

SİNOP İLİ DENİZ SUYU ve KARA MİDYE
(*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819)'NİN
MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ ve İZOLE EDİLEN
Escherichia coli SUŞLARININ MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU
CUMHUR AVŞAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNOP İLİ DENİZ SUYU ve KARA MİDYE (*Mytilus galloprovincialis*
LAMARCK, 1819)'NİN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ ve İZOLE EDİLEN
Escherichia coli SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

CUMHUR AVŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. İSMET BERBER

SİNOP – 2013

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma, jürimiz tarafından 24/01/2013 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Vahit KONAR



Üye : Doç. Dr. İsmet BERBER



Üye : Yrd. Doç. Dr. Süleyman ÖZDEMİR



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

15/02/2013



Doç. Dr. Hünkar Avni DUYAR
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**SİNOP İLİ DENİZ SUYU ve KARA MİDYE (*Mytilus galloprovincialis*
LAMARCK, 1819)'NİN MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ ve İZOLE
EDİLEN *Escherichia coli* SUŞLARININ MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

ÖZET

Kıyı sularında fekal koliform ve fekal *Streptococcus* kontaminasyonu bütün dünyada yaygın bir halk sağlığı sorunudur. Bu çalışmada, Mayıs-2011 ve Ekim-2011 tarihleri arasında Sinop ilinde belirlenen 15 farklı istasyondan alınan deniz suyu ve midye (*Mytilus galloprovincialis*) örneklerinin fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri yapıldı. Ayrıca, bu örneklerden izole edilen 40 yerel ve 1 adet referans olmak üzere toplam 41 adet *Escherichia coli* suşunun; fenotipik karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri, plazmid DNA profilleri ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemlerine göre karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Yapılan mikrobiyolojik analizler, deniz suyu ve midye örnekleri için bazı istasyonların fekal koliform ve fekal streptokok sayılarının tavsiye edilen değerlerin üzerinde olduğunu gösterdi. Farklı istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin mikrobiyolojik analizleri; her bir istasyon için toplam koliform, fekal koliform ve fekal streptokok sayıları arasındaki farkın önemli ($p<0.05$) olduğu, toplam aerob bakteri sayıları için ise anlamsız ($p>0.05$) olduğunu ortaya koydu. Ayrıca, farklı istasyonlardan toplanan midye örnekleri için yapılan tüm sayım sonuçları arasındaki farkın anlamsız ($p<0.05$) olduğu da tespit edildi.

Morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre, bütün yerel izolatların *E. coli* türüne ait oldukları belirlendi. Bütün suşların 7 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edildi. Antibiyogram sonuçlarına göre, suşlardaki antibiyotik dirençliliği; basitrasin (%100), novobiyosin (%100), ampisilin (%12.5), tetrasiklin (%7.5), seftazidim (%5) ve imipenem (%2.5) olarak belirlendi. Buna karşın, suşların hepsinin polimiksin B (%100)'ye duyarlı oldukları da bulundu.

Toplam hücre protein profilleri (41 adet *E. coli*) esas alınarak yapılan nümerik analiz, *E. coli* suşlarının benzerlik düzeyi %72, %78 ile %87 ve üzerinde iki major gruba ayrıldığını ortaya koydu. Ayrıca, suşların hücre dışı protein profilleri (31 adet *E.*

coli) esas alınarak yapılan nümerik analizde ise benzerlik düzeyi %75 ile %78 ve üzerinde iki major grup oluşturdu. Sonuçta, hücre dışı protein profillerinin toplam hücre protein profillerine göre daha iyi ayırım sağladığı belirlendi.

Plazmid DNA analiz sonuçları, suşların 22 tanesinde moleküler ağırlığı 24.500-1.618 bp arasında değişen farklı plazmidlerin varlığını doğruladı. Bu suşların 21 tanesinde moleküler ağırlığı 14.700 bp olan plazmidin ortak olduğu bulundu.

Araştırmada izole edilen 20 adet *E. coli* suşunun RAPD tekniği ile 2 farklı primer kullanılarak elde edilen bantların UPGMA metoduna göre nümerik analizleri yapıldı. RBM-6 primeri kullanılarak oluşturulan dendrogram, bant üreten toplam 13 suşun benzerlik düzeyi %12 ve üzerinde 2 major gruba ayrıldığını ortaya koydu. COL-I primeri kullanılarak oluşturulan dendrogram ise bant üreten toplam 14 suşun benzerlik düzeyi %26 ve üzerinde yine 2 major gruba ayrıldığını gösterdi.

Sonuç olarak, bu çalışmada bazı istasyonlarda alınan su ve midye örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları, istasyonlardaki mikrobiyal kirlilik düzeyinin ciddi boyutlara ulaştığını gösterdi. Ayrıca, bu çalışmada izole edilen *E. coli* suşlarının ayırımında morfolojik ve fizyolojik özellikler, SDS-PAGE tekniğiyle elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerinin nümerik analizi tür seviyesinde yeterli olurken, tür altı düzeyde ayırım için RAPD-PCR tekniğinin daha faydalı ve hızlı bir yöntem olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fekal koliform, *E. coli*, Antibiyogram, SDS-PAGE, Protein Profilleri, Plazmid, RAPD-PCR

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS of SEAWATER and BLACK MUSSELS
(*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK, 1819) of SİNOP PROVINCE and
MOLECULAR CHARACTERIZATION of ISOLATED *Escherichia coli*
STRAINS

ABSTRACT

Fecal coliform and fecal streptococcus contamination at coastal waters is one of the common problems of public health all over the world. In this study, the physico-chemical and microbiological analysis of seawater and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) samples collected from 15 different stations in Sinop between May-2011 and October-2011 were investigated. The characterization of a total of 41 strains of *Escherichia coli* including 40 native isolates and 1 reference strain also were carried out according to phenotypic characterization, antibiogram, whole cell and extracellular protein profiles, plasmid DNA profiles and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method.

According to microbiological analyses, it was shown that the numbers of fecal coliform and fecal streptococcus for the seawater and mussel samples were over recommended values in some stations. Further, the microbiological analyses of seawater examples collected from different stations showed that the difference between total coliform, fecal coliform and fecal streptococcus numbers ($p < 0.05$) was significant for each station, while the difference was not significant for total aerobic bacteria numbers ($p > 0.05$). In addition, the difference between whole counting results for mussel samples collected from different stations was not significant ($p < 0.05$), too.

According to morphological and physiological properties, it was determined that the native isolates belonged to *E. coli* species. The antibiotic susceptibility of all strains against 7 standard drugs was tested using disc diffusion method. In accordance with the result of antibiogram, the antibiotic resistivities of the isolates were as bacitracine (100%), novobiocin (100%), ampicillin (12.5%), tetracycline (7.5%), ceftazidime (5%) and imipenem (2.5%), respectively. On the other hand, it was found that whole strains were susceptible to polymyxin B (100%).

The numerical analysis of whole cell protein profiles revealed that *E. coli* strains were separated to 2 major groups at similarity levels of 72%, 78% and 87% or above.

Moreover, the numerical analysis of extracellular protein profiles of strains were generated 2 major groups at similarity levels of 75%, 78% or above. Eventually, it was pointed out that extracellular protein profiles provided better distinction than whole cell protein profiles.

Plasmid DNA analyses results confirmed that 22 strains consisted of plasmids molecular weight changing between 24.500-1.618 bp. The plasmid molecular weighing 14.700 bp was found as common 21 of these strains.

A numerical analysis of the DNA band profiles obtained by using 2 different primers of 20 *E. coli* strains was carried out by using UPGMA method. A dendrogram generated by using RBM-6 primer revealed that 13 strains produced bands divided into 2 major clusters at similarity levels of 12% or above. However, a dendrogram generated by using COL-I primer displayed that 14 strains produced bands scattered into 2 major clusters at similarity levels of %26 and over.

Consequently, in the study, the microbiological analysis results of the samples of seawater and mussel collected from some stations indicated that microbial pollution degree had reached to serious size. It was also determined that while the morphological and physiological properties, the numerical analysis of whole cell and extracellular protein profiles produced by SDS-PAGE technique at the discrimination of isolated *E. coli* strains was enough at the species level, RAPD-PCR technique can be provide fast and more useful differentiation at the strain level.

Key Words: Fecal coliform, *E. coli*, Antibigram, SDS-PAGE, Protein Profiles, Plasmid, RAPD-PCR

TEŞEKKÜR

Bilimsel titizliği ve çalışma disiplinini örnek aldığım, dostluk ve desteğiyle yanımda olan, eğitimim ve tezimin gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. İsmet BERBER'e, eğitimimde değerli katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN ve Yrd. Doç. Dr. Hülya SİPAHİ'ye,

Arazi-laboratuar ve tez yazım çalışmalarım sırasındaki dostluk ve yardımlarına minnettar olduğum Yusuf BAYRAKCI, Ayşenur UÇAR, Emire ELMAS ve diğer asistan arkadaşlarıma,

Bugüne kadar her zaman aldığım kararların arkasında duran ve hangi konuda olursa olsun destekleyen, tüm sıkıntılarımda yanımda olacaklarını bilmenin güvenini her an hissettiren, bana her zaman mutluluk ve her konuda cesaret veren aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Denizel Ortam ve Kirlilik	4
2.2. <i>Mytilus galloprovincialis</i> (LAMARCK, 1819)'de Kirlilik	14
2.3. Patojen ve İndikatör Organizmalar Arasındaki İlişkiler	17
2.4. Koliform Bakteri ve İndikatör Organizmalar	20
2.4.1. Fekal Koliformlar	21
2.4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	21
2.5. Fekal <i>Streptococcus/Enterococcus</i>	24
2.6. Fekal koliformun Fekal <i>Streptococcus</i> 'a Oranı (FC/FS Oranı)	26
2.7. <i>Escherichia coli</i> Tanımlamasında Kullanılan Metotlar	26
2.7.1. Fenotipik Metotlar	26
2.7.2. Genotipik Metotlar	30
2.7.2.1. Hücresel Protein Profillerine Dayalı Metodlar	31
2.7.2.2. Plazmid Profillerine Dayalı Metodlar	32
2.7.2.3. DNA ve RNA Profillerine Dayalı Metodlar	34
3. MATERYAL ve METOD	41
3.1. Materyal	41
3.1.1. Örneklerin Toplanması	42
3.2. Metod	43
3.2.1. Midye Örneklerinin Analizi İçin Ön Hazırlık	43
3.2.2. Deniz Suyu ve Midye Örneklerinde Toplam ve Fekal Koliform Tespiti	43

3.2.3. Toplam Bakteri Sayısının Belirlenmesi	45
3.2.4. Deniz Suyu ve Midyelerde Fekal Streptokok Sayısının Belirlenmesi	45
3.2.5. Deniz Suyu ve Midyelerde Muhtemel <i>E. coli</i> Analizi	46
3.2.6. İzolatların Teşhisi	46
3.2.6.1. Laktozdan Gaz Oluşturma Testi	46
3.2.6.2. Gram Boyama	47
3.2.6.3. Hareket Testi	47
3.2.6.4. Katalaz Testi	48
3.2.6.5. Oksidaz Testi	48
3.2.6.6. H ₂ S Testi	48
3.2.6.7. Üreaz Testi	49
3.2.6.8. DNaz Testi	49
3.2.6.9. Nitratin İndirgenmesi	49
3.2.6.10. Karbonhidrat Fermantasyon Testi	50
3.2.6.11. İndol Testi	50
3.2.6.12. Metil Red Testi	50
3.2.6.13. Voges-Proskauer Testi	51
3.2.6.14. Eijkman Testi	51
3.2.6.15. Sitrat Testi	51
3.2.6.16. Fluorocult® <i>E. coli</i> O157:H7 Agar Testi	52
3.2.6.17. Floresans Testi	53
3.2.6.18. Antibiyogram	54
3.2.6.19. Elektrophorez için Protein Örneklerinin Hazırlanışı	55
3.2.6.20. SDS-PAGE'in Yapılışı	56
3.2.6.21. Plazmid Analizi	56
3.2.6.22. Genomik DNA Analizi	57
3.2.6.23. Agaroze Jel Elektrophorez	57
3.2.6.24. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	58
3.2.6.25. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	62
4.1. Deniz Suyunun Fiziko-kimyasal Analizine Ait Bulgular	62
4.1.1. Deniz Suyu Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Bulguları	63
4.2. Midye Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Bulguları	66

4.3. <i>Escherichia coli</i> İzolasyonu ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	69
4.3.1. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçlarına İlişkin Bulgular	69
4.3.2. Antibiyogram Sonuçlarına İlişkin Bulgular	73
4.3.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) Bulguları	75
4.3.4. <i>Escherichia coli</i> Suşları Arasındaki Kümeleme Analiz Bulguları	80
4.3.5. Plazmid DNA Analiz Sonuçlarına İlişkin Bulgular	83
4.3.6. RAPD-PCR Analizine İlişkin Bulgular	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	89
6. KAYNAKÇA	107
7. EKLER	130
EK-1. Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri	130
EK-2. Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler	136
EK-3. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	138
EK-4. Plazmid Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	142
EK-5. Genomik DNA Analizinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	144
8. ÖZGEÇMİŞ	146

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

APS	Amonium Per Sulfate
APHA	American Public Health Association
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisim
ATCC	American Types Cultures Collection
BGLBB	Brilliant Green Lactose Bile Broth
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
CPRG	Klorofenol red- β -D-galaktopiranozid
DAEC	Difüz-Adherin <i>E. coli</i>
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Deoksiribo Nucleic Acid
EAggEC	Entero-agregativ <i>E. coli</i>
EC	Confirmed Medium
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetic acid
EHEC	Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazif <i>E. coli</i>
EMB	Levis's Eozin Metilen Blue
EMS	En Muhtemel Sayı
EPEC	Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
FDG	Fluoresein-di- β -galaktopiranozid
İMVEC	Indole, Metyl Red, Voges-Proskauer, Eijkman and Citrate
LB	Laktoz Broth
MPN	Most Probable Number
MUG	Metilumbelliferil- β -D-glukronit
Native-PAGE	Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standarts
ONPG	O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction

PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Real Time - Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
UPGMA	Unweight Pair Group Method Algorithm
USEPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
X-GAL	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
bp	Baz çifti
l	Litre
ml	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
sn	Saniye
dk	Dakika
β	Beta
kDa	Kilodalton

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER

		Sayfa no
Şekil 2.1	Floresan pozitif <i>E. coli</i> 'de enzim-substrat ilişkisi	27
Şekil 2.2	Bir rRNA'da operon organizasyonu	35
Şekil 3.1	Sinop ili uydu görüntüsü	41
Şekil 3.2	Örnekleme yapıldığı istasyonları gösteren harita	43
Şekil 3.3	En Muhtemel Sayı (EMS) dilüsyon serilerinin hazırlanışı	44
Şekil 3.4	Fekal streptokok mikroskop (100X) görüntüsü	45
Şekil 3.5	EMB Agar'da gelişen <i>E. coli</i> bakterisi	46
Şekil 3.6	<i>Escherichia coli</i> bakterisinin mikroskop görüntüsü (100X)	47
Şekil 3.7	<i>Escherichia coli</i> için İMVEC test sonuçları görüntüsü	52
Şekil 3.8	Fluorocult® <i>E. coli</i> O157:H7 Agar'da <i>E. coli</i> bakterisi	53
Şekil 3.9	a) Floresans olumlu koliform, b) Floresans olumlu <i>E. coli</i>	54
Şekil 3.10	<i>Escherichia coli</i> antibiyotik duyarlılık testine ait görüntü	55
Şekil 3.11	Yatay elektroforez ünitesi ve güç kaynağı	58
Şekil 3.12	Phoretix 1D programında, piksel pozisyonuna göre band belirleme profilleri	61
Şekil 3.13	Phoretix 1D programında, manuel bant ve moleküler ağırlık belirleme profilleri	61
Şekil 4.1	Deniz suyu örneklerinin içerdiği toplam aerob bakteri sayıları	64
Şekil 4.2	Deniz suyu örneklerinin içerdiği toplam koliform sayılarının aylara göre değişimi	65
Şekil 4.3	Deniz suyu örneklerinin içerdiği fekal koliform sayılarının aylara göre değişimi	65
Şekil 4.4	Deniz suyu örneklerinin içerdiği fekal streptokok sayılarının aylara göre değişimi	66
Şekil 4.5	Midye örneklerinin toplam aerob bakteri sayılarının	

	aylara göre değişimi	67
şekil 4.6	Midye örneklerinin toplam koliform bakteri sayılarının aylara göre değişimi	67
şekil 4.7	Midye örneklerinin fekal koliform bakteri sayılarının aylara göre değişimi	68
şekil 4.8	Midye örneklerinin fekal streptokok bakteri sayılarının aylara göre değişimi	69
şekil 4.9	İzole edilen bakterilerin yüzde antibiyotik dirençlilik oranları	74
şekil 4.10	İlk gruptaki 16 adet <i>E. coli</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri	75
şekil 4.11	İkinci gruptaki 16 adet <i>E. coli</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri	76
şekil 4.12	Son gruptaki 11 adet <i>E. coli</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri	77
şekil 4.13	İlk gruptaki 23 adet <i>E. coli</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri	78
şekil 4.14	İkinci gruptaki 10 adet <i>E. coli</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri	79
şekil 4.15	İlk grup 16 Adet <i>E. coli</i> suşunun toplam hücre protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	80
şekil 4.16	İkinci grup 16 adet <i>E. coli</i> suşuna ait toplam hücre protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	81
şekil 4.17	Üçüncü grup 10 adet <i>E. coli</i> suşuna ait toplam hücre protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	81
şekil 4.18	Birinci jelde yürütölen <i>E. coli</i> suşlarına ait toplam hücre dışı protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	82
şekil 4.19	Son jelde yürütölen <i>E. coli</i> suşlarına ait toplam hücre dışı protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA	

	metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	83
Şekil 4.20	İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarının plazmid profilleri	83
Şekil 4.21	İzole edilen <i>E. coli</i> suşunun plazmid profilleri	84
Şekil 4.22	İzole edilen <i>E. coli</i> suşunun plazmid profilleri	85
Şekil 4.23	RBM-6 primeri ile elde edilen RAPD-PCR band profilleri	86
Şekil 4.24	Col-I primeri ile elde edilen RAPD-PCR band profilleri	86
Şekil 4.25	<i>Escherichia coli</i> suşlarının RBM-6 primeri ile elde edilen DNA profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	87
Şekil 4.26	<i>Escherichia coli</i> suşlarının Col-I primeri ile elde edilen DNA profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	88

ÇİZELGELER

		Sayfa no
Çizelge 2.1	Suyun küresel dağılımı	4
Çizelge 2.2	İşlenmemiş evsel atık sularda bulunan enfeksiyon ajanları	7
Çizelge 3.1	Deniz suyu örneklerinin alındığı istasyonlar	42
Çizelge 3.2	Midye örneklerinin alındığı istasyonlar	42
Çizelge 3.3	RAPD-PCR analizinde kullanılan primerlere ait bilgiler	58
Çizelge 3.4	<i>Escherichia coli</i> PCR Reaksiyon Karışımı	59
Çizelge 3.5	<i>Escherichia coli</i> genomik DNA çoğaltımında kullanılan PCR koşulları	60
Çizelge 4.1	Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre pH değerleri	62
Çizelge 4.2	Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre sıcaklık değerleri	62
Çizelge 4.3	Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre iletkenlik değerleri	63
Çizelge 4.4	Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre çözünmüş oksijen değerleri	63
Çizelge 4.5	İncelenen deniz suyu örneklerindeki toplam aerob bakteri sayıları (kob/100 ml)	64
Çizelge 4.6	İzolasyonu gerçekleştirilen <i>E. coli</i> ırklarının sembolik gösterimi	70
Çizelge 4.7	<i>Escherichia coli</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçları	71
Çizelge 4.8	<i>Escherichia coli</i> izolatlarının karbonhidrat fermentasyon sonuçları	72
Çizelge 4.9	<i>Escherichia coli</i> suşlarının antibiyotik dirençlilikleri (%)	73
Çizelge 4.10	<i>Escherichia coli</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	74

1. GİRİŞ

Dünya yüzeyinin üçte ikisinin sularla kaplı olması, onun su gezegeni olarak adlandırılmasının temel sebebi olarak kabul edilmektedir. Su, yerküredeki ekosistemlerin devamlılığı açısından çok önemli bir role sahip olmasının yanında canlılar için de vazgeçilmez bir gereksinimdir (Anonim, 2003).

Su kalitesi bütün dünya ülkelerini çok yakından ilgilendirmektedir. WHO (World Healty Organization: Dünya Sağlık Örgütü) 29. Sezon (Mayıs, 1926) kararında, suyun en azından toksik maddelerden ve patojenik organizmalardan arındırılmasının ve en üst düzey modern hijyenik yöntemlerle işlendikten sonra tüketiciye sunulmasının gerektiğini vurgulamaktadır (Abdo ve ark., 2010). Bu bağlamda şüphesiz ki, gelecek 20-50 yıl boyunca dünyanın en temel sorunlarından birisinin mevcut su kaynaklarının kirlenmesinin önlenmesi olacağı kaçınılmazdır.

Yeryüzündeki sular güneşin sağladığı enerji ile “Hidrolik çevrim” adı verilen sürekli bir döngü içerisinde. İnsanlar yaşamsal faaliyetleri ve ekonomik ihtiyaçları için suyu bu döngüden almakta ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye geri bırakmaktadırlar. Bütün bu süreçler cereyan ederken suya karışan maddeler, suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirmekte ve beraberinde su kirliliği adı verilen olguyu meydana getirmektedirler. Su kirliliği terimi, su kaynaklarının kalitesini düşürerek, kullanımını bozacak düzeyde organik, inorganik, biyolojik ve radyoaktif kirleticiler içermesi olarak tanımlanmaktadır (Uslu, 2001).

Su doğal kaynaklarımız içerisinde canlı hayatını doğrudan etkileyen etmenlerden birisidir. Su kirliliği, canlıların sağlığını etkileyeceği gibi ekolojik dengenin bozulmasına da neden olan önemli bir faktördür. Ülkemizde ve dünyada su ve suda yaşayan canlıların fiziksel, kimyasal ve biyolojik kirliliklerinin belirlenmesi son derece önem arz etmektedir. Suların ve sularda yetişen su ürünlerinin kimyasal ve bakteriyolojik açıdan mevcut durumlarının belirlenmesi, tehlike oluşturacak hallerde gerekli önlemlerin alınması ve kirliliğe neden olan ajanların suya karışmasının engellenmesi son derece önem arz etmektedir. Ne yazık ki kirletici ajanları engelleme amaçlı uygulamaların yetersizliği veya hiç yapılamıyor olması, bu ajanlarla karşı karşıya gelme olasılığını arttırmaktadır. Bütün bu gerçeklerle beraber, özellikle sulardaki bakteriyolojik kirleticilerin her zaman bir risk faktörü olarak zirvedeki yerini

koruması, bu ajanlara karşı yapılan savaşta daima yeni ve bir öncesinden daha etkin yöntemlerin keşfini gerekli kılmaktadır.

Günümüzde bakteriyel hastalıkların moleküler mekanizmaları ve mikrobiyal patojenlerle ilgili daha detaylı bilgiler elde edilmektedir. Birçok patojen konakçısı ile yakın bir etkileşim içerisinde ve bu patojenler farklı tipte ökaryotik hücrelerin savunma sistemlerinden kendini korumak için bireysel stratejiler geliştirmişlerdir (De Sousa, 2003). Aynı zamanda bu bakteriyel patojenlerin hastalıklara neden olmak ve hayatta kalmak için değişen çevre koşullarına karşı adapte olabildikleri de bildirilmektedir (Henard ve Torres, 2011).

Gerekli standartların ve düşük maliyetli metodların olmamasından dolayı sucul ortamlarda olası patojenik mikroorganizma varlığının belirlenmesi ve sayılması oldukça zahmetlidir. Bu yüzden, sulardaki mikrobik kontaminasyon düzeyinin belirlenmesinde fekal indikatörler kullanılmaktadır. Kontamine olmuş sularda, bu indikatörlerin bolluğuna bakılarak diğer patojenik mikroorganizmaların varlığı ve yoğunluğu hakkında bilgi edinilmesi beklenir (Ouattara ve ark., 2011). Bugün, *Escherichia coli* ve intestinal enterokoklar fekal kirliliğin belirlenmesinde en sık kullanılan indikatörlerdir (Edberg ve ark., 2000; Ouattara ve ark., 2011).

Bakteriler arasında genetik akrabalığın daha iyi anlaşılması için genelde geleneksel mikrobiyoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez temel metodları olan; morfolojik, biyokimyasal ve serolojik testler kullanılmakla birlikte kesin tanı için moleküler tekniklere her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, *E. coli* türünde sürekli tehlike oluşturabilecek suşlar ortaya çıkabileceğinden kapsamlı taksonomik çalışmalar devam etmektedir. Bu yüzden, her geçen gün bu türe ait izolatlar arasındaki taksonomik ilişkilerin belirlenebilmesi için daha güvenilir fenotipik ve filogenetik tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır.

Mikrobiyal su kalitesinin değerlendirilmesi ve patojenik mikroorganizmaların hızlı bir şekilde belirlenmesi; biyoterörizmin önlenmesi, halk sağlığının korunması ve ekotoksikolojide önemli sorunları geride bırakmıştır (Maynard ve ark., 2005).

Sinop ili kıyı sularındaki mikrobiyolojik kirliliğin, gelecekte muhtemel salgınlara yol açabileceği, yaşam kalitesini etkileyebileceği ve bu bölgede yaşayan insanlara maddi-manevi zararlar verebileceği olasıdır.

Bu çalışmada, Sinop ili kıyı suları ve bu sularda yetişen midyelerin mikrobiyolojik kirliliği ve toplanan örneklerden *E. coli* izolasyonu, fenotipik

karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri, plazmid ve RAPD-PCR yöntemlerine göre ayrımı amaçlanmıştır.

Araştırmada elde edilecek veriler Sinop ili deniz suyunun kirlilik seviyesinin belirlenmesi ve kirlilik etkenlerinin tespitinin yanı sıra bölgede bulunan ve yöre halkı tarafından besin kaynağı olarak kullanılan kara midyesinin bakteriyolojik açıdan incelenmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Denizel Ortam ve Kirlilik

Canlıların yaşamı açısından hayati önem taşıyan su, doğal kaynak olarak dünya üzerindeki en yaygın rezervuardır. Yeryüzünün %75'i, insan vücudunun %70'i, kanın %78'i sudur (Aktürk, 2009). Su yeryüzünün on'da yedi (7/10)'sini kaplar ve toplamda $1,38 \times 10^9 \text{ km}^3$ alanı işgal ettiği tahmin edilmektedir. Bu suyun büyük çoğunluğu, atmosferik suyun büyük bir kısmını (küresel suyun %96,1'i) kapsayan okyanusların bulunduğu kıtalar arasındadır. Suyun geriye kalan %3,9'u ise (kutup buzul tabaka dâhil) kıta sınırları içerisinde (Çizelge 2.1) (Sige, 2005).

Çizelge 2.1. Suyun küresel dağılımı (Sige, 2005)

Yer	Hacim (km^3)	Kıta içerisindeki suyun %’si
Okyanuslar	1.322.000.000	-
Kutup buz katmanları ve dağları	29.200.000	55.570
Değişebilir yer altı suyu	24.000.000	44.850
Tatlı su gölleri	125.000	0.230
Tuzlu göller ve iç denizler	104.000	0.190
Toprak ve toprak üstü sular	65.000	0.120
Atmosferik buhar	14.000	0.026
Nehirler ve akarsular	1.200	0.022
Yıllık girişler		
Okyanus yüzeyine akış	37.000	-
Denize akan toprak suları	1.600	-
Yağış		
Okyanusa düşen yağmur	412.000.000	-
Kara ve göllere düşen yağmur	108.000.000	-

Yeryüzündeki su kütlesinin %97'sini okyanuslar ve denizler, %2'sini göller, akarsular ve yer altı suları, %1'ini ise buzullar ve karalar oluşturmaktadır. Su uygarlığın gelişimi süresince; kişisel hijyen, tarımsal sulama, endüstriyel üretim ve elektrik enerjisi üretimi gibi pek çok farklı amaçla kullanılmıştır. Ancak, yirminci yüzyılda başlayan hızlı sanayileşme, kentleşme ve nüfus artışını takiben doğal kaynaklar üzerindeki kullanım baskısının artması, beraberinde çevre kirliliği olarak tanımlanan insan yaşamını ve çevresini tehdit eden büyük bir tehlikenin ortaya çıkmasına neden

olmuştur. Çevreye verilen katı ve sıvı atıkların çeşidinin ve miktarının günden güne artması; toprak, hava ve su kirliliğine neden olmaktadır (Aktürk, 2009).

Su; insanlar tarafından devamlı kullanıldığı için kimyasal ya da mikrobiyolojik kalitesi düşmekte ve bu nedenle sağlık açısından olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (WHO, 2003). Bütün yüzey sularında mikrobiyolojik kontaminasyon sürekli olur. Kontaminasyonun boyutu ve etkisi farklı olabileceği gibi kaynağı da farklı olabilmektedir. İnsan aktiviteleri sonucunda oluşan kirlilik, örneğin yüzme aktivitesi süresince fekal atıklar aracılığıyla direkt olabileceği gibi (Schets, 2011) gemilerden (eğlence amaçlı veya profesyonel gemicilik) gelen atık sularda yüzey sularına bırakılır ve bu aynı zamanda arıtılmış pis su olduğundan indirekt olarak da kendini gösterir (WHO, 2003).

Deniz kirliliğinin %75-%80'i tarımsal kaynaklar başta olmak üzere karasal kökenlidir. Bunun %30'u atmosferden gelmektedir. Kirliliğin yaklaşık %12'si deniz seferleri taşımacılığından kaynaklanmaktadır. Deniz kirliliği, çoğunluğu insanoğlu tarafından okyanuslara ve denizlere atılan başta evsel atıklar (lağım pisliği, çöp ve akıntı sularından gelen kirlilik vb.), endüstriyel atıklar (hidrokarbonlar, metaller, sentetik kimyasallar, organik maddeler, radyonükleikler vb.) ve tarımsal atıklar (gübreler ve pestisitler) gibi ürünlerin sonucudur. Fransa deniz araştırmaları enstitüsü (The French Institute for Exploitation of the Sea: Ifremer)'ne göre kıyı suları kirliliğinin dünya ekonomisine yaklaşık maliyeti 2006'da 12,8 milyar dolar olarak rapor edilmiştir (Anonim, 2009a).

Mikrobiyolojik deniz kirliliğinin nedenleri; muhtemel patojenler, patojen mikroorganizmalar ve normal habitatları deniz olmayan mikroorganizmalardan meydana gelmektedir. Bu mikroorganizmalardan potansiyel patojenler ve habitatları deniz olmayan diğer karasal organizmalar denizde yoktur. Bu tip mikroorganizmalar, arıtımı yapılmamış atık suların doğrudan kıyı sularına deşarjıyla denize ulaşırlar (Efstratiou, 2001).

İyi kalitede su; kokusuz, renksiz, tatsız ve fekal kirlilikten arınmış olmalıdır (Ezeugwunne ve ark., 2009). Kirlenmiş yüzey suları, bakteri, virüs, protozoonların da içerisinde bulunduğu patojenik organizmaların büyük çeşitliliğini içerebilir. Bu patojenik mikroorganizmaların ana kaynağı insan ve diğer sıcakkanlı hayvanların dışkılarıdır; onlar yüzey su akıntısı, toprak kayması ve atık su akıntısının serbest bırakılması aracılığıyla akuatik çevreye getirilir. İnsanlar için sağlık riski, sudaki patojen yoğunluğuna ve suyun (içme suyu, rekreasyonel aktiviteler, banyo suyu,

sulama, kabuklu deniz ürünü hasatı) kullanımına bağılı olarak bu patojenleri bulundurma düzeyine bağılıdır. 19. yüzyıl süresince, su kaynaklı patojenler Batı Avrupa ülkelerinde, binlerce ölüme neden olan kolera, tifo ateşı ve dizanterinin şiddetli salgınlarının sorumlusuydu. Gelişmekte olan çoğı ülkede, patojenik bakteriler bugün halen hastalık halinin ilk nedenidir (Ouattara ve ark, 2011). Tahminlere göre, dünya genelinde yıllık su kaynaklı enfeksiyonlarda 15 milyondan daha fazla ölüm gerçekleşmektedir (Chatterjee ve ark., 2007).

Her yıl tahminen 120 milyon gastrointestinal, 50 milyon akut solunum yolu ve sayısız deri enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmalarla kontamine olmuş su denize bırakılmaktadır (Viau ve ark., 2011). Kıyı sularında görülen mikrobiyal kirliliğın bir kaynağı da akarsular ve nehirlerden boşalan karasal kökenli akıntılardır. Bu akıntılar, kanalizasyon altyapısından sızan, evcil ya da vahşı hayvanların dışkılarından ve kirlilik kaynağı belirsiz olan toprak, kum gibi içeriğı tam olarak bilinmeyen çevresel rezerviorlardan gelen patojenleri içerebilir (Viau ve ark., 2011). İşlenmemiş evsel atık sularda bulunan ve suya karışan bazı enfeksiyon ajanları Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. İşlenmemiş evsel atık sularda bulunan enfeksiyon ajanları (U.S. EPA, 1992)

Patojen	Hastalık
Protozoa	
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amobiazis (Amobik dizanteri)
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiazis
<i>Balantidium coli</i>	Balantiziazis (Dizanteri)
<i>Cryptosporidium</i>	Kriptosporadiazis, ishal, ateş
Bağırsak solucanı (Helmit)	
<i>Ascaris lumbricoides</i> (yuvarlak kurt)	Askariyazis
<i>Ancylostoma duodenale</i> (kancalı kurt)	Kancalı kurt hastalığı
<i>Necator americanus</i> (yuvarlak kurt)	Nekatoryazis
<i>Ancylostoma</i> (spp.) (kancalı kurt)	Cutaneous larva migrans
<i>Strongyloides stercoralis</i> (bağırsak solucanı)	Strongiloidozis
<i>Trichiuris trichiura</i> (kırbac kurdu)	Trichuriasis
<i>Taenia</i> (spp.) (tenya)	Tenyaazis
<i>Enterobius vermicularis</i> (sivrikuyruk)	Enterobiyazis
<i>Echinococcus granulosus</i> (spp.) (bağırsak kurdu)	Hidatiyozis
Bakteri	
<i>Shigella</i> (4 spp.)	Sigellozis (Dizanteri)
<i>Salmonella typhi</i>	Tifo ateşi
<i>Salmonella</i> (1700 serotip)	Salmonellozis
<i>Vibrio cholerae</i>	Kolera
<i>Escherichia coli</i> (Enteropatojenik)	Gastroenterit
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniyozis
<i>Leptospira</i> (spp.)	Leptosporoziyozis
<i>Legionella</i>	Lejyoner hastalığı
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterit
Virüs	
<i>Enterovirüsler</i> (72 tip)	Gastroenterit, kalp bozukluğu
<i>Polio, Echo, Coxsackie, New Enterovirüs</i>	Menenjit ve diğerleri
<i>Hepatitis A virüsü</i>	Hepatitis
<i>Adenovirüs</i> (47 tip)	Solunum hastalıkları, göz enf.
<i>Rotavirüs</i> (4 tip)	Gastroenterit
<i>Parvovirüs</i> (3 tip)	Gastroenterit
<i>Norwalk Ajanı</i>	İshal, kusma, ateş
<i>Reovirüs</i> (3 tip)	Tamamen belirli değil
<i>Astrovirüs</i> (5 tip)	Gastroenterit
<i>Calicivirüs</i> (2 tip)	Gastroenterit
<i>Coronavirüs</i>	Gastroenterit

Fekal kirlilik öncelikli olarak; besin üretimi, rekreasyonel aktiviteler ve içme suyu sağlamak için kullanılan çevresel sularla ilişkili hastalıklarla alakalıdır. Küresel tahminler, fekal kontaminasyona uğramış sularda yüzmek, banyo yapmak ve kirlenmiş sulardan hasat edilen deniz ürünlerinin tüketilmesiyle her yıl 175 milyonu aşan enfeksiyon vakasını bildirmektedir (Roslev ve Bukh, 2011).

Su kaynağındaki fekal kontaminasyon seviyesini değerlendirme amaçlı su kalite çalışmalarında total koliform (TC), fekal koliform (FC) ve fekal *Streptococcus* (FS)'u içerisinde bulunduran bakteriler indikatör olarak kabul edilir ve kullanılırlar (Hamzah ve ark., 2011). Bu organizmaların varlığı, fekal kökenli muhtemel insan patojeni diğer

organizmaları tahmin etmek için tercih edilmiştir. FC ve TC'ye ek olarak, fecal streptokoklarda özellikle deniz suyunda Birleşmiş Milletler ve Avrupa Birliği yasa tasarısı tarafından düzenlenen yüzme suyu kalitesi için indikatör organizmalar olarak kullanılırlar (Hamzah ve ark., 2011).

Araştırmacıların *E. coli*'yi bir indikatör olarak seçme nedenleri arasında bu bakterinin; i) gerçek fekal orijinli olduğu için sadece “fekal koliform” olması; ii) çok sayıda bulunması (hayvan kaynağına bağlı olarak, yaklaşık 10^9 CFU/g); iii) bazı bakteriyel patojenlerden daha fazla canlı kalabilmesinin yanında tipik çevre koşulları altında konakçının dışında yeniden üremeye dirençsiz olması ve iiiii) miktarının basitçe belirlenmesi, bunun dışında maddi olanaklar açısından tespiti ve tanımlanmasının kolayca yapılabilir olmasıdır (Hamilton ve ark., 2005).

Dinlenme amaçlı yüzme suları için deniz suyu mevcut standartları, US Environmental Protection Agency (U.S. EPA 1986; Hamzah ve ark., 2011) tarafından ayarlanan standartlarda *Enterococcus*/100 ml için 35 CFU/ml'dir. Halbuki WHO standartlarına göre (2003) kategori B suları için intestinal *Enterococcus* 100 ml su başına ≤ 40 CFU/ml'dir (Hamzah ve ark., 2011). Fecal streptokok'un yüksek sayısı toprak erozyonuyla ilgilidir, bu durum suyun türbiditesinin yükselmesine neden olabilir. Güneş ışığı fecal streptokok canlılık aktivitesini düşürür. Fecal streptokok sayısı türbiditeyle orantılı olarak artar. Güneş ışığının varlığı, deniz suyunda fecal koliform ve fecal streptokok canlılığını kontrol altına alan temel bir faktördür. Fekal streptokok aynı zamanda deniz suyunun yüksek tuzluluğuna karşı yüksek toleransa sahiptir. Bu durumda fekal kirlilik için deniz suyu indikatörü olarak fecal streptokok'un kullanılmasının iyi bir sonuç verdiği bildirilmektedir. *E. coli* ve fecal streptokok için öldürücü faktör olarak güneş ışığının etkisi daha önemlidir. Yüksek toplam koliform sayısı aynı zamanda sıcaklıktan etkilenir çünkü koliform bakteriler için en iyi gelişme sıcaklığı 30°C civarındır. Diğer taraftan, koliformlar güneş ışığında karanlıkta olduğundan daha hızlı inaktive olurlar (Hamzah ve ark., 2011).

Kaynağı belirsiz fekal indikatör bakterilerin, plaj kumu, su kenarında bulunan sedimentler, toprak ve su gibi habitatın çeşitlerinden türediği rapor edilmiştir (Byappanahalli ve ark., 2006). Fekal indikatör bakterilerin suda seviyelerinin artma sebebi iyi anlaşılmamasına rağmen, kısmen sularda indikatör bakterilerin seviyesindeki artışı açıklayabilen en azından üç doğal mekanizma vardır; (i) yüzeydeki toprağın aşınması; (ii) kıyı boyunca med cezir ve dalga hareketleri ile toprak ya da sedimentteki bakterilerin taşınımı ve serbest kalması; (iii) üst kısmı örten suyun içerisine sediment

kökenli bakterilerin yeniden karışması (Byappanahalli ve ark., 2006). *E. coli*'nin çevrede yaygın bir şekilde varoluşu sıcak iklimlerle sınırlı değildir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu indikatör organizmanın, kaynağı belirli kontaminasyon (kanalizasyon) olmaksızın; dere, nehirler boyunca batırılmış ve ıslatılmış sedimentler, sucul makrofitler (*Cladophora* ve deniz yosunu), kıyıya yakın plaj kumu ve kıydan uzakta yüzeyin altındaki kum derinlikleri gibi ılımlı habitatlarda da bulunduğunu gösteriyor (Byappanahalli ve ark., 2006).

Fekal indikatör bakteri yoğunluğu tipik olarak, bozulmuş su sistemlerinde 100 ml suda 1.000 CFU'dan daha fazla, bozulmamış sularda ise 100 ml suda 100 CFU'dan daha az orandadır (David ve Haggard, 2011). Bu mikroorganizmalar hayvan bağırsaklarından köken alır ve fekal dışkılar aracılığıyla çevrede birikirler. Su sınırı derecelerinde, fekal bakterilerin yoğunluğu ve kökeni geniş bir çeşitlilik gösterir ve su kanalına, akıntıların deşarjı, kirliliğin dökülmesi ve direkt olarak birikintiler aracılığıyla katılır (David ve Haggard, 2011). Tarımsal endüstride kullanılan geniş çeşitlilikte uygulamalar, su kanallarına fekal bakterilerin göçü için potansiyel yollardır. Büyük kentleşmelerin görüldüğü su sınırlarında, akıntıların deşarjı gibi belirsiz kaynaklardan ziyade, belirli kaynaklardan gelen fekal bakteri oranı daha fazla görülebilir (David ve Haggard, 2011). Tipik olarak su arıtma sistemine gelen akıntıların 100 ml'si yaklaşık olarak 10^7 CFU/ml fekal koliform bakteriye sahiptir, hâlbuki gelişmiş ikincil arıtma sistemlerinden dışarı bırakılan akıntılardan alıcı su kanalına bırakılan işlenmiş akıntıların 100 ml'sinde $<1-240$ CFU/ml'ye sahiptir (David ve Haggard, 2011). Son zamanlarda bakteriyel kaynakları izleme amaçlı çalışmalarda, bir fekal bakteri kaynağı olarak evcil hayvanların da önerilmesiyle, atıkların suya sadece kentsel yerleşimden gelmediği görülmüştür (Ashbolt ve ark., 2001; David ve Haggard, 2011). Su kanalında fekal kontaminasyonun kaynağı, köken, yoğunluk ve şiddette değişir ama fekal bakterilerin kontaminasyonu direkt olarak tahliye edilen atıklarla bağlantılı olabilir (David ve Haggard, 2011).

Fekal mikroorganizmalar serbest veya bağlı olarak sahil bölgesine giriş yaptığında farklı süreçlere maruz kalır bunlardan bazıları; karışım ve akıntılar tarafından fiziksel dilüsyona uğramaları, viral bozunma, bakteriyel stresle sonuçlanabilen güneş ışığı, tuzluluk, sıcaklık, pH ve besin mevcudiyeti gibi fiziko-kimyasal etkenler ve diğer mikroorganizmalarla rekabeti içine alan, biyotik etkiler şeklinde açıklanabilir (Gourmelon ve ark., 2010).

Mikrobiyal kirliliğin dışında ayrıca fiziko-kimyasal parametrelerde, deniz suyundaki mikrobiyal gelişmeye etkisi olan kıyı sularının su kalitesini belirlemek için ölçülür. Bunlardan bazıları şöyle özetlenebilir,

Deniz suyu için normal pH değeri 7,5-8,5 aralığında değişir. Bu oran; mikroorganizmaların fotosentez ve solunum aktiviteleri, basınç ve sıcaklığın etkisi altındadır. Araştırmacıların, deniz suyu pH'ı ile ilgili yürüttükleri çalışmalarda, normal pH değerlerinin 8 civarlarında olduğunu ve bu değerinde *E. coli*'nin canlılığına olası zararlı etkilere katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir (Rozen ve Belkin, 2001). Ayrıca, optimum pH oranındaki ani artış ve düşüşlerin, su kanalındaki toksik maddelerin etkisinde artış veya azalışa yol açabileceği yapılan bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Omezuruike ve ark., 2009). Bu çok düşük ve yüksek pH değerleri suda eğlenen kullanıcılar üzerine direkt bir etkiye sahiptir. Bu koşullar altında, pH deri ve gözler üzerine etkili olabilir (WHO, 2003; Hamzah ve ark., 2011).

Elektriksel iletkenliğin saptanması, suda çözünmüş iyonik maddenin direkt ölçülmesini sağladığı için su ile ilgili çalışmalarda faydalıdır. Besin içeriği düşük sularda, elektriksel iletkenliğin düşük değeri yüksek kalitenin belirtecidir. İletkenliğin yüksek değeri, tuzluluk problemini işaret edebilir aynı zamanda bitkisel besinlerin çok bol bulunduğu ötrofik su kanallarında da gözlemlenir. Çok yüksek değerler, muhtemel kirliliğin iyi bir göstergesidir. Elektriksel iletkenlikte görülen ani bir değişim, suyun içerisine direkt tahliye veya diğer kaynaklardan gelen kirliliği işaret eder ancak elektriksel iletkenlik ölçümleri, sudaki spesifik iyon konsantrasyonu ve bileşimi hakkında bilgi sağlamaz (Government of Western Australia: GWA, 2009).

Suda çözünmüş oksijen miktarı çoğunlukla su sıcaklığına bağlıdır; soğuk sular sıcak sulardan daha fazla çözünmüş oksijen taşıyabilir (GWA, 2009). Bu gazın deniz suyundaki miktarı, ortamda gerçekleşen fotosentez, akıntı ve rüzgâr olaylarıyla artarken, bitkisel ve hayvansal organizmaların solunumu ile biyokimyasal oksidasyon olayları sonucu azalır. Genellikle deniz suyundaki çözünmüş oksijen miktarı 0-10 mg/l arasında değişir. Sıfır değeri tamamen kirlenmiş sularda gözlemlenirken, 10 değeri ise yoğun fotosentez aktivitesinin gerçekleştiği aşırı doygun sularda görülmektedir (Sivri, 1993).

Hernandez-Delgado ve Toranzos (1995)'a göre koliform gelişimi için optimum pH 6-7'dir. Çözünmüş oksijen, çeşitli metallerin kimyasal oksidasyon durumunu ve mikrobiyal aktiviteyi etkileyebilir. Deniz alçalması süresince yapılan örneklemeye, çözünmüş oksijen değerinde düşüş görülebileceği bildirilmiştir.

Su sıcaklığının yükselmesi ile çözünmüş oksijenin çözülebilirliği düştüğü için, yüksek su sıcaklığı sucul yaşam için çözünmüş oksijen mevcudiyetini sınırlar. Ayrıca, su sıcaklığı su kalitesini etkileyen çeşitli biyokimyasal reaksiyonları düzenler (GWA, 2009). Su sıcaklığı bakteriyel ölüme ve onun çoğalma oranına neden olabilir (Hamzah ve ark., 2011). Sıcaklık, deniz suyunda ki patojenik mikroorganizmaların hayatta kalma sürelerini kesin olarak kontrol altına alan bir faktördür. Yüksek sıcaklıklarda atık sularda bulunan mikroorganizmaların ölümü hızlı bir şekilde artar. 0-20°C sıcaklıklarda, difüzyon bölmelerinde *E. coli* ve *Streptococcus*'un azalma oranları doğru orantılıdır. Genelde *E. coli*'nin canlı kalma süresi streptokokdan daha düşüktür (Lessard ve Sieburth, 1983). Sıcaklık ve tuzluluk artışı güneş ışığı varlığında fekal koliformların yaşamını sürdürmesinde çok fazla zararlıdır. Ayrıca koliform bakterilerin ölümünü etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesinin güneş radyasyonu olduğu çalışmalarla saptanmıştır (WHO, 2003; Hamzah ve ark., 2011).

Amerika çevre koruma ajansı (United States Environmental Protection Agency 1992), atık ve arıtılmamış sularda tespit edilmiş bakteriler arasında *S. typhi*, *C. jejuni*, *S. dysenterae*, *V. cholerae*, Enteropatojenik *E. coli* ve *Y. enterocolitica*'yı rapor etmiştir (U. S. EPA, 1992).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 1996'daki tahminlerine göre, güvensiz içme suyu ve yetersiz sanitasyonla bağlı olan hastalıklardan her yıl beş milyondan fazla insan ve yine su ile ilişkili hastalıklardan her sekiz dakikada bir çocuk yaşamını yitirmektedir.

Sıcaklık ve diğer değişkenlerin patojen varlığını tahmin etmek için kullanılabileceğini, sıcaklık ve bakteriler arasındaki karşılıklı ilişkinin cinse özgü olmasına rağmen, eğlence amaçlı kullanımın artması gibi patojen yoğunluğunu etkileyen diğer mevsimsel değişimler direkt olarak su sıcaklığının yükselmesiyle ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (David ve Haggard, 2011). Sonbahar mevsiminin sonları ile kış ayları boyunca su içerisindeki koliform bakterilerde azalma görüldüğü çalışmalarla bildirilmiştir (Gibbard ve ark., 1942).

Uçar (1990), Tekirdağ şehir sahilinden farklı zamanlarda alınan 66 su örneğinde koliform grubu bakteri ve toplam bakteri sayımı yapmıştır. Alınan tüm su örneklerinde koliform grubu bakterileri tespit etmiş ayrıca toplam aerobik bakteri bakımından alınan bölgelerin %81 oranında daha kirli olduğunu saptamış ve örnek alınan bölgelerin %64'ünün plaj olarak kullanımının tehlikeli olduğunu belirtmiştir.

Alkan ve ark. (1999), Ulubat Gölü (Bursa)'nın mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesini amaçlayan bir çalışma yapmışlardır. Gölün doğu kısmında

belirlenen noktalardan numuneler almışlar ve bu örnekler üzerinde Dökme plak (Pour-Plate) metodu ile toplam koliform ve *E. coli* sayımları yapmışlardır. Gölün kirlilik seviyesinin tespiti Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği'ndeki Su Ortamlarının Kalite Sınıflandırılması Bölümü'ne göre yapılmıştır. Sonuçlar suyun kalitesinin, gölün bazı noktalarında II. ve III. sınıf olduğu, fekal kirlenmenin yüksek olduğu bazı noktalarda ise IV. sınıf olduğunu göstermişlerdir.

Prieto ve ark. (2001), yüzme amaçlı kullanılan sulardaki hastalık etkenlerinin tespiti için en iyi mikrobiyal indikatörü belirlemek amacıyla, 2774 kişilik insan grubu üzerinde yaptıkları bir çalışmada hastaların 1858'inin solunum, gastrointestinal, göz, kulak ve meydana gelen ateş durumlarına ait belirtileri bir hafta süresince başarılı bir şekilde kayıt altına almışlardır. Toplam katılımcıların 137 (%7,5)'inin belirtileri rapor edilmiş ve yüzenlerde gastrointestinal olgular, cilt sorunları ve solunum sistemi şikâyetleri daha yüksek gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, bu belirtileri sudaki toplam koliform, fekal koliform ve fekal streptokok miktarıyla ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca, belirtilerin en iyi habercisinin toplam koliformlar olduğu sonucuna da varılmıştır.

Wade ve ark. (2003), su kalitesine indikatör bakterilerin etkisini araştırmak için fekal koliform, *E. coli* ve enterokokların gelişimlerini incelemişler. Araştırmacılar, insanlarda gastrointestinal hastalıkların, tatlı sulardaki enterokok, fekal koliform veya diğer bakteriyolojik indikatörlere maruz kalmanın sonucu olarak ortaya çıktığını ve bu indikatörlerin yüzey sularında yaygın olarak bulunmasının ise *E. coli* ile ilişkilendirilebileceğine dikkat çekmektedirler.

1999'da Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (U.S. Environmental Protection Agency: USEPA) hastalık nedeni mikroorganizmalar ile kontamine olmuş yüzey sularında yüzme ile ilişkili hastalık riskiyle karşılaşan Amerikalılar üzerine kumsal alan ve dinlenme suları için bir aksiyon planı ileri sürmüştür. USEPA tarafından gerçekleştirilen önceki epidemiyolojik çalışmalar, yüzücülerde mide ve bağırsak iltihabı ile ilişkili hastalıklarda artma ile yüzey sularındaki *E. coli* ve *Enterococcus*'un yoğunluğu arasında direkt bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Kinzelman ve ark., 2003). Craig ve ark. (2004), kıyı sularında, dinlenme aktiviteleri süresince yüzey sediment tabakasından potansiyel patojenik mikroorganizmaların yeniden askıya alınmasından dolayı insanlarda olası enfeksiyon riskinin arttığını bildirmektedirler.

Dayıoğlu ve ark. (2004), Kütahya şehir içme suyunun 2002 yılına ait fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik analizlerini incelemişler. Çalışmada içme suyu örnekleri 6 ayrı mahalleden 30 gün aralıklarla almışlardır. Aldıkları örneklerin bulanıklık, renk,

koku, tat, tortu, pH, toplam sertlik, sülfat, klorür, nitrit, amonyak, nitrat ve toplam organik madde tayinlerini yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre Kütahya ili içme sularının fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özelliklerinin WHO, EPA ve TSE içme suyu standartlarına uygunluk gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Muirhead ve ark., (2004)'nın yürüttükleri bir çalışmada, bir deredeki *E. coli* yoğunluğunun, sel veya yağmur olaylarından sonra %59 oranında azaldığını belirtmektedirler.

Sullivan ve ark. (2005), su sınırları; insanlar, süt inekleri ve tarımsal alanların bulunduğu bölgelere yakın olan akıntılarda fekal koliform bakterilerin oldukça fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Gartner, yaklaşık 90 yıl öncesinde, *E. coli*'nin belirlendiği yerlerde *V. cholerae*, *S. dysenteriae* ve *Salmonella* sp'inde varlığının yüksek bir olasılığa sahip olduğunu ileri sürmüştür. Bu olasılık, toplam koliform değeri ve özellikle *E. coli*'nin kolayca belirleniyor olmasından dolayı, içme ve yüzey sularının mikrobiyolojik güvenliğini değerlendirmek için su uzmanları tarafından tekrar tekrar çalışılmış ve doğrulanmıştır. Ancak, Toplam koliform miktarı sıcak ve tropikal iklimlerde artacağından fekal kirlilik için kullanımı sınırlıdır (Park ve ark., 2006). Hill ve ark. (2006), yüzey sularında akıntıyla taşınan kaynağı belirsiz kirliliğin, su kaynaklarındaki bakteri seviyesi üzerine önemli etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Erkan ve Vural (2006), Dicle Nehri'nin hijyenik kalitesi üzerine yapmış oldukları çalışmada; su numunelerini toplam mezofilik aerob bakteri, *Enterobacteriaceae*, koliform, *E. coli*, *Staphylococcus-Micrococcus*, *S. aureus*, küf, maya, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Y. enterocolitica* ve anaerob bakteri sayısı yönünden incelemişler. Sonuç olarak, örneklerdeki koliform ve *E. coli* kontaminasyonunu sırasıyla, %100 ve %90 olarak rapor etmişlerdir.

Sulaj ve ark. (2008), Butrinti lagününde 2005 ve 2006 yıllarında *E. coli* tespit etmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, Butrinti lagününe yakın bazı kırsal alanlardan yaz ayları boyunca deniz suyuna akan atık suların, *E. coli* sayısında artışa (2005'de 21 *E. coli*/100 ml ve 2006'da 23 *E. coli*/100 ml) neden olduğunu belirtmişlerdir. Myoda (2008), Oklahoma'da fekal indikatör bakterilerin aşırı derecede yüksek orana sahip olduğu akıntı sularını belirlerken enterokokların etkili olamadığını gözlemlemiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, yüzeyde birikmiş yağmur sularındaki fekal patojenlerin hareket kontrolünün, su ve atık su ayrımını gerçekleştiren süzgeçlerin tahliye kapasitesinin artırılmasıyla sağlanabileceği belirtilmiştir. Bunun dışında,

sürüklenen yağmur ile taşınan fekal patojenlerin makul ölçülerde fiziksel bariyerlere takılmadan geçebileceği ve partiküllere tutunabileceği gibi su sütununda da serbestçe yüzerek yer değiştirebileceği öne sürülmüştür. Öte yandan, partiküllere tutunan patojenlerin hiç kuşkusuz sürüklenen yağmurla beraber yer değiştiren toprak partikülleri ile taşınabileceği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Boyer, 2008).

Auer ve Niehaus (1993) yapmış oldukları bir çalışmada, fekal koliformların %90,5'inin 0.45–10 µm büyüklüğündeki partiküllerle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu partiküllere bağlı mikroorganizmalar dip çamurunda bulunabildiği gibi med cezir olayındaki değişimler, dalgalar, rüzgârlar, şiddetli yağmurlar ya da sedimenti temizleyen taraklı makineler ile tekrardan süspanse edilebildiğini rapor etmişlerdir (Gourmelon ve ark., 2010). Küresel tahminler, her yıl atık sularla kirlenen kıyı sularında yıkanma ve yüzmenin, 50 milyondan fazla şiddetli solunum yolu ve 120 milyondan fazla gastrointestinal hastalığa neden olduğuna dikkat çekmektedir (Abdelzaher ve ark., 2010).

İçme ve kullanma suları ile diğer suların özellikleri uluslar arası (International Organization for Standardization (ISO), American Water Works Association (AWWA), American Public Health Association (APHA), US Public Health Service (USPHS), Water Pollution Control Federation (WPCF), World Health Organisation International (WHO-I), World Health Organisation European (WHO-E), Environmental Protection Agency (EPA)) ve her ülkenin kendi koyduğu kriterler ile belirlenmektedir (Akhan, 2007). Ülkemizde ise bu kriterler, Sağlık Bakanlığı Mavi Bayrak Projesi (1990) dâhilinde yüzme amaçlı deniz suları mikrobiyolojik olarak incelenmekte ve Çevre ve Orman Bakanlığı (ÇOB)'nın 2006'dan beri "Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği" kapsamında yürütülmektedir (Anonim, 2006a).

2.2. *Mytilus galloprovincialis* (LAMARCK, 1819)'de Kirlilik

Mytilus galloprovincialis'ler, kıyı bölgelerinde suyu süzerek yaşayan çift kabuklulardır (Stabili ve ark., 2004). Bu midye, deniz suyu ve acı sularda gruplar halinde kayalıklara tutunur. Ilıman denizlerde istilacı olarak yayılır ve Türkiye'de, Doğu Akdeniz kıyıları hariç tüm kıyılarda görülür. Bunların dışında zengin organik madde içeriği ile ekonomik değeri yüksek bir besindir (Lök, 2001; Akar, 2009). Öte yandan kabuklu deniz ürünlerinin önemli besin kaynakları olmaları yanı sıra kıyı

endüstrisinin devam eden finansal üretimi açısından değerli bir ticari üründür (Fu ve ark., 2011).

Çift kabuklu yumuşakçalar yaşadıkları ortamdan veya nakliye, işleme, pazarlama esnasında çeşitli mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir. Bu hayvanların hareketsiz olması ve deniz suyunu süzerek beslenmesi, ortamdaki bakterilerle kontaminasyonlarını artırmakta ve özellikle çiğ ve az pişmiş olarak tüketildiğinde insanlarda gıda zehirlenmeleri meydana gelmektedir (Popovic ve ark., 2010; Türk ve ark., 2011).

Kabuklu deniz ürünlerinin geliştiği suların hayvan fekal atıkları ile kontaminasyonu, çoğu gastroenterit hastalık vakasından sorumlu önemli zoonotik patojenlerin (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ve *Listeria monocytogenes* gibi) kaynağı olarak değerlendirilir.

Kabuklu deniz hayvanları (Örneğin, istiridyeler, midyeler) bakteriyel, viral ve protozoon kökenli insan hastalıklarının önemli taşıyıcılarıdır. Dünya genelinde kabuklu deniz hayvanı örneklerinde patojenlerin varlığını göstermek için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Fransa'da istiridye ve midye örneklerinde enterik virüslerin (hepatit A virüs, Norwalk-like virüs, enterovirüs, rotavirüs ve astrovirüs) belirlenmesinde moleküler tekniklerin (RT-PCR) kullanımından faydalanılmıştır (Bitton, 2005).

Kabuklu deniz hayvanları aşağıdaki sebeplerden dolayı hastalık etkenlerinin taşınmasında önemlidir (Bitton, 2005).

- Devamlı evsel atık su akıntılarıyla kontamine olan nehir ağzı çevrelerinde yaşarlar.
- Süzerek beslenenler olarak, kontamine olmuş suların büyük miktarını (4-20 l/h) pompalayarak, patojen ve parazitleri bünyelerinde toplarlar.
- Bu canlılar sık sık ham veya yetersiz pişirilmeden yenirler. Fransa'da her yıl kabuklu deniz hayvanlarının sadece üçte birinin yeterince pişirilerek tüketildiği tahmin edilmektedir. Amerika'da bu alışkanlık 1991-1998 periyotları arasında 2100 vakaya yol açmıştır. Vakaların %60'ı enterik virüsler özellikle Norwalk-like virüs (NLV) tarafından gerçekleştirilmiştir (Bitton, 2005). Kabuklu deniz hayvanlarını buğulanması ve pişirilmesiyle mide ve bağırsak iltihabı ile ilişkili virüslerin önlenemediği görülmüştür. Kabuklu deniz hayvanlarında hepatit A virüsünün inaktive olması için yaklaşık 90°C sıcaklık yeterlidir.

- Kabuklu deniz ürünlerinin steril amaçlı temizlenmesi, bakteriyel kontaminasyon için etkiliyken, hepatit A virüsü gibi enterik virüsler için başarılı değildir.
- Diğer sağlık riskleri, dinoflagellat toksinleri, ağır metaller, hidrokarbonlar, pestisitler ve radyonükleidler yetenekleri sonucu bünyelerinde biriktiren kabuklu deniz ürünlerinin tüketilmesiyle ilişkilidir (Bitton, 2005).

Bahsedilen bu tehlikelerin dışında özellikle deniz ve nehir ağzı ortamlarında yaşayan *Vibrio* spp. türleri arasında; *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae* gastrointestinal hastalıklar veya bazı durumlarda sepsisemiye ilk olarak neden olanlar arasındadır. Sebep oldukları enfeksiyonlar ise önemli seviyelerde bakteri içeren kabuklu deniz ürünleri veya diğer deniz mahsullerinin uygunsuz işlenmesi, yetersiz pişirilmesi veya ham tüketilmesi yüzünden artar (Panicker ve ark., 2004).

Kaşgar (1992), İstanbul boğazının Rumeli Kavağı bölgesinden çıkarılan midyeler ve onların yaşadığı ortam olan deniz suyundaki fekal koliform bakterileri incelemiştir. Topladığı midyelerden izole ettiği *E. coli* suşlarının biyokimyasal ve üreme özellikleri üzerine yapmış olduğu çalışmada, gerek midye, gerekse deniz suyunda saptanan fekal koliform sayısının standart değerlerin çok üzerinde olduğunu saptamıştır. Ayrıca, yapılan değerlendirmelerde bu sayıların özellikle yaz aylarında arttığı kış aylarında ise azaldığını tespit etmiştir.

Şeker (1997), Keban Baraj Gölü'nün Koçkale bölgesinden topladığı 203 adet canlı su midyesi (*Unio tumidus*) ile 10 adet su örneğini bakteriyolojik yönden incelemiş ve çalışma bölgesinde fekal kirlenmenin olduğunu ve bu bölgede bulunan tatlı su midyelerinin insan gıdası olarak tüketilmeyeceğini ancak midyelerin suların kirliliğini azaltıcı olarak kullanabileceğini belirtmiştir.

Croci ve ark. (2002), *Mytilus galloprovincialis*'in tüketim için uygunluğunun bir indikatörü olarak kullanılan *E. coli*'nin indikatör olarak yeterli olup olmadığını belirlemek amacıyla temsilci olarak iki patojenik vibrio (*V. cholerae* O1 ve *V. parahaemolyticus*)'nun davranışlarını araştırmışlardır. *M. galloprovincialis*'i her üç bakteriyle kontamine ettikten sonra sayılarını belirlemek için En Muhtemel Sayı (EMS) metodunu kullanmışlar ve sonuç olarak, yumuşakçalar diğer mikroorganizmalardan arındığında indikatör olarak kullanılan *E. coli*'nin yetersiz olduğunu saptamışlardır.

Murchie ve ark. (2005), insanların tüketim amaçlı kullandıkları kabuklu deniz ürünlerinin besin değerlerini korumak için bir alternatif metot olarak yüksek basınç işlemi üzerine yürüttükleri çalışmada, yüksek basınç işlemine tabi tutulan besinler

duyusal ve besinsel özelliklerini korurken mikroorganizmalarında inaktive olduklarını tespit etmişlerdir.

Yılmaz ve ark. (2005), Marmara denizinden (Gelibolu Bölgesi) avlanan kum (*Venus gallina*) ve kara midyelerinin (*M. galloprovincialis*) mikrobiyolojik kalitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, kara midyelerinin toplam canlı bakteri sayısı $2,1 \times 10^4$ kob/g, koliform grubu bakteri $2,9 \times 10^2$ kob/g, *E. coli* 78 kob/g, *S. aureus* $3,1 \times 10^2$ kob/g olarak tespit etmişlerdir. Kum midyelerinin toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $1,9 \times 10^6$ kob/g, koliform grubu bakteri $8,2 \times 10^3$ kob/g, *E. coli* $2,5 \times 10^2$ kob/g, *S. aureus* $1,1 \times 10^3$ kob/g olarak saptamışlar. Örneklerin hiç birinde *Salmonella* spp., *V. cholera* ve *V. parahaemolyticus* varlığına rastlamamışlar.

Kaçar (2011), İzmir kıyı bölgeleri dâhilin de 4 istasyondan aldığı *M. galloprovincialis*'in bazı mikrobiyal karakteristiklerini belirlemek için yapmış olduğu bir çalışmada, tüm istasyonlarda maksimum fekal koliform sayısını Mart, Mayıs ve Kasım aylarında $2,4 \times 10^5$ MPN/100 g olarak tespit etmiştir.

2.3. Patojen ve İndikatör Organizmalar Arasındaki İlişkiler

Toplumdaki taşıyıcıların ya da aktif hastaların bağırsaklarındaki patojen mikroorganizmalar dışkı ile suya geçmekte ve sonuçta su, enfeksiyon kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tür suların içilmesi, gıda hazırlamada kullanılması, banyo yapılması, hatta solunmasıyla enfeksiyon gelişebilmektedir. Sularla bulaşan enfeksiyöz ishaller, dünyada tüm ölüm nedenleri içinde ikinci sırada yer almakta ve yılda yaklaşık 200 milyon insan su ile ilişkili hastalıklara yakalanmaktadır (WHO, 2004).

Çiftlik atıklarının uygunsuz işlenmesi, yetersiz korunan foseptiklerden sızma ve evsel atıkların direkt deşarjı su kökenli hastalıkların ana kaynağı olarak düşünülmektedir (Hatha ve ark., 2008). Patojenik mikroorganizmaları yüksek miktarda içeren lağım sularının rekreasyonel sulara boşaltılması insanların sağlığına zarar veren durumlara neden olabilir (Hatha ve ark., 2008).

Su kirliliğinin indikatörü olarak gösterilen bakterilerin en önemli grubu, *Enterobacteriaceae* ailesinin fakültatif, gram-negatif, fermentasyon yapabilen, çomak şekilli bakterileridir. Bu gruba 12 genus dâhildir bunlar: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serretia*, *Proteus*, *Yersinia* ve *Erwinia*. Bir başka önemli familya, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Photobacterium* ve *Lucibacterium* genuslarını kapsayan *Vibrionaceae* familyasıdır.

Fermentasyon yapmayan, gram-negatif, çomak şekilli grubu içeren genuslar: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* ve onların türleridir. Geriye kalan patojenik bakteriler stafilokoklar ve mikrokoklar (*Staphylococcus* ve *Micrococcus*), mikobakteriler (*Mycobacterium*), ve diğer spiroket takımına ait spiroketler ve leptospiroketlerdir (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

İnsanlar trilyonlarca bakteri tarafından kolonize olurlar bunlar ilk başta mukozal veya epitelyal yüzeylere yerleşir. Bu mikroplar başlangıçta konakçı ile simbiyotik ilişkiler içerisinde, bu yüzden bağışıklık sisteminden ödün verilmedikçe çok az ya da hiçbir şekilde patojenik etki göstermezler. Bu mikropların çoğu için anatomik yerleşim yeri bağırsaklardır, bu bölgeler tahmini kişi başına en az 160 bakteri türünü kapsayan 10-100 trilyon mikrop içerir (farklı insanlar arasında >1000 bakteri türü bulunabilir) (Ahmer ve Gunn, 2011).

Patojenik bakteriler temel ve fırsatçı olarak sınıflandırılırken, temel patojenik bakteriler sağlıklı insanlarda hastalık yapma yeteneğine sahiptir. Fırsatçı patojenler genel olarak immün yetmezliği olan insanlarda hastalığa neden olurlar. Bakterilerin patojenik karakterleri kolonizasyon ve lezyon faktörleri ile ilgilidir. Kolonizasyon faktörü bakteriye konakta koloni oluşturmayı sağlayarak yaşama ve çoğalma yeteneğini kazandırır. Adhesin, invasin, evasin ve besinsel faktörler önemli kolonizasyon faktörleridir (De Sousa, 2003).

Bakteriyel kontaminasyon; görme, koklama veya tatma ile belirlenemez. Suda patojenlerin belirlenmesi için iki yaklaşım vardır. Bunlardan ilki, patojenin kendisinin direkt belirlenmesidir. Bu durum su kalitesi belirlenirken spesifik patojenin varlığı hakkında çok fazla kesin bilgi verirken, onunla ilişkili birkaç problem vardır. Birincisi, çok çeşitli patojen varlığında her biri için yapılacak testler elverişsizdir. İkincisi, bu patojenlerin direkt belirlenmesi için kullanılan metotlar nispeten pahalı, zaman alıcı ve oldukça zordur (WHO, 1996). Suda patojenlerin belirlenmesi için ikinci yaklaşım ise, nadir gerçekleşen veya kaynağı belirlenemeyen kirlilik için indikatörlerin bulunması şeklinde tarif edilebilir.

İndikatör organizma kavramı 1982’de tanıtıldı ve bugün suların mikrobiyal kalite standardı için temeldir. İndikatör organizmalar aşağıda bahsedilen kriterlerle gösterilmelidir (Gerba ve ark., 2000; Sharma, 2005).

- Organizma suyun tüm tipleri için yararlı olmalı.
- Organizma enterik patojenin var olduğu her zaman bulunmalı.

- Organizma en dayanıklı enterik patojenden daha fazla yaşam dönemine sahip olmalı.
- Test etme metodunun uygulanması kolay olmalı.
- İndikatör organizmanın yoğunluğu fekal kirliliğin yoğunluğuyla az da olsa direkt ilişkili olmalı.
- Organizmalar, sıcakkanlı hayvanların bağırsak mikroflorasının bir üyesi olmalı.

Koliform bakteriler, bakteriyal su analizlerinde çoğunlukla kullanılan indikatör organizmalardır. Bu organizmalar özellikle insan orijinli olup toprakta, işlenmemiş yüzey sularında ve hayvan dışkısında kolayca bulunurlar (Ezeugwunne ve ark., 2009). Koliformlar, 37°C de inkübe edildiğinde asit ve gaz üretimi ile laktozu fermente eden çubuk şeklinde Gram-negatif organizmalardır. Fekal koliformlar, toplam koliform ailesi içinde küçük bir gruptur; nispeten kısa yaşam süresine sahiptirler ve memelilerin bağırsaklarında normal olarak yaşar. *E. coli*, fekal kontaminasyonunun belirtilerini verdiği için kullanılan su analiz tahlillerinde en çok tercih edilen fekal koliformdur. Aynı zamanda çevrede yeniden üreyip gelişemez. Bu nedenle, koliform bakterilerin türü olarak değerlendirilip patojenlerin varlığı ve fekal kirliliğin en iyi indikatörüdür (Edberg ve ark., 2000; Ezeugwunne ve ark., 2009).

Genelde fekal koliformlar, yüzey sularında patojenlerin belirlenmesi için kullanılmış olmasına rağmen, *E. coli* ve *Enterococcus*'un gastrointestinal hastalıkların yayılması ile yüksek derecede bağlantılı olduğu düşünülmektedir (USEPA, 1986; Soupir ve ark., 2010). İndikatör organizmalar, toprağa tutunmuş fekal partiküller, hayvan gübresiyle oluşmuş kolloidler, toprak ile ilişkili tanecikli partiküller aracılığıyla veya bir yere tutunmaksızın aşırı doyum noktasına ulaşmış akıntılarla serbestçe hareket edebilir. Fekal bakterilerin partiküllere tutunması canlı kalma süresinin uzamasına izin verir ve eğlence amaçlı aktiviteler veya fırtınalar süresince partiküllere tutunan organizmalar su sütunu içerisinde tekrardan süspanse olduğunda potansiyel olarak su kaynaklı hastalıkların yayılması devam eder (Soupir ve ark., 2010).

Koliform bakteriler, konakçı tarafından enfeksiyon oluşturacak miktarlarda alınırsa hastalık oluşturma yetenekleri diğer patojenik mikroorganizmalardan fazladır. Bu durum bu bakterilerin potansiyel hastalık oluşturma yeteneklerinin varlığını gösterir (APHA, 1995).

Bir atık su işleme tesisinde en son akan örnekte indikatör organizmaların olmaması veya önemsiz sayıda bulunması, bu su örneğinin güvenliğinin garanti

olduğunu göstermez. Muhtemelen bu durum akıntının sadece örnekleme zamanında güvenli olduğunu işaret eder. Örneğin, koliform bakterilerin önemsiz sayıda var oluşu veya yokluğuna bakılarak *Cryptosporidium* ve *Giardia* gibi protozoon parazitlerin ve enterovirüslerin varlığını doğrulamak zordur (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

2.4. Koliform Bakteri ve İndikatör Organizmalar

Aerobik ve fakültatif anaerobik, gram negatif, spor oluşturmayan, 35°C’de 48 saat içerisinde gaz üretimi ile laktoz fermente eden çomak şekilli bakterileri içerisinde alan toplam koliform grubu *Enterobacteriaceae* familyasına aittir (Bitton, 2005). Koliformlar fekal atıklar hariç çoğu habitatta (toprak ve bitki örtüsü) genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Fekal atıklarda oldukça fazla orandadırlar. Bu yüzden, koliformların varlığı fekal kontaminasyonun bir indikatörü olarak değerlendirilir.

Citrobacter, *Enterobacter*, *Escherichia*, ve *Klebsiella* cinslerine mensup türleri kapsayan koliform bakteriler *Enterobacteriaceae* familyasına aittir. Muhtemelen, en önemli koliform *E. coli*’dir. Bu bakteri sadece insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak sisteminde bulunur, tarihsel süreçte sudaki varlığı, olası enterik patojenlerin varlığı ve fekal kontaminasyon ile ilişkili olmuştur. Toplam koliformların %60’ından fazlası fekal koliformdur ve fekal koliformun %90’ından fazlası *Escherichia* genusunun üyeleridir.

Fekal koliform grup sık sık olası patojen varlığının indikatörü olarak kullanılır. Fekal koliformların yanı sıra, *Enterococcus*, *E. coli*, *Streptococcus* (fekal streptokoklar), ve total koliformları kapsayan diğer organizmalarda mikrobiyal kontaminasyon ve potansiyel sağlık riskinin birer indikatörü olarak hizmet ederler. Bu organizmalar, indikatör organizmaların bütün iyi niteliklerini paylaşır. Bu indikatörler kabuklu hayvan hasadı, içilebilir ve eğlence amaçlı sularda kalite belirlemesi için faydalıdır. Ancak dezenfeksiyonlara ve çevresel strese karşı virüsler ve protozoa kistlerinden daha az duyarlıdır. Bu grubun bazı üyeleri (Örneğin, *Klebsiella*) bazen endüstriyel ve tarımsal atıkların bulunduğu çevresel koşullar altında gelişebilir. Su işleme tesislerinde, toplam koliformlar tesisin işleme verimliliğinin en iyi indikatörlerinden biridir (Bitton, 2005).

Çoğu koliform, kapsül ile kendini kuşatarak ağır çevre şartlarında canlı kalabilir ve minimum besin gereksinimiyle büyüebildiği için mükemmel kolonizerdirler. Koliformlar klora duyarlı olmasına rağmen, klorun etkilerinden kendilerini kapsül oluşumuyla korurlar (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

2.4.1. Fekal Koliformlar

Fekal koliformlar 44,5°C’de laktozu fermente edebilen bütün koliformları içine alan termotolerant bakterilerdir. Fekal koliform grup *E. coli* ve *K. pneumonea* gibi bakterileri kapsar. Fekal koliformun varlığı sıcakkanlı hayvanlardan fekal materyalin varlığını işaret eder. Bazı araştırmacılar, fekal koliform grubun diğer üyelerinden kolayca ayırt edilebildiği için (Örneğin, β -glukoronidaz’ın varlığı ve üreaz yokluğu) fekal kirliliğin bir indikatörü olarak yalnızca *E. coli*’nin kullanılmasını öne sürmüşlerdir. Fekal koliformlar bakteriyel patojenlerinkine benzer bir yaşam mücadelesi modeli gösterirler ama onların protozoa veya viral kontaminasyonun indikatörü olarak faydalılıkları sınırlıdır. Bu yüzden koliform standartlarının, virüsler ve protozoa kistleri ile kontamine olmuş sucul ortamla bağlantısı güvenilirmezdir. Aynı zamanda koliformlar çevrede yeniden gelişebilir. Dahası tropikal yağmur ormanlarının bozulmamış alanlarında bile *E. coli*’nin geliştiği belirlenmiştir, bu durum tropikal çevrelerde fekal kirliliğin indikatörü olarak *E. coli*’nin güvenilirmez olabileceğini öne sürmüştür (Bitton, 2005).

2.4.1.1. *Escherichia coli*

Yaygın olarak *Bacterium coli* olarak bilinen *E. coli* ilk olarak Avusturyalı çocuk doktoru Theodor Escherich tarafından 1885 yılında bir çocuğun dışkılarından izole edilmiştir. Su ve diğer çevresel kaynakların mikrobiyal kirlilik için testleri, *Escherichia*’nın *Bacillus coli* (şu anda *Escherichia coli*) olarak tanımlandığı ve sıcak kanlı hayvanların dışkısında her zaman var olduğunun kanıtlandığı zamanlar 1890’lara dayanmaktadır (Edberg ve Edberg, 1988).

Escherichia coli insan ve hayvan sindirim sisteminin en yaygın bulunan bakteri türüdür. İnsan ve hayvanlarda patojen olup sindirim ve diğer sistemler için zararlı olan suşları mevcuttur. Bu suşlar içinde Enteropatojenik *E. coli* sindirim sisteminin dışında enfeksiyon yapabilme yeteneğine sahip ve sindirim sisteminde ishale neden olan suştur (Welch, 2006). Patojenik suşları ishal, üriner sistemi enfeksiyonları ve meninjitinde içerisinde bulunduğu birkaç hastalıkla ilişkilidir (Orsi ve ark., 2007).

Escherichia coli suşları 4 temel filojenik grup içinde ayrılabilir: A1, B1, B2 ve D. Genellikle, kommensal suşlar filojenik grup A ve B1 içinde yer alır. Sindirim sistemi dışı patojenik suşlar, B2 grubu ve daha az alanda yaygınlık gösteren D grubuna dâhildir.

Sindirim sistemi patojenik suşları genellikle A, B1 ve D grubuna dahildir (Orsi ve ark., 2007).

Escherichia coli'nin bulunduğu cinse mensup başka türlerde vardır; *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* ve *E. vulneris* (Welch, 2006).

E. coli, gelişmekte olan ülkelerde ki çocuklarda akut ishalin en önemli nedeni olan ve dünya genelinde halk sağlığı için önem arz eden, Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroaggregavite *E. coli* (EAggEC) ve Enteroadhesive *E. coli* (DAEC) gibi birkaç patojenik serotip içerir (Hatha ve ark., 2008).

Escherichia coli'nin en kayda değer özelliği hastalığa neden olan genotiplerinin yaygın çeşitliliğidir. Hastalıklar sindirim sistemi patolojisi ve farklı semptomları kapsayabilir, bunun dışında sindirim sistemi dışında da hastalıklar mevcuttur. ETEC'in tanınan 6 sindirim sistemi içi ve 2 sindirim sistemi dışında patojenite gösteren patotipi vardır (Welch, 2006).

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), su ve besinin fekal kontaminasyonu ile bulaşır. Enfekte olmuş bireylerde, kansız veya mukussuz bol sulu ishal, karın krampları, asidoz, dehidrasyon gibi hastalıklarla *V. cholerae*'ya benzer etki gösterir (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

Enteroinvazif *E. coli* (EIEC), yetersiz sanitasyon olan alanlarda su ve besinin fekal kontaminasyonu ile bulaşır. Genelde kolon bölgesine yerleşir. Ateş, ishal ve bazen kanlı ishale seyreden semptomları vardır (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), yetersiz sanitasyonun görüldüğü alanlarda, kontamine besin ve su salgınlarıyla hastalık oluşturur. Özellikle yeni doğan bebekler olmak üzere enfekte olmuş bireylerde "klasik" akut ishal hastalığı görülür (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), su ve besinin fekal kontaminasyonu sonucu enfekte olduğu bireylerde, ishal, karın krampları, ateş ve kusma gibi gastroenteritis ve hemolitik üremik sendrom (Böbrek hasarı) vakalarına yol açar (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

Enteroaggregavite *E. coli* (EAggEC), Hep-2 ve HeLa hücrelerine tipik etkileri olan, enterotoksin oluşturmeyen, invazif olmayan, O ve H antijenlerine göre ETEC, EHEC, EIEC ve EPEC olarak adlandırılmayan *E. coli* suşlarıdır. Dünyanın her yerinde yaygın olarak kronik diyarelere sebep olmaktadır. Ancak çocuklarda sulu diyare,

kusma, dehidratasyon ve nadiren karın ağrıları, ateş ve kanlı dışkıya neden olur (Baştürk, 2005).

İnsanların bağırsak sistemlerinin yaklaşık %0,1'i *E. coli* tarafından temsil edilir. Diğer bakterilerle birlikte sıcakkanlı organizmalar tarafından absorbe edilen B ve K vitaminlerini üretir (Gerardi ve Zimmerman, 2005).

Çok sayıda (50'den fazla) serotipi bulunan EHEC'in insanlarda hemorajik kolitis (hemorrhagic colitis: HC), akut böbrek yetmezliği (hemolitik üremik sendrom: HUS) ve küçük damarlarda kan pıhtılaşması (trombotik trombositopenik purpura: TTP) oluşturabilen en yaygın örneği O157:H7 serotipidir. Bu serotipin toksini, *Shigella dysenteriae* tip I tarafından üretilen toksine benzerliğinden dolayı Shiga benzeri toksin (Shiga like toxin-SLT) olarak da bilinen vero sitotoxin veya verotoxin (VT) üretimi ile dikkat çekmektedir. Bu toksinler, biyokimyasal olarak birbirlerine oldukça benzeyen, protein sentezini inhibe eden, Vero ve HeLa hücrelerine karşı aktif olan Shiga-like toxin 1 (VT 1) ve Shiga-like toxin 2 (VT 2) olmak üzere 2 adet güçlü toksin yapısındadır (Temelli, 2002).

Shiga benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC)'nin ilk salgını 1982 de ABD'de kaydedildi ve bu salgına O157: H7 serotipinin bir klonunun neden olduğu saptandı. 1980 öncesinin daha eski kültürleri incelendiğinde bu patojenin nadir yayılması da göz önünde bulundurularak ortaya yeni çıktığı belirtilmiştir (Coombes ve ark., 2011). *E. coli*'nin genel olarak çevrede 2-3 haftadan daha fazla dayanmadığı belirtilmiştir (Barton ve Pace., 2005). Aynı zamanda *E. coli*'nin laktozdan asit ve gaz üretimi, oksijen yokluğunda büyüyebilme yeteneği ile kolayca belirlendiği rapor edilmiştir. Sağlık riski ve su kalitesinin dolaylı bir indikatörü olan *E. coli*'nin kullanılması kavram olarak görünmesine rağmen, gerçekte, fenotipik özellikleri *E. coli*'ye benzeyen ve laktozu fermente edebilen *Citrobacter*, *Klebsiella* ve *Enterobacter* gibi diğer enterik bakterilerin varlığından dolayı bu durum karmaşıktır (Barton ve Pace., 2005).

İnsanlar, çoğu evcil ve yabani hayvanlar *E. coli*'nin kumsallarda var olmasına katkı sağlayabilir. Bunun dışında yapılan bazı araştırmalarda, yağmur sonrası, şehir içindeki bazı yüzey kısımlarında biriken sular, fırtına etkisiyle yüzeysel atıksu işleme tesislerinden dışarı akan akıntılar, bozuk septik sistemler ve birleştirilmiş lağımların aşırı taşması ile meydana gelen sızıntılardan dolayı eğlence amaçlı sularda *E. coli*'nin yoğunluğunun arttığı belirtilmiştir (Struffolino, 2010).

Neden *E. coli* sadece bazen eğlence amaçlı plajlarda var olur? Byappanahalli ve ark., (2003) tarafından belirtildiği gibi, akıntının dip sedimentlerinde *E. coli* ısrarlı bir

şekilde varlığını sürdürebilir, bu sedimentler eğlence amaçlı plajlarda *E. coli*'nin kaynağı olabilir. Akıntının dip kısmında *E. coli*'nin ısrarlı bir şekilde varlığını sürdürmesi, bu bakterilerin ince taneli çökelti ve kuma tutunmasından kaynaklanır. Bu alt katman *E. coli*'ye besin kaynağının yanı sıra güneş radyasyonu ve avcılardan korunmasını da sağlar. Sedimentlere tutunmuş olan bakteriler, artan akıntılar ve yüksek yağış miktarı periyotlarında akarsu, nehir ve yağmur suyunun oluşturduğu kanallar vasıtasıyla taşınırlar. Partiküllere bağlı *E. coli*, sedimentlerin hareketiyle yer değiştirir (Struffolino, 2010).

Muirhead ve ark. (2006), *E. coli*'nin bir yerden başka bir yere taşındığını belirlemek amacıyla yapmış oldukları bir çalışmada, direkt olarak taze sığır pisliğinden simülatör yağmur kullanılarak elde edilen akıntıdan *E. coli* sayısını EMS metoduyla incelemiş ve *E. coli*'nin ağırlıklı olarak bireysel hücre şeklinde taşındığını saptamışlardır.

Total koliformlar olarak sınıflandırılan mikroorganizmalar, böcekler, yumuşakçalar, balıklar, kuşlar, memeli bağırsakları, toprak, bitki ve su yüzeyinde varlıklarını sürdürerek çevrede geniş bir dağılım gösterirler. *E. coli* uzun zaman periyodu içerisinde toprakta canlı kalıp çoğalabildiği ve dahası *E. coli*'nin kumlu gevşek topraklarda uzun periyotlarda daha uygun oranlarda süzüldüğü bulunmuştur (Gagliardi ve Karns, 2000; O'Neal ve ark., 2007). Diğer mikroorganizmalardan farklı olarak *E. coli*'nin, çoğu farklı hayvan türünde yaygın olarak bulunup, kolaylıkla dirençlilik kazanabildiği için antimikrobiyal denetleme çalışmalarında iyi bir model biyoindikatör olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Alhaj ve ark., 2007).

2.5. Fekal *Streptococcus/Enterococcus*

Enterokoklar, *Streptococcaceae* familyası içinde yer alan katalaz negatif, Gram pozitif koklardır. *Streptococcus* cinsinden morfolojik olarak ayrılması güç olduğundan, 1980'li yıllara kadar streptokok olarak sınıflandırılmıştır. Gram-pozitif kokların DNA-RNA hibridizasyonları, 16S-rRNA dizi analizi ve hücre duvar yapılarının incelenmesi yöntemleri ile yapılan sınıflandırma çalışmaları sonucu *Streptococcaceae* familyası, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* cinsi olarak ayrılmıştır (Berzeg, 2005).

Taksonomik analizlerle ilgili genetik teknolojide kaydedilen gelişmeleri takiben, en az 12 (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. gallinorum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius*, *E.*

pseudoavium gibi kabul görmüş türlere son yıllarda, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. Seriolicida* ve *E. flavecens* gibi yeni türleri içeren) türün bulunduğu ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir. Toprak, su, yiyecek, insan ve hayvanların bağırsakları, safra yolları, ağız ve bazen de deride normal flora üyesi olarak bulunurlar. Uygun koşullar altında insanlarda çeşitli infeksiyonlara yol açarlar. Son yıllarda klinik olarak diğer streptokokların duyarlı olduğu antimikrobiyallere karşı dirençli olmaları nedeniyle, özellikle nozokomiyal patojen olarak klinik önemleri giderek artmaktadır (Berzeg, 2005).

İşlenmemiş suyun bir litresinde milyonlarca koliform bakteri bulunmasına rağmen, fekal streptokokların sayısı genelde koliform bakterilerden daha azdır. Fekal streptokoklar, hayvanların enterik bakterileri (*S. avium*, *S. bovis* ve *S. equinus*) ve insanların enterik bakterilerini (*S. faecalis* ve *S. faecium*) kapsar. streptokokun bu türleri fekal kontaminasyonun göstergeleridir. *S. faecalis* ve *S. faecium* insan orijinli fekal kontaminasyonun belirteçleridirler.

Fekal streptokok grubunun bir alttakımı olan *Enterococcus* (*E. faecalis* ve *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* ve *E. avium*) yüksek sıcaklık (45°C), yüksek pH (pH: 9,6) ve %6,5 NaCl'de gelişme yeteneğine sahiptir. Bu grup özellikle biyokatılar ve deniz ortamında virüslerin varlığını göstermek için faydalı olarak önerilmiştir (Bitton, 2005). Fekal enterokoklar doğal membranlarından dolayı kötü koşullara karşı fekal koliformlardan daha dirençlidirler. Işık (özellikle UV radyasyonu), sıcaklık, tuzluluk, saldırı ve rekabet FC ve FE'lerin bütünlüğü üzerine kötü bir etkiye sahiptir (Bordalo ve ark., 2002).

Fekal *Streptococcus/Enterococcus*, EMS veya membran filtrasyon formatlarındaki seçici gelişme ortamları kullanılarak tespit edilebilir. Fekal streptokokların tespiti için enzim temelli metotlarda kullanılır. Bu indikatörler, seçici ortam içerisine florojenik (MUG: 4-metilumbelliferon β -D-glukozid) veya kromojenik (indoksil- β -D-glukozid) substratların katılmasıyla tespit edilebilir. *Enterococcus* grubu florojenik ve kromojenik enzimatik testleri aracılığıyla hızlıca tespit edilebilir. Bu testler iki spesifik enzim, piroglutamil aminopeptidaz ve β -D-glukozidaz'ın aktivitelerinin belirlenmesine dayandırılır (Bitton, 2005).

2.6. Fekal koliformun Fekal *Streptococcus*'a Oranı (FC/FS Oranı)

Yüzey sularında bu oran, fekal kirlilik kökeninin (insan veya hayvan kaynaklı) bir indikatörü olarak kullanılmaktadır. FC/FS oranı ≥ 4 ise insan orjinli kontaminasyonu, $<0,7$ ise hayvan kökenli kirliliği gösterir. Bu oran istisnasız doğrudur ancak fekal kirliliğin son zamanları (24 saat) ve klorlanmış akıntılar için güvenilir değildir ve bazı araştırmacılar onun faydalılığını sorgulamışlardır. Bu bulguların sonucu olarak, APHA hayvansal kaynaklı kirlilikten insan kaynaklı olanının ayrımını yapmak için bir aracı olarak tercih edilen FC/FS oranının kullanımını artık önermemektedir (APHA, 1998; Bitton, 2005).

2.7. *Escherichia coli* Tanımlamasında Kullanılan Metotlar

Bakterilerin tiplendirilmesinde fenotipik ve genotipik olmak üzere iki temel kategori vardır. Fenotipleme; serotip, bakteriyosin, bakteriyofaj tipleme, biyotipleme ve antibiyotik dirençliliğini kapsamaktadır. Genotipleme ise protein profilleri, plazmit ve kromozomal DNA'ya dayalı analizleriyle direkt bağlantılı olarak tür ve cinslere uygulanır. Ayrıca genotipleme, tekrarlanabilir verilerle çok daha fazla tutarlılığa sahiptir. Karakterizasyonu yapılmış bireysel suşlar için popüler yaklaşım olarak, DNA dizi analizi, nükleik asit parmakizi ve PCR gibi moleküler biyolojinin pratik uygulamaları hedeflenmiştir (Relman ve Persing; 1996).

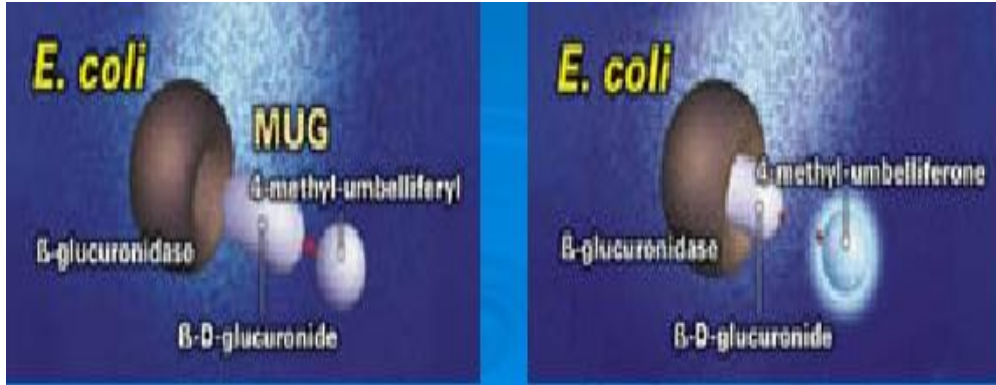
2.7.1. Fenotipik Metotlar

Suşların tanımlama ve tiplendirilmelerinde kullanılan en eski metotlardan biri olan biyotiplelendirme; bir organizmanın izolasyonu, pH, sıcaklık gibi ekstrem çevre şartlarına veya anaerobik koşullara uyumu, seçici besiyeri ortamında gelişimi, koloni morfolojisi ve spesifik biyokimyasal reaksiyonları kapsayan metabolik aktivite ifadesinin kullanımından ibarettir. Bu tekniğin kullanımı klasik taksonomide temel kriter olmuştur. Modern laboratuarlarda bu fonksiyonları otomatikleştirilmiş sistemler yapmaktadır. Biyotiplelemenin bir tür içerisindeki suşları ayırma yeteneği sınırlı olduğu için tür altı düzeyde zayıf ayırım gücüne sahiptir (Zaidi ve ark., 2003).

Biyotiplendirmeye dayalı enzimatik testler, toplam koliform ve *E. coli*'nin çevresel örneklerden hızlı ve duyarlı bir şekilde tespit edilmesi için alternatif bir

yaklaşım sağlar. Çoğu testte toplam koliform tespiti β -galaktozidaz aktivitesine dayandırılır. Kullanılan enzim substratları O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG), klorofenol red- β -D-galaktopiranozid (CPRG), 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (X-GAL) veya siklohegzenoeskuletin- β -D-galaktozid gibi kromojenik substratlardır. Aynı zamanda MUG veya fluoresein-di- β -galaktopiranozid (FDG)'i kapsayan flurojenik substratlar kullanılır (Bitton, 2005).

β -glukoronidaz bazı *Shigella* türlerinde olduğu gibi *E. coli*'de de bulunan hücre içi bir enzimdir. Bu testler kliniksel ve çevresel örneklerde *E. coli* tespiti için kullanılmaktadır. Test, 100 mg/l MUG ilave edilmiş lauril-triptoz broth'da inkübe edilen örneklerden 35°C'de 24 saatlik inkübasyon süresi içerisinde β -glukoronidaz'ın flurojenik substratı olan MUG ile reaksiyona girerek uzun dalga boylu ultraviyole lambalarla kolayca belirlenebilen floresan ışınım üretmesinden ibarettir (Şekil 2.1) (Bitton, 2005). Aynı zamanda *E. coli*, hücre periplazmik boşluğunda yerleşmiş bir enzim olan alkalen fosfataz veya en dış membran proteinlerine karşı yöneltlen monoklonal antibiyotikler kullanılarak da tespit edilebilir (Bitton, 2005).



Şekil 2.1. Floresan pozitif *E. coli*'de enzim-substrat ilişkisi (Anonim, 2007)

Huang ve ark. (1997), EMB (Levin's Eosin-Methylen Blue) Agar üzerinde üreyen şüpheli *E. coli* suşlarını tanımlamak için β -glukoronidaz ve İMVİC testlerini kıyaslamayı amaçladıkları bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında, *E. coli*'lerin %93,9 İMVİC, %95,9 β -glukoronidaz testleriyle pozitif olduklarını saptamışlar ve sonuç olarak, β -glukoronidaz tahlilinin, EMB agar üzerinde üreyen şüpheli *E. coli*'ler için klasik İMVİC testlerinin etkili bir alternatifi olabileceğini önermişlerdir.

Vilamu ve Vives-Rego (2008), üriner sistemde *E. coli* tespiti için hızlı ve direkt bir yöntem olarak flurojenik yöntemi kullanmışlardır. Neredeyse diğer tüm

enterobakterilerde β -glukoronidaz enzimi eksikken, *E. coli*'nin çoğu klinik suşunda bu enzimin bulunduğunu belirtmişlerdir ve çalışmalarında üriner sistemde 10^3 CFU/ml *E. coli* varlığını β -glukoronidaz aktivitesi ile 1 saatten kısa bir sürede saptamışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, β -glukoronidaz'ın üriner sistemde *E. coli* varlığını hızlı, spesifik ve duyarlı bir şekilde belirleyebildiğini, buna ilaveten enfeksiyon etkeni bakteri popülasyonunun biyolojik durumu hakkında ek bilgi sunduğunu rapor etmişlerdir.

Escherichia coli'nin karmaşık ancak iyi bir antijen yapısı ve değişik antijen tipleri vardır. *E. coli*, O (somatik), H (kirpik) ve K (kapsül) yüzey antijen profillerine dayalı serotiplendirilir. *E. coli*'nin bugüne kadar 181 O ve 56 H antijeni tanımlanmış ve bu antijenlerin spesifik kombinasyonu izolatların “serotipini” belirler (Nataro ve Kaper, 1998; Öngen, 2008).

Wolf (1997), serotiplendirdiği 954 ETEC suşunda 78 farklı O antijeni, 730 suşta 34 farklı H antijeni tespit etmiştir. Öte yandan suşların bir kısmını tiplendirememiştir. Jenkins ve ark. (2006), 143 EAEC suşunun 93'ünü serotiplendirmiş ve serotiplendirdikleri 93 suşun 47 farklı serotipte olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak serotiplendirme yönteminin tanıda fazla önemli olmadığı bildirilmiştir.

Bunların dışında *E. coli*'ler bakteriofajlarına göre faj tiplerine ayrılmaktadır. Faj tiplendirme metodu 1950 yılından beri epidemiyolojik çalışmalarda uygulanmaktadır (Ward ve ark., 1987). Bakteriofajlar bakterilere yüksek derecede spesifiklik gösterirler. Serolojik testlerde olduğu gibi faj tiplendirmesinde de mutlak özgüllük olmadığı göz ardı edilmelidir. Serolojik testler ve faj tiplendirmesi, diğer identifikasyon yöntemleri ile en azından “cins” aşamasına kadar identifiye edilmiş izolatların kesin tanımlarının yapılmasında kullanılır (Halkman ve Tunail, 2000).

Yine benzer bir sınıflama kolisin tiplerine göredir. Kolisin, antibiyotik etkisi gösteren bir bakteriyosindir. Bu bakteriyosin aynı türden diğer *E. coli*'leri eritici etki yapmaktadır (Bilgehan, 2000; Baştürk, 2005).

El-Jakee ve ark. (2009), su kalitesi önemini anlamadaki ihmallerden dolayı insan ve hayvanlarda ortaya çıkan hastalık risklerini tanımlama amaçlı yaptıkları çalışmada, koliformların varlığını göstermek amacıyla 50 su örneği üzerinde çalışmışlardır. İzole ettikleri tüm *E. coli*'lerin virülens genlerini (*hly*, *fliCh7*, *stx1*, *stx2* ve *eae* genleri) göstermek için serotiplendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, toplanan su örneklerinin %90'ının koliformlar için pozitif olduğunu göstermiştir. İncelenen su örneklerinden izole ettikleri *E. coli* serotiplerinden en çok bulunan O128:K67 ve onu takiben sırasıyla O157:K, O111:K58 ve O55:K59 olmuştur. Araştırmacılar bu veriler ışığında,

kontamine olmuş sulardan ETEC ve EHEC enfeksiyonlarıyla bağlantılı risklerin oluşabileceği ve suların *E. coli* enfeksiyonları için önemli rezervler olabileceği sonucuna varmışlardır.

Fenotipik metoda dayalı olan diğer bir sınıflandırma yöntemi antibiyogramdır. Sucul ortamdaki antibiyotiğe dirençli bakterilerin sayısı, insanlar tarafından bu ilaçların kullanımının yayılması sonucu olarak dramatik bir şekilde artmaktadır. Antibiyotik direnç ve çoklu direnç gösteren bakterilerin sayısındaki hızlı artışın sebebi, kısmen plazmidler gibi genetik elemanların bakteriler arasındaki transferi ve hücrelerin birbirleriyle teması sonucu bakteri popülasyonları arasında antibiyotik dirençliliği sağlayan ajanların transferiyle bu organizmaların yeteneğinin sonucudur (Perlinski ve Mudryk, 2009). Bakteri popülasyonlarında ilaçlara karşı direnç; insanlar arasında bakterilerin transferiyle, bakteriler arasında dirençli genlerin transferiyle (genellikle plazmitler üzerinden) ve transpozonlar üzerinden, bakteriler içerisinde genetik elementler arasında dirençli genlerin transferiyle görülebilir (Jalal ve ark., 2010).

Balcı (2007), Seyhan Baraj Gölü'ndeki toplam aerob bakteri, toplam koliform, fekal koliform, maya ve küf sayısını saptamak ve izolatların günümüzde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere dirençlilik frekanslarını belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlar. Araştırmacılar gölden izole edilen izolatların biyokimyasal analizleri sonunda, 179'unun *E. coli*, 179'unun *Enterobacter* sp., 47'sinin *Citrobacter* sp., 21'inin *Klebsiella* sp., olduğunu tespit etmişler. Ayrıca bu çalışmada, fekal koliform oranı %33 olarak belirlenmiş ve bunların dışında *S. feacalis*, *Vibrio* spp., ve *Cryptococcus* spp., varlığı da araştırılmıştır. İzole edilen izolatların %46,14'ünün birden fazla antibiyotiğe dirençlilik gösterdiği gözlemlenmiş ve araştırmacı sonuç olarak, gölün kirlilik düzeyinin yüksek olduğu ve ileriki zamanlarda halk sağlığı açısından ciddi problemler oluşturabileceği vurgulanmıştır.

Bashir ve ark. (2008), Pakistan'da farklı yaş ve cinsiyetteki hastaların idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan çeşitli patojenlerin antibiyotik dirençliliği üzerine yaptıkları çalışmada, idrar yolu enfeksiyonlarına en sık neden olan bakterinin *E. coli* olduğunu belirtmişlerdir. İzole edilen *E. coli* suşlarının ampicilin, kotrimokazol, siprofloksin, gentamisin, nitrofuratoyin ve amikasin'e karşı sırasıyla %92, %86, %80, %62, %47, %20 ve %4 dirençli olduğunu bulmuşlardır.

Matyar ve Dinçer (2010), Akdeniz'den izole edilen 158 adet *Enterococcus faecalis* bakterilerinin 15 farklı antibiyotiğe ve dört farklı ağır metale karşı dirençliliğini araştırmışlardır. Gentamisine (%98,7), siproflaksine (%77,8), imipeneme (%77,2) ve

levofloksasine (%72,8) karşı yüksek antibiyotik dirençliliği bulunurken, en az dirençlilik ise vankomisine (%3,2) minosikline (%13,3) ve kinopristin-dalfopristine (%13,3) karşı bulunmuştur. Birçok izolat farklı ağır metal derişimlerine tolerans göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar Doğu Akdeniz'in önemli oranda antibiyotik ve ağır metal dirençliliği taşıyan *E. faecalis* barındırdığını ve bununla halk sağlığı açısından potansiyel bir risk taşıdığını göstermektedir.

Klinik mikrobiyolojide cins, tür ve izolat seviyesinde teşhis biyokimyasal, morfolojik ve biyolojik özellikleri test eden yöntemlere dayalıdır. Geliştirilen son biyokimyasal testler türlerin identifikasyonunu sağladığı gibi bakteri ırklarını da ayırabilir. Çok genel olarak uygulanan antimikrobiyal duyarlılık testleri hem uygun tedaviyi belirler hem de bakteri ırklarını tanımlamada yardımcı olur. Ancak, yüksek dirençlilik veya duyarlılık özeliği olan patojenlerde bu tip testlerin hassasiyeti sınırlıdır. Faj tiplemesinde olduğu gibi oldukça spesifik fenotipik belirlemeler geliştirilmesine karşın, bu testlerde kullanılan besiyeri bileşenleri her zaman ticari olarak elde edilemeyebilir. Biyokimyasal testler için harcanan sürenin uzun olması, sonuçların zaman zaman yanıltıcı olması ve diğer dezavantajlar fenotipe dayalı testlerin standart hale getirilmesinde engel oluşturmıştır (Anonim, 2012a). Bu yüzden daha hızlı, güvenilir ve yüksek ayırım gücüne sahip tiplendirme yapabilen yeni fenotipik özelliklere dayalı alternatif tiplendirme metotları geliştirilmiştir.

2.7.2. Genotipik Metotlar

Bakteriyel izolatların identifikasyonunda biyokimyasal, antibiyogram ve serotipleme gibi fenotipik testler halen kullanılmaktadır (Versalovic ve ark., 1993). Biyokimyasal metotların basit olmasının yanı sıra çok vakit alıp daha az duyarlı olması ve immunolojik metotların bakteri çeşitliğini tamamen ortaya çıkaramaması, bu konudaki sorunları ve sistematik problemleri çözmek amacıyla araştırmacıları çeşitli çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir (Anand, 2001). Sistematik problemlerin çözümündeki en son gelişmeler farklı DNA temelli belirteç sistemleriyle genotipin doğrudan ya da dolaylı olarak belirlenmesi üzerinde olmuştur. DNA temelli bu farklı analizler, pek çok sorunun çözümünde umut verici görülmektedir (Roberts, 2000; Aydın, 2004). PCR bu analizlerin temelini oluşturmaktadır (Mullis ve ark., 1986).

Moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik açıdan ilişkisiz izolatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymaktadır. Moleküler yöntemler arasında;

enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) (Sahilah ve ark., 2010), rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR) (Chansiripornchai ve ark., 2001; Coenye, ve ark., 2005; Sahilah ve ark., 2010), tekrarlayan ekstragenik elementlerin PCR ile amplifikasyonu (REP-PCR) (Versalovic ve ark., 1991), çoğaltılan fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism: AFLP) (Coenye, ve ark., 2005), multilokus enzim elektroforezi (MLEE) (Chansiripornchai ve ark., 2001), PCR analizi (Saiki ve ark., 1985; Joseph ve ark., 2001; Sambrook ve Russell, 2002), plazmid tiplendirme (Sahilah ve ark., 2010), PFGE (Chansiripornchai ve ark., 2001; Coenye, ve ark., 2005; Sahilah ve ark., 2010), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Clark, 2005), randomly fragmented leght polymorphism (RFLP) (Güneş, 2006), toplam hücre içi ve hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE ve Native-PAGE ile analizi (Costas ve ark., 1989; Berber ve ark., 2003; Berber ve ark., 2010) ve PCR ribotipleme (Kostman ve ark., 1992; Haque ve ark., 2007), 16S rRNA dizi analizi (Ash ve ark., 1991; Berber ve Cokmus, 2001; Berber, 2004) gibi yöntemler yer alır. Bu yaklaşımlar bakterilerin epidemiyolojik ilişkileri ve genetik çeşitliliklerinin incelenmesinde çok fayda sağlamaktadır.

2.7.2.1. Hücresel Protein Profillerine Dayalı Metotlar

Bu yöntemle araştırma yapılacak organizmadaki proteinlerin ayrıştırılmasının yanı sıra moleküler büyüklükleri de ortaya konulabilir. Böylelikle proteinler denatüre (SDS, β -merkaptoetanol içeren) jelde moleküler büyüklüklerine, doğal (Native) jelde ise denatüre edici maddeler kullanılmadığından biyolojik ve enzimatik özelliklerini kaybetmeksizin molekül büyüklüğü, biçimi ve yüküne göre ayrılırlar. Denatüre ortamda gerçekleştirilen elektroforezde genellikle çözünürlüğü daha az olan proteinlerin ayrışması sağlanır. SDS polipeptidlerin ana iskeletini kuşatarak proteinleri denatüre eden ve moleküllere negatif yük kazandıran anyonik bir deterjandır (Temizkan ve Arda, 2004)

Bakteri sınıflandırma çalışmalarında protein profillerinin kullanım olanakları uzun zamandır araştırılmaktadır. Bu konuda ilk çalışmalar toplam protein profillerinin tespitine dayanmaktadır. Daha sonra gerçekleştirilen hücre duvarı protein profillerinin tanımlanması söz konusu çalışmaların yönünü değiştirmiştir. Toplam protein profilleri ve yüzey yapıları dışında kalan proteinlerin, değişik çevresel koşulların etkisi altında üretimi stabil değildir (Gatti ve ark., 1997; Kıran, 2006).

Hücre dışı, hücre duvarı veya tüm hücre proteinlerinin hareketli bir fazda elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre göç ettirilerek ayrıştırılmalarını esas alan SDS-PAGE yöntemi sık olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle çok sayıda suşun hızlı bir şekilde taranması sağlamış ve tür ve/veya alttür seviyesinde güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir (Berber, 2003; Berber ve Berber, 2006; Berber ve Ekin, 2008). Ancak, bazı bakteri türlerinin tür altı düzeyde ayrımında dışsal protein profillerinin daha faydalı olduğu bildirilmektedir (Berber ve ark., 2003). Poliakrilamid jelde elde edilen protein profilleri, bakterinin eksprese ettiği proteinler için parmakizi olarak dikkate alınıp, diğer sınıflandırma şemaları ile kombine edildiğinde bilinmeyen izolatların tanımlanmasında kullanılabilir. Son çalışmalarda elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların protein parmakizi ile DNA-DNA homoloji değerleri arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu göstermiştir (Jackman, 1982; Vandamme, 1996; Akçimen, 2010).

Açık ve ark. (2005), Ankara'daki bir mezbahadan *Campylobacter*, *Staphylococcus* ve *Salmonella* suşlarının izolasyonu için SDS-PAGE tekniği ile elde edilen protein profillerinin cins ayrımında faydalı olduğunu, fakat aynı cinse mensup izolatların ayrımında yeterli olmadığını bildirmektedirler.

Uçan ve ark. (2005), Konya ilindeki mastitis tanısı konmuş ineklerin sütlerinden izole edilen *E. coli* türlerinin plazmit ve protein profillerine göre tiplendirmesini yapmışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar, toplam hücre protein profillerinin daha iyi bir ayrım sağladığını rapor etmişlerdir.

Reddy ve ark. (2012), et örneklerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarının %97'sinde plazmit ve ayrıca suşların toplam hücre protein profillerini SDS-PAGE metoduyla tespit etmişlerdir. Bunların dışında suşların antibiyotik dirençlilikleri de (ampisilin, gentamisin ve siproflaksin) gösterdiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre protein ve plazmit profillerinin tür içi polimorfizm benzerliklerini değerlendirmişler ve SDS-PAGE'in *E. coli* izolatlarının taksonomik ve epidemiyolojik çalışmaları için plazmit ve antibiyotik duyarlılık kriterlerinden daha iyi sonuç verdiğini rapor etmişlerdir.

2.7.2.2. Plazmid Profillerine Dayalı Metodlar

Plazmidler bakteri içerisinde çoğalan küçük, çembersel, ekstrakromozomal, çift zincirli DNA molekülleridir. Plazmidlerin kendilerine ait replikasyon merkezleri vardır

ve endojen hücrel mekanizmalarla kendi kendilerini çoğaltabilirler. Antibiyotik direnci, virulans faktörleri ve kendi genetik özelliklerinin diğer bakterilere aktarımından sorumlu genleri taşırlar. Bakterileri ağır metal tuzlarına, UV'ye ve antibiyotiklere dirençli hale getirirler. Plazmidi içeren *E. coli* suşları dirençli oldukları antimikrobiyal ajanı içeren besi yeri ortamında üreyebilir. Ayrıca, plazmidler vektör olarak kullanılmaktadırlar. Büyük parçalar genellikle kararlı olmadığından dolayı sadece küçük DNA parçaları plazmid vektörlerinde klonlanabilir. Çeşitli *E. coli* suşlarında birçok plazmid tipine rastlanmıştır. Ancak en çok bilinenleri, F, R, Col plazmidleridir. Bu plazmidler, bazı özellikleri paylaşırlar da önemli farklılıklara sahiptirler (Sinden, 1994; Ürün, 2006).

Bakterilerde, karakterleri çok değişik olan doğal plazmidler bulunmaktadır. Taşıdıkları özel genlere dayalı olarak bunları 6 grup altında incelemek mümkündür. F plazmidi (fertilite faktörü, F faktörü, seks faktörü), Direnç plazmidleri (R plazmidleri, R faktörleri), virülens plazmidleri, bakteriyosin plazmidleri, metabolik plazmidler ve büyük plazmidlerdir (Anonim, 2012b).

Bir bakteride bulunan plazmidlerin sayısı, büyüklüğü ve nitelikleri uzun zaman aynı kalır ve yavru hücrelere de aynen aktarılırlar. Bu şekilde aynı bakteriden kaynaklanan kökenlerdeki plazmid şablonunun aynı olmasının epidemiyolojik araştırmalarda önemi vardır. Üretilen bakteri kültürlerinin deterjanlara maruz bırakılmasıyla hücreler eritilir ve DNA'lar açığa çıkar. Lizise uğramış hücre yapıları uzaklaştırıldıktan sonra lizat, agaroz jel elektroforezine tabi tutulunca tüm plazmid DNA'ları büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Özel boyalarla (Etidyum bromid gibi) boyanıp bakıldığında o bakterinin içerdiği plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri özel bir görünüm verir. Plazmid parmakizi adı verilen bu görünümün karşılaştırılmasıyla aynı kökenden kaynaklanan bakteriler saptanabilir ki bunun epidemiyolojik değeri vardır (Bilgehan, 1996).

Kaya (2009), Seyhan Baraj Gölü'nden izole ettiği *Enterobacteriaceae* grubu 88 bakteri suşunun çoklu antibiyotik dirençliliğini belirlemiştir. İzolatların plazmidlerini izole ederek her bakteriye ait plazmid profili belirlemiştir. Plazmid izolasyonunda 40 izolatın (%45,5) plazmid içerdiğini belirlemiştir. Araştırmacı, antibiyotik sayılarının plazmid ile ilişkilerine bakmış ve 7 antibiyotiğe karşı dirençli olan *E. coli* suşunda hiç plazmid DNA bandı gözlememiştir. Tek antibiyotiğe dirençli olan diğer bir *E. coli* suşunda ise toplam 7 plazmid DNA bandı gözlemiştir. Beş farklı antibiyotiğe dirençli olan yine bir diğer *E. coli* suşunda ise 14 plazmid DNA bandı saptamıştır.

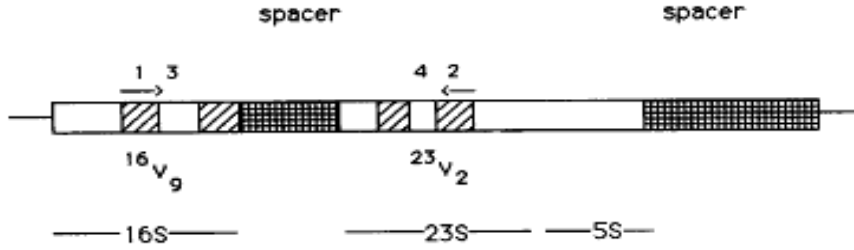
Vural ve Akçin (2011), İzmit Körfezi'ndeki 9 istasyondan aldıkları 23 deniz suyu örneğinden izole ettikleri 8 *E. coli* suşunun antibiyotiklere karşı çoklu dirençlilik özellikleri yönünden incelenmişlerdir. İzole ettikleri *E. coli* suşlarının antibiyotiklere dirençlilikleri tetrasiklin (%50), sulbaktam/ampisilin (%62,5), penisilin (%62,5), gentamisin (%50), amikasin (%12,5), kloramfenikol (%37,5), sefoperozon (%25), kanamisin (%37,5), trimetoprim/sulfametokozal (%62,5) olarak tespit etmişler. Araştırmacılar tarafından yapılan bu çalışma, İzmit Körfezi'ndeki kirlenmenin ve kirlilik indikatörü olan koliform varlığının önemli boyutlara ulaştığını göstermektedir. Buna ek olarak su kaynaklı olan *E. coli* suşlarının en az 2 antibiyotiğe birden çoklu direnç taşıdıklarını belirtmişlerdir.

Karadeniz ve ark. (2012), lağım sularından izole ettikleri 37 *E. coli* suşunun plazmit profillerini çıkarmış ve 300-10.000 bp büyüklüğünde plazmitlerin olduğunu hatta bazı suşlarda 10.000 bp'den daha büyük bantların olduğunu da belirtmişlerdir.

Radu ve ark. (2000), et örneklerinden izole ettikleri 70 *E. coli* O157:H7 izolatının RAPD-DNA modellerini ve plazmit profillerini incelemişlerdir. Elde ettikleri veriler, hem plazmit profilleri hem de RAPD-PCR parmak izi metotlarının *E. coli* O157:H7'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde moleküler tiplendirmesinin yapılabilmesi için uygun araçlar olduğunu vurgulamışlardır. Sonuç olarak, RAPD-PCR yönteminin epidemiyolojik çalışmalar için değerli bir teknik olmasından dolayı izolatların ayırımında çok daha duyarlı bir metot olduğunu önermişlerdir.

2.7.2.3. DNA ve RNA Profillerine Dayalı Metodlar

PCR Ribotyping 16S ve 23S rRNA genlerinin intergenik ara bölgelerindeki (intergenic spacer regions) polimorfizimi belirlemek için kullanılabilir (Kostman ve ark., 1992). rRNA genleri özellikle bakteriler arasında ki genetik polimorfizimi belirlemede faydalı olmuştur. Öbakteriyel transkripsiyon organizasyonu 5'-16S-23S-5S-3' dür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Bir rRNA’da operon organizasyonu (Kostman ve ark., 1992). $^{16}V_9$, 16S rRNA altbirimlerinde 9 değişken bölge. $^{23}V_2$, 23S rRNA altbiriminde 2 değişken bölge. 1 ve 2, PCR’da kullanılan primerler için korunmuş alan. 3 ve 4, türe özgü PCR primerleri için kullanılan muhtemel değişken bölgeler. Oklar PCR primerlerinin yerleri ve yönlerini işaret etmektedir

Bakteri hücresi başına 2-11 rRNA gen kopyası vardır. 16S ve 23S rRNA arasındaki intergenik ara bölgeleri birkaç tRNA kodlar ve gen kümelerinin şifreleme yapmayan bölgelerinde birkaç direkt tekrarlanan sekans içerir. rRNA için birkaç transkripsiyonel birim içeren *E. coli*’de, rRNA’nın iki sınıfı mevcuttur. Bunlardan biri 16S ve 23S rRNA ara bölgelerinde alanin ve izolösin tRNA genlerini, diğeri ise glutamik asit için tRNA genlerini kapsar (Kostman ve ark., 1992).

Fekal materyal, gram başına yaklaşık 10^{12} bakteri içerir. Dışkının bakteri muhtevası yaş ağırlığının yaklaşık %9’unu temsil eder. İnsan dışkısında baskın olan bakterileri tanımlamak için 16S rRNA gen bölgelerini hedefleyen gruba özel primerler kullanılır (Bitton, 2005). Haque ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada PCR Ribotyping tekniğinin, fırsatçı insan patojeni Gram-negatif bakteriler arasında oldukça etkili ve belirleyici ayırım gücüne sahip olduğunu ve çalışmalarında bu tekniğin *E. coli* üzerinde de etkili olduğunu saptamışlardır.

PCR bir nükleik asit hedef dizisinin çoğaltılmasıdır (Saiki ve ark., 1985). PCR kısa zamanda DNA’nın ilgili bölgelerinde parça veya dizilerin üssel olarak çoğaltılmasını ve izolasyonunu sağlamada kullanılan bir tekniktir (Joseph ve ark., 2001). PCR işlemi; DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon, elektroforez ve görüntüleme olmak üzere dört aşamada gerçekleştirilir (Sambrook ve Russell, 2002).

AFLP, bu yöntemde kromozomal DNA önce açık uçla kesen 6-7 bp uzunluğundaki bir Restriksiyon Enzimi (restriction endonuclease: RE) ile kesilir. Daha sonra RE’nin açık ucunu tamamlayıcı olarak tanıyan primerler kullanılarak hedef bağlanma veya bir başka ifade ile kesilme bölgelerinin amplifikasyonunu takiben fragment uzunluklarının analizi yapılır (Köksal, 1999). AFLP, *V. cholerae*,

Xanthomonas spp. ve *E. coli* (Hasan, 2008) gibi bakterilerin suş ve yakın ilişkili türlerinde genetik çeşitliliğin tanımlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır.

REP-PCR, bu yöntemle bakteri ve birçok mantar türünde kromozomun farklı bölgelerinde bulunabilen kısa, tekrarlayan ve korunmuş yapıları hedef alan kısa primerler kullanılır. Bölgelerin birbirlerine yeteri kadar yakın olmalarına bağlı olarak iki ekstragenik bölge arasında kalan kısımlar amplifiye edilir. Amplikonların sayı ve uzunlukları agaroz jel elektroforezi ile belirlenir (Köksal, 1999).

REP-PCR metodu, bakteri kökenlerinin, kodlanmış tekrar dizileri ile hızlı olarak tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu dizilerin boyutları her bakteri suşu için spesifiktir. REP-PCR bazı araştırmacılar tarafından Gram-negatif bakterilerde, yakın akraba ilişkisi gösteren suşlarda uygulanmıştır. Öbakteriyel türlerin ve suşların farklılıklarının tanımlanmasında önemli DNA parmakizi yöntemi oluşturmuştur (Versalovic ve ark. 1991).

PFGE, standart agaroz jel 200 bp ya da muhtemelen 50 kb oranlarındaki nükleik asidi ayırmada kullanılabilir. Aşırı büyük veya tersine çok küçük DNA moleküllerini ayırmak için jel elektroforezin özelleşmiş çeşitlerine ihtiyaç vardır. Poliakrilamid jel boyut olarak sadece tek bir baz çifti farklılığıyla DNA veya RNA parçalarını ayırabilir. Ancak, onların oranları 5-1000 bp'dir. Böyle jeller DNA dizilemede yaygın bir şekilde kullanılabilir. PFGE, 10 kb'dan 10 Mb oranlarındaki çok büyük DNA moleküllerinin, hatta tüm kromozomların analizi için kullanılabilir. Standart elektroforez süresince, DNA molekülleri elektrik sahası ile hizaya girer ve böylece jel ağ örgüsü boyunca yandan ilerler. Sonuç olarak, büyük DNA molekülleri jel matrisinde tuzağa düşer ve güçlkle hareket eder. PFGE'de elektriksel alan, elektrotların altıgensel donanımından kaynaklanan titreşimler (Pulses) meydana getirir. Bu 120°'de kesişen temelde iki alan oluşturur. Büyük moleküller kısa zamanda ilk alana direkt olarak hareket edecektir ve agarozdaki matrise tutunacaktır. Alan değiştiğinde, DNA 120° ile yeniden düzenlenecek ve kısa bir zaman içerisinde direkt olarak hareket edecektir (Clark, 2005).

DGGE, isminde de anlaşıldığı gibi, bu teknik DNA denatürasyonu ve jel elektroforezin kombinasyonudur. Bu teknik PCR ile çok kez çoğaltılmış birkaç baz uzunluğunda ki çift zincirli DNA parçalarına uygulanır. DGGE süresince, çift zincirli DNA zincirleri ayırmak için artan denatürasyonun değişim ölçüsüne bağlıdır. Çift zincirli DNA, eşlenmemiş DNA parçaları boyunca olan "erime etki alanları" (melting domains) olarak bilinen farklı zonların olduğu evrelerde erir. Kısmen erimiş DNA, agaroz ağ örgüsüne yakalandığında daha büyük yapılar içerisinde açılan küçük akımsal

DNA parçaları elektroforez süresince bir agaroz jel boyunca daha yavaş göç eder (Clark, 2005). Uygulamada, denatürasyon ılımlı olarak artan bir karışımdan dolayıdır ama sabit sıcaklıkta (genellikle 50 ve 65°C arasındadır) üre ve formamid karışımı ile kimyasal denatürasyon artar. Formamid eklenmesiyle ürenin konsantrasyon gradyentide oluşturulduğunda jel boydan boya ayarlanmış olur. Kimyasal denatürasyon gradyenti DNA'nın göç etmesini yönlendirmek için dik veya paralel olarak yeniden ayarlanabilir. Paralel DGGE benzersiz konumda bantlar verir ve sonuç olarak bu agaroz jel elektroforezine benzemektedir. Dikey DGGE'de, farklı bir veya birkaç baz çifti karışımından oluşan DNA molekülleri tüm jel katmanları boyunca yüklenir ve bir seri sigmoit bant elde edilir (Clark, 2005).

DGGE mutasyon analizlerinde kullanılır. Buna ek olarak DGGE, gözlemlenen doğal popülasyonlarda genetik çeşitlilik ve ilişki için yaygın bir şekilde kullanılır. Özellikle, DGGE'ye göre toprak veya diğer doğal habitatlardan elde edilen DNA'nın PCR analizi ile canlı mikroorganizma kültürüne ihtiyaç olmaksızın mikrobiyal popülasyonların filogenetik ilişkisi analiz edilmektedir (Clark, 2005).

PCR-RFLP, RE çift iplikçikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan enzimlerdir. Restriksiyon enzimleri DNA'yı 4–6 bp'lik özel tanıma bölgelerinden keserler. Daha sonra ortaya çıkan DNA parçalarının uzunlukları jel elektroforezi yoluyla görüntülenir ve DNA bantlarının yeri ve sayısı karşılaştırılarak elde edilen çeşitliliğe PCR-RFLP adı verilmektedir (Güneş, 2006).

ERIC-PCR dizi tekrarına dayalı DNA amplifikasyonudur. Tekrarlayan (repetitive) sekanslar tüm organizmaların genomlarında bulunur. Prokaryot genomlarında, ökaryotlara kıyasla daha düşük kopya sayıda tekrar sekansı bulunur. Başlangıçta sadece *Enterobacteriaceae* ve *Vibrionaceae* türlerinde olduğu düşünülen REP ve ERIC sekanslarının birçok türde olduğu tespit edilmiştir. Bu sekanslara yönelik primerler Versalovic ve ark. (1991) tarafından kullanılarak bakteri genomlarının parmak izleri gözlenmiştir. ERIC-PCR, DNA'nın izolasyonu, tek bir primer ile amplifikasyon, jel elektroforezi ve görüntüleme olmak üzere dört adımda gerçekleştirilir.

RAPD-PCR metodu, DNA yapısındaki polimorfizmi saptamak amacıyla düşük bağlanma sıcaklığında 9 veya 10 baz uzunluğunda bir veya daha fazla kısa primer kullanarak DNA'daki birden fazla bölgeyi amplifiye etmeye yönelik bir tekniktir (Williams ve ark., 1990). Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp etidyum bromid ile boyanır. Karşılaştırılan örnekler arasında görünen aynı (monomorfik) ve

farklı (polimorfik) DNA bantları sayılarak sonuçlar değerlendirilmektedir. RAPD-PCR, genetik çeşitliliğin araştırılmasında, genom haritalamalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır (Cenis, 1993).

RAPD tekniği *C. jejuni*, *L. monocytogenes* ve *Pseudomonas fragi* gibi mikroorganizmalara uygulanmıştır. *E. coli*'de ise, *E. coli* O157:H7 deki gibi bir tipleme metodu olarak RAPD hakkında birçok rapor yayınlanmıştır (Hasan, 2008). *E. coli*'nin klonal tiplerinin belirlenmesinde kullanılan RAPD yönteminin, RFLP tekniğine göre daha ucuz ve daha hızlı bir teknik olduğu belirlenmiştir (Chansiripornchai ve ark., 2001).

İnsanların normal intestinal mikroflorasındaki *E. coli* suşlarının identifikasyonu için RAPD tiplendirme metodu Nowrouzian ve ark. (2001) tarafından dizayn edilmiştir (Babalola, 2003). Ek olarak bu metot, birbirleriyle yakın türler arasında ki filogenetik ilişkiyi çözme potansiyeline sahip olduğu gibi bir türün içerisindeki suşları da ayırabilir (Williams ve ark., 1990; Babalola, 2003).

Primerlerin, agaroz jelde parmakizi şeklinde gözlenmesi sonucu, lokasyon ve sayıları bakteriyal türlerin farklı suşları arasında çeşitlilik göstermektedir (Olive ve Bean, 1999). Ayrıca, bu metotla ilgili olarak birkaç problem rapor edilmiştir. Özellikle RAPD-PCR metodunun güvenilirliği ve standardizasyonun azlığı ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Primerler özel genetik lokusa karşı yönlenmediği için primer ve hedef alan arasındaki hibridizasyon kusurlu sonuçlanabilir. Böylece, amplifikasyon süreci band patternlerinde farklılığa yol açabilecek annealing sıcaklığındaki küçük değişmelere son derece duyarlıdır. Deneysel olarak oluşturulan her bir primerin optimal reaksiyon şartlarının sağlanması ve reaksiyon içerikleri, metodun standardizasyonunu zor kılan parametrelerdir (Arbeit ve ark., 1993; Gündoğdu, 2006).

Pacheco ve ark. (1997), 47 ETEC suşunun genetik çeşitliliği üzerine yaptıkları çalışmada, RAPD tekniğinin, ETEC suşları arasında, birkaç fenotipik metot kombinasyonunun belirleyemediği tür ve tür altı seviyede çeşitliliği ortaya çıkardığını saptamışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar, RAPD yönteminin, ETEC'in epidemiyolojik çalışmalarda olduğu gibi populasyon genetiği için de faydalı bir aracı temsil ettiğini bildirmişlerdir.

Vogel ve ark. (1999), epidemiyolojik açıdan birbirleriyle ilgisi olmayan 32 *E. coli* izolatının, 29'unun RAPD, 25'inin ribotipleme ve 27'sinin serotip yöntemleriyle ayrıldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, RAPD analizinin tiplendirilmesi yapılan *E. coli* izolatları için en yüksek ayırım kapasitesine sahip olduğunu ve RAPD, ribotipleme

ve serotipleme analizlerinin suş ilişkilerinin değerlendirilmesi için kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Chansiripornchai ve ark. (2001), kuşlara ait patojenik *E. coli*'nin moleküler genetik tiplendirilmesi için RAPD-DNA analizi uygulamışlardır. RAPD tekniğinin oldukça yüksek derecede tekrarlanabilir olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu teknikte iki farklı primer kullanarak yüksek ayırım kapasitesine sahip kararlı bant modelleri elde etmişlerdir. İzole ettikleri 55 *E. coli* suşunun tümünü RAPD tekniğiyle analiz ettikten sonra, kullanılan iki farklı primer ile RAPD tiplerinin 50 grup içerisinde olabileceğini saptamışlar. Bekledikleri gibi, aynı çiftliklerden izole edilen *E. coli* suşları arasında yüksek derecede genetik ilişki olduğunu gözlemiş ve bu sonuçlara göre araştırmacılar, *E. coli* enfeksiyonlarının epidemiyolojik çalışmalarında, RAPD tekniğinin hızlı, düşük maliyetli, basit ve güçlü bir araç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

Fei ve ark. (2003), gelişmekte olan ülkelerdeki küçük çocuklarda ishale neden olan EPEC suşu üzerine yaptıkları bir çalışmada, izole ettikleri 38 EPEC suşunu plazmit profillerini, antibiyotik duyarlılıklarını ve RAPD-PCR analizleri aracılığıyla incelemişler ve kullanılan 8 tip antibiyotiğe karşı, çoklu antibiyotik dirençlilik indeksinin (Multiply Antibiotics Resistance: MAR) çok yüksek olduğunu gözlemişlerdir. 22 izolat (%58) 1,0-30,9 kDa oranında bir veya daha fazla plazmit varlığını tespit etmişlerdir. RAPD-PCR sonuçlarından oluşturdukları dendrogram ile %40 seviyesinde 3 gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak EPEC izolatlarının plazmit profilleri, antibiyotik direnç modelleri ve RAPD-PCR profilleriyle oldukça yüksek çeşitlilik gösterdiğini rapor etmiştir.

Gomes ve ark. (2005), kümes hayvanlarından izole ettikleri 15 *E. coli* serotipini, rastgele oluşturulmuş 8 oligonükleotid primer kullanarak RAPD-PCR tekniği ile karşılaştırmışlardır. *E. coli* serotiplerinin, dendrogram temel alınarak kümele analizlerini oluşturup sonuçta iki temel grup saptamışlardır. Polimorfik ampikonların *E. coli* türleri, buna karşın tekli ampikonların *E. coli* serotipleri için belirleyici olarak hizmet ettiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, RAPD temelli DNA parmak izi analizlerinin moleküler tiplendirme için değerli bir araç olduğunu ve *E. coli* serotiplerinin ayırt edilmesinde hızlı bir vasıta olarak iş gördüğünü bildirmişlerdir.

Sahilah ve ark. (2010), 43 *E. coli* örneğinin genomik DNA'sını izole ettikten sonra shiga toxin 1 (stx1), ERIC-PCR ve RAPD-PCR analizi ile karakterizasyonlarını yapmışlardır. ERIC-PCR *E. coli*'leri ERIC1 ve ERIC2 primerleri ile %80 benzerlik oranında 10 ayrı izolat ve 6 gruba ayırmıştır. Gen 8 ve Gen 9 primerleri ile RAPD-PCR

%80 benzerlik oranıyla sırasıyla 14 ayrı izolat ve 12 grup ve 15 ayrı izolat ve 10 gruba ayırmıştır. Araştırmacılar sonuç olarak, hem ERIC-PCR hem de RAPD-PCR ile incelenen izolatların moleküler tiplendirmesi için bu araçların faydalı olduğunu rapor etmişlerdir.

Alzahrani ve Gherbawy (2011), kaynak sularından izole ettikleri 26 *E. coli* suşunun antimikrobiyal duyarlılıkları ve RAPD analizlerini araştırmışlar. İçerisinde ampisilin (%76,9) ve tetrasiklin (%50)'inde bulunduğu çeşitli antibiyotiklere karşı direnç tespit etmişler ve bunun dışında suşların iki rastgele primer ile yapılan RAPD-PCR analizi sonucunda çeşitli sayıda bant ile farklı DNA parmak izi profilleri oluşturduklarını saptamışlar. Dendrogram sonucuna göre ise, izolatların %40 benzerlik seviyesinde 3 grup ve 26 birey izolata ayrıldıklarını saptamışlardır. Bunun dışında, 26 suştan 15 (%57,74)'inin çoklu antibiyotik direnci gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Tüm bu sonuçlar izolatların benzer antibiyotik dirençliliği göstermiş olmasına rağmen, moleküler düzeyde çeşitlilik gösterdiklerini ortaya koymuştur.

Samuel ve ark. (2011), yayın balığı kültürleri ve onların bulunduğu ortamlardan izole ettikleri *E. coli*'lerin antibiyotik duyarlılıklarını ve genetik çeşitliliklerini çalışmışlardır. İçlerinde ampisilin (%35,3) ve tetrasiklin (%23,5)'inde bulunduğu 6 farklı antibiyotik kullanılarak izolatların dirençlilik seviyelerini belirlemişlerdir. Ayrıca, tek primer ve primer kombinasyonu kullanarak gerçekleştirdikleri RAPD-PCR analizinin *E. coli* izolatlarını 3 ve 5 grup içerisine kümelediğini tespit etmişler ve sonuç olarak, RAPD analizinin, *E. coli* izolatlarının tiplendirilmesi için yeterli ayırım gücüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Moleküler tekniklere dayalı, protein elektroforezi bakterilerin sınıflandırılmasında ve teşhisinde önemli yere sahiptir. Birçok araştırmacı, çeşitli mikroorganizmaların tür ve tür altı düzeyde karakterizasyonunda hücresel proteinlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'ni başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Bunun dışında, plazmid DNA profilleride sınıflandırmada kullanılmaktadır. Bu her iki yöntemin tür altı düzeyde ayırma yetersiz kaldıkları noktalarda PCR'a dayalı metotlar (RAPD gibi) tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, Sinop ili deniz suyu ve bu sularda yetişen midyelerin mikrobiyolojik analizi ve toplanan örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri, plazmid DNA içerikleri ve RAPD-PCR yöntemi kullanılarak üretilen DNA desenlerine göre karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Sinop, Karadeniz kıyı şeridinin kuzeye doğru en çok sivrilerek uzanmış bulunan Boztepe Burnu ve Yarımadası üzerinde kurulmuştur. 41° 12' ve 42° 06' kuzey enlemleri ile 34° 14' ve 35° 26' doğu boylamları arasında yer alır (Şekil 3.1). İlin yüzölçümü 5.862 km² olup il bu yüz ölçümün %0,8'ini kaplar. Şehrin biri kuzeybatısında, biri güneydoğusunda olmak üzere iki limanı vardır. Esas limanı, güneydoğudaki koyda bulunur. Kuzeybatısındaki Aklıman ve Hamsilos Koyu eski devirlerin barınak yerlerindendir. Ortalama yağış miktarı Sinop'ta 679-1.077 mm ve toplam yağışlı gün sayısı 97-128 gün arasındadır. En yüksek sıcaklık 35°C ve en düşük sıcaklık ise - 8,4°C derecedir. Ortalama sıcaklık açısından çok büyük fark yoktur. Sinop'ta, kışın 7°C dolayında olan sıcaklık ortalaması, yazın 20°C'ye yükselir. Yıllık sıcaklık ortalaması merkezde 14°C'dir (Anonim, 2011).

Bu çalışmanın materyalini, Mayıs-2011 ve Ekim-2011 tarihleri arasında Sinop'tan alınan deniz suyu ve midye örnekleri ve bu örneklerden izole edilen 40'ı yerel 1'i referans olmak üzere 41 adet *E. coli* suşu oluşturmaktadır. Araştırma; Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Sinop ili uydu görüntüsü (Google Earth, 2012)

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Arazi çalışmalarında; buzluk (Soğuk zincir çantası), eldiven, deniz suyu örneklerinin toplanması için steril şişe, *M. galloprovincialis* örneklerinin toplanması için özel kepçe kullanıldı. Ayrıca suyun fiziko-kimyasal (sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen ve iletkenlik) değerleri örnekleme esnasında HACH HQd model portatif çok fonksiyonlu ölçüm cihazı ile yapıldı.

Araştırmamızda, Sinop kıyı sularında belirlenen istasyonlardan direkt manuel yöntemlerle alınan örnekler üzerinde çalışıldı. Örnekler, deniz suyu için 10 farklı kıyı istasyonundan Mayıs-2011 ve Ekim-2011 tarihleri arasında, midye için 5 farklı kıyı istasyonundan Haziran-2011 ve Eylül-2011 tarihleri arasında aylık dönemler halinde alındı. Deniz suyu örnekleri yüzeyden direkt olarak 10² mililitrelik steril şişelere konuldu, midyeler ise kıyı kayalıklardan kepçe ve elle toplandı. Örnekler + 4°C'deki buzlukta korunarak, üç saat içinde laboratuara getirildi. Numune alınan istasyonlar Çizelge 3.1-2'de ve istasyonları gösteren bölge haritası Şekil 3.2'de verildi.

Çizelge 3.1. Deniz suyu örneklerinin alındığı istasyonlar

İstasyon lar	Bulunduğu Lokalite
1. İstasyon	DSİ plajı
2. İstasyon	Gelincik plajı
3. İstasyon	İskele
4. İstasyon	Taşocağı
5. İstasyon	Karakum plajı
6. İstasyon	Eski Pazar yeri
7. İstasyon	Dış Liman
8. İstasyon	Bostancılı
9. İstasyon	Turizm otelcilik uygulama oteli plajı
10. İstasyon	Akliman

Çizelge 3.2. Midye örneklerinin alındığı istasyonlar

İstasyon lar	Bulunduğu Lokalite
1. İstasyon	İskele
2. İstasyon	İskele işletme (Sandal durak yeri)
3. İstasyon	Eski Pazar yeri
4. İstasyon	Satıcı (Gazi kalesinden almış)
5. İstasyon	Hamsilos koyu



Şekil 3.2. Örneklemenin yapıldığı istasyonları gösteren harita (Google Earth, 2012) S: Su; M: Midye

3.2. Metod

3.2.1. Midye Örneklerinin Analizi İçin Ön Hazırlık

Analiz için farklı istasyonlardan toplanan ve + 4°C'lik buzlukta bekletilen midye (*M. galloprovincialis*) örnekleri kısa süre içerisinde laboratuara getirildi. Yosun, poliket vb. canlılardan arındırılması için kabuk yüzeyleri basınçlı su altında fırça ile iyice temizlendikten sonra bisturi ile kapama kasları kesilip, kabuklar açıldı ve tüm iç organlar spatula ile tamamen çıkarıldı. İçerikler yaş olarak tartıldıktan sonra, darası alınmış steril erlenmayerlerde 10 g'lık kütleler halinde biriktirildi.

10 g midye içeriği 90 ml steril saf su ile steril karıştırıcıda (Waring, USA) homojenize edilerek 1:9 oranında seyreltilti.

3.2.2. Deniz Suyu ve Midye Örneklerinde Toplam ve Fekal Koliform Tespiti

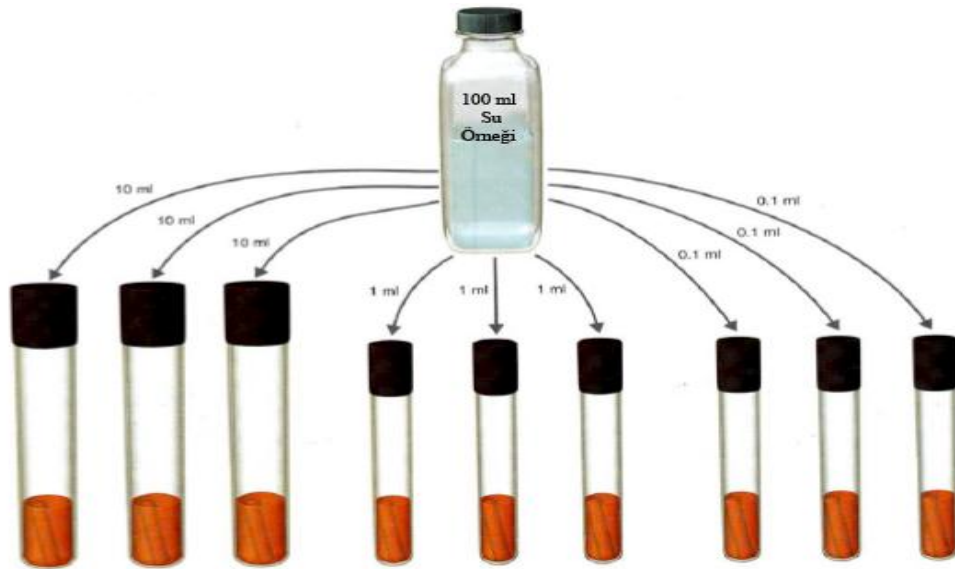
Bu çalışmada yapılan bütün sayımlar En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemine göre 3 paralelli ekim yapılarak gerçekleştirildi. Deniz suyu örnekleri için 3 paralelli tüplere ekim direkt yapılırken, midyeler için önce 10^{-1} seyreltme hazırlandı ve buradan alınan 1 ml ile 10^{-2} seyreltme elde edildi. 10^{-2} seyreltmeden 3'er Laktoz Broth (LB) besi yerine 10, 1 ve 0,1 ml ekim yapıldı. Bu durum, 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} şeklindeki ardışık üç

seyreltmeden 3'er besi yerine 1 ml ekim yapmakla aynı anlama gelmektedir. Uygulamaya geçildiğinde öncelikle toplam koliformların saptanması için bu bakterilerin karbon kaynağı olarak kullanacakları laktozlu besi yeri hazırlanarak çoklu tüp metodu ile ön çalışma gerçekleştirildi.

Steril 10 ml laktozlu buyyon besi yerlerine su ve midye örneklerinden 3 adet 10 ml, 3 adet 1 ml, 3 adet 0,1 ml aşılama yapıldı (Şekil 3.3). Numuneler için 0,1 ve 1 ml tek kuvvet laktoz buyyonu, 10 ml numuneler için ise çift kuvvet laktoz buyyonu hazırlandı. İnokülasyonu gerçekleştirilen numuneler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra asit ve gaz oluşumunu gözlenen tüpler pozitif olarak kabul edildi (Madden ve Gilmour, 1995). Gaz pozitif tüplerden, durham tüplü Brilliant Green Bile Broth (BGBB) besi yerine öze ile aşılama yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gaz pozitif tüpler belirlenip, EMS tablosu kullanılarak örneğin 100 mililitresindeki toplam koliform bakteri sayısı saptandı (Collins ve ark. 1985).

Bunun dışında, LB pozitif tüplerden alınan 0,1 ml örnek BGLBB besi yerine inoküle edildikten sonra 44,5°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüplerde bulanıklılık ve durham tüplerinde gaz oluşumu fekal koliform bakteriler için pozitif kabul edildi. Üç seyreltme serisinden elde edilen pozitif sonuçlu tüpler sayılarak, fekal koliform bakteri sayısının hesaplanmasında kullanılacak olan kod elde edildi.

Asit ve gaz oluşturan pozitif tüpler azaltma tekniğiyle EMB agara ekilip 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Metalik yeşil röfle veren koloniler muhtemel *E. coli* kabul edilerek, teşhis için bazı fenotipik testlere tabii tutuldu.



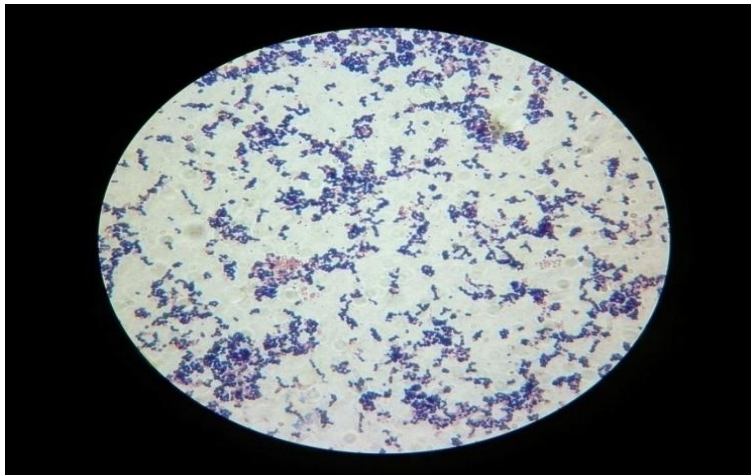
Şekil 3.3. En Muhtemel Sayı (EMS) dilüsyon serilerinin hazırlanışı (Johnson ve Case, 2010)

3.2.3. Toplam Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Toplam bakterilerin sayımı için deniz suyu ve midye numuneleri 10^{-5} oranında steril serum fizyolojik su ile seyreltildi. Seyreltilmiş numunelerden her biri için ikişer petri kabına 1 ml örnek transfer edildi ve üzerlerine 50°C 'ye soğutulmuş 10-15 ml steril Plate Count Agar (PCA) dökülen petri kapları, 888 çizerek dikkatlice karıştırıldı ve 37°C 'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 30-150 koloni olan petriler sayılıp ortalaması alındı ve toplam bakteri sayısı belirlendi. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra, sonuçlar (besi yerinde canlı ama koloni oluşturamayacak bakteriler de olabileceğinden) “CFU (kob)/100 g veya ml” olarak verildi. Her analiz sonrası, kullanılan malzeme otoklav (Tuttnauer- 3850 MLV)’da sterilize edildi (Halkman, 2005).

3.2.4. Deniz Suyu ve Midyelerde Fekal Streptokok Sayısının Belirlenmesi

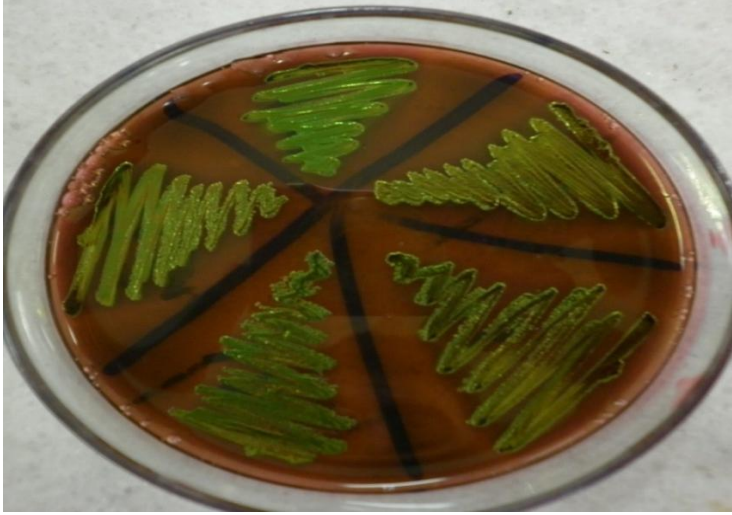
Fekal streptokokları izole etmek için ayrıcıcı besi yeri olan KF Streptococcus Agar (Merck) kullanıldı. Besi yerinin içeriğindeki maltoz ve laktoz, enterokokların çoğu tarafından asit üretilerek metabolize edilir. Böylece enterokokların gelişimi teşvik edilirken, istenmeyen mikroorganizmalar sodyum azid tarafından baskılanır. Asit oluşumu, bromkresol moru renginin sarıya dönüşmesiyle gözlenir. Enterokoklar, TTK (2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorid)'yi formazana indirger ve kırmızı koloniler oluşturur (Anonim, 2012c). KF Streptococcus Agar’da elde edilen kolonilerin tümüne katalaz testi ve Gram boyama (Şekil 3.4) uygulandı.



Şekil 3.4. Fekal streptokok mikroskop (100X) görüntüsü

3.2.5. Deniz Suyu ve Midyelerde Muhtemel *E. coli* Analizi

Escherichia coli analizi fekal koliform bakteri analizinin devamı şeklindedir. Doğrulanmış fekal koliform (+) tüplerden öze ile alınan örnekler, EMB Agar'a çizgi ekim yapıldıktan sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Metalik parlak yeşil, 2-3 mm çaplı koloniler muhtemel *E. coli* (Şekil 3.5) olarak değerlendirildi.



Şekil 3.5. EMB Agar'da gelişen *E. coli* bakterisi

3.2.6. İzolatların Teşhisi

Kesin *E. coli* tanısı konmuş izolatların fenotipik özelliklerini belirlemek için aşağıdaki biyokimyasal testler uygulandı. İzolatların tanısında kullanılan besi yerleri EK-1'de, solüsyon ve boyalar EK-2'de verildi.

3.2.6.1. Laktozdan Gaz Oluşturma Testi

Koliform grup bakterilerin laktozdan gaz oluşturmaları tipik bir reaksiyondur. Buna göre içine durham tüpü atılmış Laktoz Broth (LB) tüplerinde inkübasyondan sonra bulanıklılık ve durham tüplerinde gaz birikiminin olduğu tüpler için laktozdan gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.6.2. Gram Boyama

Temelde morfolojik inceleme için yapılmaktadır. Sıvı besi yerindeki kültürden 1-2 öze dolusu örnek temiz bir lam üzerine aktarıldı ve lamın üzerine ince bir film tabakası halinde yayılması sağlandı. Havada kurutulup alevden bir kaç defa geçirilmek suretiyle tespit edildi. Daha sonra kristal viyole boyası ile 1-2 dk boyanıp önce lügol solüsyonuyla yıkandı daha sonra lügol solüsyonuyla 1 dk beklendikten sonra %95 alkol ile dekolarize işlemi yapıldı ve bazik fuksin boyası ile 15-30 sn boyandıktan sonra kurutuldu ve immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta (Leica-DM 500, Japan) incelendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. *Escherichia coli* bakterisinin mikroskop görüntüsü (100X)

3.2.6.3. Hareket Testi

Bakterilerin besi yerindeki hareketliliklerini saptamak amacıyla, %0,2-0,3 oranında yarı katı olarak hazırlanan SIM besi yeri kullanıldı. Bu besi yerine, incelenecek sıvı bakteri saf kültüründen alınan örnek, iğne özeye batırma kültür şeklinde ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben, inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılmış bulanıklık şeklinde bir üremenin görülmesi bakterinin hareketli, yalnızca inokülasyon hattı boyunca üreme gözlenmesi bakterinin hareketsiz bir bakteri olduğu sonucuna varıldı (Collins ve ark., 1985).

3.2.6.4. Katalaz Testi

Bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Katalaz enzimi hidrojen peroksit'i (H_2O_2), su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalayan enzimdir. Testde, katı besi yeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültür üzerine %3'lük hidrojen peroksit'in damlatılmasını takiben kabarcık oluşturan bakteriler pozitif, kabarcık oluşturmayanlar ise negatif olarak değerlendirildi (MacFaddin, 2000).

3.2.6.5. Oksidaz Testi

Bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen oksidaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Genellikle, Gram-negatif aerobik ve fakültatif anarebik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan önemli bir testtir. Önce tetrametil diamin dihidroksiklorid çözeltisi 2-3 damla filtre kâğıdına emdirildi, katı besi yeri ortamında büyütülmüş 24 saatlik kültürden özeye bir miktar alınıp filtre kâğıdı üzerine sürüldü. Koyu mor bir renk oluşumu gözleniyorsa pozitif sonuç olarak değerlendirildi (MacFaddin, 2000).

3.2.6.6. H_2S Testi

Bu test, mikroorganizmaların, sülfür içeren bazı aminoasitleri (sistin, sistein, metionin, glutation) veya bileşikleri (sülfatları) ayrıştırarak hidrojen sülfür (H_2S) meydana getirebilme durumlarını saptamak için yapılır. Bakterilerin oluşturduğu H_2S , besi yeri bileşimindeki demir ile birleşerek siyah renkli demir sülfüre dönüşür. Çoğu bakterinin identifikasyonunda kullanılan basit bir test olup, ortam olarak Triple Sugar Iron (TSI) Agar besi yeri kullanıldı ve besi yerine yapılan ekimler sonucu rengin siyaha dönüşmediği gözlemlendi. Bu sonuç H_2S negatif olarak değerlendirildi. Ayrıca, bu test için ortam olarak SIM medyumda kullanılabilir yine hareket testi için kullanılan SIM medyumda da bakteri hareket alanı içerisinde siyah renk gözlenmedi bu durum TSI Agar'la elde edilen sonucu desteklemektedir.

3.2.6.7. Üreaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Üreaz hidrolizasyon testi bakterilerin cins ve türlerini tayinde işe yarar. Üreaz besi yerinde üretilen kültür, eğer üreaz enzimine sahipse besi yerinde amonyak oluşturacağından besi yerinde meydana gelen amonyak pH'nın yükselmesine sebep olur. Bu durum ya besi yerine konan indikatörün renginin ortaya çıkmasıyla ya da Nessler ayıracı damlatılarak ortaya konulur.

Dehidre besi yeri ısıtılarak damıtık su içinde eritildi. Membran filtre ile sterilize edilip steril tüplere alındı. Hazırlanmış olan bu besi yeri berrak, portakal renkli ve 25°C'de pH'ı 6,8'dir. Besi yeri bileşimindeki tek karbon kaynağı üre olup üreyi kullanan bu bakterilerin besi yerindeki gelişimleri sonucu amonyak oluşturacak ve ortamın alkali olmasına neden olacaktır. 37°C'de 48 saate kadar süren inkübasyon sonucu besi yerinin orijinal portakal kırmızısı renkten sarıya dönüşmesi üreaz negatif olarak değerlendirildi.

3.2.6.8. DNaz Testi

Test için kullanılan DNaz Agar üzerine bakteri kültürlerinden ekim yapılırken nokta şeklinde üremesi amaçlandı ve 37°C'de 2-4 gün gelişmeye bırakıldıktan sonra, besi yeri üzerine 1 N HCl döküldü. Birkaç dk çalkalandıktan sonra bakteri kolonileri çevresinde şeffaf bir zonun oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.6.9. Nitratın İndirgenmesi

Bu testte *Enterobacteriaceae* familyası genellikle pozitif reaksiyon verir. Üremiş mikroorganizmalardan nitratlı sıvı besi yerlerine ekim yapıldıktan sonra tüpler 37°C'de 1-5 gün inkübasyona bırakıldı. Durham tüpleri içinde gazın oluşumuna dikkat edildi. Tüplere Griess-Ilosvay ayıraçlarından (A+B) 5'er damla koyulup, renk dönüşümü kontrol edildi. Rengin kırmızıya dönmesi nitritin varlığını gösterir. Öte yandan, Durham tüpünde gaz varlığı nitrojen gazı oluşumunu gösterdi.

3.2.6.10. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Bir bakteri hücrelerinde hangi şekerleri fermente edebilen metabolizmanın bulunduğu o bakteri suşu için identik değer taşır. Bu testte temel amaç, incelenecek bakterinin üreyebileceği besi yerinin içeriğine yalnızca denenecek olan karbonhidratın eklenmesi ve bunu takiben fermente olup olmadığının izlenmesinden ibarettir. Bakteri bu şekeri, inkübasyon süresi sonunda fermente edip asit oluşturmuşsa ortamın pH'ı 5,5 sınır değeri altına düşecektir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta besi yeri içerisinde denenecek şekerden başka karbonhidrat bulunmaması gerektiğidir. Böylece bakteri yalnızca ortamda bulunan karbonhidratı kullanmaya zorlanır.

Karbonhidrat fermantasyon deneyinde fruktoz, galaktoz, glukoz, laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz, ksiloz, arabinoz, mannitol, sorbitol, maltoz kullanıldı. Karbonhidrat solusyonları son konsantrasyonu %5 olacak şekilde ilave edildi. Şeker çözeltileri filtreden geçirilerek sterilize edildi. Fenol red (%0,01) indikatör olarak kullanıldı. Hazırlanan besi yerine aktif kültürlerden 0,1 ml oranında aşılandıktan sonra, 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Sonuçta besi yerinde renk değişimi olup olmadığına bakıldı. Besi yeri renginin kırmızıdan sarıya dönmesi pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.6.11. İndol Testi

İndol testi; bakterilerin, bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda, bakterilerin ayırımında kullanılır. İndol, bakterilerde bulunan triptofanaz enzimiyle triptofanın parçalanması ve hidrolize etmesi sonucu oluşan nitrojenli bir bileşiktir ve aldehidlerle reaksiyona girdiğinde, kırmızı renkli bir ürün oluşturur. 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından her tüpe 0,5 ml Kovac's reaktifi dökülerek çalkalandı. Besi yerinin üst kısmında kiraz kırmızı bir halka oluşumu (Şekil 3.7) indol pozitif (+), sarı halka oluşumu indol negatif (-) sonuç verdi (APHA, 1995).

3.2.6.12. Metil Red Testi

Metil kırmızısı testi, besi yerinde bakterilerin glukozu fermente edip organik asit oluşturarak ortamın pH'ını 4,4'ün altına düşürme esasına dayanır. Bu test, bakterilerin cins ve türlerinin ayırt edilmesinde kullanılır. Metil kırmızısı testinde organik asitler

ortamın pH'ını düşürdüğünden pH'daki bu düşüşü belirlemek için kültüre metil kırmızısı indikatörü ilave edildi ve bu indikatör pH 6,2'de sarı, pH 4,2 ve altında ise kırmızı renk verdi. Metil red testi 5 ml sıvı MR-VP besi yeri içeren test tüpüne 18 saatlik aktif kültürün aşılınması ile gerçekleştirildi. 96 saatlik inkübasyon sonucunda besi yerinden alınan bir miktar örnek üzerinde metil red testi yapıldı. Kırmızı renk görülmesi pozitif (Şekil 3.7) olarak değerlendirildi (Halkman, 2005).

3.2.6.13. Voges-Proskauer Testi

Bu test, bakteri türlerini belirlemede kullanılır. Bazı bakteriler, glikozu parçalayarak nötral bir ürün olan aseton (asetil metil karbinol) oluşturur. Aseton, potasyum hidroksid (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol ile reaksiyona girdiğinde kırmızı renk oluşturur. 5 ml MR-VP buyyona incelenecek bakteri kültüründen ekim yapıldı ve atmosferik ortamda, 37°C'de 2-7 gün inkübe edildi. Kültüre 3 damla %40'lık KOH damlatıldıktan sonra 6 damla α -naftol solüsyonu damlatıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve havaya maruz kalmaları için kapakları açılarak 10-15 dk beklendi. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması ise negatif olarak (Şekil 3.7) değerlendirildi.

3.2.6.14. Eijkman Testi

EMS yönteminde de fekal koliform grubu bakterilerin doğrulanmasında kullanılan bu test, genellikle *E. coli*'lerin ayırt edilmesinde tercih edilir. Test için kullanılan besi yeri olan EC Broth, içerisinde durham tüpü bulunan tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtıldı ve 121°C'de 15 dk otoklavda sterilizasyonu sağlandı. İncelenecek bakteri kültürlerinden ekim yapıldı ve 44,5°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplerde bulanıklılık ve durham tüplerinde gaz oluşumu pozitif olarak (Şekil 3.7) değerlendirildi.

3.2.6.15. Sitrat Testi

Bakterilerin karbon kaynağı olarak sitratları, azot kaynağı olarak da amonyum tuzlarını metabolize etme yeteneklerini ortaya koymak için yapılan testtir, aynı zamanda bakterinin cins ve türlerini belirlemek için yapılır. Bakteriler tarafından sitratın

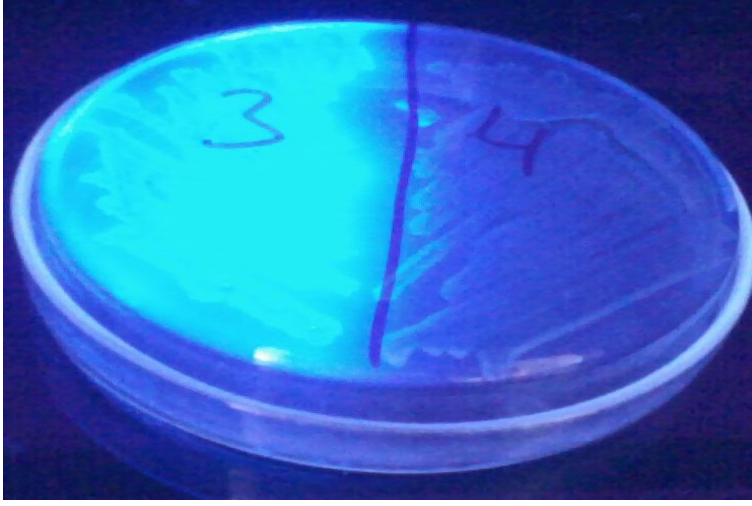
metabolizması, sitrataz veya sitrat demolaz adı verilen enzimleriyle gerçekleşir. Test tüplerinde yatık agar olarak hazırlanmış Simmon's Sitrat Agar besiyeri yerine test edilecek kültürden öze kullanılarak yüzeye aşılama yapıldıktan sonra 37°C'de 48 saat sonunda tüpün renginin incelenmesi ile yapıldı. Besiyeri renginin koyu maviye dönüşmesi pozitif, orijinal yeşil renkte kalması negatif (Şekil 3.7) sonuç olarak değerlendirildi.



Şekil 3.7. *Escherichia coli* için İMVEC test sonuçları görüntüsü, (+) Pozitif, (-) Negatif

3.2.6.16. Fluorocult® *E. coli* O157:H7 Agar Testi

Selektif bir besiyeri olan Fluorocult O157:H7 Agar (Merck), sorbitolün fermentasyon yoluyla kullanımı ve glukuronidaz aktivitesine yönelik ayırma sağlar. Besiyerinde, sodyum deoksikolat Gram-pozitif rekabetçi floranın önemli ölçüde inhibe olmasını sağlar. Sorbitolu fermente etme yeteneğine sahip bakteriler asit oluşumunu nedeniyle sarı koloniler oluştururken, sorbitol negatif olanlar renksiz koloniler oluştururlar. Besiyeri bileşiminde bulunan sodyum tiyosülfat ve amonyum demir (III) sitrat *Proteus mirabilis* gibi hidrojen sülfür oluşturan türlerin kahverengi koloniler oluşturmalarına neden olur. *E. coli* O157:H7'nin *Shigella sonnei* gibi renksiz koloni oluşturan türlerden ayırma ise glukuronidaz aktivitesi ile sağlanır. Besiyeri bileşiminde bulunan MUG, glukuronidaz aktivitesinin florojenik olarak gözlenmesini (Şekil 3.8) sağlar (Anonim, 2006b).

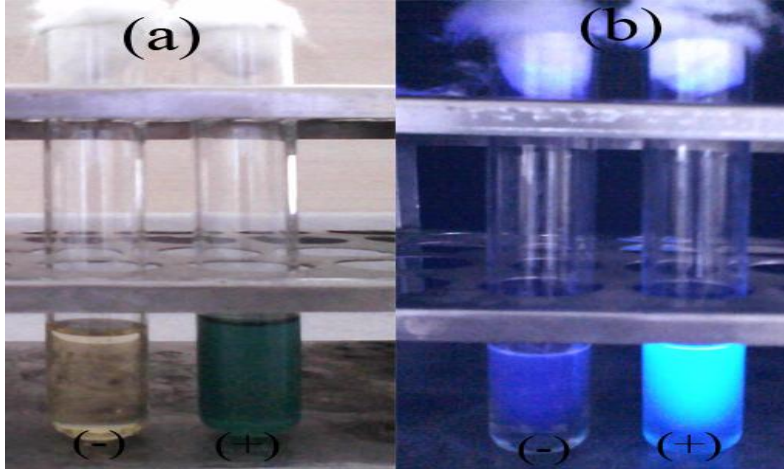


Şekil 3.8. Fluorocult® *E. coli* O157:H7 Agar'da *E. coli* bakterisi

3.2.6.17. Floresans Testi

EPA yönergelerine uygun olan Fluorocult® LMX Broth Modified (Merck) besi yeri, in vitro yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde sularda koliform grup bakteri ve *E. coli* aranması ve sayımı için selektif sıvı besi yeri olarak kullanılır.

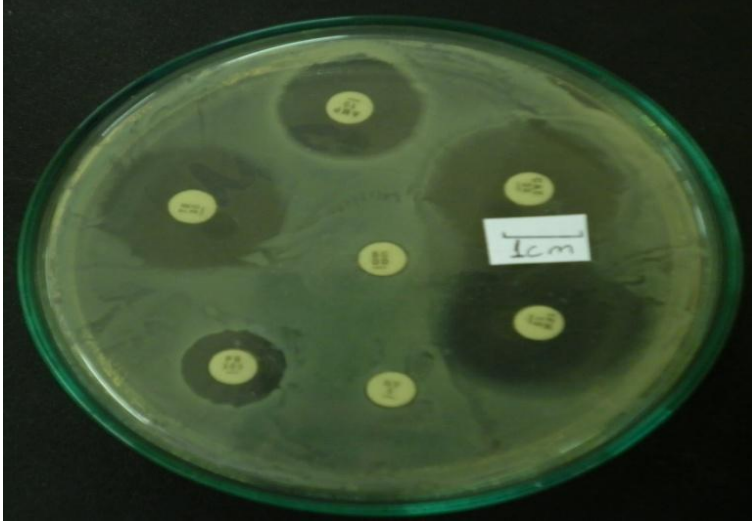
Besi yeri bileşimde bulunan lauril sülfat refakatçi floranın gelişimini baskılamak, besi yeri dâhilindeki fosfat tamponu koliform bakterilerin hızlı gelişimini sağlar. Bu besi yerinin bileşiminde bulunan X-GAL, koliform grup bakteriler tarafından parçalanarak besi yerinin mavi-yeşil renk almasını sağlayan bir kromojenik substrattır. İnkübasyon sonrasında rengi mavi-yeşil olan tüpler, koliform pozitif olarak işaretlenir (Şekil 3.9a) ve sadece bunlar 366 nm uzun dalga boylu UV lamba ile loş bir ortamda kontrol edilir. Floresan ışımaya görülen tüpler *E. coli* olarak işaretlenir (Şekil 3.9b) (Anonim, 2010).



Şekil 3.9. a) Floresans olumlu koliform, b) Floresans olumlu *E. coli*

3.2.6.18. Antibiyogram

Antimikrobiyal denemelerde kullanılacak bakteri kültürlerini hazırlamak için taze kültürlerden 5 ml LB besi yerine aşılama yapılarak 37°C’de 24 saat geliştirildi. Daha sonra gelişen kültürlerden 0,5 McFarland skalası esas alınarak mililitresinde $1-2 \times 10^8$ (CFU/ml) hücre olacak şekilde bakteri stok solüsyonları hazırlandı (Berber ve ark. 2009). İncelenecek mikroorganizmaların McFarland 0,5 skalasına denk gelen süspansiyonlarından LB besi yerine 100 µl aşılama yapıldı ve steril cam baget ile besi yeri yüzeyine yayıldıktan sonra 15-20 dk kurumaya bırakıldı. Daha sonra ampisilin (10 µg), basitrasin (0.04 U), seftazidim (30 µg), imipenem (10 µg), novobiyosin (5 µg), polimiksin B (300 U) ve tetrasiklin (30 µg) diskleri besiyerlerine uygun aralıklar bırakılarak yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri 24 saat 37°C’de geliştirildikten sonra oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımı ile milimetrik olarak ölçüldü. Her bir antibiyotiğin duyarlılık zonları farklı olduğu için değerlendirme tablosuna bakılarak, etkili ve etkisiz olan antibiyotikler belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. *Escherichia coli* antibiyotik duyarlılık testine ait görüntü

3.2.6.19. Elektroforez için Protein Örneklerinin Hazırlanışı

Toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonu için Laemmli (1970)'nin modifiye yöntemi olan ve Berber ve ark. (2003) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. Deniz suyu ve midyelerde izole edilen *E. coli* suşları 24 saat süreyle LB besi yerinde geliştirilerek aktifleştirildi. Gelişen örneklerden 5'er ml LB besi yeri içeren tüplere bir öze dolusu aşılama yapılarak 37°C'de 24 saat geliştirildi. Bu süre sonunda gelişen örneklerden 1,5 ml temiz bir ependorf tüpüne alındı. 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edildi. Süpernatant fazı atılarak pellet üzerine 100 µl serum fizyolojik ilave edilerek 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi sonrası kalan pellet üzerine 20 µl örnek tamponu (sample buffer) ilave edildi. Daha sonra 80°C'de 5 dk kaynatılarak çözünür proteinler ekstrakte edildi. Örnekler elektroforez yapılıncaya kadar - 20°C'de saklandı.

Hücre dışı proteinlerin ekstraksiyonu için Wessel ve Flugge (1984)'nin yöntemi kullanıldı. Gelişen bakteri kültürlerinden uygun miktarda örnek alınıp 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmından 500 µl alınıp 0.45 µm çaplı membran filtreden (Sartorius) geçirilerek steril ependorf tüplerine transfer edildi. Elektroforez işlemine kadar - 70°C'de saklandı. Hücre dışı proteinlerin ekstraksiyonu için süpernatant steril ependorf tüplerine aktararak üzerine 400 µl metanol, 200 µl kloroform ve 300 µl distile su ilave edilip 5 dk 10.700 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra üst faz atılıp 300 µl metanol eklenerek 10.700 rpm'de tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelmiş proteinler oda sıcaklığında kurutuldu. Örneklerin

üzerine 25 µl örnek tamponu ilave edilerek 80°C’de 5 dk kaynamış suda bekletilerek hücre dışı proteinler ekstrakte edildi.

3.2.6.20. SDS-PAGE’in Yapılışı

Bakteri kültürlerinden ekstrakte edilen toplam hücre proteinleri 1 mm kalınlığında (%4’lük toplayıcı ve %10’luk ayırıcı), hücre dışı proteinler ise (%4’lük toplayıcı ve %12’lik ayırıcı) jelde yürütülerek Comassie Brilliant Blue (R-250) ile boyandı (Laemmli, 1970). Yürütme işlemi dikey elektroforez tankında (Hoefer SE400-USA) toplayıcı jel boyunca 20 mA ve ayırıcı jel boyunca 30 mA’lik sabit akım uygulanarak gerçekleştirildi. Daha sonra jellerin boyası alınarak protein bantları görünür hale getirildi. Son olarak jellerin fotoğrafları (HP Scan-jet G2410) çekilerek diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarıldı. Ayrıca, proteinlerin molekül ağırlıkları marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas, SM0661) kullanılarak hesaplandı. Jeller %7’lik Asetik asit solüsyonunda bekletildi. Poliakrilamid jel elektroforezde kullanılan tampon ve çözeltiler EK-3’de verilmiştir.

3.2.6.21. Plazmid Analizi

Plazmid DNA ekstraksiyonu için Sambrook ve ark., (1989)’nın yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. *E. coli* örneklerinden 5 ml LB besi yerine tek koloniden ekim yapıldı ve 37°C’de bir gece etüvde inkübe edildi. 1,5 ml bakteri kültürü bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve 10.000 rpm hızda 1 dk santrifüjlendi. Üst faz atılarak pelet içerisinde bulunan bakteriler 100 µl soğuk çözelti I ile sulandırılıp vortekslendi (Biosan-Bio Vortex V1). Üzerine 200 µl çözelti II eklendikten sonra tüp birkaç defa alt üst edilerek iyice karıştırıldı ve buzda 15 dk bekletildi. Bu işlemi takiben 10.000 rpm’de 7 dk santrifüjlendi ve üst faz steril bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Eşit hacimde fenol:kloroform eklendi ve vortekslendi (Bu işlem plazmid DNA’nın protein kalıntılarından arınması için 2 kez tekrarlandı). 10.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısmı temiz bir eppendorf tüpüne alındı. Süpernatant üzerine iki katı kadar soğuk saf etil alkol ekleyerek buz üzerinde 15 dk bekletildi. Daha sonra 10.000 rpm’de 10 dk santrifüflenerek plazmid DNA’nın çöktürülmesi sağlandı. Pelet üzerindeki alkol tamamen uçurulduktan sonra %70’lik soğuk etil alkol ile yıkandı. Daha sonra alkolün

tamamen uzaklaşması sağlandı ve 50 µl TE tamponu içerisinde çözüldü ve analize kadar - 20°C’de saklandı. Plazmid DNA için kullanılan çözeltiler Ek-4’de verilmiştir.

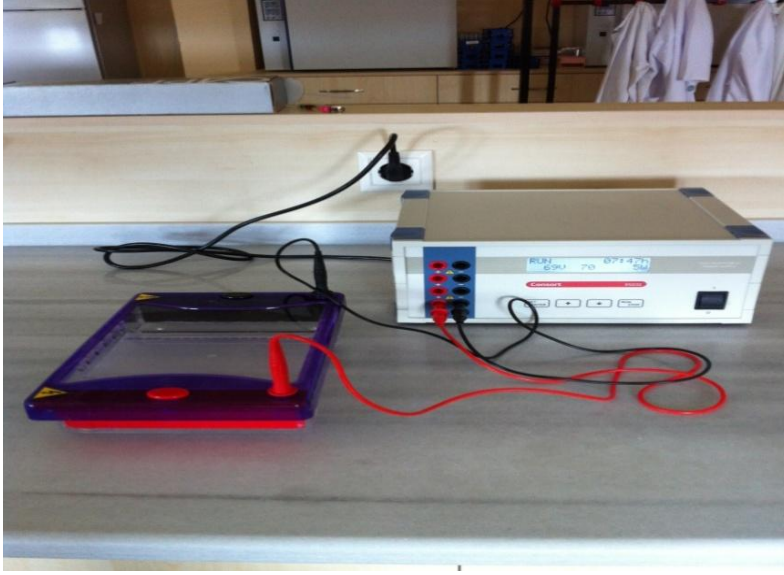
3.2.6.22. Genomik DNA Analizi

Escherichia coli Genomik DNA izolasyonu, Sambrook ve ark., (1989)’nın yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. *E. coli* örneklerinden 5 ml LB besi yerine tek koloniden ekim yapıldı ve 37°C’de bir gece üremeye bırakıldı. Bir gecelik 5 ml bakteri kültürünün 1,5 ml’si mikrosantrifüjde (Hanil Science Industrial, HM 150IV) 10.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pellet 567 µl TE tamponu içerisinde mikropipet yardımıyla çözüldü. Çözelti üzerine 30 µl SDS eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 37°C’de 1 saat bekletildi. Daha sonra 100 µl 5 M NaCl eklenerek karıştırıldı. Bunu takiben 80 µl CTAB/NaCl çözeltisi eklenip karıştırıldı ve 65°C’de 10 dk bekletildi. Üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı (Bu işlem buz üzerinde gerçekleştirildi) ve hemen sonrasında 10.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Bu işlemi takiben üst faz temiz bir santrifüj tüpüne alındı ve eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklenerek karıştırıldı (Bu işlem buz üzerinde gerçekleştirildi) ve 10.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi (Bu aşama DNA örneklerinin protein kalıntılarından kurtulması için 2 kez tekrarlandı). Üst faz dikkatli bir şekilde steril bir eppendorf tüpüne alınarak 0,6 ml izopropanol eklendi. DNA iplikçikler halinde çökünceye kadar tüp yavaş bir şekilde alt üst edilip karıştırıldı. Daha sonra 10.000 rpm’de 15 dk santrifüjleyerek DNA’nın çöktürülmesi sağlandı. Pellet üzerine 50 µl %70’lik etil alkol eklenerek DNA yıkandı ve alkolü uzaklaştırmak için tüp ters çevrilerek alkolün tamamen uçması için ağzı açık oda sıcaklığında birkaç dk bekletildi. Çökelti üzerine 100 µl TE eklendi ve parmakla yavaşça tüpe vurularak DNA’nın çözünmesi sağlandı. İzole edilen DNA örnekleri - 20°C’de saklandı (Sambrook ve ark., 1989). Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tampon ve çözeltiler EK-5’de verilmiştir.

3.2.6.23. Agaroz Jel Elektroforez

İzole edilen plazmid ve genomik DNA sırasıyla %0,7 ve %1’lik agaroz jelde 1X TBE bufferde yürütüldü. 1X TBE solüsyonu, Tris Borat EDTA 5X solüsyonundan hazırlandı. Agar mikrodalga fırında pişirildikten sonra 45°C’ye kadar soğutulup

içerisine 5 µl Etidyum bromid (Sigma) eklenip elektroforez plağına döküldü. Agarın donmasını takiben tarak çıkarılıp, 1X TBE buffer ile temizlenmiş kuyucuklara yükleme tamponu ile muamele edildi. Plazmid ve genomik DNA örnekleri yüklendikten sonra jel elektroforez cihazına (Thermo Scientific-MS1509112955, UK) bağlandı (Şekil 3.11). Daha sonra örnekler yürütme tamponu ile 80 voltluk sabit akımda yaklaşık 2,5-3 saat süre ile yürütüldü. Yürütme işleminin bitiminde jellerin fotoğrafları UV transillüminatör (Cleaver-MicroDOC, UK) altında çekildi ve diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarıldı.



Şekil 3.11. Yatay elektroforez ünitesi ve güç kaynağı

3.2.6.24. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Araştırmada, RAPD-PCR analizinde kullanılan 2 adet primer Iontek firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ve primerler ile ilgili bazı bilgiler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerlere ait bilgiler

	Primerler	Primer dizisi (5' ... 3')	%GC oranı	Tm sıcaklıkları (°C)
1	COL_1 (Iontek-İstanbul)	AAG AGC CCG T	60.0	32.0
2	RBM_6 (Iontek-İstanbul)	TTC GAG CCA G	60.0	32.0

Primerlerin bağlanması aşamasındaki Tm değerinin hesaplanmasında kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$\text{Bağlanma Sıcaklığı } T_m (^{\circ}\text{C}) = [(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4^{\circ}\text{C}]$$

PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. *Escherichia coli* için PCR reaksiyon karışımı

PCR bileşenleri	Hacim (μl)
Distile su	36,75 μl
MgCl ₂ (25 mM)	3 μl
10X PCR tamponu	5 μl
dNTP mix (10 mM)	1 μl
Primer (100 pmol/μl)	1 μl
Taq DNA polimeraz (5 U/μl)	0,25 μl
PZR karışımının toplam hacmi	47 μl
<i>E. coli</i> DNA’sı	3 μl
Toplam hacim	50 μl

Reaksiyonlar toplam 3 μl DNA + 47 μl PCR karışımı olacak şekilde 50 μl hacimde 0,2’lik PCR tüplerinde yapıldı. PCR uygulamaları Techne TC-5000 (California-USA) marka cihazda yürütüldü. Cihazın kapak sıcaklığı 105°C olacak şekilde PCR programı ayarlandı. Bu uygulamanın amacı PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemektir.

Amplifikasyonda kullanılan reaksiyon koşulları; 94°C’de 3 dk, 32°C’de 1 dk, 72°C’de 1 dk 1 döngü koşuluyla ön denatürasyon uygulandı. Bunu takiben 3 aşamada gerçekleşen PCR programında reaksiyonlar, denatürasyon aşamasında sıcaklık 94°C’de 30 sn, annealing aşamasında 32°C’de 30 sn ve sentez aşamasında ise 72°C’de 30 sn olmak üzere toplam 30 döngü uygulandı. Son olarak tüpler 72°C’de 5 dk sentez aşamasına bırakıldı ve örnek sıcaklıklarının + 10°C’ye gelmesi beklenerek PCR işlemi sonlandırıldı. Çizelge 3.5’de uygulanan PCR programı verilmiştir.

Çizelge 3.5. *Escherichia coli* genomik DNA amplifikasyonunda kullanılan PCR koşulları

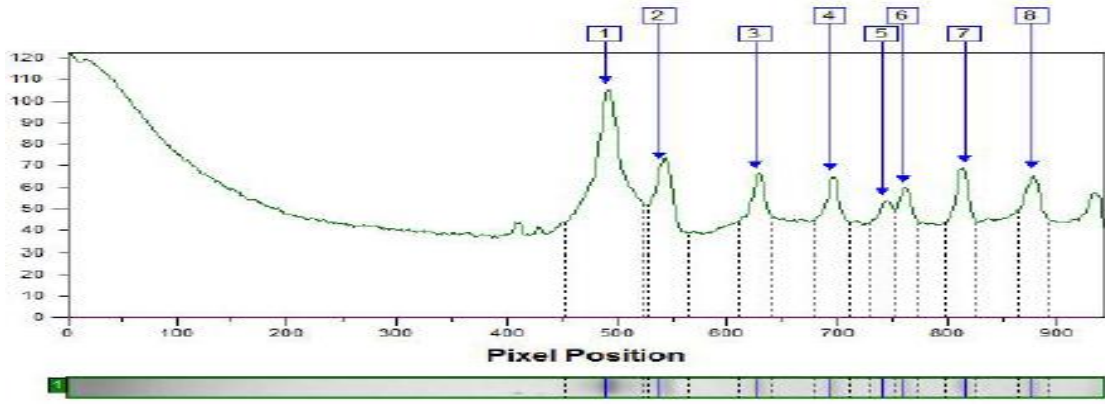
Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
	94	3 dk	1
İlk Denatürasyon	32	1 dk	1
	72	1 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	
Primer Bağlanması (Annealing)	32	30 sn	30
Zincir Uzaması (Extension)	72	30 sn	
Son Uzama (Extension)	72	5 dk	-
Bekleme	10	∞	∞

Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örnekler elektroforez işlemleri yapılınca kadar + 4°C’de bekletildi.

3.2.6.25. İstatistiksel Analiz

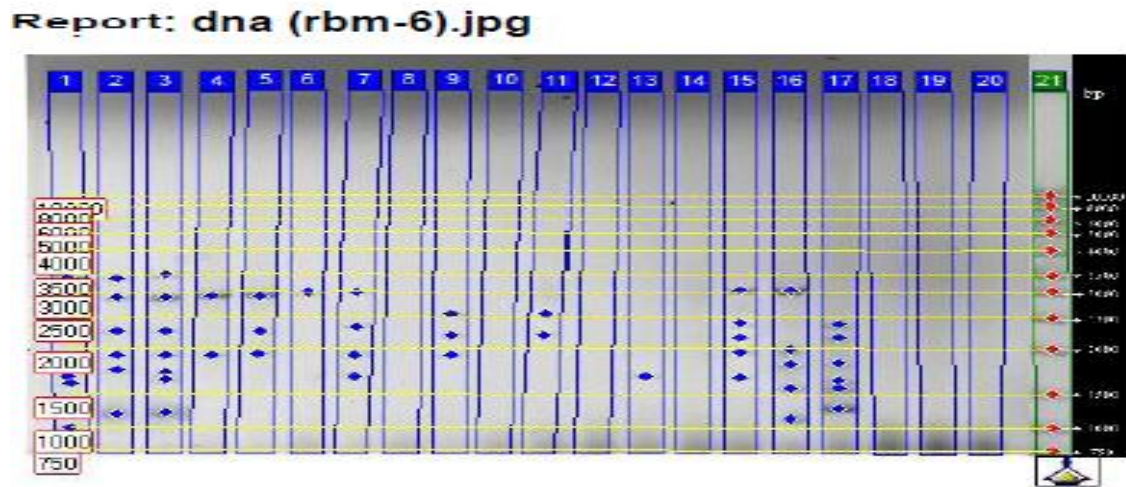
Farklı istasyonlardan alınan deniz suyu ve midye örneklerinden yapılan mikrobiyolojik sayım sonuçları arasındaki farklılıklar PASW Statistics 18 (IBM SPSS Inc.) programı kullanılarak Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way Analyses of Variance, ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Varyans analizi sonucunda önemli olan veriler Post-Hoc Tukey HSD testine göre $p<0.05$ düzeyinde test edildi.

Protein profillerinin istatistiksel analizinde; jeller, yüksek çözünürlükte bir tarayıcı (HP Scanjet, G2410) kullanılarak taranıp bilgisayar ortamına aktarıldı. Ayrıca, plazmid ve RAPD’e ait jellerin fotoğrafları UV transillüminatör (Cleaver-MicroDOC, UK) altında çekildi ve diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarıldı. Her bir bandın molekül ağırlığı Total Lab 1D Manual R11.1, UK programı kullanılarak hesaplandı. Jel görüntüleri programa yüklendikten sonra bandlar piksel pozisyonlarına göre belirlendi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Phoretix 1D programında, piksel pozisyonuna göre band belirleme profilleri

Bunu takiben, bandlar işaretlendi ve moleküler ağırlıkları marker'a göre belirlendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Phoretix 1D programında, manuel band ve moleküler ağırlık belirleme profilleri

Kümeleme analizi için veriler Phoretix 1D-Pro (Totalab, UK) programı kullanılarak Jaccard'ın benzerlik katsayısı temeline dayanan unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendrogramlar oluşturuldu.

4. BULGULAR

Sinop ili kıyı suları ve bu sularda gelişen midyelerin mikrobiyolojik analizi ve alınan örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarının moleküler karakterizasyonunu amaçlayan bu çalışmada elde edilen bulgular; mikrobiyolojik kirlilik indikatörlerinin belirlenmesi, *E. coli* izolasyonu ve izole edilen suşların moleküler karakterizasyonunu kapsamaktadır.

4.1.1. Deniz Suyunun Fiziko-kimyasal Analizine Ait Bulgular

Bu çalışmada deniz suyu örneklerinin fiziko-kimyasal özellikleri incelendi. İncelemelerde pH değerinin, 6. istasyonda her ay giderek arttığı ve bunun dışında Ekim ayında tüm istasyonlarda sınır değerlerini (7,5-8,5) aştığı belirlendi (Çizelge 4.1). Ayrıca, deniz suyu sıcaklığının mevsim normallerinde olduğu tespit edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre pH değerleri

İstasyonlar	pH					
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim
1	8,34	8,91	8,43	8,43	8,46	9,62
2	8,59	8,09	8,24	7,68	8,53	9,71
3	8,43	8,95	8,65	8,29	8,56	9,68
4	8,76	8,88	9,05	8,28	8,64	9,74
5	8,61	8,95	9,18	8,49	8,39	9,64
6	8,48	9,3	9,6	9,63	9,64	9,66
7	8,48	9,11	8,61	8,73	8,71	9,69
8	8,49	9,30	8,86	8,91	8,63	9,03
9	8,51	9,20	9,07	9,26	9,23	9,08
10	8,49	9,19	8,93	9,18	9,01	9,09

Çizelge 4.2. Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre sıcaklık değerleri

İstasyonlar	Sıcaklık (°C)					
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim
1	14,7	22,6	26	27,5	26,2	18,2
2	12,4	20,9	24,9	28,8	25,6	18,2
3	10,2	20,6	25,4	27,8	25,4	18,8
4	12,8	21,5	27,3	28,3	26	18,1
5	12,3	23,1	27	28,2	26,3	18,5
6	13,8	21	29,1	31,1	29,3	18,7
7	13	22,8	26,8	28,6	26,1	17
8	13,3	22,3	26,4	29,8	23,2	17,1
9	13,6	22	28,9	29,4	25,4	17,5
10	13,1	22,4	28	28,7	24,4	17,4

Yapılan incelemeler, iletkenlik değerinin genelde Mayıs ayından Ekim ayına doğru giderek arttığını göstermektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre iletkenlik değerleri

İstasyonlar	İletkenlik (μs/cm)					
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim
1	27,4	27,4	28,3	28,9	28,6	29,6
2	27,5	26,9	28,2	28,3	29,1	29,5
3	27	27,2	28,2	28,8	28,0	29,7
4	27,1	26,9	27,7	29,1	27,7	26,4
5	27,1	27,1	28,2	28,6	28,3	29,4
6	26,6	26,4	28,4	27,7	28,5	29,5
7	25	27	28,1	28,1	26,4	29
8	26,3	27,6	28,5	29,0	28,6	29,8
9	27,1	27,8	28,7	28,4	29,2	29,9
10	27,4	27,6	28,6	29,1	28,8	29,8

Çözünmüş oksijen değerinin; 3, 5, 4 ve 9 numaralı istasyonlarda yüksek, buna karşın 6. istasyonda düşük değerlerde bulunduğu belirlendi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Araştırmada belirlenen istasyonların aylara göre çözünmüş oksijen değerleri

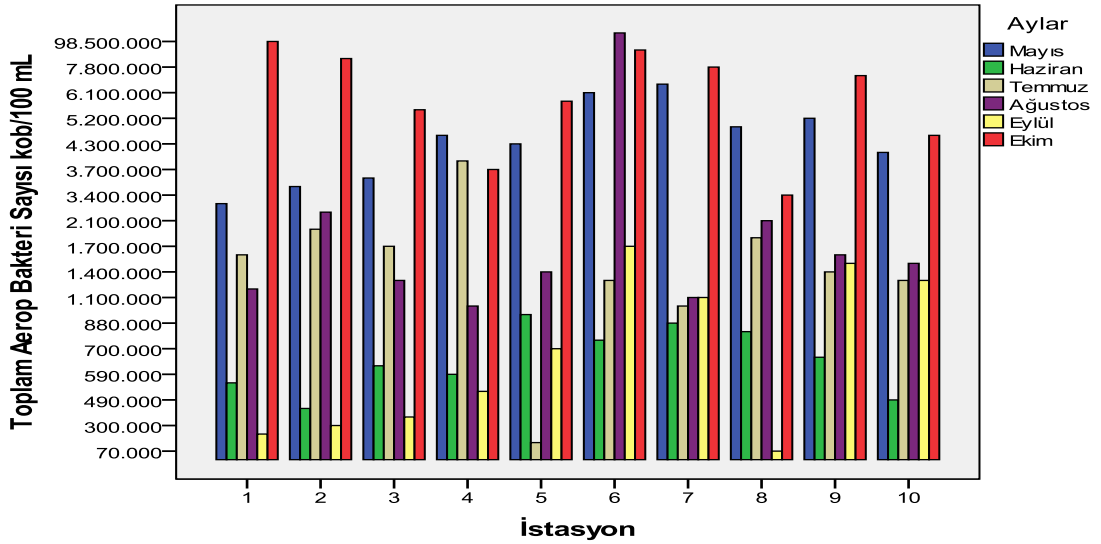
İstasyonlar	Çözünmüş O ₂ (mg/l)					
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim
1	8,74	8,05	7,33	6,99	6,99	8,36
2	12,47	9,61	8,91	7,30	8,16	8,11
3	10,06	8,51	8,89	7,05	7,12	8,24
4	14,41	10,64	17,35	7,58	11,08	8,99
5	12,90	8,49	10,51	8,46	10,48	9,20
6	5,06	3,09	6,32	5,44	4,71	5,01
7	9,40	6,99	6,93	7,09	7,34	4,64
8	9,72	8,01	7,63	9,21	7,91	9,34
9	9,59	11,42	10,56	8,26	11,03	8,95
10	10,57	8,73	8,77	8,27	8,15	8,96

4.1.2. Deniz Suyu Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Bulguları

Deniz suyu analizinde toplam aerob bakteri sayısının, tüm istasyonlar içerisinde genelde 6. istasyonda en yüksek değerlere ulaştığı saptandı (Şekil 4.1). En yüksek değer $1,07 \times 10^8$ kob/100 ml ile istasyon 6'ya (Ağustos), en düşük değer ise $7,0 \times 10^4$ kob/100 ml ile 8. istasyona (Eylül) aittir (Çizelge 4.5). Farklı istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin mikrobiyolojik analizleri; her bir istasyon için beklenen toplam aerob bakteri sayıları arasındaki farkın ($p>0,05$) önemli olmadığını ortaya koydu.

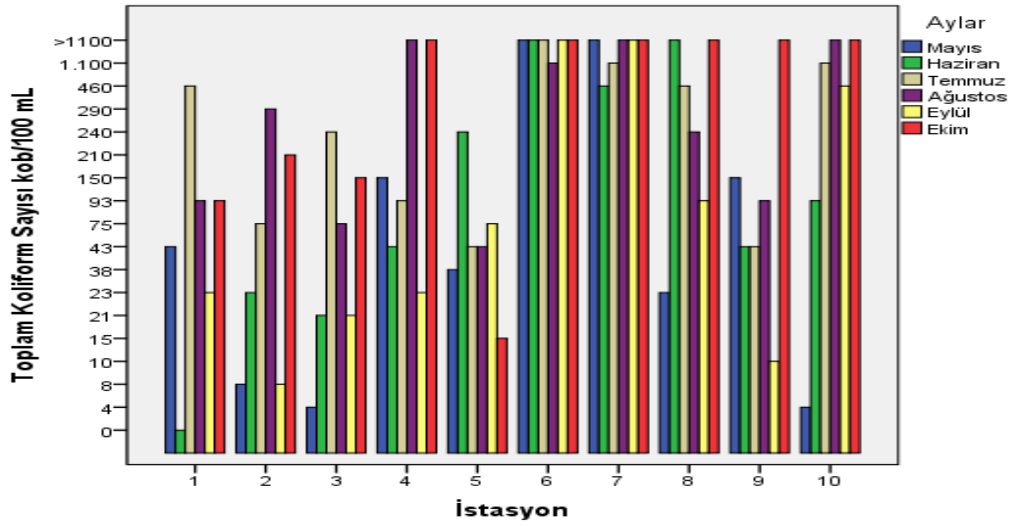
Çizelge 4.5. İncelenen deniz suyu örneklerindeki toplam aerob bakteri sayıları (kob/100 ml)

İstasyonlar	Toplam Aerob Bakteri Sayısı (kob/100 ml)					
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim
1	$3,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$9,85 \times 10^7$
2	$3,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$8,7 \times 10^6$
3	$3,6 \times 10^6$	$6,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^6$
4	$4,5 \times 10^6$	$5,9 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$
5	$4,3 \times 10^6$	$9,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$	$5,8 \times 10^6$
6	$6,1 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$1,07 \times 10^8$	$1,7 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$
7	$6,4 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$
8	$5,1 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$7,0 \times 10^4$	$3,4 \times 10^6$
9	$5,2 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
10	$4,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$



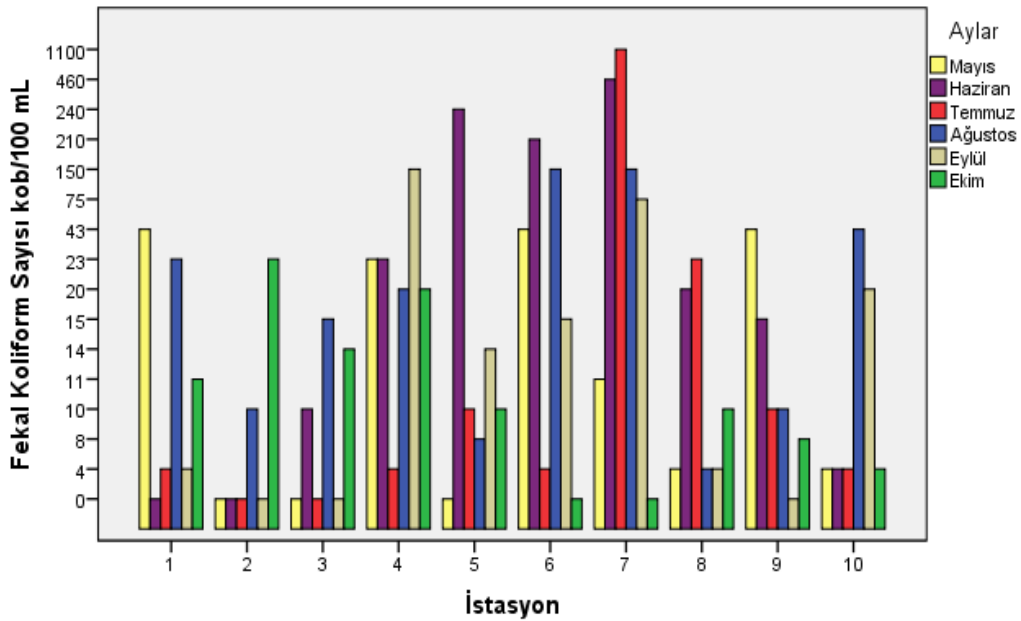
Şekil 4.1. Deniz suyu örneklerinin içerdiği toplam aerob bakteri sayıları

Farklı istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin içerdiği toplam koliform bakteri sayısının, tüm istasyonlar içerisinde genelde 6. istasyonda (Ağustos hariç) en yüksek değerlere ulaştığı saptandı. İstasyonlar için en yüksek değer EMS tablosuna göre $>1,100$ kob/100 ml olduğu bulundu (Şekil 4.2). En düşük değer ise hiçbir koliform bakteri tespiti yapılamayan 1. istasyonda (Haziran) tespit edildi. Ayrıca, farklı istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin mikrobiyolojik analizlerinde; her bir istasyon için toplam koliform sayıları arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğu bulundu ve bu durum Post-Hoc Tukey HSD testi ile doğrulandı.



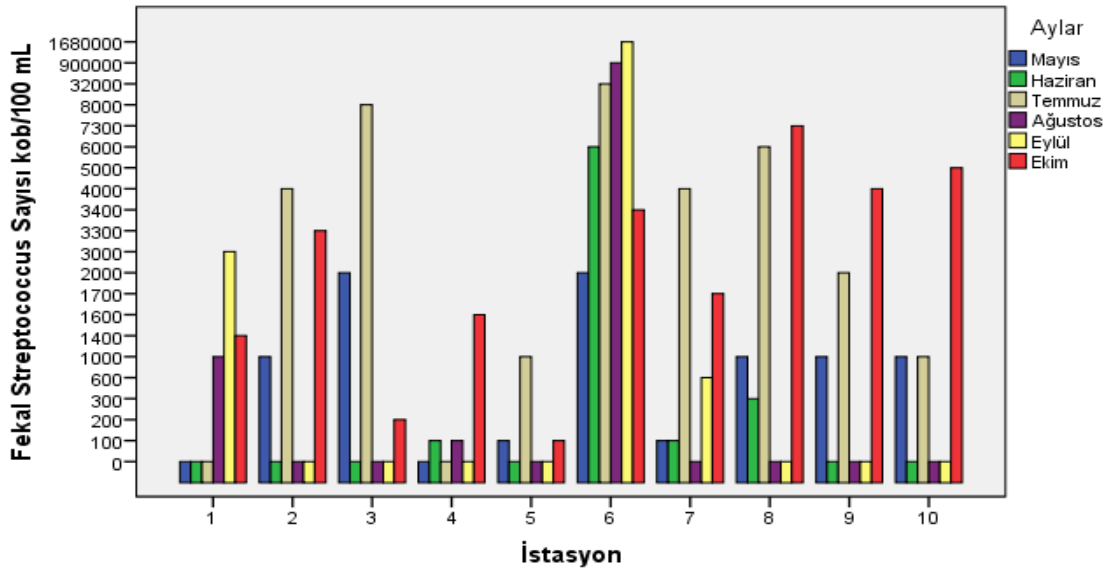
Şekil 4.2. Deniz suyu örneklerinin içerdiği toplam koliform sayılarının aylara göre değişimi

Deniz suyu örneklerinin analizinde, fekal koliform bakteri sayısının 7. istasyonda (Mayıs, Eylül, Ekim hariç) en yüksek değerlere ulaştığı saptandı (Şekil 4.3). İstasyonlar için en yüksek değer EMS tablosuna göre 1,100 kob/100 ml ile istasyon 7'ye (Temmuz) aittir, en düşük değeri ise bazı aylarda hiçbir koliform bakteri tespiti yapılamayan istasyon 1, 2, 3, 5, 6, 7 ve 9' a aittir. Ayrıca, farklı istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin mikrobiyolojik analizleri; her bir istasyon için fekal koliform sayıları arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğunu gösterdi ve bu bulgu Post-Hoc Tukey HSD testi ile doğrulandı.



Şekil 4.3. Deniz suyu örneklerinin içerdiği fekal koliform sayılarının aylara göre değişimi

Deniz suyu örnekleri için fekal streptokok sayısının, tüm istasyonlar içerisinde 6. istasyonda (Ekim ayı hariç) en yüksek değerlere ulaştığı saptandı (Şekil 4.4). En yüksek değer $1,68 \times 10^6$ kob/100 ml ile 6. istasyonda (Eylül), en düşük değer ise diğer istasyonların bazı aylarında 0 kob/100 ml olarak bulundu. Farklı istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin mikrobiyolojik analizleri; her bir istasyon için fekal Streptokok sayıları arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğunu ortaya koydu ve bu veriler Post-Hoc Tukey HSD testi ile doğrulandı.



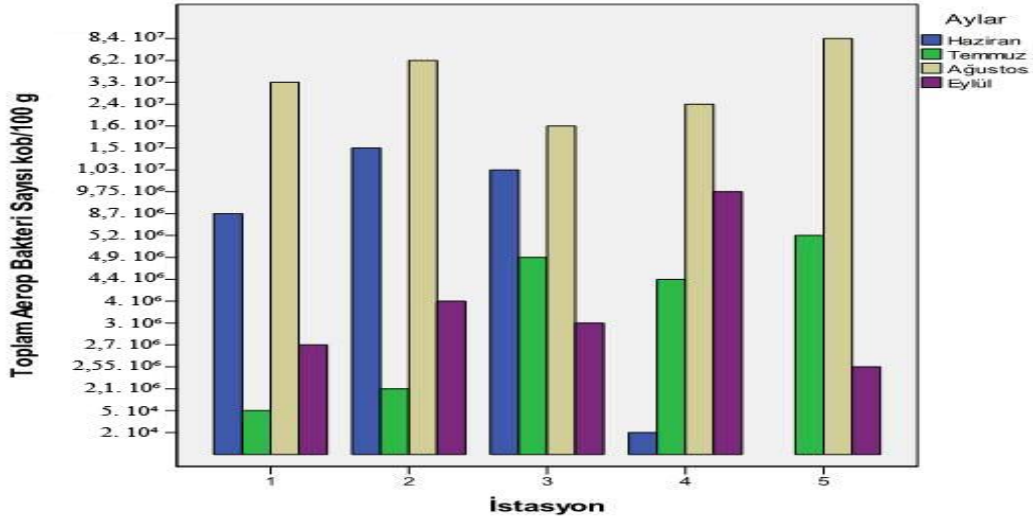
Şekil 4.4. Deniz suyu örneklerinin içerdiği fekal streptokok sayılarının aylara göre değişimi

İstasyon 6 için belirlenen toplam aerop, fekal streptokok ve toplam koliform bakteri sayılarının genelde yüksek olduğu saptandı. Fekal koliform bakteri sayısının ise istasyon 7’de en yüksek değere ulaştığı belirlendi. Tüm istasyonlar içerisinde istasyon 4 için belirlenen fekal koliform bakteri sayılarının fekal streptokoklardan fazla olduğu bulundu. İstasyon 6 dışında diğer istasyonlarda fekal koliform ve fekal streptokok sayıları arasında ters orantı olduğu belirlendi.

4.2. Midye Örneklerinin Mikrobiyolojik Analiz Bulguları

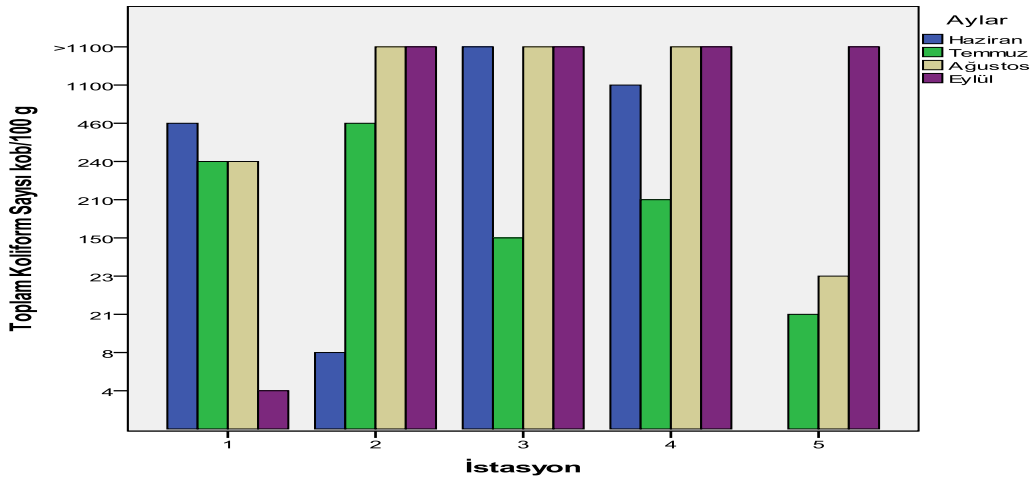
Midye örneklerinde belirlenen toplam aerop bakteri sayısının, tüm istasyonlar için Ağustos ayında en yüksek değerlere ulaştığı görüldü (Şekil 4.5). En yüksek değer $8,4 \times 10^7$ kob/100 g ile 5. istasyonda (Ağustos), en düşük değer ise $2,0 \times 10^4$ kob/100 g ile 4. istasyonda (Haziran) saptandı. Yapılan istatistiksel analizler, midye örneklerinin

içerdiği toplam aerob bakteri sayıları arasındaki farkın her bir istasyon için önemli olmadığını ($p>0,05$) ortaya koydu.



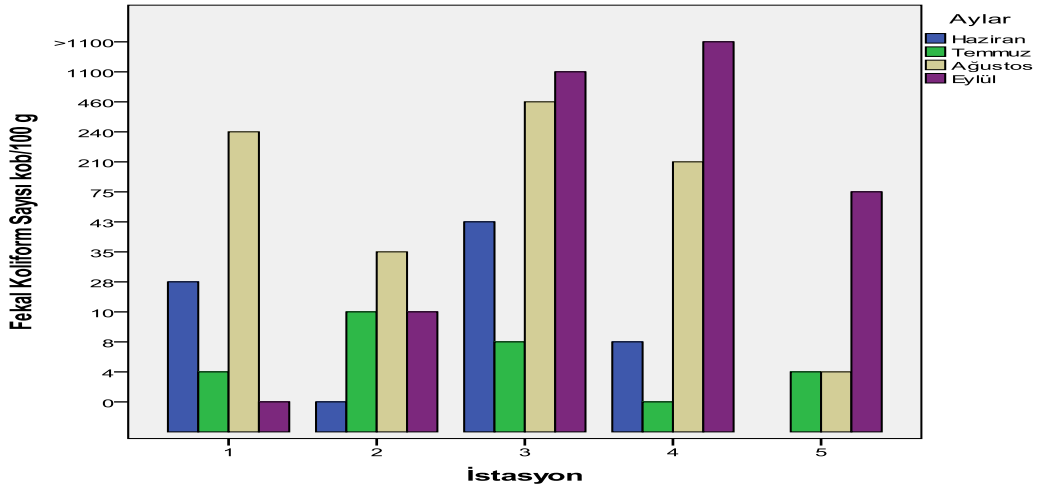
Şekil 4.5. Midye örneklerinin toplam aerob bakteri sayılarının aylara göre değişimi

Farklı istasyonlardan toplanan midye örnekleri için belirlenen toplam koliform bakteri sayılarının, sırasıyla; istasyon 1 dışında diğer istasyonlarda Eylül ayında, istasyon 1 ve 5 dışında da Ağustos ayında en yüksek değerlere ulaştığı tespit edildi. İstasyonlar için en yüksek değer EMS tablosuna göre $>1,100$ kob/100 g olarak saptandı, en düşük değer ise 4 kob/100 g koliform bakteri tespiti yapılan istasyon 1’de (Eylül) sayıldı (Şekil 4.6). Ayrıca, yapılan istatistiksel analizler, midye örneklerinin içerdiği toplam koliform bakteri sayıları arasındaki farkın her bir istasyon için önemli olmadığını ($p>0,05$) gösterdi.



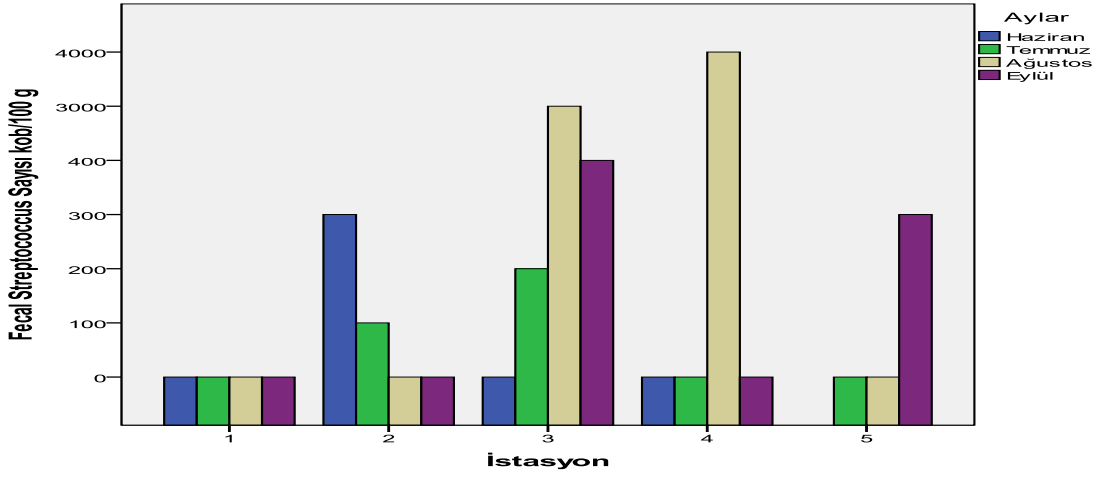
Şekil 4.6. Midye örneklerinin toplam koliform bakteri sayılarının aylara göre değişimi

Farklı istasyonlardan alınan midye örnekleri için belirlenen fekal koliform bakteri sayılarının, 3. ve 4. istasyonlarda en yüksek değerlere ulaştığı saptandı. İstasyonlar için belirlenen en yüksek değer EMS tablosuna göre $>1,100$ kob/100 g ile istasyon 4'de (Eylül), en düşük değer ise bazı aylarda hiçbir koliform bakteri tespiti yapılamayan 1. 2. ve 4. istasyonlarda belirlendi (Şekil 4.7). Yapılan istatistiksel analizler, midye örneklerinin içerdiği fekal koliform bakteri sayıları arasındaki farkın her bir istasyon için önemli olmadığını ($p>0,05$) gösterdi.



Şekil 4.7. Midye örneklerinin fekal koliform bakteri sayılarının aylara göre değişimi

Seçilen istasyonlardan alınan midye örnekleri için belirlenen fekal Streptokok sayılarının, tüm istasyonlar içerisinde 3. ve 4. istasyonlarda Ağustos ayında en yüksek değerlere ulaştığı saptandı. En yüksek değer $4,0 \times 10^4$ kob/100 g ile 4. istasyonda (Ağustos), en düşük değer ise bazı aylarda hiçbir koliform bakteri tespiti yapılamayan tüm istasyonlarda tespit edildi (Şekil 4.8). Yapılan istatistiksel analizler, midye örneklerinin içerdiği fekal Streptokok sayıları arasındaki farkın her bir istasyon için anlamsız olduğunu ($p>0,05$) gösterdi.



Şekil 4.8. Midye örneklerinin fekal streptokok bakteri sayılarının aylara göre değişimi

Yapılan bakteriyel sayım sonuçlarına göre, 4. istasyon için belirlenen sayısal değerlerin diğer istasyonlara nazaran daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca ay bazında bakıldığında, tüm sayımlar göz önünde bulundurulduğunda genelde en yüksek rakamsal değerler Ağustos ve Eylül ayında elde edildi.

4.3. *Escherichia coli* İzolasyonu ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Bu çalışmada, 34'ü su ve 6'sı midyeden izole edilen 40 adet *E. coli* suşu ve bir referans suşun biyotiplendirmesi, antibiyotik dirençlilikleri, hücre dışı ve toplam hücre protein profilleri, plazmid içerikleri ve seçilen bazı suşlara ait RAPD-PCR tekniği uygulayarak elde edilen DNA desenlerinin analizleri gerçekleştirildi. Suşların izole edildikleri istasyon ve aylara göre sembolik gösterimi Çizelge 4.6'da verildi.

4.3.1. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Araştırmada, biri referans, 34'ü su ve 6'sı midyeden izole edilen 41 adet *E. coli* suşunun fenotipik özelliklerini belirlemek amacıyla çeşitli biyokimyasal testler yapıldı. İzolatlara ait biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.7'de verildi. Çizelge 4.7 incelendiğinde izolatların hepsinin Gram-negatif, çomak şeklinde, hareketli, sporsuz, ve fakültatif anerobik oldukları belirlendi. Yapılan karbonhidrat fermantasyon testlerine göre (Çizelge 4.8), bütün suşların glukoz, laktoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, trehaloz, sorbitol, mannoz, arabinoz, ksiloz ve mannitolü kullanabildiği, buna karşın bazı suşların sükrozu kullanamadıkları tespit edildi. Diğer taraftan, izolatların tümünün H₂S negatif

oldukları saptandı. Ayrıca bütün suşların LB besi ortamında gaz oluşturdıkları da bulundu.

Çizelge 4.6. İzolasyonu gerçekleştirilen *E. coli* suşlarının sembolik gösterimi

Ay	İstasyon	Sembol	Numara
Mayıs	1. İstasyon	1S1	1
Mayıs	10. İstasyon	1S10	2
Haziran	5. İstasyon	2S5	3
Haziran	7. İstasyon	2S7	4
Haziran	8. İstasyon	2S8	5
Haziran	9. İstasyon	2S9	6
Temmuz	1. İstasyon	3S1	7
Temmuz	4. İstasyon	3S4	8
Temmuz	5. İstasyon	3S5	9
Temmuz	7. İstasyon	3S7	10
Temmuz	8. İstasyon	3S8	11
Temmuz	9. İstasyon	3S9	12
Ağustos	1. İstasyon	4S1	13
Ağustos	2. İstasyon	4S2	14
Ağustos	4. İstasyon	4S4	15
Ağustos	6. İstasyon	4S6	16
Ağustos	7. İstasyon	4S7	17
Ağustos	9. İstasyon	4S9	18
Ağustos	10. İstasyon	4S10	19
Eylül	1. İstasyon	5S1	20
Eylül	4. İstasyon	5S4	21
Eylül	5. İstasyon	5S5	22
Eylül	6. İstasyon	5S6	23
Eylül	7. İstasyon	5S7	24
Eylül	8. İstasyon	5S8	25
Eylül	9. İstasyon	5S9	26
Eylül	10. İstasyon	5S10	27
Ekim	1. İstasyon	6S1	28
Ekim	2. İstasyon	6S2	29
Ekim	3. İstasyon	6S3	30
Ekim	4. İstasyon	6S4	31
Ekim	5. İstasyon	6S5	32
Ekim	8. İstasyon	6S8	33
Ekim	9. İstasyon	6S9	34
Temmuz	2. İstasyon	2M2	35
Temmuz	3. İstasyon	2M3	36
Temmuz	5. İstasyon	2M5	37
Ağustos	1. İstasyon	3M1	38
Ağustos	2. İstasyon	3M2	39
Ağustos	3. İstasyon	3M3	40

S: Su, M: Midye

Çizelge 4.7. *Escherichia coli* suşlarının biyokimyasal test sonuçları

Suşlar	Gram boyama	Hareket	Katalaz	Oksidaz	DNaz	İndol	Üreaz	Eijkman	H ₂ S	VP testi	MR testi	Nitrat testi	Sitrat	Laktozdan gaz	Floresan
1S1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
1S10	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2S5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2S7	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2S8	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2S9	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3S1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3S4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3S5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3S7	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3S8	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3S9	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S6	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S7	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S9	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
4S10	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S6	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S7	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S8	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S9	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
5S10	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S3	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S8	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
6S9	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2M2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2M3	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
2M5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
3M1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3M2	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3M3	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
K	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+

(-); olumsuz, (+); olumlu; K, *E. coli* ATCC 25922

İzolatların hepsinin indol, metil red ve nitratı nitrite indirgeme özelliklerinin pozitif olmasına karşın, hepsinin sitrat, üreaz, DNaz ve glikozdan aseton oluşturma yetilerinin negatif olduğu saptandı. Ayrıca, Fluorocult® LMX Broth Modified ile

yapılan testin sonucunda, tüm suşların X-GAL’i kullandıkları ve UV lamba altında floresan ışığa yaydıkları görüldü. Bunun dışında, *E. coli* O157:H7 var yok testi için kullanılan Fluorocult® *E. coli* O157:H7 Agar’da altı suşun (4, 16, 18, 20, 22 ve 24) yalancı pozitiflik verdiği tespit edildi.

Çizelge 4.8. *Escherichia coli* izolatlarının karbonhidrat fermentasyon sonuçları

Suşlar	Fruktoz	Galaktoz	Mannoz	Laktoz	Arabinoz	Ksiloz	Maltoz	Sükroz	Trehaloz	Glikoz	Sorbitol	Mannitol
1S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1S10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2S5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2S8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2S9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3S5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3S7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3S8	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3S9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4S1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4S2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4S4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4S6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
4S7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4S9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4S10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5S1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5S5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5S6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5S7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5S8	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5S9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6S1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6S2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6S3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6S4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6S5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6S8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6S9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2M5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3M1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3M2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3M3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(-); olumsuz, (+); olumlu; K, *E. coli* ATCC 25922

Yapılan karbonhidrat testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.8’de verildi. Test sonuçlarına göre suşların tümünün fruktoz, galaktoz, laktoz, glikoz, maltoz, ksiloz, trehaloz, sorbitol, mannoz, arabinoz ve mannitol’ü fermente etmesine karşın bazı suşların sükrozu fermente edemediği tespit edildi.

Bunların dışında, fekal koliformlar haricinde gözlemi yapılan streptokokları tespit etmek amacıyla kullanılan KF Streptococcus Agar’da üreyen kırmızı kolonilere katalaz testi ve Gram boyama uygulandı. Sonuç olarak, muhtemel streptokokların besi yeri ortamında belirtilen kriterlere uygun olarak üredikleri görüldü ve yapılan testlerde, tümünün Gram-pozitif ve katalaz negatif olduğu saptandı.

4.3.2. Antibiyogram Sonuçlarına İlişkin Bulgular

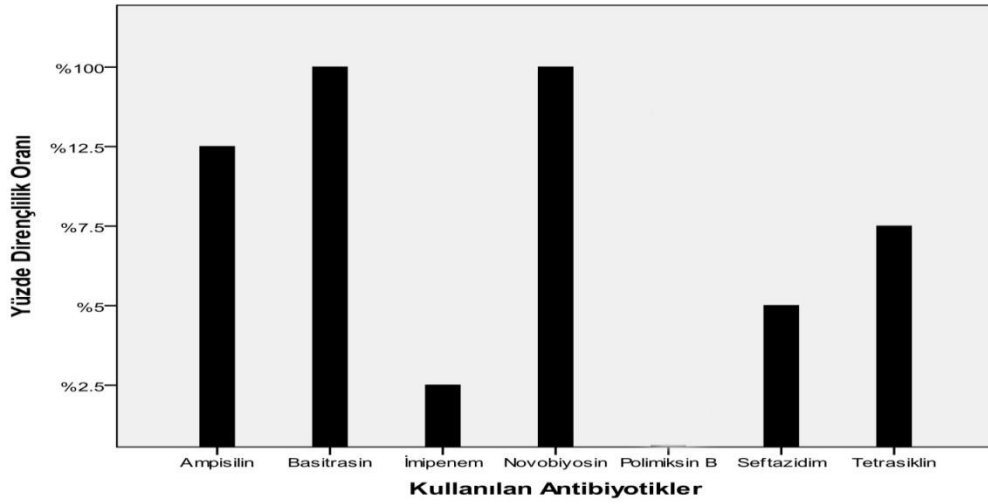
Bu çalışmada, 40 yerel ve 1 adet referans olmak üzere toplam 41 adet *E. coli* suşunun 7 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) M2-A6 önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Her suşa karşı belirlenen zon çapları CLSI tarafından önerilen zon çapları esas alınarak değerlendirildi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri (%)

Kullanılan antibiyotikler	R	I	S
Basitrasin	100	-	-
Novobiyosin	100	-	-
Tetrasiklin	7,5	-	92,5
Ampisilin	12,5	35	52,5
İmipenem	2,5	22,5	75
Seftazidim	5	30	65
Polimiksin B	-	-	100

R: Dirençli; I: Orta derecede dirençli; S: Duyarlı

Bütün suşlar basitrasin ve novobiyosin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları belirlendi. Diğer taraftan, polimiksin B’ye karşı hiç direnç gözlenmezken, diğer 4 antibiyotiğe karşı ise düşük yüzde oranlarında direnç tespit edildi (Şekil 4.9). Bu antibiyotikler içerisinde en yüksek duyarlılık (%100) polimiksin B ve tetrasikline (%92,5) karşı bulundu (Çizelge 4.10).



Şekil 4.9. İzole edilen bakterilerin yüzde antibiyotik dirençlilik oranları

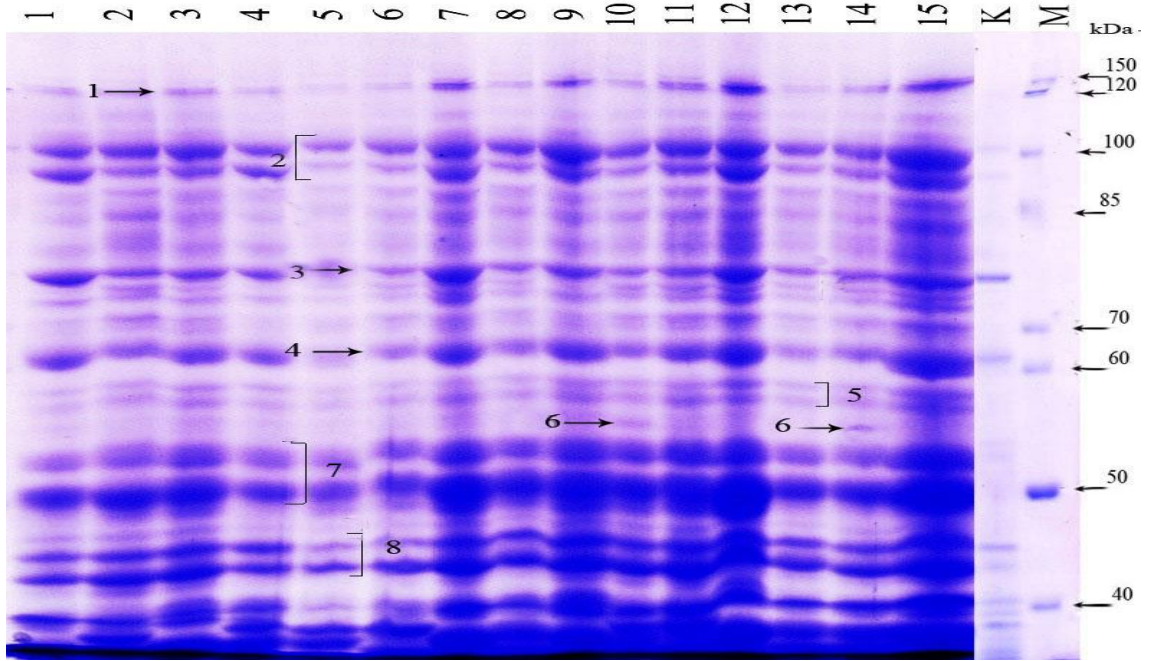
Çizelge 4.10. *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

Suşlar	Basitrasin	Novobiyosin	Tetrasiklin	Ampisilin	İmipenem	Seftazidim	Polimiksin B	Suşlar	Basitrasin	Novobiyosin	Tetrasiklin	Ampisilin	İmipenem	Seftazidim	Polimiksin B
1S1	R	R	S	S	S	S	S	5S5	R	R	S	I	S	S	S
1S10	R	R	S	R	S	R	S	5S6	R	R	S	S	S	S	S
2S5	R	R	S	S	S	I	S	5S7	R	R	S	S	S	S	S
2S7	R	R	S	I	S	S	S	5S8	R	R	S	S	S	I	S
2S8	R	R	S	S	S	S	S	5S9	R	R	S	I	I	S	S
2S9	R	R	S	S	S	S	S	5S1	R	R	S	S	S	S	S
3S1	R	R	S	S	S	S	S	6S1	R	R	R	R	I	S	S
3S4	R	R	S	S	S	S	S	6S2	R	R	S	S	I	I	S
3S5	R	R	S	S	S	S	S	6S3	R	R	S	I	I	S	S
3S7	R	R	S	I	S	S	S	6S4	R	R	S	I	I	S	S
3S8	R	R	S	S	S	S	S	6S5	R	R	R	R	S	I	S
3S9	R	R	S	S	S	S	S	6S8	R	R	S	S	S	I	S
4S1	R	R	S	I	S	S	S	6S9	R	R	R	I	S	S	S
4S2	R	R	S	I	I	S	S	2M2	R	R	S	R	I	I	S
4S4	R	R	S	S	S	I	S	2M3	R	R	S	S	S	S	S
4S6	R	R	S	I	I	I	S	2M5	R	R	S	I	S	I	S
4S7	R	R	S	I	R	R	S	3M1	R	R	S	I	S	I	S
4S9	R	R	S	S	S	S	S	3M2	R	R	S	I	S	I	S
4S10	R	R	S	R	S	I	S	3M3	R	R	S	S	I	S	S
5S1	R	R	S	S	I	S	S	K	R	R	S	S	R	S	S
5S4	R	R	S	S	S	S	S								

R: Dirençli, I: Orta dirençli, S: Duyarlı; K: *E. coli* ATCC 25922

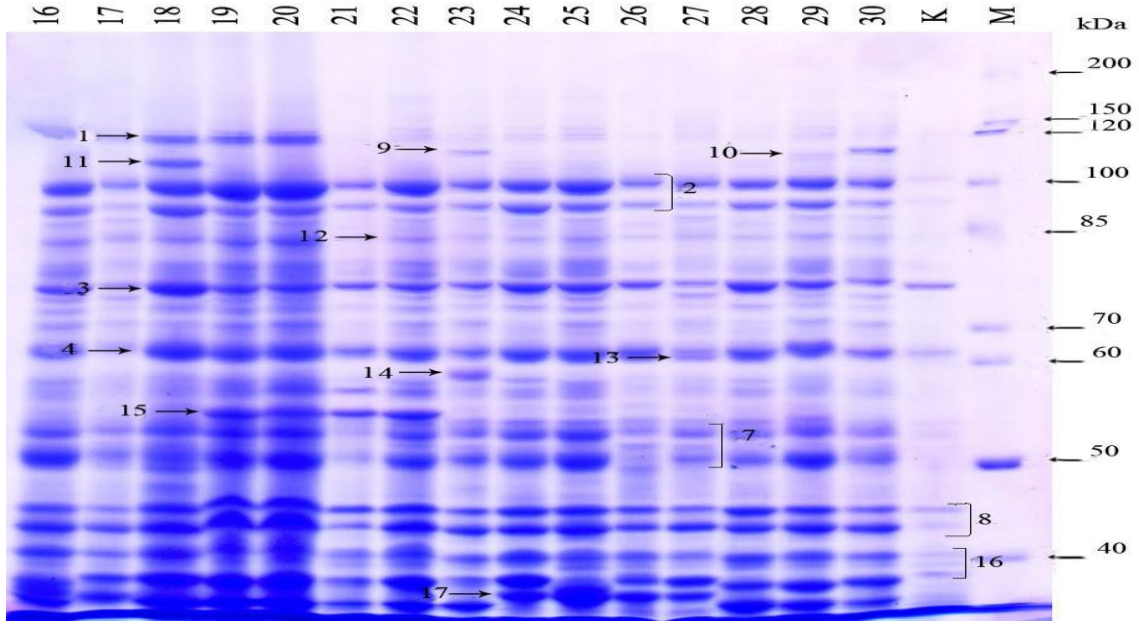
4.3.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez (PAGE) Bulguları

Araştırmamızda, 1 referans ve 40 adet yerel olmak üzere toplam 41 tane *E. coli* suşunun toplam hücre protein profilleri sodyum dodesilsülfat Poliakrilamid jel elektrophorez (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak elde edildi. İncelenen bütün suşlara ait toplam hücre protein profilleri Şekil 4. 10-11-12’de verildi.



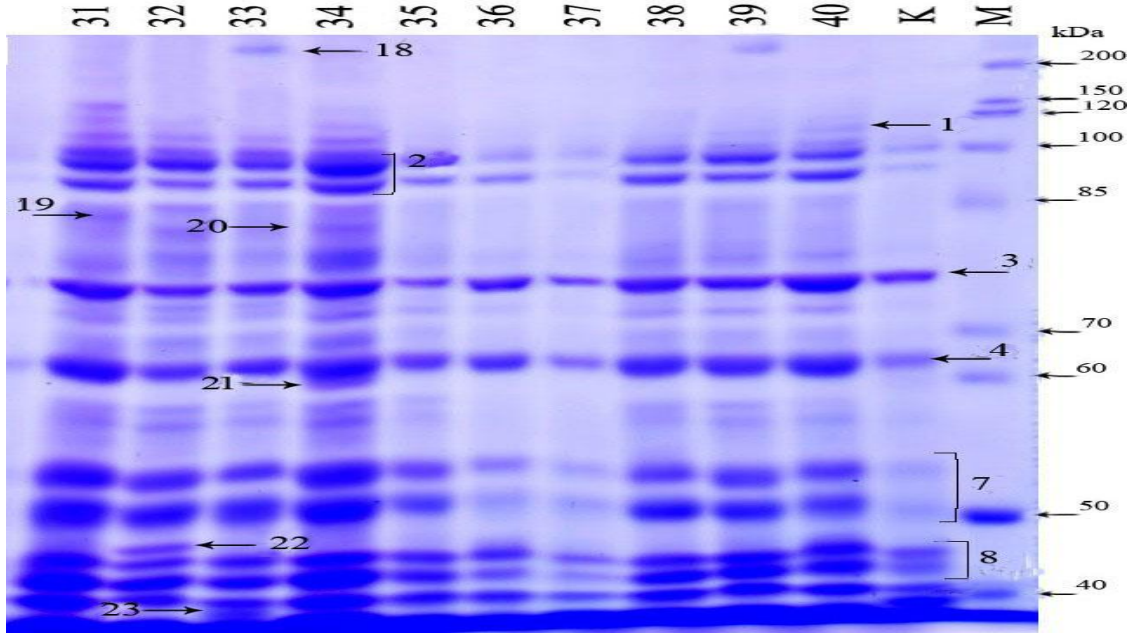
Şekil 4.10. İlk gruptaki 16 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edilen toplam hücre protein profillerine göre, ilk grup 15 yerel ve 1 referans suşun yüksek (150-70 kDa) ve düşük (60-40 kDa) molekül ağırlığındaki hücresel protein desenleri arasında benzerlik seviyesinin yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.10). Özellikle yüksek moleküler ağırlıklı 1 (120 kDa), 2 (94,5-93, kDa), 3 (75,7 kDa), 4 (65 kDa) ve düşük moleküler ağırlıklı 5 (57,1-54,9 kDa), 7 (51,2-50,1 kDa), 8 (46,1-44 kDa) ile gösterilen dominant proteinlerin tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi (1 ve 5 numaralı bandlar referans suşta tespit edilmedi). Bununla birlikte, suşlar arasında az da olsa bazı farklılıklar gözlemlendi. Örneğin, incelenen 10 ve 14 numaralı suşların 6 (52,6 kDa) ile işaretlenen protein bandını bulundurmalarıyla diğer suşlardan farklı oldukları görüldü.



Şekil 4.11. İkinci gruptaki 16 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

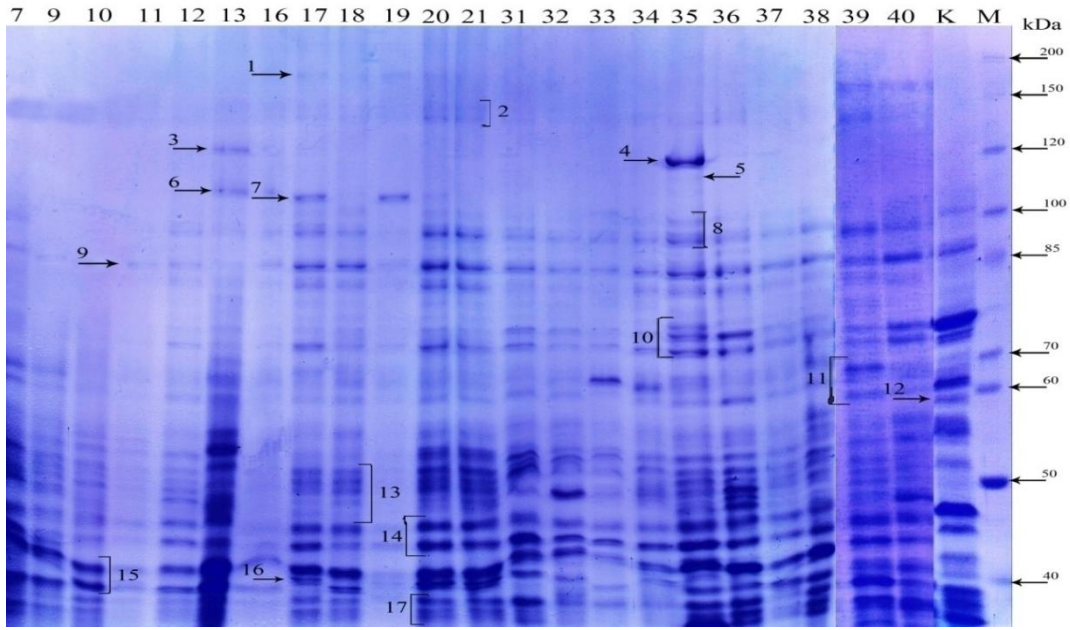
Şekil 4.11’de yürütülen suşların toplam hücresel protein profilleri incelendiğinde Şekil 4.10’da olduğu gibi, ikinci grup 15 yerel ve 1 referans suşun yüksek (150-70 kDa) ve düşük (60-40 kDa) molekül ağırlığındaki toplam hücresel protein desenleri arasında benzerlik seviyesinin yüksek olduğu saptandı. Özellikle yüksek moleküler ağırlıklı 1, 2, 12 (80,8 kDa), 3, 4 ve düşük moleküler ağırlıklı 7, 8 ve 16 (40,4-38,2 kDa) ile işaretlenen dominant proteinlerin tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi. Bunun dışında, suşlar arasında bazı minör band farklılıkları da belirlendi. İncelenen suşlarda 9 (113,5 kDa) ile gösterilen band 23 ve 30 numaralı suşlarda, 10 (113,1 kDa) ile gösterilen band 29 numaralı suşta, 11 (105,3 kDa) ile gösterilen band 18 numaralı suşta, 13 (61,1 kDa) ile gösterilen band 27 numaralı suşta, 14 (56,9 kDa) ile gösterilen band 23 numaralı suşta tespit edildi. Ayrıca, 15 (52,1 kDa) ile gösterilen protein bandı ise 19, 20, 21, 22 numaralı suşlarda ve 17 (35,8 kDa) ile gösterilen protein bandı da 24, 25, 26, 27 numaralı suşlarda görüldü.



Şekil 4.12. Son gruptaki 11 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

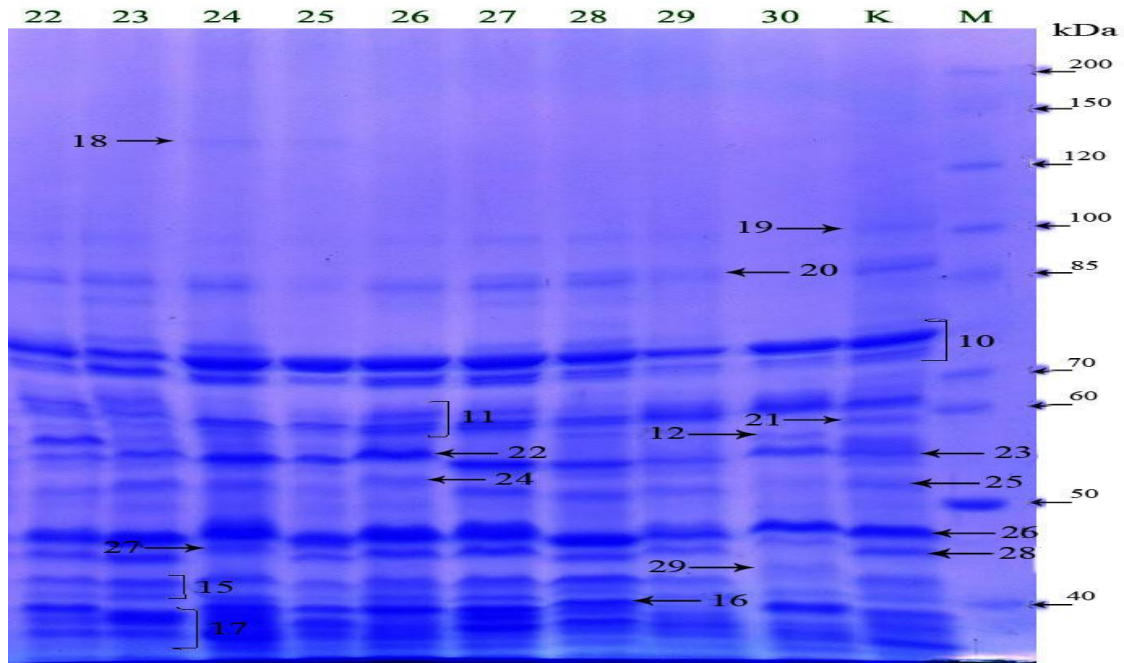
Şekil 4.12’de yürütülen suşların toplam hücre protein desenleri incelendiğinde ilk 2 jelde olduğu gibi, son grup 10 yerel ve 1 referans suşun yüksek (200-70 kDa) ve düşük (60-40 kDa) molekül ağırlığındaki toplam hücre protein profilleri arasında benzerlik seviyesinin yüksek olduğu saptandı. Yüksek moleküler ağırlıklı 1, 2, 3, 4 ve düşük moleküler ağırlıklı 7 ve 8 ile işaretlenen dominant proteinlerin tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi. Ancak, suşlar arasında bazı band farklılıkları da tespit edildi. İncelenen suşlar arasında 33 ve 39 numaralı suşlarda 200 kDa’dan daha büyük 18 (219,5 kDa) bandlar görüldü. Bunun yanı sıra, 19 (92,4 kDa) ile işaretlenen protein bandı 31 numaralı suшта, 20 (80,4 kDa) ve 21 (58,7 kDa) ile işaretlenen bandlar 34 numaralı suшта, 22 (46,5 kDa) ile gösterilen protein bandı 32 numaralı suшта ve 23 (37,5 kDa) ile gösterilen band 33 ve *E. coli* ATCC 25922 suşlarında tespit edildi.

Bu çalışmada, midye ve su örneklerinden izole edilen 31 adet yerel ve 1 adet referans olmak üzere toplam 31 adet *E. coli* suşunun toplam hücre dışı protein profillerine göre ayrımı yapıldı. SDS-PAGE tekniği kullanılarak elde edilen hücre dışı protein profilleri Şekil 4.13 ve 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.13. İlk gruptaki 23 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

İlk grupta bulunan 22 yerel ve 1 adet referans olmak üzere toplam 23 adet suşun toplam hücre dışı protein profilleri, toplam hücre protein profillerinde olduğu gibi bütün suşların benzer band profillerine sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.13). Örneğin, yüksek moleküler ağırlıklı 2 (142,5-133,9 kDa), 8 (97,4-89,7 kDa), 9 (86 kDa), 10 (74,7-73 kDa), 11 (67-61 kDa) ve düşük moleküler ağırlıklı 13 (51-47 kDa), 14 (46-44,3 kDa), 15 (42-39,4 kDa) ve 17 (38-36 kDa) ile işaretlenen protein bandlarının tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi. Buna karşın, toplam hücre protein profillerine kıyasla hücre dışı protein profillerinde suşlar arasında daha fazla farklılıklar tespit edildi. Örneğin, 1 (176,8 kDa) ile işaretlenmiş protein bandı yalnızca 17, 18, 19, 20, 39 ve 40 numaralı suşlarda görüldü. Ayrıca, 3 (119,5 kDa) ve 6 (107,5 kDa) ile işaretlenmiş protein bandları 13 numaralı suшта, 4 (115,5 kDa) ve 5 (111 kDa) ile işaretlenmiş protein bandları 35 numaralı suшта görüldü. Öte yandan, 7 (104,3 kDa) ile gösterilen protein bandı 17, 19, 20 ve 35 numaralı suşlarda, 12 (57,6 kDa) ile işaretlenmiş protein bandı *E. coli* ATCC 25922’de, 16 (40,1 kDa) ile işaretlenmiş protein bandı ise 17 numaralı suшта gözlemlendi. 17 numaralı suşun diğer suşlara göre daha fazla band farklılığına sahip olduğu tespit edildi.



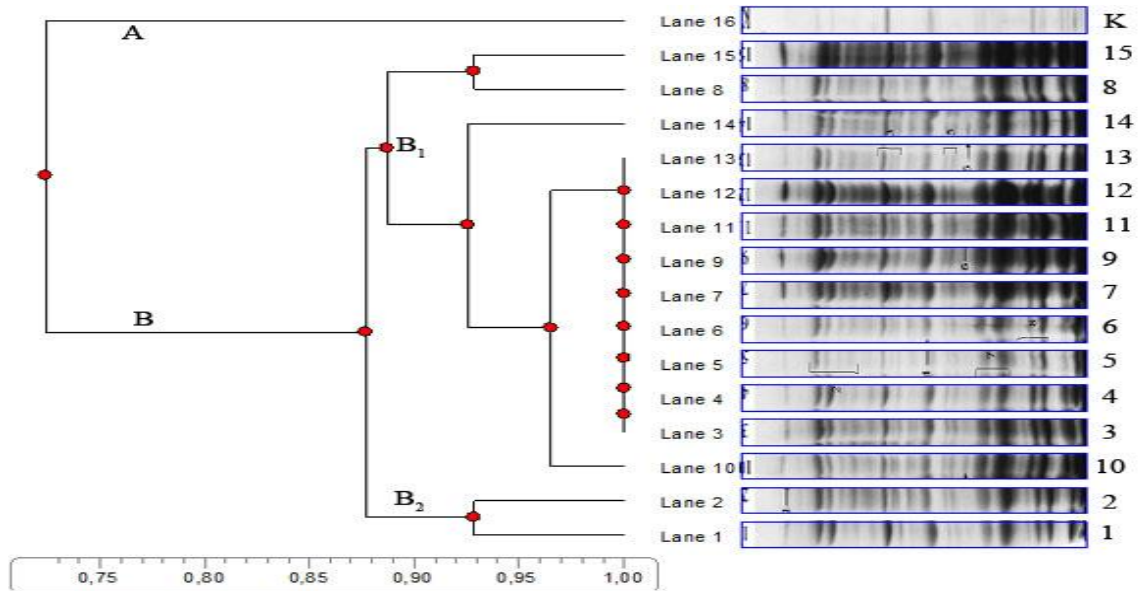
Şekil 4.14. İkinci gruptaki 10 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

Diğer taraftan, ikinci grupta yer alan 10 adet suşun toplam hücre dışı protein profillerinin görüldüğü jelde de suşlar arasındaki benzerlik seviyesinin yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.14). Yüksek molekül ağırlıklı 19 (100 kDa), 20 (85,9 kDa), 10, 11 ve düşük molekül ağırlıklı 23 (56 kDa), 25 (52,7 kDa), 26 (48 kDa), 15 ve 17 ile işaretlenen protein bandlarının tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi. Hücre dışı protein profilleri incelendiğinde suşlar arasında önemli band farklılıkları da saptandı. Örneğin, 18 (126,6 kDa) ile gösterilen band 24 ve 25 numaralı suşlarda gözlemlendi. Ayrıca, 21 (59 kDa) ile işaretlenen protein bandı 28 ve *E. coli* ATCC 25922 suşlarında, 12 ile işaretlenen protein bandı 22, 23 ve 30 numaralı suşlarda tespit edildi. Bunların dışında, 22 (55,6 kDa) ile gösterilen protein bandı 26, 30 ve *E. coli* ATCC 25922 suşlarında, yine 24 (53,2 kDa) ile gösterilen band 26 numaralı suшта, 27 (46,6 kDa) ile gösterilen band 24 ve 30 numaralı suşlarda görüldü. Ayrıca, 28 (46 kDa) ile gösterilen dominant band 24 ve 30 numaralı suşlar dışında diğer suşlarda saptandı. Son olarak, 29 (44,5 kDa) ile işaretlenen band 30 numaralı suшта, 16 (40,1 kDa) ile işaretlenen protein bandı 28 numaralı suшта görüldü.

4.3.4. *Escherichia coli* Suşları Arasındaki Kümeleme Analiz Bulguları

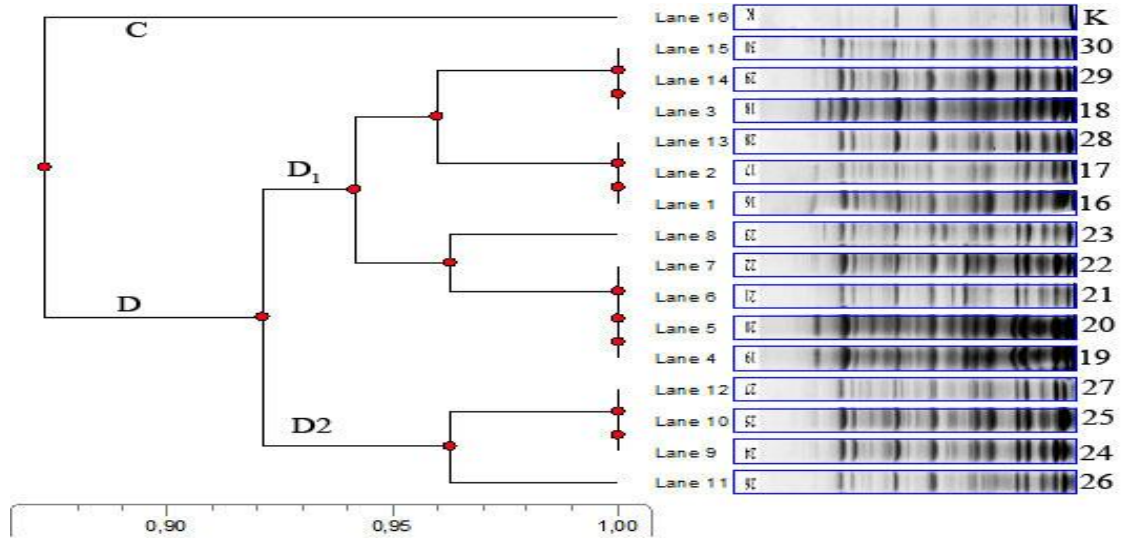
Araştırmada, 40 yerel ve 1 referans olmak üzere toplam 41 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri esas alınarak Phoretix 1D-Pro (Totallab - UK) programında Jaccard'a göre unweighted paired group method of arithmetic average (UPGMA) metodu kullanılarak kümeleme analizi yapıldı (Şekil 4.15-16-17).

Birinci jelde yürütülen 16 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE tekniği kullanılarak elde edilen toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik düzeyi 0,72 ve üzerinde 2 major gruba (A ve B) ayrıldığını ortaya koydu (Şekil 4.15). Grup A, yalnızca referans *E. coli* ATCC 25922 suşunu, grup B ise diğer 15 adet yerel suşları içermektedir. Ayrıca, grup B benzerlik düzeyi 0,88 ve üzerinde iki alt gruba (B₁ ve B₂) ayrıldı.



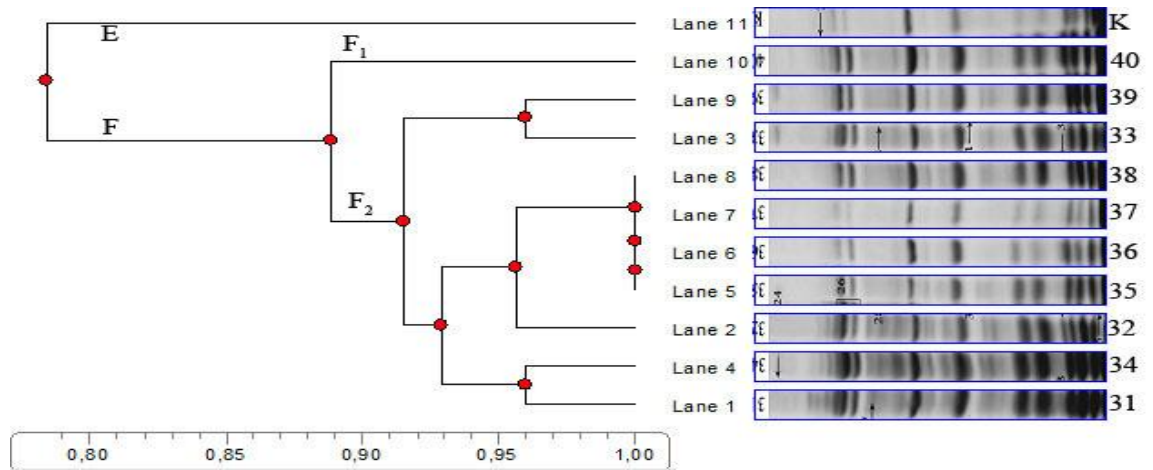
Şekil 4.15. İlk grup 16 Adet *E. coli* suşunun toplam hücre protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

İkinci jelde yürütülen 16 adet *E. coli* suşunun toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik seviyesi 0,87 ve üzerinde 2 major gruba (C ve D) ayrıldığını gösterdi (Şekil 4.16). Grup C, tek bir suşu (*E. coli* ATCC 25922), buna karşın grup D ise diğer 15 adet yerel suşu içermektedir. Öte yandan, grup D benzerlik düzeyi 0,92 ve üzerinde iki alt gruba (D₁ ve D₂) ayrıldı.



Şekil 4.16. İkinci grup 16 adet *E. coli* suşuna ait toplam hücre protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

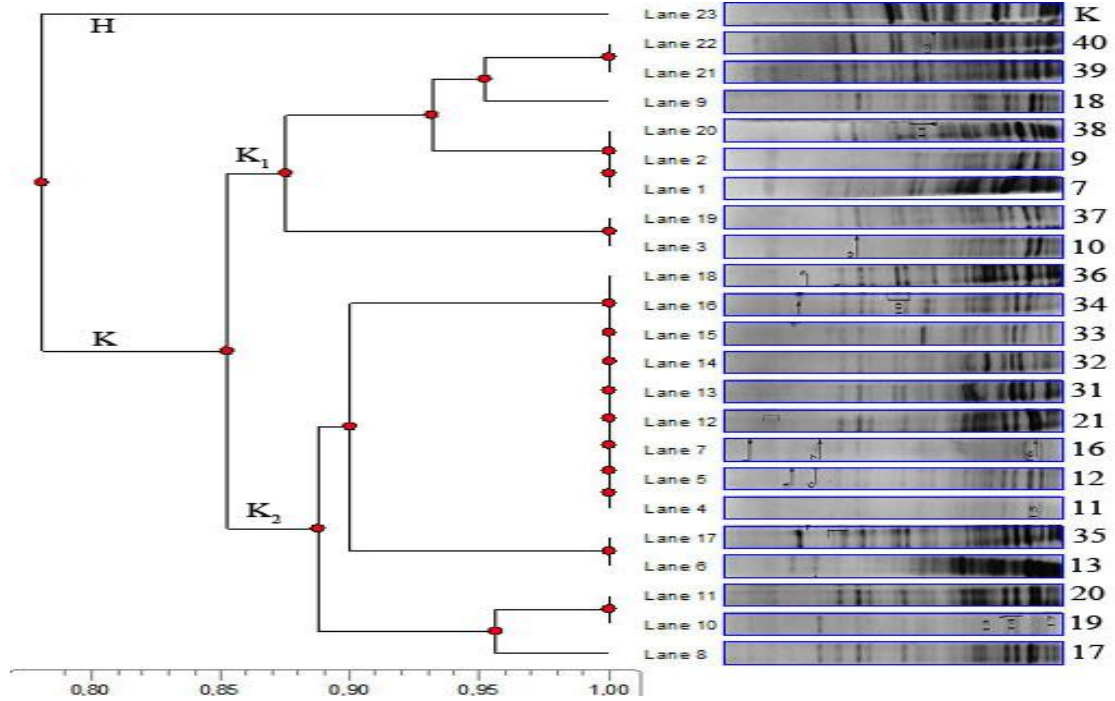
Son jelde yürütülen 11 adet *E. coli* suşunun toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik düzeyi 0,78 ve üzerinde 2 major gruba (E ve F) ayrıldığını gösterdi (Şekil 4.17). Grup E, sadece referans suşu içerirken, grup F diğer 10 adet yerel suştan oluşmaktaydı. Ayrıca, grup F benzerlik düzeyi 0,89 ve üzerinde iki alt gruba (F₁ ve F₂) ayrıldı.



Şekil 4.17. Üçüncü grup 10 adet *E. coli* suşuna ait toplam hücre protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

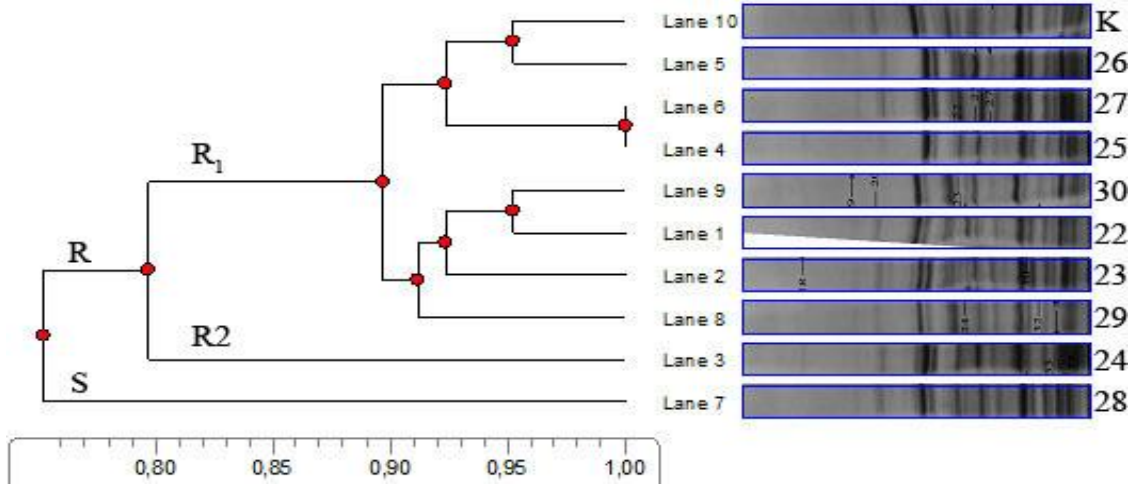
Diğer taraftan, 31 adet yerel ve 1 adet referans suş olmak üzere 32 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak Phoretix 1D-Pro (TotalLab - UK) programında Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak kümeleme analizleri yapıldı (Şekil 4.18-19).

Birinci jelde yürütülen 23 adet *E. coli* suşunun SDS-PAGE kullanılarak elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik düzeyi 0,78 ve üzeri 2 major gruba (H ve K) ayrıldığını ortaya koydu (Şekil 4.18). Grup H, yalnızca referans *E. coli* ATCC 25922 suşunu, grup K ise diğer 22 adet yerel suşları kapsamaktadır. Ayrıca, grup K benzerlik düzeyi 0,85 ve üzerinde iki alt gruba (K_1 ve K_2) ayrıldı.



Şekil 4.18. Birinci jelde yürütülen *E. coli* suşlarına ait toplam hücre dışı protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

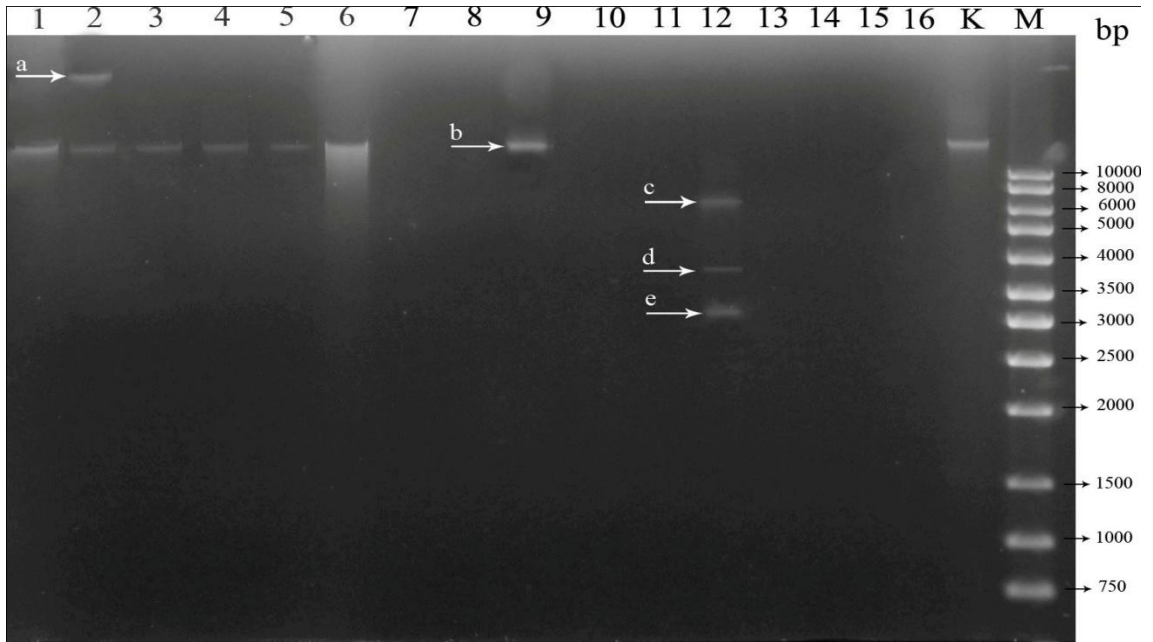
İkinci jelde yürütülen 10 adet *E. coli* suşunun toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik seviyesi 0,75 ve üzeri 2 major gruba (R ve S) ayrıldığını gösterdi (Şekil 4.19). Grup S, tek bir suşu (*E. coli* ATCC 25922), buna karşın grup R ise diğer 9 yerel suşı içermektedir. Öte yandan, grup R benzerlik düzeyi 0,80 ve üzerinde iki alt gruba (R_1 ve R_2) ayrıldı.



Şekil 4.19. Son jelde yürütülen *E. coli* suşlarına ait toplam hücre dışı protein profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

4.3.5. Plazmid DNA Analiz Sonuçlarına İlişkin Bulgular

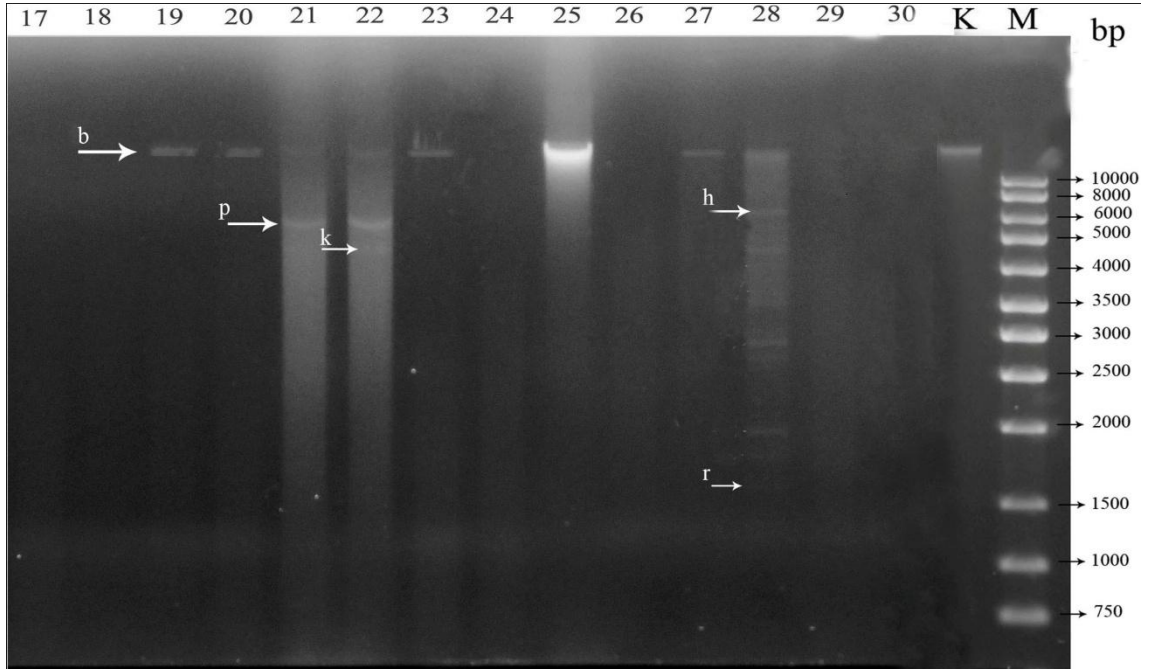
Araştırmada, 40 tanesi yerel ve 1'i referans olmak üzere toplam 41 *E. coli* suşunun plazmid DNA profilleri belirlendi. Suşların plazmid DNA profilleri Şekil 4.20-21-22'de verildi.



Şekil 4.20. İzole edilen *E. coli* suşlarının plazmid profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

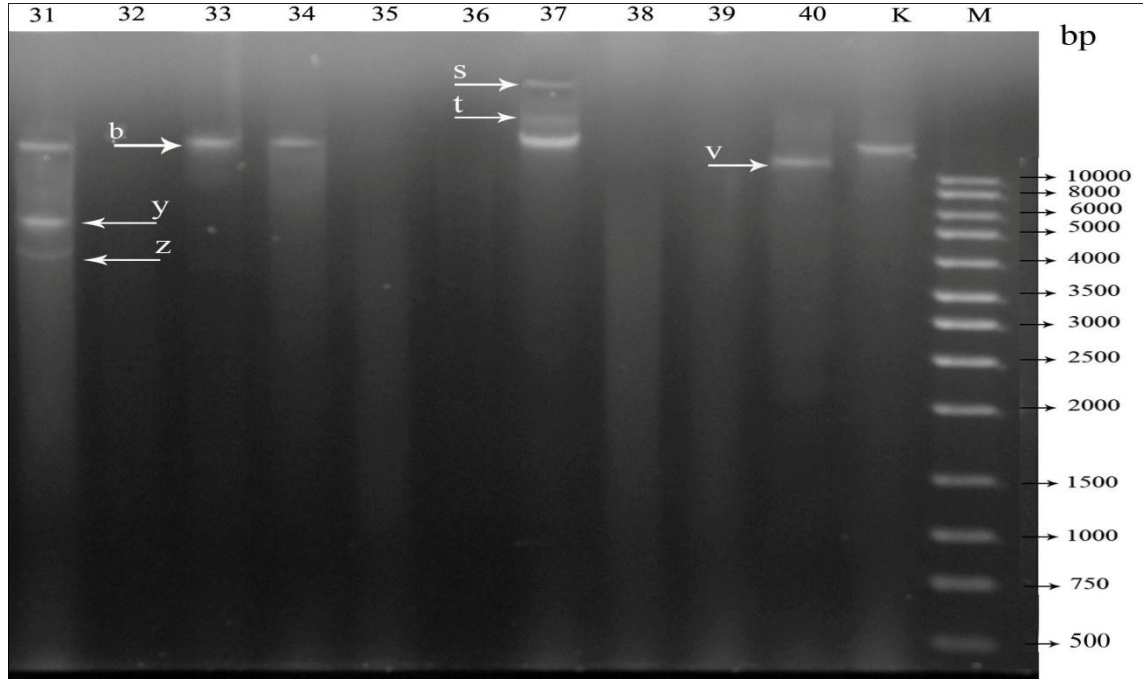
Plazmid DNA analiz sonucuna göre, a (24.500 bp) ile işaretlenmiş plazmidin yalnızca 2 numaralı suşta bulunduğu, buna karşın b (14.700 bp) ile işaretlenmiş plazmidin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 ve K suşlarında ortak olduğu belirlendi (Şekil 4.20). Ayrıca,

c (6.545 bp), d (3.792 bp), e (3.116 bp) ile işaretlenen plazmidler 12 numaralı suşta görülürken; 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15 ve 16 numaralı suşlarda ise plazmid tespit edilemedi.



Şekil 4.21. İzole edilen *E. coli* suşunun plazmid profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

Plazmid DNA analiz sonucuna göre, b ile işaretlenmiş plazmidlerin 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28 ve K suşlarında ortak olduğu saptandı (Şekil 4.21). Ayrıca, p (5.650 bp) ile işaretlenmiş plazmidin 21 ve 22 numaralı suşlarda ortak olduğu görüldü. Yine k (4.631 bp) ile işaretlenmiş plazmid 22 numaralı suşta tespit edildi. Bütün suşlar içerisinde en yüksek plazmid içeriği 28 numaralı izolatda görüldü. Bunun dışında; 17, 18, 24, 26, 29, 30 numaralı suşlarda herhangi bir plazmid tespit edilemedi.



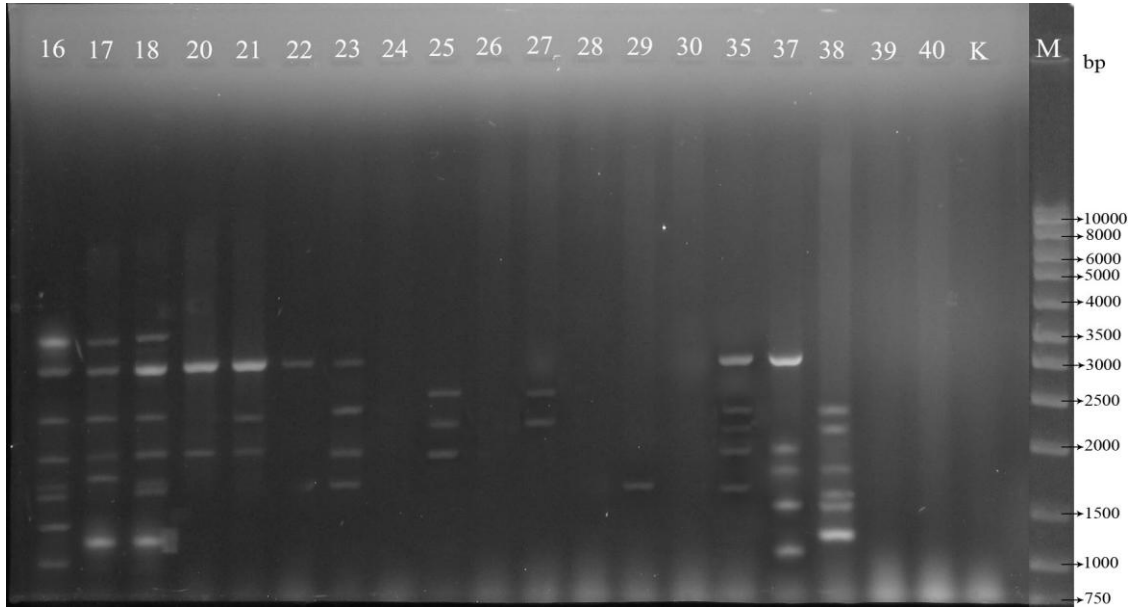
Şekil 4.22. İzole edilen *E. coli* suşunun plazmid profilleri. K: *E. coli* ATCC 25922, M: Marker

Plazmid DNA analiz sonucuna göre, b ile işaretlenmiş plazmidin 31, 33, 34, 37 ve K suşlarında da ortak olduğu belirlendi (Şekil 4.22). Ayrıca, 37 numaralı suşta s (20.973 bp) ve t (17.081 bp) olarak işaretlenen ile 31 numaralı suşta y (5.523 bp) ve z (4.180 bp) ile işaretlenen plazmidler tespit edildi. Diğer taraftan, v (11.895 bp) ile işaretlenmiş plazmidin 40 numaralı suşta bulunduğu, 32, 35, 36, 38 ve 39 numaralı suşların ise plazmid içermediği görüldü.

4.3.6. RAPD-PCR Analizine İlişkin Bulgular

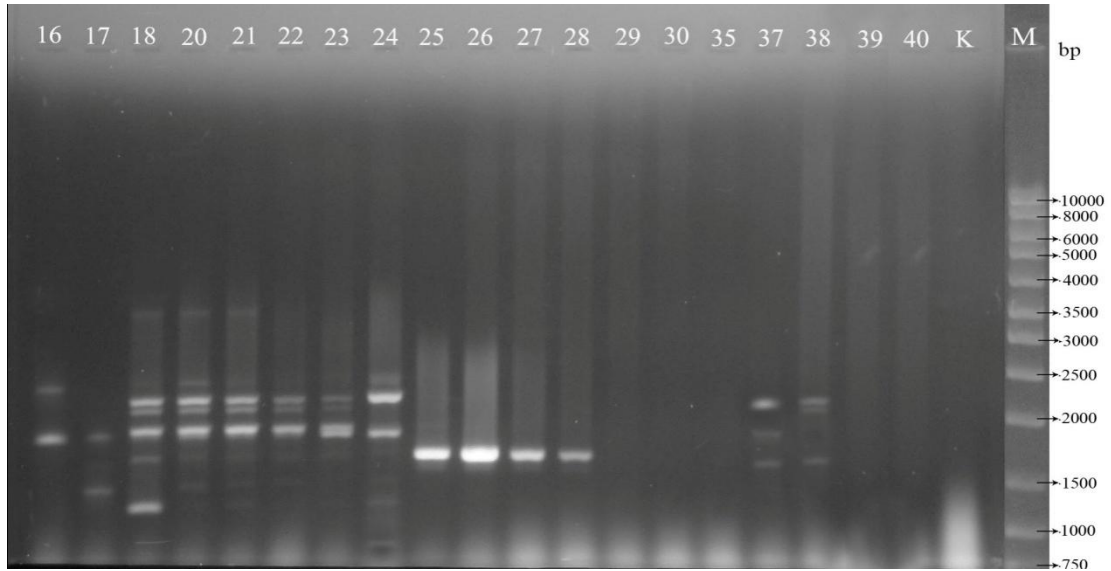
İzole edilen 40 adet yerel *E. coli* suşu içerisinde, antibiyotik duyarlılık testleri, plazmid profilleri, toplam hücre ve ekstrasellüler protein profilleri esas alınarak seçilen 19 adet *E. coli* ve 1 referans suşun genomik DNA'ları izole edildi. RAPD-PCR tekniği ve 2 farklı primer (RBM-6 ve COL-I) kullanılarak üretilen DNA bantları agaroz jelde yürütüldü.

RAPD-PCR analizi sonucu her iki primer ile elde edilen bantların tümünün polimorfik olduğu gözlemlendi (Şekil 4.23-24).



Şekil 4.23. RBM-6 primeri ile elde edilen RAPD-PCR band profilleri. K: ATCC 25922; M: Marker

RBM-6 primeri ile 24, 26, 28, 30, 39, 40 ve referans suşlar dışındaki diğer 13 suшта, moleküler ağırlıkları 3.500 bp ve 985 bp arasında değişen DNA bandlaşmaları tespit edildi (Şekil 4.23). Ayrıca, 22 (2.968 bp) ve 29 (1.710 bp) numaralı suşlarda tek band saptandı.



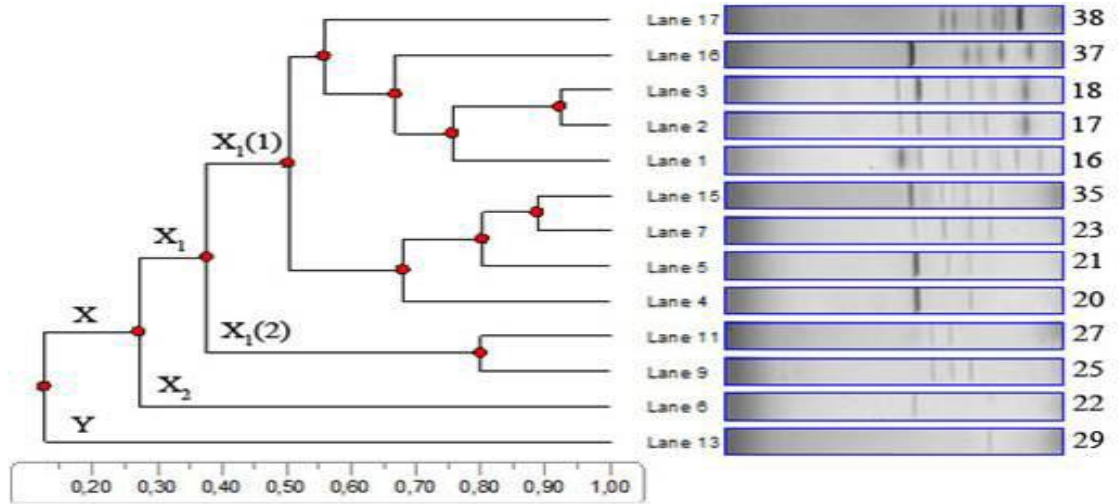
Şekil 4.24. Col-I primeri ile elde edilen RAPD-PCR band profilleri. K: ATCC 25922; M: Marker

Col-I primeri ile 29, 30, 35, 39, 40 ve referans suşlar dışındaki diğer 14 suшта, moleküler ağırlıkları 3.473 bp ve 855 bp arasında değişen DNA bandlaşmaları görüldü

(Şekil 4.24). Bununla birlikte, 25, 26, 27 ve 28 numaralı suşlarda 1.716 bp moleküler ağırlığına sahip tek band saptandı.

Her iki primer sonuçları kıyaslandığında, öncelikle suşların farklı primerlerle verdikleri band sayısında değişimler gözlemlendi. Örneğin, 16 ve 17 numaralı suşlar RBM-6 primeri ile sırasıyla 8 ve 6 band verirken, aynı suşlar Col-I primeri ile sadece 2 band üretti. Bunun dışında, RBM-6 primeriyle 18, 20, 21, 22 ve 23 numaralı suşlar sadece bir ortak band üretmelerine karşın, Col-I primeri ile aynı suşların ortak 4 adet band ürettikleri belirlendi. Ayrıca, her iki primerle 30, 39, 40 ve *E. coli* ATCC 25922 numaralı referans suşunda herhangi bir band sentezlenemediği görüldü. Yine, RBM-6 primeriyle 24, 26 ve 28 numaralı suşlarda herhangi bir band gözlenmezken, Col-I primeriyle bu suşların band ürettikleri tespit edildi. Buna karşın, RBM-6 primeriyle 29 ve 35 numaralı suşlarda band görülürken, Col-I primeriyle bu suşların band üretmedikleri saptandı.

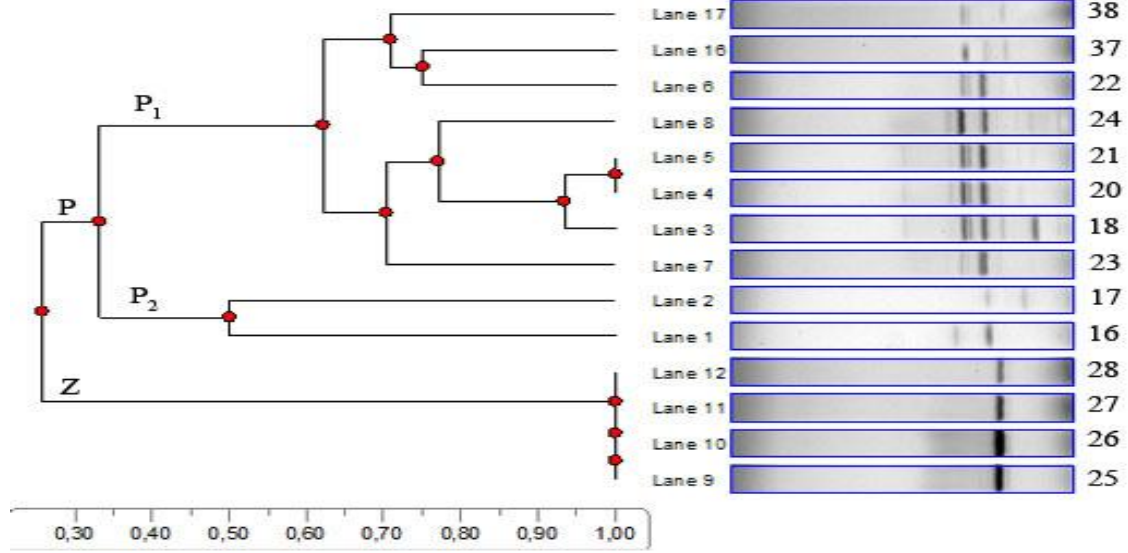
RBM-6 ve Col-I primerleriyle elde edilen band profilleri esas alınarak Phoretix 1D-Pro (TotalLab - UK) programında Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak kümeleme analizi yapıldı. Bu programda dendrogram hazırlanırken band üretmeyen suşlar dendrograma dâhil edilmedi (Şekil 4.25-26).



Şekil 4.25. *Escherichia coli* suşlarının RBM-6 primeri ile elde edilen DNA profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

RAPD-PCR yöntemi dâhilinde RBM-6 primeri vasıtasıyla genomik DNA'ları çoğaltılan 19 yerel ve 1 referans *E. coli* suşlarının mevcut primerle band üreten suşlarına ait dendrogram (Şekil 4.25) incelendiğinde, band profillerindeki benzerlik düzeyi 0,12 ve üzerinde olan 2 major gruba (X ve Y) ayrıldı. Bunlardan Y grubu

yalnızca 29 numaralı suştan oluşurken, X grubu benzerlik düzeyi 0,27 olan iki gruba X_1 ve X_2 'ye ayrıldı. X_2 grubunun sadece 22 numaralı suşu, X_1 grubunun ise benzerlik düzeyi 0,38 ve üzerinde $X_1(1)$ ve $X_1(2)$ olarak adlandırılan iki adet gruba ayrıldığı ve diğer bütün suşları içerdiği belirlendi.



Şekil 4.26. *Escherichia coli* suşlarının Col-I primeri ile elde edilen DNA profillerini esas alan ve Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

Col-I primeri kullanılarak 20 adet *E. coli* suşunun ürettiği DNA profilleri esas alınarak oluşturulan dendrogram Şekil 4.26'da verilmektedir. Band profillerindeki benzerlik düzeyi 0,26 ve üzeri olan 2 major gruba (P ve Z) ayrıldı. Bunlardan Z grubu birbirlerine %100 benzeyen 25, 26, 27 ve 28 numaralı suşlardan oluşmaktadır. P grubu benzerlik düzeyi 0,33 olan iki gruba P_1 ve P_2 'ye ayrıldı. P_2 benzerlik düzeyi 0,50 olan 16 ve 17 numaralı suşları kapsarken, P_1 grubu ise benzerlik düzeyi 0,62 ve üzeri olan iki alt gruba ayrıldı.

Dendrogramlar incelendiğinde, RBM-6 primeriyle elde edilen benzerlik katsayısının Col-I primerine göre daha düşük olduğunu, bu durumdan yola çıkarak RBM-6 primeri ile suşların ayırım gücünün daha fazla olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Mayıs-2011 ve Ekim-2011 tarihleri arasında Sinop ilinde belirlenen 15 farklı istasyondan alınan deniz suyu ve midye örneklerinin fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik analizleri yapıldı. Ayrıca, bu örneklerden izole edilen 40 yerel ve 1 adet referans olmak üzere toplam 41 adet *E. coli* suşunun; fenotipik karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri, plazmid DNA profilleri ve RAPD yöntemlerine göre karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Araştırmada belirlenen istasyonların bir kısmı, yoğun şekilde kullanılan plajlar ve plaja yakın yerlerden seçilirken, bazı istasyonlar ise ya belediye kontrollü direkt kanalizasyon ya da insan aktiviteleri sonucu oluşan atık deşarjlarının olduğu kısımlardan seçildi.

Çalışmamızda, kirlilik indikatörü olarak öncelikle koliform ve streptokok grubunu tercih etmemizin önemli nedenleri arasında, koliformların yakın zamanda gerçekleşen çevresel kontaminasyonu işaret etmeleri ve diğer kirlilik indikatörleriyle iyi bir korelasyon gösteriyor olmalarıdır. Fakat, patojenlerin varlığını işaret etmek veya kaynağı fekal olmayan kontaminasyonları göstermek için koliformların kullanılmayacağını, bu yüzden de heterotrofik bakteriler, *Streptococcus* sp., *S. aureus*, *P. auroginosa*, *Vibrio* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium perfringens* sporları, maya ve fungus gibi alternatif mikrobiyolojik indikatörlerin su kalitesini izleme amaçlı kullanılabileceği önceden rapor edilmiştir (Pagnocca ve ark., 1991; Gonzalez, 2010). Streptokokların fiziko-kimyasal şartlara ve çevresel baskılara *E. coli*'den daha dirençli olması (EU, 2006) ve deniz suyunun yüksek tuzluluğuna karşı yüksek tolerans göstermelerinden (Hamzah, 2011) dolayı, mikrobiyolojik kirlilik izleme çalışmalarında *E. coli* ile beraber en çok tercih edilen bakteri grubudur.

Sinop kıyılarında daha önce, deniz suyu kalitesi, sediman ve bentik örnekleri üzerine, bunların dışında *M. galloprovincialis*'in kalitesi, gelişimi, avlanması ve ağır metal içerikleri bakımından çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fakat deniz suyu mikrobiyolojik kirliliği araştırmaları yönünden sadece bir çalışmaya (Gökkurt, 2007) rastlanılmıştır. Bu çalışmada da mikrobiyolojik incelemelerin fazla detaylı yapılmadığı görülmüştür.

Gökkurt (2007) yaptığı çalışmada, Sinop ilindeki farklı istasyonlardan aldığı su örneklerinin fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik kirliliğini incelemiştir. Sonuç olarak;

           ksijen, pH, iletkenlik ve sıcaklık değerleri verilerimizle kıyaslandığında, 6 aylık periyotta pH ve sıcaklık verilerimizin yüksek olduğu, iletkenlik ve            ksijenin ise değişim g      ği tespit edildi. Ayrıca, araştırmacının seğtiği istasyonlardaki mikrobiyolojik kirlilik bulguları, çalışmamızla uyumlu olan istasyonlarla karşılaştırıldığında neredeyse tüm bakteri sayım sonuçlarımızın daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu durum, kirliliğin zamanla daha da arttığını açıkça göstermektedir.

Çotuk ve Kimiran (2004) İstanbul Boğazı deniz suyunun her ay düzenli olarak mikrobiyolojik analizini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, deniz suyu örneklerindeki total ve fekal koliform sayılarını, standart değerlere göre yüksek bulmuşlardır (10^3 - 10^4 /100 ml). İndikatör bakteri sayılarında mevsimsel farklılıklar olduğu ve özellikle yaz aylarında deniz suyundaki total koliform sayısının oldukça yüksek düzeye ulaştığını tespit etmişler. Ayrıca, 37  C’de gelişen total aerobik canlı bakterileri sayılarının, 1 ml’de 10^4 - 10^6 olduğu saptamışlardır. Tuğrul-İçemer ve ark. (2007) Antalya plajlarında mikrobiyolojik deniz suyu kalitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada; TK, FK ve FS yıllık ortalama değerlerini Lara ve Konyaaltı plajlarında sırasıyla; 102, 28, 8 ve 110, 17, 8 kob/100 ml olarak bulmuşlar ve bu değerlerin AB ve Türkiye yüzme suyu kalitesi sınır değerlerini aştığını bildirmişlerdir. Kol  ren ve ark. (2011) Gaga G  l   (Ordu) yüzey sularının 2005 yılı Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım aylarında; toplam koliform, fekal koliform ve fekal streptokok sayımlarını yapmışlar. Yüzey suyunda toplam koliform bakteri sayısı >1000 kob/100 ml, fekal koliform bakteri sayısı >11 ve <26 kob/100 ml ve fekal streptokok bakteri sayısı >2 ve <20 kob/100 ml olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak araştırmacılar, Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği Kıta  i Su Kaynakları Kalite Kriterlerine göre, Gaga G  l  ’nın II. sınıf su kalitesinde, az kirlenmiş su olduğunu tespit etmişlerdir. Trousellier ve ark. (2004) Senegal Nehri halicinde toplam bakteri sayısının $2,7 \times 10^6$ ile $8,1 \times 10^7$ düzeyinde olduğunu, fekal kontaminasyon indikat  rlerini sadece belirli bölgelerde tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçların, bu çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü.

Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği’nde (Anonim, 2006) belirlenen zorunlu değerler fekal koliform için yüzme ve rekreasyon amaçlı deniz suyunda 2×10^2 EMS/100 ml ve AB-Mavi Bayrak için 2×10^3 EMS/100 ml’iken, streptokoklar için zorunlu değerler yüzme ve rekreasyon amaçlı deniz suyunda 1×10^3 EMS/100 ml olarak belirlenmiştir. Araştırmamızda, kalite yönetmenliği kriterleri açısından örnek alınan istasyonlar fekal koliform için incelendiğinde, 5, 6 ve 7 numaralı istasyonların zorunlu

değer 2×10^2 EMS/100 ml değerini aştıkları görülmüştür. Ayrıca, örnek alınan istasyonlar streptokok açısından yönetmelik kriterlerine göre incelendiğinde, özellikle 6. istasyonda tüm aylarda, diğer istasyonlarda ise başta Temmuz ayı olmak üzere bazı aylarda yönetmelik sınır değerini aştığı tespit edildi. Bu sonuçlara göre, Sinop ili deniz sularının özellikle yüzme ve eğlence amacıyla en çok tercih edildiği yaz aylarında kirlilik durumuyla karşı karşıya olduğunu açıkça göstermektedir.

De Donno ve ark. (2008) kıyı sularının mikrobiyolojik bir biyoindikatörü olarak *M. galloprovincialis*'i çalışmışlar ve elde ettikleri veriler sonucunda midyelerin içerdiği bakteri seviyelerinin geliştikleri sudaki bakteri seviyesinden her zaman daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durum çalışmamızla kıyaslandığında, aynı noktalardan aldığımız su ve midye örneklerinden elde edilen bakteri seviyelerine göre, midyedeki bakteri seviyesinin yetiştigi ortama kıyasla her zaman yüksek olmadığı belirlendi.

Burkhardt ve Calci (2000), su ve kabuklu deniz ürünü etinin fekal koliform konsantrasyonlarını çalışmış ve elde ettikleri sayım sonuçlarının benzer olduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşın, bizim çalışmamızda aynı noktalardan alınan su ve midye örneklerinin fekal konsantrasyonları karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olmadığı görüldü.

Stabili ve ark. (2004) ve Akar (2009), *M. galloprovincialis*'in mikrobiyolojik kirliliği üzerine yapmış oldukları çalışmalarda, suyu süzerek beslenen bu canlının fekal koliform bakteri içeriğinin, deniz suyuna göre çok daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Biz bu çalışmada, aynı istasyonlardan aldığımız deniz suyu ve midye örneklerini kıyasladık ve midye içeriğindeki fekal koliform oranının deniz suyuna göre daha yüksek olduğunu bulduk. Diğer çalışmalarla uyumlu olan bu sonuçlarımız, iyi pişirilmeden satışa sunulan midyelerin insan sağlığına ciddi şekilde zarar vereceğinin sinyalini vermektedir.

Su Ürünleri Kalitesi Yönetmeliği'nde (Su Ürünleri Yönetmeliği, 1995) çift kabuklu canlı yumuşakçalarda belirlenen üst sınır değerler; fekal koliform için kabuklar arası sıvıda ve ette 300 EMS/100 g olarak belirlenmiştir. Yönetmelik kriterleri göz önünde bulundurularak, midye örneklerinin alındığı istasyonlara ait bulgular incelendiğinde, 3. ve 4. istasyonda bazı aylarda gözlenen fekal koliform bakteri seviyeleri yönetmelik kriterlerini bir hayli aşmaktadır. Özellikle, 4. istasyon örneklerinin daha yeni toplanmış ve canlı olarak depolanmış haldeyken, midye dolma yapan satıcıdan alınmış olması ve yönetmelik kriterlerine göre kıyaslanan fekal koliform dışında özellikle besin olarak yoğun bir şekilde tüketildiği Ağustos ayındaki

toplam aerop, toplam koliform ve streptokok sayılarının yüksek olmasından dolayı tüketime sunulan bu midyelerin ne denli risk taşıdığını açıkça göstermektedir. APHA (1995) yayınladıkları bir raporda, koliformlar suda standartların üzerinde bulunursa insan ve hayvanların muhtemelen enfeksiyon hastalığı geçirebileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, risk oluşumunu engellemek amacıyla tüketimden önce yeterli sıcaklığın uygulanması gereğini söylemek mümkündür.

David ve Haggard (2011) yağış miktarıyla beraber akıntının giderek artmasıyla, fekal koliform ve fekal streptokok sayısının belirli bir biçimde arttığını rapor etmişler. Ayrıca, akıntı olaylarıyla bakteri konsantrasyonu arasında ilişki olmasına rağmen, bu ilişkinin kanal kapasitesi, kaynağın yakınlığı ve yabancı hayvanları içerisine alan diğer parametrelere bağlı olduğunu vurgulamışlar. Buna ilaveten, bu ilişkilerin su sıcaklığı gibi mevsimsel değişimlerle daha karmaşık hale geldiğini belirtmişlerdir. Araştırmamızda, deniz suyu örneklerine ait bakteri seviyeleri incelendiğinde Ekim ayı bulguları; toplam aerop, toplam koliform ve fekal streptokok sayılarının genelde diğer aylara göre ani yükseldiği, fekal koliform sayısının ise pek değişmediği gözlemlendi. Sinop meteoroloji istasyonundan 2011 yılına ait toplam yağış miktarına göre Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim aylarına ait milimetreye düşen yağmur miktarları sırasıyla; 46,4- 95,7- 70,1- 4,2- 32,2 ve 114,6 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerlere göre, Ekim ayında düşen toplam yağış miktarından (114,6 mm) dolayı, yağmur akıntısı ile karasal atıklarında suya karışmasıyla sudaki bakteri seviyesinin arttığı söylenebilir.

Hill ve ark. (2006) sudaki fekal koliform bakterileri yoğunluğuna yağmur miktarının etkisi üzerine yaptıkları araştırmada, yağmur akıntı sularının bakteri seviyesini arttırdığını fakat bu etkinin sadece yağmur miktarına değil diğer başka faktörlere de bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Bahsedilen tüm bu etkilerin yanı sıra üzerinde tartışılması gerekenlerin bir kısmı şöyle olabilir; yapılan istasyon gözlemleri dâhilinde, Sinop ilinde deniz sezonu açılmadan hemen önce ve sezon boyunca, turizm sektörünün de canlanmasıyla birlikte belediye ve işletmeler tarafından denize deşarj edilen atık noktaları kısmen kontrol altına alınmaktadır. Bunun dışında yüzme amacıyla çok tercih edilen bazı bölgelerde, deniz sezonu süresince arıtma sisteminin kurulduğu gözlemlendi ve rekreasyonel amaçla kullanılan bazı noktalarda işletmeler tarafından kirliliği önlemek amacıyla suya giriş yerlerinden itibaren kayalıkların üzerine ve diplere kireç döküldüğü tespit edildi. Gözlenen tüm bu istasyon koşulları, turizm dönemi veya

deniz sezonu bitişiyle aksaklığa uğramakta ve bu durumda, Ekim ayında bakteriyel seviyedeki hızlı artışla elde ettiğimiz bulguyu desteklemektedir.

pH sadece çok düşük veya çok yüksek değerlerde rekreasyonel suların kullanımı üzerine direkt etkiye sahiptir. Bahsedilen bu koşullar altında pH cilt ve gözler üzerine etki oluşturabilir (WHO, 2003). Hernandez-Delgado ve Toranzos (1995), koliform gelişimi için optimum pH'nın 6-7 olduğunu bildirmişlerdir. Hamzah ve ark. (2011) kıyı suları üzerine yaptıkları bir çalışmada pH değerini 7,57-7,79 arasında bulmuşlar ve bu değerlerin koliform bakteriler için uygun olduğunu belirtmişlerdir. Bizim alışmamızda ise pH değerleri 7,68-9,74 arasında gözlenmiş ve bu değerlerin koliform bakteri gelişimi için uygun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Mayo (1995) çözünmüş oksijen konsantrasyonunun fekal koliformların sayıca azalmaları veya yaşam süreleri üzerine herhangi bir etkiye sahip olmadığını belirtmiştir. Bizim sonuçlarımızın, bu çalışmayla uyumlu olduğu görüldü.

Hem Avrupa Birliği (AB) hem de Amerika Birleşik Devletleri (ABD) yasaları gereği, kabuklu deniz mahsullerinin yetiştiği alanlarda kontaminasyon seviyesi aşırı yüksek ise direkt olarak bu mahsullerin insanların tüketimi için toplanması yasaktır. Ancak, bu ürünler ticari açıdan temizlendiğinde, yer değiştirilip ya da ısıtma işleminde tabi tutulduktan sonra tüketime sunulabilir. Fakat bu işlemlerin etkinliği bilinmediği için, eğer mahsuller ilk üredikleri ortamda aşırı derecede kirliliğe maruz kalmışlarsa bu işlemler kullanılmayabilir (Lees ve ark., 2010). Bahsedilen bu durum çalışmamıza uyarlandığında, toplanan kara midye örneklerinin yetiştikleri ortamdan ziyade kendi mikrobiyolojik kirliliğine bakıldı ve özellikle 3 ve 4. istasyonların “Su Ürünleri Yönetmelik” kriterlerinin bir hayli üstünde kontaminasyona uğramış olmalarına rağmen yinede bir takım işlemlerden geçirilip tüketime sunulmaları, verilerimizin Lees ve ark.'nın üzerinde durdukları konu ile çelişkili bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bunların dışında, belirlenen istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinin mikrobiyolojik analizleri; her bir istasyon için toplam koliform, fekal koliform ve fekal Streptokok sayıları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) olduğu, toplam aerop bakteri sayıları için ise anlamsız ($p>0,05$) olduğu belirlendi. Ayrıca, farklı istasyonlardan toplanan midye örnekleri için yapılan tüm sayım sonuçları arasındaki farkın anlamsız ($p<0,05$) olduğu da tespit edildi.

Çalışmamızda deniz suyu ve midye örneklerinin mikrobiyolojik kaliteleri kapsamında incelenen toplam aerop, toplam koliform, fekal koliform ve fekal streptokokun yanı sıra, insan ve hayvan kommensal florasının bir parçası olan, farklı

ortamlarda yaşıyor olmasına rağmen iyi bilinen bir patojen olan *E. coli*'nin izolasyonu gerçekleştirildi. Bu bakteri daha yakın zamanlarda (2011) Almanya'da köken alarak ortaya çıkmış yeni suşu ile ilişkili, Avrupa'da 908'i HUS olan ve 3.167'si HUS olmayan, dahası 50 kişinin ölümüne neden olan vakaya yol açmıştır (WHO, 2011; Moriel ve ark., 2012). Araştırmamızda *E. coli*'nin izolasyonunu takiben, fenotipik ve moleküler karakterizasyonu üzerine detaylı çalışmalar gerçekleştirildi.

Deniz suyu örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının dağılımına bakıldığında, özellikle yüzmeye amaçlı tercih edilen 1. istasyon (Mayıs, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim), 2. istasyon (Ağustos ve Ekim), 4. istasyon (Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim), 5. istasyon (Haziran, Temmuz, Eylül ve Ekim) ve 9. istasyonda (Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim) özellikle yaz aylarında *E. coli* tespit edilmesi olası bir tehlike varlığının habercisidir.

Çalışmamızda midye örnekleri için *E. coli* dağılımı incelendiğinde, sadece Temmuz ve Ağustos aylarında 1., 2., 3. ve 5. istasyonlarda *E. coli* tespiti yapılmıştır. Ancak, midye dolma satıcısından temin edilen 4. istasyon mahsullerinde *E. coli* izole edilememiştir. Bu durum olumlu olmakla beraber, aynı mahsullerde fekal streptokok sayısının Ağustos ayında $4,0 \times 10^3$ kob/100 ml olduğu tespit edilmiştir. Andrew ve Mitchell (1997) ve Bordalo ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışmada fekal streptokokların fiziko-kimyasal şartlara ve çevre koşullarına fekal koliformlara oranla daha dirençli olduklarını belirtmiş olmaları ve fekal streptokoklarında kirlilik parametresi olması, buna ilaveten fekal streptokok ve enterobakterlerin *E. coli*'yi baskılamış olma olasılığı, bulgularımızda ki olumlu sonuca gölge düşüren ihtimaller olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızda izolasyonu gerçekleştirilen 40'ı yerel 1'i referans (*E. coli* ATCC 25922) olmak üzere 41 *E. coli* suşunun, kendi aralarında yakınlık ilişkisini saptamak amacıyla fenotipik testleri, antibiyotik dirençlilikleri, toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri, plazmid DNA ve RAPD-PCR analizleri gerçekleştirildi.

E. coli'yi de kapsayan, fekal koliformlar 44,5-45,5°C'de laktozu fermente ederek asit ve gaz oluşturan Gram-negatif bakterilerdir. Richards ve Watson (2010) fekal koliformları izole etmek için en avantajlı yöntemi seçerken, hem laktoz içeren bir ortam kullanıyor olması hem de 44,5-45,5°C'de geliştiğinde gaz birikimini sağlıyor olmasından dolayı En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemini seçmişlerdir. Ayrıca, Hunsinger ve ark. (2005), EMS tekniğinin mililitre'de daha fazla koloni sayısı vermesi ve bu yöntemin en önemli adımı olan, zarar görmüş hücrelerin sıvı ortamda tekrardan canlılığını devam ettirme olasılığının yüksek olmasından dolayı bu tekniği

önermişlerdir. EMS yönteminin bu avantajlarını göz önünde bulundurarak, bizde çalışmamızda bu metodu kullandık.

Escherichia coli 19. yy sonlarından beri su güvenliği için uygun bir biyolojik indikatör olarak bilinirdi. Ancak o dönemlerde izleme metotlarındaki eksikliklerden dolayı, Gram-negatif, laktoz fermente edebilen, çubuk şeklindeki toplam koliformlar (*E. coli* dahil) indikatörlerin yerine yaygın olarak kullanılmak üzere tasarlandı. O zamanlarda, toplam koliformların kullanımının su kaynaklarında fekal kirliliği belirlemek üzere insan sağlığı için önemli olduğu düşünülmüştü. Fakat, yakın zamanda toplam koliform grubu içerisinde ki çoğu cinsin çevrede yaygın olarak yaşadığı ve fekal kontaminasyonla ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Edberg ve ark., 2000). Zamanla elde edilen tüm bu gözlemler, biyolojik indikatörleri belirlemenin en önemli adımının teşhis amaçlı kullanılan metotlar ve bu metotların geliştirmesi olduğunu belirtmek yerinde olacaktır. Heijnen ve Medema (2006) kültür tekniklerinin, *E. coli* varlığının araştırılmasında rutin olarak kullanıldığını ve bu metotların, biyokimyasal veya genetiksel yöntemlerle hazırlanmış seçici kültürleri kapsadığını belirtmişlerdir. Brenner ve ark. (1980), Dickey ve Zumoff (1988) ve Paradis ve ark. (2005), *Enterobacteriaceae* familyası üzerine temel sınıflandırma çalışmalarının, biyokimyasal reaksiyonlar ve fizyolojik özellikler gibi fenotipik faktörlere dayalı olabileceğinden yola çıkarak çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca, Bettelheim (1992) *E. coli* türlerinin yakın türlerden ayrılmasının genellikle biyokimyasal testlere dayandırıldığını rapor etmiştir.

Bu çalışmada incelenen *E. coli* suşlarının tamamı Gram-negatif, hareketli, sporsuz, çomak şeklinde, katalaz pozitif, H₂S ve oksidaz negatif, fakültatif anerobik ve nitratı nitrite indirgeme yeteneklerine sahip oldukları tespit edildi. Yapılan fenotipik testler, incelenen suşların *E. coli* türüne ait olduklarını göstermesine karşın, suşların kendi aralarında ayrımı için yararlı olmadığını ortaya koydu. Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi karbonhidrat fermentasyon test sonuçlarına göre bütün suşların laktoz, maltoz, glukoz, sorbitol, arabinoz, ksiloz, trehaloz, mannoz ve mannitolü kullanabildiği, buna karşın 19 suşın (%46,3) sükrozu kullanamadıkları belirlendi. Bu durum fermentasyon testlerine göre suşlar arasında bir ayırım yapılmasının oldukça zor olduğunu göstermektedir. Bunların dışında, Adams ve Moss (1995) *E. coli*’yi diğer *Enterobacteriaceae*’lerden ayırmak için birkaç biyokimyasal ve diğer testlerin (İMVİC testleri) kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların *E. coli*’nin ayırt edilebilmesi için kullandıkları biyokimyasal test kriterlerinin yanı sıra, The Prokaryotes (2006), Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology (2005), Association of Public

Health Laboratories (2012)'in de *E. coli* için belirttiği kriterler, bizim bulgularımıza uyarlandığında tüm sonuçlarımızın uygunluk gösterdiği tespit edildi.

Yapılan bazı çalışmalarda, biyokimyasal testler (katalaz, hidrojen sülfid, hareket, DNaz, indol, metil red, voges proskauer, sitrat, üreaz, nitrat, karbonhidrat fermentasyon vb.) *E. coli* tanısında kullanılmıştır (Gomis ve ark., 2001; Raji ve ark., 2007; Öter, 2007; Kanungo, 2009; Purkayastha, 2010). Bu çalışmada incelenen suşlara ait biyokimyasal test sonuçları yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Biyokimyasal testler *E. coli* tanısında herhangi bir sorun oluşturmamaktadır. Ancak, *E. coli* olarak tanımlanan suşlar arasındaki farklılıkları ortaya koymakta yetersiz kaldığını söylemek mümkündür.

Çalışmamızın bir başka aşamasında *E. coli* örneklerinin identifikasyonunda enzimatik testler kullanılmıştır. Bu testler, toplam koliform ve *E. coli*'nin çevresel örneklerden daha hızlı ve duyarlı bir şekilde tespit edilmesi için alternatif bir yaklaşım sunmaktadır. Toplam ve fekal koliform tespiti β -glukoronidaz aktivitesine dayandırılmaktadır (Bitton, 2005, Richards ve Watson, 2010). β -glukoronidaz'ın hızlı, spesifik ve basit identifikasyonunu seçili kılan substrat olarak MUG kullanılır. Bu enzim tüm *E. coli* izolatlarının >%95'inde vardır (Rice ve ark., 1990). Chao (2006) tropikal sularda yapmış olduğu çalışmada izole ettiği *E. coli*'lerin %9,5 (10/105) MUG negatif bulmuştur. Benzer bir çalışmada, Shadix ve Rice (1991) çevresel kaynaklardan izole ettikleri *E. coli*'lerin %10-20'sinde MUG negatif tespit etmişlerdir. Sonuçlarımıza uygunluk göstermeyen bu çalışmaların yanı sıra, Mates ve Schaffer (1988) deniz suyundan izole ettikleri *E. coli* suşlarını tanımlamak için, kullandıkları biyokimyasal doğrulama testlerinin, laktoz pozitif ya da negatif olsun floresan ışığa yayan tüm kolonilerin *E. coli* olarak doğruladığını belirtmişlerdir. Doğan ve Halkman (1998) izole ettikleri 190 *E. coli* suşunun EC Broth+Tryptofan besi yerinde gaz ve indol oluşturduğunu, ayrıca tümünün LST+MUG besiyerinde floresan pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların, bu çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü.

Nadir olarak gerçekleşen durumlarda da olsa *E. coli* O157:H7'nin çok ciddi bir patojen olduğu görülmüştür. Öneminden dolayı, çoğu araştırmada; canlılığı, karakteristik gelişimi, ortaya çıkışı ve basit tespiti üzerine durulmuştur. Enterohemorajik *E. coli* O157:H7'nin belirlenmesi için genetiğe, immünolojiye ve enzimolojiye dayalı metotlar geliştirilmiştir. Bunların dışında, özellikle rutin gözlemler için genel kültür tespit metotları, halen uygulanmakta ve muhtemelen gelecekte de

uygulanmaya devam edecektir (Noveir ve Halkman, 2000). *E. coli* O157:H7 serotipi ve normal *E. coli* serotipleri arasında belirgin iki fark şöyledir; birincisi, normal *E. coli* serotipleri sorbitolü fermente ederken *E. coli* O157:H7 serotipi fermente edemez. Bir diğeri, normal *E. coli* serotipleri β -glukoronidaz aktivitesine sahipken, *E. coli* O157:H7'de β -glukoronidaz negatiftir. Bizde çalışmamızda, *E. coli* O157:H7 için sorbitolün fermentasyon yoluyla kullanımı ve glukoronidaz aktivitesine yönelik ayırım sağlayan selektif bir besiyeri olan Fluorocult O157:H7 agarı kullanarak, izolatlarımız içerisinde olası *E. coli* O157:H7 varlığını tespit etmeyi amaçladık. Belloso (2000) farklı bölgelerden topladığı 493 su örneğinden izole ettiği *E. coli*'ler içerisinde *E. coli* O157:H7 serotipinin varlığını Fluorocult O157:H7 agarı kullanarak tets etmiş ve bu serotipe rastlamamıştır. Müller ve ark. (2001), Afrika'da, topladıkları 204 adet su numunesinde O157:H7 serotipini araştırmışlardır. Geleneksel yöntemler kullanarak elde ettikleri bulgularında *E. coli* O157:H7 serotipine rastlayamamışlardır. Öztelli (2004), Bayburt ili merkez içme sularında *E. coli* O157:H7 serotipinin varlığını araştırmış ama bu serotipe rastlamamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ayrıca, uygulamalarımız sırasında Fluorocult O157:H7 agar ile elde edilen sonuçlarda 6 (%14,6) *E. coli* suşunun MUG negatif olduğu yani bu sonuç 6 suşun muhtemel *E. coli* O157:H7 olabileceği ihtimalini vermektedir. Fakat Fluorocult LMX Broth ile elde edilen sonuçlar da tüm suşlarda MUG pozitif olduğu ve daha önce yapılan karbonhidrat fermentasyon çalışmalarında tüm suşların sorbitolü fermente ettiğinden yola çıkılarak, Fluorocult O157:H7 agar ile 6 suшта yanlış pozitif sonuç elde edildiğini söyleyebiliriz. Elde edilen tüm bu verilere rağmen, β -glukoronidaz aktivitesi bazı *E. coli* suşlarını belirlemek için genel bir metot olsa da, bu metodun taksonomik amaçlar için kullanılmayacağı (Chang ve ark., 1989) ve patojen olsun ya da olmasın *E. coli* suşlarının fenotipik test sonuçlarına göre ayrımlarının önemli yanlışlıklara neden olduğu (Farmer ve ark., 1985; Öter, 2007) daha önce yapılan bazı çalışmalarda rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, deniz suyu ve midye örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının 7 farklı standart antibiyotiğe karşı hassasiyetleri test edildi. Moş ve ark. (2010)'nın da belirtmiş olduğu gibi, disk difüzyon yöntemi güvenilir, kolay ve ucuz olduğu için bizde çalışmamızda bu yöntemi tercih ettik. Sharma ve Rai (2012) göl sularından izole ettikleri 11 *E. coli* suşunun, ampisilin (%55) ve seftazidim (%45)'e dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Shar ve ark. (2009) içme sularından izole ettikleri *E. coli* suşlarının basitrasine dirençli, imipeneme duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Patoli ve ark. (2010)

içme sularından izole ettikleri 27 *E. coli* suşunun, ampisilin (%88,89) ve seftazidim (%25,23)'e direnç gösterdiğini ve izolatların %62,96'sının çoklu antibiyotik (3-6 antibiyotik) dirençliliği gösterdiklerini saptamışlardır. Lösch ve ark. (2008) su örneklerinden izole ettikleri 68 *E. coli*'nin %44,1 (30)'inin ampisiline dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Danishta ve ark. (2010) atık su ve çevresel örneklerinden izole ettikleri 19 *E. coli*'nin %31,6'sının tetrasikline, %10,5'inin de seftazidime dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Vignaroli ve ark. (2012) deniz suyu kıyı sedimentlerinden 109 *E. coli* izole etmiş ve tetrasiklin (%28), ampisilin (%16,5)'e karşı direnç saptamışlardır. Öter (2007) kliniklerden izole ettiği 13 *E. coli* suşunun, tümünün bir penisilin türevi olan ampisilin'e direnç gösterdiklerini saptamıştır. Jett ve ark. (1995) kliniklerden izole ettikleri 25 *E. coli* suşunun imipenem'e %100, seftazidim'e %28 duyarlı olduklarını belirtmişlerdir. Dinç ve ark. (2012) sığır mastitislerinde izole ettikleri 92 adet *E. coli* suşunun %39,1 (36)'inin ampisilin'e, %34,8 (32)'inin tetrasiklin'e ve %2 (2)'sinin seftazidim'e karşı dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Parveen ve ark. (2007) fekal kirlilik kaynağı belirli olan yüzey sularında izole ettikleri 407 *E. coli* suşunun %12,5 oranında ampisiline, %10,3 oranında ise tetrasikline direnç gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Balcı (2007) Seyhan baraj gölünden izole ettiği 530 koliform bakterinin (179 *E. coli*) %15,47 oranında ampisiline, %4,52 oranında imipeneme direnç gösterdiklerini tespit etmiştir. Altuğ ve ark. (2005) Haliç yüzey sularından izole ettikleri 73 (31'i *E. coli*) *Enterobacteriaceae* üyesinin, %10 imipenem'e, %13,1 seftazidim'e ve %25 ampisilin'e dirençlilik gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Dursun ve Kaya (2010) Broiler piliçlerinde *E. coli* O157:H7'nin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı belirleme amaçlı yapmış oldukları çalışmada 32 izolat elde etmişler ve bu izolatların, %100 oranında polimiksin B'ye duyarlı fakat %100 ampisilin'e karşı dirençli olduklarını tespit etmişlerdir.

Vural ve Akçin (2011) İzmit körfezinde 23 deniz suyu örneğinden 8 *E. coli* izole etmişler ve bu izolatların tetrasiklin'e karşı %50 dirençlilik gösterdiklerini bu dirençliliklerini de R plazmid'iyile sağladıklarını belirtmişlerdir. Sayah ve ark. (2005) yüzey sularından izole ettikleri 26 *E. coli* suşunun, tetrasiklin ve ampisilin'e karşı %21,89 oranında direnç sağladıklarını vurgulamışlardır. Salehi ve Bonab (2006) Broiler piliçlerinden izole ettikleri 100 adet *E. coli* suşunun, tetrasiklin'e (%94), ampisilin'e (%47) ve seftazidim'e (%18) karşı dirençlilik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Luczkiewicz ve ark. (2011) yüzey sularından izole ettikleri 222 *E. coli* suşunun,

ampisilin'e (%21), tetrasiklin'e (%16), seftazidim'e (%3) karşı direnç gösterdiğini fakat imipenem'e karşı hiç direnç göstermediklerini saptamışlardır.

Akond ve ark. (2009) kümes hayvanlarından izole ettikleri 50 *E. coli* suşunun, ampisilin'e (%58) ve tetrasiklin'e (%52) karşı direnç gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Jalal ve ark. (2010) topraktan izole ettikleri 15 (1'i *E. coli*) Gram-negatif bakterinin, ampisilin, tetrasiklin, novobiyoisin ve basitrasin'e %100 direnç gösterdiklerini saptamışlardır. İslam ve ark. (2010) içme suyu şişelerinden ve belediye musluklarından izole ettikleri 10 *E. coli* suşunun, basitrasin (%100), tetrasiklin (%90) ve novobiyoisin (%60)'e oranında direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Poongothai ve ark. (2012) 700 idrar örneğinden izole ettikleri 153 *E. coli* suşunun, novobiyoisin (%92,1), ampisilin (%87,5), tetrasiklin (%81) ve basitrasin (%70,5)'e direnç gösterdiklerini saptamışlardır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz antibiyogram bulgularına bakıldığında, tüm isolatların basitrasin ve novobiyoisin'e direnç gösterdikleri. Ayrıca, tetrasikline (%7,5), ampisilin (%12,5), imipenem (%2,5) ve seftazidim (%5)'e karşı düşük oranlarda direnç göstermişlerdir. Bunların dışında, tüm suşların polimiksin B'ye karşı duyarlı oldukları saptandı. Daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğuna uygunluk göstermekle beraber görülen farklılıkların nedenleri arasında, bakterilerin farklı kaynaklardan izole edilmiş olmaları, farklı çevre şartlarına maruz kalmaları veya bulundukları ortamlara (Özellikle, akuatik ortam) dışarıdan gelen ve ilaçlara karşı taşıdıkları plazmitler ile dirençlilik kazanan türlerden bu dirençlilik genlerini almaları farklılıkların nedeni olabilir. Ayrıca bakterilerin horizontal gen transferi ve spontan mutasyonlarla direnç kazanabildiklerini ve tek bir spontan mutasyonla, dirençlilik belirli antibiyotiklere karşı gözlenirken, çoklu antibiyotik dirençliliği için çoklu mutasyonların olması gerektiği (Davies ve Davies, 2010; Lee ve ark., 2010; Toprak ve ark., 2012) görüşü de farklılık nedenlerinden biri olabilir. Dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında en büyük rolü R-plazmidleri tarafından sentezlenen β -laktamazlar oluşturmaktadır ve bu plazmidler bakteriler arasında yüksek bir yüzde ile transfer olmaktadır. Bu enzimlerden en sık rastlanılan TEM'den derive olmuş TEM-1 ve TEM-2 enzimidir ve bu enzimlerin *Enterobacteriaceae* üyelerinin yaklaşık %25-75'inde bulunması (Gutmann ve ark., 1988) diğer bir farklılık nedeni olabilir. Nikaido (1989) basitrasin ve novobiyoisin antibiyotiklerinin *E. coli*'yi etkileyememesinin sebebini, bu antibiyotiklerin *E. coli* dış membranını geçebilecek yeteneğe sahip olmadığı şeklinde açıklamıştır. Bu durum, her iki antibiyotik için elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Dikkat edilmesi gereken bir başka nokta, tüm isolatlarımızın çoklu antibiyotik dirençliliği göstermiş olmalarıdır. Vural ve Akçin

(2011) yaptıkları çalışmada su kaynaklı *E. coli* suşlarının en az 2 antibiyotiğe birden çoklu direnç taşıdıkları ve bu dirençliliklerini R plazmitleri ile aktarabilme yeteneğinde olduklarını ispat etmiş olmaları, plazmit'in çoklu dirençlilikteki önemi açısından, çalışmamızın bir başka aşaması olan plazmit üzerine yoğunlaşmamızı sağlayacaktır.

Yukarıda anlatılan klasik metotlar, zaman harcaması ve iş gücü gerektirmesine rağmen, mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılmasını takiben, kültür koleksiyonlarının saklanması ve bu organizmaların alt tiplere ayrılmasını sağlar. Bakterilerin alt tiplerine ayrılması için çok daha fazla klasik metot gereklidir ve bunlar mikroorganizmaların fenotipik karakteristikleri (biyotipleme, serotipleme ve faj tipleme)'nin çalışılmasını kapsar. Ancak, mikroorganizmaların, genetik mutasyonlar veya çevresel değişimlerden dolayı sahip oldukları fenotipik karakteristikleri aniden değiştirme yeteneğinde olduklarından dolayı bu fenotipik tipleme metotları sınırlıdır. Bu yüzden, karakterizasyonda fenotipik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda farklı teknikler (Genotipik gibi) kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2006).

Plazmid, bir bakteri tipleme aracı olarak kullanılan ilk moleküler metot olarak gösterilmiştir (Meyers ve ark., 1976; Schaberg, 1981; Liu ve ark., 1996; Tenover ve ark., 1997; Singh ve ark., 2006). Plazmidler, bakteri populasyonları arasında antibiyotik dirençlilik genlerinin taşınmasını sağlayan temel mekanizmalardır (Smalla ve ark., 2000). Holmberg ve ark. (1984) plazmidlerin identifikasyonda en azından faj tipleme kadar güvenilir olduğunu fakat yinede mikroorganizmaların tanımlamasında çok daha güvenilir olan moleküler metotlara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. Hanahan (1983) plazmid profil analizlerinin epidemiyolojik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanıldığını rapor etmiştir. Singh ve ark. (2006) ise plazmidlerin, eklemeler veya azalmalarla sık sık değişebilen ekstrakromozomal DNA parçaları olduğundan, genelde endemik ve epidemik suşlar arasındaki farklılığı belirtmede yararlı olmadıklarını vurgulamışlardır.

Araştırmamızda; test edilen toplam 41 adet *E. coli* suşunun plazmid DNA'ları fenol:kloroform:izoamil alkol presipitasyonu yöntemi kullanılarak izole edilmiş ve elde edilen plazmid analiz sonuçlarına göre, 22 (%53,6) suшта en az bir adet plazmidin bulunduğu belirlenmiştir. Plazmid taşıyan bu 22 suşun 20'sinde 14.700 bp (14,7 kb) moleküler ağırlığına sahip plazmid gözlenmiştir. Ayrıca, deniz suyundan izole edilen 2, 12, 21, 22, 28, 31 ve midyeden izole edilen 37 numaralı suşlarda birden fazla (2-13 plazmid) plazmid tespit edilmiştir. Jan ve ark. (2009) 76 *E. coli* izolatının %50'sinin çoklu antibiyotik dirençlilik gösterdiğini ve 40 (%52,6) *E. coli* suşunun plazmid

taşıdığını belirtmişlerdir. Bazı suşların bir plazmid bazılarının ise birden fazla plazmid (2,3 kb'dan 26 kb büyüklüklerinde) taşıdıklarını ve yüksek moleküler ağırlığa sahip plazmidleri taşıyan izolatların yüksek antibiyotik dirençlilik gösterdiklerini saptamışlardır. Çalışmamızda yüksek moleküler ağırlığa sahip plazmid taşıyan 2 (24.500 bp) numaralı suşun dört antibiyotiğe (basitrasin, novobiyosin, ampicilin ve seftazidim), bir diğer yüksek moleküler ağırlığa sahip 37 (20.973-17.081 bp) numaralı suşun ise iki antibiyotiğe (basitrasin ve novobiyosin) karşı dirençli olduğu görüldü. Ancak, hiç plazmid taşımayan 17, 32 ve 35 numaralı suşların sırasıyla 4, 4 ve 3 adet antibiyotiğe dirençli oldukları tespit edildi. Bu bulgularımız Jan ve ark. (2009)'nın elde ettikleri sonuçlara paralellik göstermemektedir. Farshad ve ark. (2012) izole ettikleri 96 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılıklarını belirledikten sonra tüm suşların 76'sında plazmid (1-10 arasında) tespit etmişler ve dirençli fenotipler ile plazmid profilleri arasında tutarlı bir ilişkinin olmadığını vurgulamışlardır. Berber ve ark. (2008) klinik örneklerden izole ettikleri 35 adet metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşunun plazmid DNA profilleri ve farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını incelemişler ve sonuç olarak araştırmacılar, antibiyotiklere karşı dirençlilikte plazmid sayısının önemli olmadığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar bulgularımıza paralellik göstermektedir.

Öter (2007) 13 *E. coli* suşunun plazmid izolasyonunu gerçekleştirmiş ve tüm suşlarda en az bir plazmide rastlamıştır. Suşların en az bir plazmid içermelerinin antibiyotik dirençliliği ile ilişkili olabileceğini ve ayrıca plazmid profillerine göre suşlar arasında bir ayırım sağlamanın mümkün olmadığını belirtmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, Öter'in sonuçlarıyla paraleldir. Birkaç çalışmada, mastitis tanısı konmuş hayvanlardan izole edilen *E. coli* izolatlarının ve hayvan kesimhanelerinden izole edilen *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* ve *Campylobacter* ve bunlara ek olarak kliniklerden izole edilen *E. coli* ve atık sulardan izole edilen *Salmonella* ve yine kliniklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının tiplendirilmesinde plazmid profillerine göre yapılan ayırımın faydalı olmadığı, ancak diğer moleküler ve epidemiyolojik tekniklerle beraber uygulandığında faydalı olabileceğini rapor etmektedirler (Walia ve ark., 1988; Uçan ve ark., 2003; Açıık ve ark., 2005; Öter, 2007; Zaki ve ark., 2009). Bu çalışmalardan elde edilen veriler bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Walia ve ark. (1988) *P. aeruginosa*, Pardesi ve ark. (2007) *Acinetobacter spp.* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını ve plazmid profillerini çalışmış ve aralarında önemli bir bağlantının olmadığını bildirmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların yapılan bu çalışmalarla uyumlu olduğu görüldü.

Bakterilerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) protein profil analizi, özellikle diğer tanımlama metotlarıyla memnun edici sonuçların alınmadığı zamanlarda, bir başka tipleme metodu olarak, medikal öneme sahip bakterilerin tür yada tür altı seviyede ayrımını sağlayan etkili bir araçtır (Holmes ve ark., 1990). Toplam hücre ve hücre dışı SDS-PAGE protein profilleri, taksonomideki uygulamalarıyla oldukça yüksek ayırım gücüne sahip tipleme metotlarıdır. 1980’lerde bu teknik çeşitli organizmalara uygulanmakla beraber, 1990’lar süresince, çoğunlukla DNA temelli metotların yerini almıştır (Vandamme ve ark., 1996; Belkum ve ark., 2007). Bakterilerde proteinler, genomlarının bir yansıması olduğu için, toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri identifikasyon, sınıflandırma, tiplendirilme ve kıyaslamada önemli roller oynar (Kustos ve ark., 1998). SDS-PAGE ile analizi yapılan toplam hücre protein profillerinin, suşların tiplendirilmesinde yararlı olduğu ve çoğu diğer tipleme metotlarına benzer ya da daha iyi ayırım sağladığı görüşü daha önce, *Corynebacterium* (Jackman, 1982; Jackman ve Pelczynska, 1986), *Pseudomonas aeruginosa* (Walia ve ark., 1988) ve *Clostridium* (Sathish ve Swaminathan, 2009) suşlarıyla yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir.

Jackman (1982), Vandamme ve ark. (1996) ve Akçimen (2010), elektroforetik modeller ile ortaya çıkarılan toplam hücre protein profillerinin DNA:DNA hibridizasyon tekniğiyle iyi bir korelasyon oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Son yıllarda, SDS-PAGE tekniği kullanılarak birçok cinse ait mikroorganizmaların toplam ve dışsal hücre protein profilleri belirlenerek gerek tür gerekse tür altı seviyede ayırım yoluna gidilmiş ve bu yöntemin bazı cinslere ait türlerin ayrımında oldukça faydalı olduğu belirlenmiştir (Costas ve ark., 1993; Uçan ve ark., 2003; Berber, 2004; Berber ve Berber, 2006; Öter, 2007).

Çalışmamızda seçilen 41 *E. coli* suşunun SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edilen toplam hücre ve 32 *E. coli* suşunun hücre dışı protein profillerine göre karşılaştırılması yapıldı. SDS-PAGE analizine göre suşların hepsinin yüksek düzeyde benzer protein profillerine sahip oldukları fakat yinede bazı bant farklılıklarının olduğu saptanmıştır. Toplam hücre protein profillerinde, 219,5; 113,5; 113,1; 105,3; 92,4; 80,4; 61,1; 58,7; 56,9; 52,6; 52,1; 46,5; 37,5 ve 35,8 kDa molekül ağırlığına sahip bantların suşlar arasında farklılık gösterdiği tespit edildi. Diğer taraftan, hücre dışı protein profillerinde de bazı minör farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Özellikle 176,8; 126,6; 119,5; 115,5; 111; 107,5; 104,3; 59; 57,6; 55,6; 53,2; 46,6; 46; 44,5 ve 40,1 kDa molekül ağırlığındaki protein bantlarının suşlar arasında farklılıklar gösterdiği görüldü.

Toplam hücre ve hücre dışı protein profillerindeki yüksek benzerlik düzeyine bakılarak, suşlar arasında bir ayırım yapmanın oldukça güç olduğu söylenebilir. Ancak hücre dışı protein profilleriyle suşlar arasında daha fazla bant farklılıklarının olduğu, buda tür altı seviyede ayırım da hücre dışı protein profilinin daha faydalı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar Berber ve ark. (2003), Öter (2007), Çine (2012) ile uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda, SDS-PAGE metodu ile elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri esas alınarak, benzerlik aritmetik ortalama algoritmasıyla ağırlıksız eşleşme grup metoduna (UPGMA) göre dendrogramlar oluşturuldu. *E. coli* izolatlarının toplam hücre protein profilleri benzerlik düzeyi ilk 15 ve referans suşları için %72 ve üzerinde (Şekil 4.15) iki gruba (A-B) ayrıldı. Birinci grup (A) sadece referans suşu kapsarken ikinci grup (B) ise benzerlik düzeyi %88 ve üzerinde olan iki alt gruba ayrılmıştır. İkinci 15 (15-31 arası) ve referans suşları için toplam hücre protein profilleri benzerlik düzeyi %87 ve üzeri (Şekil 4.16) iki gruba (C-D) ayrıldı. Yine ilk grup (C) sadece referans suşu barındırırken, ikinci grup (D) benzerlik düzeyi %92 ve üzerinde iki alt grup oluşturmuştur. Son 10 (31-40 arasındakiler dâhil) ve referans suşları için toplam hücre protein profilleri benzerlik düzeyi %78 ve üzeri (Şekil 4.17) iki gruba (E-F) ayrıldı. İlk grup (E) yine sadece referans suşu barındırırken, ikinci grup (F) benzerlik düzeyi %89 ve üzerinde iki alt gruba bölünmüştür. Her üç dendrograma referans suşun oluşturduğu grup göz ardı edilip bakıldığında, izole ettiğimiz suşlar arasındaki benzerlik düzeylerinin %88- %92- %89 ve üzerinde olması incelenen suşların identik olduğunu göstermektedir.

Hücre dışı proteinleri esas alınarak yapılan nümerik analizde, ilk 22 ve referans suşlarının benzerlik düzeyi %78 ve üzeri (Şekil 4.18) iki gruba (H-K) ayrıldı. İlk grup (H) toplam hücre dendrogramlarında olduğu gibi yine sadece referans suşu kapsarken, ikinci grup (K) benzerlik düzeyi %85 ve üzeri olan iki alt grup oluşturmuştur. Son 9 ve referans suşlarının benzerlik düzeyi %75 ve üzeri (Şekil 4.19) iki gruba (R ve S) ayrıldı. Birinci grup (R) benzerlik düzeyi %80 ve üzeri olan iki alt grubu oluştururken, ikinci grup (S) yalnızca 28 numaralı suştan ibarettir.

Sonuç olarak, dendrogramlar incelendiğinde, toplam hücre dışı protein profilleri ile yapılan nümerik analizin toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analize kıyasla daha ayırıcı olduğunu söyleyebiliriz. Bunun dışında, dendrogramlar incelendiğinde deniz suyu ve midyelerden izole edilen *E. coli* suşlarının birbirlerine yakın benzerlik gösterdiği tespit edildi.

RAPD tekniği, tür içi ve türler arası seviyede benzerliklerin tanımlanmasını kolaylaştıran DNA tiplendirme metodu olarak gösterilmiştir (Roberts ve Crawford, 2000; Coenye ve ark., 2005; Gündoğdu, 2006). Bu çalışmada, izole edilen 19 *E. coli* ve 1 referans suş arasındaki benzerlik RBM-6 ve Col-I primerleri kullanılarak RAPD-PCR ile araştırılmıştır. RBM-6 primeri ile çalışılan 20 suşun 7'sinde herhangi bir bant görölmedi. Diğer 13 suşun RAPD parmak izleri en düşük 1 (22 ve 29 numaralı suşlar), en yüksek 8 (16 numaralı suş) fragment sayısında ve 985-3.500 bp aralığında bant oluşturmuşlardır. Col-I primeri ile 20 suşun 6'sında bant tespit edilemedi. Diğer 14 suşta en düşük 1 (25, 26, 27 ve 28 numaralı suşlarda), en yüksek 8 (21 numaralı suş) fragment sayısında ve 855-3.473 bp aralığında bant üretmişlerdir. Birkaç izolatin her iki primerle de bant üretmediği tespit edildi. Bu durum izolatların kromozomal DNA'sında primerlerin bağlandığı spesifik yerleri kaybettiği şeklinde açıklanabilir.

RAPD temelli DNA parmak izi analizlerinin moleküler tiplendirme için değerli bir araç olduğunu ve *E. coli* serotiplerinin ayırt edilmesinde hızlı bir vasıta olarak iş gördüğü görüşü yapılan bazı çalışmalarda (Pacheco ve ark., 1997; Vogel ve ark., 1999; Radu ve ark., 2000; Chansiripornchai ve ark. 2001; Fei ve ark. 2003; Gomes ve ark., 2005; Sahilah ve ark., 2010; Alzahrani ve Gherbawy, 2011; Samuel ve ark., 2011) bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda yapılan bu çalışmalara uygunluk göstermektedir.

Maity ve Guru (2007) 13 adet laboratuvar kemirgen (rodent)'inden izole ettikleri patojenik *E. coli* suşlarını 10 RAPD primeri kullanarak incelemişler ve farklı rodent türlerinden izole ettikleri *E. coli* için 10 RAPD primerine karşı toplam 6724 bant gözlemişlerdir. Araştırmacıların çalıştıkları bu primerler içerisinden RBM-1 primerinin en etkili olduğu bizimde çalışmamızda kullandığımız RBM-6 primerinin laboratuvar rodentlerin de patojenik *E. coli* suşlarını identifiye etmek için yeterli olmadığını belirtmişlerdir. Bu durum aynı primerin çalıştığımız 20 suştan 7'sinde bant vermemiş olmasıyla özdeşleştirildiğinde bulgularımızın bu çalışmaya paralellik gösterdiğini söyleyebiliriz. Bir başka çalışmada, Chansiripornchai ve ark. (2001) 55 *E. coli* izolatına RAPD metodu uygulayarak, iki farklı primer ile çalışmışlar ve 50 farklı profil elde etmişlerdir.

Kılıç ve ark. (2009) collibacillosis şüpheli farklı kanatlı işletmelerinden izole ettikleri 48 *E. coli* suşu arasındaki genetik farklılığı tespit etmek için RAPD yöntemi uyguladılar. Primer olarak bizimde çalışmamızda tercih ettiğimiz COL-I ile DNA'ları çoğaltmış ve 9 farklı profil elde etmişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlar doğrultusunda,

RAPD metodunun *E. coli*'leri izole ettikleri bölgede bu bakteri soyları arasında yüksek genetik farklılık gösterdiğini saptamış ve RAPD metodunun *E. coli* suşlarını tiplendirmede yüksek oranda ayırıcı olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda iki farklı primerle DNA'larını çoğalttığımız 20 izolatın %65 (13)'ünde RBM-6 primeriyle 12 farklı profil, yine COL-I primeriyle izolatların %70 (14)'ünde 10 farklı profil gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar mevcut çalışmalara uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda, RBM-6 ve COL-I primerleri kullanılarak, RAPD metodu ile elde edilen profillerin benzerlik aritmetik ortalama algoritmasıyla ağırlıksız eşleşme grup metoduna (UPGMA) göre dendrogramlar oluşturuldu. *E. coli* izolatlarının RBM-6 primer profilleri benzerlik düzeyi sadece bant üreten 13 suş için %12 ve üzeri (Şekil 4.24) iki gruba (X-Y) ayrıldı. Birinci grup (X) benzerlik düzeyi %27 ve üzerinde olan iki alt gruba (X_1 - X_2) ayrılmıştır. Bunlardan X_1 grubunun benzerlik düzeyi %38 ve üzeri olan 11 suşu kapsadığı görülmüştür. RBM-6 dendrogramına göre Y grubu üyesi 29 ve X_2 grubu üyesi 22 nolu izolatların diğer suşlardan uzak olduğu ve sırasıyla, %12-27 oranında benzerliğinde kafaları karıştıran bir durum olarak karşımıza çıktığını söyleyebiliriz. Diğer bir primer olan Col-I primer profilleri benzerlik düzeyi sadece bant üreten 14 suş için %26 ve üzeri (Şekil 4.25) iki gruba (P-Z) ayrıldı. Z grubu birbirlerine %100 benzerlik gösteren 4 suş (25, 26, 27 ve 28)'dan oluşurken, P grubu benzerlik düzeyi %33 ve üzeri olan iki gruba (P_1 ve P_2) ayrılmıştır.

Moreira ve ark. (2012) 81 *E. coli* izolatının REP-PCR profilleriyle oluşturdukları cluster da benzerlik seviyesini, %14'den %98'e oranlarında tespit etmişler ve izolatların oldukça yüksek oranda çeşitlilik gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Kılıç ve ark. (2003) idrar örneklerinden izole ettikleri 61 *E. coli* suşundan çoklu antibiyotik direçliliği gösteren 32 suş RAPD-PCR yöntemi ile genotiplendirilmiştir. Sonuç olarak elde ettikleri dendrogramda benzerlik seviyesi %0-100 aralığında 12 grup saptamışlar bu durumda, RAPD yönteminin izolatlar arasında oldukça yüksek çeşitlilik gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmamızda elde ettiğimiz dendrogramların bu çalışmalara uyumluluk gösterdiği bulundu.

Çalışmamızda, her iki primer için UPGMA metoduyla elde edilen dendrogramlar karşılaştırıldığında RBM-6 primerinin izolatlar için daha ayırıcı olduğunu fakat Col-I primerinin, RBM-6'ya göre daha fazla suşta bant ürettiği tespit edildi. Ayrıca aynı suşların farklı primerler ile benzerlik düzeylerinin farklı olduğu (Örn, RBM-6 ile %27 benzerlik düzeyinde 22 numaralı suş, Col-I primeri ile %62 ve üzeri benzerlik düzeyine sahip P_1 grubunda görülmesi) saptandı. Bunun dışında, midye

ve deniz suyundan izole edilen suşlar kıyaslandığında, midyeden izole edilen suşlardan bant üretenler birbirlerine yakınlık gösterirken, deniz suyundan izole edilen suşlardan da pek fazla ayrılmadıkları tespit edildi.

Çalışmamızda izole ettiğimiz *E. coli* suşlarının tiplendirilmesi için yaptığımız biyokimyasal testler, antibiyotik duyarlılıkları, plazmit profilleri ve toplam hücre ve hücre dışı SDS-PAGE analizleri tür seviyesinde identifikasyon için yeterli olurken, tür altı seviyede identifikasyon için seçilen RAPD-PCR yönteminin doğru bir tercih olduğunu söylemek yerinde olacaktır.

Mikrobiyal sınıflandırmanın temel amacı izole edilen mikroorganizmaları tür seviyesine kadar tanımlamaktır. Ancak, bir türün farklı suş ve genotiplerinin ayrımı veya tiplendirmesi endüstriyel noktada giderek artan bir önem kazanmaktadır. İncelenecek herhangi bir suşun tiplendirilmesi yapılırken, fenotipik, kimyasal ve nükleik asit verilerinin kombine bir şekilde kullanılması filogenetik sınıflandırılmanın yapılmasına izin verir (Wayne ve ark., 1987) ve böylece karşılaşılan bu suş tehlikeli olsun olmasın, olası tekrarlanan rastlantılar hakkında bilgi sahibi olunmakla beraber meydana getirebileceği tehlikeler konusunda da önlemler alınmış veya alınmaya çalışılacaktır.

Çoklu antibiyotik dirençliliği gösteren suşlar, diğer enterik organizmalara plazmitleri aracılığıyla dirençlilik genini aktarabilme yeteneğine sahip oldukları için antibiyotiklere dirençli suşların yayılmasını önlemeli ve bu suşlarla mücadelede gerekli tedbirler alınmalıdır. Özellikle, insan bakteri florasının antibiyotik dirençlilik transferinde önemli bir rolü üstlenmesi (Pardesi ve ark., 2007), kanalizasyon ve diğer atıkların çevreye bırakılmadan önce arıtım işlemlerine tabi tutulması gereğini açıkça öne sürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada belirlenen bazı istasyonlardan toplanan su ve midye örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları, istasyonlardaki mikrobiyal kirlilik düzeyinin ciddi boyutlara ulaştığını göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmada izole edilen *E. coli* suşlarının ayırımında morfolojik ve fizyolojik özellikler, SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerinin nümerik analizi tür seviyesinde yeterli bulunurken, tür altı düzeyde ayırım için RAPD-PCR tekniğinin daha faydalı ve hızlı bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur.

6. KAYNAKÇA

- Abdelzaher, A.M., Wright, M.E., Ortega, C., Solo-Gabriele, H.M., Miller, G., Elmir, S., Newman, X., Bonilla, P.S.J. A., Bonilla, T.D., Palmer, C.J., Scott, T., Lukasik, J., Harwood, V.J., McQuaig, S., Sinigalliano, C., Gidley, M., Plano, L. R.W., Zhu, X., Wang, J.D., Fleming, L.E. 2010. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(3): pp. 724–732.
- Abdo, M.H., Sabae, S.Z., Haroon, B.M., Refaat, B.M., Mohammed, A.S. 2010. Physico-chemical characteristics, microbial assessment and antibiotic susceptibility of pathogenic bacteria of Ismailia canal water, river Nile, Egypt, *J. American Sci.*, 6(5): 234-250.
- Açık, L., Temiz, A., Çelebi, A., Arslan, S., Yılmaz, R. 2005. Protein patterns and plasmid profiles of the bacterial strains isolated from a poultry slaughterhouse in Ankara, Turkey. *Food Technol. Biotechnol.*, 43: 255–262.
- Ahmer, M.M., Gunn, J.S. 2011. Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota, *Front. Microbiol.*, 2(101): 1-9.
- Akar, S. 2009. İzmir İç Körfezi’nde, Kıyı Sularında ve Kara Midyelerde (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) Fekal Koliform Bakterilerin İzlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 97 s.
- Akçimen, B. 2010. Hastane Enfeksiyonlarından İzole Edilen Vankomisin Dirençli Enterokokların Pulsed Field Jel Elektrophoresis Yöntemiyle Genotip Tayini, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 128 s.
- Akhan, M. 2007. Bir Kaynak Suyu Tesisindeki Mikrobiyal Kontaminasyon Kaynaklarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 75 s.
- Akond, M.A., Alam, S., Hassan, S.M.R., Shirin, M. 2009. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Inter. J. Food Safety*, 11: 19-23.
- Aktürk, S., 2009. Adana-Tufanbeyli Yol Hattındaki Çeşme Sularının Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 93 s.

- Alhaj, N., Mariana, N.S., Raha, A.R., Ishak, Z. 2007. Prevalence of antibiotic resistance among *Escherichia coli* from different sources in Malaysia, Res. J. Pharma., 1(2): 44-49.
- Alkan, U., Çalışkan, S., Mescioğlu, Ü. 1999. Uluabat gölünün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi. Eko. Çev. Kor., 33: 3-5.
- Altuğ, G., Yardımcı, C.H., İçöz, I.O. 2005. Haliç yüzey sularında *Enterobacteriaceae* üyelerinin bazı betalaktam antibiyotiklerine dirençlilik frekansı. Türk Sucul Yaşam Derg., 3(4): 258-264.
- Alzahrani, A.M., Gherbawy, Y.A. 2011. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa region. Afr. J. Microbiol. Res., 5(2): 123-130.
- American Public Health Association (APHA). Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. (ed.). 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19th ed.), APHA, Washington, DC.
- American Public Health Association (APHA). 1998. Standard Methods for The Examination of Water and Waste Water, 20th Edition. APHA, Washington DC.
- Anand, N.N., Bukanov, T.U., Westblum, S., Kresovich, S., Berg, D.E. 2001. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Res., 20: 5137-5142.
- Andrew, P.W., Mitchell, T.J. 1997. The biology of *Streptococci* and *Enterococci*. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement. The Soc. for Appl. Bacteriol., Blackwell Science, Osney Mead, Oxford, UK., 83: p. 126.
- Anonim. 2003. www.epa.gov/water/programs/owintro
- Anonim. 2006a. Yüzme suyu kalitesi yönetmeliği. Resmî gazete, (26048).
- Anonim. 2006b. Merck Microbiology Manual. 12th Edition. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, pp. 287-288.
- Anonim. 2007. (Erişim tarihi 23.11.2012) <http://www.epi-net.org/eng/past>
- Anonim. 2009a. <http://www.goodplanet.info/eng/Pollution/Oceans/Sea-pollution>.
- Anonim. 2010. Merck Mikrobiyoloji El Kitabı (Rapid Access). Eds: A. Kadir Halkman, Özlem Etiz Sağdaş, Arkadaş Matbaacılık, Ankara, 234 s.
- Anonim. 2011. (Erişim tarihi, 04.02.2011) <http://tr.wikipedia.org/wiki/Sinop>.
- Anonim, 2012a. <http://genotyping.wordpress.com> 2007/06/02
- Anonim, 2012b. (Mustafa ARDA-Plazmid ve Epizomlar) [http:// www.mikrobiyoloji.org](http://www.mikrobiyoloji.org)
- Anonim. 2012c. (Erişim tarihi 06.08.2012) <http://www.mikrobiyoloji.org>

- Arbeit, R.D., Slutsky, A., Barber, T.W., Maslow, J.N., Niemezyk, S., Falkinham, J.O., O'Connor, G.T., Reyn, C.F. 1993. Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. J. Infect. Dis., 167: 1384–1390.
- Ash, E., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunits ribosomal RNA sequences. Letters Appl. Microbiol., 13: 2002-2006.
- Ashbolt, N.J., Grabow, W.K., Snozzi, M. 2001. Indicators of Microbial Water Quality. in L. Fewtrell & J. Bartram (Eds.), Water Quality: Guidelines, Standards and Health London: IWA. pp. 289–316.
- Association of Public Health Laboratories (APHL). 2012. Guidance for Public Health Laboratories, Isolation and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Clinical Specimens, p. 102.
- Auer, M.T., Niehaus, S.L. 1993. Modeling fecal coliform bacteria–I. field and laboratory determination of loss kinetics. Water Res., 27: 693–701.
- Aydın, S. Ö. 2004. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği, DPÜ Fen Bil. Enst. Derg., 6: 113-130.
- Babalola, O.O. 2003. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. Afr. J. Biotech., 2(12): 710-713.
- Balcı, R.S. 2007. Seyhan Baraj Gölünün Bakteriyoloji Kirlilik Düzeyinin Belirlenmesi ve *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Antibiyotik Dirençliliği, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 79 s.
- Barton, H.A., Pace, N.R. 2005. Discussion: Persistent coliform contamination in Lechuguilla cave pools, J. Cave Karst Stud., pp. 55-57.
- Bashir, M.F., Qazi, J.I., Ahmad, N., Riaz, S. 2008. Diversity of urinary tract pathogen and drug resistant isolates of *Escherichia coli* in different age and gender groups of Pakistan. Trop. J. Pharma. Res., 7(3): 1025-1031.
- Baştürk, S. 2005. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi, 61 s.
- Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M. 2007.

- Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13 (Supl. 3): 1–46.
- Belloso, C.O. 2000. Absence of *Escherichia coli* 0157:H7 in waters interdisciplinary perspectives on drinking water risk assessment and management (Proceedings of the Santiago (Chile) Symposium, September 1998). IAHS Pub., 260: pp. 33-35.
- Berber, I., 2004. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. J. Cell Mol. Biol., 3: 33–37.
- Berber, I., Cokmus C. 2001. Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by Native-PAGE. Bull. Pure and Appl. Sci., 20(1): 17-21.
- Berber, I., Berber, S. 2006. Numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns of facultative alkaliphilic *Bacillus* Species isolated from Lake Van, Turkey, Fresen. Environ. Bull., 15: 409-416.
- Berber, I., Cokmus, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS-PAGE of whole-cell and extracellular proteins. Microbiol., 72: 42–47.
- Berber, I., Ekin, S. 2008. Discrimination and numerical analysis of human pathogenic *Candida albicans* strains based on SDS-PAGE protein profiles. Afr. J. Biotech., 7(4): 425-429.
- Berber, İ., Alan, N., Önlü, H. 2008. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MDSA) suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Y. Y. Ü. Fen Bil. Enst. Derg., 13(1): 35-38.
- Berber, İ., Özgökçe, F., Şeker, A. 2009. Van yöresinde yetişen bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. Y.Y.Ü Fen Bil. Derg., 14(2): 117-121.
- Berber, I., Alan, N., Ekin, S., Onlu, H. 2010. Use of the different polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) methods in the characterization of human pathogenic *Staphylococcus aureus* strains. Asian J. Chem., 22(4): 3173-3185.
- Berzeg, D. 2005. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ve E Test ile Vankomisin MİK Değerlerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 96 s.
- Bilgehan, H. 1996. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 8. Basım, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, İzmir, 592 s.
- Bilgehan, H. 2000. “*Escherichia*” Klinik mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 10. baskı: sayfa 3-17.

- Bitton, G., 2005. Microbial Indicators of Fecal Contamination. Ph. Doctora, Universty of Florida, Gainesville, FL., p. 71.
- Bordalo, A.A., Onrassami, R., Dechsakulwatana, C. 2002. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand), J. Appl. Microbiol., 93: 864–871.
- Boyer, D.G. 2008. Fecal coliform dispersal by rain splash on slopes, Agricult. Forest Meteor., 148: 1395-1400.
- Brenner, D.J., Farmer, J.J. 2005. Order XIII. “Enterobacteriales”. Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Vol. 2 (The Proteobacteria), part B, Springer, New York, pp. 587-607.
- Brenner, D.J., Richard, C., Steigerwalt, A.G., Asbury, M.A., Mandel, M. 1980. *Enterobacter gergoviae* sp. Nov.: A new species of *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens and the environment. Int. J. Syst. Bacteriol., 30: 1–6.
- Burkhardt, W., Calci, K.R. 2000. Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. Appl. Environ. Microbiol., 66(4): 1375–1378.
- Byappanahalli, M.N., Whitman, R.L., Shively, D.A., Sadowsky, M.J., Ishii, S. 2006. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a great lakes watershed. Environ. Microbiol., 8(3): 504-513.
- Cenis, J.L. 1993. Identification of four major *Melioidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). Phytopathology, 83: 76-80.
- Chang, G.W., Brill, J., Lum, R. 1989. Proportion of β -Glucuronidase-negative *Escherichia coli* in human fecal samples. Appl. Env. Microbiol., 55(2): pp. 335-339.
- Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Sasipreeyajan, J., Svenson, S.B. 2001. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Vet. Microbiol., 80: 75-83.
- Chao, W.L. 2006. Evaluation of Colilert-18 for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in tropical fresh water. The Soc. Appl. Microbiol., 42: 115-120.
- Chatterjee, S.N., Das, D., Roy, M., Banerjee, S., Dey, P., Bhattacharya, T., Chandra, G. 2007. Bacteriological examination of drinking water in Burdwan, India with reference to coliforms. Afr. J. Biotech., 6(22): 2601-2602.

- Clark, D. 2005. Molecular Biology, Elsevier Academic Press, Southern Illinois University, USA, p. 802.
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. FEMS Microbiol. Rev., 29: 147-167.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. 1985. Microbiological Methods. (5th ed.). Butterworths, London, p. 243.
- Coombes, B.K., Gilmour, M.W., Goodman, C.D. 2011. The Evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Front. Microbiol., 2(90): 1-3.
- Costas, M., Cookson, B.D., Talsania, H.G., Owen, R.J. 1989. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 27: 2574-2581.
- Costas, M., Holmes, B., Frith, K.A., Riddle, C., Hawkey, P.M., 1993. Identification and typing of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* biogroups 2 and 3, from clinical sources, by computerized analysis of electrophoretic protein patterns. J. Appl. Bacteriol., 75: 489-498.
- Craig, D.L., Fallowfield, H.J., Cromar, N.J. 2004. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. J. Appl. Microbiol., 96: 922-930.
- Croci, L., Suffredini E., Cozzi, L., Toti, L. 2002. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. J. Appl. Microbiol., 92: 460-465.
- Çine, N. 2012. Dış çürüklerinden *Staphylococcus aureus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sinop Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sinop, 89 s.
- Çotuk, A., Kimiran, A. 2004. İstanbul Boğazı deniz suyu örneklerinde indikatör bakterilerin dağılımı. Orlab-online Mikro. Derg., 2 (5): 22.
- Danishta, I., Ismet, M., Sonatun, D., Jaufeerally-Fakim, Y. 2010. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates from environmental and waste water samples in Mauritius. Adv. Environ. Biol., 4(1): 1-9.
- David, M.M., Haggard, B.E. 2011. Development of regression-based models to predict fecal bacteria numbers at select sites within the Illinois River watershed, Arkansas and Oklahoma, USA. Water Air Soil Pollut., 215: 525-547.
- Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 74: 417-433.

- Dayioğlu, H., Özyurt, M. S., Bingöl, N., Yıldız, C. 2004. Kütahya ili içme sularının bazı fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik özellikleri. DPÜ Fen Bil. Enst. Derg.. (7): 71-90.
- De Donno, A., Liaci, D., Bagordo, F., Lugoli, F., Gabutti, G. 2008. *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of microbiological pollution of coastal waters: a study conducted in the Salento Peninsula (Italy). J. Coast. Res., 1: 216-221.
- De Sousa, C.P., 2003. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: An evolutionary view, biological and health centre, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil. The Braz. J. Infect. Dis., 7(1): 23-31.
- Dickey, R.S., Zumoff, C.H. 1988. Emended description of *Enterobacter cancerogenus* comb. Nov. (Formerly *Erwinia cancerogena*). Int. J. Syst. Bacteriol., 38: 371–374.
- Dinç, G., Ata, Z., Temelli, S. 2012. Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 59: 85-88.
- Doğan, H.B., Halkman, A.K. 1998. *E. coli* sayımında EC Broth+Tryptofan ile LST Broth+MUG besiyerlerinin kullanılması. Gıda, 23(6): 425-429.
- Dursun, S.G., Kaya, O. 2010. Broiler piliçlerinden *Escherichia coli* O157:H7 serotipi'nin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 37(1): 19-31.
- Edberg, S.C., Edberg, M.M. 1988. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. The Yale J. Biol.Med., 61: 389-399.
- Edberg, S.C., Rice, E.W., Karlin, R.J., Allen, M.J. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. J. Appl. Microbiol., 88(Suppl.): 106–116.
- Efstratiou, M.A. 2001. Managing coastal bathing water quality: The contribution of microbiology and epidemiology. Marine Pollut. Bull., 42: 425-432.
- EL-Jakee, J., Moussa, E.I., Mohamed, K.F., Mohamed, G. 2009. Using molecular techniques for characterization of *Escherichia coli* isolated from water sources in Egypt. Global Vet., 3(5): 354-362.
- Erkan, M.E., Vural, A. 2006. Dicle nehrinin hijyenik kalitesi üzerine bir araştırma. Dicle Tıp Derg., 33 (4): 205-209.

- EU (European Union). 2006. Directive 2006/7/EC of The European Parliament and The Council Concerning The Management of Bathing Water Quality. Offic. J. Eur. Commun., 64: 37-61.
- Ezeugwunne, I.P., Agbakoba, N.R., Nnamah N.K., Anahalu, I.C. 2009. The Prevalence of bacteria in packaged sachets water sold in Nnewi, South East, Nigeria. W. J. Dairy Food Sci., 4(1): 19-21.
- Farmer, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner, F.W., McWorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asburi, M.A., Riddle, C., Wathe-Grady, H.G., Elias, C., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., O'Hara, C.M., Morris, G.K., Smith, P.B., Brenner, D.J. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 21: 46-76.
- Farshad, S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., Mohammadzadegan, R. 2012. Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children in Jahrom, Iran. Arch. Iran Med., 15(5): 312-316.
- Fei, W.K., Radu, S., Kqueen, C.Y., Benjamin, P.G., Wong, C.M., Ling, V., Fong, H.S., Harun, A., Khiong, L.S., Kiew, L.P. 2003. Antibiotic resistance, plasmid profile and RAPD-PCR analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) clinical isolates. S. Asian J. Trop. Med. Pub. Health, 34: 620-626.
- Fu, L., Shuai, J., Wang, Y., Ma, H., Li, J. 2011. Temporal genetic variability and host sources of *Escherichia coli* associated with fecal pollution from domesticated animals in the shellfish culture environment of Xiangshan Bay, East China Sea. Environ. Pollut., 159(3): 2808-2814.
- Gagliardi, J.V., Karns, J. S. 2000. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural practices. Appl. Environ. Microbiol. 66: 877-883.
- Gatti, M., Fornasari, E., Neviani, E. 1997. Cell wall protein profiles of dairy thermophilic *lactobacilli*. Lett. Appl. Bacteriol., 25: 345-348.
- Gerardi, M.H., Zimmerman M.C., 2005. Wastewater Pathogen, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 188.
- Gibbard, J.F., Campbell, A.G., Needler, A.W.H., Medcof, J.C. 1942. Effect of hibernation on content of coliform bacteria in oysters. American J. Pub. Health, 32: pp. 979-986.

- Gerba, P.C. 2000. "Environmental Microbiology". Indicator Organisms, Academic Press, California. pp. 491-503.
- Google Earth. 2012. (<https://maps.google.com/maps>).
- Gomes, A.R., Muniyappa, L., Krishnappa, G., Suryanarayana, V.V.S., Isloor, S., Prakash, B., Hugar, P.G. 2005. Genotypic characterization of avian *Escherichia coli* by Random Amplification of Polymorphic DNA. Int. J. Poultry Sci., 4(6): 378-381.
- Gomis, S.M., Riddell, C., Potter, A.A., Allan, B.J. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. Can. J. Vet. Res., 65: 1-6.
- Gonzalez, A.M., Paranhos, R., Lutterbach, M.S. 2010. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio De Janeiro Brazil. Environ. Monit. Assess., 164: 207–219.
- Gourmelon, M., Lazure, P., Hervio-Heath, D., Le Saux, J.C., Caprais, M.P., Le Guyader, F.S. Catherine, M. Pommepuy, M. 2010. Microbial modelling in coastal environments and early warning systems: Useful tools to limit shellfish microbial contamination. World Health Organization (WHO). Safe management of shellfish and harvest waters. Edited by G. Rees, K. Pond, D. Kay, J. Bartram and J. Santo Domingo. Published by IWA Publishing, London, UK. pp. 297-318.
- Goverment of Western Australia. 2009. Surface water sampling methods and analysis: Technical appendices: Standard operating procedures for water sampling: Methods and analysis. Department of Water, Australia, p. 59.
- Gökkurt, O. 2007. Sinop Kıyılarında Potansiyel Deşarj Noktalarının Suyun Kalitesine ve Canlılara Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 202 s.
- Gutmann, L., Kıtız, M.D., Billot-Klein, D., Goldstein, F., Tran Van Nhieu, G., Lu, T, Carlet, J., Collatz, E., William son, R., 1988. Plasmid mediated beta-lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam, Rev. Infect. Dis. 10: 860-866.
- Gündoğdu, E. 2006. Termofilik *Streptomyces* spp.'lerin Moleküler Taksonomisi. Doktora Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 161 s.

- Güneş, K. 2006. Klinik Örneklerde PZR–RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu–Restriksiyon Bölümünün Uzunluk Değişkenliği) Yöntemi Kullanılarak *Leishmania* Parazitlerinin Tür Tayini. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 183 s.
- Halkman, A.K., Tunail, N. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı, 7. Bölüm, Sim Matbaacılık, Ankara, 552 s.
- Halkman, A.K. (Ed.). 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık, Ankara, 334 s.
- Haque, A., Mehwish, J., Saira, B., Mashkoo, M., Ayesha, T., Aasia, B., Asma, H., Yasra, S., Aamir, A. 2007. Differentiation of common Gram-negative pathogens by PCR-Ribotyping. J. Med. Sci., 23(2): 223-333.
- Hamilton, W.P., Kim, M., Thackston, E.L. 2005. Comparison of commercially available *Escherichia coli* enumeration tests: Implications for attaining water quality standards. Water Res., 39: 4869–4878.
- Hamzah, A., Kipli, S.H., Ismail, S.R. Una, R., Sarmani, S. 2011. Microbiological study in coastal water of Port Dickson, Sains Malays., 40(2): 93–99.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 166: 551-5.
- Hasan, N.A. 2008. Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) Fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7, Master Thesis, University of Malaya, Biotech. Sci., p. 64.
- Hatha, M., Chandran, A., Varghese, S., 2008. Increased prevalence of indicator and pathogenic bacteria in the Kumarakom Lake, Sengupta, M., Dalwani, R. (Editors). 2008. Prooceding of taal 2007: The 12th World Lake Conference, pp. 250-256.
- Heijnen, L., Medema, G. 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other Shiga Toxin Producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with Real-Time PCR. J. Water Health, 4 (4): 487–498.
- Henard, C.A., Vázquez-Torres, A. 2011. Nitric oxide and *Salmonella* pathogenesis, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, USA. Front. Microbiol., 2(84): 1-11.
- Hernandez-Delgado, E.A., Toranzos, G.A. 1995. *In Situ* replication studies of somatic and male-specific coliphages in a tropical Pristine River. Water Sci. Technol., 31: 247-250.

- Hill, D.D., Owens, W.E., Tchounwou, P.B. 2006. The impact of rainfall on fecal coliform bacteria in Bayou Dorcheat (North Louisiana). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 3(1): 114-117.
- Holmberg, S.D., Wachsmuth, I.K., Hickman-Brenner, F.W., Cohen, M.L. 1984. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J. Clin. Microbiol.*, 19(2): pp. 100-104.
- Holmes, B. Costas, M., Sloss, L.L. 1990. Numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns of *Serratia marcescens*: A comparison with other typing methods. *Epidemiol. Infect.*, 105: 107-117.
- Huang, S.W., Changi, C.H., Tai, T.F., Chang, T.C. 1997. Comparison of the β -Glucuronidase assay and the conventional method for identification of *Escherichia coli* on Eosin-Methylene Blue Agar. *J. Food Protec.*, 60(1): pp. 6-9.
- Hunsinger, B., Kamp, B.A., Kumala, C., Böhm, R. 2005. Comparison of the spread plate technique and the MPN-technique for the determination of viable colony counts in quantitative suspension tests to evaluate bactericidal and fungicidal activity of chemical disinfectants. Warsaw, Poland, ISAH, 2: pp. 221-225.
- Islam, S., Begum, H.A., Nili, N.Y. 2010. Bacteriological safety assessment of municipal tap water and quality of bottle water in Dhaka city: Health hazard analysis. Bangladesh. *J. Med. Microbiol.*, 4(1): 9-13.
- Jackman, P.J.H. 1982. Classification of *Corynebacterium* species from axillary skin by numerical analysis of electrophoretic protein patterns. *J. Med. Microbiol.*, 15: 485-492.
- Jackman, P.J.H., Pelezynska, S. 1986. Characterization of *Corynebacterium* group JK by whole-cell protein patterns. *J. General Microbiol.*, 132: 1911-1915.
- Jalal, K.C.A., Nur Fatin U.T., Mardiana, M.A., Akbar John, B., Kamaruzzaman, Y.B., Shahbudin, S., Omar, M.N. 2010. Antibiotic resistance microbes in tropical mangrove sediments in East Coast Peninsular, Malaysia. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4(8): pp. 640-645.
- Jan, N., Meshram, S.U., Kulkarni, A. 2009. Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E. coli* isolated from UTI patients of Nagpur City, India. *Romanian Biotech. Lett.*, 14(5): pp. 4635-4640.
- Jenkins, C., Chart, H., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Smith, H.R. 2006. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the

- detection of both typical and atypical strains, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 55(1): 13-9.
- Jett, B.D., Ritchie, D.J., Reichley, R., Bailey, T.C., Sahm, D.F. 1995. In vitro activities of various beta-lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. resistant to *Oxyimino Cephalosporins*. *Antimic. Agents and Chemotherapy*, 39(5): 1187-1190.
- Johnson, T., Case, C. 2010. *Laboratory Experiments in Microbiology*. San Francisco, Benjamin Cummings, p. 4.
- Kaçar, A. 2011. Some microbial characteristics of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in coastal city area. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 18: 1384–1389.
- Kanungo, S. 2009. A simplified analysis of different *Escherichia coli* strains by using RAPD technique. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.*, 37(2): 257-260.
- Karadeniz, E., Sarigüllü, F.E., Untaş, I., Çolak, O. 2012. Plasmid profile analysis of phage sensitive *E.coli* strains from human sewage system. *J. Anim. Sci. Adv.*, 2(10): 873-878.
- Kaşgar, H.S. 1992. İstanbul Boğazının Deniz Suyu ve Midyelerinin Fekal Koliform Bakteriler Bakımından İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 46 s.
- Kaya, Y. 2009. Seyhan Baraj Gölü'nden İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Grubu Bakterilerde Antibiyotik Dirençliliği ve Plazmid Profillerinin Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana 67 s.
- Kılıç, A., Yapar, M., Saraçlı, M.A., Baysallar, M., Doğancı, L. 2003. Spinal kord yaralanmalı hastalardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile genetik analizi. *Gülhane Tıp Derg.*, 45(2): 143-146.
- Kılıç, A., Muz, A., Ertaş, H.B., Özbey, G. 2009. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Escherichia coli* isolated from chickens. *F. Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, 23(1): 1-4.
- Kıran, F. 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Pilazmid İçeriklerine göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 142 s.
- Kinzelman, J., Clement, N., Jackson, E., Gradus, S., Bagley, R. 2003. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: Comparison of two

- methodologies and their impacts on public health regulatory events. Appl. Environ. Microbiol., 69(1): 92-96.
- Kolören, Z., Taş, B., Kaya, D. 2011. Gaga Gölü (Ordu, Türkiye)'nün mikrobiyolojik kirlilik seviyesinin belirlenmesi. Karadeniz Fen Bil. Derg., 1(3): 74-85.
- Kostman, J.R., Edlind, T.D., Lipuma, J.J., Stull, T.L. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by Polymerase Chain Reaction Ribotyping. J. Clin. Microbiol., 30: 2084-2087.
- Köksal, F. 1999. Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı. Hastane İnfek. Derg.; 3: 189-195.
- Kustos, I., Kocsis, B., Kerepesi, I., Kilar, F. 1998. Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis. Electrophoresis 19: 2317–2323.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227: 680-685.
- Lee, H.H., Molla, M.N., Cantor, C.R., Collins, J.J. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. Nature 467: 82–85.
- Lees, D., Younger, A., Dore, B. 2010. World Health Organization (WHO). Safe Management of Shellfish and Harvest Waters. Edited by Rees, G., Pond, K., Kay, D., Bartram, J., Domingo, J., S., Published by IWA Publishing, London, UK. pp. 37.
- Lessard, E.J., Sieburth, J.M. 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol., 45(3): 950-959.
- Liu, P.Y.F., Shi, Z.Y., Lan, Y.J., Hu, B.S., Shyr, J.M., Tsai, W.S., Lin, Y.H., Tseng, C.Y. 1996. Use of restriction endonuclease analysis of plasmids and Pulsed-Field Gel Electrophoresis to investigate outbreaks of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin. Infect. Dis. 22: p. 86.
- Lösch, L.S., Alonso, J.M., Merino, L.A. 2008. Occurrence of antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* in water from different source in a subtropical region of Argentina. Ambi-Aqua, Taubate, 3(2): 28-36.
- Luczkiewicz, A., Janskowska, K., Kurlenda, J., Olanczuk-Neyman, K. 2011. Identification and antimicrobial susceptibility of fecal coliform isolated from surface water. Polish. J. Environ. Stud. 24(4): 941-950.
- MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, Third Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania., p. 912.

- Madden, R.H., Gilmour, A.A. 1995. Impedance as an alternative to MPN enumeration of coliforms in pasteurized milks. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21: 387-388.
- Maity, B., Guru, P.Y. 2007. Genetic diversity and molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* from different species of laboratory rodents. *Ind. J. Biotech.*, 6: pp. 210-215.
- Mates, A., Schaffer, M. 1988. Quantitative determination of *Escherichia coli* from faecal coliforms in seawater. *Microbios.*, 53: 216-217.
- Matyar, F., Dinçer, S. 2010. Doğu Akdeniz'den izole edilen *Enterococcus faecalis* bakterilerinin antibiyotik ve ağır metal dirençliliği. *SDU J. Sci.*, 5(2): 172-178.
- Maynard, C., Berthiaume, F., Lemarchand, K., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Mason, L., Brousseau, R. 2005. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12): 8548-8557.
- Mayo, A.W. 1995. Modeling coliform mortality in waste stabilization ponds. *J. Environ. Enginer.*, 121(2): 140-152.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P., Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid Deoxyribonucleic Acid. *J. Bacteriol.*, 127: 1529–1537.
- Moriel, D.G., Rosini, R., Seib, L.K., Serino, L., Pizza, M., Rappuoli, R. 2012. *Escherichia coli*: great diversity around a common core. *American Soc. Microbiol.* 3(3): 1-3.
- Morier, S., Brown, A., Ha, R., Iserhoff, K., Yim, M., Yang, J., Liao, B., Pszczolko, E., Qin, W., Leung, K.T. 2012. Persistence of *Escherichia coli* in freshwater periphyton: Biofilm-forming capacity as a selective advantage. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 79: 608–618.
- Mos, I., Micle, O., Zdranca, M., Muresan, M., Vicas, L. 2010. Antibiotic sensivity of the *Escherichia coli* strains isolated from infected skin wounds. *Farmacia*, 58(5): 637-645.
- Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M., Kelly, A.L. 2005. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 6: 257–270.
- Muirhead, R.W., Littlejohn, R.P., Bremer, P.J. 2004. Evaluation of the effectiveness of a commercially available defined substrate medium and enumeration system for

- measuring *Escherichia coli* numbers in faeces and soil samples. Lett. Appl. Microbiol., 39: 383–387.
- Muirhead, R.W., Collins, R.P., Bremer, P.J. 2006. Numbers and transported state of *Escherichia coli* in runoff direct from fresh cowpats under simulated rainfall. Lett. Appl. Microbiol., 42: 83-87.
- Müller, E.E., Ehlers, M.M., Grabow, W.O.K. 2001. The occurrence of *E. coli* O157:H7 in South African water sources intended for direct and indirect human consumption. Wat. Res. 35(13): 3085-3088.
- Myoda, S. 2008. Expert Report for Case No. 4: In the U.S. District Court for the Northern District of Oklahoma. State of Oklahoma, Plaintiff vs. Tyson Foods, Inc. et al., Defendants. p. 36.
- Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1831–1836.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*, Clin. Microbiol. Rev., 11(1): 142-201.
- Noveir, M.R., Halkman, A.K. 2000. A study on selective broths and agar media for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 Serotype. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 24. 459-464.
- Nowrouzian, F., Wold, A.E., Adlerberth, I. 2001. Computer-based analysis of RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) fingerprints for typing of intestinal *Escherichia coli*. Mol. Biol. Today, 2: 5-10.
- Olive, M., Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol., 37: 1661-1669.
- Omezuruike, O.I., Adawale, O.A., Olawale, K.O., Isreal, B.S.O., Adeola, O.T., Damilola, A.O., Aloysius, F.E. 2009. Comparative studies and microbial risk assessment of different water samples used for processing frozen sea-foods in Ijora-Olopa, Lagos State, Nigeria. Elect. J. Environ., Agricul. Food Chem., 8(6): 408-415.
- O’Neal, S.W., Hollrah, D.N. 2007. Monitoring of total coliform and *Escherichia coli* levels in a second order stream in West-Central Oklahoma. Proc. Okla. Acad. Sci., 87: 69-75.
- Orsi, R.H., Stoppe, N.C., Sato M.I.Z., Ottoboni, L.M.M. 2007. Identification of *Escherichia coli* from groups A, B1, B2 and D in drinking water in Brazil. J. Water Health, pp. 1-5.

- Ouattara, N.K., Passerat, J., Servais, P. 2011. Microbiological Water Quality in Rivers of the Scheldt Drainage Network (Belgium): Impact of Urban Wastewater Release, 8th World Wide Workshop for Young Environmental Scientists 2009: Urban Waters: Resource or Risks. France, p. 10.
- Öngen, B. 2008. *Escherichia coli* ishallerinde laboratuvar tanısı. ANKEM Derg., 22(Ek 2): 197-210.
- Öter, A. 2007. Van İlindeki Kliniklerden Elde Edilen *Escherichia coli* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 65 s.
- Öztelli, Y. 2004. Bayburt İli Merkez İlçede İçme Sularında Enterohemorajik *Escherichia coli* (O157:H7)'nin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 49 s.
- Pacheco, A.B.F., Guth, B.E.C., Soares, K.C.C., Nishimura, L., Almeida, D.F., Ferreira, L.C.S. 1997. Random Amplification of Polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol., 35(6): pp. 1521-1525.
- Pagnocca, F.C., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N. 1991. Heterotrophic bacteria associated with the shrimp *Penaeus schmitti*, sediment and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Braz. Revista de Microbiol., 22(3): 247–252.
- Panicker, G., Call, D.R., Krug, M.J., Bej, A.K. 2004. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using Multiplex PCR and DNA Microarrays, Appl. Environ. Microbiol., 70(12): 7436–7444.
- Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N., Be' langer, S.D., Martel, E.A., Boudreau, D.K., Picard, F.J., Ouellette, M., Roy, P.H., Bergeron, M.G. 2005. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -Subunit. Int. J. Syst. Bacteriol., 55: 2013–2025.
- Pardesi, K.R., Yavankar, S.P., Chopade, B.A. 2007. Plasmid distribution and antimicrobial susceptibility patterns of acinetobacter genospecies from healthy skin of a tribal population in Western India. Indian. J. Med. Res., 125: pp. 79-88.
- Park, J.E., Ahn, T.S., Lee, H.J., Lee, Y.O. 2006. Comparison of total and faecal coliforms as faecal indicator in eutrophicated surface water. Water Sci. Tech., 54(3): 185–190.
- Parveen, S., Murhpree, R.L., Edmiston, L., Kapsar, C.W., Portier, K.M., Tamplin, M.L. 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and

- nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. Appl. Environ. Microbiol., 63: 2607-2612.
- Patoli, A.A., Patoli, B.B., Mehraj, V. 2010. High prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from Hyderabad. G. J. Med. Sci., 8(1): 23-26.
- Perlinski, P., Mudryk, Z. 2009. Inhibitory effect of antibiotics on the growth of heterotrophic bacteria in habiting marine beach. Baltic Costal Zone, 13(2): 15-24.
- Prieto, M.D., Lopez, B., Juanes, J.A., Revilla, J.A., Llorca, J., Delgado-Rodríguez, M. 2001. Recreation in coastal waters: Health risks associated with bathing in sea water. J. Epidemiol. Commun. Health, 55: 442–447.
- Poongothai, P., Rajan, S., Jegadeeshkumar, D. 2012. Emergence of multi drug resistant strains of *E. coli* isolated from urinary tract infection in Namakkal. Int. J. Appl. Biol. Pharm. Tech., 3(3): 218-223.
- Popovic, N.T., Skukan, A.B., Dzidara, P., Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Kozacinski, L., Jadan, M., Brlek-Gorski, D. 2010. Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the adriatic coast of Croatia. Vet. Med., 55(5): 233–241.
- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K., Schleifer, K.H. 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. J. Gen. Microbiol., 139: 513–517.
- Purkayastha, M., Khan, M.S.R., Alam, M., Siddique, M.P., Begum, F., Mondal, T., Choudhury, S. 2010. Culturel and biochemical charecteriziation of sheep *Escherichia coli* isolated from in and around Bau Campus. Bangl. J. Vet. Med., 8(1): 51-55.
- Radu, S., Alias, R., Rusul, G., Lihan, S., Ling, O.W. 2000. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from beef by RAPD-PCR and plasmid profiles. Pakistan J. Biol. Sci., 3(4): 558-561.
- Raji, M., Adekeye, J., Kwaga, J., Bale, J., Henton, M. 2007. Serovars and biochemical characterization of *Escherichia coli* isolated from colibacillosis cases and dead-in-shell embryos in poultry in Zaria-Nigeria. Vet. arhiv, 77 (6): 495-505.

- Reddy, M.V.B., Sasikala, P., Karthik, A. 2012. Identification of *Escherichia coli* isolates from meat samples by antibiotic susceptibility, plasmid DNA and whole cell protein fingerprinting. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 2(4): 705-712.
- Relman, D.A., Persing, D.H. 1996. Genotypic methods for microbial and detection, isolation, and molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.*, 4: 1096-1100.
- Rice, E.W., Allen, M.J., Edberg, S.C. 1990. Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined-substrate technology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1203–1205.
- Richards, G.P., Watson, M.A. 2010. Fluorogenic membrane overlays to enumerate total and fecal *Escherichia coli* and total *Vibrionaceae* in shellfish and seawater. *Int. J. Microbiol.*, 910486: 9.
- Roberts, M.A., Crawford, D.L. 2000. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) as a means to develop genus and strain specific *Streptomyces* DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(6): pp. 2555-2564.
- Roslev, P., Bukh, A.S. 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Chemistry and Environmental Engineering, Alborg University. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89: 1341–1355.
- Rozen, Y., Belkin, S. 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 513-529.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A., p. 1102.
- Samuel, L., Marian, M.M., Apun, K., Lesley, M.B., Son, R. 2011. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cultured catfish by antibiotic resistance and RAPD Analysis. *Int. Food Res. J.*, 18(3): 971-976.
- Sahilah, A.M., Audrey, L.Y.Y., Ong, S.L., Wan Sakeenah, W.N., Safiyyah, S., Norrakiah, A.S., Aminah, A., Ahmad Azuhairi, A. 2010. DNA profiling among egg and beef meat isolates of *Escherichia coli* by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) and Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), *Int. Food Res. J.*, 17: 853-866.
- Salehi, T.Z., Bonab, S.F. 2006. Antibiotics susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz province, Iran. *Int. J. Poult. Sci.*, 5(7): 677-684.

- Sathish, S., Swaminathan, K. 2009. Genetic diversity among Toxigenic *Clostridia* isolated from soil, water, meat and associated polluted sites in South India. Ind. J. Med. Microbiol., 27(4): 311-320.
- Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y., Miller, R-A. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septage and surface water. Appl. Environ. Microbiol., 71(3): 1394-1404.
- Schets, F.M. 2011. The Microbiological Safety of Bathing Water-Waterborne Pathogens Beyond Bathing Water Legislation, Master Thesis, Utrecht University, Netherlands, p. 160.
- Shadix, L.C., Rice, E.W. 1991. Evaluation of β -glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. Can. J. Microbiol., 37: 908–911.
- Shar, A.H., Kazi, Y.F., Soomro, I.H. 2009. Antibiotic susceptibility thermo-tolerant *Escherichia coli* 2 isolated from drinking water of Khairpur city, Sindh, Pakistan. Pak. J. Biolog. Sci., 12(8): 648-652.
- Sharma, D. 2005. Removal of Bacteria (Total Coliform) of Gem 505 model. Bachelor Degree in Environmental Science, Environmental Science School of Science, Kathmandu University. p. 68.
- Sharma, B.C., Rai, B. 2012. Incidence of multi-drug resistance in *Escherichia coli* strains isolated from three lakes of tourist attraction (Mirik Lake, Jorepokhari Lake and Nakhapani Lake) of Darjeeling Hills, India. Ind. J. Fund. Appl. Life Sci., 2(2): pp. 108-114.
- Schaberg, D.R., Tompkins, L.S., Falkow, S. 1981. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint Gram-negative Bacilli. J. Clin. Microbiol., 13: 1105–1108.
- Sigee, D.C. 2005. Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in The Freshwater Environment. John Wiley & Sons Ltd, England, p. 541.
- Sinden, R.R. 1994. Nice Modern Textbook on DNA Structure, DNA Structure and Academic Press, San Diego, CA, p. 393.
- Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L., Zervos, M.J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin. Microbiol. Rev., 19(3): pp. 512–530.

- Sivri, N. 1993. Deniz Suyu Kalitesinin Belirlenmesinde Nitrifikasyon Bakterilerinin Önemi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 42 s.
- Smalla, K., Heuer, H., Gotz, A., Niemyer, D., Krogerrecklenfort, E., Tietze, E. 2000. Exogenous isolation of antibiotic plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of incQ-like plasmids. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4854-4862.
- Soupir, M.L., Mostaghimi S., Dillaha T. 2010. Attachment of *Escherichia coli* and Enterococci to particles in runoff. J. Environ. Qual. 39: 1019–1027.
- Sousa, C.P. 2003. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: An evolutionary view, biological and health centre, Federal University of São Carlos. The Braz. J. Infect. Dis., 7(1): 23-31.
- Stabili, L., Immacolata-Acquaviva, M.I., Cavallo, R.A. 2004. *Mytilus galloprovincialis* filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). Elsevier, Water Res., 39 (2-3): 469–477.
- Su Ürünleri Yönetmeliği. 1995. Resmi Gazete 22223, Ankara, 43 s.
- Sulaj, K., Korro, K., Duro, S., Zalla, P., Aleksi, P., Rapti., D. 2008. Microbiological pollution of sea water samples collected from butrinti lagoon in Albania. Natura Montenegrina, 8(2): 101-105.
- Sullivan, T.J., Snyder, K.U., Gilbert, E., Bischoff, J.M., Wustenberg, M., Moore, J., Moore, D. 2005. Assessment of water quality in association with land use in the Tillamook bay watershed, Oregon, USA. Water Air Soil Pollut., 161: 3-23.
- Struffolino, P. 2010. Identifying Sources of *Escherichia coli* to Maumee Bay, Oregon, Ohio. A Thesis for The Master of Science Degree in Biology, The University of Toledo. p. 56.
- Şeker, E. 1997. Keban Baraj Gölünün Koçkale Bölgesinden Toplanan Su Midyesinden Mide ve Bağırsakların Fekal Koliformlar Yönünden İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 32 s.
- Tangüler, H. 2010. Şalgam Suyu Üretiminde Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Şalgam Suyu Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 393 s.
- Temelli, S. 2002. Gıda zehirlenmesine neden olan *E.coli* O157:H7 ve önemi, Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med., 21: 133-138.

- Temizkan, G., Arda, N. 2004. Proteinlerin Molekül Ağırlıklarına Göre Ayrılma: Denatüre Jel Elektroforezi (SDS-PAGE). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı. 161-273.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V. 1997. Plasmid fingerprinting: a tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community acquired infections. Infect. Cont. Hosp. Epid., 18(6): 426-439.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.B., Chait, R., Hartl, D.L., Kishony, R. 2012. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. Nature Genetics, 44(1): 101-105.
- Troussellier, M., Got, P., Bouvy, M., Boup, M.M., Arfi, R., Lebihan, F., Monfort, P., Corbin, D., Bernard, C. 2004. Water quality and healthy status of Senegal river estuary. Marine Pollut. Bull., 48: 852–862.
- Tuğrul-İçemer, G., Keleş, C., Karaca, H. 2007. Antalya plajlarında mikrobiyolojik deniz suyu analizi. Türk Sucul Yaşam Derg., 3(5): 553-560.
- Türk, N., Yabanlı, M., Avsever, M.L., Aydın, M.A. 2011. Çift kabuklu yumuşakçalardan *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu. Bornova Vet. Bil. Derg., 33(47): 1-8.
- Uçan, S.U., Açık, L., Çelebi, A., Erganiş, O., Arslan, E. 2003. Plasmids and protein patterns of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Konya, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 29: 475-480.
- Uçar, S. 1990. Tekirdağ İçme Suyu, Kaynak Suyu, Kuyu Suyu, Deniz Suyunda Bakteriyolojik Kirlilik ve Nitrik Aranması Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya, 54 s.
- Uslu, O. 2001. Su kirliliği, Türkiye'nin çevre sorunları, T.Ç.S.V Yay., Ankara, 5, 99 s.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). 1986. Ambient Water Quality Criteria for Bacteria. Washington, D.C.
- U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency). 1992. Guidelines for Water Reuse. Washington, p. 261.
- Ürün, M. 2006. Plazmit DNA Saflaştırılması İşleminde Kullanılmak Üzere Magnetik Affinite Mikrokürelerin Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 64 s.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial classification. Microbiol. Rev., 60: 407–438.

- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Woods, C., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1993. Whole cell REP-PCR allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1927-1931.
- Viau, E.J., Goodwin, K.D., Yamahara, K.M., Layton, B.A., Sassoubre L.M., Burns S.L., Tong H., Wong S.H.C., Lu Y., Boehm A.B. 2011. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res.*, 45: 3279-3290.
- Vignaroli, C., Luna, G.M., Rinaldi, C., Di Cesare, A., Danovaro, R., Biavasco, F. 2012. New sequence types and multidrug resistance among pathogenic *Escherichia coli* isolates from coastal marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 1-22.
- Vilamu, M., Vives-Rego, J. 2008. Fluorogenic assay for immediate presumptive detection of *Escherichia coli* in urine. *Appl. Microbiol.*, 19(5): 317-320.
- Vogel, L., Oorschot, E., Maas, H.M.E., Minderhout, B., Dijkshoom, L. 1999. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, ribotyping and serotyping. *Clinical Microbiol. Infect. Dis.*, CMI, 6: 82–87.
- Vural, H.C., Akçin, A. 2011. İzmit körfezinden izole edilen *Escherichia coli*'lerde R plazmidlerine bağlı "bulaşıcı tipte antibiyotik direnç özelliğinin" belirlenmesi. *KÜ. Vet. Fak. Derg.*, 17: 23-30.
- Wade, T.J., Pai, N., Eisenberg, J.N.S., Colford, J.M. 2003. Do U.S. environmental protection agency water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.*, 111(8): 1102-1109.
- Walia, T.M., Williamson, T., Kaiser, A., Tewari, R. 1988. Usefulness of protein patterns, serotyping and plasmid DNA Profiles in the epidemiologic finger printing of *P. aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7: 248-255.
- Ward, L.R., De Sa, J.D., Rowe, B. 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.*, 99(2): 291-294.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.H., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüpper, H.G. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology.

- Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 463-464.
- Welch, R.A., 2006. The Genus *Escherichia*,. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed), *The Prokaryotes: A Handbook on The Biology of Bacteria*, 3rd ed, Vol. 6. Springer, New York, NY., pp. 60–71.
- Wessel, D., Flugge, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Annal. Biochem.*, 138: 141-143.
- World Health Organization (WHO). 1996. “Guidelines for Drinking Water Quality”, (2nd Ed.), Vol.2, Health Criteria and Other Supporting Information. Geneva, Switzerland.
- WHO. 2003. Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Volume 1, Coastal and Fresh Waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. 2004. Guidelines for Drinking-Water Quality (3th ed), Geneva.
- WHO. 2011. Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection: (<http://www.euro.who.int>).
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Wolf, M.K. 1997. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 10(4): 569-84.
- Yılmaz, İ., Bilgin, B., Öktem, B. 2005. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* and *Venus gallina* harvested from the Marmara Sea. *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, 29: 409-415.
- Zaidi, N., Konstantinou, K., Zervos, M. 2003. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology, *Arch. Pathol. Lab.*, 127: 1098-1105.
- Zaki, S., Abd-El-Halem, D., El-Helow, E., Mustafa, M. 2009. Molecular and biochemical diagnosis of *Salmonella* in wastewater. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 3(2): 83-92.

7. EKLER

EK-1. Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri

1. Plate Count Agar (PCA) Besiyeri

Plate Count Agar (PCA) Besiyeri (Merck)	23,5 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2

Besi yeri damıtık suda çözündükten sonra eritilir ve tüplere dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye kadar soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür, + 4°C’de saklanır.

2. Lactose Broth (LB) Besiyeri

Lactose Broth (LB) Besiyeri (Merck)	13 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	6,9 ± 0,2

10 ml örnek pipetlenecek tüpler (18 x 180 mm) için çift kuvvet, diğer tüpler için (16 x 160 mm) tek kuvvet LB besiyeri hazırlanmıştır ve laktozdan oluşturduğu gazı belirlemek için tüplere Durham tüpleri koyulduktan sonra, ağızları kapatılan tüpler, 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edilir. + 4°C’de saklanır.

3. Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB) Besiyeri

BGLBB Broth Besiyeri (Merck)	40 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,2 ± 0,2

Distile suda eritilen besiyeri, ters çevrilmiş durham tüpü taşıyan deney tüplerine 10’ar ml dağıtılır ve ağızları kapatılıp, 121°C’de 15 dk otoklavda sterilize edilir.

4. Yatık Nutrient Agar (YNA)

Nutrient Agar (Difco)	23 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	6,8

Besi yerinden 23 g Nutrient Agar 1 l damıtık suda süspanse edilir, agar eriyinceye kadar kaynatılır. Ağzı kapalı tüplere 2 ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüpler bir pipet üzerine yatık vaziyette konur ve besi yeri katılaştıktan sonra + 4°C’de saklanır.

5. Eosin Methylene-Blue (EMB) Agar Besiyeri

Eosin Methylene-Blue (EMB) Agar (Merck)	36 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2

Besi yerinde 36 g tartılarak 1 l damıtık suda çözülür, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir ve 50°C’ye soğutulup, petri kaplarına dökülür (15-20 ml), + 4°C’de saklanır.

6. KF Streptococcus Agar

KF Streptococcus Agar (Merck)	36 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2

Dehidre besiyeri, 71,5 g/l olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir. Sürekli çalkalanarak 5 dakika kaynatılır. Eğer toplam selektivite gerekiyorsa 121°C’de 10 dakika otoklavlanır. Aşırı ısıtılmamalıdır. 45-50°C’ye soğutulup, %1 TTK (2,3,5-trifenilteterazolum klorid) çözeltisi (10 ml/l) eklenir, karıştırılıp steril petri kaplarına 12,5'er ml dökülür ve + 4°C’de saklanır.

7. EC Broth

EC Broth (Merck)	37 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	6,9 ± 0,2

Besi yerinden 37 g tartılarak 1 l damıtık suda çözülür, ters çevrilmiş durham tüpü taşıyan tüplere 10 ml dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir ve + 4°C’de saklanır.

8. Deoksiribonükleaz (DNaz) Agar

DNaz Agar (Oxoid)	39 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,3

Besi yerinde 39 g tartılarak 1 l damıtık suda çözülür, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür, + 4°C’de saklanır.

9. Üreaz Broth

Yeast Ekstrakt	0,1 g
Potasyum di Hidrojen Fosfat	9,1 g
Sodyum Hidrojen Fosfat	9,5 g
Üre	20 g
Fenol Kırmızısı	0,01 g

Besi yerinden 38,5 g tartılarak 1 l damıtık suda eritilir. Membran filtreden geçirilerek sterilize edilir. Steril tüplere 3’er ml dağıtılır.

10. Tripton (İndol) Broth Bileşimi

Trypton (Merck)	3 g
Sodyum klorür (Oxoid)	0,3 g
Damıtık Su	100 ml
pH	7,0

Gerekli miktarlar tartılıp 100 ml suda süspanse edilir ve eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

11. MR-VP Broth (Merck)

MR-VP (Merck)	17 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,0

Gerekli miktarlar tartılıp 1 l suda süspanse edilir ve eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

12. Simmon’s Sitrat Agar Bileşimi

Simmon’s Sitrat Agar (Oxoid)	25 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,0

Gerekli miktarlar tartılıp 1 l damıtık suda süspanse edilir ve agar eriyinceye kadar kaynatılır. Ağzı kapalı tüplere 2 ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüpler bir pipet üzerine yatık vaziyette konur ve besi yeri katılaştıktan sonra + 4°C’de saklanır.

13. SIM Medium

SIM medium (Merck)	30 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,3 ± 0,2

Besi yerinden 30 g tartılarak 1 l damıtık su içinde çözülür. Sonra uygun boyuttaki tüplere dağıtılarak 121°C’de 15 dk sterilize edilip dikey konumda dondurulur.

14. Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Triple Sugar Iron Agar (Merck)	65 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,3 ± 0,2

Besi yerinden 65 g tartılarak 1 l damıtık suya ilave edilip kaynar su banyosunda 5-10 dk tutularak iyice eritilir. Daha sonra tüplere dağıtılan besi yeri 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler 1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak bu şekilde katılaşmaları beklenir. Sonuçta katılaşan besi yerleri parafilm ile kaplanarak buzdolabında saklanır.

15. Nitrate Broth (NB)

Nitrate Broth (Acumedia)	23 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,0

Dehidre besi yeri 23 g olacak şekilde gerekirse ısıtılarak distile su içerisinde çözülür. İçerisinde durham tüpü bulunan tüplere 10’ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

16. Fluorocult® E. coli O157:H7 Agar

Fluorocult® E. coli O157:H7 Agar (Merck)	55 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7,3 ± 0,2

Besi yerinde 55 g tartılarak 1 l damıtık suda çözülür, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür ve + 4°C’de saklanır.

17. Fluorocult® LMX Broth Modified

Fluorocult® LMX Broth Modified (Merck)	17 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	6,8 ± 0,2

Dehidre besi yeri, tek kuvvette 17,0 g; çift kuvvette 34,0 g olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, tüplere 10'ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

EK-2. Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler

1. Kristal Viyole

Kristal Viyole	10 g
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

2. Lügol

İyot	1 g
Potasyum İyodür	2 g
Damıtık su	300 ml

3. Bazik Fuksin

Bazik Fuksin	3 g
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

4. Serum Fizyolojik

Sodyum Klorür	8,5 g
Damıtık su	1000 ml

5. İyot Çözeltisi

İyot	1 g
KI	2 g
Damıtık Su	100 ml

KI suda çözündükten sonra iyot ilave edilir ve çözmeye devam edilir. Membran filtreden geçirilip renkli şişede 2-3 hafta bekletilebilir.

6. Alfa-naftol Çözeltisi

Alfa-naftol	5 g
Etil Alkol	100 ml

7. KOH çözeltisi

Potasyum Hidroksit	10 g
Damıtık Su	100 ml

8. Metil-Red Ayracı

Metil Red	0,050 g
Etil Alkol (%95)	150 ml
Saf Su	100 ml

Metil Red, alkolde eritildikten sonra damıtık su eklenerek çözülür. Oda sıcaklığında saklanabilir.

9. Kovaks Ayracı

Para-dimetilaminobenzaldehit	5 g
n-Amil alkol	75 ml
Konsantre HCl	25 ml

10. Griess-Ilosvay Ayracı

Alfa naftilamin % 0,5 (A) + sulfanilik asit %0,8 (B).

11. Katalaz Test Ayracı

Hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30'luk)'den 3 ml alınarak 97 ml distile su ile iyice karıştırılır.

EK-3. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Akrilamid + N,N'-Metilen Bis-akrilamid Monomer Stoğu

Akrilamid (Oxoid)	28,8 g
Bis-akrilamid (Oxoid)	1,2 g

Maddeler gerekli miktarda tartılıp 75 ml damıtık su içersinde çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede + 4°C'de saklanır.

2. Ayırma Jel Tamponu (1,5 M Tris-HCL, pH 8,6)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 8,6'ya ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve + 4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0,4 oranında SDS ilave edilir.

3. Yığma Jel Tamponu (0,5 M Tris-HCL, pH 6,8)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 6,8'e ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve + 4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0,4 oranında SDS ilave edilir.

4. Tank Buffer

Trizma Bazı (Sigma)	1,21 g
Glisin	5,76 g

Maddeler 1000 ml damıtık suda çözülür. SDS- PAGE için %0,1 oranında SDS ilave edilir.

5. Laemmli Buffer (X4)

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	5,12 g
Gliserin (Merck)	8,00 g
Damıtık Su	3,00 ml
SDS	2,00 ml
2-β-Merkaptoetanol	4,00 ml
Bromo Fenol Mavisi (Merck)	0,025 ml

Gerekli miktarlar tartılıp temiz bir deney tüpü içerisinde homojen hale getirilir ve gün ışığına maruz bırakılmadan saklanır.

6. Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1,5 g
İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Damıtık Su	650 ml

Boya çözündükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

7. Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Damıtık Su	650 ml

Gerekli miktarlar tartılarak 650 ml damıtık suda çözündürülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

8. Jel Saklama Çözeltisi

Jel saklamak amacıyla %7'lik Glasial Asetik Asit çözeltisi kullanılır.

9. %10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS	1 g
Damıtık Su	10 ml

Gerekli miktarlar tartılarak damıtık suda çözülür ve + 4°C'de saklanır. Bir haftadan sonra taze hazırlanarak kullanılır.

10. %10'luk SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	8,78 ml
Damıtık Su	10,84 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,6	6,58 ml
APS (Sigma)	100,00 µl
TEMED (Oxoid)	10,00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısma aktarılır.

11. %12'lik SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	12 ml
Damıtık Su	10,5 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,6	7,8 ml
APS (Sigma)	125,00 µl
TEMED (Oxoid)	10,00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısma aktarılır.

12. %4'lük SDS-PAGE Yığma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	0,81 ml
Damıtık Su	2,95 ml
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	1,235 ml
APS (Oxoid)	50,00 µl
TEMED (Oxoid)	6,00 µl

%10'luk SDS-PAGE polimerleştikten sonra, yukarıdaki maddelerden gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezde %10'luk SDS-PAGE kısmın üzerine aktarılır. Polimerleşme başlamadan en kısa zamanda hava boşluğu bırakılmadan tarak yerleştirilir.

EK-4. Plazmid Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Çözelti-I: 50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCL pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8

9 ml % 50'lik Glukoz,

12,5 ml 1 M Tris-HCL pH 8,0,

10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 alınır ve damıtık su ile 500 ml tamamlanır.

2. Çözelti-II: %1 SDS, 0,2 N NaOH

50 ml %10'luk SDS, 100 ml 1 N NaOH alınır ve damıtık su ile 500 ml tamamlanır.

3. Çözelti-III:

60 ml 5 M Potasyum asetat, 11,5 ml Glasiyal asetik asit alınır ve damıtık suyla 100 ml tamamlanır.

4. Tris-EDTA (TE) Solüsyonu: 10 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA

1 ml 1 M Tris-HCL pH 8,

0,5 ml 1 M EDTA pH 8,0 alınır ve damıtık su ile 100 ml tamamlanır.

Tercihe bağlı olarak RNaz ilave edilir (25 mg/ml)

5. Fenol:Kloroform Solüsyonu

1:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

6. Tris-Borat EDTA (TBE) Solüsyonu: 5X, pH 8,0

Trizma Bazı (Sigma)	54 g
Asit Borik (Sigma)	27,5 ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	20 ml
Damıtık su	1000 ml

7. Yükleme Solüsyonu (Loading Buffer)

Üre (Merck)	4 M
EDTA Merck)	0,025 M
Sükroz (Sigma)	%60
Bromfenol Blue (Sigma)	%0,025
Ksilen (Merck)	%0,025

EK-5. Genomik DNA Analizinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Tris-EDTA (TE) Solüsyonu: 10 mM Tris-HCL pH 8, 1 mM EDTA

1 ml 1 M Tris-HCL pH 8,

0,5 ml 1 M EDTA pH 8,0 alınır ve damıtık su ile 100 ml tamamlanır.

2. SDS, %10

10 g SDS alınır ve damıtık su ile 100 ml tamamlanır.

3. 5M NaCl

141,6 g NaCl alınır ve damıtık su ile 500 ml tamamlanır.

4. CTAB/NaCl

NaCl	4,1 g
Damıtık su	90 ml
CTAB	10 g

4,1 g NaCl 90 ml damıtık suda çözülür ve 10 g CTAB yavaşça eklendikten sonra 65°C'ye kadar ısıtılarak karıştırılır.

5. Kloroform/izoamil alkol solüsyonu

24:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

6. Fenol/kloroform/izoamil alkol solüsyonu

25:24:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

7. Tris-Borat EDTA (TBE) Solüsyonu: 1X, pH 8,0

Trizma Bazi (Sigma)	10,8 g
Asit Borik (Sigma)	5,5 g
0,5 M EDTA, pH 8,0	4 ml
Damıtık su	1000

8. Yükleme Solüsyonu (Loading Buffer)

Üre (Merck)	4 M
EDTA Merck)	0,025 M
Sükroz (Sigma)	%60
Bromfenol Blue (Sigma)	%0,025
Ksilen (Merck)	%0,025

8. ÖZGEÇMİŞ

Cumhur AVŞAR, 1987 yılında Ardahan’da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2005 yılında kayıtlandığı 19 Mayıs Üniversitesi, Ordu Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl bölümünde yüksek lisansına başladı. 2010 yılında Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde açılan kadroyu kazanarak Biyoloji bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Halen buradaki görevine ve yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.