunan proteinler kütle spektrofotometri ile tanımlanabilmekte ve VBNC durum ile ilişkisi analiz edilmektedir (Lai vd., 2009). Proteomik yöntem, VBNC durumdaki *E. coli* hücrelerinin dış membranındaki protein değişimini incelemek için kabul edilmiştir ve on üç proteinde artış gözlemlenmiştir (Muela vd., 2008). VBNC durumdaki *Vibrio harveyi* proteinleri 2D-PAGE ile ayrıldıktan sonra MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir (Jia vd., 2013). Bu yöntemin geliştirilmesiyle VBNC tespit yöntemlerine bir yenisini daha eklenmiştir.

Son yıllarda VBNC hücreleri tespit etmek ve VBNC forma geçiş sürecini aydınlatmak için mikroarray ve RNA sekans yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde VBNC durumdaki hücrelerin gen ekspresyon profilleri, hangi genlerin ekspresyon seviyesinde artış ya da azalış olduğu belirlenmekte ve bu sayede moleküler mekanizmanın çözümüne yönelik yeni bilgiler elde edilmeye çalışılmaktadır (Asakura vd., 2007a; Daer vd., 2021; Su vd., 2015; Xu vd., 2018; Ye vd., 2020; Zhong & Zhao, 2019).

VBNC tespitinde kullanılan yöntemlerden bir diğeri de LC/MS/MS ve İTRAQ dır. Bu yöntemin temeli hücrelerden izole edilen proteinlerin tripsin ile parçalanması, etiketlenmesi ve daha sonra elde edilen peptit fraksiyonların LC/MS ile analizine dayanmaktadır. Literatürde *E. coli*, *Cupriavidus metallidurans* ve *A. citrulli* ile gerçekleştirilen çalışmalarda VBNC

durumdaki hücrelerin protein profillerine odaklanılmış ve hangi proteinlerin artıp ya da azaldığı hakkında derinlemesine bilgiler elde edilmiştir. Hatta bu yöntemin RNA sekans ve mikroarray yöntemlerinden daha yüksek çözünürlük ve hassasiyete sahip olduğuna da değinilmektedir (Calo-Mata vd., 2016; Kan vd., 2020; Zhao vd., 2016).

VBNC hücrelerin tespitinde kullanılan bir diğer yöntemde Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi yöntemidir. FTIR spektroskopisi, mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılması için 1991 yılında tanıtılan ve araştırmacıların yoğun ilgi gösterdiği ve geliştirdiği bir tekniktir. Günümüzde bu teknik, mikrobiyal suşların hızlı karakterizasyonunu ve mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. FTIR spektroskopisi, bakteriyel izolatlarda parmak izi spektrumları sağlayarak karmaşık mikrobiyal numunelerin hızlı ve güvenilir bir şekilde incelenmesini mümkün kılmaktadır. Ek olarak bu teknik, mikroorganizmaların biyokimyasal bileşenlerindeki değişiklikleri tespit etme yeteneğine de sahiptir (Erukhimovitch vd., 2005; Schmitt & Flemming, 1998; Wenning & Scherer, 2013). Bu açıdan bakıldığında ATR-FTIR spektroskopisi, VBNC hücrelerin tespit edilmesi gibi önemli bir alanda potansiyel bir çözüm sunmaktadır. VBNC hücrelerin biyokimyasal özellikleri incelenip tespit edilebilmektedir. VBNC duruma indüklenen hücreler üzerinde gerçekleştirilen ATR-FTIR analizlerinde, birçok mikroorganizma türünde lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında önemli spektral değişiklikler meydana gelmektedir. Örneğin, *E. coli* ile gerçekleştirilen bir çalışmada soğuk stresine maruz bırakılan hücrelerde lipit, protein ve fosfodiester spektral bantlarında kontrol örneklerine kıyasla azalmanın meydana geldiği tespit edilmiştir (Jia vd., 2020; Lu vd., 2011; Niedźwiedz vd., 2020; Xie vd., 2021).

2.6. VBNC Durumdaki Bakterilerde Patojenite

VBNC durumdaki bakterilerin patojenitesini koruduğu ve bu durumun iki şekilde meydana geldiği yapılan çalışmalar neticesinde tespit edilmiştir. Bunlardan ilki stres şartları altındayken sessiz kalmaktır. Hücreler stres şartları altındayken metabolizmalarını minimize ederler ve stres şartları ortadan kalktığında veya çeşitli etmenlerle ortam koşulları uygun hale geldiğinde yeniden canlanabilir ve hastalıklara sebep olabilirler. Bir diğer durum ise VBNC durumdaki bakterilerin virülans ve toksisiteyle ilgili genlerini sentezlemeye devam etmeleridir. Yani, stres altındayken dahi toksin veya virülans faktörlerini üretebiliyor olmalarıdır. Bu durumda, bakteriler hala patojenik kalabilirler ve hastalıklara neden olabilirler (Dong vd., 2020; Li vd., 2016; Zhang vd., 2015; Zhao vd., 2017). *E. coli* (Aurass vd., 2011; Fu vd., 2020), *S. aureus* (Magalhães vd., 2021), *Vibrio* sp. (Colwell vd., 1996; Oliver & Bockian, 1995), *C. jejuni*

(Chaisowwong vd., 2012), *Salmonella* (Zeng vd., 2013), *Shigella* (Rahman vd., 1994), *M. tuberculosis* (Gengenbacher & Kaufmann, 2012) ve *C. sakazakii* (Jameelah vd., 2018) gibi mikroorganizmalarında aralarında bulunduğu birçok tür VBNC durumda virülanslarını korumaktadır. VBNC durumdaki bakterilerin virülansları yapılan *invivo* çalışmalar ile test edilmiş ve doğrulanmıştır (Liu vd., 2010; Oliver & Bockian, 1995; Zeng vd., 2013; Zhu vd., 2022).

2.7. VBNC Durumdaki Bakterilerin Yeniden Canlanması

Rutin kültür ortamlarında gelişemeyen ancak metabolik olarak aktif olan VBNC hücreler, ortam şartları yeniden elverişli olduğunda veya uygulanabilecek bazı fiziksel ve kimyasal etmenler sayesinde tekrar aktif ve kültürlenebilir bir duruma geri dönebilirler. Bu durum yeniden canlanma (resüsitasyon) olarak bilinmektedir. Fiziksel veya kimyasal birçok etmen yeniden canlanmaya sebep olmaktadır. Düşük veya yüksek sıcaklık ile VBNC duruma indüklenen hücrelerde sıcaklığın optimum seviye de tutulması hücreleri yeniden canlandıran fiziksel bir uyarıdır (Fu vd., 2020; Mizunoe vd., 2000; Zeng vd., 2013). Sıcaklığın yanında VBNC durumun geriye döndürülmesinde besin ilavesi (Bekir vd., 2015; Song & Lee, 2021), kuraklıkta ortam neminin artırılması (Se vd., 2021) gibi farklı fiziksel etmenlerde rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra kimyasal uyarılarda hücrelerin VBNC durumdan çıkışını tetiklemektedir. Örneğin VBNC hücre popülasyonunun bulunduğu ortama sodyum pirüvat (Mizunoe vd., 2000), Tween 20 (Jiang, 2014; Zeng vd., 2013), Tween 80 (Wei & Zhao, 2018), NaCl (Casasola-Rodríguez vd., 2018), glutamin, treonin ve serin gibi amino asitlerin (Pienaar vd., 2016; Pinto vd., 2011), bazı vitaminlerin (Hommel vd., 2019; Sun vd., 2008), katalaz, DnaK, RpfS ve YeaZ gibi aktif proteinlerin (Handford vd., 2009; Jiang, 2014; Keep vd., 2006; Liu vd., 2018; Mizunoe vd., 2000; Panutdaporn vd., 2006; Pinto vd., 2015; Xu vd., 2022; Zeng vd., 2013), otoindükleyiciler ve norepinefrinin (Ayrapetyan vd., 2014; Freestone vd., 1999; Pinto vd., 2011; Sperandio vd., 2003) ilavesi ile kültürlenebilirliğin geriye dönüşümü desteklenmektedir. Ancak kültürlenebilirlik her bir bakteri türü için farklılık göstermekte hatta bazen VBNC durumdaki bir popülasyonun kültürlenebilirliği için birden fazla fiziksel ve kimyasal uyarı gerekmektedir.

Sıcaklık düşüşü ile VBNC duruma indüklenen *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ve *V. vulnificus* gibi bakterilerde resüsitasyon, sıcaklık stresinin giderilmesi ile gerçekleşmektedir. Açlık ve düşük sıcaklık kaynaklı VBNC'ye indüklenen *Enterohemorajik E. coli* ise katalaz veya sodyum pirüvat gibi H₂O₂ indirgeyici bileşiklerle modifiye edilmiş ortamlarda yeniden canlanabilmektedir (Mizunoe vd., 2000). Yüksek sıcaklık ile VBNC duruma giren hücrelerde

ise sıcaklığı maruz kalma süresi hücrelerin yeniden canlanması üzerinde farklı sonuçlar doğurmaktadır. Kısa vadeli yüksek sıcaklık (50 °C) maruziyeti ile VBNC ye indüklenen hücreler optimum sıcaklık değerlerinde yeniden canlanabilirken uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalan hücreler canlanamamaktadır (Fu vd., 2020). Elektrolize oksitleyici su ile VBNC'ye indüklenmiş *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* hücrelerinin 37 °C'de sodyum piruvat ve Tween 20 ile muamele edilmesinin ardından sadece *E. coli* O157:H7'nin yeniden canlandığı tespit edilmiştir (Afari & Hung, 2018).

VBNC durumdaki hücrelerin yeniden canlanmasında rol oynayan bir diğer faktörde protein agregasyonudur. Desnues vd. (2003) çalışmasında, *E. coli*'deki protein agregasyonunun VBNC durumu ile ilişkili olduğunu ve bu agregatların hücrelerin yeniden canlanma kapasitesi üzerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (Desnues vd., 2003). Benzer şekilde, Fu vd. (2020) de, protein agregasyonunun hücrelerin fizyolojik streslere adaptasyonunda önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. Bu çalışmalarda, protein agregatlarının, hücrelerin stres koşulları altında biyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için kritik bir rol oynadığı vurgulanmaktadır (Fu vd., 2020). Pu vd. (2019)'nin çalışmasında ise, VBNC hücrelerinin yeniden canlanabilmesi için DnaK-ClpB aparatının gerekli olduğu tespit edilmiştir. DnaK-ClpB şaperon sistemi, hücre proteinlerin düzgün katlanmasını sağlayarak protein agregasyonunu önler ve mevcut agregatları çözerek hücre fonksiyonların geri kazanılmasına yardımcı olur. Bu bulgu, VBNC durumdan çıkış ve hücrelerin yeniden kültüre edilebilir hale gelmesi sürecinde DnaK-ClpB sisteminin kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Pu vd., 2019).

2.8. VBNC Hücrelerde Enzim Aktivitesi

VBNC durumdaki mikroorganizmaların bir diğer önemli özellikleri de metabolik aktivitelerinin devam etmesidir. VBNC hücrelerde API ZYM kiti kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda VBNC hücrelerin metabolik aktiviteleri analiz edilmiştir. *E. coli* O157:H7 ile yapılan bir çalışmada, yüksek karbondioksit basıncı ile VBNC duruma indüklenen hücrelerde gerçekleştirilen analizler sonucunda, VBNC durumdaki hücrelerde enzim aktivitesinin logaritmik fazdaki hücrelere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Zhao vd., 2013). *Vibrio fluvialis* ile deniz tortusunda yapılan bir çalışmada alkalın fosfataz, C4-esteraz ve C8-esteraz lipaz aktivitelerinde bir azalma gözlemlenirken lösin arilamidaz, valin arilamidaz, β-galaktosidaz ve β-glukozidaz enzim aktiviteleri ise tespit edilememiştir. Ancak yine aynı çalışmada deniz suyunda inkübe edilen hücrelerde ise sadece C8-esteraz lipaz, asit fosfataz ve naftol-AS-BI-fosfohidrolazın normal hücrelerle aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir (Amel vd., 2008). *R. biphenylivorans* ile yapılan bir çalışmada hem VBNC hem de normal hücrelerde

α -glukozidaz, β -glukozidaz, asit fosfataz, naftol-ASBI-fosfohidrolaz, valin arilamidaz, lösin arilamidaz, esteraz lipaz ve esteraz gibi bazı enzimlerin benzer aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur (Su vd., 2015). *S. aureus* ile yapılan bir çalışmada da asit fosfataz, alkalın fosfataz ve naftol-ASBI-fosforhidrolaz enzimlerinin hem logaritmik faz hücrelerinde hem de VBNC hücrelerde benzer aktivite gösterdikleri API ZYM kiti ile belirlenmiştir (Yan vd., 2021). Benzer şekilde *S. aureus* ile yapılan başka bir çalışmada da alkalın fosfataz, asit fosfataz, esteraz lipaz C8, esteraz C4 ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz ile ilgili enzimlerin her iki hücrede de aktivitelelerini koruduğu bildirilmiştir (Liao vd., 2021). Açlık koşullarında *Bacillus* sp. ile yapılan bir çalışmada normal hücrelere kıyasla VBNC hücreler alkalın fosfataz, esteraz (C4), esteraz lipaz (C8), β -glukosidaz, amilaz, lesitinaz ve kazeinaz enzimlelerini aktifleştirmişlerdir (Mahdhi vd., 2012).

2.9. VBNC Durumda Bakterilerde Meydana Gelen Fiziksel ve Moleküler Değişiklikler

VBNC durumda mikroorganizmalar çevresel şartlara dayanabilmek için bazı değişimler ortaya koymaktadırlar. VBNC hücrelerde hücre duvar yapısı (Signoretto vd., 2000) ve morfoloji (Takeda, 2011) değişiklik gösterse de gen ekspresyonu (Lleò vd., 2001), protein sentezi (Rahman vd., 1994), zar bütünlüğü (Lloyd & Hayes, 1995) ve solunum aktivitesi hala devam etmektedir (Li vd., 2014; Oliver, 2005). VBNC duruma giren bakterilerde hücre hacminde ve hücre zarfında bazı değişikliklerin meydana geldiği elektron mikroskopu çalışmaları ile tespit edilmiştir (Li vd., 2016; Signoretto vd., 2000). VBNC durumda çomak şekilli mikroorganizmaların kok ve benzeri forma (Kumar & Ghosh, 2019), yay şekilli mikroorganizmaların ise küresel forma geçiş yaptığı gözlenmiştir (Dong vd., 2020). Meydana gelen bu morfolojik değişiklikler, sitoplazmik membrandaki yağ asidi bileşimi, peptidoglikan çapraz bağları, lipoprotein ve glikan zincirler gibi hücre duvarı bileşenleindeki kapsamlı modifikasyonlarla ilişkilidir (Dong vd., 2020; Signoretto vd., 2000). Bu değişiklikler hücre duvarı ve membranının stabilizasyonunu arttıran ve dolayısı ile hücrenin stabilitesini de sağlayan özelliklerdir. Ayrıca VBNC durumdaki hücrelerde peptidoglikan sentezinin de arttığı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Artan peptidoglikan sentezi ve çapraz bağlanmalar nedeni ile VBNC durumdaki hücrelerin kültüre edilebilir hücrelere göre fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı çok daha yüksek dirence sahip olduğu düşünülmektedir (Borkar vd., 2024; Fu vd., 2020; González-Escalona vd., 2006; Hung vd., 2013; Robben vd., 2018, 2019). Dahası VBNC hücreler ile kültüre edilebilir hücreler arasında fizyolojik ve moleküler açıdan belirgin farklılıklar gözlemlenmektedir. Bu farklılıklar, özellikle hücrelelerin enerji metabolizması,

metabolik aktiviteleri, RNA ve protein sentezi ile gen ekspresyonu düzeylerinde ortaya çıkmaktadır. VBNC hücrelerde ATP seviyeleri genellikle düşüktür, bu da enerji metabolizmasının minimal seviyelerde çalıştığını ve hücrelerin hayatta kalmak için enerji tasarrufuna yöneldiğini göstermektedir. Benzer şekilde, VBNC duruma indüklenen hücrelerde metabolik aktivitenin de baskılandığı tespit edilmiştir. Bu baskılanmanın enerji tüketimini en aza indirmek ve uzun süre hayatta kalmayı sağlamak amacıyla hücrelerin geliştirdikleri bir adaptasyon olduğu düşünülmektedir (Fu vd., 2020; González-Escalona vd., 2006; Robben vd., 2018, 2019). VBNC durumundaki hücrelerde RNA sentezinin azaldığı ve buna bağlı olarak protein sentezinin de belirgin şekilde azaldığı gözlenmektedir. RNA ve protein sentezinde meydana gelen bu azalma yine hücredeki enerji tasarrufu ile ilişkilidir. Çünkü bu azalma sonucunda hücreler transkripsiyonel aktivitelerini azaltarak enerji tasarrufu sağlarlar. Bununla birlikte, VBNC hücrelerde belirli genlerin ekspresyonu baskılanırken, stres yanıtı ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış gözlenebilir. Bu durum, hücrelerin zorlu çevresel koşullara karşı geliştirdikleri adaptif yanıtın bir parçası olarak değerlendirilmektedir (Fu vd., 2020; González-Escalona vd., 2006; Hung vd., 2013).

2.10. VBNC Durumun Moleküler Mekanizması

Bakterilerin VBNC durumu ile ilgili moleküler mekanizma hala tam anlamı ile aydınlatılmış değildir. Bugüne kadar bakterilerin VBNC ye girişini tetikleyen stres faktörleri, VBNC duruma giren bakteri türleri ve VBNC durumun görüldüğü ortamlar ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen literatürde var olan moleküler mekanizmayı aydınlatıcı çalışmaların bu kapsamda yeterli olmadığı görülmektedir (Dong vd., 2020; Li vd., 2014; Pinto vd., 2015; Yoon & Lee, 2020). VBNC durumu indükleyen veya kontrol eden molekülü belirlemek için yapılan bazı çalışmalar neticesinde mekanizmayı kontrol eden birkaç proteinin VBNC hücre oluşumunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Bunlardan bazıları sensör histidin kinaz EnvZ (Darcan vd., 2003, 2009; Darcan, 2005), alternatif sigma faktör RpoS (Boaretti vd., 2003; Kusumoto vd., 2012) ve polifosfat kinaz PPK1 (Gangaiah vd., 2009) proteinleridir.

Darcan vd. (2003) *E. coli* ile deniz suyunda yaptıkları çalışmalarında *envZ* nakavt suşların VBNC duruma girmediğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde çalışmalarında osmotik stres, alkali pH ve osmotik koruyucu glisin betain varlığı gibi farklı stres şartlarında bu durumun değişmediğini bulmuşlardır (Darcan vd., 2003, 2009; Darcan, 2005). Yani stres faktörleri değişse bile *E. coli envZ* mutant suş VBNC duruma indüklenmemiştir. Bu durum, sensör kinaz EnvZ proteininin yokluğunda hücrelerin çevresel stresi algılayamaması ve dolayısıyla VBNC mekanizmasının çalıştırılmamasıyla ilişkilendirilmektedir.

VBNC durumdaki hücrelerde EnvZ'nin yanı sıra dış membran porin proteinlerinde de önemli değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Porin proteinleri, bakteriyel dış zarın temel bileşenleridir ve küçük moleküllerin hücre içine ve dışına geçişini düzenleyerek hücrelerin çevresel streslere karşı adaptasyon geliştirmelerine olanak sağlamaktadırlar. Oksidatif stres, yüksek karbondioksit basıncı, klor ve düşük sıcaklıklar ile VBNC ye indüklenen hücrelerde dış membran proteini TolC, OmpW, OmpF ve OmpA'nın sentezinde ciddi bir artış saptanmıştır (Asakura vd., 2007b, 2008; Lin vd., 2017; Muela vd., 2008; Zhao vd., 2016; Zhong & Zhao, 2019). Ancak dış membran proteinlerinde meydana gelen bu artışın VBNC duruma giriş ile ilişkisi ve moleküler mekanizması hakkında bilgiler hala yetersizdir. Bunun yanında *E. coli* ile gerçekleştirilen bazı çalışmalarda, dış membran proteinlerinin ekspresyonuyla üretilen bir sinyalin alternatif sigma faktör E (*rpoE*) aktivitesini düzenlediği tespit edilmiştir. Dış membran proteinlerinin artan ekspresyonu ile RpoE'nin ekspresyonun arttığı ve azalan ekspresyonuyla azaldığı belirlenmiştir (Mecsas vd., 1993). Bu sebeple belki de dış membran porinlerinin neden olduğu zarf stres tepkisi RpoE üzerinden VBNC durum oluşumuna sebep olmaktadır.

Dış membran proteinlerinin yanı sıra, farklı stres şartlarında birçok genin düzenlenmesinden sorumlu olan alternatif sigma faktörü RpoS'nin de VBNC durumun oluşumunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Boaretti vd. (2003) yapay oligotrofik ortamda +4 °C de *rpoS* mutant *E. coli* hücrelerinin VBNC duruma girmediğini ve stres şartları altında erkenden öldüğünü tespit etmişlerdir (Boaretti vd., 2003). Klor varlığında VBNC duruma indüklenmiş *E. coli* hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise *rpoS*'nin ekspresyon miktarının arttığı tespit edilmiştir (Chen vd., 2018; Lin vd., 2017). Buna karşın farklı stres şartlarında *E. coli*, *S. typhimurium*, *Salmonella enterica*, *C. sakazakii* ve *V. cholera* ile gerçekleştirilen çalışmalarda *rpoS*'nin ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (González-Escalona vd., 2006; Jameelah vd., 2018; Kusumoto vd., 2012; Munro vd., 1995; Xu vd., 2018). Dolayısı ile farklı hücrelerde ve farklı stres şartlarında RpoS'nin rolü hususunda değişken sonuçlar elde edilmiştir.

VBNC durum ile ilişkisi olan bir diğer enzimde poli-P'nin sentezinde anahtar rol oynayan polifosfat kinaz 1 (PPK1)'dir. Bu enzimin, bakterilerin virülansında ve stres cevaplarına aracılık etmede hayatta kalabilmek için temel molekül olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Brown & Kornberg, 2008). Düşük nemli yapay toprakta *E. coli* O157:H7 ile yapılan bir çalışmada polifosfat kinazın ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir (Se vd., 2021). Gangaiah vd. (2009) ve Kassem vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen başka çalışmalarda *ppk1* mutantında, hücrede enerji kaynağı olarak iş gören poli-P miktarında azalmanın meydana geldiğini ve bunun bir sonucu olarak da *C. jejuni* hücrelerinde VBNC oluşturma yeteneğinin

azaldığını tespit etmişlerdir. Bu sonuç poli-P'nin, VBNC oluşumunu pozitif olarak düzenleyebileceğini göstermektedir (Gangaiyah vd., 2009; Kassem vd., 2013).

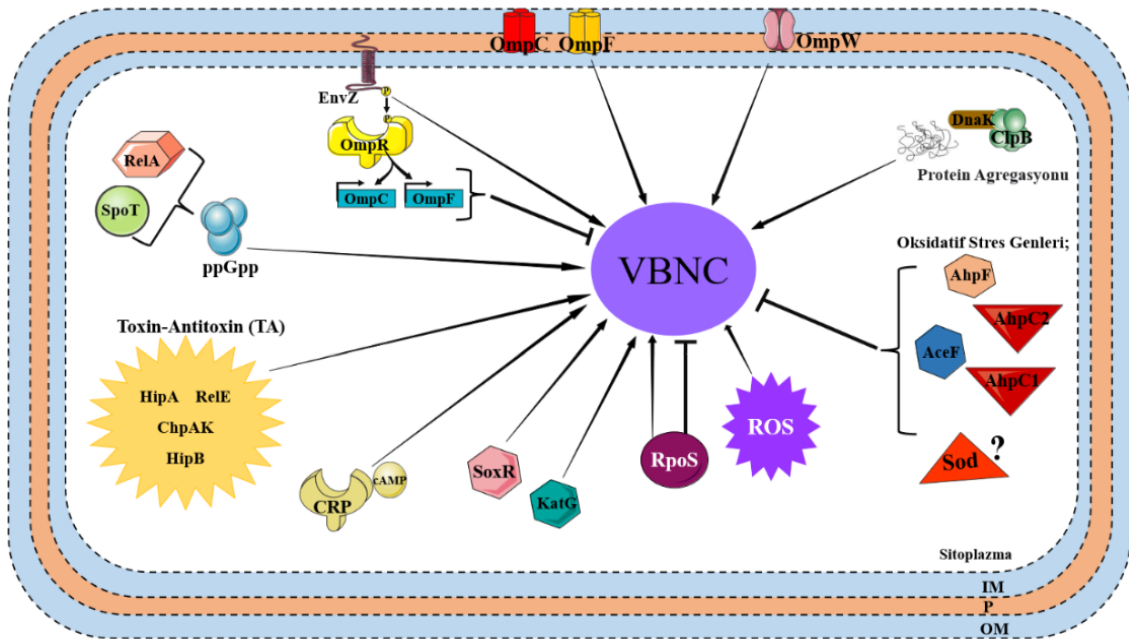
EnvZ, RpoS ve PPK1'in yanı sıra oksidatif stresle ilişkili LysR tipi transkripsiyonel düzenleyici OxyR (Kong vd., 2004; Li vd., 2014), alkil hidroperoksit redüktaz alt birimi AhpC (Asakura vd., 2007b; Wang vd., 2013), glutatyon S-transferaz (GST) (Abe vd., 2007) ve süperoksit dismutaz SodA (Noor vd., 2009; Zhao vd., 2016)'nın da VBNC durum ile ilişkili proteinler olduğu yapılan çalışmalar neticesinde belirlenmiştir. LysR tipi transkripsiyonel düzenleyici OxyR'nin VBNC durum ile ilişkisini belirlemek için, *oxyR* gen bölgesi mutant *V. vulnificus* hücreleri soğuğa maruz bırakılmış ve *oxyR* mutant suşların VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Kong vd., 2004). *E. amylovora*'da 37 °C'de açlık ortamında VBNC duruma indüklenen hücrelerde *oxyR* geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Santander vd., 2012). Her iki çalışmanın bulguları, *oxyR* geninin varlığının hücrelerin VBNC duruma girişini engellediğini ve bu genin ekspresyonunun azalmasının VBNC durumunu tetiklediğini göstermektedir. Bu durum, OxyR'nin, bakterilerin stres koşullarına yanıt olarak VBNC duruma geçişlerini düzenleyen önemli bir transkripsiyonel düzenleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Asakura vd. (2007)'nin oksidatif stres altında *E. coli*'nin strese duyarlı varyantı MP37 ile yapmış oldukları çalışmada *ahpCF* ve *aceF* nin ekspresyon seviyelerinin azalmış olduğunu tespit etmişlerdir (Asakura vd., 2007b). Oksidatif stres altında *ahpCF* ve *aceF* genlerinin ekspresyonunun azalması, hücrel savunma mekanizmalarının zayıflamasına ve VBNC durumunun indüksiyonuna katkı sağlıyor olabilir. VBNC durum ile ilişkisi olduğu tespit edilen bir diğer protein de GST'dir. Yapay deniz suyunda +4 °C de *V. vulnificus* ile gerçekleştirilen çalışmada GST'nin aşırı ekspresyonunda hücrelerin VBNC duruma indüklenmediği tespit edilmiştir (Abe vd., 2007; Li vd., 2014). Aşırı eksprese edilen GST'nin VBNC duruma geçişi engellemesi, bu proteinin stres yanıtlarında kritik düzenleyici olarak rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca oksidatif stres ile ilişkili *sod* geninin de VBNC durum ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Düşük sıcaklıkta doğal deniz suyunda VBNC *S. aureus* hücreleri ile yapılan çalışmada, *sodA* mutant hücrelerin yabani tip hücrelere kıyasla daha hızlı VBNC duruma girdiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, *sodA* mutasyonunun veya inaktivasyonunun *S. aureus*'ta VBNC duruma geçişi indükleyebileceğini göstermektedir (Masmoudi vd., 2010). VBNC durumunun oluşumu üzerinde etkisi olduğu bilinen diğer oksidatif stres genleri arasında *Vibrio vulnificus*, *Erwinia amylovora* ve *S. aureus*'ta çalışılan *katA* ve *katG* de bulunmaktadır (Masmoudi vd., 2010; Oliver, 2010; Santander vd., 2018). *V. vulnificus*'ta *katA/G* genlerinin ekspresyonunun veya inaktivasyonunun VBNC duruma girişte katkı sağladığı ve hücreler yeniden canlandırıldığında bu genlerin ekspresyonunun tekrar arttığı tespit edilmiştir

(Oliver, 2010). *E. amylovora*'da yapılan bir çalışma da *katA* ve *katG* genlerinin VBNC durumdaki hücrelerde azaldığı belirlenmiştir (Santander vd., 2012). Açlık ortamında *E. amylovora* ile gerçekleştirilen çalışmaların devamında, *katA* ve *katG* genleri mutant suşlar ve bu genlerin aşırı eksprese edildiği suşlarla deneylere devam edilmiştir. Yabani tip ve mutant suşlarda hızlı bir VBNC duruma geçiş gözlemlenirken, aşırı eksprese edilen suşlarda kültüre edilebilir hücre sayısında yabani tipe göre önemli bir artış kaydedilmiştir. Bu bulgular, *KatA* ve *KatG*'nin VBNC duruma giriş sürecini geciktirdiğini göstermektedir (Santander vd., 2018). Hem *KatA* hem de *KatG*, açlığın neden olduğu hücre içi oksidatif stresin detoksifikasyonuna katılarak hücre kültüre edilebilirliğini korumaya ve VBNC durum oluşumunu geciktirmeye yardımcı olur. Ancak klor/kloraminasyon stresi altında VBNC *E. coli* ile yapılan bir çalışmada ise, *katG* geninin VBNC durumda önemli ölçüde indüklendiği tespit edilmiştir. Bu sonuçta *katG*'nin VBNC durumunun oluşumuna katkı sağladığını ima etmektedir (Chen vd., 2018).

Son yıllarda VBNC durumun moleküler mekanizmasını çözmek için transkriptomik analizler ile daha derinlemesine araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Bu metot var olan tüm genlerin aynı şartlar içerisinde ekspresyon düzeylerinin analizini sağlamaktadır. Dolayısı ile VBNC durumda hangi genlerin aktif veya inaktif olduğu tespit edilebilmektedir. Literatürde farklı stres şartları ve farklı mikroorganizma türleri ile gerçekleştirilmiş transkriptomik temelli çalışmalar yer almaktadır. *E. coli* O157:H7 suşu ile düşük sıcaklıklarda yapılan deney sonucunda hücreler -20°C 'de 152 günde VBNC ye indüklenmiş ve bu hücreler ile transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde 1735 genin sentezinin arttığı ve 563 genin ise azaldığı toplamda 2298 gen tespit edilmiştir. *ompA*, *rpoA*, *tuf*, *secY* ve *50S ribosomal protein L15* en fazla sentezlenen 5 gen olarak belirlenmiştir. Ayrıca KEGG yolağı analizi sonuçlarına göre ribozom sinyal yolağında, RNA polimeraz alt ünitesi *rpoA*, *rpoB*, protein sentezi başlatma faktörü IF-1, IF-2 ve IF-3, protein sentezi uzama faktörü EF-Tu, EF-Ts ve EF-G, öncü protein translokaz alt birimi SecY ve FtsY reseptörü ve Ffh proteini artarken protein sentezi salınım faktörü RF-1'i kodlayan *rpmE* geninin ise azaldığı tespit edilmiştir. Gen ontoloji (GO) fonksiyonel analizleri neticesinde de *dcuA*, *proY*, *metN*, *glpT* ve *mgta* iyon taşıyıcılarının da en fazla indüklenen genler olduğu sonucuna varılmıştır (Zhong & Zhao, 2019). Yüksek CO₂ basıncı altında VBNC ye indüklenen *E. coli* hücrelerinde RNA sekans ve iTRAQ yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada 97 genin ve 56 proteinin VBNC durumunda önemli ölçüde değiştiği ortaya konulmuştur. *yhaR*, *ecnB*, *hdeAB*, *yodB*, *ylcB* (*cusC*) ve *fliH* dahil toplamda 22 genin sentezinin arttığı *lamB*, *metN*, *intC*, *hyaD*, *dicC* ve *fimC* dahil 75 genin ise sentezinin azaldığı tespit edilmiştir. Membran taşınması, merkezi

metabolizma, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi ile ilgili genlerin ve proteinlerin VBNC hücrelerindeki ekspresyonu azalmaktadır. Ek olarak, VBNC hücrelerinde farklı şekilde ifade edilen proteinleri tanımlamak için iTRAQ yöntemi ile analizler de gerçekleştirilmiş ve 1573 protein ile bağlantılı toplam 7194 benzersiz peptid tanımlanmıştır. Bu proteinler arasında 28 proteinin (MalK, ThrC, GlnS, TopA, DamX, GltA, AceE, OmpF ve YaeH) sentezinin arttığı 28 proteinin (OmpA, OcrD, DnaE, RpsAE, CarB ve AcnB) ise azaldığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2016). Klor kullanılarak *E. coli* ile VBNC'ye indüklemiş hücrelerde ise 203 genin sentezinin arttığı 159 genin ise azaldığı toplamda 362 geninin ekspresyonunun önemli ölçüde değiştiği bulunmuştur. Çalışmanın devamında, daha fazla analiz gerçekleştirmek amacıyla, 5 kat yüksek seviyelerde eksprese edilen genler incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, toksik protein kodlayıcı *ygeG*, *ibsD*, *shoB*; stres kaynaklı protein kodlayıcı *spy*, *fadE*, *narV*, *yeaG*, *ycgB*; düzenleyici protein kodlayıcı *ebgC*, *ycgW*, *yaiV*; taşıyıcı protein kodlayıcı *glcA*, *mtlA* ve dışa atım sistemi kodlayıcı *cusC*, *cusF* ve *garP* dahil olmak üzere 16 genin sentezinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kültürlenebilir hücrelere kıyasla farklı şekilde eksprese edilen VBNC genlerinin FPKM (Fragments Per Kilobase Million) hiyerarşik küme analizi sonucunda, ABC taşıyıcılar, biyotin, curli, biyofilm, nitrat redüktaz ve diğerleri dahil olmak üzere altı fonksiyonel grup ile ilişkili genlerin yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur. Buna ek olarak, hidrojenaz I alt birimi *hyaABCDEF*, iç membran proteini *yjiG*, soğuk şok proteini *cspAB*, sitokrom bd-II ubikinol oksidazın alt birimi *appC* ve MgtC ailesinin ATP'ye bağımlı olduğu varsayılan taşıyıcısı *yhiD* ise 4 kat azalan genler arasında yer almaktadır (Ye vd., 2020). *V. cholerae* ile yapılan bir çalışmada Rodriguez vd. (2018), yapay deniz suyunda +4 °C'de 60 günde hücreleri VBNC duruma indüklemişlerdir. Daha sonra aynı çalışma ortamına c-di-GMP ilave edildiğinde hücrelerin VBNC ye giriş sürelerinin azaldığını saptamışlar. Her iki ortamdaki VBNC hücreler ile transkriptomik analiz gerçekleştirilmiştir. Yapay deniz suyunda lizin/kadaverin antiporter, 50S ribosomal protein L29, serin proteaz, aminoimidazol ribozid kinaz ve DNA primazında içinde olduğu 17 genin sentezinin arttığı tespit edilmiştir. c-di-GMP ilave edilmiş yapay deniz suyunda ise MinD- benzeri protein, ClpB proteini, Flagellar bazal protein FliL'nin de içerisinde bulunduğu 22 genin sentezinin arttığı tespit edilmiştir (Casasola-Rodríguez vd., 2018). Yine *V. cholerae* ile yapay deniz suyunda düşük sıcaklıklar da VBNC duruma indüklenen hücreler ile yapılan başka bir RNA sekans analizi neticesinde 985 genin sentezinin arttığı, 435 genin ise sentezinin azaldığı toplamda 1420 genin ekspresyon seviyesinin değiştiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu (*rbmA* ve *bapI*), kitin kullanımı (*vc0769*, *vca0027* ve *vc1073*) ve stres genlerinin (*groEL*, *groES*, *dnaK*) ekspresyon seviyesi artarken, hücre bölünmesi (*ftsZ*), morfoloji (*mreBCD*) ve ribizomal aktiviteden sorumlu genlerinin ekspresyon

seviyesi azalmıştır (Xu vd., 2018). Başka bir çalışmada ise VBNC duruma indüklenen *V. cholerae* hücreleri ile mikroarray analizi sonucunda taşıma ve bağlama proteinleri, DNA metabolizması, hücre zarf proteinleri, enerji metabolizması, amino asit biyosentezi, yağ asidi ve fosfolipid metabolizması, işlevi bilinmeyen ve korunmuş proteinler gibi hücresel süreçlerden sorumlu birçok genin ekspresyonunda artış ve azalış saptanmıştır. *vctC*, *mglA*, *mshM*, *flaC*, *fliG*, *polB*, *sbcB*, *pilQ*, *gltD-2* ve *thiF* gibi toplam da 100 gen, VBNC durumunda beş kattan fazla indüklenmişken *potC*, *flgD*, *relA*, *lpcA*, *atpB*, *rpmE* ve *gltB-2* gibi birçok gende baskılanmıştır (Asakura vd., 2007a). Görüldüğü üzere VBNC durumun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen net bir sonuç elde edilememiştir. Çalışmalarda farklı koşullarda VBNC duruma giren hücrelerde farklı genler ön plana çıkarılmış, bu nedenle ortak tespit edilen geçerli bir mekanizma belirlenememiştir. Ancak, genel olarak VBNC duruma indüklenmiş hücrelerde elektron transferi, hücre zarf proteinleri, hücre bölünme proteinleri, DNA replikasyonu, RNA degradasyonu ve stres cevabı gibi önemli hücresel süreçlerin rol oynayabileceği belirtilmiştir (Asakura vd., 2007a; Ye vd., 2020; Zhao vd., 2016; Zhong & Zhao, 2019). Bu sebeple, çalışmamızda özellikle zarf stresi, hücre bölünmesi ve stres cevabı ile ilişkili bazı genlere odaklanmayı tercih ettik. Ayrıca, literatürde gerçekleştirilen çalışmaların genellikle farklı stres koşullarında karşılaştırmalı olarak yapılmamış olması nedeniyle, moleküler mekanizmayı aydınlatacak ortak bir mekanizma ortaya konulamamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda üç farklı stres şartı kullanılarak, bu koşullarda VBNC durumda ortak bir yolak belirlenmesi hedeflenmiştir.



Şekil 2.1. *E. coli*'de VBNC Durum Oluşumunda Rol Oynayan Bazı Proteinler

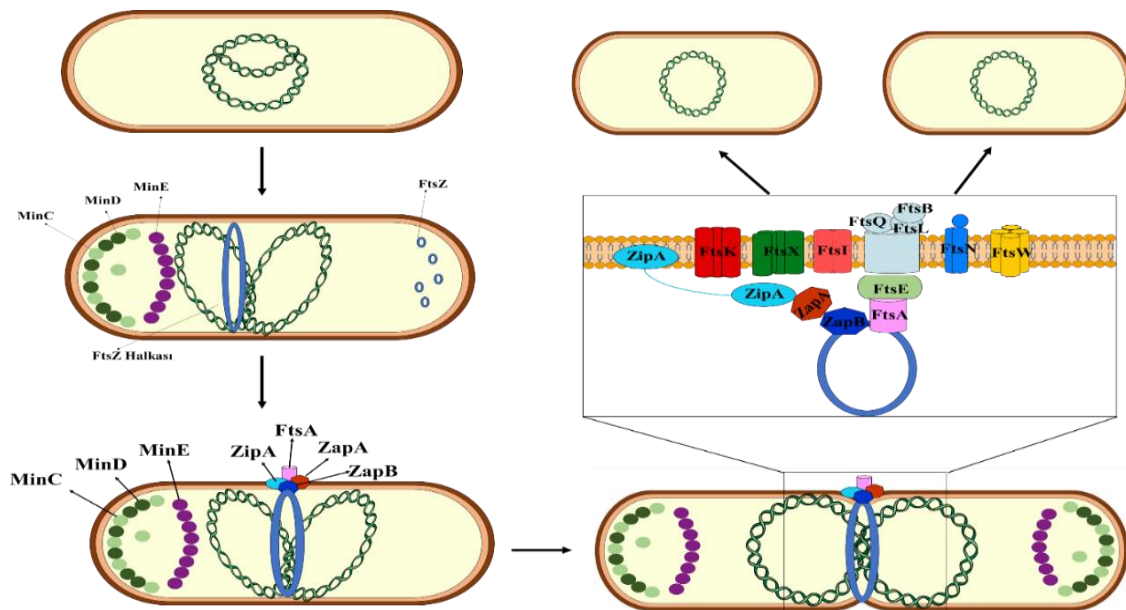
(Kaynak: İzgördü vd., 2022).

2.11. *E. coli*' de Hücre Bölünme Mekanizması

Büyüme ve bölünme yeteneği, tüm yaşam formlarının temel özelliklerindedir. Hücre bölünmesi, yeni hücrelerin oluşumunu ve genetik materyalin aktarılmasını sağlayarak organizmada neslin devamlılığını sağlamaktadır.

Bakteriyel sitokinez, yeni hücre zarf malzemesinin sentezi, membranın daralması ve bölünmesinin yanı sıra peptidoglikan katmanının yeniden şekillenmesini ve ayrılmasını içeren çok karmaşık ve birçok proteinin kontrolünde gerçekleşen bir süreçtir. Bu süreç hücrede genetik materyalinin iki katına çıkması yani replikasyon işlemi ile başlamaktadır. Replikasyonun ardından hücre bölünmesinin başlangıcı için sitoplazmik zardan oluşan ve sitoplazmik bölünme halkası adı verilen bir yapı oluşmaya başlamaktadır. Bu yapı hücrenin FtsZ halkasıdır ve bu halka küçük üst üste binen filamentlerden oluşmaktadır. Bu filamentlerin polimerize olması ile FtsZ halkası oluşmaya başlar. FtsZ çoğu bakteride hücre bölünmesi için gerekli ve merkezi bir proteindir. FtsZ halkasının oluşması ile hücre bölünmeye teşvik edilir ve bölünmeye birçok protein eşlik etmektedir. Öncelikli olarak Min sistemi devreye girmektedir. MinC, MinD ve MinE olmak üzere üç proteinden oluşan Min sistemi, FtsZ'nin hücrenin tam ortasına yerleşmesine yardımcı olmak için birbirleri ile etkileşime girmektedirler. ATP ile aktive olmuş MinD hücre kutuplarında sitoplazmik zara bağlanır MinD kümeleri oluşturur. Daha sonra bu kümeler MinC'yi de kendine bağlar ve sitoplazmik membranda MinCD kompleksi oluşturur. MinCD kompleksi hücre bölünmesini inhibe etme görevine sahiptir. Bu sebeple daha FtsZ halkası orta noktayı bulmadan hücre bölünme inhibisyonunun gerçekleşmemesi için MinE proteini devreye girmekte ve MinCD kümesini hücre kutuplarında sınırlı tutarak bloke etmektedir. Polimerleşen ve hücrenin orta noktasına yerleşen FtsZ halkası FtsA, ZipA ve Zap (ZapA, ZapB, ZapC, ZapD ve ZapE) proteinleri tarafından stabilize edilir ve membrana bağlanır (Galli & Gerdes, 2010; Hale & De Boer, 1997, 1999; Leger vd., 2015; Pichoff & Lutkenhaus, 2002; Schumacher vd., 2016; Wang vd., 1997). FtsZ halkasının olgunlaşmış tam bir septal halka olması ve membrana bağlanmasından sonra FtsA tarafından divisomun diğer bileşenleri olan FtsB, FtsE, FtsI/PBP3, FtsK, FtsL, FtsN, FtsQ, FtsW ve FtsX proteinleri devreye girer. ATP bağlayıcı bir kompleks olan FtsEX, FtsA ile etkileşime girer ve bölünmede görevli diğer proteinlerin toplanmasını sağlar. FtsA ile etkileşime giren bir diğer protein kompleksi ise FtsK tarafından toplanan FtsBLQ'dir. Bu protein kompleksi FtsW ve FtsI/PBP3'ün sisteme alınması sağlayarak septal peptidoglikan sentezinin katalize edilmesini ve düzenlenmesini sağlar. Daha sonra hücre içi FtsN miktarının artmaya başlaması ile bölünmeye izin verilir ve kromozomun iki kopyası birbirinden uzaklaşarak her bir kromozom

kendi kardeş hücrelerine doğru geçer. Daha sonra hücre daraldıkça FtsZ halkasının depolimerize olmasıyla ana hücre iki yavru hücreye bölünür ve burada FtsZ sitoplazmada monomer olarak kalmaktadır (Den Blaauwen & Luirink, 2019; Du vd., 2016; Kretschmer vd., 2019; Leger vd., 2015; Pichoff & Lutkenhaus, 2002; Wang vd., 2020). Ancak, karmaşık ve düzenli bir süreç olan hücre bölünmesi her zaman bu düzen içerisinde devam etmez. Stres koşulları altında bazı bakteriler hayatta kalmak için bölünme ve enerji gerektiren diğer süreçleri durdururlar. Bir bölünememe durumu olan VBNC durumdaki hücrelerde, hücre bölünmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunun azaldığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Örneğin, *E. coli* ile yapılan bir çalışmada, ferrat ve monokloramin dezenfeksiyonu altında hücre bölünmesi için gerekli olan *ftsQ* geninin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Daer vd., 2021). *E. coli* ile açlık ortamında yapılan bir başka çalışmada, hücre bölünmesi ve nükleotid biyosentezi ile ilişkili 320 genin ekspresyonunun baskılandığı tespit edilmiştir (Rozen vd., 2002). Bu durum yalnızca *E. coli* ile sınırlı değildir, başka mikroorganizmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. VBNC durumdaki *V. cholerae* ve *V. vulnificus* hücrelerinde *ftsZ*, *ftsA*, *ftsQ* ve *ftsH* genlerinin transkripsiyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (Xu vd., 2018; Rao vd., 2014). VBNC *Proteus mirabilis* ile yapılan Real-Time PCR analizlerinde, *ftsZ* geninin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır (Wasfi vd., 2020). Ayrıca bakır stresi ile VBNC duruma indüklenen *C. michiganensis* ile yapılan bir başka çalışmada da bölünme ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Bai vd., 2022). Bu bulgular, VBNC durumuna geçen hücrelerde hücre bölünmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunun azalma eğiliminde olduğunu ve bu durumun hücrel stres yanıtlarının bir parçası olabileceğini göstermektedir.



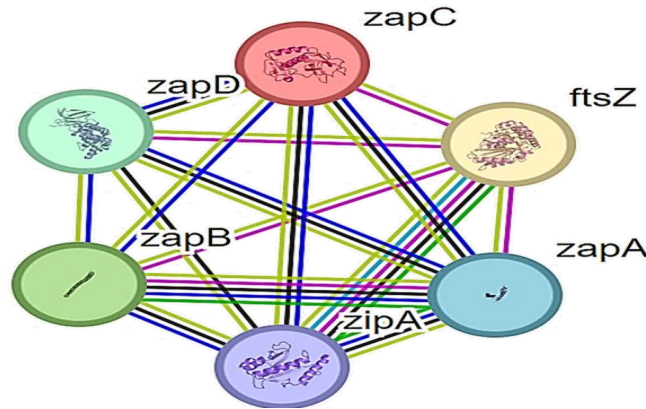
Şekil 2.2. *E. coli*'de Bölünme Mekanizmasının Şematik Genel Görünümü

2.12. Hücre Bölünme Protein Kompleksi ZapABCDE

Bakteriyal hücre bölünmesi sırasında birçok protein görev almaktadır. Bu proteinler hücre bölünmesinde görev alan Z halkasının düzenlenmesi ve stabilitesi ile ilişkili FtsA, ZipA ve Zap (ZapA, ZapB, ZapC, ZapD ve ZapE) proteinleridir. Zap proteinlerinin her biri her ne kadar bölünme için vazgeçilebilir olsa da ZapA, ZapB veya ZapC içermeyen hücreler de dağınık Z halkası oluşturur ve iki veya daha fazla Zap proteininden mahrum olan hücrelerde orta dereceli filamentasyon gözlenmektedir (Levin & Janakiraman, 2021). ZapA-D proteinleri sitokinezin erken döneminde devreye girer ve FtsZ protofilamentlerinin demetlenmesini artırarak Z halkasını doğrudan veya dolaylı olarak stabilize edilmesinde rol oynarlar (Durand-Heredia vd., 2012; Galli & Gerdes, 2010; Hale vd., 2011) . ZapA FtsZ ile doğrudan iletişim kuran ve divizoma ilk alınan proteindir ve FtsZ protofilamentlerini çapraz bağlayarak Z halkasının bağlanmasını ve stabilitesini sağlamaktadır. Ayrıca ZapA, MinCD kompleksin aşırı üretimini engelleyerek hücre bölünme yerinin doğru bir şekilde belirlenmesini sağlar. ZapB, ZapA ile etkileşime girerek FtsZ ile bağlantı sağlar ve FtsZ'nin demetlenmesinde rol alan ZapA'nın aktivitesini artırır (Galli & Gerdes, 2010, 2012). Bu etkileşim, hücre bölünmesinin düzenlenmesinde ve FtsZ halkasının stabilizasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Galli ve Gerdes'in çalışmaları, ZapB'nin, ZapA'nın fonksiyonel aktivitesini artırarak FtsZ filamentlerinin düzgün bir şekilde organize edilmesini sağladığını ortaya koymuştur. Ayrıca ZapB'nin MatP ile etkileşerek kromozom ayrılmasında da rol oynadığı bilinmektedir. ZapB, kromozomların Ter bölgesine bağlanan MatP proteinine doğrudan bağlanır. MatP, ZapB ve ZapA birbirleriyle sıralı bir şekilde etkileşime girer ve kromozomların Ter bölgesini Z halkasına sabitleyen bir MatP-ZapB-ZapA yapısı oluşturur (Espéli vd., 2012; Männik Jaana vd., 2016). ZapB, Z halkasını stabilize etmek ve bu yapı içindeki kromozom ile Z halkası arasındaki kromozom ayrımını koordine etmek için bir bağlayıcı görevi görür. ZapC küçük sitoplazmik monomerik bir proteindir ve kendisinin düzenlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Ancak, ZapC'nin hücre içi seviyelerinin düşük olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada ZapC'nin hücre de aşırı ekspresyonun kararlı FtsZ halkasına ve hücre filamentasyonuna yol açtığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu proteinin in vivo olarak hem ClpXP hem de ClpAP'nin bir substratı olduğu tespit edilmiştir (Buczek vd., 2016; Durand-Heredia vd., 2012; Hale vd., 2011). ZapC ve ZapD FtsZ ile doğrudan etkileşime girmekte ve FtsZ protofilamentlerinin demetlenmesini desteklemektedir (Durand-Heredia vd., 2012; Hale vd., 2011). ZapE ise bir Walker ATPazdır ve bilinmeyen bir mekanizma ile ATP varlığında FtsZ polimerlerinin stabilitesini azaltır. ZapE'nin hücre bölünmesi sürecinin son aşamalarında Z halkasına

alındığını ve Z halkasının daralmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. ZapE'nin aşırı ekspresyonu veya baskılanmasının bakteriyal filamentasyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Marteyn vd., 2014) .

Hücre bölünmesinin düzenlenmesinde görevli bu proteinlerin ekspresyonundaki değişiklikler, bakterilerin stres koşullarına nasıl adapte oldukları konusunda önemli ipuçları sunmaktadır. Özellikle, çevresel stres faktörlerinin etkisiyle meydana gelen VBNC durumdaki bakterilerde bu proteinlerin ve ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişikliklerin anlaşılması VBNC durumun moleküler mekanizmasına önemli katkılar sağlayacaktır. *E. coli* ile gerçekleştirilen bir çalışmada monokloramin dezenfektanına maruz bırakılarak VBNC duruma indüklenen hücrelerde *zapA* geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Daer vd., 2021). Ayrıca, açlık ortamında farklı stres şartlarına maruz bırakılarak VBNC duruma indüklenen hastane izolatu *P. mirabilis* suşları ile yapılan bir başka çalışmada ise *zapA* genin ekspresyon seviyesinin suşlar ve uygulanan stres faktörlerine bağlı olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışılan tüm stres şartlarında *zapA* geninin ekspresyonu 3 numaralı izolatta azalırken, 6 numaralı izolatta ise artmıştır. 7 numaralı izolatta ise stres şartlarına göre *zapA* geninin ekspresyonunda artış, azalış veya değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Wasfi vd., 2020). Bu sonuçlar, bakterilerde çevresel stres faktörlerine yanıtta *zapA* geninin önemli bir role sahip olduğunu ve *zap* genlerinin daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir.



Şekil 2.3. Zap Proteininin FtsZ Proteini ile Etkileşimi

(Kaynak: Szklarczyk vd., 2023)

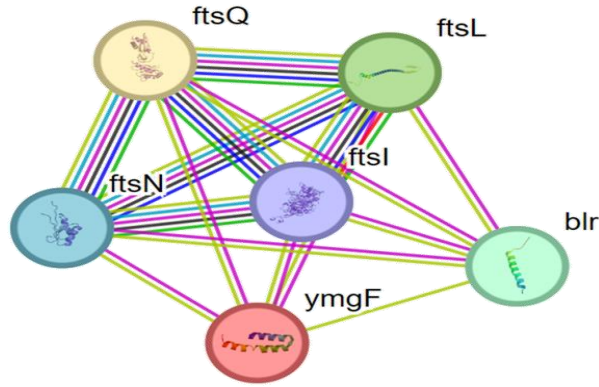
2.13. Hücre Bölünme Proteini YmgF

YmgF, *E. coli*'de hücre bölünmesiyle ilişkili C ve N terminal olmak üzere iki transmembran alanına sahip, 72 aminoasitten oluşan bir iç membran proteindir. Proteinin N-terminal kısmının dimerizasyon ve hücre bölünmesi proteinleriyle etkileşimi için gerekli

olabileceği öne sürülmüştür. YmgF'nin, hücre bölünme proteinleri FtsI, FtsN, FtsQ, FtsZ ve FtsA ile etkileşime girerek hücre bölünmesi sırasında septuma lokalize olduğu tespit edilmiştir. DNA replikasyonunun yaklaşık ortasında veya hemen sonrasında, FtsZ polimerizasyonunun normal olarak başladığı noktaya çok yakın bir yerde YmgF ekspresyonunun maksimum seviyeye ulaştığı tahmin edilmektedir. Ancak düşük ozmolariteli ortamda aşırı eksprese olarak *ftsQ* mutantının kısmen de olsa büyüme kusurlarını giderebildiği tespit edilmiştir (Karimova vd., 2005, 2009).

Dahası YmgF'nin DNA replikasyonunda görev alan ve OriC nin sağında ve solunda yer alan *mioC* ve *gdiA* genlerinin düzenlenmesinden de sorumlu olduğu tespit edilmiştir. YmgF t-RNA modifikasyonundan sorumlu *gdiA*'nın ekspresyonunu baskımlarken replikasyon sırasında hataların düzeltilmesi ve modifikasyonlardan sorumlu *mioC* nin ekspresyonunu arttırmaktadır. Yapılan bir çalışma da *gdiA* ve *mioC* genlerinin promotör bölgelerinde yapılan bir mutasyonla genlerin ekspresyonu baskılanmış ve mutant hücrelerde hücre bölünmesinin engellendiği tespit edilmiştir (Bates vd., 1997; Lies vd., 2015).

YmgF proteini, *E. coli*'de hem hücre bölünmesi hem de DNA replikasyonunun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu sebeple bir bölünememe durumu olan VBNC duruma geçişte de bu proteinin bir rolü olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.4. YmgF Proteininin Fts Proteinleri ile Etkileşimi

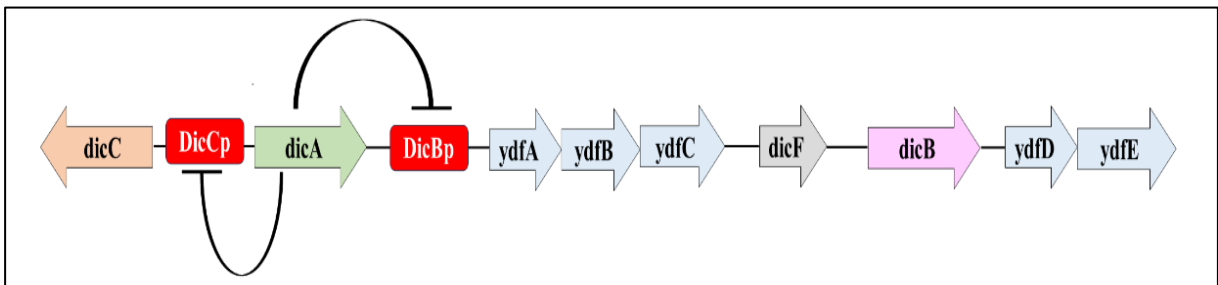
Kaynak: (Szklarczyk vd., 2023)

2.14. Bölünme ile İlişkili Qin Profajı DicAC ve DicBF lokusları

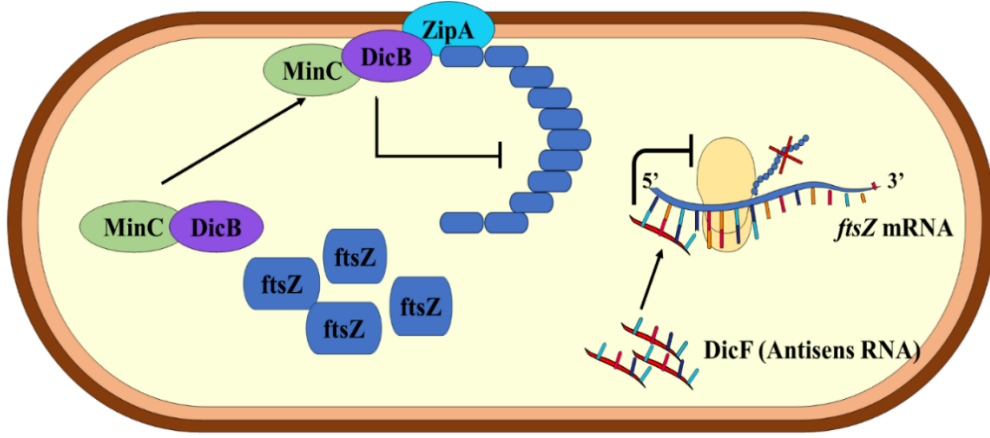
Mikroorganizmalar zorlu şartları atlatabilmek ve hayatta kalabilmek üzere çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. *E. coli*'nin olumsuz koşullar altında hayatta kalmasına önemli katkılar sağlayan bir başka mekanizma da profajlar tarafından kodlanan genlerdir (Brüssow vd., 2004; Wang vd., 2010). *E. coli* de 9 adet kriptik profaj bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi

olan Kim (Qin) fajı, DicAC ve DicBF lokuslarından oluşmaktadır. DicA, DicB ve DicC bölünme ile ilişkili olan proteinleri kodlarken, DicF antisens bir sRNA kodlamaktadır (Bouché & Bouché, 1989; Cam vd., 1988; Faubladiert & Bouche, 1994; Yang vd., 2016). DicAC lokusu, DicBF operonunun hemen yukarısında bulunmaktadır ve DicBF operonunun promotörü DicA tarafından baskılanmaktadır. Ayrıca DicA DicC yi de baskılamaktadır. *dicC* geninin fonksiyonu ile ilgili çalışmalar nispeten daha nadirdir. Yapılan çalışmalarda DicC proteininin, DicA proteininin fonksiyonunu tamamlayabildiği dolayısıyla *dicB* geninin ekspresyonunu inhibe edebildiği tespit edilmiştir (Béjar vd., 1986).

DicB, FtsZ polimerizasyonunun negatif düzenleyicisi olan MinC ile etkileşime girer. DicB-MinC kompleksi, septal halka bileşeni ZipA ile etkileşime girerek septumda FtsZ'nin depolimerizasyonuna yani inhibisyonuna neden olur, bu da hücrelerin filamentasyonuna yol açar. DicF ise 53-nükleotidlik küçük bir RNAdır ve *ftsZ* mRNA'sının translasyonunu bir antisens mekanizmasıyla engellemektedir (Altuvia vd., 2018; Ragunathan vd., 2023; Yang vd., 2016). Dahası DicF'nin piruvat kinaz, ksiloz düzenleyici ve mannoz taşıyıcı mRNA'ların translasyonunu inhibe ederek konakçı hücre metabolizmasını da doğrudan etkilediği bilinmektedir (Azam & Vanderpool, 2018; Balasubramanian vd., 2016). Ayrıca yapılan çalışmalarda *E. coli*'de bulunan Kim profajının VBNC durumuyla ilişkili olabileceği de tespit edilmiştir. Yüksek karbondioksit basıncı ile VBNC duruma indüklenen *E. coli* ile yapılan çalışmalarda DicC proteinini kodlayan *z2046* geninin ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmanın devamında *dicC* mutanı, DicA aşırı ekspresyon suşu ve DicC aşırı ekspresyon suşlarıyla deneylere devam edilmiş ve yapılan analizler sonucunda VBNC hücre sayısının *dicC* mutanı ve DicA aşırı ekspresyon suşunda arttığı, DicC aşırı ekspresyon suşunda ise azaldığı gözlenmiştir. Benzer sonuçlar asit ve H₂O₂ stresleri altında da elde edilmiştir. Bu sonuçlar DicC'nin VBNC hücre oluşumunda negatif bir düzenleyici olabileceğini göstermektedir (Pan vd., 2019; Zhao vd., 2016).



Şekil 2.5. DicBF Operonunun DicA Tarafından Düzenlenmesi. *dicAC* lokusu, *dicBF* Operonunun Yukarısında Bulunur ve DicBF Operonunun Promotörü DicBp, DicA Tarafından Baskılanmaktadır.



Şekil 2.6. Bölünme ile İlişkili Qin Profajı dicBF Lokusu Çalışma Modeli

2.15. Çalışmanın Amacı

Literatürde belirtilen bulgular ışığında, farklı çevresel stres faktörlerinin VBNC durumun oluşum mekanizmasında önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda birçok genin ekspresyon seviyesinde artış veya azalış gözlenmesine rağmen, VBNC' nin moleküler mekanizmasında spesifik bir yolak ortaya konulamamıştır. Farklı stres koşullarında aynı anda karşılaştırmalı çalışmalar yapılmadığından dolayı, VBNC duruma giren hücrelerde farklı genler ön plana çıkarılmış ve dolayısıyla ortak bir mekanizma belirlenememiştir. Ayrıca, literatürde VBNC hücrelerle yapılan çalışmaların çoğunda kontrol olarak strese uğratılmamış logaritmik faz hücreleri kullanıldığı için, sonuçların kontrol grubu hücrelerine kıyasla VBNC hücrelerde büyük farklılıklar göstermesi muhtemeldir. Bu bağlamda çalışmamızın amacı, sıcaklık, metal ve antibiyotik stres koşulları altında hücrelerin VBNC duruma indüklenmesi ve bu durumdaki hücrelerde üç stres şartında ortaya çıkabilecek ortak fiziksel veya moleküler değişikliklerin belirlenmesidir. Aynı zamanda bu çalışma, ATR-FTIR spektroskopisini kemometrik yaklaşımlar ve temel bileşen analizi (PCA) ile birleştirerek, sıcaklık, metal ve antibiyotik gibi farklı stres koşulları altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde meydana gelen biyomoleküler değişiklikleri belirlemeyi amaçlamaktadır. Çalışmada spesifik olarak bakterilerdeki VBNC duruma geçişle ilişkili spektrokimyasal biyobelirteçlerin incelenmesine odaklanılmıştır.

Ayrıca, VBNC duruma indüklenen hücrelerle yapılan tüm analizlerde sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla hem logaritmik faz hücreleri hem de stres koşulları ile aynı süre boyunca açlık ortamında inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu yaklaşımla, üç farklı stres şartı altında VBNC duruma geçen hücrelerde meydana gelen biyomoleküler değişikliklerin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi ve bu değişikliklerin belirlenmesi hedeflenmektedir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.2. Kullanılan *E. coli* Suşları

Bu çalışmada, *E. coli* W3110 suşu kullanıldı. Bu suş, -80 °C'de (Thermo Scientific) %40 gliserol (Merck) içeren LB broth besiyerinde saklandı. Çalışma devamında yapılan rekombinant suşlarda aynı şekilde %40 gliserol (Merck) içeren LB broth besiyerinde -80°C'de saklandı.

3.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

3.3.1. LB Agar Besiyeri

Bu besiyeri çalışmada kullanılan *E. coli* W3110 suşunun stok olarak buzdolabında saklanması için kullanıldı. Besiyeri hazırlanırken 10 g pepton from casein (Merck), 5 g yeast extract (Merck), 10 g NaCl (Merck) ve 15 g agar agar (Merck) 1 litre distile suda eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak (Hirayama) steril edildi. Daha sonra besiyeri steril kabin içerisinde petrilere döküldü ve agar katılaşana kadar ağzı açık bir şekilde steril kabin içerisinde bekletildi.

3.3.2. LB Broth Besiyeri

LB broth besiyeri yaşam deneyleri ve MİK deneyleri öncesinde bakterilerin üretilmesinde kullanıldı. 10 g pepton from casein (Merck), 5 g yeast extract (Merck) ve 10 g NaCl (Merck) tartılarak 1 litre distile suda eritildi. Daha sonra erlen ve tüplere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak (Hirayama) steril edildi.

3.3.3. Nutrient Agar besiyeri

Besiyeri yaşam deneylerinde koloni sayımı için kullanıldı. 20 g Nutrient agar (Merck) 1 L distile suda eritilerek 121 °C'de 15 dakika otoklavda (Hirayama) steril edildi.

3.3.4. SOB Medium

Transformasyon deneyinde kullanıldı. 4 g bacto tryptone (BD), 1 g yeast extract (Merck), 0,4 ml 5M NaCl (Merck), 0,25 ml 2M KCl (Merck) 200 ml distile suda eritildi ve pH metre ile (Metler toledo) pH 7'ye ayarlandı. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika otoklav ile steril edildi.

3.3.5. SOC Medium

Transformasyon sırasında hücrelerin büyütülmesi için kullanıldı. Bir örnek için 1,96 ml steril SOB medium içerisine daha önceden hazırlanmış ve steril edilmiş 20 µl 2M Mg⁺² (Merck) ve 14,4 µl %50'lik glukoz (Merck) çözeltisi eklenerek hazırlandı.

3.3.6. 1X PBS

Yaşam deneyleri sırasında örneklerin yıkanması ve ½ seri dilüsyonların yapılmasında kullanıldı. Bunun için 1 adet PBS tableti (Sigma) 200 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve 121 °C' de 15 dakika otoklav ile steril edildi.

3.3.7. Yapay Deniz Suyu

Yaşam deneylerinin gerçekleştirilmesi için yapay deniz suyu hazırlandı. Çalışmada kullanılacak yapay deniz suyu Rigsbee vd. (1996) göre litre başına 24,723 g NaCl (Merck), 4,668 g MgCl₂ (Merck), 6,298 g MgSO₄ (Merck), 1,36 g CaCl₂ (Merck), 0,67 g KCl (Merck) ve 0.18 g NaHCO₃ (Merck) içerecek şekilde hazırlandı. Daha sonra 100 ml lik erlenlerde 50 ml olacak şekilde dağıtıldı ve otoklav (15 dakika, 121 °C) ile steril edildi (Rigsbee vd., 1997).

3.3.8. IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranosid)

Aşırı eksprese edilmesi gereken rekombinant suşların indüklenmesi için 0,1 M IPTG (Sigma) stok solüsyonu hazırlandı. 0,238 g IPTG ile 9,9 ml saf su çözdürüldü ve 0,22 µM şırınga filtre yardımı ile steril edildi. Ependorflara 1'er ml olacak şekilde aktarıldı ve alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C' de saklandı.

3.3.9. 2M Mg⁺²

Transformasyon deneylerinde kullanılmak üzere 2 M Mg⁺² hazırlandı. Bunun için 6,16 g MgSO₄ (Merck) ve 5,08 g MgCl₂ (Merck) dan tartılarak ayrı ayrı 25 ml saf suda çözdürüldü ve daha sonra her iki solüsyondan eşit hacimde karıştırılarak 2 M Mg⁺² hazırlandı. Hazırlanan solüsyon 121 °C' de 15 dakika otoklav ile steril edilerek kullanıldı.

3.4. Eritromisin Antibiyotiği MİK Değerinin Belirlenmesi

Eritromisin, bakterilerde ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak etki eden bakteriyostatik bir antibiyotiktir (Usary & Champney, 2001). Çalışmada kullanılacak eritromisin antibiyotiğinin MİK değerinin belirlenmesi için iki farklı yol izlenmiştir. İlk yolda besi ortamında antibiyotiğin MİK değeri belirlendi. Bunun için 5 ml LB broth (Merck) besiyerine *E. coli* ekilerek 37 °C'de 1 gece 160 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edildi ve ön

kültür hazırlandı. İnkübasyon sonrasında bakteri yoğunluğu OD₆₀₀'de 0,1 absorbans olacak şekilde ayarlandı ve daha sonra 60 ml steril LB broth (Merck) içerisinde 400 µl bakteri olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Buradan 96 kuyucuklu mikropalkanın ilk kuyucuklarına 170 veya 180 µl, diğer kuyucuklara 100 µl olacak şekilde kültürler eklendi ve daha sonra 170 ve 180 µl bakteri kültürü içeren ilk kuyucuklara 5 mg/ml eritromisin (fisher) antibiyotiğinden 30 ve 20 µl eklenerek total hacim 200 µl ye tamamlandı. Daha sonra 1. kuyucuktan 12. kuyucuğa kadar ½ seri sulandırma yapıldı ve mikro plakalar, 37 °C' de 1 gece inkübe edilerek ertesi gün MİK değerleri belirlendi (CLSI, 2018). İkinci yöntemde ise logaritmik faza kadar büyüyen hücrelerden 1 ml alınarak iki kez 1X PBS ile yıkandı ve 50 ml yapay deniz suyunda çözdürüldü. Elde edilen bu hücre süspansiyonundan, 96 kuyucuklu mikropalkanın ilk kuyucuklarına 170 veya 180 µl, diğer kuyucuklara 100 µl olacak şekilde kültürler dağıtıldı. Daha sonra 170 ve 180 µl bakteri kültürü içeren ilk kuyucuklara 30 ve 20 µl ayrı ayrı antibiyotikten eklenerek total hacim 200 µl ye tamamlandı ve 1. kuyucuktan 12. kuyucuğa kadar ½ seri sulandırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından mikropalakalar, 37 °C' de 1 gece inkübe edildi ve inkübasyonun ardından 1. kuyucuktan başlayarak 12. kuyucuğa kadar LB agar bulunan ortama 5 µl ekim yapıldı. Daha sonra petriyerler 37 °C' de 1 gece inkübe edildi ve inkübasyon sonrasında üremenin olduğu kuyucuktan bir önceki kuyu (üremenin olmadığı) çalışmada kullanılacak antibiyotik dozu olarak belirlendi. Deneyler en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Yapılan iki deney sonucunda da antibiyotiğin MİK değeri benzer çıkmıştır.

LB besiyerinde Eritromisin antibiyotiğinin MSK değeri; 195,31ug/ml

Yapay deniz suyunda Eritromisin antibiyotiğinin MSK değeri; 1875 ug/ml

$$\left. \begin{array}{l} \text{LB agarda } 10^4 \text{ plak sayımı}=24 \\ \text{Yapay deniz suyunda } 10^4 \text{ plak sayımı}=224 \end{array} \right\} \text{ Kat farkı}=9,33$$

Kat farkına göre MİK değeri= 195,31*9,33=1822,89

3.5. Yaşam Deneyleri

3.5.1. Farklı Stres Şartlarında Hücrelerin VBNC Duruma İndüklenmesi

Çalışmanın başlangıcında, hücreler -80 °C'den çıkarılarak tek koloni oluşturacak şekilde LB agar plakalara ekim yapıldı ve bu plakalar 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Petri plakalarında büyüyen hücrelerden seçilen tek bir koloni, LB broth sıvı besiyerine transfer edildi

ve aynı koşullar altında 160 rpm çalkalama hızında logaritmik faza ($OD_{600} = 1$) ulaşana kadar inkübe edildi. Bu aşamada elde edilen hücreler, yapay deniz suyunda yapılan yaşam deneylerinde kullanıldı (Darcan vd., 2009; Jia vd., 2020; Na vd., 2006; Riggsbee vd., 1997; Xia vd., 2017).

Sıcaklık stresi varlığında yaşam deneylerini gerçekleştirmek için logaritmik faza kadar büyütülen hücreler 2 kez 1X PBS ile yıkandıktan sonra final konsantrasyonu 10^7 olacak şekilde 50 ml yapay deniz suyuna ilave edildi ve erlenler $42^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı.

Antibiyotik stresi varlığında yaşam deneyleri gerçekleştirmek için eritromisin antibiyotiklerinden 50 ml yapay deniz suyu içerisine $937,5 \mu g/ml$ MİK değerinin yarısı olacak şekilde ilave edildi. Antibiyotik ilavesinin ardından sıcaklık stresinde de olduğu gibi 1X PBS ile yıkayıp besiyerinden uzaklaştırılan hücreler final konsantrasyonu 10^7 olacak şekilde 50 ml yapay deniz suyuna ilave edildi ve erlenler $25^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı.

Çalışmada metal stresi olarak bakır sülfat ($CuSO_4$) kullanıldı. Bunun için 50 ml yapay deniz suyu içerisine final konsantrasyonu $20 \mu M$ olacak şekilde $CuSO_4$ ilave edildi ve sıcaklık stresinde de olduğu gibi 1X PBS ile yıkayıp besiyerinden uzaklaştırılan hücrelerden final konsantrasyonu 10^7 olacak şekilde 50 ml yapay deniz suyuna ilave edildi ve erlenler $25^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra her üç stres şartı altındaki bu erlenlerden örnekler alınarak hücrelerin VBNC duruma geçişleri gözlemlendi. Alınan örnekler ile koloni oluşturabilen bakterilerin sayımı (plak sayımı ile) ve membran bütünlüğüne sahip bakterilerin sayımı (Live/Dead BacLight kiti) gerçekleştirildi.

3.5.2. VBNC hücrelerde Plak Sayım ve Floresan Mikroskop Deneyleri

Farklı stres şartları altında gerçekleştirilen yaşam deneylerinden belirli zaman aralıklarında $100 \mu l$ örnek alınarak 1X PBS'de 1:10 seri dilüsyon gerçekleştirilmiş ve nutrient agar içeren petrilere drigalski spatülü ile ekim yapıldı. Daha sonra petriler $37^{\circ}C$ 'de inkübasyona bırakıldı ve 24 saat sonunda hücre sayıları mililitre başına sayı (CFU/mL) olarak hesaplandı. Ayrıca petriler 48 saat daha oda sıcaklığında bekletilerek tekrar sayımları yapıldı ve daha önce yapılan sayımlarda bir değişiklik olup olmadığı kontrol edildi (Guo vd., 2019; Jia vd., 2020; Masmoudi vd., 2010; Xie vd., 2021).

Plak sayımı için örnek alınırken aynı zamanda Live/Dead BacLight (Invitrogen) kiti ile ölü canlı hücre sayımı gerçekleştirildi (Park & Kim, 2018; Song & Lee, 2021; Zhang vd., 2023; Zhao vd., 2013; Zhou vd., 2022). Numunelerdeki toplam hücre sayıları ve canlı hücre sayıları

Live/Dead BacLight bakteriyel canlılık kiti ile boyanarak belirlendi. Bu kit, hücre zarı bütünlüğünü değerlendirmek için SYTO 9 ve propodyum iyodür (PI) olmak üzere iki nükleik asit boyasının bir karışımını içermektedir. SYTO 9 (yeşil floresan verir) bakteri hücrelerinin hem sağlam hem de hasarlı olan plazma zarından geçebilirken, PI (kırmızı floresan verir) yalnızca hasarlı plazma zarına sahip hücrelere nüfuz edebilir ve nükleik asit bağlanma bölgeleri için SYTO 9 ile rekabet edebilir. Bu nedenle, hücre zarları sağlam olan (canlı olduğu düşünülen) hücreler yeşil floresan gösterirken, zarları hasarlı olan (ölü olduğu düşünülen) hücreler kırmızı floresan göstermektedir. Deney öncesinde kitin protokolüne göre boyalar hazırlandı ve daha sonra iki boya 1:1 oranında karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi. Sayımı yapılacak olan yapay deniz suyu örneklerinden tüplere 1'er ml alınarak üzerine 3 µl Live-Dead karışımından ilave edildi. Karışım 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücreler floresans mikroskopta (Olympus-BX53) görüntülendi. En az 20 farklı alanın sayımı yapıldı ve bu alanların ortalaması alınarak mikroskop alanından ml'deki bakteri sayısına ulaşıldı.

3.6. Elektron Mikroskopisi

3.6.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

VBNC duruma geçtiği plak sayım sonuçları ve Live Dead kiti ile doğrulanan hücreler 0.2 µm por çaplı 47 mm genişliğindeki polikarbonat filtre ile vakum filtrasyon sistemi kullanılarak toplandı. Filtreler yardımı ile toplanan kontrol ve VBNC hücreler 1 X PBS ile yıkandıktan sonra 18 saat boyunca +4 °C'de %3 glutaraldehit içinde fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra örnekler 8000 g de 10 dakika +4°C santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücreler %10, %30, %50, %70, %90 ve %100 olmak üzere bir dizi etil alkol serisinden geçirilerek dehidre edildi. Hücreler alkol serileri arasında 10' ar dakika inkübasyona tabi tutuldu. Dehidrasyon işlemi sonrasında hücreler iletken karbon bantlar üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve kuruyan örnekler Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesinde 40 mA de 50 saniye altın-paladyum kaplama yapılarak taramalı elektron mikroskopunda incelendi (Coutard vd., 2007b; Wei & Zhao, 2018; Zhao vd., 2013).

3.6.2. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

VBNC duruma geçtiği plak sayım sonuçları ve Live Dead kiti ile doğrulanan hücreler 0.2 µm por çaplı 47 mm genişliğindeki polikarbonat filtre ile vakum filtrasyon sistemi kullanılarak toplandı. Filtreler yardımı ile toplanan kontrol ve VBNC hücreler 1 X PBS ile yıkandıktan sonra 18 saat boyunca +4 °C'de glutaraldehit içinde fiksasyon işlemine tabi tutuldu.

Daha sonra hücreler %50, %70, %90, %96 ve %100 etil alkol ile alkol serisinde dehidrasyon işlemi uygulandı. Dehidrasyonu yapılan hücreler propilen oksit ile şeffaflaştırılıp resine alıştırıldı. Daha sonra resin ile bloklandı, 60°C'de etüvde 48 saat süresince polimerizasyonu yapıldı. Traşlanmaya hazır hale gelen bloklardan 80-100 nm'lik ince kesitler halinde örnekler elde edildi. Daha sonra bu örnekler geçirimsiz elektron mikroskopunda incelendi (Coutard vd., 2007b; Zhao vd., 2013)

3.7. RNA İzolasyonu

VBNC duruma geçtiği plak sayım sonuçları ve Live Dead kiti ile doğrulanan hücreler 0.2 µm por çaplı 47 mm genişliğindeki polikarbonat filtre ile vakum filtrasyon sistemi kullanılarak toplandı. Toplanan VBNC hücreler 1X PBS ile bir kez yıkandıktan sonra pelet üzerine 1000 µl Trizol (Riboex) ve 200 µl kloroform (Merck) eklenerek örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 12000 g'de 15 dakika +4 °C santrifüj (Beckman Coulter) yapıldı. Santrifüj sonrasında üstte kalan ve RNA'ları içeren kısım pipet ile temiz bir ependorfa aktarıldı. Üst faz üzerine 500 µl izopropanol eklenerek, 1 dakika alt üst edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 12000 g'de 10 dakika +4 °C santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından üst sıvı atılarak RNA peleti %75 lik EtOH (Merck) ile 2 kez yıkandı ve 12000 g'de 5 dakika +4 °C santrifüj edildi. Daha sonra alkol kokusu uçana kadar tüpler kurumaya bırakıldı ve son olarak RNA'lar 50 µl RNase free suda çözündürüldü. Elde edilen RNA'ların Nanodrop (BioSpec-nano- Shimadzu) ile miktar tayini yapıldı ve RNA varlığı tespit edildi.

3.8. RNA Saflaştırma

RNA örneklerinde potansiyel DNA kalıntılarını temizlemek ve kaliteyi artırmak amacıyla DNase I (Thermo Scientific) enzimi kullanılarak işlem uygulandı. DNase işlemi için 1 µg RNA üzerine 10X reaksiyon tamponundan (MgCl₂ içeren) 1 µL, RNase-free DNase I den 1 µL (1 U) eklendi ve son hacim 10 µL ye nükleaz free dH₂O ile tamamlandı. Ardından 37 °C 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 50 mM EDTA dan 1 µL ilave edilip 65 °C 30 dakika inkübasyona bırakıldı. DNaseI işlemi sonrasında RNA örneklerinin tekrar Nanodrop (BioSpec-nano- Shimadzu) ile miktarı belirlendi.

3.9. Primer Tasarımı

Çalışmada kullanılacak olan bölünme ve hücre zarfı stresinden sorumlu genlere ait dizi bilgileri, *E. coli* genom veritabanı olan PEC'den elde edildi (Yamazaki vd., 2008). Bu bilgilere dayanarak, %45-50 GC oranına ve 18-20 nükleotit uzunluğuna sahip primerler tasarlandı.

Tasarlanan primerler dimerizasyon, heterodimerizasyon ve hairpin oluşumu gibi faktörler açısından değerlendirilmesi için bir oligo analiz aracı kullanılarak kontrol edildi (Owczarzy vd., 2008). Primer tasarımı sonrasında, tasarlanan primer çiftlerinin etkinliği ve spesifikliği insiliko PCR simülasyon yazılımıyla kontrol edildi (Bikandi vd., 2004). Tasarlanan primerler Tablo 3.1’de verildi.

Rekombinant hücrelerin elde edilmesi amacıyla, pLATE51 vektörüne özgü primerler de tasarlandı. Rekombinant hale getirilecek genin başlangıç ve bitiş kısmından 22 şer nükleotit olacak şekilde forward ve reverse primeri belirlendi. Daha sonra belirlenen bu dizilere aLICator LIC Cloning and Expression Kit 2 (Thermo Scientific) içinde bulunan pLATE51 vektörüne uyumlu bir şekilde ligasyon yapabilmek için 18 nükleotit uzunluğunda standart nükleotit dizileri eklendi. Böylelikle vektöre spesifik yapışkan uç oluşturabilmesi sağlandı. Tasarlanan tüm primerler Tablo 3.1’de sunuldu.

3.10. Primerlerin Sulandırılması

Primerlerin sulandırılması için 1X TE (Tris-EDTA) tamponu kullanıldı. Öncelikli olarak ana stok hazırlamak için üreticinin talimatlarına göre sentezlenen primerlerin final konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde TE tamponu ile sulandırıldı. Daha sonra, final konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde alikotlar hazırlandı. Bunun için ana stoklardan 10 µl primer alınıp üzerine 90 µl TE (Multicell) ilave edildi. Hazırlanan primer ana stokları ve alikotlar, -20 °C dondurucuda saklandı.

Tablo 3.1. Real Time PCR da Kullanılan Primer Dizileri

| Gen Adı | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | Bant Büyüklüğü |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| <i>cedA</i> | CGTTTCGTGATGTCTGGATG | GGCAGATTCAGGCACAGTAA | 101 |
| <i>cpxA</i> | AAACCATCAAAGCCAACCAG | CTGGTTGGCTTTGATGGTTT | 164 |
| <i>cpxP</i> | GCCTCCTGTTAATGTTAGCG | GGACTTTTGCCATCTCAACC | 140 |
| <i>cpxR</i> | ATGATGCCGAAGAAAAATGG | CATTAACGGTTTCGGGAGA | 154 |
| <i>dam</i> | ACGGCGTATCACACAAACA | GGAGATCAGCACTGGAATAT | 99 |
| <i>damX</i> | TTCTCTGCCACCGATCTCTT | TTGACCGCCACATTGTTTCAG | 147 |
| <i>dedD</i> | GTGATTGTACTTCCAGGGCT | GTGGTGCTTCAACCTTTGGT | 310 |
| <i>dicB</i> | TGTCATATCAGTAACCCAGT | GTAACGAGCCAGCATTGA | 107 |
| <i>dicC</i> | CAAGCAGCAGGTATTCGTTTG | TTGGGATCATACTGAAGCTC | 116 |

Tablo 3.1. Tablonun Devamı

| | | | |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----|
| <i>dnaA</i> | TACTACCGTTCCGTAGATGC | TTTCATCAGGATCGCCACAC | 252 |
| <i>envC</i> | ACCTACAAACCGACCGAAAG | AGCGTAATTCACCCTGTAGC | 139 |
| <i>envZ</i> | GGTAAAGGGATTATTCCGCC | CTCATCATCTCAGTCGCCAG | 191 |
| <i>ftsA</i> | TGTGATCCC GCAAGAGTATG | GTCAACTTTCAGCCCACAAC | 163 |
| <i>ftsB</i> | ATTCGCTGTGGTTCGGTAAAG | CCTGGTCATGCTGAGTTCAT | 188 |
| <i>ftsE</i> | TGTCAGCAAGGCTTATCTCG | TCAGCTTCAGGAGGGTACTT | 125 |
| <i>ftsL</i> | ATTGCCTGGTGTTATCGGTG | AGCGGTCAGTAAACGGGTAT | 127 |
| <i>ftsN</i> | AAATCTGCCTGCGGTTTCTC | AGCGTCTCGGACTCTTCTTT | 114 |
| <i>ftsP</i> | GCTTGCTGCCAACTGAAATC | CGTCAACCCAAACGGTATCT | 267 |
| <i>ftsQ</i> | GGTTTCTTCTCGCCGCAATA | CTGACGCTCACCTGCTTAAT | 294 |
| <i>ftsX</i> | CACGCAGATTAACGGCATTG | ACTCAGACGCACACTGTTAC | 157 |
| <i>ftsZ</i> | AAAACAGCGGTTGGACAGAC | AGGCTTAGTGACGACAGCAA | 252 |
| <i>mreB</i> | GATTGAAGAACCGATGGCTG | CGCACAGAAGAGGAGTAAAC | 144 |
| <i>mukB</i> | CTGATTACCACTCGCTGATG | GTCATACGGTTTTTCACGCAG | 220 |
| <i>ompC</i> | CTACATGCGTCTTGGCTTCA | AATTTACAGACCTGCGAATGC | 144 |
| <i>ompF</i> | GACATGACCTATGCCCGTCT | TATTTAAGACCCGCGAATGC | 161 |
| <i>ompR</i> | CATCGGGTTGCTCTGACTAC | CCTGCTGACTCGTGAATCTT | 106 |
| <i>pal</i> | ACGCCGTTAAGATGTACCTG | TTTGGAGTATGCCGCTTCGT | 116 |
| <i>recA</i> | ACGTTATCGTCGTTGACTCC | TTACCACCGGTAGTGGTTTC | 223 |
| <i>rpoE</i> | CAGAAGGGAGATCAGAAAGC | TACAGCAATCCGATACAGCC | 195 |
| <i>rpoS</i> | ATACGCAACCTGGTGGATTC | GGCTTATCCAGTTGCTCTGC | 183 |
| <i>seqA</i> | CGGATGAATACGCAGAGCAA | CGGCTTGGTCTGATTACCAT | 179 |
| <i>slt</i> | CGTGCGTCAGGTAAACAAGA | CAGTGAAATGATTGCCGAGG | 144 |
| <i>spy</i> | TCAAAGACCTGAACCTGACC | GAAGGTATCGCTGGCAATGA | 134 |
| <i>sulA</i> | GTTCTTCGTCGTTCTCATCC | CTGACCGAGTTGCTGTAACA | 152 |
| <i>tolA</i> | AAAGGGAACAATGCTTCGCC | TTGGTGGTTTTCGGGATCTTC | 271 |
| <i>tolQ</i> | GGACCCGTATTCTTAACGCA | TTCCCCTGGCTCTCTTGATA | 103 |
| <i>tolR</i> | AAGTGTCAGCCGTTTCAAG | CGATTTACACCCGCACTAT | 122 |
| <i>uidA</i> | CTCTATGAACTGTGCGTCAC | TCAGCGTAAGGGTAATGCGA | 260 |
| <i>cpoB</i> | TCCGATATTGATTCCCTGCG | TCTGAAATGCCACCATTGCG | 301 |
| <i>ycbC</i> | CGAAAGCACCTATCCGACAT | GCGTGGCAGACTGTTATTGA | 127 |

Tablo 3.1. Tablonun Devamı

| | | | |
|-------------|----------------------|-----------------------|-----|
| <i>yedR</i> | CTGGCTTTGTGGGCTTTCTA | GGCAATGCTGCCTAACAATG | 201 |
| <i>yfhA</i> | AGTTTCCTCACCAAGCCTGT | TCCAGCAAACGCAGCATCAG | 140 |
| <i>yfhK</i> | GAGTCTGGTAATGGTACTGC | CCACTGAACGAGACGCTATT | 120 |
| <i>ymgF</i> | CCTCCTGGTCATCCTTATTG | ATTGCTGATCCCTGTGGTTG | 146 |
| <i>ytfB</i> | GTCGGATTTCTGCTTCCATC | TTCTGTGCGGCGGTTGTGATT | 99 |
| <i>zapA</i> | AAGGGATGCGTTGAATCAGG | CGGCAATGAAGACCAACTGT | 104 |
| <i>zapB</i> | GGAAGCAAAAGTACAGCAGG | TCAGATGGTTGTTCTCACGC | 149 |
| <i>zapC</i> | ACTCCAGATGCCTTTTCTCC | AGTATCGCTCAACCAAACGC | 243 |
| <i>zapD</i> | TCGTTTGATTGCTCTGGTGC | GCTGGTTTGTTTACGGAAGG | 214 |
| <i>zapE</i> | ATGCTACTTGGCGGTCTGAT | GATAATCAACACCAGCGTCC | 181 |
| <i>zipA</i> | ACCAGTACCAACCGCCTTAT | GAAGCAGTTCACCGTTTAGC | 369 |
| <i>zraR</i> | CAGTTCGGTATGGTCGGTAA | TTATCGGCTCCAGTAAACGC | 257 |
| <i>zraS</i> | GTCATTCTTCTGGTATCGCC | GAGGAAAGTGGGTTACGGAT | 135 |

Tablo 3.2. Ligasyonda Kullanılan Primer Dizileri

| Gen Adı | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') |
|----------------|--|--|
| <i>dicB</i> | GGTGATGATGATGACAAGATGAA AACGTTATTACCAAACG | GGAGATGGGAAGTCATTATTGTGC ACATCCTTTTGGCATC |
| <i>dicC</i> | GGTGATGATGATGACAAGATGCTT AAAACGACGCTCTTT | GGAGATGGGAAGTCATTAGGAGTG ATTTTCATTGTTCAAC |
| <i>ymgF</i> | GGTGATGATGATGACAAGATGAAC AATAGTAATAATCTGG | GGAGATGGGAAGTCATTATTGCTG ATCCCTGTGGTTGACG |
| <i>zapC</i> | GGTGATGATGATGACAAGATGCGA ATTAACCAAGACGATA | GGAGATGGGAAGTCATTAGACTGC CTGTTCGAGGCTGAAG |
| Lic- | TAATACGACTCACTATAGGG | GAGCGGATAACAATTTACACAGG |

3.11. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) (cDNA Sentezi)

Saflaştırma işleminden sonrasında daha kaliteli hale getirilen RNA'lardan hesap yapılarak yaklaşık aynı miktarda RNA örneklerinden Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti kullanılarak ters transkripsiyon (RT-PCR) ile cDNA'lar elde edildi. cDNA sentezi Tablo 3.3'de yer alan bileşenler ve Tablo 3.4'de yer alan döngü koşullarına göre gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri, kullanılabildiği kadar -20 °C derin dondurucuda muhafaza edildi. Bu cDNA örnekleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) deneylerinde kalıp olarak kullanıldı.

Tablo 3.3. RT-PCR Reaksiyon Bileşenleri

| Bileşen | Miktar |
|-----------------------------------|-------------|
| 10× RT Buffer | 2 µl |
| 25× dNTP Mix (100 mM) | 0.8 µl |
| 10× RT Random Primer | 2 µl |
| MultiScribe Reverse Transcriptase | 1 µl |
| Nuclease-free H ₂ O | 4,2 µl |
| RNA (100 ng/µl) | 10 µl |
| Total hacim | 20µl |

Tablo 3.4. RT-PCR Döngü Koşulları

| | Adım 1 | Adım 2 | Adım 3 | Adım 4 |
|-----------------|-----------|------------|----------|--------|
| Zaman | 25 °C | 37 °C | 85 °C | 4 °C |
| Sıcaklık | 10 dakika | 120 dakika | 5 dakika | ∞ |

3.12. Real Time PCR (qPCR)

cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler ile AriaMx (Agilent) Real Time PCR cihazında Real Time PCR (qPCR) yapıldı. qPCR yapılırken housekeeping gen olan Beta-glukuronidaz (*uidA*) (Barbau-Piednoir vd., 2018) referans gen olarak kullanıldı. qPCR reaksiyonu için RealQ Plus 2x Master Mix (Ampliçon) kullanılarak üreticinin protokolüne uygun bir şekilde

reaksiyonlar kuruldu. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler ve reaksiyon şartları Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da sunuldu. Her bir örnek bağımsız 3 tekrar şeklinde gerçekleştirildi. Gen ekspresyonundaki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre hesaplandı. Elde edilen Real Time PCR sonuçları Pfaffl yöntemi kullanılarak analiz edildi (Pfaffl, 2001).

Tablo 3.5. qPCR Bileşenleri

| Bileşenler | Miktar |
|--------------------------------|---------------|
| RealQ Plus 2X Master Mix | 7,5 µl |
| Forward Primer | 0,5 µl |
| Reverse Primer | 0,5 µl |
| Nuclease-free H ₂ O | 5,5 µl |
| cDNA | 1,0 µl |
| Toplam | 15 µl |

Tablo 3.6. qPCR Döngü Koşulları

| Döngü | Sıcaklık | Zaman |
|--------------|-----------------|--------------|
| 1 | 95 °C | 15 dakika |
| 40 | 95 °C | 30 saniye |
| | 60 °C | 1 dakika |
| 1 | 95 °C | 30 saniye |
| | 65 °C | 30 saniye |
| | 95 °C | 30 saniye |

3.13. *E. coli* Rekombinant Hücrelerinin Eldesi

3.13.1. Koloni PCR

Real Time PCR için tasarlanan primerlerin kontrolü, rekombinant hale getirilecek gen bölgesinin çoğaltılması ve transformasyon deneyleri sonrasında elde edilen rekombinant hücrelerin doğrulanmasında koloni PCR yöntemi kullanıldı. Transformasyon sonrasında seçilen koloniler ve yabancı tip *E. coli* W3110 20 µl distile su içerisine süspansiyon edilerek PCR için kalıp hazırlandı. Daha sonra aşağıda Tablo 3.7’de verilen reaksiyon bileşenleri ve Tablo 3.8’de verilen döngü koşullarına göre koloni PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.7. Koloni PCR Bileşenleri

| Bileşenler | Miktar |
|--------------------------------|---------------|
| MasterMix (Affymetrix) | 12,5 µl |
| Forward Primer | 0,5 µl |
| Reverse Primer | 0,5 µl |
| Nuclease-free H ₂ O | 10,5 µl |
| Bakteri süspansiyonu | 1 µl |
| Toplam | 25 µl |

Tablo 3.8. Koloni PCR Döngü Koşulları

| Döngü | Sıcaklık | Zaman |
|--------------|-----------------|--------------|
| 1 | 95 °C | 5 dakika |
| 35 | 95 °C | 15 saniye |
| | 58 °C | 1 dakika |
| | 68 °C | 2 dakika |
| 1 | 68 °C | 10 dakika |
| 1 | 4 °C | ∞ |

3.13.2. Agaroz Jel Elektroforezi

%1'lik agaroz hazırlamak için 1 g agaroz (sigma) ve 100 ml 1x TBE (Thermo Scientific) kullanıldı. Mikrodalga'da ısıtılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra 10 mg/ml EtBr stoğundan 3 µl EtBr (Biomatik) eklendi. Elektroforez cihazının tankına hazırlanan agaroz jeli döküldü. Donduktan sonra 5 µl PCR ürünü 1 µl loading dye (Thermo Scientific) ile karıştırılarak örnekler jele yüklendi ve 120 voltta 45 dk yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel görüntüleme sistemi (Syngene, G:Box) ile görüntüleme yapıldı.

3.13.3. Ligasyon

Koloni PCR ile çoğaltılan gen bölgelerinin pLATE51 vektörüne ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Alicator pLATE51 (Thermo Scientific) vektörüne ligasyon basamağı şu şekilde yapıldı; 2 µl 5X LIC tamponu, 1 µl PCR ürünü, T4 DNA polimeraz (1 u/µl) 1 µl ve saf su 6 µl eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı üzerine 0.5 M EDTA'dan 0.6 µl eklendi. Son olarak aynı reaksiyon karışımı üzerine 1 µl de pLATE51

vektörü eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona devam edilerek ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* gen bölgeleri 6x histidin içeren plazmid içerisine yerleştirildi.

3.13.4. Transformasyon

2 ml LB broth içerisine *E. coli* W3110 suşunun ekimi yapıldı ve 37 °C' de bir gece çalkalamalı inkübasyona bırakılarak transformasyon için ön kültür hazırlandı. Ertesi gün steril 9.9 ml SOB besiyeri üzerine steril 100 µl 2 M Mg⁺² ve hazırlanan ön kültürden 50 µl eklenerek O.D₆₀₀ değeri 0,3' e gelene kadar 37 °C' de çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından aseptik koşullarda hücreler steril 6 adet santrifüj tüpüne aktararak 5 dakika buzda soğutuldu. Ardından 12000 rpm'de 5 dakika +4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatantlar uzaklaştırılarak pelet üzerine 1 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ eklenerek 6 ayrı santrifüj tüpündeki peletler 2 ayrı santrifüj tüpüne toplandı ve süspansiyon edilerek 10 dakika buzda bekletildi. Tekrar 12000 rpm'de 5 dakika +4 °C' de santrifüje tabi tutuldu. Süpernatant yeniden uzaklaştırılarak tüp başına 0,1 M soğuk 200 µl CaCl₂ eklendi. Daha sonra yeniden pelet süspansiyon haline getirildi ve 30 dakika buzda bekletildi.

1,5 ml 2 adet steril santrifüj tüpünde bulunan 200 µl kompetan hücre üzerine 10-100 ng olacak şekilde 2 farklı konsantrasyonda rekombinant hale getirilecek geni içeren plazmidler eklendi ve 30 dakikadan fazla buzda inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonları cam tüplere aktararak 42 °C' de 2 dakika ısı şoku uygulandı ve sonrasında 2 dakika buzda bekletilerek hücreler şoklandı. Ardından hücreler üzerine 800 µl SOC besiyeri eklenerek 37 °C' de 60 dakika çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Rekombinant hücrelerinin 500 µl'si 1,5 ml' lik ependorflara alındı ve 5000 rpm'de 2 dakika +4 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üzerine 100 µl SOC medium eklendi ve yeniden süspansiyon edilerek ampisilin antibiyotiği içeren LB agar üzerine yayıldı ve 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petri de koloni oluşturan hücreler seçilerek yine ampisilin antibiyotiği içeren LB agar besiyerine master plate ekim yapıldı ve burada üreyen hücreler ile koloni PCR yapıldı. Koloni PCR da Tablo 3.2'de yer alan ve kitin içerisinden çıkan plazmide özgü primerler ile gen spesifik forward ve reverse ligasyon primeri kullanılarak ikili doğrulama işlemi yapıldı.

3.14. Büyüme Deneyleri

Bölünme ile ilişkili olan genlerin rekombinant hücreleri ile büyüme deneyleri gerçekleştirildi. Bunun için her bir suştan 5 ml LB broth besiyerine tek koloni ekim yapıldı ve 37 °C'de 18 saat çalkalamalı (160 rpm) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından

başlangıç bakteri yoğunluğunu eşitlemek için OD₆₀₀ değeri 0,1 absorbans olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra buradan bakteri başlangıç değerleri eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu 15 ml LB broth içerisinde ilave edildi ve 37 °C, 160 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince bakterilerden her 2 saatte bir örnek alınarak 8 saat boyunca spektrofotometrede OD₆₀₀ değerleri ölçüldü ve büyüme grafikleri oluşturuldu (Kaygusuz & Darcan, 2021). Deneyler en az 3 bağımsız tekrar ile gerçekleştirildi.

3.15. *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Analizi

Yabani tip *E. coli* W3110, *E. coli* W3110 boş vektör, rekombinant suşlar *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* genlerinin ekspresyonu Real Time PCR ile doğrulandı. Doğrulama işlemi için öncelikle her bir suştan ön kültür elde etmek için 5 ml LB broth besiyerine tek koloni ekim yapıldı ve 37 °C'de 18 saat çalkalamalı (160 rpm) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücre yoğunlukları 0,1 absorbansa ayarlandı ve buradan 15 ml LB broth içeren erlenlere eşit hacimde ekim yapıldı ve erlenler 37 °C'de 160 rpm de inkübasyona bırakıldı. OD₆₀₀ değeri ~0,1-0,2 OD ye geldiğinde final konsantrasyonu 1mM IPTG olacak şekilde erlenlere IPTG ilave edildi ve inkübasyona devam edildi. OD₆₀₀ değeri ~0,5-0,6 olduğunda her bir erlenden 2 ml örnek alındı. Daha sonra alınan örnekler 1XPBS ile yıkandıktan sonra yukarıda anlatılan RNA izolasyon yöntemine göre izolasyon yapıldı. Ardından elde edilen RNA'lar ile cDNA sentezi gerçekleştirildi ve Tablo 3.1 de yer alan *uidA*, *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* primerleri ile Real Time PCR gerçekleştirildi.

3.16. *E. coli* DicB, DicC, YmgF ve ZapC Rekombinant Suşlarda VBNC Durumun Belirlenmesi

Yabani tip *E. coli* W3110, boş vektör ve rekombinant suşlarla yaşam deneylerini gerçekleştirmek için logaritmik faza kadar büyütülen hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra final konsantrasyonu 10⁷ olacak şekilde 50 ml yapay deniz suyu bulunan erlenlere ilave edildi. Erlenler sıcaklık, metal ve antibiyotik stresi şartlarına uygun olarak yukarıda anlatıldığı gibi hazırlandı ve inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu erlenlerden plak ve Live/Dead sayımları yapıldı.

3.17. Lipit Peroksidasyonu

Yapılan deneyler sonrasında VBNC duruma geçtiği plak sayım sonuçları ve Live/Dead BacLight kiti ile doğrulanan hücreler 0.2 µm por çaplı 47 mm genişliğindeki polikarbonat filtre ile vakum filtrasyon sistemi kullanılarak toplandı. Filtreler ile toplanan hem VBNC hücreler hem de kontrol hücreleri 1X PBS ile 1 kez yıkandıktan sonra 300 µl PBS de tekrar çözdürüldü

ve üzerine 300 µl %20 TCA ilave edilerek -20 °C de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüm safsızlıklar santrifüjleme yoluyla uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrasında 250 µl süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 600 µl %0,67 TBA ilave edilerek 30 dakika 100 °C de ısıtıldı. Bu işlemin ardından örnekler 15 dakika buz üzerinde soğutulduktan sonra spektrofotometrede 532 ve 600 nm dalga boylarında okumalar gerçekleştirildi. Kalibrasyon katsayısı $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.18. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Üç farklı stres koşulu altında VBNC durumuna indüklenen bakteriyel hücreler, 0,2 um gözenek boyutuna sahip 47 mm genişliğinde bir polikarbonat filtre ile bir vakumlu filtreleme yöntemi kullanılarak toplandı. Daha sonra bu hücreler dH₂O ile filtre üzerinden toplanarak yıkandı ve 12000 g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1 ml dH₂O ile tekrar yıkandı ve 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bunu takiben hücre peleti 100 µl dH₂O içerisinde süspanse edildi ve 1 ul, ATR-FTIR Spektrometresinin (Perkin-Elmer, ABD) Elmas/ZnSe kristal plakası üzerine damlatıldı ve 2 dakika boyunca hafif bir nitrojen akışı altında kurutuldu. Daha sonra oda sıcaklığında 4000 ila 650 cm⁻¹ spektral aralıkta, 4 cm⁻¹ çözünürlükte ve 32 taramayla tarandı (Kilicaslan vd., 2023).

Kantitatif spektral veri analizi OPUS 5.5 (Bruker) yazılımı kullanılarak yapıldı. Her numunenin spektrumu, CO₂ bantları hariç 64 taban çizgisi noktasıyla Rubberband düzeltme yöntemi kullanılarak taban çizgisi düzeltildi. Ayrıntılı kantitatif spektrokimyasal analizde spektrumun farklı spektral bölgelerinde en yüksek absorbans değerlerine sahip bantlar seçilerek bantların başlangıç ve son frekansları hassasiyetle belirlendi. OPUS 5.5 (Bruker) yazılımı ile belirlenen frekans aralıklarının integral alanları alınarak çeşitli biyomoleküllere özgü bantların alanları analiz edildi (Ardahanlı vd., 2022; Ceylani vd., 2022).

3.19. Kemometrik Analiz

Farklı bakteri gruplarının spektral verilerini birbirinden ayırt etmek ve VBNC durumundan sorumlu değişkeni tahmin etmek için Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulandı. Spektral dönüşümler, niteliksel ve niceliksel analizlerin FTIR spektrometrelerinden mümkün olduğunca bağımsız hale getirilmesi açısından değerlidir. Bu nedenle analiz öncesinde ham spektrumlara iki farklı dönüşüm uygulandı. İlk olarak, 4000-650 cm⁻¹ spektral bölge üzerinde taban çizgisi offset yöntemi kullanılarak taban çizgisi dönüşümü yapıldı. İkinci olarak, aynı bölge üzerinde Birim Vektör Normalizasyonu uygulandı. Ortalama merkezli spektral veriler, veri madenciliğinde dokuz bölümlü tam bir yöntem kullanılarak çapraz doğrulandı.

Kalibrasyon numunesi sayısı 9'du. Matris çarpanlarına ayırma yöntemi, tekil değer ayrıştırma (SVD) algoritması, 1300-700 cm^{-1} spektral aralığında uygulandı. Maksimum temel bileşen sayısı 7 idi. Sonuçlar, puanlar ve yükleme grafikleri olarak verildi.

3.20. İstatistiksel Analiz

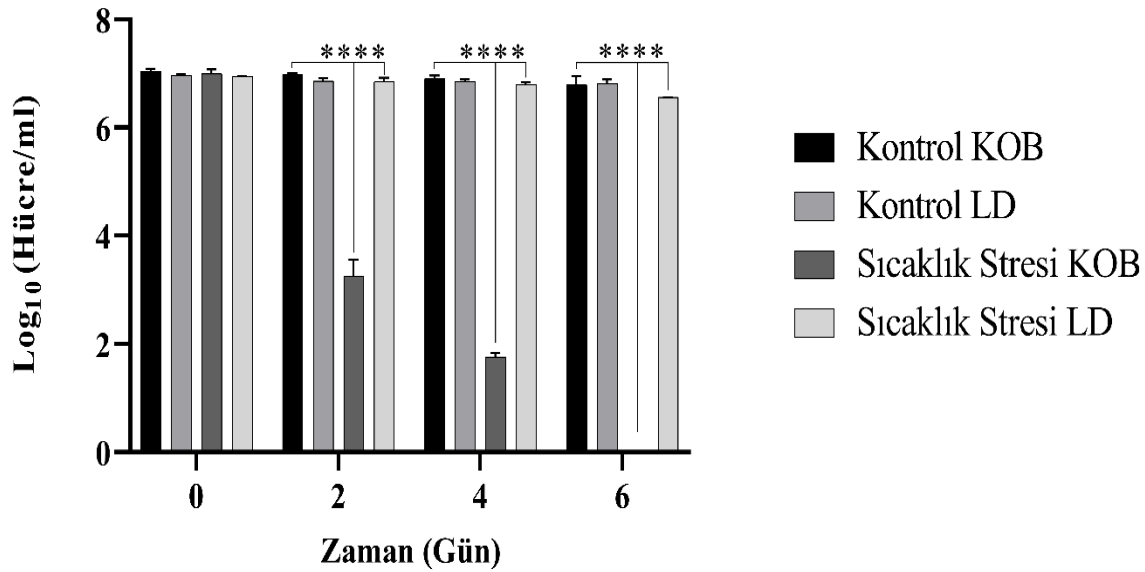
Analizler istatistiksel bir analiz programı olan GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, San Diego, California) kullanılarak yapıldı. Veriler, sıradan Tek Yönlü ANOVA çerçevesinde Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık derecesi her zaman %95'lik bir güven aralığına ayarlandı ve $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ *** ve $P < 0,0001$ ****'ye eşit veya küçük olarak gösterildi. Sonuçlar ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak ifade edildi.

Alıcı Çalışma Karakteristiği (ROC) analizleri de GraphPad Prism 8.01 yazılımı kullanılarak yapıldı; burada eğri altındaki alan (AUC) ve P değerleri %95 güven aralığında hesaplandı. Eşik değıştikçe duyarlılık (Gerçek Pozitif Oranı) ve özgüllük (Yanlış Pozitif Oranı) yüzde puanları bir ROC eğrisi grafiği üzerinde çizildi.

4. BULGULAR

4.1. *E. coli*'nin Kültürlenabilirliği ve Canlılığı Üzerine Sıcaklık Stresinin Etkisi

E. coli W3110 ile sıcaklık stresi (42 °C) altında gerçekleştirilen deneylerde kültüre edilebilir hücre sayısının kontrol grubu örneklerine kıyasla önemli ölçüde azaldığı yapılan petri plak sayımlarıyla tespit edilmiştir. 42 °C'de yapay deniz suyu ortamında gerçekleştirilen deneylerde *E. coli* W3110 hücrelerinin başlangıç petri plak sayısı 7.0 log iken 6 günlük inkübasyon sonucunda plak sayısının sıfıra indiği ve dolayısıyla kültürlenabilirliğin tamamen kaybolduğu belirlenmiştir. Ancak, aynı zamanda Live/Dead BacLight kiti ile gerçekleştirilen floresan mikroskop sayım sonuçlarında 6 günlük inkübasyon sonucunda hücre sayısının 6.56 log olduğu ve dolayısıyla hücre canlılığının hala devam ettiği ve hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.4). Bu sonuçlar, *E. coli* W3110 hücrelerinin koloni oluşturmaları da membran bütünlüğünü koruduğunu ve hala canlı olduklarını göstermektedir.

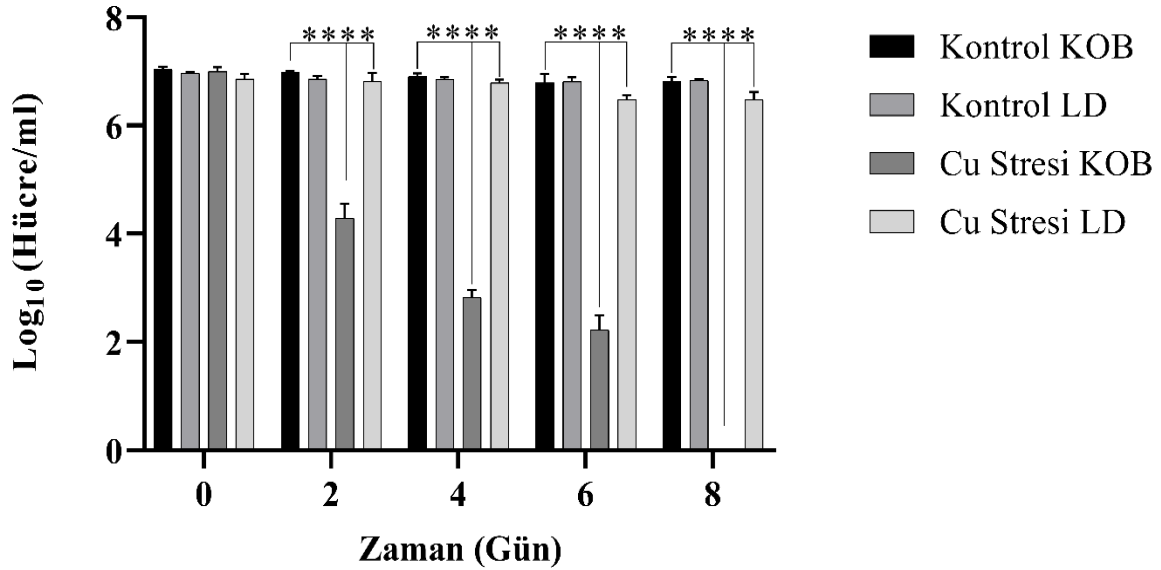


Şekil 4.1. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında *E. coli* W3110 Hücrelerinin Yaşam Deneyi Sonuçları. Anlamlılık Derecesi $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi. (KOB: Koloni Oluşturan Birim, LD: Live/Dead BacLight Sayım Sonuçları)

4.2. *E. coli*'nin Kültürlenebilirliği ve Canlılığı Üzerine Bakır Stresinin Etkisi

Bakır stresi altında, yapay deniz suyu ortamında gerçekleştirilen yaşam deneylerinde *E. coli* W3110 hücrelerinin başlangıç petri plak sayısı 7.0 log seviyesindeyken 25 °C'de 8 günlük

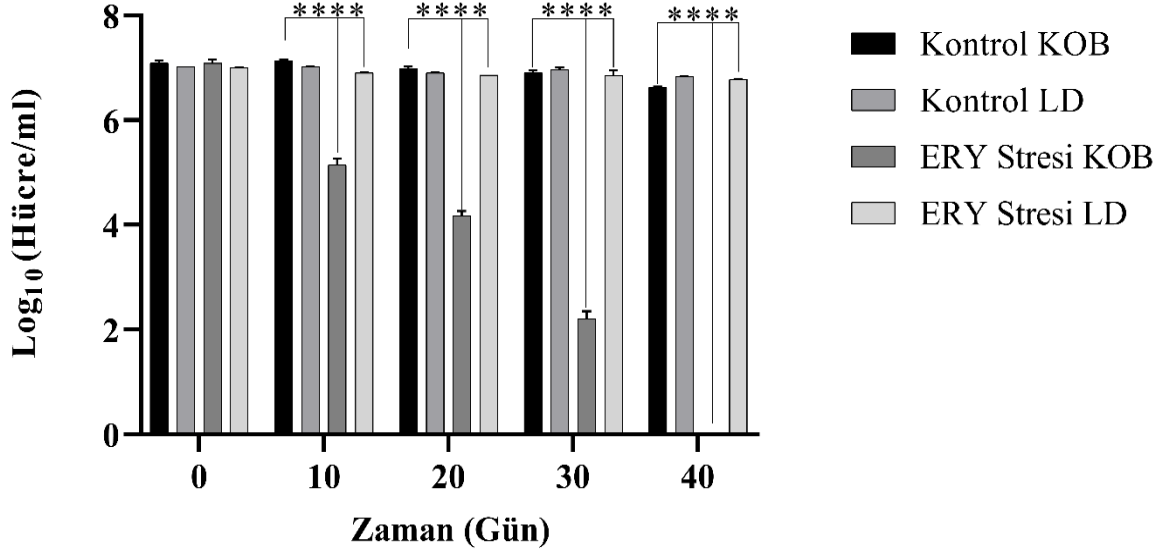
inkübasyon sonrasında yapılan petri plak sayımlarında hücre canlılığının ve kültürlenebilirliğin azaldığı ve plak sayımının sıfıra indiği belirlenmiştir. Ancak, Live/Dead BacLight kiti kullanılarak gerçekleştirilen floresan mikroskop sayım sonuçlarında, 8 günlük inkübasyon sonucunda hücre sayısının 6.47 log olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, hücre canlılığının hala devam ettiğini ve hücrelerin VBNC duruma indüklendiğini göstermektedir (Şekil 4.2, Şekil 4.4).



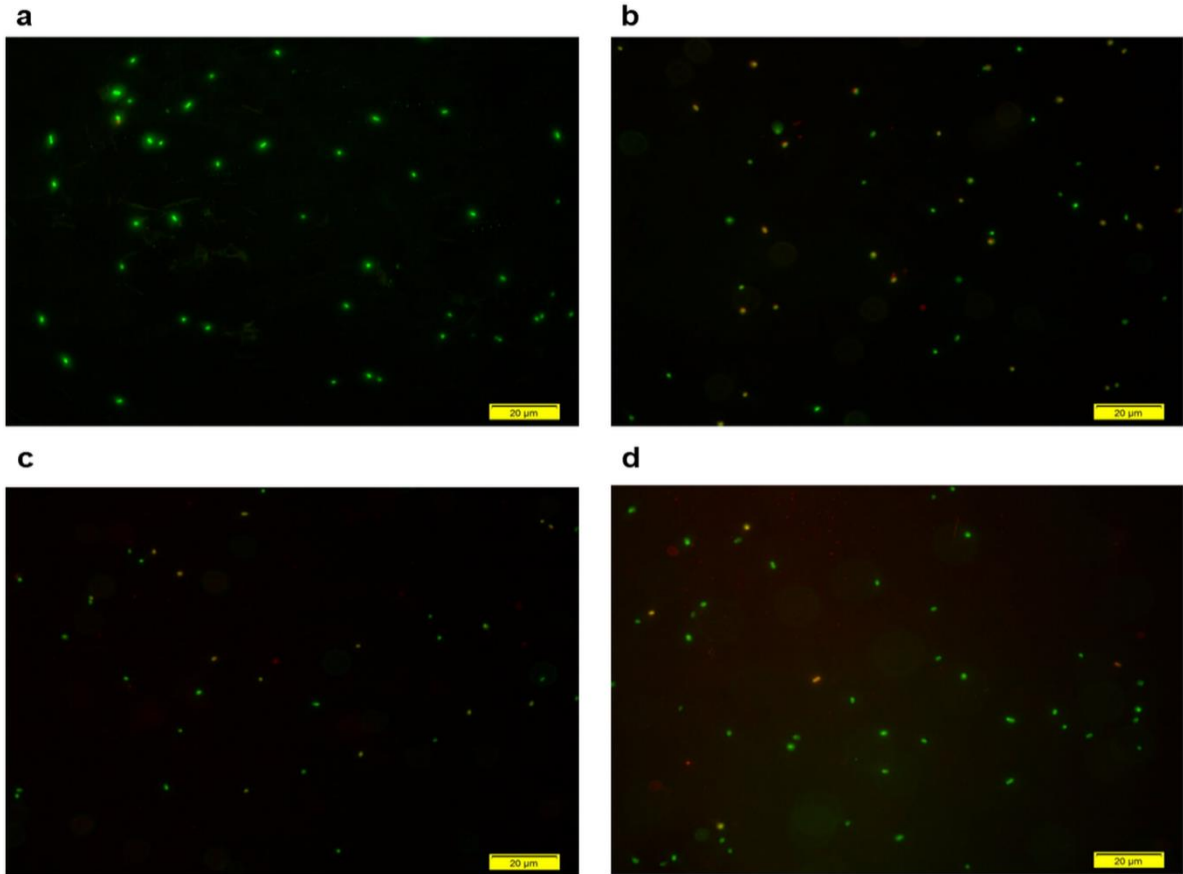
Şekil 4.2. Metal (CuSO_4) Stresi Varlığında *E. coli* W3110 Hücrelerinin Yaşam Deneyi Sonuçları. Anlamlılık Derecesi $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamasının Standart Hatası Olarak İfade Edildi. (KOB: Koloni Oluşturan Birim, LD: Live/Dead BacLight Sayım Sonuçları)

4.3. *E. coli*'nin Kültürlenebilirliği ve Canlılığı Üzerine Eritromisin Antibiyotiği Etkisi

Eritromisin antibiyotiği varlığında yapay deniz suyu ortamında gerçekleştirilen yaşam deneyleri sonucunda, *E. coli* W3110 hücrelerinin 40 gün içinde VBNC duruma geçtiği, yapılan plak sayım sonuçları ve Live/Dead BacLight kiti sonuçlarıyla belirlenmiştir. Başlangıçta 7.0 log seviyesinde olan plak sayım sonucunun, 40. günün sonunda sıfır olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık aynı zamanda gerçekleştirilen floresan mikroskop sayım sonuçlarında hücre sayısının 6.78 log olduğu tespit edilmiştir. Dolayısı ile 40 günlük inkübasyon sonucunda hücrelerin membran bütünlüğünü koruduğunu ve hücre canlılığını devam ettirdiğini göstermektedir (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında *E. coli* W3110 Hücrelerinin Yaşam Deneyi Sonuçları. Anlamlılık Derecesi $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamasının Standart Hatası Olarak İfade Edildi. (KOB: Koloni Oluşturan Birim, LD: Live/Dead BacLight Sayım Sonuçları)

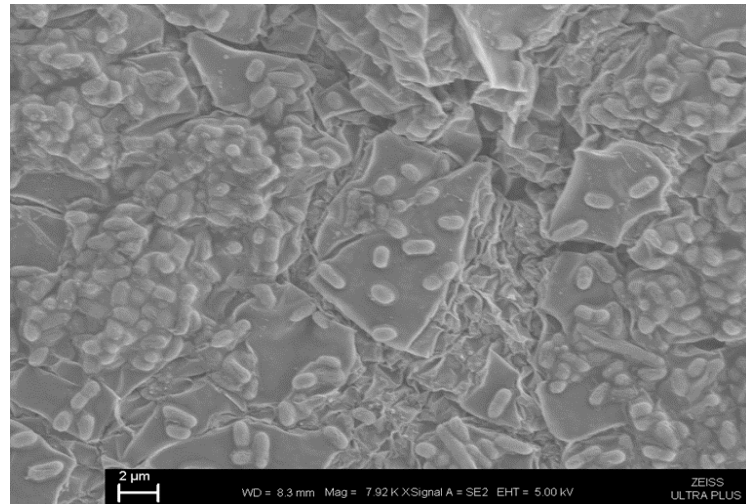


Şekil 4.4. Floresan Mikroskop Altında *E. coli* W3110 Hücrelerinin Görüntüleri. Canlı (yeşil) ve Ölü Hücreleri (Kırmızı) Ayırt Etmek için Hücreler Live/Dead BacLight Kit ile Boyandı. (a) Kontrol, (b) Sıcaklık (42 °C) 6. Gün, (c) Metal (CuSO_4) 8. Gün ve (d) Antibiyotik (Eritromisin) 40. Gün Sonuçları. Ölçek Çubuğu 20 μm 'yi Temsil Eder.

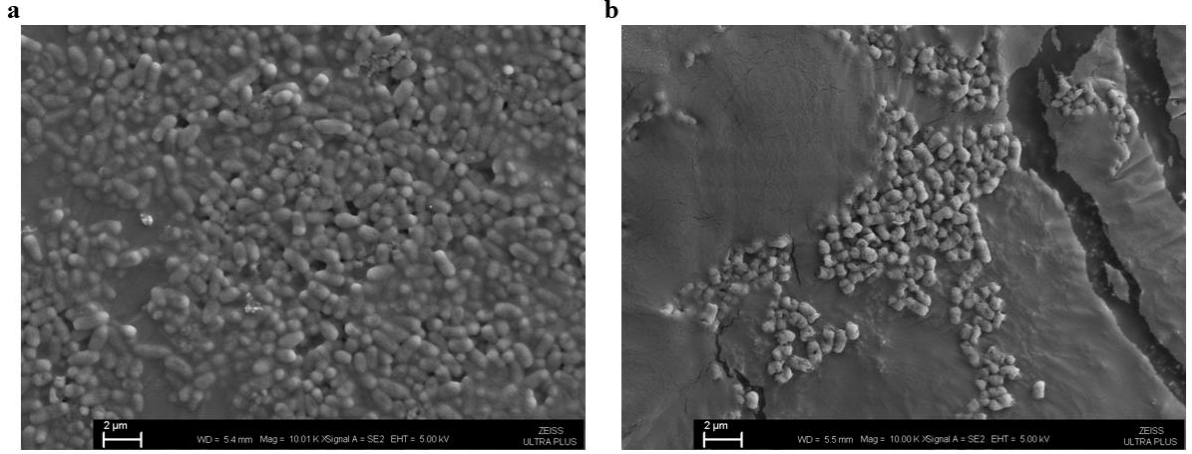
4.4. Kültürlenebilir ve VBNC *E. coli* W3110 Hücrelerinde Elektron Mikroskopisi

Kontrol grubu logaritmik faz hücrelerinin ve farklı stres koşullarında VBNC duruma indüklenmiş hücrelerin morfolojik değişiklikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8). Sıcaklık ve antibiyotik stresi ile VBNC duruma indüklenen hücrelerde, kontrol grubundaki hücelere kıyasla hücre yüzeylerinde belirgin pürüzlerin oluştuğu gözlenmiştir. Her üç stres koşulu altında VBNC duruma indüklenen hücrelerde içe doğru çökmelerin meydana geldiği de tespit edilmiştir. Ayrıca, ImageJ programı ile floresan mikroskop görüntüleri üzerinde yapılan analizlerde, VBNC hücrelerinin boyutlarının kontrol grubundaki hücelere göre belirgin şekilde küçüldüğü belirlenmiştir. Kontrol grubu *E. coli* hücreleri basil formunda ve $2\pm 0,20$ μm uzunluğunda iken VBNC duruma indüklenen hücelerde; sıcaklık stresi altında $1,43\pm 0,21$ μm , bakır stresi altında $1,56\pm 0,19$ μm ve antibiyotik stresi altında $1,49\pm 0,19$ μm uzunluğunda oldukları tespit edilmiştir.

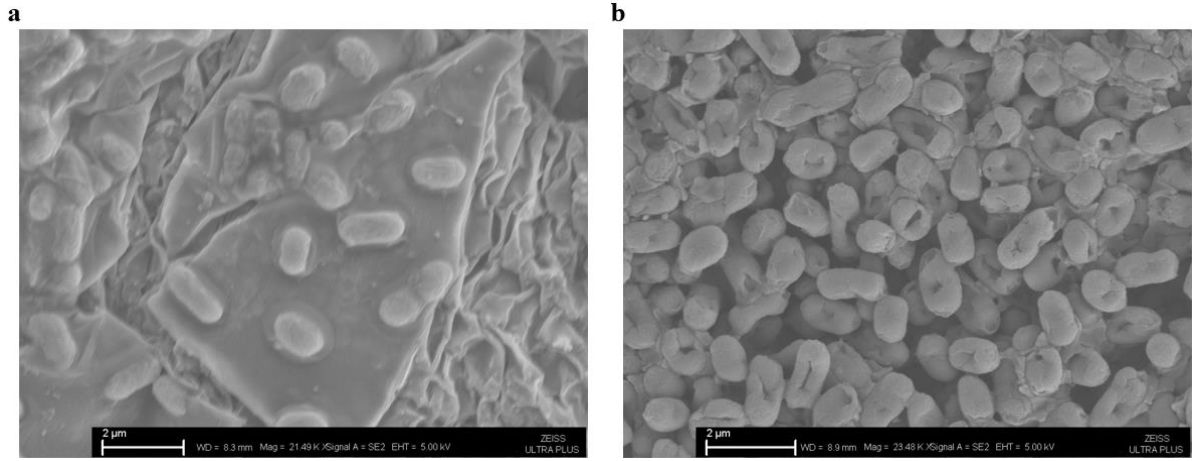
Farklı stres koşullarında VBNC duruma indüklenen hücrelerin iç yapısı geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak tespit edilmiştir. VBNC durumdaki hücelerde ribozom sayısındaki azalmadan ötürü sitoplazmik matrisin kontrol grubuna göre daha az yoğun olduğu ve VBNC hücelerde dış ve iç zarlar arasında bir boşluk meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca VBNC durumdaki hücelerde DNA şeritlerinin belirgin hale geldiği, genetik içeriklerin diğer sitoplazmik içeriklerden ayrıldığı ve kromozom yapısında potansiyel değişikliklerin meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11).



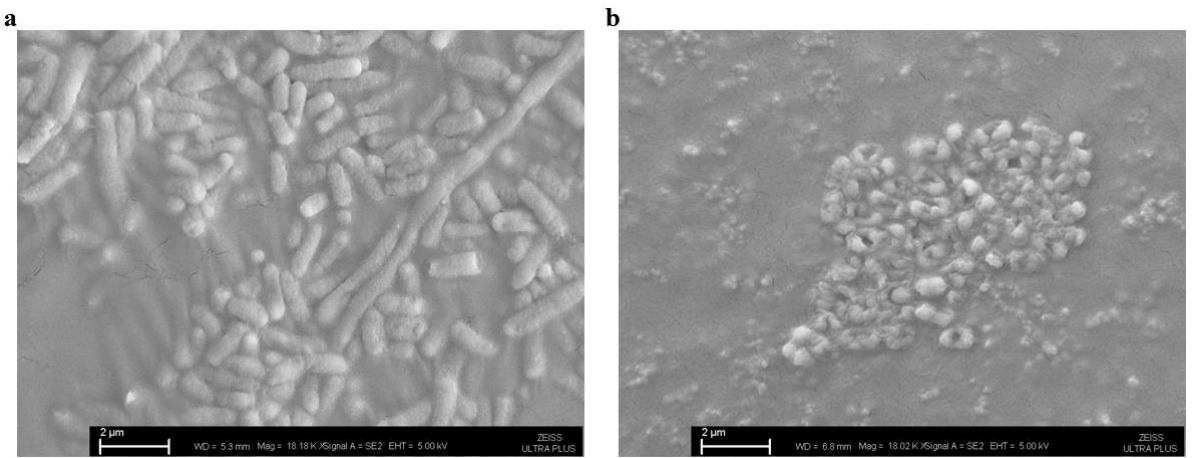
Şekil 4.5. Logaritmik Faz Hücrelerinin Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. (Mag: 8.00KX, Ölçek Çubuğu 2 μm 'yi Temsil Eder.)



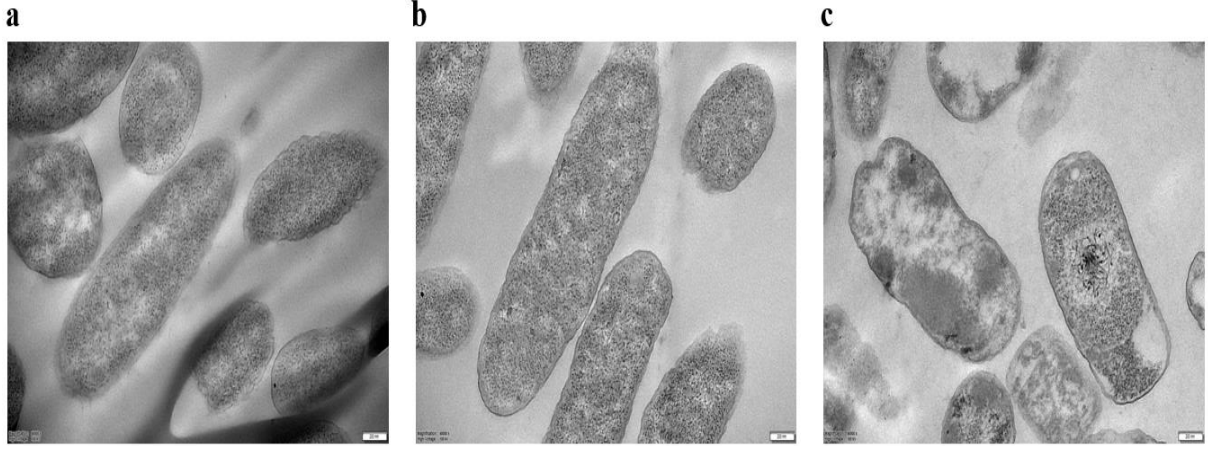
Şekil 4.6. Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. a. Strese Maruz Kalmamış Kontrol Grubu, b. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında VBNC Duruma İndüklenmiş Hücreler (Mag:10.00KX, Ölçek Çubuğu 2 µm'yi Temsil Eder.)



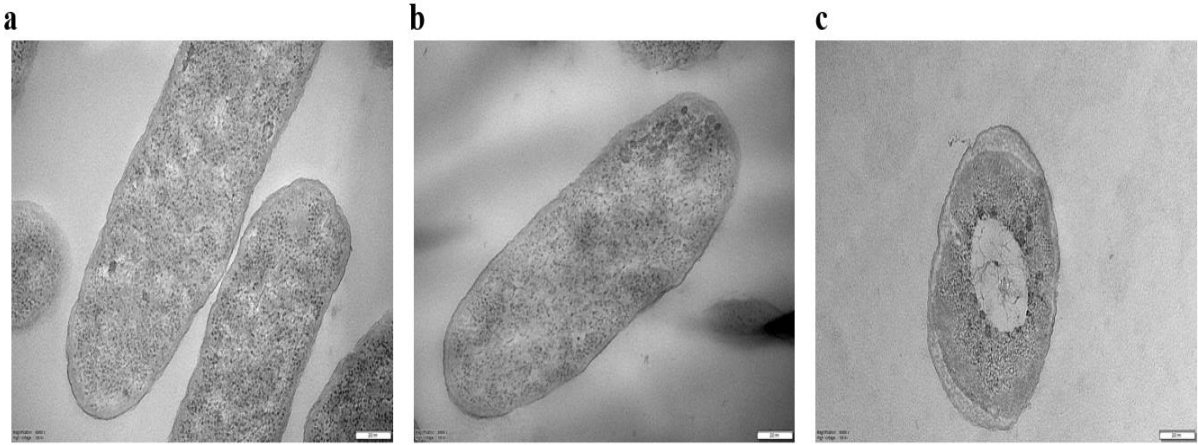
Şekil 4.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. a. Strese Maruz Kalmamış Kontrol Grubu, b. Metal (CuSO₄) Stresi Varlığında VBNC Duruma İndüklenmiş Hücreler (Mag: 20.00KX, Ölçek çubuğu 2 µm'yi Temsil Eder.)



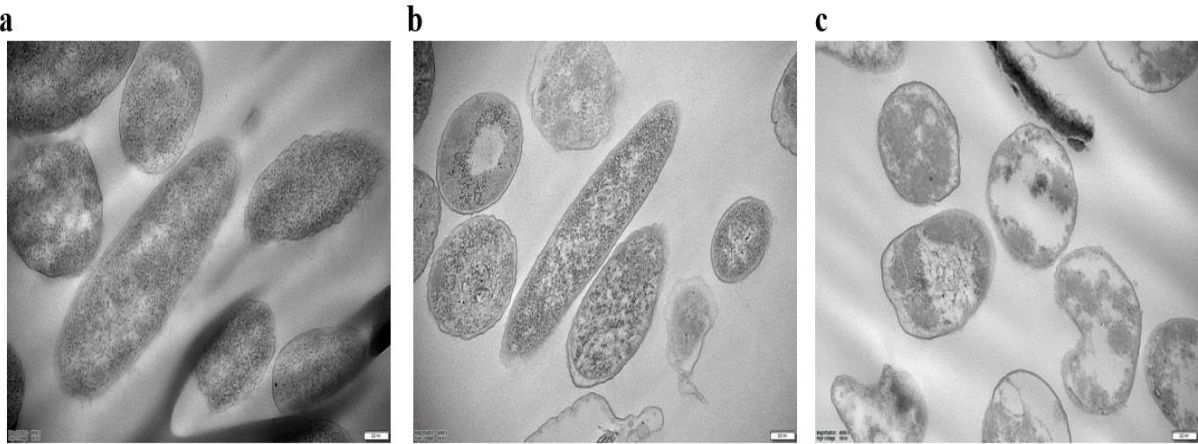
Şekil 4.8. Taramalı Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. a. Strese Maruz Kalmamış Kontrol Grubu, B. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında VBNC Duruma İndüklenmiş Hücreler (Mag: 18.00KX, Ölçek Çubuğu 2 µm'yi Temsil Eder.)



Şekil 4.9. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. a. Logaritmik Faz *E. coli*, b. Strese Maruz Kalmamış Kontrol Grubu, C. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında VBNC Duruma İndüklenmiş Hücreler (Mag: 40000x, High Voltage 100kV, Ölçek Çubuğu 200 nm'yi Temsil Eder.)



Şekil 4.10. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. A. Logaritmik Faz *E. coli*, B. Strese Maruz Kalmamış Kontrol Grubu, C. Metal (CuSO_4) Stresi Varlığında VBNC Duruma İndüklenmiş Hücreler (Mag: 60000x, High Voltage 100kv, Ölçek Çubuğu 200 nm'yi Temsil Eder.)



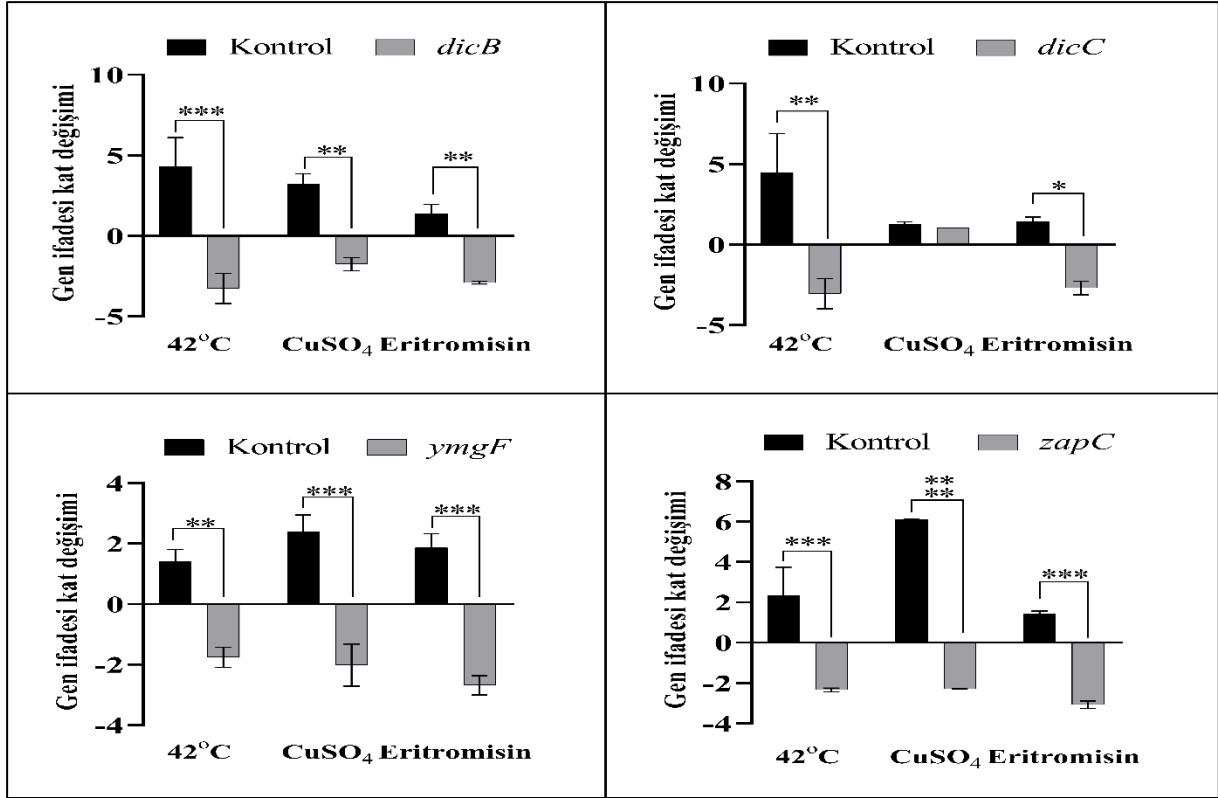
Şekil 4.11. Geçirimli Elektron Mikroskopisi Görüntüleri. A. Logaritmik Faz *E. coli*, B. Strese Maruz Kalmamış Kontrol Grubu, C. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında VBNC Duruma İndüklenmiş Hücreler (Mag: 40000x, High Voltage 100kv, Ölçek Çubuğu 200 nm'yi Temsil Eder.)

4.5. Bölünme ve Hücre Zarf Stres Genlerinin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

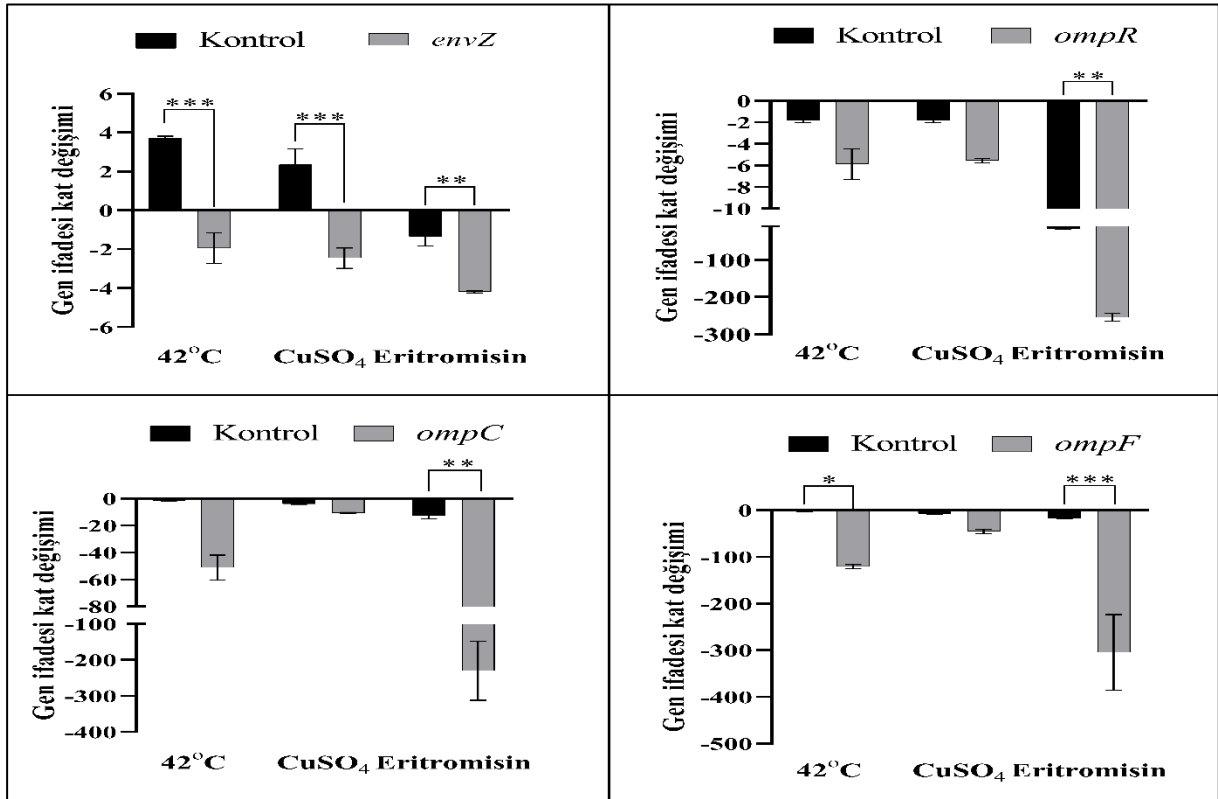
Farklı stres şartlarında VBNC duruma indüklenen *E. coli* W3110 hücrelerinde, hücre bölünmesinde doğrudan veya dolaylı rol oynayan genler ve hücre zarf stresinde rol oynayan genlerin ekspresyon düzeyleri Real time PCR kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmada, VBNC durumdaki hücrelerin yanında kontrol grubu olarak aynı süre boyunca açlık ortamında bulunan hücreler ve logaritmik faz hücreleri kullanılmıştır.

Real-time PCR analizlerinde, 42 °C sıcaklık stresi altında çalışılan 52 genden 24'ünün (*cedA*, *cpxA*, *cpxP*, *cpxR*, *dam*, *dedD*, *dicB*, *dicC*, *envZ*, *ftsB*, *ftsE*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsP*, *ftsQ*, *recA*, *slt*, *sulA*, *tolQ*, *zapD*, *zapC*, *zapE*, *ymgF* ve *zapA* genlerinin) ekspresyon seviyesinin kontrol grubu hücrelerine kıyasla VBNC duruma indüklenen hücrelerde azaldığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde bakır metali varlığında ise *pal* geni hariç çalışılan 52 genin 30'unda (*cpxP*, *cpxR*, *cpoB*, *dam*, *damX*, *dicB*, *envC*, *envZ*, *ftsB*, *ftsE*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsP*, *ftsQ*, *ftsX*, *mukB*, *pal*, *recA*, *slt*, *sulA*, *tolA*, *tolQ*, *tolR*, *zapD*, *zapC*, *ycbC*, *yedR*, *yfhA*, *ymgF* ve *zapA*) ekspresyon seviyesinin kontrol grubu örneklerine kıyasla VBNC örneklerde azalmış olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde antibiyotik stresi altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde çalışılan 52 genden 8'unun (*cpxA*, *dicB*, *dicC*, *yedR*, *yfhA*, *ymgF*, *zapC* ve *zraR*) kontrol grubu örneklerine kıyasla ekspresyon seviyelerinin azaldığı yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Diğer genlerin ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçların analizi neticesinde *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* genlerinin her üç stres şartı altında benzer sonuçlar verdiği belirlenmiş ve çalışmaya bu dört gen ile devam edilmiştir.

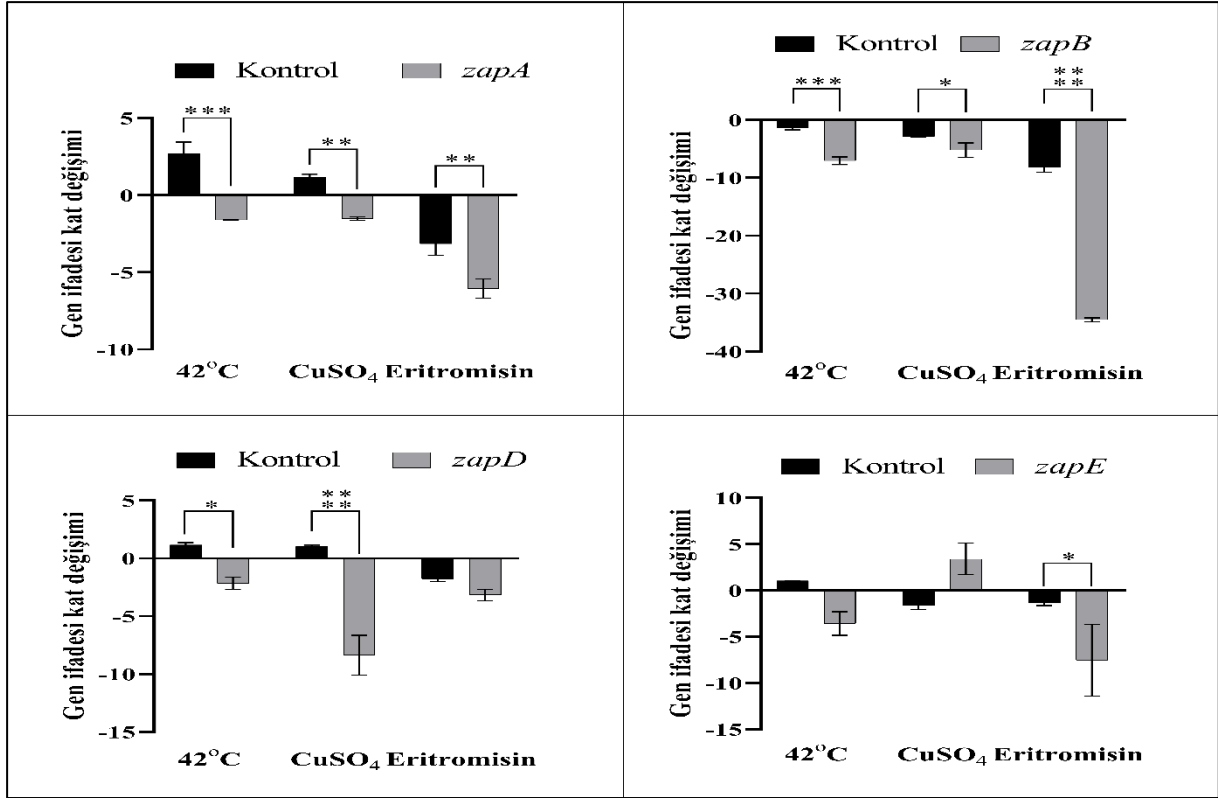
Kontrol grubu örneklerine kıyasla, sıcaklık, metal ve antibiyotik stresi varlığında VBNC hücrelerde *dicB* geni sırasıyla 3,25 kat, 1,75 kat ve 2,90 kat aşağı regüle edilmiştir. *dicC* geni ise sıcaklık stresinde 3,04 kat, antibiyotik stresinde 2,69 kat aşağı regüle edilmiş olup, metal stresi varlığında değişiklik göstermemiştir. *ymgF* geni, sıcaklık, metal ve antibiyotik streslerinde sırasıyla 1,76 kat, 2,02 kat ve 2,68 kat aşağı regüle edilmiştir. Benzer şekilde, *zapC* geni sıcaklık, metal ve antibiyotik stresi altında sırasıyla 2,34 kat, 2,30 kat ve 3,08 kat aşağı regüle edilmiştir. Bu sonuçlar, ilgili genlerin çeşitli stres koşullarına verdiği yanıtların benzer olduğunu ve bu genlerin VBNC durumdaki hücrelerde rollerini anlamak için önemli veriler sunduğunu göstermektedir. Bu sebeple, bu genlerin aşırı eksprese edildiği rekombinant suşlar, transformasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra, aşırı eksprese edilen bu rekombinant hücrelerde, aynı stres şartlarında VBNC durumunun incelenmesi gerçekleştirilmiştir.



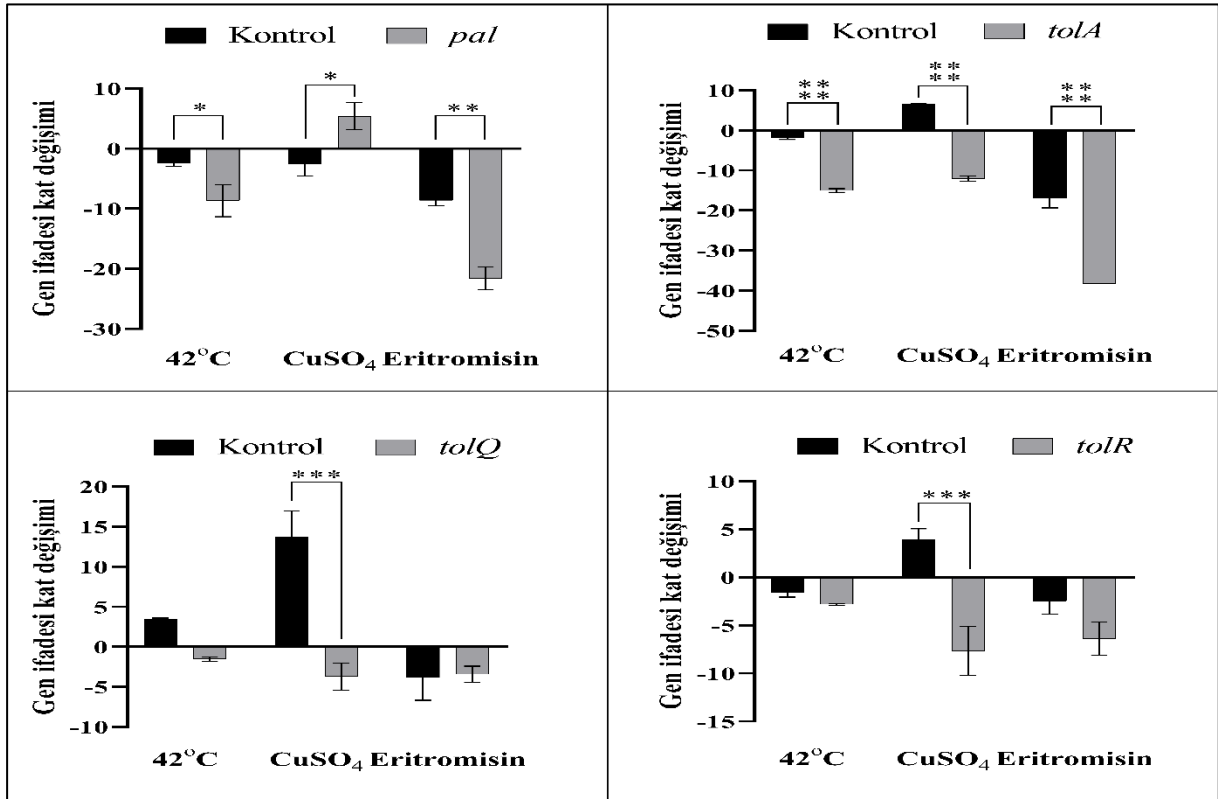
Şekil 4.12. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



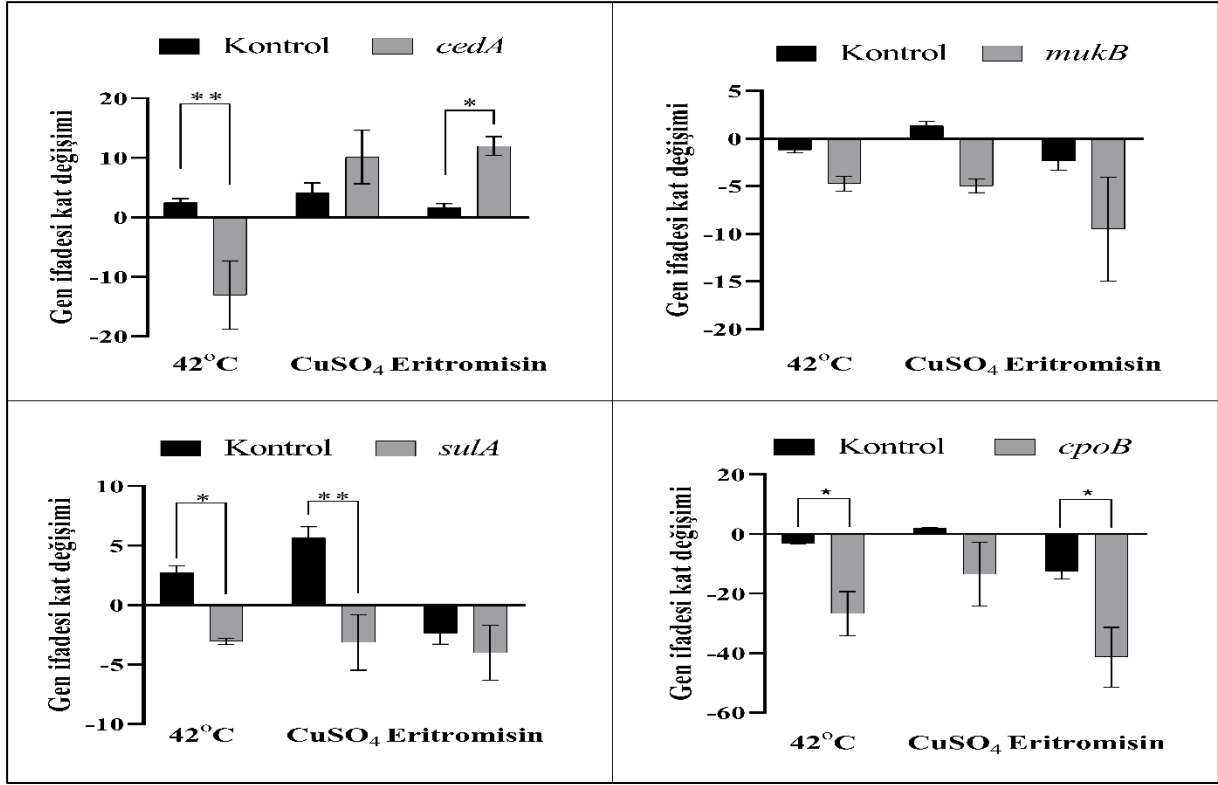
Şekil 4.13. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *envZ*, *ompR*, *ompC* ve *ompF* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



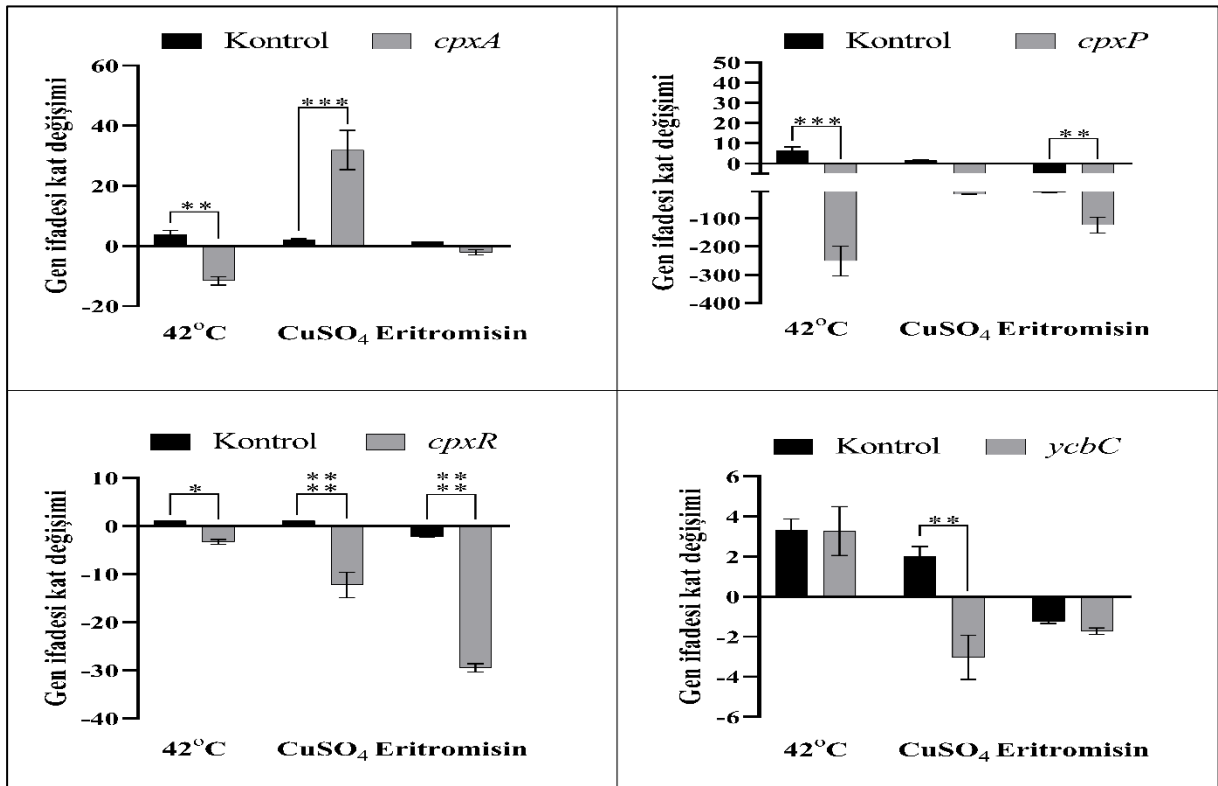
Şekil 4.14. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *zapA*, *zapB*, *zapD* ve *zapE* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



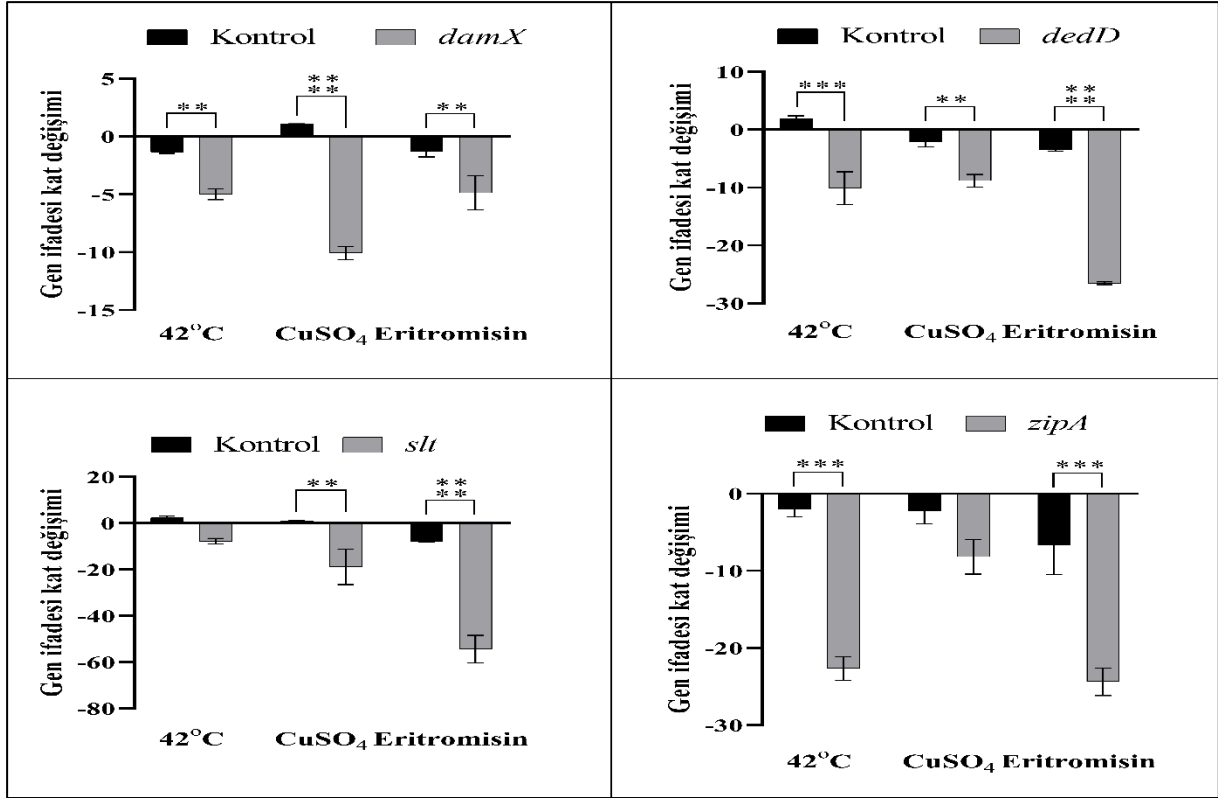
Şekil 4.15. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *pal*, *tolA*, *tolQ* ve *tolR* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



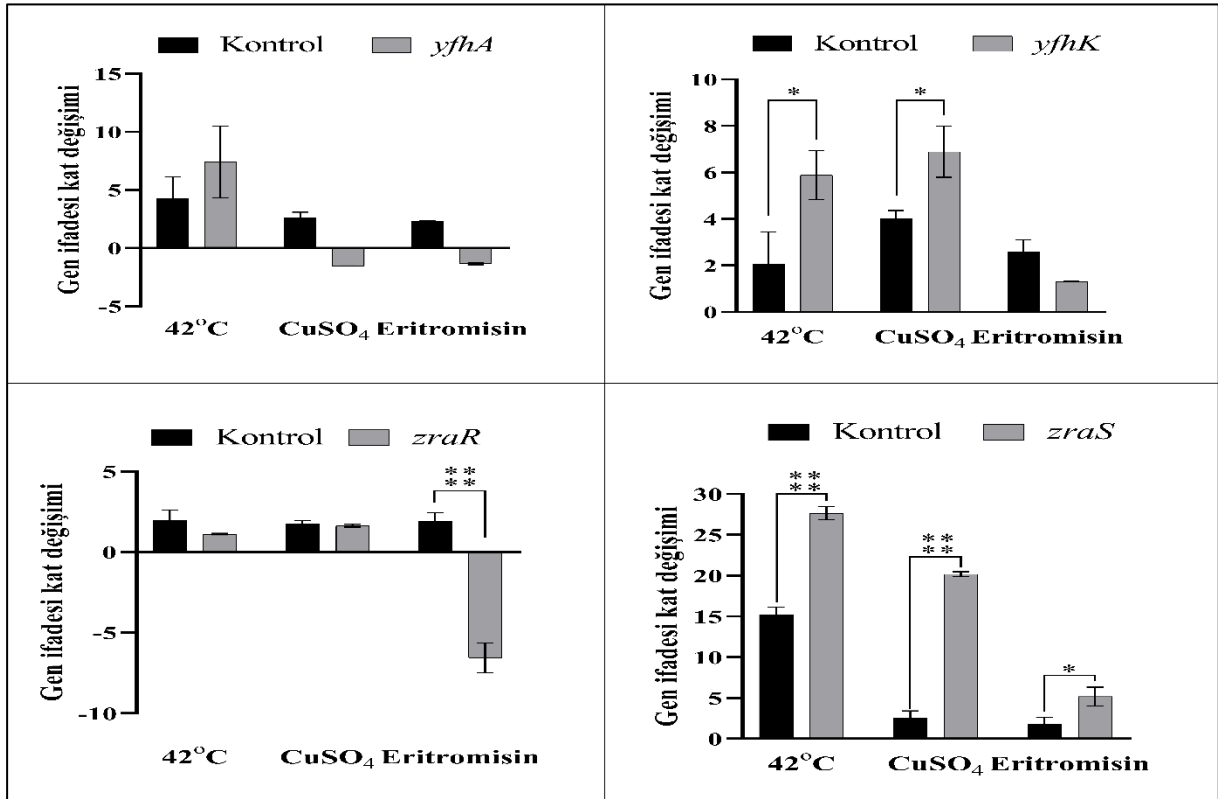
Şekil 4.16. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *cedA*, *mukB*, *sulA* ve *cpoB* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



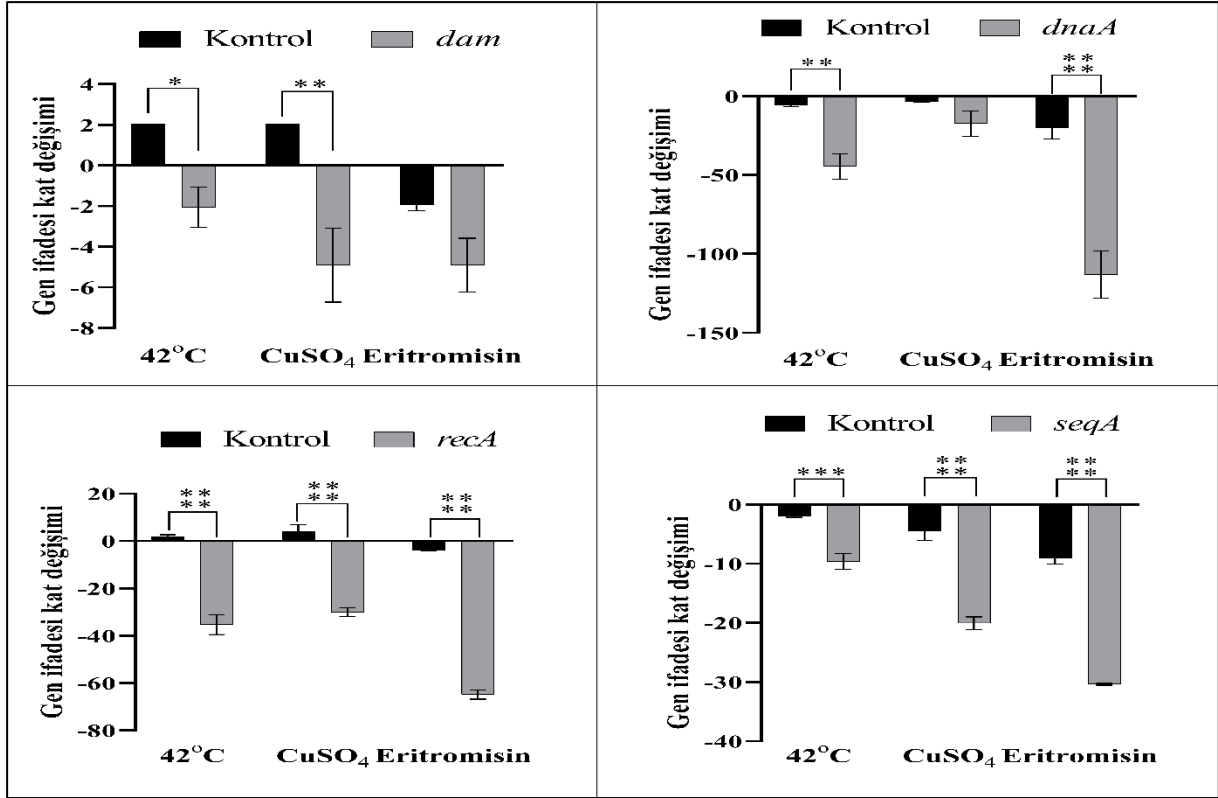
Şekil 4.17. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *cpxA*, *cpxP*, *cpxR* ve *ybcC* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



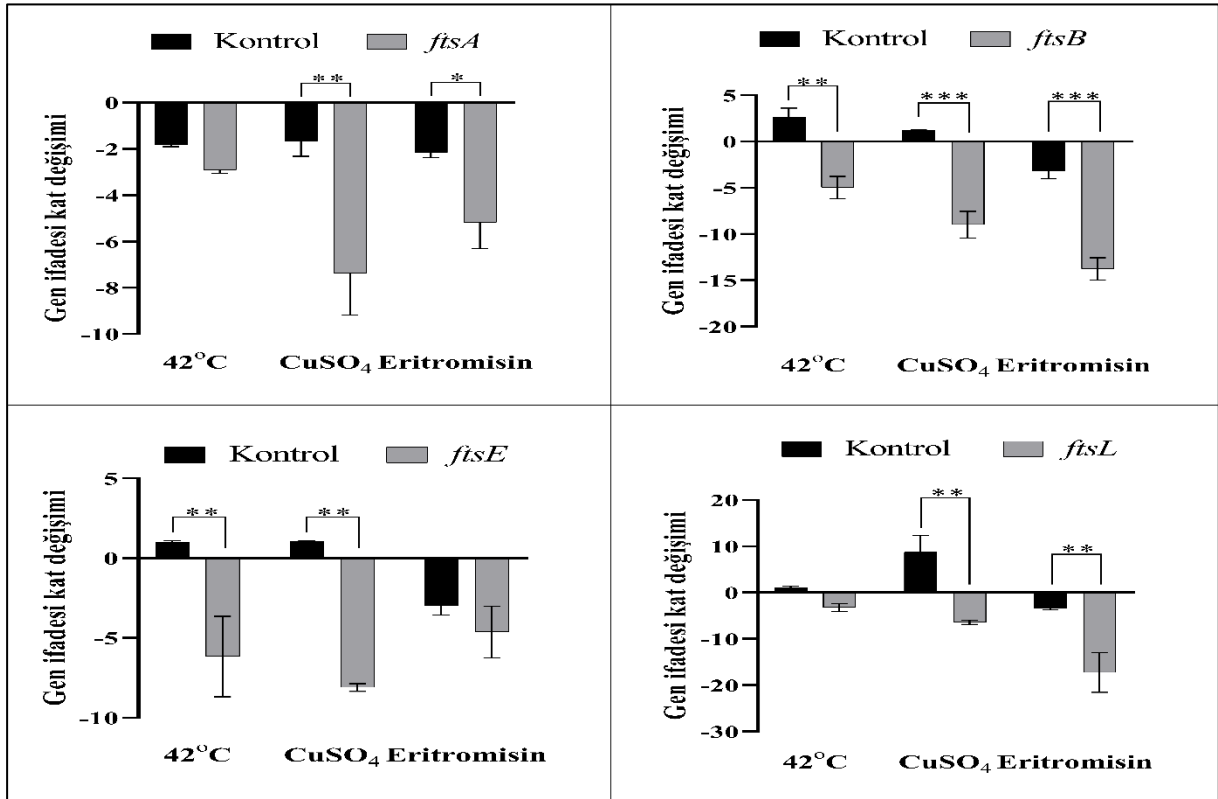
Şekil 4.18. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *damX*, *dedD*, *slt* ve *zipA* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



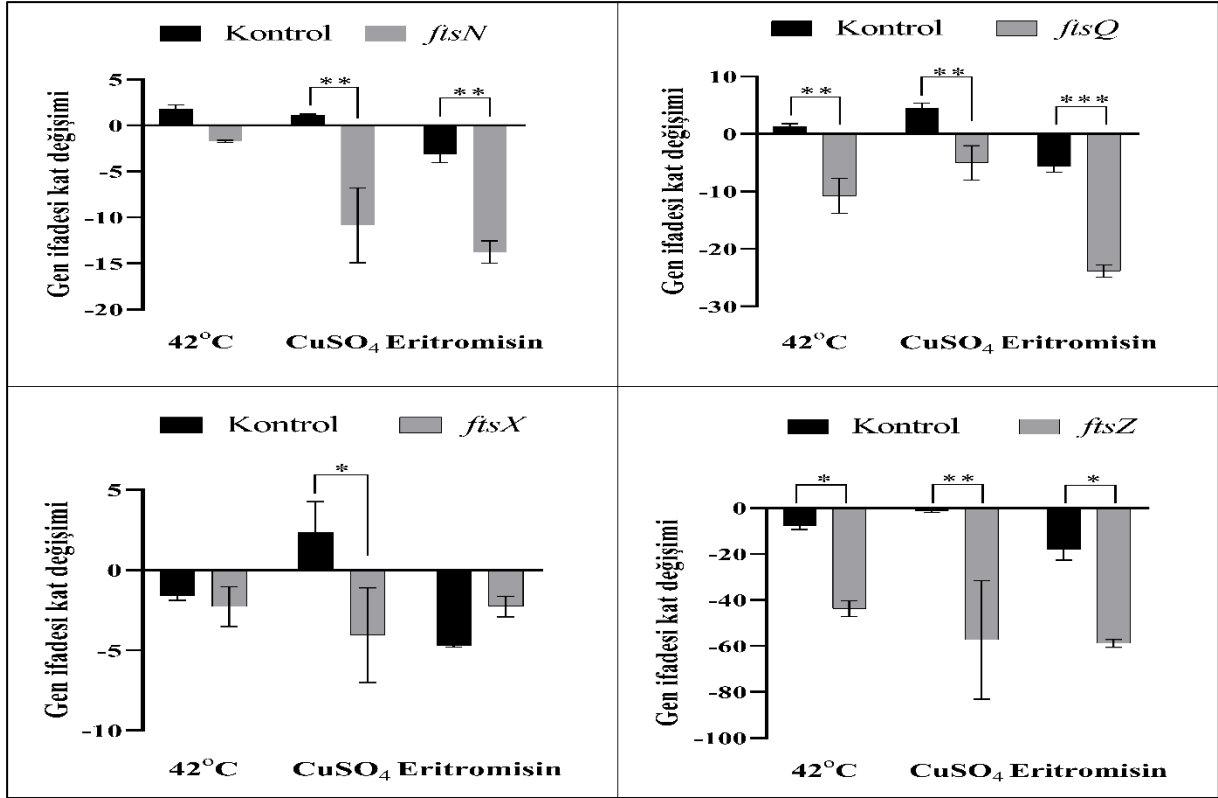
Şekil 4.19. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *yfhA*, *yfhK*, *zraS* ve *zraR* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



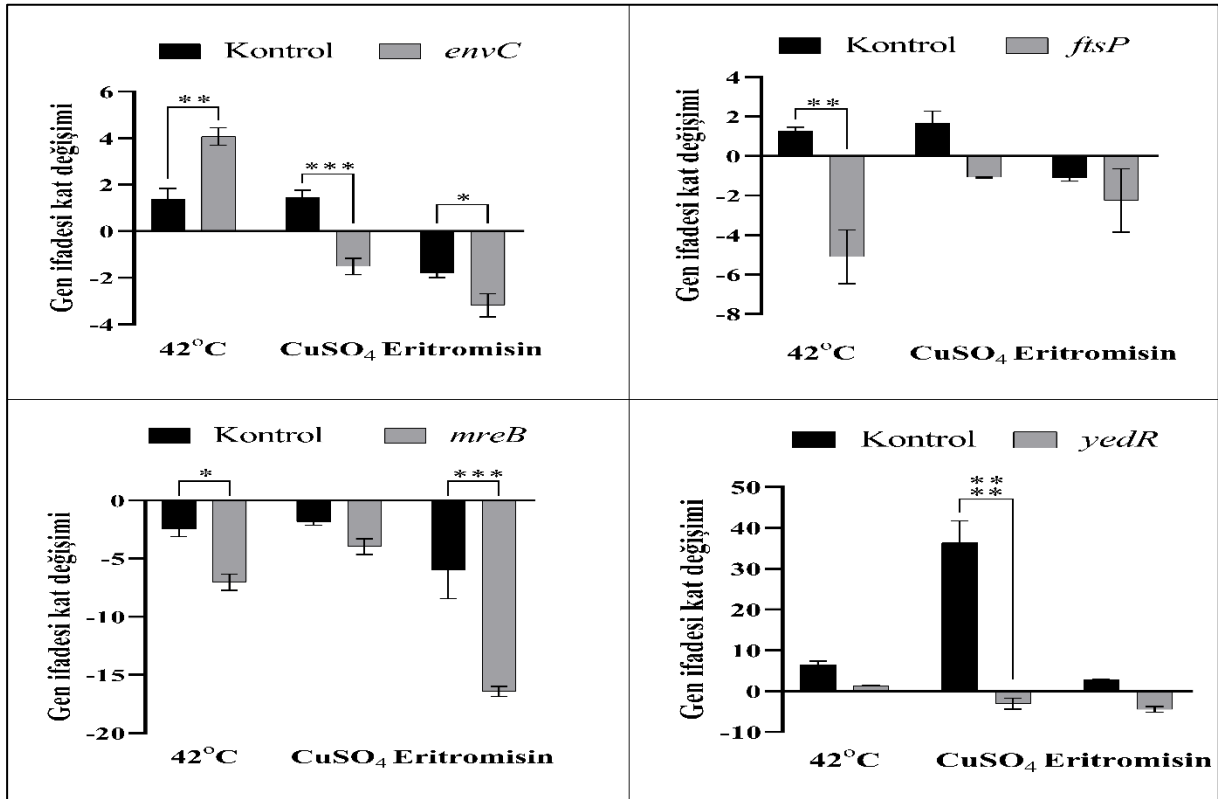
Şekil 4.20. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *dam*, *dnaA*, *recA* ve *seqA* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



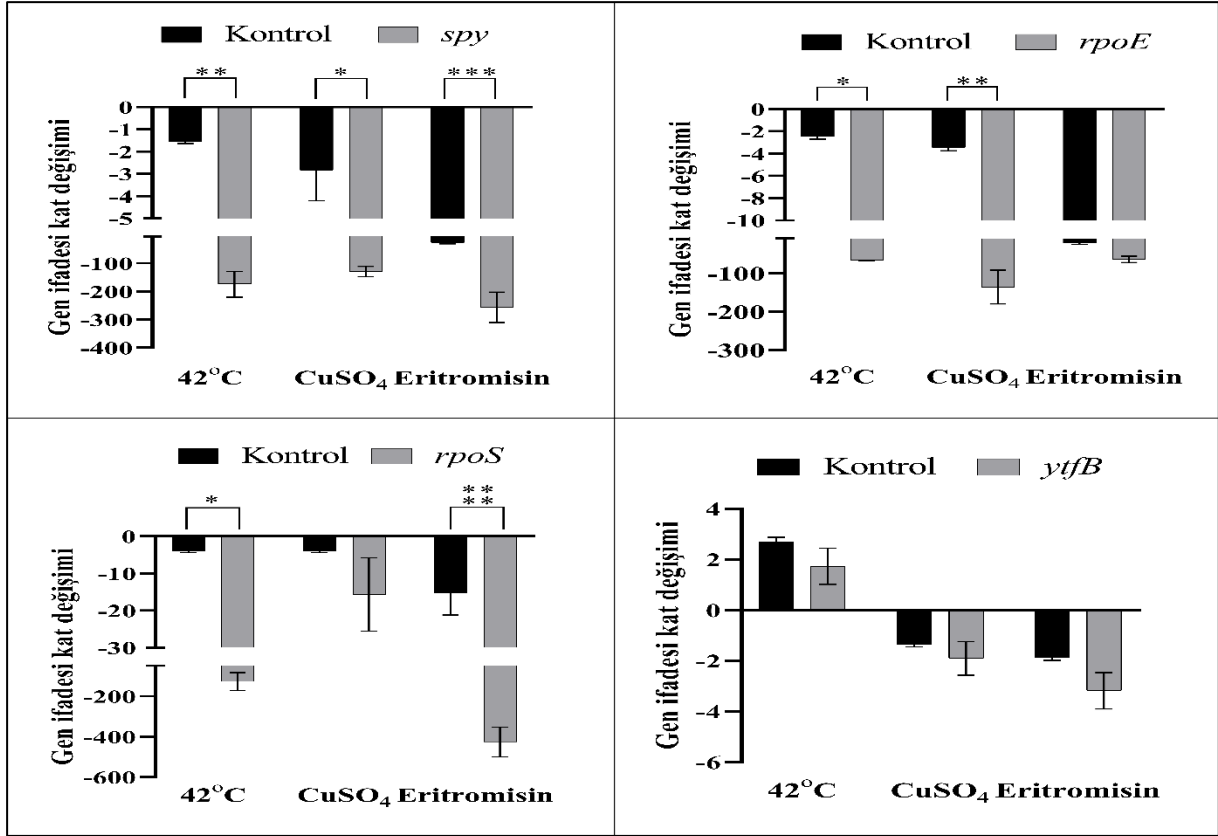
Şekil 4.21. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *ftsA*, *ftsB*, *ftsE* ve *ftsL* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



Şekil 4.22. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *ftsN*, *ftsQ*, *ftsX* ve *ftsZ* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



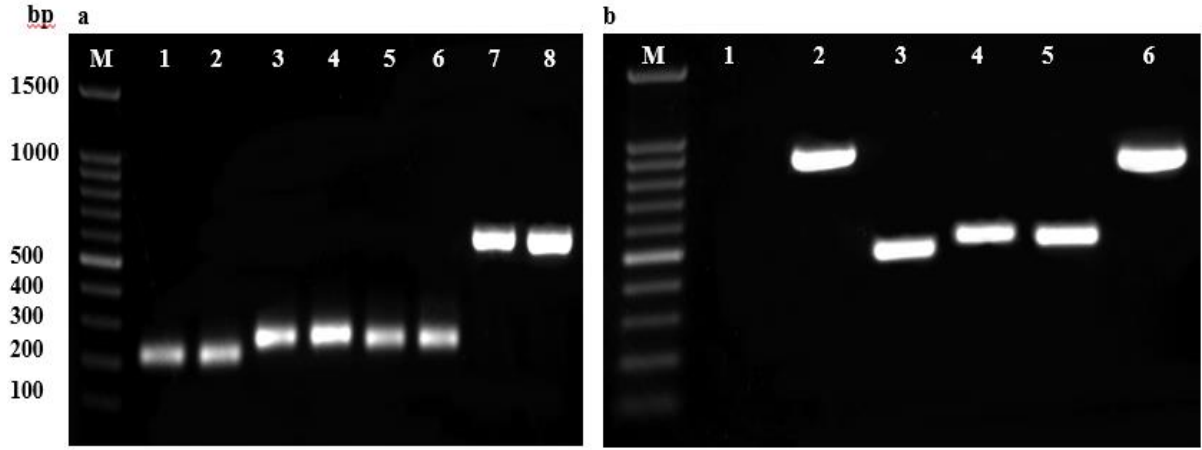
Şekil 4.23. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *envC*, *ftsP*, *mreB* ve *yedR* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri



Şekil 4.24. VBNC Duruma İndüklenen *E. coli* Hücrelerinde *spy*, *rpoE*, *rpoS* ve *ytfB* Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri

4.6. Aşırı Ekspresyon Plazmidleri Barındıran Rekombinant Bakteri Suşlarının Elde Edilmesi

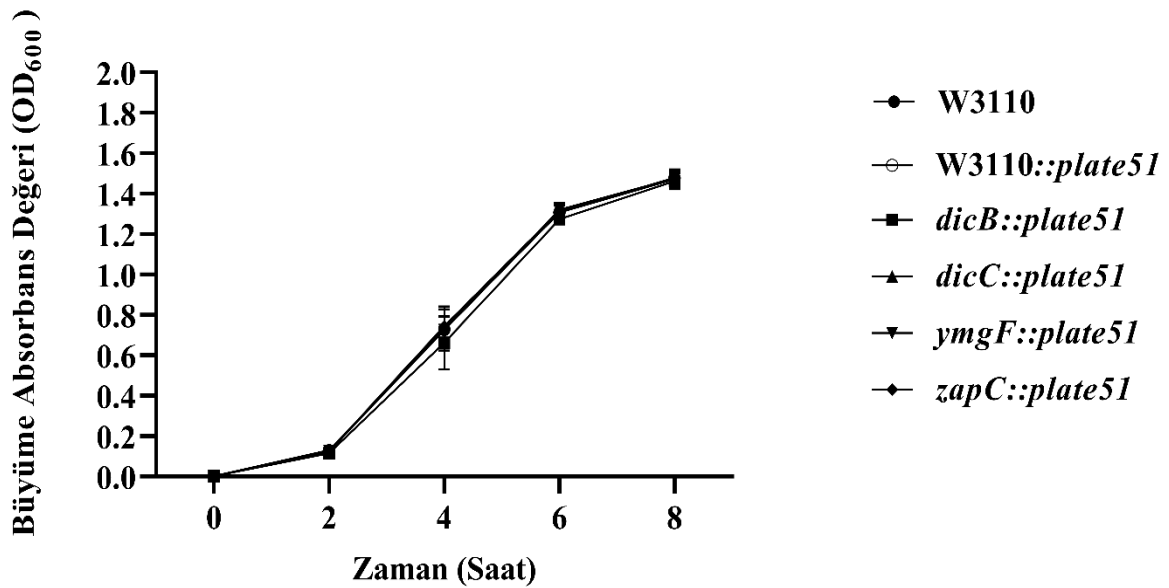
VBNC duruma giren hücrelerle ve kontrol grubu hücreleriyle yapılan Real-Time PCR analizleri sonucunda azalış gösteren genler belirlenmiştir. Bu genlerle aynı stres koşullarında tekrar yaşam deneyleri yapmak için, her bir genin aşırı eksprese edileceği rekombinant suşlar, transformasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Her bir genin, plate51 vektörüne klonlanarak oluşturulan rekombinant suşları, kendilerine özgü forward ve reverse primerleri kullanılarak PCR ile doğrulanmıştır. Elde edilen rekombinant suşlardan *dicB* 189 bp, *dicC* 231 bp, *ymgF* 219 bp ve *zapC*'nin 543 bp bant uzunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca rekombinant suşların doğruluğu plazmide özgü primerler kullanılarak da sağlanmıştır. Bu doğrulama sürecinde ise *dicB* 455 bp, *dicC* 497 bp, *ymgF* 485 bp ve *zapC*'nin 809 bp bant uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada plazmidin hücreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için, yabancı tip *E. coli* W3110'a, kitin içerisinde bulunan kontrol plazmidi de transforme edilmiştir. Elde edilen tüm rekombinant suşlar Şekil 4.25 de verilmiştir.



Şekil 4.25. Aşırı Ekspresyon Plazmidleri Barındıran *E. coli* W3110 Rekombinant Bakteri Suşları a. Hedef Genlere Spesifik Primerler (M: Marker, 1.W3110 *dicB*, 2. *plate51::dicB*, 3. W3110 *dicC*, 4. *plate51::dicC*, 5. W3110 *ymgF*, 6. *plate51::ymgF*, 7.W3110 *zapC*, 8.*plate51::zapC*), b. Plate51 Plazmidine Spesifik Primer Sonuçları (M: Marker, 1. W3110, 2. W3110 Vektör, 3. *plate51::dicB*, 4. *plate51::dicC*, 5. *plate51::ymgF*, 6. *plate51::zapC*)

4.7. Çalışmada Kullanılan Yabani Tip *E. coli* W3110 ve Rekombinant Suşlarının Büyüme Deneyleri

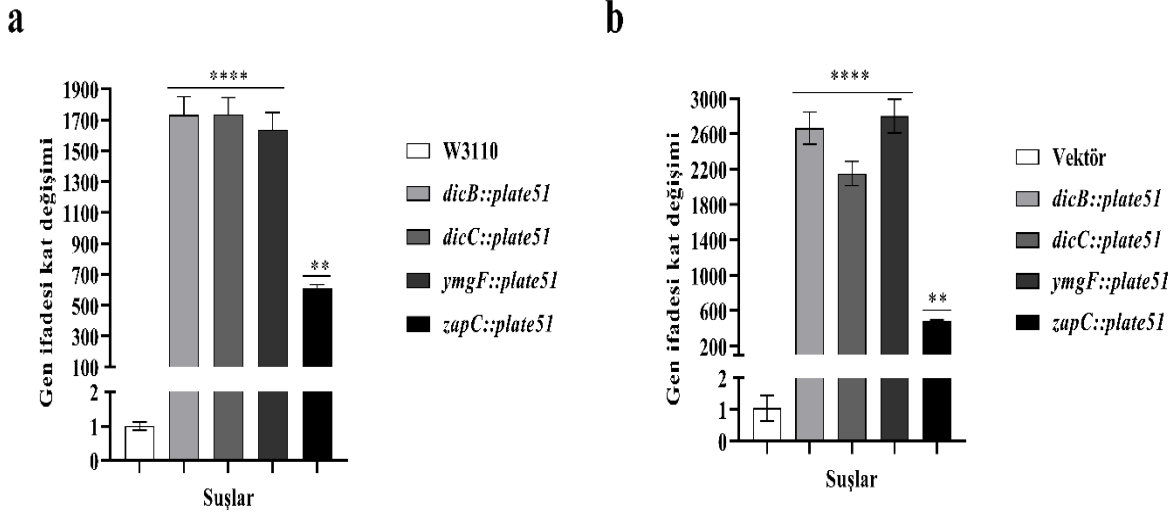
Bölünme ile ilişkili genlerin rekombinant hücrelerinde büyüme ile ilişkili bir farklılığın olup olmadığı gerçekleştirilen büyüme deneyleri ile tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda tüm rekombinant hücrelerin yabani tip *E. coli* W3110 ile benzer bir büyüme gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Rekombinant Hücrelerin Büyüme Grafiği

4.8. Yabani Tip *E. coli* W3110 ve Rekombinant Suşların Real Time PCR ile Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılmak üzere yapılan DicB, DicC, YmgF ve ZapC rekombinant suşların doğruluğu Real Time PCR ile analiz edilmiştir. LB broth ortamında IPTG varlığında indüklenen aşırı eksprese genlerin Real Time PCR ile gerçekleştirilen analizlerinde tüm rekombinant suşların yabani tip ve boş vektör içeren suşa göre aşırı eksprese edildiği gözlenmiştir.

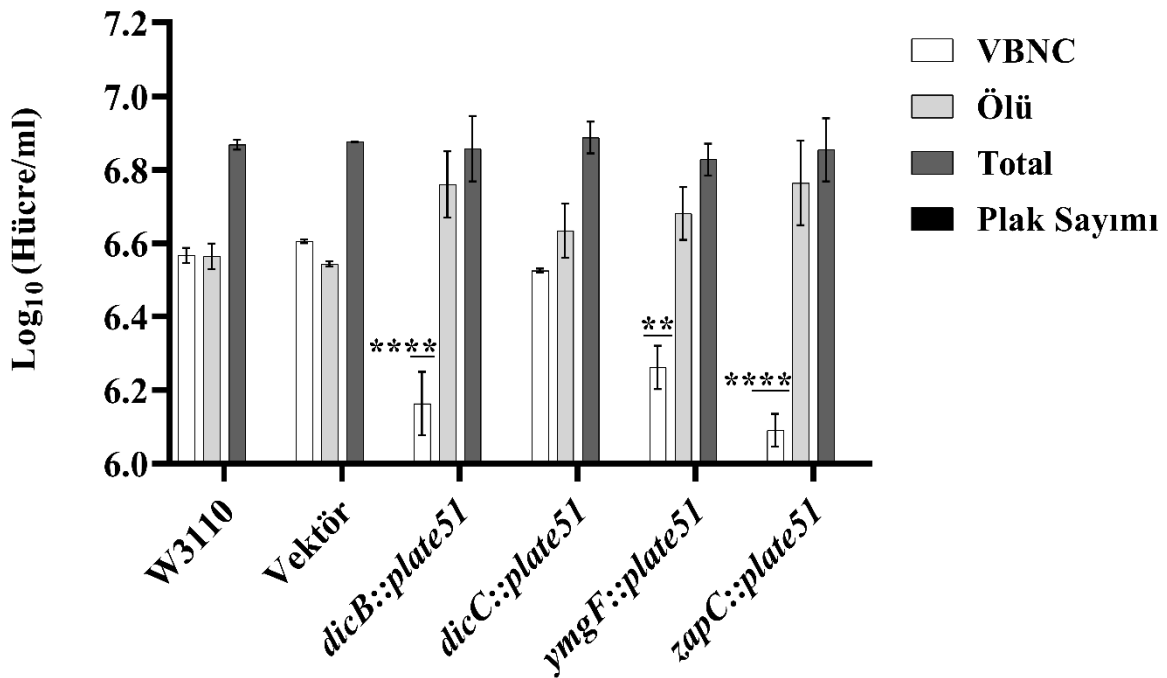


Şekil 4.27. DicA, DicC, YmgF ve ZapC Rekombinant Suşlarında Yabani Tip *E. coli* ve Boş Vektöre Göre *dicA*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* Gen Ekspresyon Seviyelerinin qPCR ile Tespiti. Anlamlılık Derecesi $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtildi. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi.

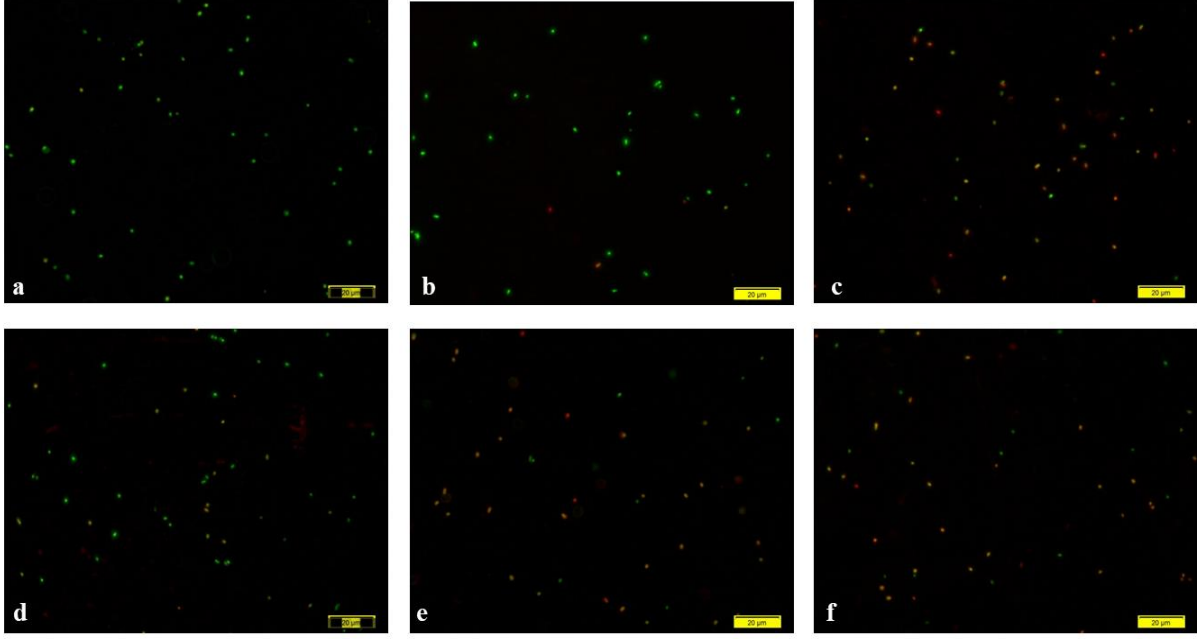
4.9. Sıcaklık, Metal ve Antibiyotik Stresi Altında *E. coli* DicB, DicC, YmgF ve ZapC Rekombinant Suşlarının VBNC Hücre Oluşumu Üzerine Etkileri

Yabani tip *E. coli* W3110, boş vektör içeren *E. coli* W3110 (Vektör), DicB, DicC, YmgF ve ZapC suşları ile üç farklı stres şartında yaşam deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılıkları petri plak sayımları ve Live/Dead BacLight bakteriyel canlılık kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm suşların başlangıç değeri yaklaşık 7.0 log olarak ayarlanmıştır. Sıcaklık stresi altında tüm suşların plak sayısı 6. günde sıfırlanırken, aynı zamanda yapılan floresan mikroskop sayımlarında yabani tip *E. coli* W3110, vektör ve DicC rekombinant suşunun yaklaşık 6.5 log VBNC hücre sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca rekombinant suşlardan DicB'nin 6.1 log, YmgF'nin 6.2 log ve ZapC'nin 6.0 log VBNC hücre sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. DicB, YmgF ve ZapC rekombinant suşlarında VBNC hücre sayısı azalmış ve suşların VBNC duruma girmek yerine öldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.28, Şekil 4.29). Bakır metali varlığında gerçekleştirilen yaşam deneylerinde ise 8.

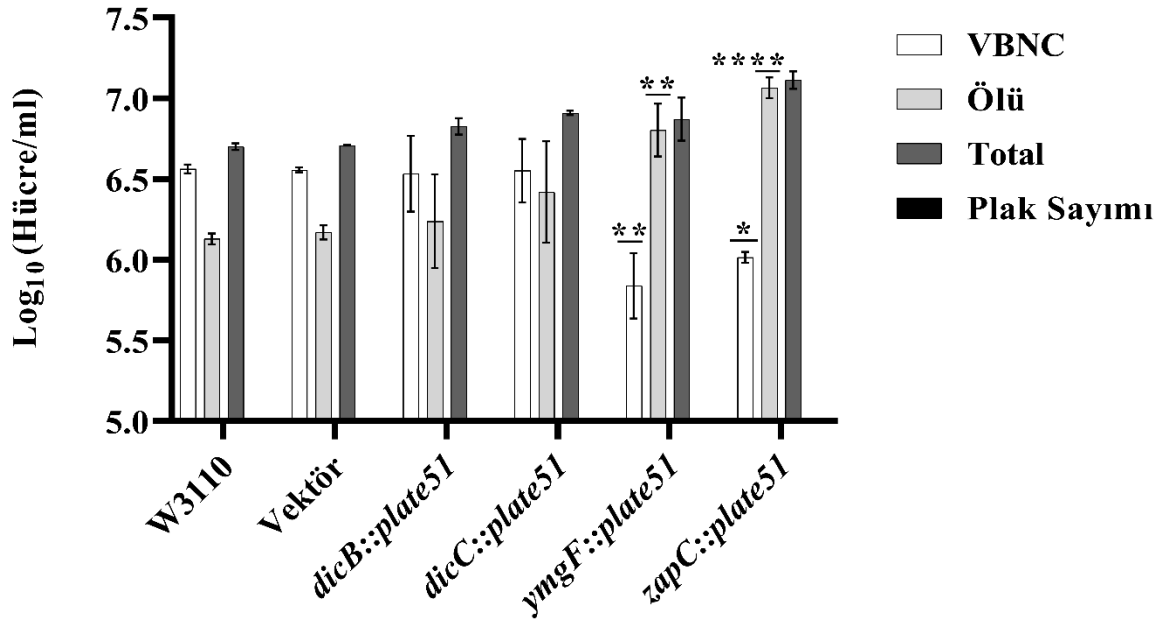
günün sonunda plak sayısı sıfırlanırken, aynı zaman diliminde yapılan floresan mikroskop sayımları yabancı tip *E. coli*, vektör, DicB ve DicC rekombinant suşunun yaklaşık 6.5 log VBNC hücre sayısına sahip olduğu ancak YmgF ve ZapC rekombinant suşlarının ise sırasıyla 5,8 log ve 6.1 log VBNC hücre sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant suşlarda yabancı tipe göre VBNC hücre sayısının azaldığı ve hücrelerin öldüğü tespit edilmiştir. Yabancı tip *E. coli*, vektör, DicB ve DicC yaklaşık 6.2 log ölü hücreye sahipken, YmgF 6,8 log ve ZapC 7 log ölü hücre içermektedir (Şekil 4.30, Şekil 4.31). Eritromisin antibiyotiği varlığında gerçekleştirilen yaşam deneylerinde ise 40. günün sonunda plak sayısı sıfırlanırken, aynı zaman diliminde yapılan floresan mikroskop sayımlarında yabancı tip *E. coli*, vektör, DicB, DicC ve YmgF rekombinant suşunun yaklaşık 6.7 log VBNC hücre sayısına ve yaklaşık 5.9 log ölü hücre sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında ZapC rekombinant suşunun ise 6.5 log VBNC hücre ve 6.1 log ölü hücre sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. ZapC rekombinant suşlarda yabancı tip hücrelere kıyasla VBNC hücre sayısının azaldığı ve hücrelerin öldüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.32, Şekil 4.33).



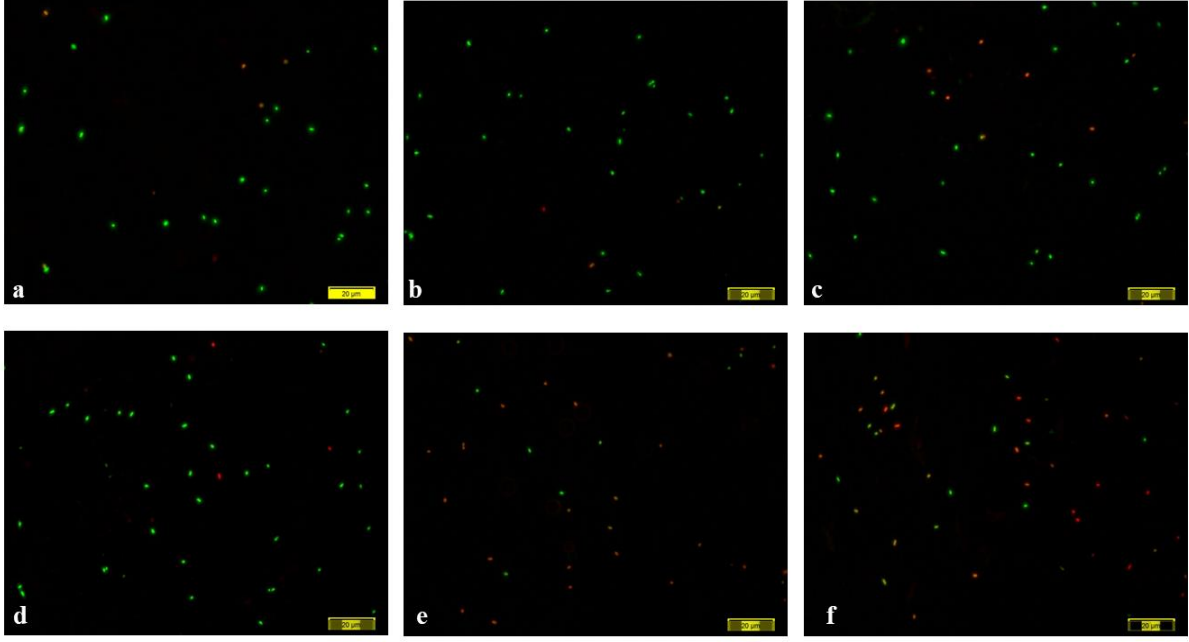
Şekil 4.28. Sıcaklık (42°C) Stresi Varlığında 6. Gün Yabancı Tip *E. coli*, Vektör ve Rekombinant Suşlarla Gerçekleştirilen Yaşam Deneyi Sonuçları. Anlamlılık Derecesi $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi.



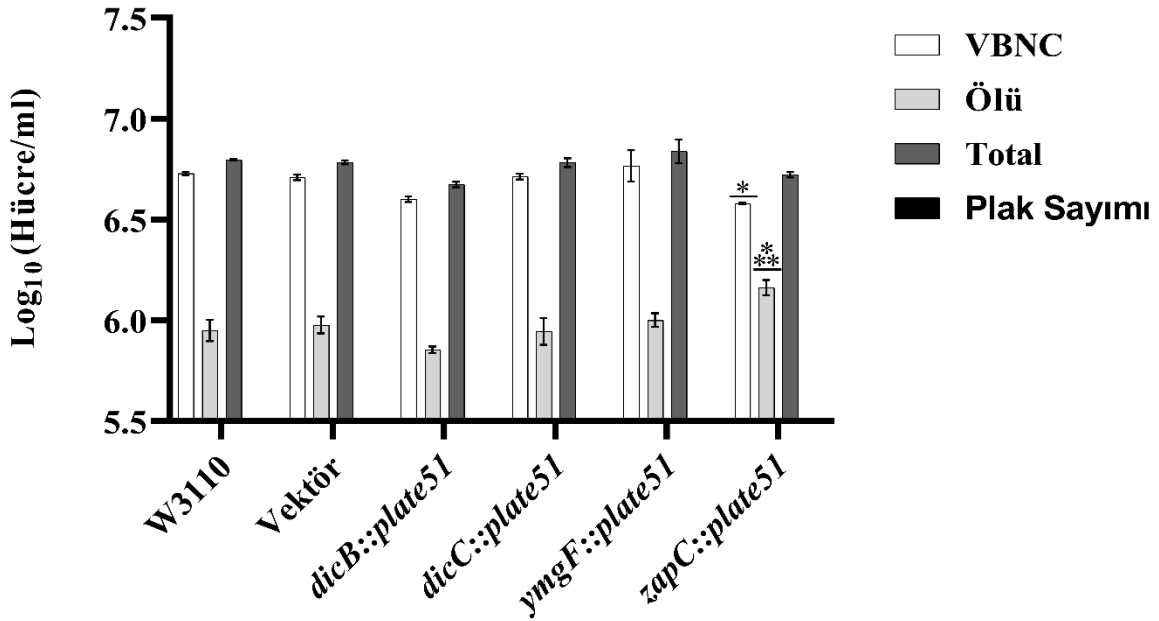
Şekil 4.29. Sıcaklık (42 °C) Stresi Varlığında 6. Gün Yabani Tip ve Rekombinant Hücrelerin Floresan Mikroskop Altında VBNC Durumun Görüntüleri. Canlı (Yeşil) ve Ölü Hücreleri (Kırmızı) Ayırt Etmek için Hücreler Live/Dead BacLight Kit ile Boyandı. (a) Yabani Tip *E. coli* W3110, (b) Boş Vektör, (c) DicB (d) DicC, (e) YmgF ve (f) ZapC. Ölçek Çubuğu 20 µm'yi Temsil Eder.



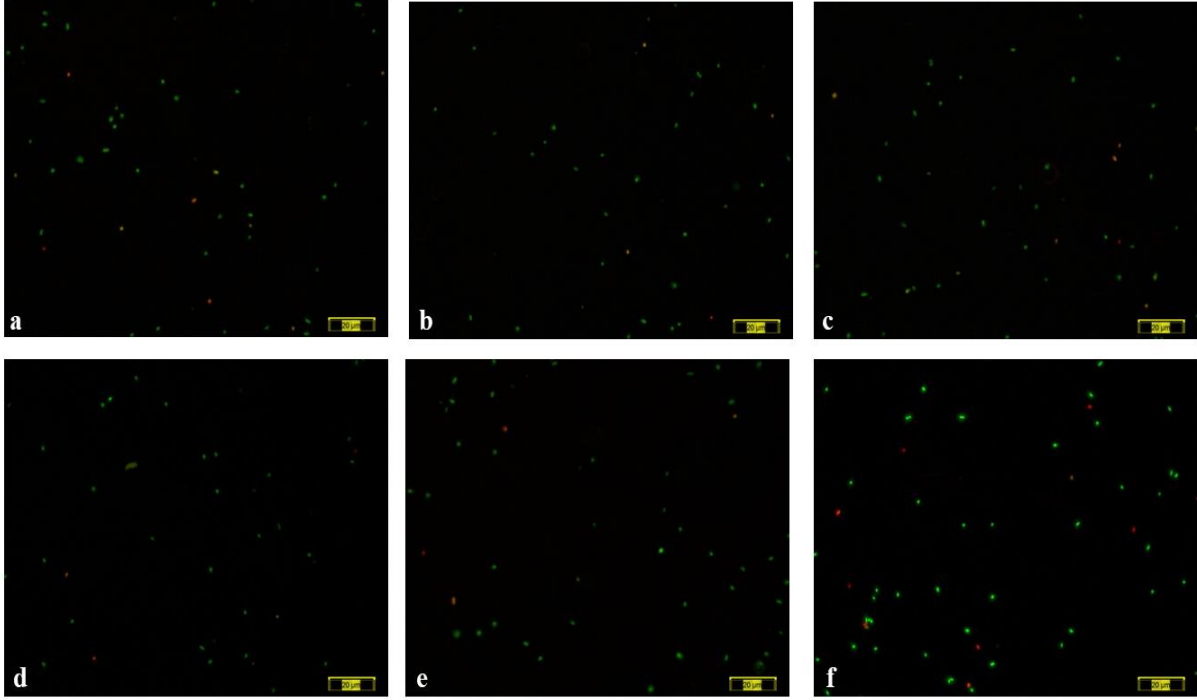
Şekil 4.30. Metal (CuSO_4) Stresi Varlığında 8. Gün Yabani Tip *E. coli*, Vektör ve Rekombinant Suşlarla Gerçekleştirilen Yaşam Deneyi Sonuçları. Anlamlılık Derecesi $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtildi. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi.



Şekil 4.31. Metal (CuSO_4) Stresi Varlığında 8. Gün Yabani Tip ve Rekombinant Hücrelerin Floresan Mikroskop Altında VBNC Durumunun Görüntüleri. Canlı (Yeşil) ve Ölü Hücreleri (Kırmızı) Ayırt Etmek için Hücreler Live/Dead BacLight Kit ile Boyandı. (a) Yabani Tip *E. coli* W3110, (b) Boş Vektör, (c) DicB (d) DicC, (e) YmgF ve (f) ZapC. Ölçek Çubuğu 20 μm 'yi Temsil Eder.



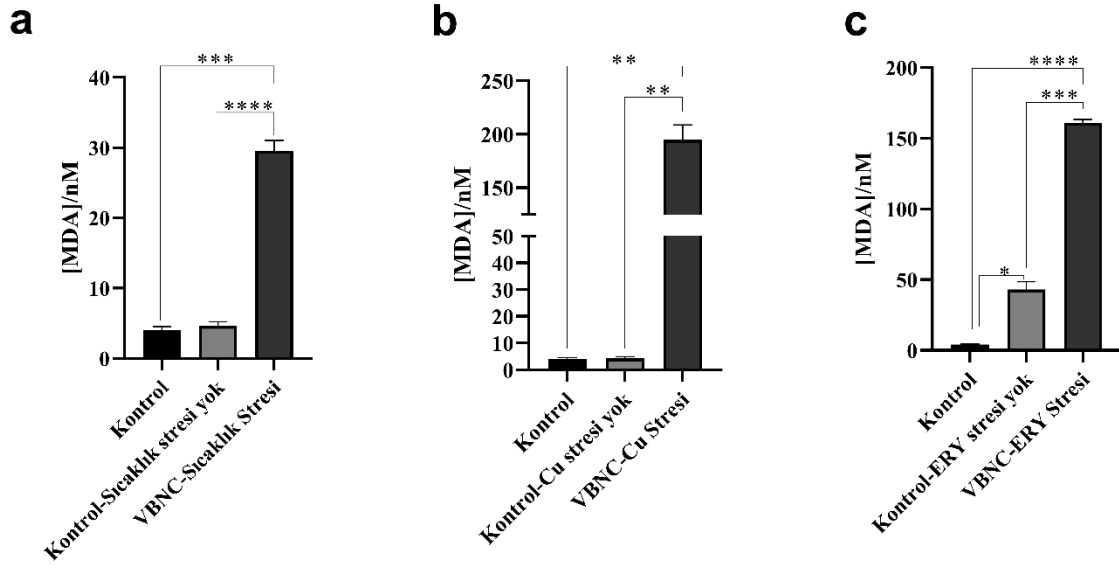
Şekil 4.32. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında 40. Gün Yabani Tip *E. coli*, Vektör ve Rekombinant Suşlarla Gerçekleştirilen Yaşam Deneyi Sonuçları. Anlamlılık Derecesi $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, $P < 0,0001$ ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama \pm Ortalamasının Standart Hatası Olarak İfade Edildi.



Şekil 4.33. Antibiyotik (Eritromisin) Stresi Varlığında 40. Gün Yabani Tip ve Rekombinant Hücrelerin Floresan Mikroskop Altında VBNC Durumun Görüntüleri. Canlı (Yeşil) ve Ölü Hücreleri (Kırmızı) Ayırt Etmek için Hücreler Live/Dead BacLight Kit ile Boyandı. (a) Yabani Tip *E. coli* W3110, (b) Boş Vektör, (c) DicB (d) DicC, (e) YmgF ve (f) ZapC. Ölçek Çubuğu 20 µm'yi Temsil Eder.

4.10. Lipit Peroksidasyonu

Mikroorganizmaların VBNC duruma geçişi, çeşitli stres faktörlerinin etkisi altında hücre lipid yapılarında ve miktarlarında değişikliklere neden olabilmektedir. Bu çalışmada, farklı stres koşulları altında VBNC durumuna indüklenen hücrelerde malondialdehit (MDA) miktarları TBARS testi kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar, üç farklı stres altında VBNC duruma indüklenen hücreler, kontrol grubu hücrelerine kıyasla daha yüksek seviyelerde lipid peroksidasyonu göstermiştir. Sıcaklık stresi ile VBNC duruma indüklenen hücrelerde 30 nmol, metal stresi varlığında 195 nmol ve antibiyotik stresi varlığında ise 160 nmol MDA miktarı ölçülmüştür. Özellikle bakır ve antibiyotik stresinin, sıcaklık stresine kıyasla peroksidasyonda daha büyük bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.34).

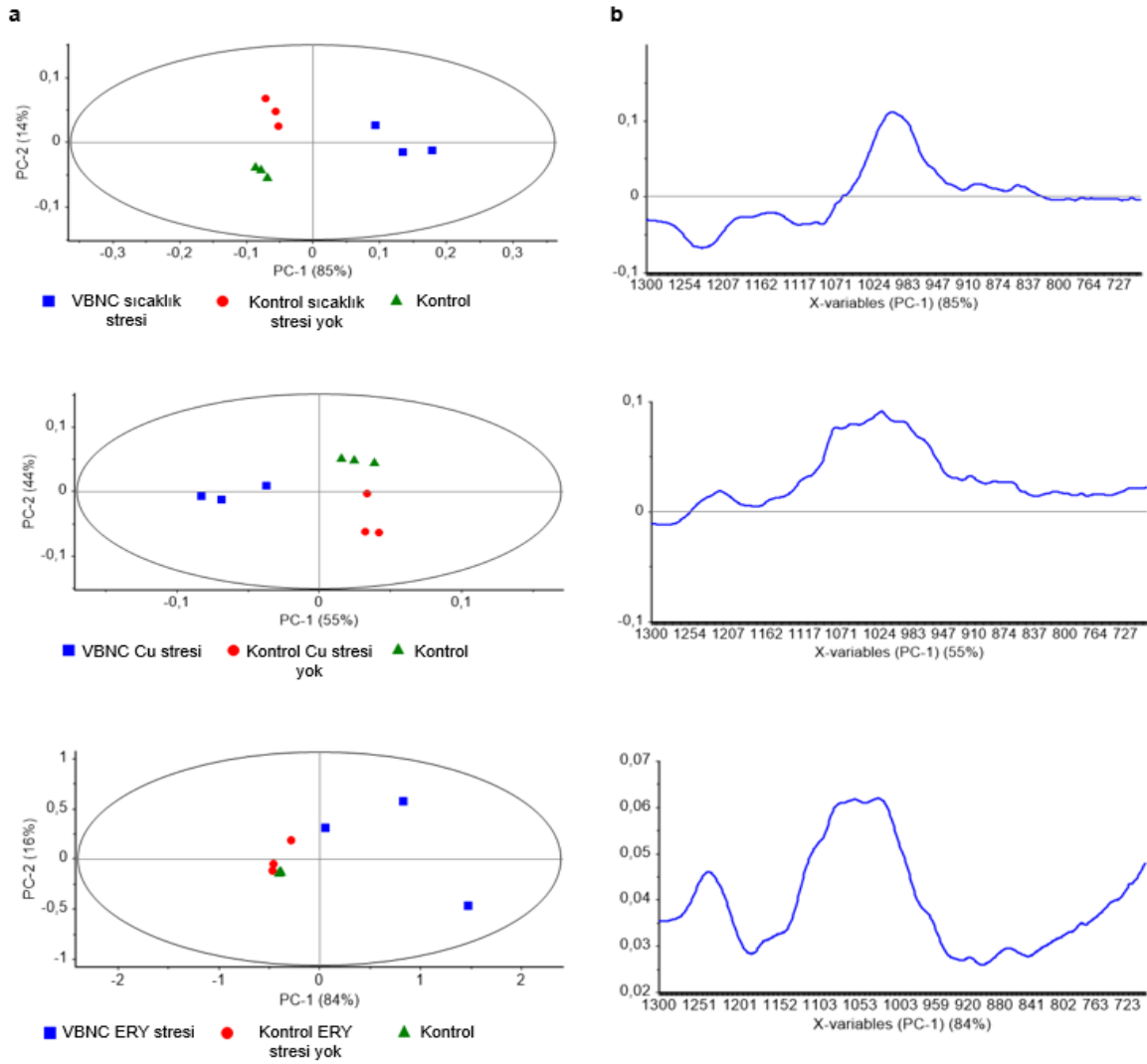


Şekil 4.34. Farklı Stres Koşulları Altında VBNC Duruma İndüklenmiş *E. coli* Hücrelerinde Lipit Peroksidasyon (Malondialdehit/MDA) Seviyeleri. (a) Sıcaklık (42 °C), (b) Metal (CuSO₄) ve (c) Antibiyotik (Eritromisin). Anlamlılık Derecesi P < 0,05 *, P < 0,01 **, P < 0,001 ***, P < 0,0001 ****'den Küçük veya Ona Eşit Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama ± Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi.

4.11. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

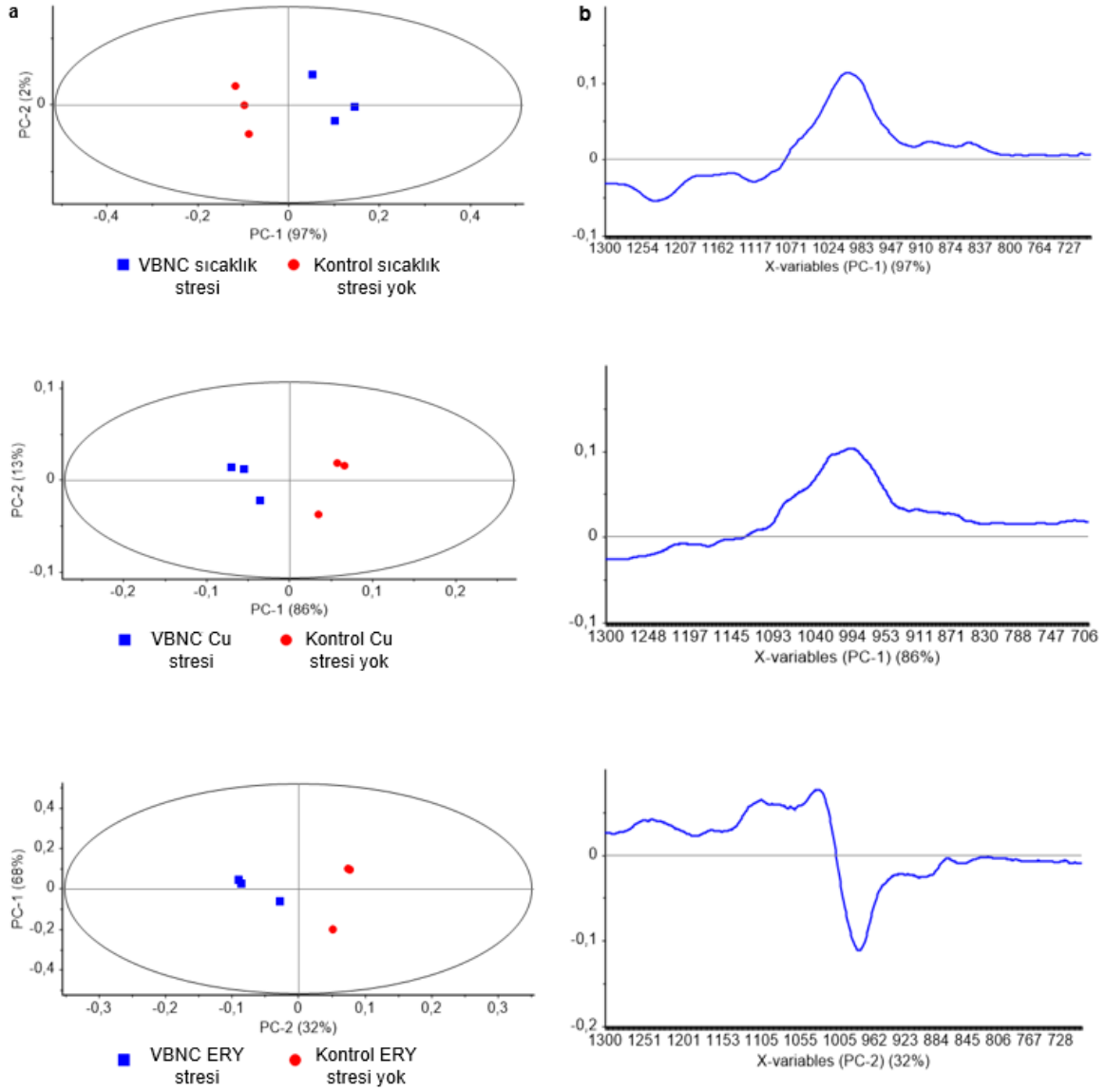
4.11.1. Kalitatif Kemometrik Bulgular

Çalışmanın bir diğer amacı da *E. coli* W3110'da sıcaklık, metal (CuSO₄) ve antibiyotik (eritromisin) gibi çeşitli stres faktörlerinin neden olduğu VBNC durum sırasında IR spektroskopisi yoluyla biyomoleküler modülasyonları ortaya çıkarmaktır. Bu nedenle, ham IR spektral verileri uygun şekilde dönüştürülmüştür. Daha sonra, spektrokimyasal bantlarda kemometrik veri madenciliği tekniği ve temel bileşenler analizi (PCA) kullanılarak, bakteriyel biyomoleküllerde etkilenen önemli fonksiyonel grupların kritik spektral konumlarını belirlemek amacıyla analizler yapılmıştır. Genel kemometrik değerlendirmeler sırasında; VBNC bakteriler deneysel ve bağımsız kontrollerden farklılaşmıştır ve bu olay tüm stres faktörlerinde aynıdır (Şekil 4.35). VBNC bakterilerinin (puan grafiklerinde mavi kareler olarak gösterilen) kontrol bakterilerinden farklılaşma yüzdeleri, puan grafiklerinin PC-1 ekseninde %55-85 aralığında ortaya çıkmıştır. Bağımsız kontroller ve deneysel kontroller de PC-2 düzleminde %14-44 aralığında birbirlerinden ayrılmıştır (Şekil 4.35a, sol panel). Genel bir kural olarak PC-1 ve PC-2, küçük değişikliklerin değerlendirilmesi sırasında dikkate alınan diğer PC'lerin aksine, büyük değişikliklerin değerlendirilmesi sırasında incelenen ana temel bileşenlerdir. Yükleme grafikleri, aynı eksen boyunca bu farklılaşmalardan sorumlu olan spektral değişikliklerin (ayırıcıların) yaklaşık konumlarını göstermiştir Şekil 4.35b, sağ panel).



Şekil 4.35. *E. coli*'deki VBNC Durumuyla İlişkili Biyomoleküler Olayları Gösteren Temel Bileşen Analizi. 1300-700 cm^{-1} Spektral Aralığında Deneysel Kontrol ve Bağımsız Kontrol Numunelerinin Yanı Sıra Sıcaklık (42 °C), Metal (CuSO_4) ve Antibiyotik (Eritromisin) Streslerinin Neden Olduğu VBNC Durumu Gösterir. (A) Skorlar ve (B) Yükleme Grafikleri

Spektral ayırıcıların kesin konumlarını sağlamak için yeniden PCA analizi yapılmış; bu kez bağımsız kontrol bakterileri hariç VBNC ve deneysel kontrol bakterileri analize dahil edilmiştir (Şekil 4.36). Yapılan bu analiz sonucunda daha kesin sonuçlar ortaya çıkmıştır. VBNC durumdaki bakteriler, PC-1 düzlemleri boyunca sıcaklık ve bakır stresleri açısından sırasıyla %97 ve %86 ile deneysel kontrol bakterilerinden farklılaşmıştır. Öte yandan eritromisin kaynaklı VBNC hücrelerde en etkili farklılaşma PC-2 düzleminde %32 ile elde edilmiştir (Şekil 4.36a, sol panel). Yükleme grafiklerinin değerlendirilmesi, gözlemlenen farklılaşmanın arkasında duran spektral ayırıcıların kesin konumlarını ortaya çıkarmaktadır. Sıcaklık ve bakır stresleri için 995 cm^{-1} 'deki pozitif ayırıcı ve eritromisin için aynı spektral konumdaki negatif ayırıcı, *E. coli* W3110'daki VBNC ile ilişkili modülasyonu güçlü bir şekilde saptamıştır (Şekil 4.36b, sağ panel).



Şekil 4.36. *E. coli*'deki VBNC Durumuyla İlişkili Biyomoleküler Olayları Gösteren Temel Bileşen Analizi. 1300-700 cm⁻¹ Spektral Aralık İçindeki Deneysel Kontrol Örneklerinin Yanı Sıra Sıcaklık (42 °C), Metal (CuSO₄) ve Antibiyotik (Eritromisin) Streslerinin Neden Olduğu VBNC'yi Gösterir. (A) Skorlar ve (B) Yükleme Grafikleri

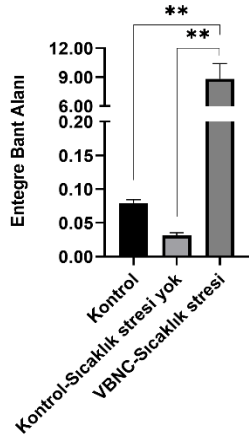
4.11.2. Kantitatif Spektrokimyasal Bulgular

VBNC ile ilgili modülasyonların kemometrik destekli araştırması, veri analizi bölümünde açıklanan bant entegrasyon yöntemi kullanılarak daha fazla niceliği belirlenen ana spektrokimyasal parametrelerin belirlenmesine yardımcı olmuştur. Doğrulama amacıyla kantitatif analizler ROC analizleriyle de desteklenmiştir. Yukarıda bildirildiği gibi, 995 cm⁻¹ spektral konumu civarında ortaya çıkan bandın VBNC durumuyla ilişkili ana spektrokimyasal işaretleyici olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, özellikle laboratuvar koşullarında, VBNC durumun hızlı takibinde potansiyel güvenilir bir biyobelirteç olarak kullanılabilir bu bandın

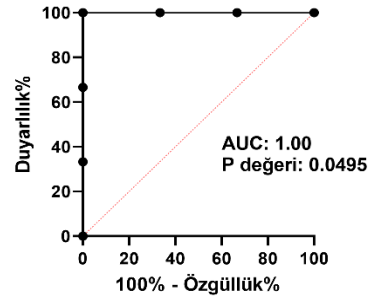
ölçülmesine ve doğrulanmasına odaklanmıştır. Literatüre göre 995 cm^{-1} 'de önerilen VBNC biyobelirteç bandı, C-O riboz, C-C titreşimleri ve RNA urasil halkalarının gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Ferreira vd., 2020). Genellikle bu bant biyolojik sistemlerde bulunan RNA moleküllerinden ortaya çıkmaktadır (Talari vd., 2017). Sonuçlar, 995 cm^{-1} pozisyonundaki RNA bandı konsantrasyonlarının hem bağımsız kontrol hem de deneysel kontrol grubu bakterileri ile karşılaştırıldığında, tüm stres koşulları altında VBNC durumdaki bakterilerde önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Sonuçların doğrulanması, tüm stres koşulları altında kayda değer AUC değerlerini (1.00) gösteren ROC eğrileri ile yapılmıştır; bu sonuç RNA bandının, laboratuvar şartları altında VBNC durum için güvenilir bir spektrokimyasal biyobelirteç olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Şekil 4.37).

VBNC ile ilişkili diğer biyomoleküler değişiklikler de ölçülmüştür. Sırasıyla toplam protein ve nükleik asit niceliklerini gösteren spektrokimyasal indeksler olan Amid toplamı ve PO_2 antisimetrik/Amid toplam bant alanı oranlarında önemli modülasyonlar meydana gelmiştir (Yonar vd., 2022). RNA konsantrasyonlarındaki önemli artışa rağmen; VBNC durumdaki bakterilerde, bakır stresi koşulları dışında, sıcaklık ve eritromisin stresi altında protein (Şekil 4.38 a-c) ve nükleik asit (Şekil 4.38 d-f) miktarlarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

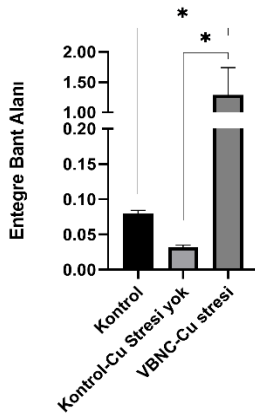
a Spektrokimyasal biyobelirteç
995 cm⁻¹
C-O riboz/C-C; RNA urasil halkası gerilmesi



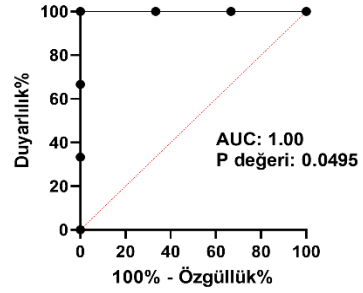
b ROC eğrisi
Spektrokimyasal biyobelirteç (995 cm⁻¹)



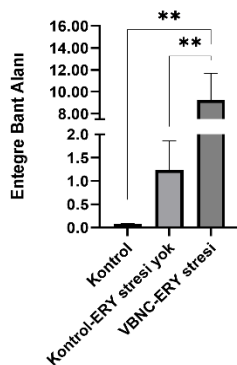
c Spektrokimyasal biyobelirteç
995 cm⁻¹
C-O riboz/C-C; RNA urasil halkası gerilmesi



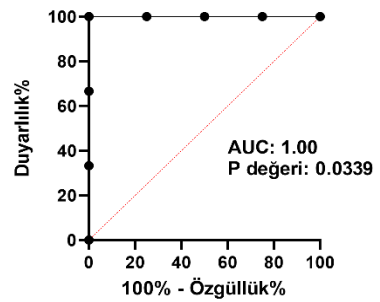
d ROC eğrisi
Spektrokimyasal biyobelirteç (995 cm⁻¹)



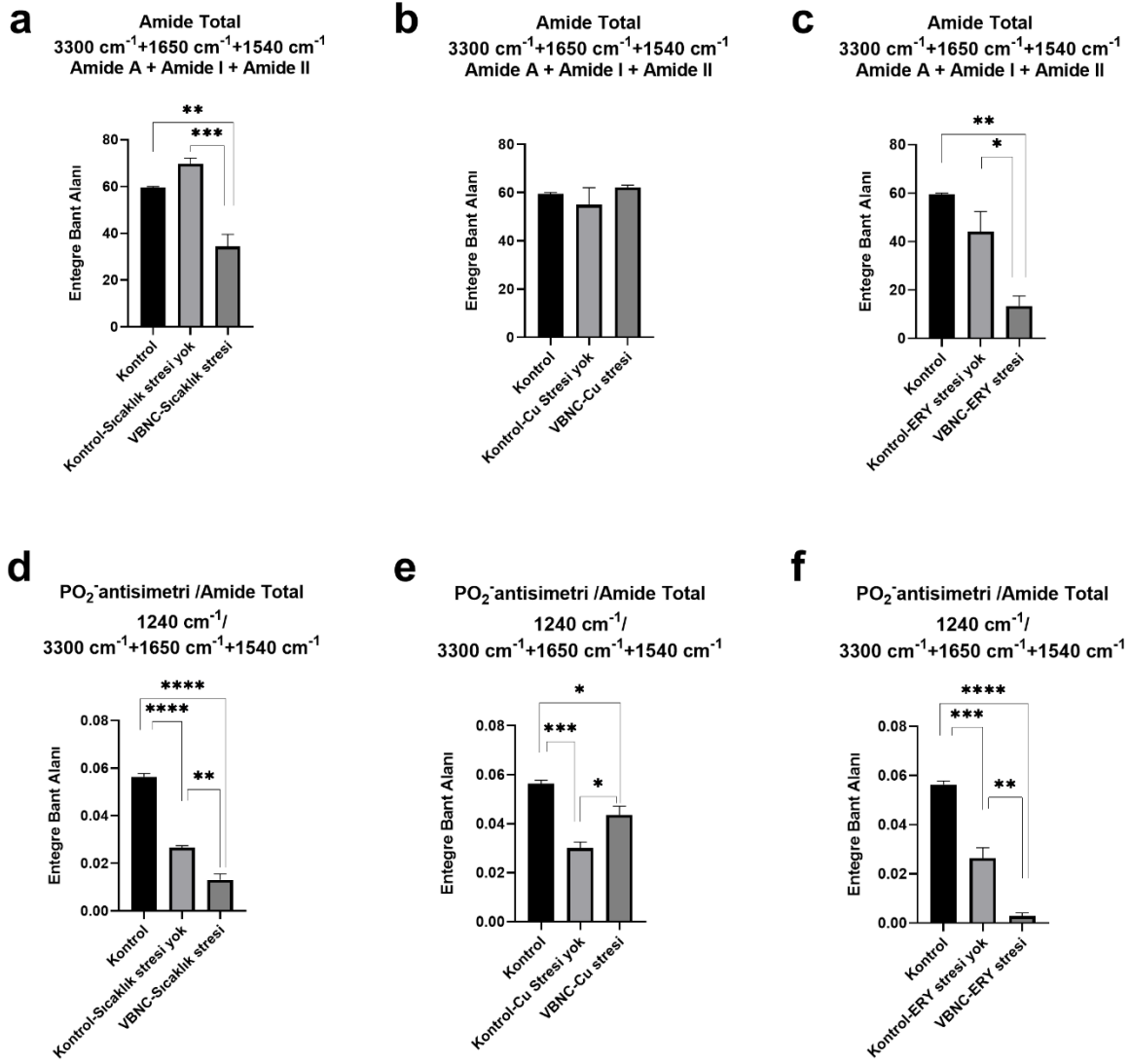
e Spektrokimyasal biyobelirteç
995 cm⁻¹
C-O riboz/C-C; RNA urasil halkası gerilmesi



f ROC eğrisi
Spektrokimyasal biyobelirteç (995 cm⁻¹)



Şekil 4.37. Sıcaklık (42 °C) (A-B), Metal (CuSO₄) (C-D) ve Antibiyotik (Eritromisin) (E-F) Stres Koşulları Altında *E. coli*'de VBNC Durumu için Spektrokimyasal Biyobelirteç Bandının Miktarının Belirlenmesi ve Doğrulanması. Anlamlılık Derecesi P < 0,05* ve P < 0,01**'e Eşit veya Daha Küçük Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama ± Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi.



Şekil 4.38. Sıcaklık (42 °C), Metal (CuSO₄) ve Antibiyotik (Eritromisin) Stres Koşulları Altında *E. coli*'de VBNC Durumu için Çeşitli Spektrokimyasal Bant Endekslerinin Ölçülmesi. (a-c) Amid Toplamı ve (d-f) PO₂⁻Antisimetrik /Amid Toplam Bant Oranlarındaki Değişiklikler. Anlamlılık Derecesi P < 0,05* ve P < 0,01**'e Eşit veya Daha Küçük Olarak Belirtili. Sonuçlar Ortalama ± Ortalamanın Standart Hatası Olarak İfade Edildi.

5. TARTIŞMA

Yıllardır yapılan araştırmalar, VBNC durumun antibiyotik, kimyasal maddeler, asitler, metaller, açlık, osmolarite gibi stres şartlarına sahip zorlu çevre koşulları altında hayatta kalmak için mikroorganizmaların geliştirdiği bir yaşam stratejisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu strateji hücreleri olumsuz çevre şartlarına karşı dirençli hale getirmektedir. Dahası, VBNC durumdaki bazı bakterilerde gerek yeniden canlanmadan önce gerekse yeniden canlandıktan sonra patojenite ve virülansın korunduğu bilinmektedir. Bu sebeple bakterilerde, VBNC durumun altında yatan moleküler mekanizmaların kapsamlı ve sistematik bir şekilde anlaşılması gıda güvenliği, çevre yönetimi, halk sağlığı ve tarımsal üretim açısından büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda VBNC durumun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlamak için sıcaklık, metal ve antibiyotik stresi gibi farklı stres şartları altında hücrelerin VBNC duruma geçişi ve VBNC durumdaki hücrelerde meydana gelen fizyolojik ve moleküler değişiklikler araştırılmıştır.

Yapay deniz suyunda 42 °C sıcaklık stresine maruz kalan *E. coli* W3110 hücreleri 6 günlük inkübasyon sonucunda kültüre edilebilirliğini tamamen kaybetmiş ve 7.0 log olan petri plak sayısı 0 (sıfır)'a inmiştir. Ancak aynı zaman diliminde Live/Dead BacLight kiti ile gerçekleştirilen floresan mikroskop sayım sonuçlarının da ise canlı hücre sayısının 6.56 log olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç *E. coli* hücrelerinin ölmediği ve VBNC duruma geçtiğini göstermektedir. Sıcaklık ile gerçekleştirilen daha önceki araştırmalar da 25 °C, 30 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda farklı besin ortamlarında *E. coli* W3110'un büyümesi üzerindeki etkiler incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *E. coli* büyümesinin 45 °C'de inhibe edildiği ve normal fenotipik koloni özelliklerini sergilemediği belirlenmiştir (Noor vd., 2013). *E. coli* MC4100 ile 50 °C de gerçekleştirilen bir çalışmada, petri plağında yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan hücrelerden % 63 ünün VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Bruhn-Olszewska vd., 2018). Benzer şekilde *E. coli* O157::H7 ile yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen bir başka çalışmada 50 °C'de 2 saatlik inkübasyon sonucunda 7.0 log olan plak sayısının 0 (sıfır)'a indiği, ancak aynı zaman diliminde canlı hücre sayısının 6.47 log olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında, 50 °C'deki inkübasyonun 6. saatinde hücre canlılığının 6.47 log'dan 3.16 log'a, 8. saatin sonunda ise 2.05 log'a düştüğü tespit edilmiştir (Fu vd., 2020). Hem literatürden hem de çalışmamızdan elde edilen sonuçlar *E. coli*'nin kültüre edilebilirliğinin ve canlılığının yüksek sıcaklığa duyarlı olduğunu ve yüksek sıcaklık stresi altında VBNC duruma geçiş yaparak hayatta kalma stratejisi geliştirdiğini göstermektedir. Ancak yüksek sıcaklık stresi varlığında

hücrelerin VBNC duruma indüklendiği bilinse de bu durumun moleküler mekanizması hakkında literatürde bir bilgi boşluğu bulunmaktadır. Bu mekanizmanın anlaşılması, *E. coli* ve benzeri mikroorganizmaların sıcaklık stresi altındaki hayatta kalma stratejilerinin daha iyi anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Bakır, hücre için esansiyel bir eser element olmasının yanında antimikrobiyal özelliğe sahip olması nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksik bir elementtir. Bu nedenle tarım, sağlık hizmetleri ve çeşitli diğer alanlarda sterilizasyon amaçlı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bakır maruziyeti, çoğu zaman hücrelerin VBNC duruma geçişini tetiklemektedir. Bu sebeple çalışmamızda, *E. coli* W3110 hücrelerinin yapay deniz suyu ortamında 25 °C'de, 20 µM bakır stresine maruz kalmasının etkileri araştırılmış ve bakır stresi altında 8 günlük inkübasyon sonrasında petri plak sayısının sıfırlandığı, ancak yapılan mikroskop sayımlarında 6.47 log hücrenin canlı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, hücrelerin bakır stresine maruz kaldığında kültüre edilebilirliğini kaybettiğini, ancak canlılığını koruyarak VBNC durumuna geçtiğini göstermektedir. *E. coli* ile gerçekleştirilen başka bir çalışma da 4 mM, 6 mM ve 25 mM bakır metali içeren LB agar ortamında 6 ve 25 mM bakır varlığında hücrelerin koloni oluşturmadığı ancak Live/Dead BacLight kiti kullanılarak yapılan mikroskop sayımlarında hücrelerin ölmediği, aslında VBNC duruma geçtiği tespit edilmiştir (Grey & Steck, 2001b). Bir salgın suşu olan *E. coli* O104:H4 ile besin açısından fakir ve 500 µM bakır içeren %0,9 tuzlu su ortamında yapılan bir çalışmada ise hücrelerin 10 gün içinde kültürlenemez hale geldiği ve VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Aurass vd., 2011). Bu bulgular, *E. coli* hücrelerinin yüksek konsantrasyonlarda bakır metali varlığında kültüre edilebilirliğini kaybettiğini, ancak yaşamlarını VBNC durumda sürdürdüğünü göstermektedir (Maertens vd., 2021).

E. coli'nin yanı sıra başka bakteri türlerinde de bakır maruziyeti VBNC durumu indüklemektedir. *P. aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada, içme suyu tesisat malzemelerinden kaynaklı 10 µM bakır kontaminasyonu bulunan içme suyunda gerçekleştirilen bir çalışmada, hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Dwidjosiswojo vd., 2011). Benzer şekilde *P. aeruginosa* ile yapılan başka bir çalışmada 0,25 mg/L bakır içeren içme suyunda hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir. (Bédard vd., 2014). Bakteriyel meyve lekesi hastalığına neden olan *A. citrulli*'nin, 50 µM bakır sülfata maruz kaldıktan sonra VBNC duruma geçtiği tespit edilmiştir (Kan vd., 2019, 2020). Benzer şekilde, başka bir bitki patojeni olan *R. solanacearum*'un 50 ile 500 µM aralığındaki bakır konsantrasyonlarında VBNC duruma indüklendiği belirlenmiştir (Grey & Steck, 2001a; Um vd., 2013). Sentetik içme suyunda 1mg/L

bakıra maruz kalan *L. pneumophila* hücrelerinin de VBNC duruma geçtiği bildirilmiştir (Hwang vd., 2006). Bakır varlığında gerçekleştirilen tüm bu çalışmalarda ortam şartları fark etmeksizin hücrelerin bakır varlığında VBNC duruma indüklendiği vurgulanmıştır. Ancak VBNC bakır stresi ilişkisine dair proteomik, transkriptomik ve metabolomik çıkarımlar eksik kalmaktadır. Bu sebeple bakır kaynaklı VBNC hücreleri karakterize etmek ve moleküler mekanizmanın daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyacı vardır.

Antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde devrim niteliğinde başarı sağlamış ilaçlardır. Ancak, bu ilaçların geniş çaplı kullanımı, bakterilerin direnç mekanizmaları geliştirmesine yol açmıştır. Antibiyotik stresi altında, bakterilerin VBNC duruma geçişi, bu direnç stratejilerinden biridir. Eritromisin antibiyotiği varlığında yapay deniz suyu ortamında gerçekleştirilen yaşam deneyleri sonucunda, *E. coli* W3110 hücrelerinin 40 gün içinde VBNC duruma indüklendiği yapılan petri plak sayımları ve floresan mikroskop sayımları sonucunda belirlenmiştir. Deney başlangıcında yaklaşık 7.0 log olan plak sayısı 40. günde 0 (sıfır)'a inerken, Live/Dead BacLight kiti ile gerçekleştirilen mikroskobik sayımlarda 6.78 log canlı hücre tespit edilmiştir. Bu sonuç, *E. coli* hücrelerinin membran bütünlüğünü koruduğunu ve canlı olduğunu göstermektedir. Literatürde, *E. coli*'nin antibiyotik stresi varlığında VBNC durumu genellikle iki şekilde ele alınmıştır. Birincisi, antibiyotik dirençli *E. coli* hücrelerinin farklı çevresel streslere maruz bırakılarak VBNC duruma indüklenmesi; ikincisi ise, farklı stres şartları altında VBNC duruma indüklenmiş *E. coli* hücrelerinde antibiyotik, dezenfektan veya kimyasal maddelere karşı gelişen dirençtir (Lin vd., 2017; Robben vd., 2019; Ye vd., 2020; Yin vd., 2023). Dahası antibiyotik stresi varlığında *E. coli* ile gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda persister hücreler çalışılmıştır. Antibiyotik varlığı persister ve VBNC hücreler olmak üzere iki alt popülasyon meydana getirmektedir. Hem persister hem de VBNC hücreler insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Antibiyotiğin ortamdaki uzaklaştırılması ile hızla büyümeye devam eden persister hücrelerin aksine, VBNC hücreler şartlar normale dönse bile uzun süreler boyunca büyümeden kalabilir ve böylece geleneksel mikrobiyolojik analizlerle gözden kaçarak ciddi sorunlar oluşturabilmektedir (Dörr vd., 2010; Hossain vd., 2023). Bu sebeple çalışmamız, eritromisin antibiyotiği varlığında *E. coli* W3110'un VBNC duruma indüklendiğini gösteren ilk çalışmadır. Antibiyotik stresi varlığında *E. coli* BW25113 ile gerçekleştirilen bir diğer çalışma ise ampisilin antibiyotiği ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada LB broth ortamında durağan faza geçmiş hücrelere MİK değerinin 25 katı ampisilin antibiyotiği verilmiş ve yapılan analizler neticesinde hücrelerin VBNC duruma indüklendiği tespit edilmiştir (Bamford vd., 2017). Literatürde antibiyotiklerin *E. coli* dışında bazı mikroorganizmaları VBNC duruma

indüklediğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır. Örneğin, *R. biphenylivorans* ile yapılan bir çalışma da 64 mg/L norfloksasin stresi altında hücrelerin VBNC duruma indüklediği tespit edilmiştir (Jia vd., 2020). Açlık ortamında tobramisin (0,25 mg/L ve 8 mg/L) ve siprofloksasin (0,062 mg/L ve 1 mg/L) antibiyotikleri ile PAO1-N ve C24 olmak üzere iki farklı *P. aeruginosa* suşu biyofilmlerinde yapılan bir çalışmada antibiyotik ilavesinin, hücrelerin VBNC duruma geçmesine neden olduğu gösterilmiştir (Mangiaterra vd., 2020). *S. aureus* biyofilmleri ile yapılan bir çalışmada ise M9 agar ortamına vancomycin (4 mg/L) ve quinupristin/dalfopristin (2mg/L) antibiyotiklerinin MİK değeri, MİK değerinin 4, 8 ve 16 katı ilave edilmesi ile hücrelerin VBNC duruma indüklediği tespit edilmiştir (Pasquaroli vd., 2013). Benzer şekilde, *C. sakazakii* ile yapılan başka bir çalışmada 100, 400, ve 1600 µg/ml ampisilin antibiyotiğine maruz bırakılan hücrelerin sırasıyla 30, 10 ve 7 günde VBNC duruma indüklediği belirlenmiştir. Kültürlenebilen hücre sayısının sırasıyla 8 log'dan 30, 10 ve 7 gün sonunda sıfıra düştüğü, ancak floresan mikroskop sayımlarında ise yaklaşık ml de $10^4 - 10^5$ canlı hücre olduğu tespit edilmiştir. VBNC hücrelerde hücresel bütünlüğün korunduğu, ancak morfolojilerinin normal hücrelerinkinden belirgin şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2020). Bu sonuçlar dikkate alındığında, birçok mikroorganizma türünün antibiyotik maruziyeti sırasında VBNC duruma geçtiği ve bu şekilde sessiz kalarak daha sonra rekürrens enfeksiyonlara yol açabildiği gözlenmektedir. Bu nedenle, VBNC durumun moleküler mekanizmasının çözülmesi ve hücrelerin VBNC duruma geçmesine sebep olan yolağın tespit edilmesi son derece önemlidir. VBNC duruma geçişin moleküler mekanizmasının aydınlatılması, bu hücrelerin indüklenmesini önleyici stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir ve böylece antibiyotik tedavilerinin etkinliğini artırabilir. Bu doğrultuda yapılacak çalışmalar, enfeksiyonların yeniden ortaya çıkmasını önlemek ve mikrobiyal kontrol stratejilerini iyileştirmek için hayati öneme sahiptir.

VBNC duruma indüklenen hücrelerde, kültüre edilebilen hücelere kıyasla belirgin hücresel değişikliklerin meydana geldiği bilinmektedir. Hücre morfolojisi ve hücre boyutundaki değişiklikler, VBNC hücrelerinin belirgin özellikleridir (Zhao vd., 2017). Bu durumdaki hücreler, genellikle hücre boyutunda meydana gelen azalmadan dolayı kokoid bir morfoloji sergilemektedirler. Bu durum, hücelere besin alımı için artan bir yüzey alanı sağlayarak açlık, düşük sıcaklık ve aşırı pH gibi stresli koşullar altında hücrenin hayatta kalmasına olanak tanımaktadır (Lin vd., 2017; Oliver, 2010; Ramamurthy vd., 2014; Zhang vd., 2015; Zhu vd., 2022).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda, üç farklı stres şartı altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* W3110 hücrelerinde hücre hacminin azaldığını ve hücrelerin küçüldüğünü göstermektedir. *E. coli* hücreleri yaklaşık 2 µm uzunluğunda basil formunda morfoloji göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız kontrol grubu hücrelerinin de yaklaşık 2±0,20 µm uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, VBNC durumdaki hücrelerin uzunlukları stres koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir; sıcaklık stresi altında 1,43±0,21 µm, bakır stresi altında 1,56±0,19 µm ve antibiyotik stresi altında 1,49±0,19 µm uzunluğunda oldukları tespit edilmiştir. Çalışmamızda gerçekleştirilen SEM ve TEM analizleri sonucunda VBNC duruma geçen hücrelerde küçülmenin yanı sıra hücrelerde içeriye doğru bir çökmenin (kavislerin) meydana geldiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde *E. coli* ile gerçekleştirilen birçok çalışmada hücrelerin küçüleşerek kok formuna geçtiği belirlenmiştir (Aurass vd., 2011; Li vd., 2016; Signoretto vd., 2000; Ye vd., 2020). Düşük seviyeli klorlama ile VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücreleri ile gerçekleştirilen SEM analizlerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hücre hacminin küçüldüğü ve hücrelerde kavislerin meydana geldiği gözlenmiştir (Ye vd., 2020). Yüksek CO₂ basıncı ile VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücreleri ile yapılan SEM analizlerinde hücre hacminin azaldığı ve hücrelerin küçüldüğü yapılan mikroskopik analizlerle tespit edilmiştir. Aynı çalışmada gerçekleştirilen TEM analizleri sonucunda da kontrol hücrelerine kıyasla VBNC durumdaki hücrelerde ribozom sayısında azalma, genetik materyalde gevşeme ve hücre iç membranı ile dış membranı arasında bir boşluğun meydana geldiği tespit edilmiştir (Zhao vd., 2013). Çalışmamızda gerçekleştirilen TEM analizleri sonucunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. VBNC duruma indüklenen hücrelerde ribozom sayısındaki azalmadan ötürü sitoplazmik matrisin kontrol grubuna göre daha az yoğun olduğu ve VBNC hücrelerde dış ve iç zarlar arasında bir boşluk meydana geldiği tespit edilmiştir. *E. coli* dışındaki birçok mikroorganizmada da VBNC durum, hücre hacminde değişiklik meydana getirmektedir. Örneğin, *S. typhi* ile yapılan bir çalışmada, 0.01 mmol/L ve 0.015 mmol/L CuSO₄ maruz bırakılan hücrelerin VBNC duruma indüklendiği ve hücrelerin kısa çubuk şeklinden kok şekline dönüştüğü gösterilmiştir (Zeng vd., 2013). Soğuk stresi varlığında VBNC duruma indüklenen *C. jejuni*'nin spiral formdan kokoid forma dönüştüğü ve *Edwardsiella tarda* ile deniz suyunda gerçekleştirilen çalışmada, VBNC duruma indüklenen hücrelerin çubuk şeklinden kokoid forma dönüştüğü tespit edilmiştir (Chaisowong vd., 2012; Du vd., 2007). Ayrıca VBNC duruma indüklenen hücrelerde kontrol grubu hücrelerine kıyasla protein agregatlarının meydana geldiği tespit edilmiştir. Protein agregatlarının, çoğunlukla fonksiyon kaybı ve toksisite ile ilişkili olduğu bilinse de stresli koşullar altında bakterilerin hayatta kalmasını artırdığı da bilinmektedir (Bollen vd., 2021; Pu vd., 2019). Protein agregatları, ısı

şoku, oksidatif stres veya antibiyotik stresi gibi zorlu koşullarla bakterilerin başa çıkmasına yardımcı olmaktadır. Stres altında oluşan protein agregatları, hücre içi protein homeostazının korunmasına ve hasarlı proteinlerin toksik etkilerinin minimize edilmesine katkı sağlamaktadır. Böylece, bakterilerin hayatta kalma ve adaptasyon stratejilerinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (Bollen vd., 2021; Dong vd., 2020; Pan vd., 2023).

VBNC durumun moleküler mekanizmasını aydınlatmak için bu zamana kadar farklı stres şartları ve farklı mikroorganizma türleri ile gerçekleştirilen birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında birçok teknik geliştirilmiş ve VBNC durumdaki organizmaların tespitinde kullanılmıştır. VBNC durumu bir uyku hali olduğu için VBNC durumdaki hücrelerde, enerji tüketimini azaltmak için birçok genin ekspresyonu aşağı regüle edilmektedir. Bununla birlikte, VBNC hücreler hala yüksek seviyede gen ekspresyonuna da sahiptir ve bu genlerin davranışı, VBNC hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarına ve yeniden canlanmalarına katkı sağlamaktadır.

Mikroorganizmalarda VBNC durumu, hücrenin kültüre edilebilirliği ile yakından ilişkilidir. Çünkü VBNC durum, aslında hücrelerin bölünememe halini ifade etmektedir. Ancak, bugüne kadar yapılan araştırmalarda hücre bölünmesi ile VBNC durumunun oluşumu arasındaki ilişkiyi inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızın devamında VBNC duruma indüklenen hücrelerde bazı hücre zarf stres genleri ile hücre bölünmesinde doğrudan veya dolaylı rol oynayan genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır.

Bakteriler, hücreyi sınırlayan ve koruyan karmaşık bir zarfla kaplıdır. Zarf stres genleri, bakterilerin çevresel streslerle başa çıkabilmeleri ve hayatta kalabilmelerini sağlayan sistemlerdir. Çalışmamızda, hücre zarfı ile ilişkili birçok genin ekspresyon seviyesi sıcaklık, metal ve antibiyotik stresi altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde Real Time PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu genler, bakteri hücre zarfının bütünlüğünü ve homeostazını sağlamak, çevresel streslere yanıt vermek ve bakterinin hayatta kalmasını sağlamak için önemli rol oynarlar.

İki bileşenli sistemler, mikroorganizmalarda çevresel değişikliklere yanıt oluşturan bir protein ailesidir. Bu protein ailesi, çeşitli stres koşullarına adaptasyonda önemli bir rol oynar. İki bileşenli sistemler, çevresel koşullardaki değişikliklere yanıt olarak gen ekspresyonunu değiştirerek, mikroorganizmaların hayatta kalma ve adaptasyon yeteneklerini artırmaktadır (Groisman, 2016). CpxA/R, hücre zarfının stres yanıtını düzenleyen iki bileşenli bir sistemdir. Bu sistem sensör kinaz CpxA ve cevap regülatörü CpxR den oluşmaktadır. CpxA/R, virülans,

ağır metal toleransı, antibiyotik direnci, biyofilm oluşumu ve oksidatif stres gibi birçok çevresel adaptasyona katkıda bulunarak bakterilerin canlılığı ve patojenitesinde rol oynar (Weatherspoon-Griffin vd., 2014; Zhao vd., 2022). Ayrıca CpxA/R sistemi yanlış katlanmış proteinlerin varlığı ile uyarılarak zarf stresine yanıt oluşturur. Zarftaki hasarlı proteinlerin onarımında yer alan proteinlerin sentezini kontrol ederek zarf bütünlüğünün korunmasında rol oynamaktadır (Leinberger vd., 2024; DiGiuseppe & Silhavy, 2003; Weatherspoon-Griffin vd., 2014). Çalışmamızda metal stresi varlığında *cpxA* genin ekspresyonu artmış *cpxP* ve *cpxR* genin ekspresyonu ise azalmıştır. Diğer tüm stres şartlarında ise her üç geninde VBNC durumda ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, farklı stres koşullarının CpxA/R sisteminin gen ekspresyonunu ve dolayısıyla hücre zarfı stres yanıtını farklı şekillerde regüle ettiğini göstermektedir.

Cpx sistemi tarafından düzenlenen, zarf homeostazı ve biyogenezinde rol oynadığı bilinen başka bir proteinde Spy'dır. Spy proteini (sferoplast protein y), ilk kez sferoplast hücrelerde tespit edilmiş ve bu hücrelerde yüksek miktarda bulunurken sağlam hücrelerde bulunmayan büyük ölçüde strese özgü bir periplazmik şaperondur. Yapılan çalışmalarda Spy ekspresyonunun hem Cpx hem de Bae zarf stres proteinleri tarafından düzenlendiği ve bütanol, etanol gibi protein denatüranları tarafından güçlü bir şekilde indüklendiği tespit edilmiştir (Combs & Silhavy, 2024; Leinberger vd., 2024). Düşük klorlama ile VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücreleri ile yapılan bir çalışmada VBNC durumdaki hücrelerde *spy* geninin arttığı tespit edilmiştir (Ye vd., 2020). Çalışmamızda ise çalışılan tüm stres şartları altında *spy* genin ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine nazaran ciddi bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular CpxAR sistemi sonuçları ile de uyumludur. Çünkü *cpxR* geninin ekspresyonu azalırken *spy* geninin ekspresyonu da azalmıştır. Bilindiği üzere *spy* geni CpxR tarafından regüle edilen bir genidir ve VBNC hücrede *cpxR* geninin ekspresyonunun azalması *spy* geninin transkripsiyonunun başlatılmasını veya artırılmasını da sınırlamaktadır. Bu sonuçlar, Spy proteininin stres koşullarında hücrelerin zarf stresine karşı adaptasyonunda kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca elde edilen veriler, zorlu çevresel koşullara adaptasyonda CpxAR ve Spy sistemlerinin birlikte önemli bir işleve sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, hücre zarfı opaklığı, hücre bölünmesi ve ökaryotik hücrelere yapışmada rol oynadığı tahmin edilen *ytfB* ve zarf biyogenezinden sorumlu *ycbC* (*elyC*) genlerinin ekspresyonu da incelenmiştir (Bottomley vd., 2020; Paradis-Bleau vd., 2015). YcbC proteini, bakteriyel zarfın ana yapısal bileşeni olan peptidoglikanın düşük sıcaklıklarda sentezinden sorumludur. *ycbC* mutant hücrelerle yapılan bir çalışmada, 21 °C'de peptidoglikan sentezinin

engellendiği ve hücrelerin lizize uğradığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *ycbC* mutant suşlarda protein agregasyonunun arttığı, Spy veya DsbG periplazmik şaperonlarının aşırı ekspresyonunun bu protein agregasyonunu yabancı tip düzeyine indirdiği gözlemlenmiştir (Bottomley vd., 2020; Kouidmi vd., 2018). Çalışmamızda Real Time PCR analizleri sonucunda, tüm stres koşulları altında *ycbC* ve *ytfB* genlerinin ekspresyon seviyelerinin azaldığı sadece *ycbC* genin ekspresyonunun sıcaklık stresi varlığında kontrol grubu ile benzer sonuç verdiği tespit edilmiştir. *ycbC* ve *ytfB* genlerinin ekspresyon seviyesinde meydana gelen azalmaların, bakteriyel hücrelerin stres koşullarına adaptasyon süreçlerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Özellikle *ycbC* geninin yüksek sıcaklık stresi altında kontrol grubu ile benzer ekspresyon düzeyleri sergilemesi, hücreler VBNC durumda da olsa bu genin sıcaklık stresine karşı koruyucu bir mekanizma olduğunu doğrulamaktadır.

Yanlış katlanmış periplazmik proteinler ve zarf bozulmasında sorumlu olan bir diğer iki bileşenli sistem, CpxA/R sisteminin homoloğu olan ZraS/R'dir. ZraS/R, antibiyotik direncine katkıda bulunan bir zarf stres yanıtı sistemidir. ZraS/R, hücre zarfını etkileyen çeşitli kimyasal ve fiziksel stresler altında hücre zarının bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar (Petit-Härtlein vd., 2015; Rome vd., 2018). Çalışmamızda, VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde ZraS/R sisteminin sensör kinazının ekspresyon seviyesinin tüm stres şartlarında arttığı tespit edilmiştir. Bu sensörün ekspresyonunda meydana gelen artış, stres şartlarının hücreler tarafından algılandığını ve bu durumda hücrede koruma mekanizmalarının aktive olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, bu sistemlerin ekspresyon seviyelerindeki artış, hücrelerin VBNC duruma geçişinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Bu bulgular, ZraS/R sisteminin hücrel stres yanıtında rol oynadığını ve hücrelerin VBNC durumuna geçişinde önemli bir adaptif mekanizma olarak işlev gördüğünü göstermektedir.

YfhA/K sistemi, alternatif sigma faktörleri ve küçük RNA'lar ile ilişkili olan iki bileşik fosforlama sistemidir. *E. coli* K-12'de bir cevap regülatörü olan YfhA, Sigma 54'e bağımlı promotörlerden *glmY* ve *rpoE*'nin transkripsiyonunu aktive eder. Küçük RNA GlmY ve RpoE (Sigma 24), hücre zarfı homeostazının önemli düzenleyicileridir. YfhA/K sisteminin bu işlevine ek olarak, Enterobacteriaceae familyasının patojenik formlarında virülans için gerekli olduğu da bilinmektedir. Bu sistem ayrıca bakterilerin oksidatif stresle başa çıkmasına yardım ederek hücre zarını korur (Göpel & Görke, 2018; Klein vd., 2016). *E. coli* W3110 ile yapılan bir çalışmada 0,2 M NaCl stresine maruz bırakılan *yfhA* ve *yfhK* mutant hücrelerinde hücre canlılığının kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç osmotik stresten korunmak için YfhA/K iki bileşenli sistemin hücre için gerekli olduğunu göstermektedir. Ayrıca aynı

çalışmada 33 µg/ml çinko stresi varlığında gerçekleştirilen yaşam deneylerinde *yfhA* ve *yfhK* mutant hücrelerde kontrol grubuna nazaran hücre canlılığının önemli derece de azaldığı tespit edilmiştir (Kaygusuz, 2016). Yapılan birçok çalışmaya rağmen YfhA/K'nın rolü hala tam anlamıyla tanımlanmamıştır ve literatürde QseE/QseF ve GlrK/GlrR olarak da bilinmektedir.

Çalışmamızda, VBNC durumdaki hücrelerde YfhA/K iki bileşikli sisteminin sensör kinazı YfhK'nın ekspresyon seviyesinin antibiyotik stresi dışındaki tüm stres şartlarında arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, YfhK sensör kinazının çevresel stresleri algılayarak hücrede korunma mekanizmalarını aktive etme sinyalinin başladığını göstermektedir. Dolayısıyla, bu sistemlerin ekspresyon seviyelerindeki artış, hücrelerin VBNC duruma geçişini sağlayabilir. Bu bulgular, bakteriyel hücrelerin çevresel streslere karşı adaptasyon süreçlerini anlamak açısından önemli ipuçları sunmakta ve VBNC durumun oluşumunda sensör kinazların rolünü ortaya koymaktadır. Darcan vd. (2009)'nin yapmış olduğu bir çalışmada çalışılan tüm stres şartlarında EnvZ sensör kinaz mutantlarının VBNC duruma indüklenmemesi bu sonuçla ilişkili olabilmektedir (Darcan vd., 2009). Sonuç olarak iki bileşikli sistemlerin özellikle çevresel stres koşulları altında hücrede korunma mekanizmalarını aktive etmedeki kritik rolünü vurgulamakta ve EnvZ sensör kinazının eksikliğinin VBNC duruma geçişini engellediği gözlemiyle paralellik göstermektedir, bu da sensör kinazların VBNC durumun oluşmasında düzenleyici faktörler arasında yer alabileceğini göstermektedir.

P. mirabilis ile gerçekleştirilen bir çalışmada, *envZ* geninin ekspresyon seviyesinin yüksek osmotik koşullarda azaldığı ancak asidik pH koşullarında arttığı tespit edilmiştir. (Wasfi vd., 2020). Bir başka çalışma da yapay deniz suyunda VBNC duruma indüklenen *V. vulnificus* hücrelerinde *envZ* geninin ve *E. coli*'de *ompF*'ye karşılık gelen *ompU* geninin ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (Rao vd., 2014). EnvZ, bir osmosensör olarak işlev görür ve OmpR'yi fosforile ederek *ompC* ve *ompF* genlerinin ekspresyonunu düzenler. Bu düzenleme, bakterilerin zar geçirgenliğini ve çevresel değişikliklere adaptasyonunu kontrol etmede kritik bir rol oynar. Çalışmamızda bu genlerin ekspresyon seviyeleri tüm stres şartları altında analiz edilmiştir. Sonuçlar *envZ*, *ompR*, *ompC* ve *ompF* genlerinin ekspresyon seviyelerinin tüm stres şartları altında azaldığını göstermektedir. Darcan vd. (2003)'nin deniz suyunda yaptıkları çalışmada, porin proteinlerinin sentezinde osmosensör olarak görev yapan EnvZ sensörünün nakavt edilmesi durumunda *E. coli*'nin VBNC duruma girmediği tespit edilmiştir. Aynı şekilde çalışmalarında osmotik stres, alkali pH ve osmotik koruyucu glisin betain gibi farklı stres şartlarında bu durumun değişmediğini bulmuşlardır. Yani stres faktörleri değişse bile *E. coli*'de *envZ* mutantları VBNC duruma girmemektedir. Muhtemelen *envZ* mutant bakteriler dış

ortamdaki stresleri algılayamadığından VBNC duruma girmek yerine doğrudan ölmüştür (Darcan vd., 2003, 2009; Darcan, 2005). Bu durumun bir sonucu olarak VBNC duruma indüklenen bakterilerde EnvZ miktarının artması beklenmektedir. Ancak çalışmamızda VBNC durumdaki hücrelerde *envZ* geninin ekspresyon seviyesi azalmıştır. Çünkü bir organizmada genin nakavt olması ile hücredeki ekspresyon seviyesinin azalması aynı değildir. Gen silinmesi, gen ürününün tamamen yokluğuna sebep olurken, gen ekspresyonunun azalması gen ürününün kısmen mevcut olmasını sağlar. Bu sebeple *envZ* geninin ekspresyon seviyesindeki azalmanın, enerji tasarrufu ve hücre zarfı stabilizasyonu gibi adaptif yanıtın bir parçası olabileceği düşünülmektedir.

Darcan vd. (2003) ayrıca çalışmalarında *ompR*, *ompC*, *ompF* ve *ompC/ompF* ikili mutantlarının da deniz suyunda VBNC duruma indüklendiğini tespit etmişlerdir. Dış membran porin proteinlerinin VBNC durumunun oluşumunda bir rol oynadığı, literatürdeki diğer çalışmalarla da doğrulanmaktadır. Farklı çalışmalarda, oksidatif stres, yüksek karbondioksit basıncı ve düşük sıcaklıklarla VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde dış membran proteinleri OmpW, OmpF ve OmpA'nın sentezinde ciddi bir artış tespit edilmiştir (Asakura vd., 2007b, 2008; Muela vd., 2008; Zhao vd., 2016; Zhong & Zhao, 2019). Başka bir çalışmada ise, klor ile VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde dış membran porin proteinleri OmpC, OmpF ve özellikle de TolC'nin ekspresyon seviyelerinin arttığı, Real Time PCR analizleri ile tespit edilmiştir (Lin vd., 2017). Ek olarak, *C. sakazakii* hücreleri kuraklık stresi ile VBNC duruma indüklendiğinde, *ompA*'nın ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Jameelah vd., 2018). Dış membran proteinleri bakteri hücrelerinde maddelerin değişimi ve çevresel uyaranlara yanıt için gerekli proteinlerdir. Bu nedenle, OmpW ve EnvZ de dahil dış membran proteinlerinin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler, VBNC hücre oluşumunda rol oynayan ve çevresel stres faktörlerine adaptasyonda kritik öneme sahip proteinlerdir.

Stres koşullarında hücre zarının stabilitesini sağlayan ve zar ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir diğer sistemde alternatif sigma faktör RpoE'dir (Hayden & Ades, 2008). RpoE, yüksek sıcaklıklar, dış zar proteinlerinin artan ekspresyonu veya yanlış katlanmasına neden olan mutasyonlar tarafından indüklenmekte ve zarf homeostazını düzenlemektedir (Combs & Silhavy, 2024; DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Yapay deniz suyunda +4 °C de *V. cholerae* ile gerçekleştirilen bir çalışmada VBNC duruma indüklenen hücrelerde RpoE, RpoH ve RpoN'nin transkripsiyonun iki kattan fazla azaldığı tespit edilmiştir (Xu vd., 2018). Benzer şekilde *Vibrio alginolyticus* hücreleri ile +4 °C yapay deniz suyunda yapılan bir başka çalışmada VBNC duruma indüklenmiş hücrelerde *rpoE* ve *toxR*'nin transkripsiyon

seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Cai vd., 2023). Çalışmamızda da VBNC durumdaki hücrelerde, kontrol grubu hücrelerine kıyasla *rpoE*'nin ekspresyon seviyesinin tüm stres şartları altında ciddi derecede azalmış olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* ile gerçekleştirilen bir çalışmada *rpoE* tarafından kodlanan σ^E 'nin büyümenin erken durağan fazında meydana gelen VBNC hücrelerde lizise neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun sebebinin, hücre canlılığını uzun süreler boyunca korumak amacıyla hasarlı hücreleri uzaklaştırarak besin kullanımını en üst düzeye çıkarmak için gerçekleştiği belirtilmiştir (Noor vd., 2009). Bu bulgular, RpoE'nin hücrel stres yanıtındaki kritik rolünü vurgulamakta ve RpoE ekspresyonundaki azalmanın, hücrelerin VBNC duruma geçişini kolaylaştıran önemli bir adaptif mekanizma olduğunu göstermektedir

VBNC durumda rolü olduğu bilinen genlerden bir tanesi de *rpoS* dir. RpoS bakterilerin çevresel stresler altında hayatta kalmasını sağlayan transkripsiyonel bir düzenleyicidir (Bhagwat vd., 2006). Çalışmamızda üç farklı stres şartı altında VBNC duruma indüklenen yabancı tip *E. coli*'nin *rpoS* ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. RpoS'nin *E. coli*, *S. enterica* *V. vulnificus* ve *C. sakazakii*'de VBNC durumun oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (Boaretti vd., 2003; Jameelah vd., 2018; Kusumoto vd., 2012; Xu vd., 2018). Eş zamanlı UV ve klor maruz bırakılarak VBNC duruma indüklenen antibiyotik dirençsiz, çoklu ilaca dirençli RP4 plazmidini taşıyan ve *rpoB* geni mutasyona uğramış (Ser585phe) *E. coli* K12 suşlarıyla gerçekleştirilen Real Time PCR analizlerinde *rpoS* ekspresyonunun RP4 plazmidi taşıyan *E. coli* suşunda azaldığı diğer iki suşta ise arttığı belirlenmiştir (Zhang vd., 2024). Yapay oligotrofik bir ortamda +4 °C'de yabancı tip *E. coli* ve *rpoS* mutant suş ile gerçekleştirilen çalışmada, *rpoS* mutantının VBNC duruma girmediği ve stres şartları altında erkenden öldüğü tespit edilmiştir. Yani *rpoS* geninin varlığının hücreleri VBNC duruma indüklediği belirlenmiştir (Boaretti vd., 2003). Başka bir çalışma da ise klor varlığında VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde *rpoS*'nin ekspresyon miktarının arttığı tespit edilmiştir (Chen vd., 2018; Lin vd., 2017). Ancak farklı stres şartlarında VBNC duruma indüklenen hücrelerde *rpoS*'nin ekspresyon seviyesinin azaldığı veya stres şartlarından etkilenmediğini gösteren çalışmalarda mevcuttur. Yapay deniz suyunda +4 °C de VBNC duruma indüklenen *V. cholerae* ile gerçekleştirilen bir çalışma da logaritmik faz hücrelerine kıyasla *rpoS* mRNA kopyalarının azaldığı tespit edilmiştir (González-Escalona vd., 2006). Ozmotik stres varlığında VBNC duruma indüklenen *S. enterica* hücrelerinde hücre içi RpoS seviyesinde azalma gözlenmiştir (Kusumoto vd., 2012). Benzer şekilde ozmotik ve oksidatif stres koşulları altında *E. coli* ile yapılan bir çalışmada RpoS ekspresyonunun azaldığı durumda hücrelerin VBNC duruma

indüklendiği tespit edilmiştir (Asakura vd., 2005). Monokloramin dezenfeksiyonundan dolayı VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde *rpoS* ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Daer vd., 2021). Bir başka çalışmada ise farklı stres şartları altında VBNC duruma indüklenen *P. mirabilis*'in üç farklı klinik izolatta *rpoS*'nin ekspresyonunda farklılıklar tespit edilmiştir. Yaradan izole edilen 3 numaralı izolatta *rpoS* geninin ekspresyonu azalırken, idrardan izole edilen 6 ve 7 numaralı izolatta ise *rpoS* geninin ekspresyonu artmıştır (Wasfi vd., 2020). Çalışmamız ve mevcut literatür incelendiğinde, *rpoS* geninin VBNC durumuna geçiş ve çevresel streslere adaptasyon süreçlerinde kritik bir rol oynadığı, ancak bu genin ekspresyon seviyelerinin stres şartlarına ve mikroorganizma türlerine bağlı olarak büyük farklılıklar gösterebildiği ortaya konulmuştur. Sonuç olarak *rpoS* ekspresyonundaki bu çeşitlilik, hücrel yanıtın sadece stres türüne değil, aynı zamanda mikroorganizmanın bulunduğu ortama, genetik yapısına ve metabolik durumuna da bağlı olduğunu göstermektedir.

Bakteriyel zarfın ana yapısal bileşeni olan peptidoglikan ile ilişkili bir başka dış zar proteini de Pal'dır. Pal bölünen hücrelerde daralma bölgesinde birikir ve FtsN'ye bağlı olarak çalışır. Ayrıca Pal, Tol-Pal sistemi olarak bilinen ve hem hücre zarfı hem de hücre bölünmesinde rol oynayan bir protein grubudur. Tol-Pal kompleksi, dış zar bütünlüğünün korunması için önemlidir. Çalışmamızda, kontrol grubu hücrelerine kıyasla Tol-Pal sisteminden *pal* geninin ekspresyonunun, metal stresi hariç VBNC durumdaki hücrelerde tüm stres şartlarında azaldığı tespit edilmiştir. *tol* genlerinin ve *tol-pal* gen kümesi ile ilişkili *cpoB* geninin ekspresyonunun da kontrol grubu hücrelerine göre tüm stres şartlarında azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, Tol-Pal sisteminin VBNC durumunda azalan ekspresyonu, bu sistemin hücre bölünmesi ve zarf bütünlüğü üzerinde doğrudan etkisi olduğunu ve stres koşullarında bu sistemin işleyişinin bozulmasının hücrelerin VBNC durumuna geçişine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Gelecekte yapılacak araştırmalar, Tol-Pal sisteminin bu süreçteki rolünü daha detaylı aydınlatarak, bakteriyel stres yanıtının ve VBNC durumunun daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

Hücre bölünmesi, *E. coli*'de karmaşık ve iyi düzenlenmiş bir süreçtir. Bu süreç, septum oluşumu ile başlar ve bu aşamada FtsZ proteini kritik bir rol oynar. FtsZ, hücre zarı boyunca bir halka yapısı oluşturur ve bu halka, bölünmenin başlangıç noktasını belirler. Bu halkanın doğru bir şekilde işlev görmesi için FtsA, FtsB, FtsE, FtsL, FtsN, FtsP, FtsQ, FtsX, DedD, ZipA, MukB ve Sula gibi çeşitli proteinler gereklidir.

FtsA, FtsZ'nin zara bağlanmasına ve septumun oluşumuna yardımcı olurken, FtsB, FtsL, FtsQ, FtsN ve FtsX, hücre zarfının yapılandırılması ve bölünmenin ilerlemesi için gerekli olan protein komplekslerini oluşturur. DedD ve ZipA ise FtsZ halkasının stabilizasyonunu sağlar. MukB, hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmasını düzenlerken, Sula DNA hasarına yanıt olarak hücre bölünmesini durdurarak hücrelerin hasarlı DNA'yı onarmasına izin verir. Çalışmamızda, VBNC durumdaki *E. coli* W3110 hücrelerinde bu genlerin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalmanın, hücre bölünmesinin durmasına ve VBNC durumunun oluşmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu bulgu, literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur. Örneğin *E. coli* ile deniz suyunda yapılan mikroarray analizlerinde, hücre bölünmesi ve nükleotid biyosentezinde rol oynayan 320 genin negatif düzenlendiği tespit edilmiştir (Rozen vd., 2002). Benzer şekilde *E. coli* ile ferrat ve monokloramin dezenfeksiyonu varlığında yapılan başka bir çalışmada *ftsQ* geninin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Daer vd., 2021). Bakır sülfat ile VBNC duruma indüklenen *C. michiganensis* ile yapılan RNA sekans analizlerinde bölünme ile ilişkili genlerin (CMM_0842 ve CMM_0012) ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir (Bai vd., 2022). Farklı stres şartlarında üç farklı klinik izolat *P. mirabilis* ile gerçekleştirilen Real Time PCR analizinde *ftsZ* ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Wasfi vd., 2020). *V. cholerae* ile gerçekleştirilen RNA sekans analizleri *ftsZ* ve hücre bölünmesiyle ilgili diğer genler olan *ftsA*, *ftsQ* ve *ftsH*'nin transkripsiyon seviyelerinin VBNC hücrelerde azaldığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada MreBCD ile ilişkili üç gen olan *mreB*, *mreC* ve *mreD*'nin transkripsiyon seviyelerinin de VBNC durumdaki bakterilerde azaldığı tespit edilmiştir (Xu vd., 2018). Benzer bir sonuç yapay deniz suyunda 4 °C'de *V. vulnificus* hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada da tespit edilmiştir. VBNC duruma indüklenen hücrelerde *ftsZ* ve *mreB* geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlenmiştir (Rao vd., 2014). Bu veriler, VBNC durumdaki hücrelerde hücre bölünmesi ve zarf bütünlüğü ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki azalma eğiliminin yaygın olduğunu ve bu durumun hücrel stres yanıtlarının bir parçası olabileceğini göstermektedir.

MreBCD, hücre morfolojisinin korunması ve hücre duvarı sentezinin yönlendirilmesi için gerekli olan bir komplekstir. MreBCD genlerinin eksik olduğu hücrelerde hücrelerin küreselleştiği, genişlediği ve sonunda parçalandığı tespit edilmiştir. Her bir *mre* geninin ayrı ayrı yok edilmesi, hücre morfolojisi ve canlılığında büyük değişikliklere yol açmış ve dolayısıyla, *mreBCD* tarafından kodlanan üç proteinin aynı morfogenetik yolda işlev gördüğü ve gerekli olduğu kanısına varılmıştır (Kruse vd., 2005; Shi vd., 2018). Çalışmamızda, üç farklı

stres şartında VBNC duruma indüklenen bakterilerde, *mreB* geninin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. MreBCD kompleksi, hücre morfolojisinin korunması ve hücre duvarı sentezinin yönlendirilmesinde kritik bir rol oynar. *mreBCD* genlerinin eksikliğinde hücrelerin küreselleştiği, genişlediği ve sonunda parçalandığı önceki çalışmalarla belgelenmiştir (Kruse vd., 2005). Dolayısıyla, VBNC hücrelerde *mreB* geninin ekspresyonunun azalması, hücre boyutu ve morfolojisinde belirgin değişikliklere yol açarak hücrelerin hayatta kalma stratejilerini değiştirdiğini göstermektedir. Bu bulgu, MreBCD kompleksinin VBNC durumdaki hücrelerde morfogenetik yolun korunmasındaki önemini vurgulamakta ve çevresel stres faktörlerinin bakteriyel hücre morfolojisi üzerindeki etkisine ışık tutmaktadır. Ayrıca, bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olup, MreBCD kompleksinin bakteriyel hücre morfolojisi ve canlılığı üzerindeki kritik rolünü bir kez daha doğrulamaktadır.

Hücre bölünmesi sırasında FtsZ halkasının düzenlenmesi ve stabilitesinde rol oynayan *zap* genlerinin VBNC durum ile ilişkisi çalışmamızda gerçekleştirilen Real time PCR analizleriyle incelenmiştir. Analizler sonucunda, metal stresi altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde *zapE* geninin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı sıcaklık ve antibiyotik stresinde ise azaldığı tespit edilmiştir. Diğer tüm stres koşulları altında ise *zapA*, *zapB*, *zapC* ve *zapD* genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Özellikle *zapC* geni kontrol grubu hücrelerinde pozitif eksprese edilirken, VBNC hücrelerde negatif eksprese olmuştur. Farklı stres şartları altında üç farklı hastane izolatı *P. mirabilis* ile yapılan bir başka çalışmada, *zapA* genin ekspresyon seviyesinin suşlar ve uygulanan stres faktörlerine göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Wasfi vd., 2020). *E. coli*'de Zap proteinleri ile gerçekleştirilen önceki çalışmalarda ferrat ve monokloramin dezenfektanlarının *zapA* geninin ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada hücre bölünmesi ve zarf bütünlüğü ile ilişkili *damX* geninin ekspresyon seviyesinin de ferrat ve monokloramin dezenfektanları varlığında azaldığı gözlenmiştir (Daer vd., 2021). Benzer şekilde çalışmamızda da tüm stres şartları altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde *damX* geninin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ancak yüksek CO₂ basıncı ile VBNC duruma indüklenen *E. coli* hücrelerinde ise *damX* geninin ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. (Zhao vd., 2016). Bu bulgular, *damX* geninin VBNC durumdaki hücrelerde ekspresyonunun stres türüne bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ve literatürde bu konuda rapor edilen sonuçların birbirinden farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, *damX* geninin VBNC durumu üzerindeki etkileri ve bu genin farklı stres şartlarına yanıtı hakkında daha

kapsamlı bir çalışma yapılmalıdır. Bunun yanında genel olarak çalışmamızda tüm stres koşulları altında *zapA*, *zapB*, *zapC* ve *zapD* genlerinin azalan ekspresyon seviyeleri ise bu genlerin hücre bölünmesi ve FtsZ halkasının stabilitesinde kritik roller üstlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu sonuçlar bir bölünememe durumu olan VBNC durumunda genlerin rollerinin baskılandığını işaret etmektedir. Özellikle *zapC* geninin kontrol grubunda pozitif, VBNC hücrelerde ise negatif ekspresyona edilmesi, bu genin hücre bölünmesinde ve VBNC durumunun düzenlenmesinde anahtar rol oynadığını göstermektedir.

Zhao vd. (2016) *E. coli* de yapmış oldukları çalışmalarında DicC proteinini kodlayan *z2046* geninin ekspresyonunun azaldığını belirlemişlerdir (Zhao vd., 2016). Bu sonuç çalışmamızda elde edilen veriler ile uyumludur. Yüksek karbondioksit basıncı altında *E. coli* O157:H7 ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada *dicC* mutant, *dicA* ve *dicC* aşırı ekspresyon suşlarının VBNC durumu araştırılmış ve *dicC* mutant ve *dicA* aşırı ekspresyon suşlarında VBNC hücre sayısının arttığı ancak *dicC* aşırı ekspresyona eden suşta azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmanın devamında asit ve H₂O₂ stresleri altında bu suşların VBNC durumları da analiz edilmiş ve yüksek karbondioksit basıncı ile aynı sonuçlar elde edilmiştir. Yani çalışmada VBNC hücrelerinin oluşumunda DicC'nin, negatif düzenleyici olabileceğini göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada tüm stres şartlarında *dicB* mutant suşunun VBNC durumu da araştırılmış ve tüm stres şartlarında *dicB* mutant suşta VBNC hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir (Pan vd., 2019). Çalışmamızda tüm stres koşulları altında VBNC durumdaki hücrelerde *dicC* ve *dicB* geninin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. DicB, MinC negatif düzenleyicisi MinD ile az bir homoloji göstermektedir. Hücre bölünmesi sırasında MinC, MinD ile etkileşime girebildiği gibi DicB ile de etkileşime girebilmektedir. DicB, hücre bölünmesini engellemek için FtsZ polimerizasyonunun negatif düzenleyicisi MinC'yi septuma lokalize eder ve böylelikle FtsZ nin depolimerize olmasına sebep olarak hücre bölünmesini engellemektedir (Ragunathan vd., 2023; Yang vd., 2016). DicC ve DicB gibi negatif düzenleyicilerde ekspresyonda meydana gelen azalma, hücrelerin bölünme süreçlerini ve adaptif yanıtlarını etkileyerek, stres koşullarında hayatta kalmalarına katkı sağlayabilmektedir.

Bu tez çalışmasında belirtilen genler, hücre bölünmesi, septum oluşumu ve hücre zarının ayrılması gibi hayati öneme sahip kritik süreçlerden sorumlu olan genlerdir. Bu genlerin ekspresyon seviyesinde meydana gelen azalma, hücre bölünme hızının azalmasına ve hücrenin enerji tasarrufu yapabilmesine olanak sağlamaktadır. Mikroorganizmalar için hücre bölünmesi, oldukça maliyetli bir süreçtir. Oysa VBNC durum, çevresel streslerle başa çıkabilmek ve hayatta kalabilmek için hücrelerin metabolik aktivitelerini minimuma indirdikleri ve zorlu

çevresel koşullara daha dayanıklı hale geldikleri bir süreçtir. Dolayısıyla, bölünme ile ilişkili genlerin ekspresyonunun azalması, hücrelerin hayatta kalma stratejilerinin bir parçası olarak değerlendirilebilmektedir.

Sonuç olarak, bölünme ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki azalma, VBNC duruma geçmiş hücrelerde enerji tasarrufu ve hayatta kalma süresinin uzatılması açısından kritik bir adaptif yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmada gerçekleştirilen analizler, *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* genlerinin VBNC durumunun moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için mevcut stres koşullarında daha detaylı analizlerinin yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu doğrultuda, kontrol grubuna kıyasla ekspresyon seviyelerinde azalma gözlemlenen bu genlerin işlevsel rollerini daha iyi anlamak amacıyla, ilgili genlerin aşırı eksprese edildiği rekombinant hücreler oluşturulmuştur. Bu süreçte, ilgili genler bir ekspresyon plazmidine klonlanmış ve ardından transformasyon yöntemi kullanılarak *E. coli* hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında, rekombinant hücrelerde bu genlerin aşırı ekspresyonunun, aynı stres şartları altında VBNC durum ile ilişkisi yeniden incelenmiştir. Bu yaklaşımla, *dicB*, *dicC*, *ymgF* ve *zapC* genlerinin hücrel stres yanıtlarındaki ve hayatta kalma stratejilerindeki spesifik rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada sıcaklık stresi varlığında DicB, YmgF ve ZapC rekombinant hücrelerde VBNC hücre sayısının kontrol grubu hücrelerine (yabani tip *E. coli* W3110 ve boş vektör içeren *E. coli* W3110) kıyasla azaldığı ve hücrelerin öldüğü tespit edilmiştir. DicC rekombinant hücrelerinin ise kontrol grubu hücreleri ile benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Bakır metali varlığında gerçekleştirilen yaşam deneylerinde ise DicB ve DicC rekombinant hücrelerinin kontrol grubu hücreleri ile benzer sonuçlar verdiği, YmgF ve ZapC rekombinant hücrelerde ise VBNC hücre sayısının azaldığı ve hücrelerin öldüğü tespit edilmiştir. Eritromisin antibiyotigi varlığında gerçekleştirilen yaşam deneylerinde ise DicB, DicC ve YmgF rekombinant hücrelerinin kontrol grubu hücreleri ile benzer sonuçlar verdiği, ZapC rekombinant hücrelerinde ise VBNC hücre sayısının kontrol grubu hücreleri göre azaldığı ve hücrelerde ölümün meydana geldiği gözlenmiştir. DicB'nin aşırı ekspresyonunda elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur. Çünkü yüksek CO₂ basıncı altında *dicB* mutant suşları ile gerçekleştirilen çalışmada, H₂O₂ ve asit stresi altında VBNC hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir (Pan vd., 2019). Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda ise, çalışılan tüm stres şartları altında VBNC hücrelerde *dicB* geninin ekspresyonu azalmış ancak DicB'nin aşırı eksprese edildiği hücrelerde ise VBNC hücre sayısının azaldığı ve hücrelerin ölüme sürüklendiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, literatürdeki bulgularla uyumlu olup, birbirini destekler niteliktedir. Sonuç olarak bu

rekombinant hücreler arasında, tüm stres şartları altında sadece ZapC'nin VBNC durumda bir rolünün olduğu tespit edilmiştir. Çünkü kontrol grubu hücrelerine kıyasla *zapC* geninin aşırı eksprese edildiği hücrelerde VBNC hücre sayısının azaldığı ve hücrelerin VBNC duruma girmek yerine ölmeyi tercih ettiği gözlenmiştir. Bu sonuç, literatürde ZapC'nin FtsZ polimerleri ile kusurlu bir bileşim oluşturarak hücre bölünmesini engellediği ve hücre ölümüne yol açtığı bilgisiyle uyumludur (Ortiz vd., 2017).

VBNC durumdaki hücrelerin metabolizma ve gen ekspresyonu gibi faaliyetlerini minimum seviyeye indirmelerinin sonucu olarak protein ve nükleik asit miktarlarında azalmanın meydana geldiği bilinmektedir. Ayrıca, VBNC duruma indüklenen hücrelerin peptidoglikan çapraz bağlarında, lipoproteinlerinde, glikan zincirlerinde ve yağ asidi bileşiminde kapsamlı modifikasyonların meydana geldiği tespit edilmiştir (Fu vd., 2020; González-Escalona vd., 2006; Hung vd., 2013; Robben vd., 2018, 2019). Bu modifikasyonlar, VBNC duruma indüklenen hücrelerin stres şartları altında hayatta kalabilmeleri için fayda sağlamaktadır. Ancak stres koşulları altında meydana gelen membran hasarı, hücrelerin VBNC duruma geçmesinin olası bir nedeni olabilir. Bu sebeple çalışmamızda VBNC duruma indüklenen hücrelerde lipit peroksidasyonu analizi ve ATR- FTIR tekniği kullanılarak hücrenin temel bileşenlerinin analizi yapılmıştır.

VBNC durumdaki mikroorganizmalar çevresel stres faktörlerine maruz kaldığında antioksidan savunma mekanizmaları zayıflayabilir, bu da serbest radikal oluşumunun artmasına ve dolayısıyla lipit peroksidasyonunun artmasına neden olabilir. Çok sayıda çalışma, VBNC durumdaki hücrelerde lipit peroksidasyonunda artış olduğunu göstermiştir (Borkar vd., 2024; Dolezalova & Lukes, 2015; Joshi vd., 2011; Yost & Joshi, 2015). Ancak literatürde metal antibiyotik ve sıcaklık kullanılarak VBNC duruma indüklenen hücrelerde lipit peroksidasyonu analizleri gerçekleştirilmemiştir. Çalışmamızda farklı stres koşulları altında VBNC durumuna indüklenen *E. coli* W3110 hücrelerinde MDA miktarları TBARS tahlili ile ölçüldüğünde, uygulanan her üç stres koşulunda da lipit peroksidasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir. Lipit peroksidasyonunun gerçekten çalışılan tüm streslerde VBNC hücrelerden kaynaklandığını ve besin eksikliğinden kaynaklanmadığını göstermek için çalışmamızda kontrol grubu olarak hem logaritmik faz hücreleri hem de stres faktörlerinin olmadığı ancak açlık ortamında inkübe edilen hücreler kullanılmıştır. Bu kontrol grupları, elde edilen sonuçların spesifik olarak VBNC durumuna bağlı olduğunu ve besin eksikliğinin bir sonucu olmadığını doğrulamak amacıyla seçilmiştir. Özellikle metal ve antibiyotik stresine maruz kalarak VBNC olan hücrelerde, MDA konsantrasyonunun her iki kontrol grubu hücrelerine kıyasla önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

Bu artışın nedeni hem metalin hem de antibiyotik serbest radikal oluşumunu artırarak hücre zarının oksidatif bozulmasına neden olması ve bu da lipid peroksidasyon son ürünlerinin oluşumuna yol açması olabilir.

Çalışmamızda gerçekleştirilen kızılötesi spektrokimyasal analizler sonucunda VBNC duruma indüklenen hücrelerde kontrol grubu hücrelerine kıyasla protein ve nükleik asit bantlarında azalma tespit edilmiştir. Literatürde ATR-FTIR yöntemi kullanılarak mikroorganizmalarda temel bileşenlerin analizi gerçekleştirilmektedir. Ancak literatürde çalışmamızda kullandığımız stres şartları ve kontrol gruplarındaki farklılıkların ön plana çıkarıldığı, VBNC üzerine detaylı analizlerin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Soğuk stresi altında (4 °C/-18 °C) yaralanmış ancak hücre canlılığı devam eden *E. coli* ile yapılan bir çalışmada 2966 cm⁻¹, 2929 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹ (lipid), 1637 cm⁻¹, 1545 cm⁻¹ (proteinlerin ikincil yapısı) ve 1235 cm⁻¹ (fosfodiesterler) spektral bantlarının pozisyonları kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır. Aynı çalışmada -18 °C'de yapılan deneylerde lipitler, nükleik asitler ve yapısal proteinlerle ilişkili bantların yoğunluğunda da azalma olduğu ortaya çıkmıştır (Lu vd., 2011). Başka bir çalışmada, farklı dozlarda serbest klor (0,0-1,0 ppm) maruz bırakılan *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 15442 hücrelerinde 1800-1300 cm⁻¹ spektral bölgede önemli değişiklikler belirlenmiştir. Ayrıca yapılan PCA analizleri sonucunda klor maruz kalan hücreler ile klor maruz kalmayan hücrelerin birbirinden ayrıldığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda yaralı ve VBNC durumdaki su kaynaklı patojenlerin varlığını tespit etmek için FTIR spektroskopisinin uygulanabilir olabileceği öne sürülmüştür (Al-Qadiri vd., 2008). *Lentilactobacillus hilgardii* hücrelerinde soğuk plazma uygulaması sonrasında yapılan FTIR analizleri sonucunda, normal hücrelere kıyasla VBNC hücrelerde önemli sayıda spektral değişiklik olduğu tespit edilmiştir. Plazma uygulaması sonrasında ~2960 cm⁻¹ ve 2920 cm⁻¹ bantlarında azalma, 1375 cm⁻¹, 1720 cm⁻¹ ve 1045 cm⁻¹ civarındaki bantlarda ise belirgin bir artış belirlenmiştir. Bu değişikliklerin, özellikle yağ asitleri, karbonhidratlar, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlere ait fonksiyonel grupların titreşimleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Niedzwiedz vd., 2020). Yüksek fenol konsantrasyonu ile VBNC duruma indüklenen *Candida sp.* LN1 suşunda yapılan FTIR analizlerinde, normal hücrelere kıyasla daha fazla bant olduğu ve tespit edilen bu bantlarda normal hücrelere kıyasla farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bantlar arasında 2955 cm⁻¹ (metil grubu asimetric titreşim bandı), 1539 cm⁻¹ (proteinlerin amid I ve II bantları) ve 1044 cm⁻¹'deki polisakkaritler/nükleik asitlerle ilişkili bantlarda farklılıklar tespit edilmiştir. Ayrıca 1000 ila 900 cm⁻¹ spektral bölgede gözlenen absorpsiyon bantları, hücre duvarındaki

karbonhidratlara ve polisakkaritlere atanmış ve belirlenen bu bantların VBNC durumunun göstergeleri olduğu kabul edilmiştir (Xie vd., 2021). Sıcaklık ve oksijen gerilimindeki değişiklikler yoluyla VBNC duruma indüklenen *C. jejuni* ile yapılan bir çalışmada Moen ve ark. (2005) proteinlerde azalma, polisakkaritlerde ise artış gözlemlenmiştir (Moen vd., 2005). Benzer şekilde, norfloksasin antibiyotiği varlığında VBNC durumuna indüklenen *R. bifenilivorans* hücrelerindeki peptidoglikanın moleküler yapısı, ATR-FTIR spektroskopik yöntemi kullanılarak araştırılmış ve 1200-800 cm^{-1} bölgesinde küçük ama anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Jia vd., 2020).

Çalışmamızda elde edilen bulgular, mevcut literatürden elde edilen destekleyici kanıtlarla birlikte, kemometrik araçlarla birleştirilmiş FTIR spektroskopisinin, geleneksel mikrobiyal teknikler kullanılarak tespit edilemeyen VBNC bakterilerinin varlığını tespit etmek için uygulanabilir bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız özellikle 995 cm^{-1} deki RNA bandının, *E. coli* W3110 hücrelerinin VBNC durumunda hızlı ve ekonomik tespiti için önemli bir sonuç olduğunu vurgulamaktadır. Bu nedenle, FTIR spektroskopisi ve veri madenciliği teknikleri gibi hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli yaklaşımların tanınması ve kullanılması, halk sağlığının korunması ve gıda güvenliğinin sağlanması açısından son derece önemli hale gelmektedir. Bu nedenle gelecekteki çalışmalar, çeşitli mikroorganizma türlerini VBNC durumuna indüklerken bu bandın özgülüğünü keşfetmeye odaklanmalıdır. VBNC durumuna girseler de girmeseler de mikroorganizmalar çevresel stresle başa çıkmak için çeşitli stratejiler geliştirirler. Bu mekanizmalar arasında RNA sentezi ve ekspresyonundaki artış yer almaktadır. Özellikle stres koşullarında spesifik genlerin ekspresyonu artarak RNA düzeylerinde artışa neden olabilir. Ayrıca mikroorganizmaların stres koşullarında uzun süre hayatta kalabilmek için metabolik aktivitelerini azaltma eğiliminde oldukları da bilinen bir gerçektir. Bu durumda bakteriler temel hücresel fonksiyonlarını sürdürmek için enerji tasarrufu stratejilerini kullanırlar. Dolayısıyla artan RNA miktarı, hücrelerin genetik materyallerini korumalarına ve potansiyel olarak uygun koşullar altında çoğalmalarına yönelik bir adaptasyon mekanizması olabilmektedir (Blazewicz vd., 2013; Rhodius vd., 2005). Literatürde yapılan çalışmalar, VBNC durumundaki organizmaların ölçülebilir miktarda rRNA içerdiğini (Chambon vd., 1968) ve bazı durumlarda vejetatif duruma göre önemli ölçüde daha fazla rRNA içerebileceğini göstermiştir (Sukenic vd., 2012). RNA içeriğindeki artışın bir diğer nedeni ise mikroorganizmalarda bulunan sinyal iletim sistemidir. Bu sistemlerde çevresel stresleri algılayan bir sensör kinaz ve streslere tepki veren bir yanıt düzenleyici bulunmaktadır. Bu mekanizmalar aracılığıyla stresle ilişkili belirli genlerin regülasyonu sağlanır ve hücre içi

yanıtlar oluşturulurken gen ekspresyonunu düzenleyen RNA moleküllerinin üretimi de artmaktadır (Beier & Gross, 2006; Groisman, 2016; Piattelli vd., 2020). Ayrıca mikroorganizmalarda spor oluşumu sırasında genellikle RNA miktarında artışın meydana geldiği gözlenmektedir. Spor oluşum süreci, mikroorganizmaların uygun olmayan çevre koşullarına karşı geçici olarak dirençli bir forma geçmesi anlamına gelir. Bu işlem sırasında bakteri hücresi, esasen kromozomal DNA'sını korurken, nükleik asit sentezi ve protein üretimi gibi metabolik aktivitelerini büyük ölçüde azaltır veya durdurur. Ancak spor oluşum süreci birçok düzenleyici genin aktivasyonuna ve bazı genlerin ekspresyonunun artmasına yol açabilir. Buda özellikle spor oluşumu için gerekli olan spesifik proteinlerin sentezini mümkün kılar. Bu nedenle spor oluşumu sırasında bazı genlerin ekspresyonundaki artışa bağlı olarak hücrede RNA miktarında artış meydana gelebilmektedir (Segev vd., 2012; Setlow & Christie, 2020; Traag vd., 2013). Aynı şey, mikroorganizmaların kendilerini çevresel streslerden korumak için bir araya geldiği biyofilm oluşumu için de geçerlidir. Biyofilm oluşumu sırasında mikroorganizmalar, gen ekspresyonu ve metabolik aktivitelerini değiştirerek çevresel koşullara uyum sağlar. Özellikle de biyofilm içindeki hücreler arası iletişim ve koordinasyonu sağlamak için çeşitli genlerin ekspresyonunda artışa giderek RNA sentezi ve ekspresyonunda bir artış söz konusu olur (Condinho vd., 2023; Ghaz-Jahanian vd., 2013; Martínez & Vadyvaloo, 2014; Mitra & Mukhopadhyay, 2023). Sonuç olarak, bakterilerin çevresel streslere adaptasyonu sırasında RNA miktarındaki artış, genetik materyali koruma ve potansiyel olarak üreme yeteneklerini koruma stratejilerinin bir parçası olabilir. Bu, bakterilerin uzun süre hayatta kalması ve VBNC durumundayken stres koşullarına uyum sağlaması için önemli bir adaptasyon mekanizması olabilir.

6. SONUÇ

İlk kez 1982 yılında keşfedilen canlı fakat kültürü yapılamayan hücre (VBNC) durumu, bakterilerin stresli koşullar altında hayatta kalabilmek için geliştirdikleri bir yaşam stratejisi olarak değerlendirilmektedir. Mikroorganizmalar bu forma girdiklerinde rutin laboratuvar yöntemleri ile tespit edilemedikleri ve koloni oluşturamadıkları için gözden kaçabilmektedir. Bununla birlikte, bu bakterilerin patojeniteleri hem VBNC durumundayken hem de çevresel şartlar normale dönüp yeniden canlandıklarında devam edebilmektedir. Bugüne kadar, VBNC durumunun moleküler mekanizmasının çözümüne yönelik, birçok mikroorganizma türü ve farklı stres koşulları altında çalışmalar gerçekleştirilmiş ve mekanizmayı aydınlatacak bazı proteinler tespit edilmiştir. Ancak, bu alandaki araştırmalara rağmen, VBNC durumunun tam anlamıyla anlaşılmasına yönelik kesin bir çözüm henüz bulunamamıştır. Dahası VBNC durumdaki mikroorganizmalar sucul çevreler, gıda işleme tesisleri, tarım ürünleri, hastaneler gibi birçok ortamda karşımıza çıkmakta ve halk sağlığını tehdit etmektedir. Bu sebeple VBNC durumunun anlaşılması ve bu hücrelerin tespiti için hızlı ve ucuz yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi, mikrobiyal ekoloji ve halk sağlığı alanlarında önemli gelişmelere olanak sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, *E. coli* W3110 suşu, sıcaklık (42 °C), metal (CuSO₄) ve antibiyotik (Eritromisin) olmak üzere üç farklı stres şartı altında VBNC duruma indüklenmiştir. Yapılan plak sayım ve Live/Dead sayım sonuçları ile hücrelerin VBNC duruma geçtiği doğrulanmıştır. VBNC duruma indüklenen hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile analiz edilmiştir. SEM sonuçları, her üç stres şartı altında hücre morfolojilerinin kontrol grubu hücrelerine kıyasla küçüldüğünü göstermiştir. TEM sonuçları ise, VBNC hücrelerde ribozom sayısındaki azalmadan ötürü sitoplazmik matrisin daha az yoğun olduğunu ve hücre iç ve dış zarı arasında bir boşluk meydana geldiğini ortaya koymuştur.

Real-Time PCR analizleri ile, VBNC duruma indüklenen hücrelerde 52 genin ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve sıcaklık stresi altında 24, metal stresi altında 30, antibiyotik stresi altında ise 8 genin ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Tüm stres şartları altında *dicB*, *ymgF* ve *zapC* genlerinin benzer sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Rekombinant suşlar oluşturularak bu genlerin aşırı eksprese edilmesi sonucunda, sıcaklık stresine maruz kalan DicB, YmgF ve ZapC rekombinant suşlarında VBNC hücre sayısının kontrol grubu hücrelerine kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Metal stresi varlığında YmgF ve ZapC, antibiyotik stresi varlığında ise sadece ZapC rekombinant suşunda VBNC hücre sayısının azaldığı

gözenmiştir. Bu sonuçlar, ZapC'nin sıcaklık, metal ve antibiyotik stresi altında VBNC hücrelerinin oluşumunu negatif olarak düzenleyebileceğini göstermektedir.

VBNC duruma indüklenen hücrelerde lipid peroksidasyonu analizleri gerçekleştirilmiş ve her üç stres koşulunda da lipid peroksidasyonunun meydana geldiği tespit edilmiştir. Özellikle metal ve antibiyotik stresine maruz kalan VBNC hücrelerinde MDA (malondialdehit) konsantrasyonunun belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, VBNC durumunun oluşumunda oksidatif stresin önemli bir rol oynayabileceğini de göstermektedir.

ATR-FTIR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen analizler, VBNC durumun indüksiyonu sırasında RNA, protein ve nükleik asit konsantrasyonlarında biyomoleküler değişiklikler ortaya koymuştur. Özellikle 995 cm^{-1} 'deki RNA bandının VBNC durumdaki bakterilerde arttığı belirlenmiş ve bu bandın *E. coli* W3110'un laboratuvar koşulları altında VBNC durumunun tespitinde güvenilir bir spektrokimyasal biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada farklı stres koşulları altında VBNC duruma indüklenen *E. coli* W3110 hücreleri ile gerçekleştirdiğimiz araştırmalarda, hem Real Time PCR analizleri ile belirlenen *zapC* geni hem de IR spektroskopisi analizleri sonucunda belirlenen 995 cm^{-1} bandının, VBNC durumunun tespiti ve moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik önemli katkılar sağladığı ortaya konulmaktadır. Gelecekte yapılacak araştırmalar, bu bulguları daha da ileriye taşıyarak mikrobiyal ekoloji ve halk sağlığı alanlarında önemli katkılar sağlayacaktır. VBNC duruma geçişin moleküler mekanizmasının aydınlatılması, hem bu hücrelerin indüklenmesini önleyici stratejilerin geliştirilmesine hem de yeni tespit yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. VBNC durumunun tespiti ve kontrolü, sucul çevreler, gıda işleme tesisleri, tarım ürünleri ve hastaneler gibi birçok ortamda halk sağlığını koruma açısından kritik öneme sahiptir. Bu tez kapsamında elde edilen veriler, VBNC durumun moleküler mekanizmasının çözümüne yönelik gelecekteki araştırmalar için sağlam bir temel oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

Abdallah, F. Ben, Lagha, R., & Bakhrouf, A. (2008). Resuscitation and Morphological Alterations of *Salmonella Bovismorbificans* Cells under Starvation in Soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1507-1512.

Abe, A. vd. (2007). Isolation and Characterization of A Cold-Induced Non-Culturable Suppression Mutant of *Vibrio vulnificus*. *Microbiological Research*, 162(2), 130-138.

Afari, G. K., & Hung, Y. C. (2018). Detection and Verification of the Viable but Non-Culturable (VBNC) State of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Using Flow Cytometry and Standard Plating. *Journal of Food Science*, 83(7), 1913-1920.

Alexander, E., Pham, D., & Steck, T. R. (1999). The Viable-but-Non-Culturable Condition is Induced by Copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3754-3756.

Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 1-14.

Al-Qadiri, H. M. vd. (2008). Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Absorbance Spectroscopy and Multivariate Analysis to Study the Effect of Chlorine-Induced Bacterial Injury in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8992-8997.

Altuvia, S., Storz, G., & Papenfort, K. (2018). Cross-Regulation Between Bacteria and Phages at A Posttranscriptional Level. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 10-1128.

Amel, B. K. N., Amine, B., & Amina, B. (2008). Survival of *Vibrio fluvialis* in Seawater under Starvation Conditions. *Microbiological Research*, 163(3), 323-328.

Ardahanlı, İ. vd. (2022). Infrared Spectrochemical Findings on Intermittent Fasting-Associated Gross Molecular Modifications in Rat Myocardium. *Biophysical Chemistry*, 289, 106873.

Asakura, H. vd. (2002). Passage in Mice Causes a Change in the Ability of *Salmonella enterica* serovar *Oranienburg* to Survive NaCl Osmotic Stress: Resuscitation from the Viable but Non-Culturable State. *FEMS Microbiology Letters*, 212(1), 87-93.

Asakura, H. vd. (2005). Role of In vivo Passage on the Environmental Adaptation of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Cross-Induction of the Viable but Non-

Culturable State by Osmotic and Oxidative Stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), 243-249.

Asakura, H. vd. (2007a). Gene Expression Profile of *Vibrio cholerae* in the Cold Stress-Induced Viable but Non-Culturable State. *Environmental Microbiology*, 9(4), 869-879.

Asakura, H. vd. (2007b). Proteomic Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the Oxidation-Induced Viable but Non-Culturable State. *Microbiology and Immunology*, 51(9), 875-881.

Asakura, H. vd. (2008). Differential Expression of the Outer Membrane Protein W (OmpW) Stress Response in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Corresponds to the Viable but Non-Culturable State. *Research in Microbiology*, 159(9-10), 709-717.

Aurass, P., Prager, R., & Flieger, A. (2011). EHEC/EAEC O104:H4 Strain Linked with the 2011 German Outbreak of Haemolytic Uremic Syndrome Enters into the Viable but Non-Culturable State in Response to Various Stresses and Resuscitates upon Stress Relief. *Environmental Microbiology*, 13(12), 3139-3148.

Ayrapetyan, M., Williams, T. C., & Oliver, J. D. (2014). Interspecific Quorum Sensing Mediates the Resuscitation of Viable but Non-Culturable *Vibrios*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2478- 2483.

Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship Between the Viable but Non-Culturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of Bacteriology*, 200(20), 10-1128.

Azam, M. S., & Vanderpool, C. K. (2018). Translational Regulation by Bacterial Small RNAs Via an Unusual Hfq-Dependent Mechanism. *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2585-2599.

Bai, H. vd. (2019). Citric Acid can Force *S. aureus* into Viable but Non-Culturable State and Its Characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108254.

Bai, K. vd. (2022). RNA-Seq Analysis Discovers the Critical Role of Rel in ppGpp Synthesis, Pathogenicity, and the VBNC State of *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 112(9), 1844-1858.

Balasubramanian, D. vd. (2016). A Prophage-Encoded Small RNA Controls Metabolism and Cell Division in *Escherichia coli*. *mSystems*, 1(1), 10-1128.

- Bamford, R. A. vd.** (2017). Investigating The Physiology of Viable but Non-Culturable Bacteria by Microfluidics and Time-Lapse Microscopy. *BMC biology*, 15, 1-12.
- Barbau-Piednoir, E. vd.** (2018). Detection and Discrimination of Five *Escherichia coli* Pathotypes Using a Combinatory SYBR® Green qPCR Screening System. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3267-3285.
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. S.** (2022). *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. *Escherichia coli-Old and New Insights*.
- Bates, D. B. vd.** (1997). The Absence of Effect of *gid* or *mioC* Transcription on the Initiation of Chromosomal Replication in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12497-12502.
- Bédard, E. vd.** (2014). Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* Culturability Following Copper- and Chlorine-Induced Stress. *FEMS Microbiology Letters*, 356(2), 226-234.
- Beier, D., & Gross, R.** (2006). Regulation of Bacterial Virulence by Two-Component Systems. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 143-152.
- Béjar, S., Cam, K., & Bouché, J. P.** (1986). Control of Cell Division in *Escherichia coli*. DNA Sequence of *dicA* and of a Second Gene Complementing Mutation *dicA1*, *dicC*. *Nucleic Acids Research*, 14(17), 6821-6833.
- Bekir, K. vd.** (2015). Electrochemical Impedance Immunosensor for Rapid Detection of Stressed Pathogenic *Staphylococcus aureus* Bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), 15796-15803.
- Besnard, V. vd.** (2002). Environmental and Physico-Chemical Factors Induce VBNC State in *Listeria monocytogenes*. *Veterinary Research*, 33(4), 359-370.
- Bikandi, J. vd.** (2004). In Silico Analysis of Complete Bacterial Genomes: PCR, AFLP-PCR and Endonuclease Restriction. *Bioinformatics Applications Note*, 20(5), 798-799.
- Blazewicz, S. J. vd.** (2013). Evaluating rRNA as an Indicator of Microbial Activity in Environmental Communities: limitations and uses. *The ISME Journal*, 7(11), 2061-2068.
- Bhagwat, A. A. vd.** (2006). Functional Heterogeneity of RpoS in Stress Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4978-4986.

- Boaretti, M. vd.** (2003). Involvement of *rpoS* in the Survival of *Escherichia coli* in the Viable but Non-Culturable State. *Environmental Microbiology*, 5(10), 986-996.
- Bollen, C., Dewachter, L., & Michiels, J.** (2021). Protein Aggregation as A Bacterial Strategy to Survive Antibiotic Treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 669664.
- Bonten, M. vd.** (2021). Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*, 72(7), 1211-1219.
- Borkar, S. B. vd.** (2024). Plasma-Generated Nitric Oxide Water: A Promising Strategy to Combat Bacterial Dormancy (VBNC state) in Environmental Contaminant *Micrococcus luteus*. *Journal of Hazardous Materials*, 461, 132634.
- Bottomley, A. L. vd.** (2020). The novel *Escherichia. coli* Cell Division Protein, YtfB, Plays A Role in Eukaryotic Cell Adhesion. *Scientific Reports*, 10(1), 6745.
- Bouché, F., & Bouché, J. P.** (1989). Genetic Evidence that DicF, a Second Division Inhibitor Encoded by the *Escherichia coli dicB* Operon, is Probably RNA. *Molecular Microbiology*, 3(7), 991-994.
- Boulos, L. vd.** (1999). Live/Dead (®) BacLight (TM): Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 77-86.
- Bovill, R. A., & Mackey, B. M.** (1997). Resuscitation of “Non-Culturable” Cells From Aged Cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 143(5), 1575-1581.
- Brown, M. R., & Kornberg, A.** (2008). The Long and Short of It—Polyphosphate, PPK and Bacterial Survival. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(6), 284-290.
- Bruhn-Olszewska, vd.** (2018). Physiologically Distinct Subpopulations Formed in *Escherichia coli* Cultures in Response to Heat Shock. *Microbiological Research*, 209, 33-42.
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.D.** (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560-602.
- Buczek, M. S., Arevalo, A. L. C., & Janakiraman, A.** (2016). ClpXP and ClpAP Control the *Escherichia coli* Division Protein ZapC by Proteolysis. *Microbiology*, 162(6), 909.

- Cai, J. vd.** (2023). Identification of Determinants for Entering into a Viable but Non-Culturable State in *Vibrio alginolyticus* by Tn-seq. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(5-6), 1813-1827.
- Calo-Mata P. vd.** (2016). Novel Peptide Biomarker Discovery for Detection and Identification of Bacterial Pathogens by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 7(1), 296.
- Cam, K. vd.** (1988). Identification and Sequence of Gene *dicB*: Translation of the Division Inhibitor from an in-Phase Internal Start. *Nucleic Acids Research*, 16(14), 6327-6338.
- Capozzi, V. vd.** (2016). Viable But Non-Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine: New Insights on Molecular Basis of VBNC Behaviour Using a Transcriptomic Approach. *Food Microbiology*, 59, 196-204.
- Cappelier, J. M. vd.** (1997). Double Staining (CTC-DAPI) for Detection and Enumeration of Viable but Non-Culturable *Campylobacter jejuni* Cells. *Veterinary Research*, 28(6), 547-555.
- Casasola-Rodríguez, B. vd.** (2018). Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR Based on Differential Gene Expression Analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 365(15), 1-8.
- Cervero-Aragó, S. vd.** (2019). Viability and Infectivity of Viable but Non-Culturable *Legionella pneumophila* Strains Induced at High Temperatures. *Water Research*, 158, 268-279.
- Ceylani, T. vd.** (2022). Intermittent Fasting-Induced Biomolecular Modifications in Rat Tissues Detected by ATR-FTIR Spectroscopy and Machine Learning Algorithms. *Analytical Biochemistry*, 654, 114825.
- Chaisowwong, W. vd.** (2012). Physiological characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: its potential for public threat. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(1), 43-50.
- Chambon, P., DuPraw, E. J., & Kornberg, A.** (1968). Biochemical Studies of Bacterial Sporulation and Germination: IX. Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid Polymerases in Nuclear Fractions of Vegetative Cells and Spores of *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 243(19), 5101-5109.
- Chang, C. W., & Lin, M. H.** (2018). Optimization of PMA-qPCR for *Staphylococcus aureus* and Determination of Viable Bacteria in Indoor Air. *Indoor Air*, 28(1), 64-72.

- Chen, S. vd.** (2018). Induction of *Escherichia coli* into a VBNC State Through Chlorination/Chloramination and Differences in Characteristics of the Bacterium Between States. *Water Research*, 142, 279-288.
- CLSI.** (2018). Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. 11th Edition. Wayne,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Colwell, R. R. vd.** (1996). Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* O1 Revert to a Cultivable State in the Human Intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 28-31.
- Combs, A. N., & Silhavy, T. J.** (2024). Periplasmic Chaperones: Outer Membrane Biogenesis and Envelope Stress. *Annual Review of Microbiology*, 78.
- Condinho, M. vd.** (2023). The Role of RNA Regulators, Quorum Sensing and c-di-GMP in Bacterial Biofilm Formation. *FEBS Open Bio*, 13(6), 975-991.
- Coutard, F. vd.** (2007a). Real-Time Reverse Transcription-PCR for Transcriptional Expression Analysis of Virulence and Housekeeping Genes in Viable but Non-Culturable *Vibrio parahaemolyticus* after Recovery of Culturability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5183-5189.
- Coutard, F. vd.** (2007b). Recovery in Culture of Viable but Non-Culturable *Vibrio parahaemolyticus*: Regrowth or Resuscitation? *ISME Journal*, 1(2), 111-120.
- Daer, S., Goodwill, J. E., & Ikuma, K.** (2021). Effect of Ferrate and Monochloramine Disinfection on the Physiological and Transcriptomic Response of *Escherichia coli* at Late Stationary Phase. *Water Research*, 189, 116580.
- Darcın C.** (2005). *Karadeniz Suyunda pH, Osmolarite ve Açlık Stresinin Escherichia coli'nin Dış Membran Porin Protein Sentez Düzeyine Etkisinin Araştırılması*. (Doktora Tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Darcın, C. vd.** (2009). Viable but Non-Culturable State (VBNC) of *Escherichia coli* Related to EnvZ under the Effect of pH, Starvation and Osmotic Stress in Sea Water. *Polish Journal of Microbiology*, 58(4), 307-317.
- Darcın, C., Özkanca, R., Flint, K. P.** (2003). Survival of Nonspecific Porin-Deficient Mutants of *Escherichia coli* in Black Sea Water. *Letters in Applied Microbiology*, 37(5), 380-385.

- Defives, C. vd.** (1999). Total Counts, Culturable and Viable, and Non-Culturable Microflora of a French Mineral Water: A Case Study. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 1033-1038.
- Del Campo, R. vd.** (2009). *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Enters the VBNC State after Copper Treatment and Retains Its Virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 298(2), 143-148.
- Den Blaauwen, T., & Luirink, J.** (2019). Checks and Balances in Bacterial Cell Division. *mBio*, 10(1).
- Denamur, E. vd.** (2020). The Population Genetics of Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:1, 19(1), 37-54.
- Desnues, B. vd.** (2003). Differential Oxidative Damage and Expression of Stress Defence Regulons in Culturable and Non-Culturable *Escherichia coli* Cells. *EMBO Reports*, 4(4), 400-404.
- DiGiuseppe, P. A., & Silhavy, T. J.** (2003). Signal Detection and Target Gene Induction by The CpxRA Two-Component System. *Journal of Bacteriology*, 185(8), 2432-2440.
- Ding, T. vd.** (2017). Significance of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli*: Induction, Detection, and Control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 417-428.
- Dinu, L. D., & Bach, S.** (2013). Detection of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 from Vegetable Samples Using Quantitative PCR with Propidium Monoazide and Immunological Assays. *Food Control*, 31(2), 268-273.
- Dinu, L.D., & Bach, S.** (2011). Induction of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 in the Phyllosphere of Lettuce: a Food Safety Risk Factor. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23), 8295-8302.
- Dolezalova, E., & Lukes, P.** (2015). Membrane Damage and Active but Non-Culturable State in Liquid Cultures of *Escherichia coli* Treated with An Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Bioelectrochemistry*, 103, 7-14.
- Dong, K.** (2020). Induction, Detection, Formation, and Resuscitation of Viable but Non-Culturable State Microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 149-183.
- Dörr, T., Vulić, M., & Lewis, K.** (2010). Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB Toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biology*, 8(2), e1000317.

- Dreux, N.** (2007). Viable but Non-Culturable *Listeria monocytogenes* on Parsley Leaves and Absence of Recovery to A Culturable State. *Journal of Applied Microbiology*, *103*, 1272-1281.
- Du, M. vd.** (2007). Retention of Virulence in A Viable but Non-Culturable *Edwardsiella tarda* Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(4), 1349-1354.
- Du, S., Pichoff, S., & Lutkenhaus, J.** (2016). FtsEX Acts on FtsA to Regulate Divisome Assembly and Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), E5052-E5061.
- Durand-Heredia, J.** (2012). Identification of ZapD as A Cell Division Factor that Promotes the Assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *194*(12), 3189-3198.
- Dwidjosiswojo, Z.** (2011). Influence of Copper Ions on the Viability and Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under Conditions relevant to Drinking Water Environments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *214*(6), 485-492.
- Erukhimovitch, V. vd.** (2005). FTIR Microscopy as a Method for Identification of Bacterial and Fungal Infections. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *37*(5), 1105-1108.
- Espéli, O.** (2012). A MatP-Divisome Interaction Coordinates Chromosome Segregation with Cell Division in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, *31*(14), 3198-3211.
- Fakruddin, Md., Mannan, K. S. Bin, & Andrews, S.** (2013). Viable but Non-Culturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. *ISRN Microbiology*, *2013*, 1-6.
- Fan, J. vd.** (2023). Extended Lag Phase Indicates the Dormancy of Biphenyl Degrading *Rhodococcus biphenylivorans* TG9 under Heat Stress. *Environmental Pollution*, *322*, 121248.
- Fan, Z. vd.** (2024). Quantitative Detection of VBNC State *Pseudomonas aeruginosa* Contributing to Accurate Assessment of Microbial Inactivation in Drinking Water Disinfection. *Water*, *16*(2), 236.
- Faubladiert, M., & Bouche, J.P.** (1994). Division Inhibition Gene *dicF* of *Escherichia coli* Reveals a Widespread Group of Prophage Sequences in Bacterial Genomes. *Journal of Bacteriology*, *176*(4), 1150-1156.
- Fernandes, E. vd.** (2013). A Bacteriophage Detection Tool for Viability Assessment of Salmonella Cells. *Biosensors and Bioelectronics*, *52*, 239-246.

- Ferreira, I. C. C. vd.** (2020). Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Oncology*, 2020.
- Freestone, P. P. E. vd.** (1999). Stimulation of Bacterial Growth by Heat-Stable, Norepinephrine-Induced Autoinducers. *FEMS Microbiology Letters*, 172(1), 53-60.
- Friedmann, H. C. vd.** (2014). Escherich and *Escherichia*. *Ecosal Plus*, 6(1), 10-1128.
- Fu, Y. vd.** (2020). Induction of *Escherichia coli* O157:H7 into a Viable but Non-Culturable State by High Temperature and Its Resuscitation. *Environmental Microbiology Reports*, 12(5), 568-577.
- Galli, E., & Gerdes, K.** (2010). Spatial Resolution of Two Bacterial Cell Division Proteins: ZapA Recruits ZapB to the Inner Face of the Z-ring. *Molecular Microbiology*, 76(6), 1514-1526.
- Galli, E., & Gerdes, K.** (2012). FtsZ-ZapA-ZapB Interactome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 292-302.
- Gangaiah, D. vd.** (2009). Importance of Polyphosphate Kinase 1 for *Campylobacter jejuni* Viable-but-Non-Culturable Cell Formation, Natural Transformation, and Antimicrobial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7838-7849.
- Gengenbacher, M., & Kaufmann, S. H. E.** (2012). *Mycobacterium tuberculosis*: Success through Dormancy. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 514-532.
- Ghaz-Jahanian, M. A. vd.** (2013). Influence of Small RNAs on Biofilm Formation Process in Bacteria. *Molecular Biotechnology*, 55(3), 288-297.
- Gin, K. Y. H., & Goh, S. G.** (2013). Modeling the Effect of Light and Salinity on Viable but Non-Culturable (VBNC) Enterococcus. *Water Research*, 47(10), 3315-3328.
- González-Escalona, N. vd.** (2006). Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Analysis of *Vibrio cholerae* Cells Entering the Viable but Non-Culturable State and Starvation in Response to Cold Shock. *Environmental Microbiology*, 8(4), 658-666.
- Göpel, Y., & Görke, B.** (2018). Interaction of Lipoprotein QseG with Sensor Kinase QseE in the Periplasm Controls the Phosphorylation State of the Two-Component System QseE/QseF in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 14(7), e1007547.

- Grey, B. E., & Steck, T. R.** (2001a). The Viable but Non-Culturable State of *Ralstonia solanacearum* May Be Involved in Long-Term Survival and Plant Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3866-3872.
- Grey, B., & Steck, T. R.** (2001b). Concentrations of Copper Thought to Be Toxic to *Escherichia coli* Can Induce the Viable but Non-Culturable Condition. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3-12), 5325-5327.
- Groisman, E. A.** (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annual Review of Microbiology*, 70, 103.
- Guo, L. vd.** (2019). Population and Single Cell Metabolic Activity of UV-Induced VBNC Bacteria Determined by CTC-FCM and D₂O-Labeled Raman Spectroscopy. *Environment International*, 130, 104883.
- Guo, L. vd.** (2021). Detection and Distribution of VBNC/Viable Pathogenic Bacteria in Full-Scale Drinking Water Treatment Plants. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124335.
- Hale, C. A. vd.** (2011). Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a Component of the Division Apparatus that Binds and Bundles FtsZ Polymers. *Journal of Bacteriology*, 193(6), 1393-1404.
- Hale, C. A., & De Boer, P. A. J.** (1997). Direct Binding of FtsZ to ZipA, An Essential Component of the Septal Ring Structure that Mediates Cell Division in *Escherichia coli*. *Cell*, 88(2), 175-185.
- Hale, C. A., & De Boer, P. A. J.** (1999). Recruitment of ZipA to the Septal Ring of *Escherichia coli* is Dependent on FtsZ and Independent of FtsA. *Journal of Bacteriology*, 181(1), 167-176.
- Handford, J. vd.** (2009). Conserved Network of Proteins Essential for Bacterial Viability. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4732-4749.
- Hayden, J. D., & Ades, S. E.** (2008). The Extracytoplasmic Stress Factor, σ^E , Is Required to Maintain Cell Envelope Integrity in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 3(2), E1573.
- Hommel, B. vd.** (2019). *Cryptococcus neoformans* Resists to Drastic Conditions by Switching to Viable but Non-Culturable Cell Phenotype. *PLoS Pathogens*, 15(7), e1007945.
- Hossain, T., Singh, A., & Butzin, N. C.** (2023). *Escherichia coli* cells are primed for survival before lethal antibiotic stress. *Microbiology Spectrum*, 11(5), e01219-23.

- Hu, B., Pan, Y., Li, Z., Yuan, W., & Deng, L.** (2019). EmPis-1L, An Effective Antimicrobial Peptide Against the Antibiotic-Resistant VBNC State Cells of Pathogenic Bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 667-675.
- Hung, W. vd.** (2013). Association of a d-Alanyl-d-Alanine Carboxypeptidase Gene with the Formation of Aberrantly Shaped Cells during the Induction of Viable but Non-Culturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7305.
- Hussein, D. E. E., & Ghit, A.** (2021). Detection of Viable but Non-Culturable (VBNC) *Escherichia coli* from Beef Liver Using Pma-PCR Assay. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 69(2), 1-6.
- Hwang, M., Katayama, H., & Ohgaki, S.** (2006). Intracellular Survivability of *Legionella Pneumophila* in VBNC State Against Silver and Copper Exposure. *Environmental Engineering Research*, 43(29), 237-243.
- Idil, Ö. vd.** (2010). *Escherichia coli*: Dominance of Red Light Over Other Visible Light Sources in Establishing Viable but Non-Culturable State. *Photochemistry and Photobiology*, 86(1), 104-109.
- Imazaki, I., & Nakaho, K.** (2009). Temperature-Upshift-Mediated Revival from the Sodium-Pyruvate-Recoverable Viable but Non-Culturable State Induced by Low Temperature in *Ralstonia Solanacearum*: Linear Regression Analysis. *Journal of General Plant Pathology*, 75(3), 213-226.
- Inoue, D. vd.** (2008). Application of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Coupled with Ethidium Monoazide Treatment for Selective Quantification of Viable Bacteria in Aquatic Environment. *Water Science and Technology*, 58(5), 1107-1112.
- İzgördü, Ö. K., Darcan, C., & Kariptaş, E.** (2022). Overview of VBNC, a Survival Strategy for Microorganisms. *3 Biotech*, 12(11), 307.
- Jameelah, M., Dewanti-Hariyadi, R., & Nurjanah, S.** (2018). Expression of *rpoS*, *ompA* and *hfq* Genes of *Cronobacter sakazakii* Strain Yrt2a During Stress and Viable but Non-Culturable State. *Food Science and Biotechnology*, 27, 915-920.
- Jia, J. vd.** (2013). Proteomic Analysis of Protein Expression in the Induction of the Viable but Non-Culturable State of *Vibrio harveyi* SF1. *Current Microbiology*, 67(4), 442-447.

- Jia, Y. vd.** (2020). Alterations in the Cell Wall of *Rhodococcus biphenylivorans* under Norfloxacin Stress. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 554957.
- Jiang, L.** (2014). Low Temperature and Copper Induce Viable but Non-Culturable State of *Salmonella typhi* in the Bottled Drinking Water. *Advanced Materials Research*, *893*, 492-495.
- Jiang, N. vd.** (2016). Induction of the Viable but Non-Culturable State in *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* and in Planta Resuscitation of the Cells on Tomato Seedlings. *Plant Pathology*, *65*(5), 826-836.
- Josephson, K. L., Gerba, C. P., & Pepper, I. L.** (1993). Polymerase Chain Reaction Detection of Nonviable Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(10), 3513-3515.
- Joshi, S. G. vd. (2011).** Nonthermal Dielectric-Barrier Discharge Plasma-Induced Inactivation Involves Oxidative DNA Damage and Membrane Lipid Peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(3), 1053-1062.
- Kan, Y., vd.** (2019). Induction and Resuscitation of the Viable but Non-Culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 454323.
- Kan, Y., vd.** (2020). ITRAQ-Based Proteomic Analyses of the Plant-Pathogenic Bacterium *Acidovorax citrulli* during Entrance into and Resuscitation from the Viable but Non-Culturable State. *Journal of Proteomics*, *211*, 103547.
- Karimova, G., Dautin, N., & Ladant, D.** (2005). Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. *Journal of Bacteriology*, *187*(7), 2233-2243.
- Karimova, G., Robichon, C., & Ladant, D.** (2009). Characterization of YmgF, a 72-Residue Inner Membrane Protein that Associates with the *Escherichia coli* Cell Division Machinery. *Journal of Bacteriology*, *91*(1), 333-346.
- Kassem, I. I. vd.** (2013). Of Energy and Survival Incognito: A Relationship Between Viable but Non-Culturable Cells Formation and Inorganic Polyphosphate and Formate Metabolism in *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1081.
- Kaygusuz, Ö.** (2016). *YfhA-YfhK ve CusS-CusR İki Bileşikli Fosforlama Sistemlerinin Farklı Stres Şartlarında (pH, Osmolarite, Bazı Antibiyotikler ve Metallerle) Escherichia coli*

W3110'nun Yaşamındaki Rollerinin Araştırılması. (Yüksek Lisan Tezi). Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilecik.

Kaygusuz, Ö., & Darcan, C. (2021). Alkali pH'da *Escherichia coli*'nin VBNC Forma Geçişinde CusS-CusR İki Bileşikli Sisteminin Rolünün Araştırılması. *Recep Tayyip Erdogan University Journal of Science and Engineering*, 2(2), 36-50.

Keep, N. H. vd. (2006). Bacterial Resuscitation Factors: Revival of Viable but Non-Culturable Bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), 2555-2559.

Kibbee, R. J., & Örmeci, B. (2017). Development of a Sensitive and False-Positive Free PMA-qPCR Viability Assay to Quantify VBNC *Escherichia coli* and Evaluate Disinfection Performance in Wastewater Effluent. *Journal of Microbiological Methods*, 132, 139-147.

Kilicaslan, G. C., Gurbanov, R., & Darcan, C. (2023). Evaluation of Copper-Induced Biomolecular Changes in Different Porin Mutants of *Escherichia coli* W3110 by Infrared Spectroscopy. *Journal of Biological Physics*, 49(3), 309-327.

Kim, J. S. vd. (2018). Viable but Non-Culturable and Persistence Describe the Same Bacterial Stress State. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2038-2048.

Klein, G. vd. (2016). Multiple Transcriptional Factors Regulate Transcription of the *rpoE* Gene in *Escherichia coli* under Different Growth Conditions and When the Lipopolysaccharide Biosynthesis is Defective. *Journal of Biological Chemistry*, 291(44), 22999-23019.

Klont, R. R. vd. (2006). *Legionella pneumophila* in Commercial Bottled Mineral Water. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 47(1), 42-44.

Kogure, K., Simidu, U., & Taga, N. (1979). A Tentative Direct Microscopic Method for Counting Living Marine Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(3), 415-420.

Kong, I.S. vd. (2004). Role of Catalase and *oxyR* in the Viable but Non-Culturable State of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 133-142.

Kouidmi, I. vd. (2018). The Chaperone Activities of DsbG and Spy Restore Peptidoglycan Biosynthesis in the *elyC* Mutant by Preventing Envelope Protein Aggregation. *Journal of Bacteriology*, 200(19), 10-1128.

Kretschmer, S. vd. (2019). Synthetic Cell Division via Membrane-Transforming Molecular Assemblies. *BMC Biology*, 17(1), 1-10.

- Kruse, T., Bork-Jensen, J., & Gerdes, K.** (2005). The Morphogenetic MreBCD Proteins of *Escherichia coli* form An Essential Membrane-Bound Complex. *Molecular Microbiology*, 55(1), 78-89.
- Ku, H. K., Park, S. R., & Kim, S. K.** (2008). Characterization of Viable but Non-Culturable Condition of *Escherichia coli* Induced with Copper. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 36(3), 209-214.
- Kumar, S. S., & Ghosh, A. R.** (2019). Assessment of Bacterial Viability: A Comprehensive Review on Recent Advances and Challenges. *Microbiology*, 165(6), 593-610.
- Kusumoto, A., Asakura, H., & Kawamoto, K.** (2012). General Stress Sigma Factor RpoS Influences Time Required to Enter the Viable But Non-Culturable State in *Salmonella enterica*. *Microbiology and Immunology*, 56(4), 228-237.
- Lai, C. J. vd.** (2009). Change of Protein Profiles in the Induction of the Viable but Non-Culturable State of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 118-124.
- Leger, M. M. vd.** (2015). An Ancestral Bacterial Division System is Widespread in Eukaryotic Mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10239-10246.
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U.** (2013). *Escherichia coli* as An All-Rounder: the Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 358, 3-32.
- Leinberger, F. H. vd.** (2024). Protein Aggregation is A Consequence of The Dormancy-Inducing Membrane Toxin TisB in *Escherichia coli*. *bioRxiv*, 2024-02.
- Lemke, M. J., & Leff, L. G.** (2006). Culturability of Stream Bacteria Assessed at the Assemblage and Population Levels. *Microbial Ecology*, 51, 365-374.
- Levin, P. A., & Janakiraman, A.** (2021). Localization, Assembly, and Activation of the *Escherichia coli* Cell Division Machinery. *EcoSal Plus*, 9(2).
- Li, H. vd.** (2016). Synergetic Effects of High-Pressure Carbon Dioxide and Nisin on the Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 180-186.

- Li, L. vd.** (2014). The Importance of the Viable but Non-Culturable State in Human Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, 88860.
- Li, Y. vd.** (2020). Formation and Control of the Viable but Non-Culturable State of Foodborne Pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1202.
- Liao, X. vd.** (2021). Stress Resistance and Pathogenicity of Nonthermal Plasma Induced Viable-but Non-Culturable *Staphylococcus aureus* Through Energy Suppression, Oxidative Stress Defense, and Immune Escape Mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2), 1-17.
- Lies, M. vd.** (2015). MioC and GidA Proteins Promote Cell Division in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6,141049.
- Lin, H. vd.** (2017). Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* Induced by Low Level Chlorination have Higher Persistence to Antibiotics than Their Culturable Counterparts. *Environmental Pollution*, 230, 242-249.
- Lindbäck, T. vd.** (2010). The Ability to Enter into An Avirulent Viable but Non-Culturable (VBNC) form is Widespread among *Listeria monocytogenes* Isolates from Salmon, Patients and Environment. *Veterinary Research*, 41(1), 1-10.
- Liu, J. vd.** (2017). The Viable but Non-Culturable State Induction and Genomic Analyses of *Lactobacillus casei* BM-LC14617, a Beer-Spoilage Bacterium. *Microbiology Open*, 6(5), e00506.
- Liu, J. vd.** (2018). Induction and Recovery of the Viable but Non-Culturable State of Hop-Resistance *Lactobacillus brevis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2076.
- Liu, W., Xu, Y., & Slaveykova, V. I.** (2023). Oxidative Stress Induced by Sub-Lethal Exposure to Copper as A Mediator in Development of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Science of the Total Environment*, 860, 160516.
- Liu, Y. vd.** (2009). Induction of *Escherichia coli* O157: H7 into The Viable but Non-Culturable State by Chloraminated Water and River Water, and Subsequent Resuscitation. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 155-161.
- Liu, Y. vd.** (2008). Detection of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 Bacteria in Drinking Water and River Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1502-1507.

- Liu, Y. vd.** (2010). Production of Shiga-like Toxins in Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7. *Water Research*, 44(3), 711-718.
- Liu, Y. vd.** (2020). A Hidden Risk: Survival and Resuscitation of *Escherichia coli* O157:H7 in the Viable but Non-Culturable State after Boiling or Microwaving. *Water Research*, 183, 116102.
- Lleò, M. M. vd.** (2001). Resuscitation Rate in Different Enterococcal Species in the Viable but Non-Culturable State. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1095-1102.
- Lloyd, D., & Hayes, A. J.** (1995). Vigour, Vitality and Viability of Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 133(1-2), 1-7.
- Lothigius, Å. vd.** (2010). Survival and Gene Expression of Enterotoxigenic *Escherichia coli* during Long-Term Incubation in Sea Water and Freshwater. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1441-1449.
- Lu, X. vd.** (2011). Using of Infrared Spectroscopy to Study the Survival and Injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under Cold Stress in Low Nutrient Media. *Food Microbiology*, 28(3), 537-546.
- Maalej, S. vd.** (2004). Maintenance of Pathogenicity During Entry into and Resuscitation from Viable but Non- Culturable State in *Aeromonas hydrophila* Exposed to Natural Seawater at Low Temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 557-565.
- Maertens, L.vd.** (2021). Characteristics of the Copper-Induced Viable-but-Non-Culturable State in Bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3), 37.
- Magalhães, A. P. vd.** (2021). Viable but Non-Cultivable State: A Strategy for *Staphylococcus aureus* Survivable in Dual-Species Biofilms with *Pseudomonas aeruginosa*? *Environmental Microbiology*, 23(9), 5639-5649.
- Mahdhi, A. vd.** (2012). Change in Physiological Cellular State of Halophilic *Bacillus* sp. under Long Marine Stress Starvation Conditions. *African Journal of Microbiology Research*, 6(32).
- Makino, S. I. vd.** (2000). Does Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Enter the Viable but Non-Culturable State in Salted Salmon Roe? *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5536-5539.

- Mangiaterra, G. vd.** (2020). Role of Tobramycin in the Induction and Maintenance of Viable but Non-Culturable *Pseudomonas aeruginosa* in An In Vitro Biofilm Model. *Antibiotics*, 9(7), 1-10.
- Männik Jaana, C. D. E. vd.** (2016). The role of MatP, ZapA and ZapB in Chromosomal Organization and Dynamics in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 44(3), 1216-1226.
- Marteyn, B. S. vd.** (2014). ZapE is a Novel Cell Division Protein Interacting with FtsZ and Modulating the Z-ring Dynamics. *mBio*, 5(2), 10-1128.
- Martínez, L. C., & Vadyvaloo, V.** (2014). Mechanisms of Post-Transcriptional Gene Regulation in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(38), 1-15.
- Mascher, F. vd.** (2000). The Viable-but-Non-Culturable State Induced by Abiotic Stress in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not Promote Strain Persistence in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1662-1667.
- Masmoudi, S., Denis, M., & Maalej, S.** (2010). Inactivation of the Gene *kata* or *sodA* Affects the Transient Entry Into the Viable but Non-Culturable Response of *Staphylococcus aureus* in Natural Seawater at Low Temperature. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2209-2214.
- Matilla, M. A.** (2018). Shedding Light into the Mechanisms of Formation and Resuscitation of Persistent Bacterial Cells. *Environmental Microbiology*, 20(9), 3129-3131.
- Mecenas, J.** (1993). The Activity of Sigma E, an *Escherichia coli* Heat-Inducible Sigma-Factor, is Modulated by Expression of Outer Membrane Proteins. *Genes & Development*, 7(12b), 2618-2628.
- Millet, V., & Lonvaud-Funel, A.** (2000). The Viable but Non-Culturable State of Wine Microorganisms During Storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), 136-141.
- Mitra, A., & Mukhopadhyay, S.** (2023). Regulation of Biofilm Formation by Non-Coding RNA in Prokaryotes. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 4, 100151.
- Mizunoe, Y. vd.** (2000). Resuscitation of Viable but Non-Culturable Cells of *Vibrio parahaemolyticus* Induced at Low Temperature under Starvation. *FEMS Microbiology Letters*, 186(1), 115-120.

- Moen, B. vd.** (2005). Explorative Multifactor Approach for Investigating Global Survival Mechanisms of *Campylobacter jejuni* under Environmental Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2086-2094.
- Morishige, Y., Fujimori, K., & Amano, F.** (2013). Differential Resuscitative Effect of Pyruvate and Its Analogues on VBNC (Viable but Non-Culturable) *Salmonella*. *Microbes and Environments*, 28(2), 180-186.
- Muela, A.vd.** (2008). Changes in *Escherichia coli* Outer Membrane Subproteome under Environmental Conditions Inducing the Viable but Non-Culturable State. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 28-36.
- Munro, P. M. vd.** (1995). Influence of the RpoS (KatF) Sigma Factor on Maintenance of Viability and Culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1853-1858.
- Na, S. H. vd.** (2006). The Survival Response of *Escherichia coli* K12 in a Natural Environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 386-392.
- Nicol, M. vd.** (2019). Anti-Persister Activity of Squalamine Against *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(3), 337-342.
- Nicolò, M. S. vd.** (2011). Viable but Non-Culturable State of Foodborne Pathogens in Grapefruit Juice: A Study of Laboratory. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 11-17.
- Niedźwiedź, I. vd.** (2020). Morphological and Physiological Changes in *Lentilactobacillus hilgardii* Cells After Cold Plasma Treatment. *Scientific Reports*, 10(1).
- Nocker, A., & Camper, A. K.** (2006). Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1997-2004.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K.** (2006). Comparison of Propidium Monoazide with Ethidium Monoazide for Differentiation of Live vs. Dead Bacteria by Selective Removal of DNA From Dead Cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 310-320.
- Noll, M. vd.** (2020). Benzalkonium Chloride Induces a VBNC State in *Listeria monocytogenes*. *Microorganisms*, 8(2), 4-6.

- Noor, R. vd.** (2013). Influence of Temperature on *Escherichia coli* Growth in Different Culture Media. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(2), 899-904.
- Noor, R., Murata, M., & Yamada, M.** (2009). Oxidative Stress as A Trigger for Growth Phase-Specific σ -Dependent Cell Lysis in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 177-187.
- Oliver, J. D.** (1995). The Viable but Non-Culturable State in the Human Pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*, 133(3), 203-208.
- Oliver, J. D.** (2005). The Viable but Non-Culturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43(1), 93-100.
- Oliver, J. D.** (2010). Recent Findings on the Viable but Non-Culturable State in Pathogenic Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415-425.
- Oliver, J. D.** (2016). The Viable but Non-Culturable State for Bacteria: Status update: This Dormant form of Bacteria was First Appreciated in 1982; Now Skeptics Recognize This State as A Bacterial Response to Stress and A Strategy for Survival. *Microbe*, 11(4), 159-164.
- Oliver, J. D., & Bockian, R.** (1995). In Vivo Resuscitation, and Virulence Towards Mice, of Viable but Non-Culturable Cells of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2620-2623.
- Ordax, M. vd.** (2006). Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable-but-Non-Culturable State. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3482-3488.
- Ortiz, C. vd.** (2017). The Hypermorph FtsA* Protein has An in Vivo Role in Relieving The *Escherichia coli* Proto-Ring Block Caused by Excess ZapC+. *PLoS One*, 12(9), e0184184.
- Ou, A. vd.** (2021). First Report on the Rapid Detection and Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Viable but Non-Culturable (VBNC) Under Food Storage Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 615875.
- Owczarzy, R. vd.** (2008). IDT SciTools: A Suite for Analysis and Design of Nucleic Acid Oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36, 163–169.
- Pal, A. vd.** (2022). Bacterial Survival Strategies and Responses under Heavy Metal Stress: A Comprehensive Overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 48(3), 327-355.

- Pan, H. vd.** (2019). The Association of Cell Division Regulated by DicC with the Formation of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 501361.
- Pan, H. vd.** (2020). Quantitative Detection of Viable but Non-Culturable State *Escherichia coli* O157:H7 by ddPCR Combined with Propidium Monoazide. *Food Control*, *112*, 107140.
- Pan, H. vd.** (2023). Acid Shock Protein Asr Induces Protein Aggregation to Promote *Escherichia coli* O157:H7 Entering Viable but Non-Culturable State under High Pressure Carbon Dioxide Stress. *Food Microbiology*, *109*, 104136.
- Pan, Y., & Breidt, F.** (2007). Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* Cells by Real-Time PCR with Propidium Monoazide and Ethidium Monoazide in the Presence of Dead Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(24), 8028-8031.
- Panutdaporn, N. vd.** (2006). Resuscitation of the Viable but Non-Culturable State of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by Recombinant Resuscitation-Promoting Factor Derived from *Salmonella typhimurium* strain LT2. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(3), 241-247.
- Paradis-Bleau, C. vd.** (2014). A Genome-Wide Screen for Bacterial Envelope biogenesis Mutants Identifies a Novel Factor Involved in Cell Wall Precursor Metabolism. *PLoS Genetics*, *10*(1), e1004056.
- Park, S. Y., & Kim, C. G.** (2018). A Comparative Study of Three Different Vability Tests for Chemically or Thermally Inactivated *Escherichia coli*. *Environmental Engineering Research*, *23*(3), 282-287.
- Pasquaroli, S. vd.** (2013). Antibiotic Pressure can Induce the Viable but Non-Culturable State in *Staphylococcus aureus* Growing in Biofilms. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(8), 1812-1817.
- Pawlowski, D. R. vd.** (2011). Entry of *Yersinia pestis* into the Viable but Non-Culturable State in A Low-Temperature Tap Water Microcosm. *PLoS One*, *6*(3).
- Pazos-Rojas, L. A. vd.** (2023). The Viable but Non-Culturable (VBNC) State, A Poorly Explored Aspect of Beneficial Bacteria. *Microorganisms*, *12*(1), 39.
- Petit-Härtlein, I. vd.** (2015). Biophysical and Physiological Characterization of ZraP from *Escherichia coli*, The Periplasmic Accessory Protein of The Atypical ZraSR two-Component System. *Biochemical Journal*, *472*(2), 205-216.

- Pfaffl, M. W.** (2001). A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Piattelli, E., Peltier, J., & Soutourina, O.** (2020). Interplay Between Regulatory RNAs and Signal Transduction Systems During Bacterial Infection. *Genes*, 11(10), 1209.
- Pichoff, S., & Lutkenhaus, J.** (2002). Unique and Overlapping Roles for ZipA and FtsA in Septal Ring Assembly in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 21(4), 685-693.
- Pienaar, J. A., Singh, A., & Barnard, T. G.** (2016). The Viable but Non-Culturable State in Pathogenic *Escherichia coli*: A General Review. *African Journal of Laboratory Medicine*, 5(1), 1-9.
- Pinto, D. vd.** (2011). Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC Cells Depends on A Variety of Environmental or Chemical Stimuli. *Journal of Applied Microbiology*, 110(6), 1601-1611.
- Pinto, D., Santos, M. A., & Chambel, L.** (2015). Thirty Years of Viable but Non-Culturable State Research: Unsolved Molecular Mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 61-76.
- Pommepuy, M. vd.** (1996). Retention of Enteropathogenicity by Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* Exposed to Seawater and Sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4621-4626.
- Progulske-Fox, A. vd.** (2022). VBNC, Previously Unrecognized in the Life Cycle of *Porphyromonas gingivalis*? *Journal of Oral Microbiology*, 14(1), 1952838.
- Pu, Y. vd.** (2019). ATP-Dependent Dynamic Protein Aggregation Regulates Bacterial Dormancy Depth Critical for Antibiotic Tolerance. *Molecular Cell*, 73(1), 143-156.
- Ragunathan, P. T. vd.** (2023). Mechanisms of Regulation of Cryptic Prophage-Encoded Gene Products in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 205(8), e00129-23.
- Rahman, I. vd.** (1994). Methionine Uptake and Cytotoxicity of Viable but Non-Culturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3573.
- Ramamurthy, T. vd.** (2014). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in Public Health*, 2, 1-9.

- Rao, N. V., Shashidhar, R., & Bandekar, J. R.** (2014). Induction, Resuscitation and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analyses of Viable but Non-Culturable *Vibrio vulnificus* in Artificial Sea Water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(8), 2205-2212.
- Ravel, J. vd.** (1995). Temperature-Induced Recovery of *Vibrio cholerae* from the Viable but Non-Culturable State: Growth or Resuscitation? *Microbiology*, 141(2), 377-383.
- Reissbrodt, R. vd.** (2000). Resuscitation by Ferrioxamine E of Stressed *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Soil and Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4128-4130.
- Reygaert, W. C.** (2018). An Overview of the Antimicrobial Resistance Mechanisms of Bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482.
- Rhodium, V. A. vd.** (2005). Conserved and Variable Functions of the σ E Stress Response in Related Genomes. *PLoS Biology*, 4(1), e2.
- Rigsbee, W., Simpson, L. M., & Oliver, J. D.** (1997). Detection of the Viable but Non-Culturable State in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Safety*, 16(4), 255-262.
- Robben, C. vd.** (2018). Induction of the Viable but Non-Culturable State in Bacterial Pathogens by Household Cleaners and Inorganic Salts. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9.
- Robben, C. vd.** (2019). A Fast and Easy ATP-Based Approach Enables MIC Testing for Non-Resuscitating VBNC Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-10.
- Rome, K. vd.** (2018). The Two-Component System ZraPSR is A Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 430(24), 4971-4985.
- Rozen, Y. vd.** (2002). Gene Expression Analysis of the Response by *Escherichia coli* to Seawater. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 15-25.
- Sachidanandham, R., & Yew-Hoong Gin, K.** (2009). A Dormancy State in Nonspore-Forming Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), 927-941.
- Santander, R. D., Figàs-Segura, À., & Biosca, E. G.** (2018). *Erwinia amylovora* Catalases KatA and KatG are Virulence Factors and Delay the Starvation-Induced Viable but Non-Culturable (VBNC) response. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 922-934.

- Santander, R. D., Oliver, J. D., & Biosca, E. G.** (2012). Expression Analyses of Oxidative Stress *kata*, *katG* and *oxyR* genes in *Erwinia amylovora* in the Viable but Non-Culturable State. In *Microbes In Applied Research: Current Advances and Challenges* (pp. 624-628).
- Schmitt, J., & Flemming, H. C.** (1998). FTIR-Spectroscopy in Microbial and Material Analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *41*(1), 1-11.
- Schumacher, M. A. vd.** (2016). Structural and Functional Analyses Reveal Insights into the Molecular Properties of the *Escherichia coli* Z Ring Stabilizing Protein, ZapC. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(5), 2485-2498.
- Se, J. vd.** (2021). Proteomic Changes of Viable but Non-Culturable (VBNC) *Escherichia coli* O157:H7 Induced by Low Moisture in An Artificial Soil. *Biology and Fertility of Soils*, *57*(2), 219-234.
- Segev, E., Smith, Y., & Ben-Yehuda, S.** (2012). RNA Dynamics in Aging Bacterial Spores. *Cell*, *148*(1), 139-149.
- Setlow, P., & Christie, G.** (2020). Bacterial Spore mRNA – What’s Up With That? *Frontiers in Microbiology*, *11*, 596092.
- Severin, E., Stellmach, J., & Nachtigal, H. M.** (1985). Fluorimetric Assay of Redox Activity in Cells. *Analytica Chimica Acta*, *170*, 341-346.
- Shi, H. vd.** (2018). How to Build A Bacterial Cell: MreB as The Foreman of *Escherichia coli* Construction. *Cell*, *172*(6), 1294-1305.
- Shleeva, M. vd.** (2004). Formation of “Non-Culturable” Cells of *Mycobacterium smegmatis* in Stationary Phase in Response to Growth Under Suboptimal Conditions and Their Rpf-Mediated Resuscitation. *Microbiology*, *150*(6), 1687-1697.
- Signoretto, C. vd.** (2000). Cell Wall Chemical Composition of *Enterococcus faecalis* in the Viable but Non-Culturable State. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(5), 1953-1959.
- Somorin, Y. vd.** (2016). The General Stress Response is Conserved in Long-Term Soil-Persistent Strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(15), 4628.
- Song, H., & Lee, S. Y.** (2021). High Concentration of Sodium Chloride Could Induce the Viable and Culturable States of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Letters in Applied Microbiology*, *72*(6), 741-749.

- Sperandio, V. vd.** (2003). Bacteria-Host Communication: the Language of Hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8951-8956.
- Su, X. vd.** (2015). Identification, Characterization and Molecular Analysis of the Viable but Non-Culturable *Rhodococcus biphenylivorans*. *Scientific Reports*, 5(18590),1-12.
- Sukenik, A. vd.** (2012). Massive Multiplication of Genome and Ribosomes in Dormant Cells (akinetes) of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria). *The ISME Journal*, 6(3), 670.
- Sun, F. vd.** (2008). Characterization and Virulence Retention of Viable but Non-Culturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(1), 37-44.
- Suzuki, K. vd.** (2006). Induction of Viable but Non-Culturable State in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(4), 295-301.
- Szklarczyk, D. vd.** (2023). The String Database in 2023: Protein-Protein Association Networks and Functional Enrichment Analyses for any Sequenced Genome of Interest. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 638-646.
- Takeda, Y.** (2011). *Vibrio parahaemolyticus*, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 87(1), 1-12.
- Talari, A. C. S. vd.** (2017). Advances in Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(5), 456-506.
- Tenaillon, O. vd.** (2010). The Population Genetics of Commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
- Traag, B. A. vd.** (2013). A Novel RNA Polymerase-Binding Protein Controlling Genes Involved in Spore Germination in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 113-122.
- Um, H. Y. vd.** (2013). Altered Gene Expression and Intracellular Changes of the Viable but Non-Culturable State in *Ralstonia solanacearum* by Copper Treatment. *The Plant Pathology Journal*, 29(4), 374.
- Usary, J., & Champney, W. S. (2001).** Erythromycin Inhibition of 50S Ribosomal Subunit Formation in *Escherichia coli* Cells. *Molecular Microbiology*, 40(4), 951-962.

- Van Elsas, J. D. vd.** (2010). Survival of *Escherichia coli* in the Environment: Fundamental and Public Health Aspects. *The ISME Journal*, 5(2), 173-183.
- Wang, H. W. vd.** (2013). Roles of Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunit C (AhpC) in Viable but Non-Culturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3734-3743.
- Wang, M. vd.** (2020). Regulation of Cytokinesis: FtsZ and Its Accessory Proteins. *Current Genetics*, 66(1), 43-49.
- Wang, X. vd.** (1997). Analysis of the Interaction of FtsZ with Itself, GTP, and FtsA. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5551-5559.
- Wang, X. vd.** (2010). Cryptic Prophages Help Bacteria Cope with Adverse Environments. *Nature Communications*, 1(1), 1-9.
- Wani, A. K. vd.** (2022). Microbial Adaptation to Different Environmental Conditions: Molecular Perspective of Evolved Genetic and Cellular Systems. *Archives of Microbiology*, 204(2), 1-16.
- Wasfi, R. vd.** (2020). First-Time Characterization of Viable but Non-Culturable *Proteus mirabilis*: Induction and Resuscitation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(5), 2791-2801.
- Weatherspoon-Griffin, N. vd.** (2014). The CpxR/CpxA Two-Component Regulatory System Up-Regulates The Multidrug Resistance Cascade to Facilitate *Escherichia coli* Resistance to A Model Antimicrobial Peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32571-32582.
- Wei, C., & Zhao, X.** (2018). Induction of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 by Low Temperature and Its Resuscitation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 361941.
- Wenning, M., & Scherer, S.** (2013). Identification of Microorganisms by FTIR Spectroscopy: Perspectives and Limitations of the Method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7111-7120.
- Wideman, N. E. vd.** (2021). Detection and Potential Virulence of Viable but Non-Culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A Review. *Microorganisms*, 9(1), 194.
- Xia, X. vd.** (2017). OxyR-Activated Expression of Dps is Important for *Vibrio cholerae* Oxidative Stress Resistance and Pathogenesis. *PLoS ONE*, 12(2), e0171201.

- Xie, M. vd.** (2021). Viable but Non-Culturable State of *Yeast Candida* sp. Strain LN1 Induced by High Phenol Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(18), 1-15.
- Xu, H. S. vd.** (1982). Survival and Viability of Non-Culturable *Escherichia coli* and in *Vibrio cholerae* the Estuarine and Marine Environment. *Microbial Ecology*, 8(4), 313-323.
- Xu, L. vd.** (2018). Mechanisms of Ultraviolet Disinfection and Chlorination of *Escherichia coli*: Culturability, Membrane Permeability, Metabolism, and Genetic Damage. *Journal of Environmental Sciences*, 65, 356-366.
- Xu, T. vd.** (2018). RNA-Seq-Based Monitoring of Gene Expression Changes of Viable but Non-Culturable State of *Vibrio cholerae* Induced by Cold Seawater. *Environmental Microbiology Reports*, 10(5), 594-604.
- Xu, Y. vd.** (2016). Occurrence and Distribution of Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes in the Urban Rivers in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 213, 833-840.
- Xu, Z. vd.** (2022). A Novel Procedure in Combination of Genomic Sequencing, Flow Cytometry and Routine Culturing for Confirmation of Beer Spoilage Caused by *Pediococcus damnosus* in Viable but Non-Culturable State. *LWT*, 154, 112623.
- Yamamoto, H.** (2000). Viable but Non-Culturable State as A General Phenomenon of Non-Sporeforming Bacteria, and Its Modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(2), 112-114.
- Yamazaki, Y., Niki, H., & Kato, J. I.** (2008). Profiling of *Escherichia coli* Chromosome Database. *Methods in Molecular Biology*, 416, 385-389.
- Yan, H. vd.** (2021). Formation of Viable but Non-Culturable State of *Staphylococcus aureus* under Frozen Condition and Its Characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 357.
- Yang, S. vd.** (2016). Characterization of DicB by Partially Masking Its Potent Inhibitory Activity of Cell Division. *Open Biology*, 6(7), 160082.
- Ye, C. vd.** (2020). Characterization and Potential Mechanisms of Highly Antibiotic Tolerant VBNC *Escherichia coli* Induced by Low Level Chlorination. *Scientific Reports*, 10(1), 1957.

- Yin, W. vd.** (2023). Peracetic acid disinfection induces antibiotic-resistant *Escherichia coli* into VBNC state but ineffectively eliminates the transmission potential of ARGs. *Water Research*, 242, 120260.
- Yokomaku, D., Yamaguchi, N., & Nasu, M.** (2000). Improved Direct Viable Count Procedure for Quantitative Estimation of Bacterial Viability in Freshwater Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5544-5548.
- Yonar, D. vd.** (2022). Rapid Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma and Its Discrimination from Lung Cancer and Benign Exudative Effusions Using Blood Serum. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1868(10).
- Yoon, J. H., & Lee, S. Y.** (2020). Characteristics of Viable-but-Non-Culturable *Vibrio parahaemolyticus* Induced by Nutrient-Deficiency at Cold Temperature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60 (8),1302-1320.
- Yost, A. D., & Joshi, S. G.** (2015). Atmospheric Nonthermal Plasma-Treated PBS Inactivates *Escherichia coli* by Oxidative DNA Damage. *PLoS One*, 10(10), e0139903.
- Young, D. B., Gideon, H. P., & Wilkinson, R. J.** (2009). Eliminating Latent Tuberculosis. *Trends in Microbiology*, 17(5), 183-188.
- Zeng, B. vd.** (2013). Formation and Resuscitation of Viable but Non-Culturable *Salmonella typhi*. *BioMed Research International*, 1-7.
- Zhang, J. vd.** (2020). Survival Strategy of *Cronobacter sakazakii* Against Ampicillin Pressure: Induction of the Viable but Non-Culturable State. *International Journal of Food Microbiology*, 334, 108819.
- Zhang, J. vd.** (2023). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable Foodborne Pathogenic Bacteria: A Review. *Foods*, 12(6), 1179.
- Zhang, M. vd.** (2024). Viable but Non-Culturable State Formation and Resuscitation of Different Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Induced by UV/Chlorine. *Water Research*, 261, 122011.
- Zhang, S. vd.** (2015). UV Disinfection Induces a VBNC State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*, 49(3), 1721-1728.

Zhang, X. H. vd. (2021). Viable but Non-Culturable Bacteria and Their Resuscitation: Implications for Cultivating Uncultured Marine Microorganisms. *Marine Life Science & Technology*, 3, 189-203.

Zhang, Z. vd. (2024). The Effects and Cell Phenotype Changes in *Escherichia coli* O157:H7 Induced into VBNC State by l-malic Acid at Low Temperature. *Food Bioscience*, 60, 104301.

Zhao, F. vd. (2013). Induction of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 by High Pressure CO₂ and Its Characteristics. *PLoS One*, 8(4), e62388.

Zhao, F. vd. (2016). New Insights into the Formation of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 Induced by High-Pressure CO₂. *mBio*, 7(4), 1-11.

Zhao, L., & Matthews, K. R. (2000). Influence of Starvation, Temperature, and pH on Culturability of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food safety*, 20(3), 193-206.

Zhao, X. vd. (2017). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 580.

Zhao, Y. vd. (2021). Antibiotic Resistome in the Livestock and Aquaculture Industries: Status and Solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(19), 2159-2196.

Zhao, Z. vd. (2022). Systematic identification of CpxRA-regulated genes and their roles in *Escherichia coli* stress response. *Msystems*, 7(5), e00419-22.

Zhong, J., & Zhao, X. (2018). Detection of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 by PCR in Combination with Propidium Monoazide. *3 Biotech*, 8(1), 1-9.

Zhong, J., & Zhao, X. (2019). Transcriptomic Analysis of Viable but Non-Culturable *Escherichia coli* O157:H7 Formation Induced by Low Temperature. *Microorganisms*, 7(12), 634.

Zhou, M. vd. (2022). Roles of Virulence Regulator ToxR in Viable but Non-Culturable Formation by Controlling Reactive Oxygen Species Resistance in Pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Microbiological Research*, 254, 126900.

Zhu, L. vd. (2022). Mechanisms Underlying the Effect of Chlorination and UV Disinfection on VBNC State *Escherichia coli* Isolated from Hospital Wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127228.

Zimmermann, R., Iturriaga, R., & Becker-Birck, J. (1978). Simultaneous Determination of the Total Number of Aquatic Bacteria and the Number There of Involved in Respiration. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6), 926.