



## ACID TOLERANCE RESPONSE OF CARIOGENIC MICROORGANISMS AND MALOLACTIC FERMENTATION

*Karyojen Mikroorganizmaların Asit Tolerans Yetenekleri ve Malolaktik Fermantasyon*

Erol KESKİN<sup>1</sup> Serdar BAĞLAR<sup>1</sup> Tahir ÖRÜN<sup>1</sup>

**Makale Kodu/Article Code** : 204370

**Makale Gönderilme Tarihi** : 15.10.2016

**Kabul Tarihi** : 13.01.2017

### ABSTRACT

Dental caries is an infectious disease which occurs by the metabolism of bacteria acids released to dental environment which results hard tissue resolutions. Because of the oxygen-free structures of mature plaques complex and deep layers, cariogenic bacteria which have the ability of fermentation come forward. Strong acids like lactic acid, formic acid and pürivat deminish ph of the plaque and the acidity of the plaque causes demineralization of enamel during caries evolution. Existed plaque acidification is not only causes losing minerals from enamel but also threats microorganisms living in the biofilm of the plaque. So most of the microorganisms can't survive under the ph value of 2.5. The ability of bacteria to survive in this acidic environment depends on the acid tolerance responses they have. Protection against acidity is possible by the production of glicoses, lactic acid and ATP (Adenosine triphosphate) by bacteria. Malolactic fermentation is the most important system that provides these productions in acidic environment. In order to better understand the anti-caries treatment protocols used in current preventive dental practice, the role of bacteria in the fermentation process needs to be known. In this review we examined: chemical reactions of fermentation, which acids has been occurred by the result of these reactions, ph changes in dental plaque, acidojenic and aciduric properties of bacteria which realise fermentation, how can microorganisms survive in acidic environment, what are the advantages propable inhibition of acid tolerance responses for guest. So we tried to attract attention to the anti-cariogenic strategies such as flour, chitosan,  $\alpha$ -mangostin and gene studies which are used in the inhibition of acid tolerance systems of bacteria.

**Key words:** Acidojenic&aciduric, dental plaque, fermentation, glycolyse, S. mutans

### ÖZ

Diş çürüğü karyojen bakterilerin metabolizmaları sonucu ortama saldıkları asitler nedeniyle diş sert dokularında mineral çözünmesi sonucu oluşan bir çeşit enfeksiyon hastalığıdır. Olgunlaşmış plağın komplike ve derin tabakalardaki oksijensiz yapıdan dolayı çürük oluşumunda fermantasyon yapabilme yeteneği olan bakteriler ön plana çıkmaktadır. Fermantasyon sonucu açığa çıkan laktik asit, formik asit ve pürivik asit gibi güçlü asitler, plak pH'sını düşürür ve oluşan plak asiditesi çürük gelişimi süresince minenin demineralizasyonuna yol açar. Oluşan plak asidifikasyonu sadece minenin mineral kaybına neden olmakla kalmaz aynı zamanda plak biyofilminin içerisinde yaşayan mikroorganizmalar için de tehlike oluşturur. Yani çoğu mikroorganizmalar, ölümcül pH değerleri olan pH 2.5 ve altında hayatlarını sürdüremezler. Bakterilerin bu asidik ortamda hayatta kalabilmeleri, sahip oldukları asit tolerans cevaplarına bağlıdır. Bakterilerin bu asiditeye karşı koyması glikoliz, laktik asit üretimi ve ATP (Adenozin trifosfat) üretimi sayesinde olur. Malolaktik fermantasyon ise asidik ortamda bu üretimleri sağlayan en önemli sistemdir. Güncel koruyucu diş hekimliği uygulamalarında kullanılan çürük önleyici tedavi protokollerinin daha iyi anlaşılması için bakterilerin fermantasyon sürecindeki rollerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu derlemede fermantasyon sürecinin kimyasal tepkimelerini, bu tepkimeler sonucu hangi asitlerin oluştuğunu, dental plaktaki pH değişikliklerini, fermantasyonu gerçekleştiren bakterilerin asidojenik&asidurik özelliklerini ve özellikle oluşan asidik ortamda mikroorganizmaların hayatlarını nasıl sürdürebildiklerini ayrıca asit tolerans cevabının muhtemel inhibisyonunun konak için ne tür avantajlar oluşturabileceği incelenmiştir. Böylece bakterilerin asit tolerans sistemlerinin inhibisyonunda kullanılan flor, çitosan,  $\alpha$ -mangostin ve gen çalışmaları gibi antikaryojenik stratejilere dikkat çekilmeye çalışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Asidurik&asidojenik, dental plak, fermantasyon, glikoliz, S. mutans

## GİRİŞ

Diş çürüğünün oluşumunda fermantasyon sürecinin rolü zaten bilinmektedir.<sup>1-4</sup>

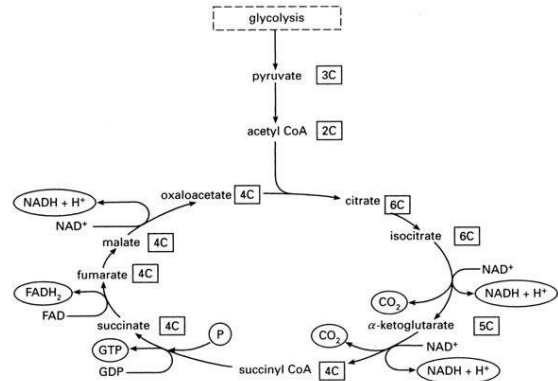
Fermantasyon, biyokimyada oksijensiz ortamda gerçekleşen enerji tepkimelerini tanımlarken, gıda sanayisinde mikroorganizmaların oksijen varlığında yaptığı yıkım reaksiyonlarını da kapsar (sirke fermantasyonu gibi). Biyoteknolojide ise fermantasyon, büyük tanklarda büyütülen bakterilere yaptırılan her türlü üretim (proteinler dahil) olarak tanımlanır. Ancak diş hekimliği bilimi ve dental plak açısından değerlendirecek olursak; fermantasyon, mikroorganizmaların oksijensiz ortamda yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan enerjiyi elde ettikleri kimyasal reaksiyonlar zinciridir. Esasında fermantasyon olayı bir bakıma mikroorganizmaların hayat mücadelesi demektir. Tüm canlılar gibi bakteriler de yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için ATP'ye ihtiyaç duyarlar.<sup>5-8</sup>

### Plak Fermantasyon Süreci

Enerji (ATP) üretimi sırasında meydana gelen reaksiyonlarda glikoz (veya benzeri diğer moleküller) hidrojenlerini teker teker kaybederek daha basit organik moleküllere dönüşürler. Bu reaksiyonlar glikoliz, krebs döngüsü ve oksijensiz ortamlarda fermantasyon olarak gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlardan glikoliz sonucunda pirüvat, pirüvatın krebs döngüsüne girmesi sonucunda malik asit oluşur. Oksijen bulunmayan ortamlarda ise pirüvat ve/veya malik asit spesifik bakteriler tarafından fermantasyon ile laktik asite dönüştürülebilir. Daha önce de bahsedildiği gibi bu reaksiyonlar, yaşamsal faaliyetlerin devamı için gerekli ATP elde edilmesi için gerçekleştirilmektedir.

Birinci evre olan glikoliz hücre sitoplazmasında meydana gelir. (Şekil-1) Bu sırada substrat düzeyinde enzimler yardımıyla ATP sentezi gerçekleşir. Glikoliz sonucu

oluşan pirüvat, krebs devrine katılmak için mitokondriye geçer.



Şekil 1. Glikozun krebs devrini de içeren yıkım döngüsü.

Krebs devri ve elektron taşıma sistemi(ETS) mitokondride gerçekleşen olaylardır. Glikoliz ve krebs devri sonucu oluşan NADH<sub>2</sub> (nikotinamid adenin dinükleotit)'lerden ETS sırasında ATP sentezlenir. Bu ATP elde edilme şekline de oksidatif fosforilasyon adı verilir. Tabiki bakterilerin ribozom harici gelişmiş organelleri bulunmadığından dolayı krebs döngüsü, ETS ve solunum tepkimeleri mezozom denilen mitokondrial yapılar içerisinde ve hücre çeperinde gerçekleşir. Pirüvat oluşumundan sonra tepkimeler ortamda oksijen bulunup bulunmamasına göre ikiye ayrılır.

-Oksijenli solunum

-Oksijensiz solunum

Oksijen bulunması halinde oksijenli solunum olarak devam eder ki bu aşamalar ise krebs döngüsü ve sonrasında elektron taşıma sistemidir. Krebs döngüsündeki tepkimelerde H<sup>+</sup> iyonları, NAD tarafından yakalanır ve NADH<sub>2</sub> sentezlenir. Daha sonra ise glikoliz ve krebs döngüsünde ortaya çıkan H<sup>+</sup> iyonları NAD molekülleri tarafından elektron taşıma sistemine aktarılarak ATP sentezi gerçekleşmiş olur. Ve bu şekilde oksijenli solunumla 34 net ATP üretimi gerçekleşmiş olur. Oksijensiz solunumda ise iki çeşit son ürün reaksiyonu gerçekleşir;

- Laktik asit fermantasyonu
- Etil alkol fermantasyonu

Fermantasyonun son adımı (pirüvatin fermantasyon ürünlerine dönüşmesi) enerji üretme dahi, bu süreç anaerobik bir hücre için önemlidir. Çünkü bu süreç glikozun pirüvata dönüşmesi sırasında harcanan  $NAD^+$ ların yenilenmesini sağlar. Bu da glikolizin devamı için gereklidir. Örneğin alkol fermantasyonunda pirüvattan oluşan asetaldehit,  $NADH$  ve  $H^+$  tarafından etanola dönüşür ve hücreden dışarı atılır.<sup>9</sup>

Son ürün reaksiyonlarının amacı indirgenen  $NAD^+$ ı yükseltmek, pirüvik asit birikimini önlemek ve glikoliz reaksiyonlarının tekrarını sağlamaktır.

-Laktik asit fermantasyonu: Laktat dehidrogenaz enzimi sayesinde pirüvat'dan sonra  $NADH_2$  lerin  $H^+$  iyonlarını tutularak laktik asit oluşur. Ve bu oluşan laktik asit aktif diş çürüklerinde en yüksek oranda görülen asit olarak karşımıza çıkar.

Sonuç olarak oksijenli ve oksijensiz solunumlarda gerçekleşen son ürün reaksiyonlarından ve krebs döngüsünden bir takım organik asitler oluşur. Bu asitler dental plak formasyonunun irreversible aşamasında ortaya çıkmaya başlar. *S.mutans*'ın glikoliz ve fermantasyon sonucu oluşturduğu asitlerin bir kısmı güçlü ve yıkıcı yani demineralizasyon etkisi gösteren asitlerdir ki bunlar: laktik asit, malik asit, formik asit ve pirüvattır. Diğer oluşan asitler ise daha zayıftır ve tamponlanabilme kapasiteleri yüksektir. Bu asitler ise asetik asit, propionik asit, bütirik asit ve karbonik asitlerdir. Bunlara ilave olarak dental plaktaki diğer mikroorganizmaların fermantasyonu sonucu bir takım başka asitler de oluşur. Bunlar ise sükkinat, valerat ve kaproattır.<sup>10-12</sup>

Plak yapısındaki mikroorganizmaların çoğunluğunu asit üreten (asidojenik) mikroorganizmalar oluşturmasına rağmen, tüm mikroorganizmaların asit üretim oranları aynı

değildir. Optimal şartlar altında bazı bakteriler diğerlerinden daha fazla asit üretebilirler. Mesela streptokokların asit üretimi aktinomiçeslerden daha hızlıdır. Yine aynı grup içerisinde de asit üretim oranı farklılığı vardır. *S.mutans* ve *S.sabrinus*un asit üretim oranları *S.mitis*, *S.gordonii*, *S.sangius*, *S.oralis*, *S.intermedius*, *S.anginosus*, *S.vestibularis*, *S.constellatus*'a göre belirgin bir şekilde daha fazladır.<sup>13</sup>

Besin maddelerinin mevcudiyeti ve miktarına göre *S.mutans*, glikolitik yolla elde ettiği asit üretim modellerini değiştirebilir. Örneğin, küçük miktarlarda sukroz varlığında, glikoz ve fruktozdan türetilen major ürünler pirüvat, asetat ve formatken daha yüksek ve artırılmış oranlarda sukroz varlığında ürünler daha çok laktat ve daha az seviyede pirüvat olur.<sup>10</sup>

Organik asitlerin çeşitliliğinden dolayı değişik konsantrasyonlardaki asitlerin etkilerini dikkate almamız önem arz eder.

Mesela düşük karyojenik çevrede oluşan ve sınırlı fermantasyon kapasitesi olan dental plağın, primer ürünü asetatır daha az oranlarda propionat ve bütirattır. Bu zayıf asitler plak pH değişikliklerinde tamponlanabilirler. Aksine yüksek karyojenik çevrede oluşan ürünler ise yüksek oranlarda laktat, formate ve pirüvattır. Bu güçlü asitler ise minenin demineralizasyonuna çok daha fazla neden olurlar.

1994 yılında *S.Hojo* ve *ark*.<sup>14</sup> çekilmiş dişler üzerinde yaptığı bir çalışmada, çürük dentindeki asit profilleri ve pH değerlerini saptamışlardır. Aktif dentin çürüklerinde pH  $4.9 \pm 0.2$  iken laktat dominant asit olarak bulunmuştur. İlerlemesi durmuş dentin çürüklerinde ise pH 5.7 olarak tespit edilmiştir. Bu da aktif çürüklere göre daha yüksek bir değerdir. Bununla birlikte ilerlemesi durmuş lezyonlardaki dominant asitler ise asetat ve propionat'dır. (Tablo 1)

**Tablo 1.** Çürük dentindeki asit profilleri

	Aktif(n=15)	Durmuş(n=14)	Rest.alt.(n=7)	Sınıflandırma dışı n=40
pH	4.9 ± 0.2	5.7 ± 0.5 <sup>c</sup>	5.8 ± 0.7 <sup>c</sup>	5.6 ± 0.4
Asit % oranları				
Laktat	88.2 ± 8.3	7.5 ± 6.5 <sup>b</sup>	5.6 ± 8.3 <sup>c</sup>	49.0 ± 22.6
Asetat	9.6 ± 5.9	64.0 ± 14.4 <sup>a</sup>	54.0 ± 8.9 <sup>a</sup>	36.3 ± 20.2
Propionat	1.2 ± 1.1	18.2 ± 9.2 <sup>a</sup>	27.7 ± 10.6 <sup>c</sup>	9.6 ± 5.9
İ_Bütirat	nd	0.5 ± 1.7	1.8 ± 3.5	0.3 ± 0.5
N_Bütirat	0.6 ± 0.9	4.9 ± 5.4 <sup>a</sup>	6.3 ± 4.9 <sup>b</sup>	3.5 ± 4.7
İ_Valerat	0.1 ± 0.1	0.9 ± 1.4	0.9 ± 1.0	0.7 ± 0.9
N_Valerat	0.1 ± 0.4	1.7 ± 2.7	1.8 ± 3.0	0.9 ± 1.6
İ_Kaproat	nd	0.3 ± 0.7	0.6 ± 1.6	0.7 ± 1.1
N_Kaproat	0.2 ± 0.7	2.0 ± 4.1	1.3 ± 2.2	0.6 ± 1.4

n=örnek sayısı %=mol % nd=tespit edilememiş

pH ve organik asit yüzdeleri; aktif lezyonlarla, restorasyon altı ve ilerlemesi durmuş olan çürüklerle kıyaslanmıştır. (\* p<0.05; <sup>b</sup> p<0.01; <sup>c</sup> p<0.001)

Dental plaktaki oral laktik asit bakterilerinin (Laktobasiller, Streptokoklar ve Leukonostok) asit üretimleri sonucu pH kritik eşik olan 5.5 değerinin aşağısına indiği zaman mine yüzeyinde demineralizasyon başlar. Plak asiditesi sadece dişler üzerinde zarar oluşturmaz, aynı zamanda biyofilm mikroorganizmaları için de bir stres kaynağı oluşturur. Ve belli değerlerin altında (pH 3.0-2.5) karyojenik bakteriler için ölümcül olabilmektedir.

Bakterilerin metabolizmalarını ve canlılıklarını olumsuz yönde etkileyen faktörlerin başında; açlık (starvation) stresi, oksidatif stres, yüksek sıcaklık stresi ve asidik stres gelmektedir. Mikroorganizmalar bu tür etkilere karşı koyup canlılıklarını devam ettirebilmek için zaten yapılarında var olan ya da sonradan edindikleri savunma mekanizmalarına sahiptirler. Özellikle asidik strese karşı MS (Mutans Streptokok) türleri sahip oldukları ATR (asit tolerans cevabı) sayesinde biyofilm kompleksi içerisinde yüksek asidik ortamda bir adım öne çıkarak (asidojenik-asidürik) karyojeniteden birincil planda sorumlu olarak görülmüşlerdir.<sup>15</sup>

İşte bu ölümcül asit değerlerinde dental plak bakterilerinin nasıl hayatta kaldığı ve yeni asit sentezine nasıl katkıda bulunduğunu anlatan özellikleri genel olarak asidürik özellikleri olarak karşımıza çıkar.

Bu özellik mikroorganizmaların kendi ürettikleri asit ortamda yaşayabilme ve çoğalabilme kabiliyetleridir. Bazı bakteriler diğerlerine nazaran aside karşı daha dayanıklıdır. Laktobasiller ve S. mutans bu grubun önde gelen isimleridir ve pH stratejistleri olarak anılırlar. Hem oluşturdukları asit ortamda yaşarken hem de yeni asit sentezine katkıda bulunurlar. Böylece pH daha da düşer. Düşük pH ise mine demineralizasyonu için spesifik şarttır. Mikrofloranın bu asit toleransı minenin demineralizasyonunu dolayısıyla çürük gelişimini indükler. (Tablo 2)

**Tablo 2.** Asit toleransa sahip oral bakteriler

ASİT TOLERANS	PH= 4	ASİT TOLERANS	PH= 5
<i>Streptokokus Mutans</i>		<i>Streptokokus Sangius</i>	
<i>Streptokokus Sabrinus</i>		<i>Streptokokus Oralıs</i>	
<i>Laktobasillus spp.</i>		<i>Streptokokus Gordonii</i>	
<i>Aktinomiçes Odontolikus</i>		<i>Streptokokus Anjinosus</i>	
<i>Enterokokus Faekalis</i>		<i>Streptokokus Konstallatus</i>	
		<i>Streptokokus İntermedius</i>	
		<i>Streptokokus Mitis</i>	
		<i>Streptokokus Salvaryus</i>	
		<i>Streptokokus Vestibularıs</i>	
		<i>Aktinomiçes Visközüs</i>	

Dental plakta bulunan büyümesi ve çoğalması durmuş (non growing) bakterilerin pH 5.0 ve altında asit üretebilme kapasiteleri (asidojenik-asidürik) diş çürüğü ile doğrudan ilişkilidir. Diş yüzeyindeki minerallerin çözünmesi plak pH'sından dolayıdır. Bu çözülmeye neden olan düşük pH ise oral streptokokların minimum büyüebilme pH'sından daha düşük seviyededir. Yani bu pH seviyesinde oral streptokoklar büyüme ve çoğalma fonksiyonlarını sağlayamazlar ancak asit tolerans yetenekleri sayesinde canlılıklarını koruyup asit üretimini de devam ettirebildiklerinden dolayı diş çürüğünün birincil nedenidirler. Bu asit stresi altında bakteriler glikolitik yolla elde ettikleri ATP'yi büyüme ve çoğalma için değil yaşamsal metabolizmalarını devam ettirebilmek için kullanırlar.

İşte bu ATP büyümeden ziyade, F-ATPase yoluyla hücre membranı boyunca asit-baz dengesini korumak amacıyla kullanılır. Yani protonları (H<sup>+</sup>) F-ATPase ile membran dışına çıkarıp hücre içi alkalizasyonu sağlar. Hücre membranındaki pH değişim farkı asidik ortamda glikolizin devam edebilmesine olanak tanır. Ancak pH 3.0 ve altındaki oranlar karyojenik streptokoklar için dahi ölümcül olabilir. Asit öldürücülüğünün oranı üretilen asit miktarı ve derecesi ile ilişkili olduğu kadar bakterilerin doğal ve adaptif (edinsel) olan asit tolerans yetenekleri ile de ilişkilidir.<sup>16</sup>

Fermente olabilen karbonhidratların metabolizması esnasında asidojenik bakteriler, oluşan asitler sayesinde plak pH'sını 4 ve daha aşağı seviyelere dakikalar içerisinde düşürürler. Ve bu pH'sı plak biyofilminin yaşına bağlı olarak 1 saate kadar aynı şekilde koruyabilirler. İşte bu pH dalgalanmalarına karşı koyabilmek için çeşitli bakteriler, asit tolerans cevap yeteneğine sahiptirler. Bu bakteriler içerisinde *S.mutans* asit tolerans cevap yeteneği bakımından bir adım daha öne çıkmıştır.<sup>17</sup>

Çoğunlukla bu yanıt, plak ve çevresindeki pH düşüşlerinde mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebilmelerine, karbonhidratları fermente edip asit üretimlerine devam ettirebilmelerine olanak tanır.<sup>18</sup>

Neilands ve *ark.*<sup>19</sup> *S. mutans*'ın ATR sistemine "chitosan"ın etkisini incelemiştir. Çalışmalarının ilk aşamasında pH'sı 7.5 olan bakteri biyofilmini HCL kullanılarak asit şoka uğratarak lethal doz olan pH 3.5'e indirmişlerdir ve sadece çok az oranda bir hücrenin canlı kaldığını tespit etmişlerdir. İkinci aşamasında ise pH'sı 5.5 olan bakteri biyofilmini 2 saatlik inkübasyon periyodunun ardından yine lethal doz olan pH 3.5'de 30 dakika süre ile bekletmişler ve büyük oranda bakterinin canlılığını koruduğunu tespit etmişlerdir. Üçüncü aşamasında ise pH 7.5 olan bakteri biyofilmi, 15 dakika süre ile chitosan nanopartiküllerine maruz bırakılmış ve

ardından yine 2 saat süre ile pH 5.5 de adaptasyon amacıyla inkübe edilmiştir. Ardından lethal doz olan pH 3.5'da 30 dakika bekletilmiş ve çoğu bakterinin canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan çıkan sonuçlara göre araştırmacılar, normal şartlarda adaptasyon periyodu sonucunda ATR geliştirebilen mikroorganizmaların chitosan varlığında bu yeteneklerini ortaya koyamadıklarını iddia etmektedirler.

Welin ve *ark.*<sup>20</sup> yaptıkları çalışmada biyofilm oluşturmuş ve planktonik haldeki *S.mutans* hücrelerinin farklı türlerinin gerçekleştirdikleri asit toleranslarını incelemiştir. Buna göre araştırmacılar sert yüzeye tutunup biyofilm oluşturan bakteri popülasyonunun planktonik haldeki mutanslara kıyasla asit stresine karşı altı kat daha dirençli olduğunu belirtmektedirler. Böyle olmakla beraber 3 günlük matür biyofilmin asidik stres karşısında sağ kalım oranı %41.5 iken 3 saatlik immatür biyofilmin sağ kalım oranı %5.1 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca biyofilm içerisindeki çeşitli mutans türlerinin asit tolerans cevaplarının genetik yapıları nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı olmasa da farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda karyojenitenin biyofilm oluşumu ve bunun olgunlaşmasından doğrudan etkilendiği ortaya çıkmaktadır.

ATR asidik koşullar altında devreye giren bir mekanizmadır ve pH 5-5.5 ATR indüksiyonu için optimal seviyedir. ATR'de altmıştan fazla protein gen rol oynar. Bunların büyük çoğunluğu da asidik şokun ilk 30 dakikasında aktif haldedir. Tümünün aktif hale gelmesi ise 90 ile 120 dakika arasında gerçekleşmektedir.<sup>6,7,21</sup>

Biyofilm mikroorganizmalarının asit stresine karşı verdiği cevap mekanizmaları;

- Genel stress proteinlerinin indüklenmesi,
- Membran proton geçirgenliğinin azalması,
- Proton ekstrüzyonu (F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPase)

- Artmış glikolitik aktivite
- DNA ve makroproteinlerin tamiri,
- Anabolik reaksiyonlar baskılanması (daha yavaş büyüme ve daha az metabolik ürün)
- Sitoplazma alkalizasyonu:

- Membran F-ATPases
- Arjinin deaminaz sistem (ADS)
- Sitoplazmik Ureaz sistemi (st.salivarius)
- Agmatin deaminaz sistem (AgDS)

-Malolaktik fermentasyon (MLF), gibi birden çok reaksiyonla meydana gelebilmektedir.<sup>17,22</sup>

### **Genel stress proteinlerinin indüklenmesi**

Bakterilerin açlık, oksidatif, yüksek sıcaklık ve asidik streslere maruz kaldıkları zaman koruyucu mekanizmalarını başlatabilmeleri ve devam ettirebilmeleri için gerekli olan genetik proteinlerin uyarımı, sitoplazmaya salınımı ve fonksiyonlarını gerçekleştirme aşamasıdır. Len ve ark.<sup>21</sup> yaptıkları çalışmalarında nötral şartlarda (pH:7) gelişen hücre kültürü ile asidik şartlarda (pH:5) gelişen hücre kültürleri arasında 30 farklı gen proteinini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu genetik proteinlerin stres tolerans mekanizması kapsamındaki yollarda görev aldıklarını belirtmişlerdir.

### **Membran proton geçirgenliğinin azalması**

Hücre membran bütünlüğünün ve kompozisyonunun önemi birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Şöyle ki hücre membranı bünyesinde bulunan doymuş yağ asidi sentezinin artması ve yoğunlaşması, azalmış proton (H<sup>+</sup>) geçirgenliğiyle sonuçlanmaktadır. Bu yağ asitlerinin biyosentezi de stres uyaranlarına karşı aktifleşen genler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca hücre membran yüzeyi ile ilişkili genetik proteinlerin de hücre duvarı biyosentezi, biyofilm sentezi ve stres tolerans mekanizmalarında çok önemli görevler aldıkları belirtilmektedir. Wen ve ark.<sup>22</sup>

yaptıkları çalışmalarında membran yüzeyi ile ilişkili BrpA geni mutasyonlu hücrelerin yukarıda bahsedilen mekanizmalarının kontrol hücreleri ile kıyaslandığında belirgin biçimde olumsuz yönde etkilendiğini bildirmektedir.<sup>23</sup>

### **Proton ekstrüzyonu (F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPase)**

S.mutans'ın sitoplazma ve ekstraselüler çevre arasındaki pH homeostazını sağlamak için primer mekanizması proton ekstrüzyonu yapan membran yapısı içerisindeki F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPase sistemidir. Mikroorganizmalar stres altında hücre içi pH'larını dengeleyebilmeleri ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için hücre içerisindeki protonları sitoplazma dışına çıkarmaları gerekmektedir. Özellikle proton taşıyan ATPase sistemleri membran boyunca protonları dışarı çıkararak aside karşı hassas olan glikolitik enzimleri korurlar ve hücrenin canlı kalıp asidik ortamda ve diğer stresler altında yaşayabilmelerini sağlarlar.<sup>15,24,25</sup>

### **Artmış Glikolitik aktivite**

Çevresel stresler özellikle asidik strese maruz kalan bakteri hücrelerinin hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerçekleştirdikleri bir diğer savunma mekanizması ise artmış glikolitik aktivitedir. Ph 5.0'da hücrelerin H<sup>+</sup> iyonlarını hücre dışına çıkarabilmeleri ve sitoplazmanın alkalizasyonunu sağlayabilmesi için ATP üretimine ihtiyacı vardır. İşte bu ATP ihtiyacını asidürik özelliğe sahip hücreler glikolitik aktivitelerini artırarak giderirler. Len ve ark.<sup>21</sup> yaptıkları çalışmada S.mutans'ın nötral pH'da(7.0) glikoz transferine kullandıkları EII<sup>man</sup> ve EII<sup>glc</sup> enzim kompleks sistemlerini, asidik pH'da(5.0) kullanmaktan kaçındıkları ve bu iki glikoz transfer sistemi haricinde sitoplazmanın daha fazla alkali olmasını sağlayan yeni bir non-PTS glikoz permeaz enzim kompleksini tercih ettiklerini bildirmişlerdir. Iwami ve ark.<sup>26</sup> ise pH:5.5'de S.mutans hücrelerinin glikolizin pirüvata indirgendiği tepkimelerdeki kullanılan enzimlerden 3-fosfogliserat ve fosfoenolpirivat'ın seviyelerinin azaldığı, 2-

fosfogliserat enzim seviyesinin aynı kaldığı ve pirüvat miktarının arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları diğer bir çalışmada ise hücre içi pH düştüğü zaman pirüvat/fosfoenolpirüvat oranının belirgin bir şekilde arttığını göstermişlerdir ki bu da pirüvatın ortamda artması yani daha fazla enerji elde edilmesi anlamına gelmektedir.<sup>27</sup>

#### **DNA ve makroproteinlerin tamiri**

Oral biyofilm hücrelerinin maruz kaldıkları stresler (açlık, asidik, oksidatif, termal, uv radyasyon)<sup>28</sup> sonucu gerçekleşebilen zararlardan bir tanesi de DNA harabiyetidir. DNA sarmalında glikozil bağlayan deoksiribonükleotitler düşük pH'da kararsız ve değişken bir durumdadır. Asit atağa maruz kalmış hücrede glikosil bağlarının kopması sonucunda pürin ve primidinler sarmal yapıdan ayrılarak DNA'nın bozulmasına neden olabilirler. Tamir edilmemiş DNA hasarları hücre için ölümcül olabilir.<sup>20</sup> Hanna ve ark.<sup>29</sup> yaptıkları çalışmada düşük pH larda S. mutans'da beliren bir genin B.subtillis'in UV tamir genine benzer yapıda olduğunu ve bu gen mutant olan S.mutans suşlarının standart suşlarla kıyaslandığında asit ve UV ataklarına karşı çok duyarlı hale geldiklerini bildirmişlerdir.

#### **Anabolik reaksiyonların baskılanması**

pH seviyesinin 5.0 ve altına düşmüş olduğu asidik durumlarda, strese cevap olarak dental plak bakterileri elde ettikleri enerjiyi, büyüme ve çoğalma gibi anabolik reaksiyonlardan ziyade çevresel streslerle mücadele için kullanmaya başlar.<sup>17</sup>

#### **Sitoplazma alkalizasyonu;**

##### **Membran F-ATPase**

Asit toleransa sahip bakterilerin sitoplazma pH'sını alkali tutabilmelerinin en önemli yollarından bir tanesi de membran F-ATPase sistemidir. Bu enzim sistemi hücre içi alkalizasyonu sağlamanın yanında, protonları hücre dışına çıkararak hücrelerin yaşamını

devam ettirebilmeleri için gerekli olan ATP üretimine de katkıda bulunmaktadır.<sup>15,24,30,31</sup>

#### **Arjinin deaminaz sistem(ADS)**

Asit zararına karşı ağız içi bakterilerin kendilerini korumaları için kullandıkları diğer bir yol da alkali üretimidir. Arjininin yıkıma uğrayıp amonyağın açığa çıkması hücresel ve çevresel pH'yı artırır ve asit stresine karşı bir rahatlama olur.<sup>32,33</sup>

#### **Üre**

Diğer bir major alkali üretim kaynağıdır. Streptococcus salivarius ya da Actinomyces naeslundii tükürüğün içerisinde bulunan ürenin hidrolizini katalize ederler ve CO<sub>2</sub> ve NH<sub>3</sub> oluşur. Üreaz üretimi asidifikasyondan ziyade azot açlığına karşı cevapları düzenleyen bir sistem olarak görülür. Asit zararlarına karşı görevi enzimin ikinci bir fonksiyonu gibidir. Tükürük ve dolayısıyla ağız ortamındaki üre ve arjinin konsantrasyonunun artmasının karyojenik mikro-organizmaları negatif etkilediği yapılan çalışmalarla belirtilmiştir. Araştırmacılar üreaz ve arjinin deaminaz sistemi sayesinde üretilen amonyağın, çürük gelişimi ve asidojenik mikrobiyom için endojen kaynaklı bir inhibitör olabileceğini savunmaktadırlar.<sup>34</sup>

#### **Agmatin deaminaz sistem (AgDS)**

S. mutans'ın yüksek seviyede asit toleransı olmasına karşın ADS (arjinin deaminaz sistem) ve üreaz negatiftir. Buna karşın düşük seviyelerde de olsa agmatin deaminaz sistemi vardır. Sistem düşük pH'larda aktiftir böylece asit toleransa da katkıda bulunur. Yüksek asit tolerans yeteneğine sahip olmasına rağmen S.mutans alkali üretme eğiliminde olan bir mikroorganizma değildir. Zaten agmatin deaminaz sistemi de baz üretmek için değil daha çok agmatinin detoksifikasyonunu sağlamak için yapılmaktadır.<sup>35</sup>

Sheng ve ark.<sup>36</sup> 2007 yılında S.mutans'ın da aralarında bulunduğu oral laktik asit bakterilerinin değişik bir alkali üretim

sistemlerinin olduğunu tanımlamışlardır. Bu sistem amonyak üretmez onun yerine L-malik asidin dekarboksilasyonunu katalize ederek alkalizasyonu sağlar ve bakterilerin asidik streslerin öldürücü etkilerine karşı korunmalarına yardımcı olur. Sheng ve Marquizin bulduğu bu sistem MLF (Malolaktik Fermantasyon)'dir.

### MALOLAKTİK FERMANTASYON

Plak pH'sının düşmesi ile birlikte asit stresine maruz kalan mikroorganizmaların glikolitik aktivitelerinin azalmasıyla birlikte glikoliz ürünleri ve ATP üretimi de azalır. Mikroorganizmaların bu asidik ortamda canlı kalabilmeleri için gerekli enerjiyi sağlayabilmesi için glikoliz haricinde başka yollara ihtiyacı vardır. MLF karyojenik *S.mutans*'ın da aralarında bulunduğu bazı oral laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus*) asidik ortamda enerji gereksinimleri için ATP elde ettikleri çok önemli bir sistemdir. MLF aynı zamanda daha asidik olan malik asidi, laktik asit ve CO<sub>2</sub>'e dönüştürerek ortamın alkalileşmesini sağlayan ve bakterilerin yaşamlarını devam ettirebilmelerine ciddi biçimde destek olan major sistemlerdendir. Yani MLF, hücreleri sadece asit zararına karşı korumakla kalmaz starvation (açlık) zararlarına karşı da korur. Bu reaksiyon malolaktik enzim (MLE) katalizörlüğünde gerçekleşen bir dekarboksilasyondur. *S.mutans*'ların düşük asidik şartlarda MLF gerçekleştirebilme yeteneği diğer streptokok türlerine kıyasla daha başarılıdır, bu nedenle MLF, *S.mutans*'ın çok özellikli dental plak kompleksi içerisinde baskın rol oynamasını sağlamaktadır. *S.mutans*'ın düşük pH'larda (Ph=4 veya Ph=5) malik asitten laktik asit üretim kapasitesi, glikoliz ile laktik asit üretim kapasitesinden daha yüksektir. *S.mutans*'ın bu yeteneği yüksek karyojenik özellik göstermesinde çok etkilidir.<sup>36,37</sup>

*S.mutans*'ın asit tolerans cevabı düşük pH seviyelerinde ortamda malat bulunmadığında

da devreye girer. *S.mutans*'ın bu davranışı adaptif olabilir, çünkü bakteriyel biofilme meydana gelen pH değişimleri ve malik asit mevcudiyeti biofilmin kendi metabolik faaliyetleri haricinde, asidik yapıya sahip meyve-sebze alımından da etkilenir. Sheng ve ark.<sup>37</sup> MLF'nin, elma ve diğer bazı yiyecekler içinde major bir asit olarak bulunan L-Malat tarafından uyarılabilen bir sistem olduğunu bildirmişlerdir.

*S.mutans* suşlarında MLF için optimal pH 4.0'tür. Ancak pH 2.5 – 3.0 seviyelerinde de MLF reaksiyonu gerçekleşmektedir. Optimum pH 4.0'e ulaştıktan sonra malik asit dekarboksilasyonu giderek azalır ve pH 7.0 seviyesinde reaksiyon neredeyse tamamen durur. Dolayısıyla pH, MLF için adeta bir açma kapama düğmesi olarak görev yapar.<sup>37</sup>

Sheng ve ark.<sup>37</sup> yaptıkları çalışmada *S.mutans*, *S.sabrinus*, *S.salvayus*, *S.sangius* ve *L.kasei* türlerinin gerçekleştirdikleri maksimal MLF aktiviteleri ve optimal pH değerlerini tespit etmişlerdir. Çalışmaya göre pH optimal değeri sırasıyla 4.0; 4.5; 4.5; 5.0; 3.0 dır. MLF aktiviteleri ise yine sırasıyla 9.91±2.37; 23.52±4.10; 14.19±0.95; 8.58±0.95; 46.34±4.71 olarak bildirmişlerdir. *S.mutans*'ın diğer streptokoklara göre daha düşük pH seviyelerinde maksimal aktivitesini sergilemesi, karyojeniteden birincil olarak sorumlu tutulmalarını destekler bir çalışma olmuştur.

*S.mutans* genomunda (Oralgen database; <http://www.oralgen.lanl.gov>) MLF ile ilişkili genler tespit edilmiştir. Buna göre mleR'nin (SMu0121) MLF'nin regülasyonundan, mleS'nin (SMu0123) malolaktik enzim aktivasyonundan (L-malatın, L-laktik asit ve CO<sub>2</sub>'e dekarboksile olmasını katalize eder) ve mleP'nin (SMu0124) malat permeaz regülasyonundan (L-malatın hücre membranı boyunca transportunu katalize eder) sorumlu genler olduğu bildirilmiştir.<sup>17,38</sup>



### ***Inhibitörler***

Sheng ve ark.<sup>36,37</sup> yaptıkları çalışmada, DCCD (N,N-dicyclohexylcarbodiimid'in) 1.0 mM konsantrasyonda etkili bir şekilde MLF ile ilişkili ATP sentezini bloke ettiğini ve bunun da F(H)-ATPase'in blokajından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada yaygın bir şekilde ağız bakım ürünlerinde kullanılan florun, HF formunda, protonların transmembran kondüktörü olduğunu ve pH 4 de *S.mutans* UA159 hücrelerinin malattan ATP üretimini artan bir şekilde inhibe ettiğini ayrıca glikolitik enzim olan enolazı inhibe ederek ATP üretiminin azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.<sup>39</sup> Ağız bakım ürünlerinde yaygın bir şekilde kullanılan triclosan da pH 4 ve 0.1 mM ID 50 de *S.mutans* UA159'un MLF'nunu etkili bir şekilde inhibe eder. Bu inhibisyonlar sonucu *S.mutans* hücreleri MLF gerçekleştiremez ve asit ataklara karşı savunmasız kalır.

Fozo ve ark.<sup>24</sup> yağ asidi biyosentezi inhibitörü olan cerulenin ile işlem görmüş hücrelerin yoğun asit ortamlarında yaşamlarını sürdüremediklerini bildirmişlerdir.

Bender ve ark.<sup>15</sup> ise gramicidin gibi antibiyotiklerin de hücre membranının protonlara karşı permeabilitesini artırdığını ve membran boyunca pH dengesinin bozulmasına yol açtığını dolayısıyla aside karşı hassas türlerin oluştuğunu belirtmişlerdir.

Matsui ve ark.<sup>40</sup> asit toleransdan sorumlu genlerden olan ComCDE, hk11/tr11 ve CiaH/K genlerinin baskılanmasının asite karşı hassas fenotiplerin oluşmasına yol açabileceğini bu da bakterilerin karyojenik potansiyellerini azaltabileceğini bildirmişlerdir.

Hasona ve ark.<sup>41,42</sup> sinyal tanımlama sistemi (SRP: signal recognition pathway) ile ilişkili genlerin mutant olmalarının da biyofilm oluşumunun azalmasına neden olduğu, stres tolerans ve biyofilm oluşumunun birbiri ile çakışan birçok yönü olduğunu bildirilmiştir.

Yine doymuş yağ asitlerinin biyosentezinden sorumlu olan fabM geninin inaktivasyonu da düşük pH ortamlarına hassas bakteri türlerin oluşmasına ve hücrelerin delta pH'ı sürdürememelerine neden olduğu bildirilmiştir.

Protein bağlanması, renatürasyon ve parçalanma gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol alan GroEL ve DnaK gibi hassas genlerin inhibisyonu da yüksek sıcaklığa hassas türlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Yine trigger faktörolan RopA (ribosome-associated peptidyl-prolyl isomerase) geninin adezyon ve biyofilm oluşumunda ve asit toleransda önemli görev aldığını bildirmişlerdir.<sup>22</sup>

Fe ve Mn gibi metalik iyonlar da *S.mutans*'ın virülans özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynadıkları belirtilmiştir. Metalloregülâtör geni olan SloR geni ise *S.mutans*'ın biyofilm formasyonu ve oksidatif streslere karşı hücrelerin mücadelesinde önemli rol oynar. Bu genin baskılanması ise yine düşük pH seviyelerine karşı hassas türlerin ortaya çıkmasına neden olur.<sup>43,44</sup>

Yine agmatinin aktivasyonundan sorumlu olan LuxR gen ailesinden olan AguR geninin inaktivasyonu da AgD metabolizmasını azaltır ve hücre içi alkalizasyonunun sağlanmasını zorlaştırır. Hücre içi alkali ortamı sağlayamayan bakteriler asit ataklarında savunmasız kalırlar.<sup>37</sup>

UvrA geninin inhibisyonu da yine UV zararlarına karşı DNA'nın kendini tamir edebilme yeteneğini engeller ve streslere karşı hücreler korumasız kalırlar.<sup>31</sup>

Çitosan nanopartiküllerinin de *S.mutans*'ın asit tolerans sistemi üzerinde inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Çitosan bu etkisini hücre membranıyla etkileşerek ve membran geçirgenliğini değiştirerek gerçekleştirir. Ayrıca chitosan mRNA ve bazı proteinlerin sentezini inhibe edebilir. Yani çitosan varlığında mikroorganizmalar asit adaptasyonlarını sağlayamaz ve ölürlür. Bu da dental plağın

kompleks yapısında bozulmalara neden olur.<sup>19</sup> Nguyen ve ark.<sup>45</sup> yaptıkları çalışmalarında  $\alpha$ -mangostin bitkisinin, *S.mutans*'ın MLF'sini ve F-ATPase'ı da içeren membran enzimlerini etkili bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu özelliklerinden dolayı  $\alpha$ -mangostin'nin antikaryojen ajanlarda kullanışlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Duarte ve ark.<sup>46</sup> ise polifenol içeriği bakımından zengin olan kıvılcık meyvasının da *S.mutans*'ın glikoziltransferaz ve F-ATPase enzimlerinin inhibisyonuna neden olduğunu böylece *S.mutans*'ın asidojenitesi ve biyofilm oluşturmasını olumsuz etkilediklerini bildirmişlerdir.

Yine pürivat dehidrogenaz enzim kompleksi nden sorumlu gen olan *pdhA* geninin baskılanması asit toleransı azaltmak ve *S.mutans*'ın karyojenitesini düşürmek için geliştirilebilecek yeni bir strateji olabilir.

Sonuç olarak *S.mutans*'ın gerçekleştirdiği bütün asit tolerans özelliklerinin inhibisyonu, çürük önleme stratejilerinin geliştirilmesinde yeni bir hedef olarak değerlendirilebilir.

## SONUÇ

Dental çürük, dünya genelinde yaygın olarak görülen ve asidojenik & asidürik bakterilerin diş yüzeyindeki kolonizasyonları sonucu oluşan multifaktöriyel bir enfeksiyöz hastalıktır.<sup>1-3</sup> Karyojen mikroorganizmalar içerisinde ATR yeteneği bakımından en etkili olanlar *S.mutans* ve *Laktobasil* türleridir.<sup>36,37</sup> Bu yetenekleri sayesinde sözü geçen bakteriler çok düşük asidik ortamlarda dahi canlılıklarını devam ettirebildiklerinden dolayı yüksek karyojen özellik gösterirler.<sup>18,47</sup> Başlıca ATR mekanizmalarının biri olan MLF *S.mutans*'da major alkali üretim kaynağıdır.<sup>36</sup> ATR ve MLF inhibitörü moleküllere örnek olarak DCCD, flor, triklosan, serulenin, çitosan, mangostan, kıvılcık ve gramisidin verilebilir. Bu moleküllerin antikaryojenik özelliklerini gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>20, 26, 37</sup> Ayrıca ATR'den sorumlu olduğu düşünülen genlerle ilgili yapılan çalışmalarda bu genlerin baskılanması sonucunda

antikaryojenik sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.<sup>38-48</sup> Yapılan bu çalışma sonuçlarına göre araştırmacılar MLF'nin de içerisinde bulunduğu ATR sisteminin çürük oluşumunda ne denli önemli bir yerinin bulunduğu ve çürük önleme stratejileri geliştirilmesinde birincil hedeflerden olması gerektiğini belirtmektedirler.

## REFERANSLAR

1. Hamada S & Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44:331–384.
2. Harper DS & Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 1984;10, 843–848.
3. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353–380.
4. Van Ruyven FO, Lingstrom P, Van Houte J & Kent R. Relationship among *Streptococcus mutans*, “low-pH” bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *J Dent Res* 2000;79:778–784.
5. Belli WA, Marquis RE. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 1991;57(4):1134–1138.
6. Svensater G, Larsson UB, Greif ECG, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:266-273.
7. Hamilton IR, Svensater G. Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:292-300.
8. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel NC. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-464.
9. Carr FJ, Chill D, Maida N. “The lactic acid bacteria: A literature survey”. *Critical Reviews in Microbiology* 2002;28: 281-370

10. Walsh LJ. Dental plaque fermentation and its role in caries risk assessment. *International Dentistry South Africa (Australasian Edition)* 2006;1:3, 4-13.
11. Vratsanos SM, Mandel ID. Comparative plaque acidogenesis of caries-resistant vs. caries-susceptible adults. *J Dent Res* 1982;61:465-468.
12. Coogan MM, Motlekar HB. Salivary and plaque acids in caries active and caries free subjects. *J Dent Assoc S Afr* 1996;51:823-827.
13. De Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. Strain-Related Acid Production by Oral Streptococci. *Caries research* 2000;34:(6), 486-490.
14. Hojo S, Komatsu M, Okuda R, Takahashi N, Yamada T. Acid profiles and pH of carious dentin in active and arrested lesions. *Journal of dental research* 1994;73(12): 1853-1857.
15. Bender GR, Sutton SV, Marquis RE. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect Immun* 1986;53:331-338.
16. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9: 54-85.
17. Lemme A, Sztajer H, Wagner-Döbler I. Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC microbiology* 2010;10:1,1.
18. Hamilton IR, Buckley ND. Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 65-71.
19. Neilands J, Sutherland D, Resin A, Wejse PL, Chávez de Paz LE. Chitosan nanoparticles affect the acid tolerance response in adhered cells of *Streptococcus mutans*. *Caries research* 2011;45:6, 501-505.
20. Welin-Neilands J, Svensäter G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Applied and environmental microbiology* 2007;73:17, 5633-5638.
21. Len AC, Harty DW, Jacques NA. Proteome analysis of *Streptococcus mutans* metabolic phenotype during acid tolerance. *Microbiology* 2004;150:1353-1366.
22. Wen ZT, Suntharaligham P, Cvitkovitch DG, Burne RA. Trigger factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation. *Infection and immunity* (2005;73(1):219-225.
23. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol* 2005;7:95-107.
24. Fozo EM, Quivey RG Jr. The *fabM* gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *Journal of bacteriology* 2004;186:4152-4158.
25. Sturr MG, Marquis RE. Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 1992;58: 2287-2291.
26. Iwami Y, Abbe K, Takahashi-Abbe S, Yamada T. Acid production by streptococci growing at low pH in a chemostat under anaerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7: 304-308.
27. Vadeboncoeur C, St Martin S, Brochu D, Hamilton IR. Effect of growth rate and pH on intracellular levels and activities of the components of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect Immun* 1991;59: 900-906.
28. Quivey RG, Jr Faustoferra RC, Clancy KA, Marquis RE. Acid adaptation in *Streptococcus mutans* UA159 alleviates sensitization to environmental stress due to RecA deficiency. *FEMS Microbiol Lett* 1995;126, 257-261.
29. Hanna MN, Ferguson RJ, Li YH, Cvitkovitch DG. *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol* 2001;183: 5964-5973
30. Sheng J, Marquis RE. Enhanced acid resistance of oral streptococci at lethal pH values associated with acid-tolerant catabolism

- and with ATP synthase activity. *FEMS microbiology letters* 2006;262:93–98.
- 31.** Bender GR, Marquis RE. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:2124-2128.
- 32.** Casiano-Colón AIDA, Marquis RE. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54(6): 1318-1324.
- 33.** Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 2000;193:1.6
- 34.** Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24(2): 89-95.
- 35.** Griswold AR, Jameson-Lee M, Burne RA. Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3):834–841
- 36.** Sheng J, Marquis RE. Malolactic fermentation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;272: 196–201.
- 37.** Sheng J, Baldeck JD, Nguyen PT, Quivey RG, Marquis RE. Alkali production associated with malolactic fermentation by oral streptococci and protection against acid, oxidative, or starvation damage. *Canadian journal of microbiology* 2010;56(7): 539-547.
- 38.** Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99(22): 14434-14439.
- 39.** Kanapka JA, Hamilton IR. Fluoride inhibition of enolase activity *in vivo* and its relationship to the inhibition of glucose-6-P formation in the oral microbe, *Streptococcus salivarius*. *Arch. Biochem. Biophys* 1971;144: 596–602.
- 40.** Matsui R, Cvitkovitch D. Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future microbiology*, 2010;5(3): 403-417.
- 41.** Hasona A, Crowley PJ, Levesque CM, Mair RW, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Brady LJ. Streptococcal viability and diminished stress tolerance in mutants lacking the signal recognition particle pathway or YidC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(48):17466-17471.
- 42.** Hasona A, Zuobi-Hasona K, Crowley PJ, Abranches J, Ruelf MA, Bleiweis AS, et al. Membrane composition changes and physiological adaptation by *Streptococcus mutans* signal recognition particle pathway mutants. *Journal of bacteriology* 2007; 189(4):1219-1230.
- 43.** Dunning DW, McCall LW, Powell WF Jr, Arscott WT, McConocha EM, McClurg CJ, Goodman SD, Spatafora GA. SloR modulation of the *Streptococcus mutans* acid tolerance response involves the GcrR response regulator as an essential intermediary. *Microbiology* 2008;154:1132–1143.
- 44.** Rolerson E, Swick A, Newlon L, Palmer C, Pan Y, Keeshan B, Spatafora G. The SloR/Dlg metalloregulator modulates *Streptococcus mutans* virulence gene expression. *Journal of bacteriology* 2006;188:5033–5044.
- 45.** Nguyen PT, Marquis RE. Antimicrobial actions of  $\alpha$ -mangostin against oral streptococci. *Canadian journal of microbiology* 2011;57(3):217-225.
- 46.** Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, Koo H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 2006;257(1):50-56.
- 47.** Len AC, Harty DW, Jacques NA. Stress responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology* 2004;150:1339- 1351.

**48.**Lemos JA, Chen YY, Burne RA. Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 2001;183:6074-6084.

**İletişim:**

Dr.Erol Keskin

Kırıkkale Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Yenişehir Mahallesi Çelebi Sokak No:1  
YAHŞİHAN/KIRIKKALE

Tel : +90 318 2244927

+905055750910

Fax : +90 3182250685

E-posta : dt.erolkeskin@hotmail.com