

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA KÖRFEZİNDEKİ FEKAL MİKROBİYAL
KİRLETİCİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE
BELİRLENMESİ

Mine DAĞAŞAN SADIKLAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTALYA KÖRFEZİNDEKİ FEKAL MİKROBİYAL
KİRLETİCİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE
BELİRLENMESİ**

Mine DAĞAŞAN SADIKLAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 2010.02.0121.011 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA KÖRFEZİNDEKİ FEKAL MİKROBİYAL
KİRLETİCİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE
BELİRLENMESİ

Mine DAĞAŞAN SADIKLAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez ~~23/02~~2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (90) not takdir edilerek
Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Yard. Doç. Dr. İ Tülay ÇAĞATAY(Danışman).....*Tulay Çağatay*
Prof. Dr. Beria Falakalı MUTAF.....*Beria Falakalı Mutaf*
Prof. Dr. Aysun ERGENE.....*A. Ergene*

ÖZET

ANTALYA KÖRFEZİNDEKİ FEKAL MİKROBİYAL KİRLİTİCİLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE BELİRLENMESİ

Mine DAĞAŞAN SADIKLAR

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY

Ocak 2011, 72 sayfa

Bu çalışmada amaç Antalya sahilinde özellikle kanalizasyon kaynaklı (konut, turistik tesis ve tekne atıkları gibi) kirlilik yaratan çevre ve insan sağlığına risk oluşturan hastalık etkeni indikatör koliform patojenlerden *Escherichia coli*, ve *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*' nin moleküler biyolojik yöntemlerden biri olan PCR yöntemi ile hızlı tespiti amaçlanmıştır.

Deniz suyu örnekleri çalışması Eylül 2009'dan 2010 Eylül 2010'a kadar Liman, Konyaaltı, Side ve Kemer bölgelerinin sahillerinden toplanmıştır. Toplanan 48 su örneğinin pH ve sıcaklık değerleri ölçülmüştür. Daha sonra laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonları yapılmıştır. Referans *E. coli* , *S. typhi*, *S. sonnei* bakterileri ve su örnekleri için uygun PCR programı seçilmiş ve örneklerin PCR'ı yapılmıştır. PCR'ı yapılan örnekler elektroforezde yürütülmüş ve incelenmiştir.

Bunun sonucunda Konyaaltı ve Kemer bölgesinde *E. coli* Cnf₂ gen bölgesi pozitif çıkmıştır. Bu da bölgelerde Temmuz ve Ağustos aylarında kirlilik indikatörü *E. coli* varlığını göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: *E. coli*, *S. typhi*, *S. sonnei*, PCR, su kirliliği

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. İ Tülay ÇAĞATAY(Danışman)

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Prof. Dr. Aysun ERGENE

ABSTRACT

A STUDY ABOUT FECAL MICROBIAL POLLUTANTS IN THE GULF OF POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND DETERMINATION

Mine DAĞAŞAN SADIKLAR

M. Sc. Thesis in Aquatic Engineering

Adviser: Assist. Prof. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY

Jan, 2011, 72 pages

This study, based in Antalya coast, particularly sewage source (residential, tourist facilities and boat waste, etc.) pollution of the environment and human health risk of the disease agent indicator coliform pathogens, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*'s molecular biological methods is one of the PCR method for fast determination is done.

From September 2009, to 2010 we have collected sea water from Konyaalti, Kemer, Liman, Side coast. The sample's, brought to the laboratory and DNA isolations were made. The *Cnf₂*, *Hin*, *İpaH* genes used to identify *E. coli*, *S. typhi* and *S. sonnei*. PCR programs were selected and electrophoresis was carried out

We found that Konyaalti and Kemer region given positive PCR results. This means that Konyaalti and Kemer has been effected by *E. coli* pollution during July and August.

KEY WORDS: *E. coli*, *S. typhi*, *S. sonnei* PCR, waste water

COMMITTEE: Yrd. Doç. Dr. İ Tülay ÇAĞATAY (Danışman)

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Prof. Dr. Aysun ERGENE

ÖNSÖZ

Son yıllarda ülkemizde artan nüfus, gelişen endüstri ve artan turizm faaliyetleri nedeni ile farklı kirleticiler deniz veya iç sulara deşarj edilmektedir. Kanalizasyon kaynaklarıyla karışan organik içeriği yüksek deniz suyu, göl ve havuz suları, içme suları fekal mikroorganizmalar bakımından zenginlik gösterir (Bitton, 2005). Hızla yayılma potansiyeline sahip, barsak enfeksiyonlarına (örn: *tifo*, *dizanteri*, *kolera* ve *diğer gastroenterit vakalar*) neden olan bu patojenlerin, insan sağlığına tehdit oluşturduğu için bu bakterilerin hızlı ve doğru tespiti ve kontrolü oldukça önemlidir (Harwood, vd. 2005). Bu yüzden moleküler biyoloji yöntemi olan PCR yöntemi ile bu bakterilerin hızlı tespitini yapabilmekteyiz. İleride havuz suyu, içme suyu, göl suyu gibi kullanım alanı sürekli olan yerlerde de bu çalışma yapılıp hızlı ve doğru sonuçlar tespiti açısından çalışmanın özgün bir değeri bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasının laboratuvar kısmının tümü Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliği Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın tüm aşamalarında yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İ. Tülay Çağatay'a göstermiş olduğu özenden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonuna, çalışmalarım süresince imkânlarından yararlandığım Su Ürünleri Mühendisliği Fakültesi Anabilim Dalı Başkanlığına, değerli yardımlarından dolayı hocam Sayın Arş. Gör. Mesut Yılmaz'a, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm fakültemiz yüksek lisans öğrencilerinden Evrim Beyhan Şen'e, çalışmalarım süresince bana destek olan tüm arkadaşlarıma ve yaşamımda maddi, manevi desteklerini esirgemeyen annem Seyrat Dağaşan, babam Habip Dağaşan, ağabeyim Cem Dağaşan ve eşim Murat Sadıklar' a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALAR.....	5
2.1. <i>E. coli</i> 'nin Biyolojisi.....	5
2.1.1. <i>E. coli</i> 'nin sistematığı.....	5
2.1.2. <i>E. coli</i> 'nin morfolojisi.....	5
2.1.3 <i>E. coli</i> 'nin insan sağlığında rolü.....	7
2.2. <i>Salmonella</i> 'nın biyolojisi.....	8
2.2.1. <i>Salmonella</i> 'nın sistematığı.....	8
2.2.2. <i>Salmonella</i> 'nın morfolojisi.....	8
2.2.3 <i>Salmonella</i> 'nın insan sağlığında rolü.....	9
2.3. <i>S. sonnei</i> 'nin Biyolojisi.....	10
2.3.1. <i>S. sonnei</i> 'nin sistematığı.....	10
2.3.2. <i>S. sonnei</i> 'nin morfolojisi.....	10
3. MATERYAL VE METOT.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Araştırmanın yapıldığı yer.....	11
3.1.2.Örneklerin toplanması, laboratuvara getirilmesi.....	12
3.1.3. <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> ve <i>S. sonnei</i> referans suşların temini.....	13
3.1.4. Çalışma da kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler.....	13

3.1.5 Gram boyama' da kullanılan kimyasal maddeler.....	14
3.1.6 DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	15
3.1.7 PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar.....	16
3.1.8 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	26
3.1.9 Yararlanılan alet ve ekipmanlar.....	17
3.2 Metot.....	17
3.2.1 Su örneklerinin laboratuara getirilmesi ve mikroskopik incelemesi.....	17
3.2.2 Çalışmada kullanılan referans bakterilerin üretimi.....	18
3.2.3 Bakteriyel DNA izolasyonu.....	18
3.2.4 DNA'nın kalitatif tayini.....	19
3.2.5 DNA'nın kantitatif tayini.....	19
3.2.6 Primerlerin Hazırlanması.....	19
3.2.7 Primer Tm sıcaklıklarının hesaplanması.....	20
3.2.8 PCR reaksiyonu ve optimizasyonu.....	21
3.2.9 Tez çalışmasın da kullanılmış olan primerlerin PCR protokolü.....	21
3.2.10 Jel Elektroforezi, boyama ve görüntüleme.....	24
4.BULGULAR.....	25
4.1 Deniz suyu sıcaklığı ve pH'lardan elde edilen bulgular.....	25
4.2 Referans suşlarının üretiminden elde edilen sonuçlar.....	27
4.3 Mikroskopik çalışma sonucu elde edilen bulgular.....	32
4.4 PCR çalışmalarına ilişkin bulgular.....	33

4.5 Deniz sularından elde edilen PCR sonuçları.....	43
5.TARTIŞMA.....	51
6.SONUÇ.....	54
7.KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
pH	Hidrojen potansiyeli
gr	Gram
cm	Santimetre
$^{\circ}$ C	Santigrad derece
rpm	Döngü sayısı
dk	Dakika
Mg	Miligram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Antalya Bölgesi Haritası.....	1
Şekil 2.1 <i>E. coli</i> 'nin 3 boyutlu mikroskoptan çekilmiş resmi.....	6
Şekil 2.2 <i>S. typhi</i> 'nin mikroskop altında çekilmiş 3 boyutlu resmi.....	9
Şekil 3.1 Konyaaltı Sahili, Antalya.....	11
Şekil 3.2 Liman Antalya.....	11
Şekil 3.3 Side Antalya.....	12
Şekil 3.4 Kemer Antalya.....	12
Şekil 3.5 Bir PCR döngüsünün şematize hali.....	24
Şekil 4.1 MacConkey besi yerinde <i>E. coli</i>	28
Şekil 4.2. Nutrient agar besi yerinde <i>E. coli</i>	29
Şekil 4.3 Endo agarda <i>E. coli</i>	29
Şekil 4.4 MacConkey besi yerinde <i>S. typhi</i>	29
Şekil 4.5 XLD besi yerinde <i>S. typhi</i>	30
Şekil 4.6 Nutrient agar'da <i>S. typhi</i>	30
Şekil 4.7 MacConkey agarda <i>S. sonnei</i>	30
Şekil 4.8 EMB agarda <i>S. sonnei</i>	31
Şekil 4.9 Nutrient broth'ta <i>S. typhi</i>	31
Şekil 4.10 Nutrient broth'ta <i>E. coli</i>	32
Şekil 4.11 <i>E. coli</i> gram boyama.....	28
Şekil 4.12. <i>S. typhi</i> gram boyama.....	28
Şekil 4.13 <i>S. sonnei</i> gram boyama.....	28

Şekil 4.14 DNA peleti.....	32
Şekil 4.15 <i>E. coli</i> 'nin (Cnf ₂ gen bölgesi) agaroz jel görünüşü.....	33
Şekil 4.16 <i>E. coli</i> 'nin (Hin gen bölgesi) agaroz jel görünüşü.....	34
Şekil 4.17 <i>E. coli</i> 'nin (İpaH gen bölgesi) agaroz jel görünüşü.....	35
Şekil 4.18 <i>S. typhi</i> 'nin (Cnf ₂ gen bölgesi) agaroz jel'de yürütülmüş hali.....	38
Şekil 4.19 <i>S. typhi</i> 'nin (Hin gen bölgesi) agaroz jel'de yürütülmüş hal.....	38
Şekil 4.20 <i>S. typhi</i> 'nin (İpaH gen bölgesi) agaroz jel'de yürütülmüş hali.....	39
Şekil 4.21 <i>S. sonnei</i> 'nin (İpaH gen bölgesi) agaroz jel'de yürütülmüş hali.....	40
Şekil 4.22 <i>S. sonnei</i> 'nin (Cnf ₂ gen bölgesi) agaroz jel'de yürütülmüş hali.....	41
Şekil 4.23 <i>S. sonnei</i> 'nin (Hin gen bölgesi) agaroz jel'de yürütülmüş hali.....	42
Şekil 4.24 Konyaaltı bölgesi <i>E. coli</i> Cnf ₂ gen bölgesinin aylara göre PCR sonuçları...	44
Şekil 4.25 Konyaaltı bölgesi <i>S. typhi</i> Hin gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları.....	44
Şekil 4.26 Konyaaltı bölgesi <i>S. sonnei</i> ipaH gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları...	45
Şekil 4.27 Liman bölgesi <i>E. coli</i> Cnf ₂ gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları.....	45
Şekil 4.28 Liman bölgesi <i>S. typhi</i> Hin gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları.....	46
Şekil 4.29 Liman bölgesi <i>S. sonnei</i> İpaH gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları	46
Şekil 4.30 Kemer bölgesi <i>E. coli</i> Cnf ₂ gen bölgesinin aylara göre PCR sonuçları.....	47
Şekil 4.31 Kemer bölgesi <i>S. typhi</i> Hin gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları	48
Şekil 4.32 Kemer bölgesi <i>S. sonnei</i> İpaH gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları.....	48

Şekil 4.33 Side bölgesi <i>E. coli</i> Cnf ₂ gen bölgesi aylara göre PCR sonuçları	49
Şekil 4.34 Side bölgesi <i>S. typhi</i> Hin gen bölgesinin aylara göre PCR sonuçları.....	49
Şekil 4.35 Side bölgesi <i>S. sonnei</i> İpaH gen bölgesinin aylara göre PCR sonuçları.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>E. coli</i> 'nin sistematığı.....	5
Çizelge 2.2 <i>S. typhi</i> 'nin sistematığı.....	8
Çizelge 2.3 <i>S. sonnei</i> 'nin sistematığı.....	10
Çizelge 3.1 Set Solusyonu Çözeltisi.....	15
Çizelge 3.2 TE (Tris-EDTA) tampon çözeltisi.....	15
Çizelge 3.3 KIA (kloroform:isoamilalkol)(24:1).....	15
Çizelge 3.4 TAE (Tris asetik asit EDTA).....	16
Çizelge 3.5 TBE (tris boric asit EDTA).....	16
Çizelge 3.6 Agaroz jel hazırlanışı.....	17
Çizelge 3.7 Bakteri gen bölgeleri'nin listesi.....	20
Çizelge 3.8 Tm sıcaklıklarının hesaplanması.....	20
Çizelge 3.9 Cnf ₂ gen bölgesi için PCR optimizasyon tablosu.....	21
Çizelge 3.10 Hin gen bölgesi için PCR optimizasyon tablosu.....	22
Çizelge 3.11 İpaH gen bölgesi için PCR optimizasyon tablosu.....	22
Çizelge 3.12 Cnf ₂ gen bölgesi için PCR protokolü.....	23
Çizelge 3.13 Hin gen bölgesi için PCR protokolü.....	23
Çizelge 3.14 İpaH gen bölgesi için PCR protokolü.....	24
Çizelge 4.1 Konyaaltı bölgesi için aylara göre su sıcaklık ve pH'ları.....	25
Çizelge 4.2 Side bölgesi için aylara göre su sıcaklık ve pH'ları.....	26
Çizelge 4.3 Liman bölgesi için aylara göre su sıcaklık ve pH'ları.....	26
Çizelge 4.4 Kemer bölgesi için aylara göre su sıcaklık ve pH'ları.....	27

1. GİRİŞ

Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji son yıllarda uluslararası ve ulusal temelde üzerinde önemle durulan bir ilgi alanı olmuştur.

Moleküler biyoloji ve modern biyoteknoloji; günümüzde Tıp, Tarım-Hayvancılık, İlaç Endüstrisi, Su Ürünleri ve Biyoenerji gibi değişik sektörel alanlar için yenilikçi yaklaşımlar getirerek rekabet gücünü arttırmakta büyük rol oynamaya başlamıştır. Kullanılan bu teknik süreçlerin akuatik çalışmalarda da kullanılması gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır.

Bu tez çalışmasındaki amaç özellikle kanalizasyon kaynaklı (konut, turistik tesis ve tekne atıkları gibi) denizel kirlilik yaratan çevre ve insan sağlığına risk teşkil eden mikrobiyal kirleticilerin özellikle hastalık etkeni patojenlerin varlığının moleküler biyolojik yöntemlerden biri olan PCR ile hızlı tespitini yapmaktır.



Şekil 1.1 Antalya Körfezi Haritası

Turistik nedenlerden dolayı belli dönemlerde hızla artan nüfus ve yanlış politikalar nedeniyle kanalizasyon suları tam olarak arıtılmamakta deniz ve iç sulara deşarj edilmektedir. Kanalizasyon kaynaklı sularla temas eden organik içeriği yüksek deniz suyu ve iç sular mikroorganizmalar bakımından zenginlik içerirler (Schroeder 1977; Bull vd. 2000; Harwood vd. 2000; Schloter vd. 2000; Wilderer vd. 2002; Bitton 2005). Bu nedenle de söz konusu sularda organik, inorganik kimyasal kirliliğe ek olarak mikrobiyal kirlilikten söz etmek mümkündür (Curds 1975; Gieseke vd. 2001, Gilbride vd. 2006). Bu gibi sular ve bunlarla temas eden doğal su ortamlarında ortaya çıkabilecek mikrobiyal kirlenmelerde özellikle patojen (hastalığa neden olan) karakterdeki mikroorganizmalar insan sağlığı açısından önemlidir (Payment vd. 2000; Grant vd. 1996; Wagner and Loy 2002).

Sularla yayılma yeteneğindeki barsak enfeksiyonlarına neden olan çeşitli patojenler çevredeki insan yaşamı için bir tehdit oluşturur (Mitchell 1972; Rompre vd. 2002; Sahlstom vd. 2004; Panicker vd. 2004; Harwood vd. 2005). Patojenler de dahil bu gibi çevresel ortamlardaki mikroorganizmaların tanımlanmalarında kullanılan geleneksel yöntemler temeli, bu ortamlardan alınacak örneklerdeki mikroorganizmaların laboratuvarlarda ki üretilmelerine dayanır (Eaton vd. 2005, Aman vd. 1998; Anderson vd. 2005). Bu şekilde yapılan mikroorganizma tanımlamalarının yüksek maliyet içeren, çok çalışma gerektiren ve zaman tüketen süreçler olması, bu yönlerden daha avantajlı teknik süreçlerin aranmasını zorunlu kılmıştır.

Kirlilik indikatörü mikroorganizma (Mitchell 1972) tanımlanmasına dayanan süreçlerin geliştirilmesi bu yöndeki arayışların bir sonucudur. Bu son duruma örnek olarak, sularda ve içeceklerde fekal koliform bakteri (*E.coli*) saptanması verilebilir (Sharma and Dean-Nystrom 2003). Mikropsal kirlilik içerebilecek sularda varlığı gösterilecek *E. coli* bakterisi, bu ortamların kanalizasyon sularıyla temasa geldiğinin ve dolayısıyla diğer barsak kökenli patojenleri de içerebileceğinin göstergesi olmaktadır (Scott vd. 2002; Rompre vd. 2002).

Barsak kökenli patojen mikroorganizmalar arasında sularla yayılan enfeksiyon etkeni çeşitli mikroorganizmalar bulunur. Bunlar arasında kirli suların içilmesi ile geçen *Salmonella* gibi bakterilerin neden oldukları barsak enfeksiyonları (örneğin, tifo ,

dizanteri, kolera ve diğler gastroenterit vakaları) insan sağlığı açısından büyük önem taşır (Mitchell vd. 1974; Payment vd. 2000; Sahlstrom vd. 2004; Lemarchand vd. 2004).

Poliomyelit (ocuk felci) virüsü, Hepatit virüsü gibi viral enfeksiyonların etkenleri de sularla insanlara geçen viral patojenler arasında yer alır. Sularda varlığı saptanacak koliform bakterilerin niteliği (fekal kaynaklı olması gibi) kadar niceliğinin de önemi vardır.

Moleküler teknikler özellikle PCR amplifikasyonu, oklu PCR ve Real Time PCR (Lee vd. 2008), DNA-mikroarray analizi (Alexandrino vd. 2004; Ibekwe vd. 2002), Amplifiye olmuş DNA restriksiyon analiz yöntemi (ARDRA) (Blackall vd. 1998), Ribozomal aralık analizi (RISA) (Yu and Mohn 2001), Denature gel elektroforez (DGGE) (Muyzer and Smalla 1998, Zhang vd. 2005; Moura vd. 2007), Floresans in situ hibridizasyon (FISH) (Murray vd. 2001), 16S rDNA klonlaması (Chan vd. 2001; Ferris and Ward 1997; Felske vd. 1998; Amann and Ludwig, 2000; Adamezyk vd. 2003; Lee vd. 2006) gibi birçok yöntem ile incelenen ortam ve örneklerdeki mikroorganizmaların kompozisyonları ve aktiviteleri hakkında bilgi üretmek günümüzde olası hale gelmiştir (Scott vd. 2002; Lemarchand vd. 2004).

PCR ile bakteri tanımlamanın geleneksel yöntemlere göre pek çok avantajları vardır. Bu yöntemde; hedef organizmadan elde edilen genin bir parçası milyonlarca çoğaltılarak kolayca tespit edilebilecek seviyeye getirilmektedir. PCR, halen mevcut kültür tekniklerinden daha duyarlı olup, teşhiste 12-48 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermektedir. Bu yöntem özellikle çok yavaş çoğalan mikroorganizmalar araştırıldığı zaman çok daha uygun bulunmuştur (Murray vd. 2001). İlk zamanlar PCR, spesifik tek bir organizma için uygulandığından, fazla masraflı ve deneyim gerektirmekteydi. Günümüzde ise basit bir PCR laboratuvarı düşük maliyetle oluşturulmaktadır. Bu teknik hastalık teşhisinde doğrudan pratik uygulamaya sahip olduğu gibi, nedeni bilinmeyen hastalıklara da, epidemiyoloji sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (Arda 1995)

PCR' ın bu avantajları olmakla birlikte bazı dezavantajları da vardır. Tekniğin duyarlılığı kontaminasyona karşı hassas kılmakta ve deneyin sonucunun değerlendirilmesinde problem oluşturmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında deniz suyunda enfeksiyon nedeni patojen mikroorganizmaları *S. typhi*, *E. coli*, *S. sonnei* yüksek özgüllükte saptayan moleküler tekniğin geliştirilmesi ve uygulanabilirliğinin araştırılması temel amaç olarak alınmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. *Escherichia coli*'nin biyolojisi

2.1.1 *E. coli*'nin sistematığı

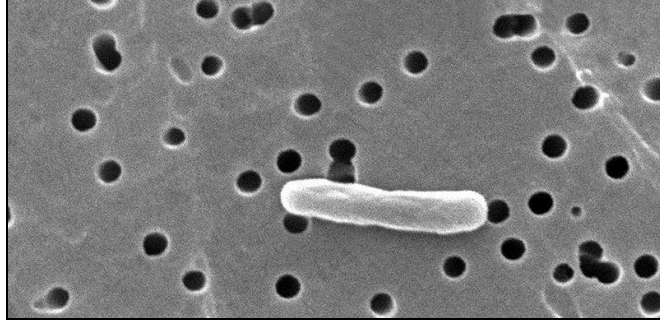
Çalışmada materyal olarak kullanılan *E. coli*'nin sistematığı Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *E. coli*'nin sistematığı

Şube:	Eubacteria
Sınıf:	Gamma Proteobacteria
Takım:	Enterobacteriales
Aile:	Enterobacteriaceae
Cins:	<i>Escherichia</i>
Tür:	<i>E. coli</i> (Linnaeus 1758)

2.1.2. *E. coli*'nin morfolojisi

E. coli 1885'de Thedor Escherich tarafından ishalleri süt çocuklarının dışkılarından izole edilip, *Bacterium coli commune* adı ile tarif edilmiş, daha sonra barsak dışı enfeksiyonlarındaki patojenliği tanınmış, 1919'da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins ad önerilene kadar *Bacterium coli* adı kullanılmıştır (Bilgehan 2000).



Şekil 2.1 *E. coli*'nin elektron mikroskobu ile çekilmiş resmi (Duarte 2009)

E. coli, diğer *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakteriler gibi, gram negatif çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Kapsül oluşturma nadirdir. Nutrient Agar' da Optimal üreme 37°C'de, nötral pH varlığında olur.

Sıvı besiyerlerinde genellikle homojen bulanıklık meydana getirir. Katı besiyerlerinde 24 saatte düzgün kenarlı, ortası kalkık, 2-3 mm çapında, pigmentsiz koloniler oluşturur (Bilgehan 2000).

Yaygın bir bakteri olmasından dolayı *E. coli* mikrobiyolojide sıkça çalışılmıştır ve moleküler biyolojide bir gereç haline gelmiştir.

Bakteriyel konjügasyon, genetik rekombinasyon, operon kavramları ilk *E.coli*'de keşfedilmiştir, DNA'nın çoğalması, RNA transkripsiyonu, protein sentezi gibi, moleküler biyolojinin pek çok önemli mekanizması, metabolizmanın çoğu ayrıntısı bu organizmada yapılan araştırmalarla anlaşılmıştır.

Laboratuarda kullanılan standart *E. coli* suşunun adı K12'dir. *E. coli* K12'nin ve O157:H7 serotipli bir suşun genom dizinleri çözülmüştür. K12 genomu yaklaşık 4200 genden oluşmaktadır, O157:H7 genomu ise K12'ninkiden %25 daha büyüktür. K12 suşu hastalık yapan bir faktörler taşımaz ve hatta K12'nin ilk izolasyonundan günümüze geçen yıllar zarfında kapsül yapma yeteneğini kaybederek laboratuvar ortamına uyum sağlamış, artık doğal ortamında (yani insan bağırsağında) başka *E. coli* türleriyle rekabet edemeyecek kadar zayıflamıştır (Bilgehan 2000).

E. coli modern biyoloji mühendisliğinde önemli bir yeri vardır. Araştırmacılar bu bakteriyi büyük miktarda DNA veya protein üretmek amacıyla bir fabrika gibi kullanırlar.

E. coli genelde zararsız olmasına rağmen kirlenmenin ölçütü olarak kullanılmasının nedeni, seçmeli (fakültatif) anaerob olmasından dolayı *E. coli* 'nin kolay kültürlenebilmesidir. Ayrıca, dışkıda bulunan *E. coli* sayısı patojen bakterilerin (örneğin tifo etmeni *S. typhi*) sayısından çok daha fazladır (Bitton 2005).

Su kirlenmesini belirlemek amacıyla yapılan nispeten basit testlerde *E. coli* 'ye benzeyen organizmalar için "koliform" terimi kullanılır. Ayrıca, dışkı kirlenmesi olmayan ortamlarda da *E. coli* 'nin var olabildiği gözlemlenmiştir (Bitton 2005).

2.1.3 *E. coli*'nin insan sağlığında rolü

Bağırsak florasının normal bir üyesi olan *E. coli* ile konak organizma arasında uyumlu bir ilişki olduğundan bakteri normalde hastalık yapmaz. Ancak, başka ortama geçmesi halinde ki bu aynı organizmada başka bir organ olabilir (idrar yolu enfeksiyonu ile mesaneye geçmek gibi) veya başka bir konak organizmanın bağırsağı olabilir, *E. coli* bir hastalık etmeni olabilir. Bazı *E. coli* tipleri içinde buldukları hayvan için zararsız olmalarına rağmen insana geçtiklerinde hastalık yapabilirler. Bu hastalıklar arasında başlıca ishalleri hastalıklar olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, mastit, septisemi ve gram-negatif pnömoni de sayılabilir (Cann vd. 2004).

2.2 *Salmonella typhi*' nin biyolojisi

2.2.1. *S. typhi*' nin sistematigi

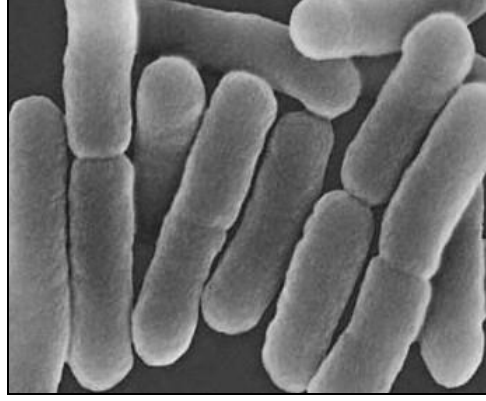
Çalışmada materyal olarak kullanılan *S. typhi*' nin sistematigi Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *S. typhi*' nin sistematigi

Şube:	Eubacteria
Sınıf:	Proteobacteria
Takım:	Enterobacteriales
Aile:	Enterobacteriaceae
Cins:	<i>Salmonella</i>
Tür:	<i>S. typhi</i> (Linnaeus 1758)

2.2.2 *S. typhi*' nin morfolojisi

S. typhi, Enterobacteriaceae içinde yer alan fakültatif anaerob, Gram negatif, çubuk şekilli patojen bir bakteridir. Nutrient agar da optimum üreme sıcaklıkları 35-37 °C olup, karbohidratlardan asit veya gaz oluştururlar, H₂ S üretirler, lizin ve ornithini kadaverin ve putresine dekarboksile ederler. Oksidaz negatif, katalaz pozitifler, laktoz, sukroz ve üreyi metabolize edemezler. Bazı atipik *S. typhi* biyotipleri ise lizini dekarboksile edemezken, laktoz, sukroz ve üreyi kullanabilirler (Bilgehan 2000).



Şekil 2.2 *S. typhi*'nin elektron mikroskobu altında çekilmiş resmi (Maynard 2005)

S. typhi üretilmesinde kullanılan diğer besi yerleri ise MacConkey agar, Deoksikolat sitrat agar, XLD agar, HE agar dır (Bilgehan 2000).

2.2.3 *S. typhi*'nin insan sağlığında rolü

S. typhi tifoğun nedenidir. Organizma dışkı yoluyla (fokal-oral yolla) iletilir. İnsanlar da dışkı yoluyla atılır ve kirli su, gıda veya dokunma yoluyla bulaşır (Giannella 1996). *S. typhi*' nin neden olduğu en önemli hastalık tifodur. Çoğunlukla lağım suyunda bulunurlar ve soğuga oldukça dirençlidirler. Bakterilerin ağız yoluyla insana girmesi ile enfeksiyon oluşur.

2.3 *Shigella sonnei*' nin biyolojisi

2.3.1 *S. sonnei*' nin sistematığı

Çalışmada materyal olarak kullanılan *S. sonnei*' nin sistematığı Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. *S. sonnei*' nin sistematığı

Şube:	Bacteria
Sınıf:	Proteobacteria
Takım:	Enterobacteriales
Aile:	Enterobacteriaceae
Cins:	<i>Shigella</i>
Tür:	<i>S. sonnei</i> (Linnaeus 1758)

2.3.2 *S. sonnei*' nin morfolojisi

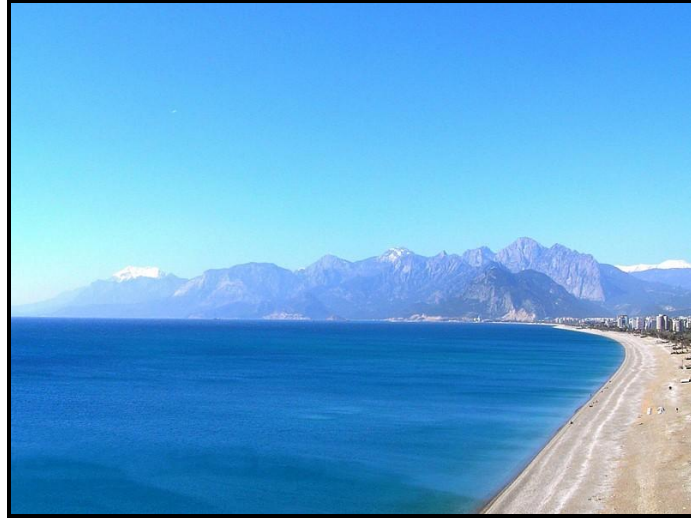
Shigella Gram-negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çubuk şekilli bir bakteri cinsidir. *E. coli* ve *Salmonella* ile yakından ilişkilidir. Şigeloz hastalığının etmeni olan *Shigella*, diğer primatlarda da hastalık yapar ama diğer memelilere etki etmez. Nutrient agar da optimum üreme sıcaklıkları 35-37 °C 'dir, karbohidratlardan asit veya gaz oluştururlar (Schloter vd. 2000).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yapıldığı yer

Araştırma da kullanılacak deniz suyu örnekleri Antalya' körfezi Konyaaltı (Şekil 3.1), Liman (Şekil 3.2), Side (Şekil 3.3) ve Kemer (Şekil 3.4) bölgelerinin sahillerinden alınmıştır. Örneklerin toplanacağı sucul ortamların pH'sı ve sıcaklığı ölçülüp kayıt edilmiştir.



Şekil 3.1 Konyaaltı Sahili, Antalya



Şekil 3.2 Liman, Antalya



Şekil 3.3 Side, Antalya



Şekil 3.4 Kemer, Antalya

3.1.2 Örneklerin toplanması, laboratuvara getirilmesi

Su örnekleri Antalya körfezindeki 4 farklı bölgeden aylık olarak alınmıştır (Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım, Aralık, Ocak, Şubat, Mart, Nisan, Mayıs, Haziran). Steril koşullarda alınan bu örnekler aseptik koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Örnekler santrifüj edilip, DNA'ları izole edilinceye kadar buzdolabında saklanmıştır.

3.1.3. Referans suşları ve temini

Referans *E. coli* ATCC 25922, *S. typhi* ATCC 6539, *S. sonnei* ATCC 9290 suşları Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji ABD üyesi Prof. Dr. Nazif Kolonkaya' dan ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezinden temin edilmiş, laboratuvar da besiyerlerine ekimi yapılarak çoğaltılıp kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

3.1.4.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri

a) **Nutrient agar:** Mikrobiyolojik analizlerde genel katı besiyeri olarak kullanılmıştır. Bileşiminde Pepton 5,0 g/L; Et ekstratı 3,0 g/L; bakteriyolojik-agar 12,0 g/L bulunur.

Dehidre besiyeri 20,0 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir ve 45-50 °C'a soğutulup steril petri dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C'da pH'sı 7,0 dır.

b) **Nutrient broth:** Mikrobiyolojik analizlerde genel sıvı besiyeri olarak kullanılır. Bileşiminde pepton 5,0 g/L; Et ekstratı 3,0 g/L bulunur.

Besiyeri, 8,0 g/L olacak şekilde distile su içinde eritilip şişelere dağıtılmıştır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkli olup, 25 °C' da pH' sı 7,0 dır.

c) **MacConkey agar:** Mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakteriler ve özellikle *E. coli* 'nin geliştirilmesi ve sayılması için selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır. Dışkı, idrar, su ve gıda örneklerinden koliform bakteriler yanında *Salmonella* izolasyonu için de kullanılmıştır. Bileşimi pepton 17,0 g/L; Pepton 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Lactoz 10,0 g/L; Bile tuz karışımı 1,5 g/L; Nötral kırmızı 0,03 g/L; Kristal viyole 0,001 g/L; Bakteriyolojik agar 13,5 g/L şeklindedir.

50,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş ve 45-50 °C'a soğutulup petri kutularına dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı kahve renkli olup, 25 °C'da pH'sı 7,1' dir.

d) Endo agar: Mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakteriler ve *E. coli* için selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır Bileşiminde pepton 10,0 g/L; K₂HPO₄ 2,5 g/L; Laktoz 10,0 g/L; Na₂SO₃ (anhidrat) 3,3 g/L; Pararosanilin 0,3 g/L; Bakteriyolojik agar 12,5 g/L bulunur.

39,0 g/L olacak şekilde olacak şekilde ısıtılarak distile su içinde eritilmiş ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş ve 45-50 °C'a soğutulup petri kutularına dökülmüştür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve soluk pembe renkli olup, 25 °C'da pH'sı 7,4'dir. Hazırlanmış besiyerinin oksijene maruz kalması sonunda renk giderek kırmızılaşır. Bu nedenle hazırlanmış besiyeri karanlıkta ve buzdolabında olmak üzere en çok birkaç gün depolanabilir.

e) Ksiloz Lisin Çikolata agarı (XLD) agar: *Salmonella* için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. Bileşiminde NaCl 5,0 g/L; D(+) Ksiloz 3,75 g/L; Laktoz 7,5 g/L; Sukroz 7,5 g/L; L(+) lizin 5,0 g/L; sodyum deoksilat 1,0 g/L; Sodyum thiosulfat 6,8 g/L; Amonyum demir sülfat, sitrat 0,8 g/L; fenol kırmızısı 0,08 g/L; Biyolojik-agar 14,5 g/L bulunur.

50 mL distile su içine 55,0 g/L dehidre besiyeri ilave edilmiştir, karıştırılmış ve üzerine 950 mL distile su eklenmiştir. Topaklanma olmadığından emin oluncaya kadar iyice karıştırılmıştır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir, 25 °C'da pH'sı 7,4'dir.

3.1.4.2 Gram boyama' da kullanılan kimyasal maddeler

Kristal viyole, lugol, bazik fuksin ve alkol kullanılmıştır.

3.1.4.3 DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

DNA izolasyonunda; SET tuz solüsyonu, TE (Tris-EDTA), KİA (kloroform: isoamilalkol), TAE (Tris asetik asit EDTA) , TBE (Tris Boric asit EDTA) solüsyonları, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), proteinaz K (10 mg/ml), Kloroform, İzoamil alkol, Etanol, Sodyum asetat, Lizozim enzimi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 SET Tuz Solüsyonu

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon (pH=8,0)
NaCl (Merck)	0.44 gr
EDTA (Applichem)	0.85 gr
Tris (Merck)	0.24 gr
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanmıştır

Çizelge 3.2 TE (Tris-EDTA) Tampon Çözeltisi

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon (pH=8,0)
Tris-HCl (Applichem)	10 mM
EDTA (Applichem)	1 mM

(karışım otoklavlanır).

Çizelge 3.3 KİA (kloroform:isoamilalkol)(24:1)

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon (pH=8,0)
Kloroform (Applichem)	24 ml
İsoamilalkol (Applichem)	1 ml

Çizelge 3.4 TAE (Tris asetik asit EDTA) Tampon Çözeltisi

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon (pH=8,0)
Tris base (Merck)	242 gr
Asetik asit (Merck)	57,1 gr
EDTA (Applichem)	100 ml
dH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanmıştır

(karışım otoklavlanır).

Çizelge 3.5 TBE (tris boric asit EDTA) Tamponu

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon (pH=8,0)
Tris base (Merck)	108 gr.
Boric asit (Applichem)	55 gr.
EDTA (Applichem)	40 ml.
dH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanmıştır

(karışım otoklavlanır).

3.1.4.4 PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar

PCR uygulamalarında; Tag DNA polimeraz ünitesi, dNTP mix, PCR tamponu, MgCl₂, Primerler (primer listesi çizelge 3.7' de verilmiştir) ve dH₂O (steril) kullanılmıştır.

3.1.4.5 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Elektroforezde; Agaroz, EtBR(10mg/ml), 1xTAE, DNA işaretleyici (100 bp-1000 bp) ve Yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) kullanılmıştır.

Çizelge 3.6 Agaroz jel hazırlanışı

Kimyasalın adı	Son konsantrasyon (pH=8,0)
Agaroz (Applichem)	0.3 gr
dH ₂ O	30 ml

3.1.5 Yararlanılan alet ve ekipmanlar

Laboratuvarda yapılan işlemler sırasında; PCR, UV Görüntüleme Sistemi, yatay elektroforez, Etüv, Otoklav, Derin Dondurucu, Santrifüj, Saf Su Cihazı, Elektronik Teraziler, Vorteks, Manyetik karıştırıcı, pH metre, Otomatik pipetler, PCR tüpleri, Plastik tüp ve değişik boyutlarda cam malzemeler kullanılmıştır.

3.2 Metot

Tüm çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Moleküler Genetik araştırma laboratuvarın da yapılmıştır.

3.2.1 Su örneklerinin labarotuvara getirilmesi ve mikroskopik incelemesi

Laboratuvara getirilen su örnekleri mikroskopik inceleme öncesinde kaba filtreden geçirilmiştir (Moura vd. 2007). Filtre edilmiş sıvıdan elde edilen örnekler, morfolojik tanımlama için mikrobiyolojik gram boyama yöntemi ile boyanıp mikroskopta incelenmiştir.

Gram boyama yapmak için hazırlanmış preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika beklenmiş ve iyot-lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Preparata tekrar iyot-lugol çözeltisi damlatılarak 1 - 2 dakika bekletilmiş, distile su ile yıkanmış iyot-lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine %96 'lık etil alkol damlatılmış 15 - 30 saniye beklenmiş, distile su ile yıkanmıştır ve karşıt boya olarak safranin damlatılmıştır ve 40 - 50 saniye bekletilmiştir. Preparat distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmış, preparata immersiyon yağı damlatılmış ve 100 'lük objektifle incelenmiştir. Mor renkli bakteriler

Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2 Çalışmada kullanılan referans bakterilerin üretimi

Çalışma da kullanılan referans bakteriler uygun katı ve sıvı besiyerlerinde 37 °C’ de ekimi yapılarak üretilmiştir. Üretilen bakterilerden DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.3 Referans bakteri ve su örneklerinden bakteriyel DNA izolasyonu

Referans olarak *E. coli* ATCC 25922, *S. typhi* ATCC 6539, *S. sonnei* ATCC 9290 suşları kullanılmıştır (Maynard vd. 2005; Alvarez vd. 2003).

1. Numaralandırılmış örneklerden 2 ml sıvı alınmış, her biri 16.000 Xg’de soğutmalı ultra santrifüj cihazında santrifüj edildikten sonra süpernatant ve çökmüş partiküller ayrılmıştır.
2. Çökmüş hücre ve tüm atık partiküller PBS tamponu ile iyice berraklaşmaya kadar 2-3 kez yıkanıp 3500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Hazırlanan set solüsyonundan 1ml, lizis tamponundan ise 100 µl eklenmiş ve 37°C’deki su banyosun da 30 dk. bekletilmiştir.
4. Üzerine 100 µl SDS, 50 µl proteinaz K eklenmiş ve 55 °C ‘deki su banyosunda 2 saat bekletilmiştir.
5. Bunun üzerine 200 µl NaCl eklenmiş ve el ile hafifçe karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 500 µl Kloroform/ izoamil alkol konulmuş ve yine el ile 30 dk. boyunca karıştırılmıştır. Bu karışım 3500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatantlar yeni bir tüpe boşaltılmıştır.
6. Süpernatantların üzerine 1 ml. %100’lük etanol eklenmiş ve 3500 devirde 15 dk. santrifüj edilmiştir.

7. %70'lik etonolden 500 µl eklenmiş ve 1000 devirde 3 dk. santrifüj edilmiştir.
8. Çıkan tüplerdeki süpernatantlar boşaltılıp tüplerin kapakları açık bir biçimde kurutma kağıdının üzerinde yaklaşık 30 dk. bekletilmiştir.
9. Alkol kokusu giden örneklerin üzerine en son olarak 100 µl TE tamponu eklenmiş ve DNA'lar kullanıma hazır hale getirilmiştir.

İzole edilen DNA'lar derin dondurucu da -20' °C saklanmıştır. Toplanan su örneklerinden elde edilen genomik DNA' lar da yukarıdaki DNA izolasyon yöntemi ve hazır DNA izolasyon kitleri (Qiagen-DNA izolasyon kiti) ile izole edilerek elde edilmiştir.

3.2.4 Bakteriyel DNA'nın kalitatif tayini

DNA'ların izolasyonun son aşamalarında sodyum asetat eklendiğinde tüp içerisinde çok yoğun olmayan bir pelet gözlenmiştir.

3.2.5 Bakteriyel DNA'nın kantitatif tayini

dsDNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbanların oranıyla (A_{260}/A_{280}) belirlemek mümkündür. Absorbsiyon spektrumunun şekli aynı zamanda ekstraksiyon katsayısı, bazların doğasıyla değişiklik arz eder. Şöyle ki, saf dsDNA için $A_{260}/A_{280}=1,8$ 'dir. Saf bir RNA'nın ki ise 2.0 civarındadır. Protein doğal olarak $\lambda_{max}=280$ olduğu için 260/280 oranı 1'den küçüktür. Buna göre bir DNA örneğinde A_{260}/A_{280} değeri 1.8' den büyük ise RNA kontaminasyonuna 1.8' den küçük ise protein veya fenol kontaminasyonuna işaretir. A_{260}/A_{280} 1.5-1.8 arasında olması DNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir (Turner 2004).

3.2.6 Primerlerin hazırlanması

Bu indikatör türlerin gen bölgelerini belirlenmek üzere ileri ve geri primer setleri tasarlanmıştır. Bunun için DNA-MAN ve İnvitrogen bilgisayar programı kullanılmıştır. Elde edilen kromozomal DNA'dan dizayn edilen primerler ticari şirketlerden sağlanmıştır.

E. coli, *S. typhi*, *S. sonnei* için kullandığımız primerler modifiye edilerek hazırlanmış ve aşağıdaki çizelge 3.7 ' de verilmiştir (Pass vd. 2000, Way vd. 1993).

Çizelge 3.7 Bakteri primerleri'nin listesi

Bakteri Adı	Primer Adı	Primer Adı	Boyut(bp)
<i>E. coli</i>	CNF ₂ -F	5'-GTGAGGCTCAACGAGATTATGCACTG-3'	839
	CNF ₂ -R	5'-CCACGCTTCTTCTTCAGTTGTTCCCTC-3'	
<i>S. typhi</i>	Hin1750-F	5'-CTAGTGCAAATTGTGACCGCA-3'	239
	Hin1750-R	5'-CCCCATCGCGCTACTGGTATC-3'	
<i>E. coli</i>	VirF	5'-AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC-3'	618
	VirR	5'TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC3'	
<i>S. sonnei</i>	IpaH-F	5'CCTTGACCGCCTTTCCGATA3'	606
	IpaH-R	5'CAGCCACCCTCTGAGGTACT3'	

3.2.7 Primer T_m (ayrılma) sıcaklıklarının hesaplanması

Kullanılan primerlerin T_m sıcaklıkları Oligo Analyzer 3.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.8 Primer T_m sıcaklıklarının Hesaplanması

T _m F primer=57,3 °C	T _m R primer= 58,8 °C
$T_{m_{ort}} = (T_{m_{F \text{ primer}}} + T_{m_{R \text{ primer}}}) / 2 = 58,05 \text{ °C}$	

3.2.8 PCR reaksiyonu ve optimizasyonu

PCR için bu primer setleri ve saflaştırılmış genomik DNA, PCR master karışımına (Fermantas, Kanada) ilave edilmiştir ve PCR için hazır hale getirilmiştir. Bu işlemde kullanılan PCR karışımı çizelge 3.8’ de verilmiştir.

Çizelge 3.9 Cnf₂ geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12.5 µl
Mg ⁺²	7.5 µl
Geri primer	12.5 µl
İleri primer	12.5 µl
dNTP’ler	20 µl
Tag polimeraz	0.5 µl
Steril distile su	47.5 µl
TOPLAM	113 µl

Oluşan karışım 5 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 4 tüpün içine 3 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cycler’ a yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.10 Hin 1750 geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12.5 µl
Mg	7.5 µl
Geri primer	12.5 µl
İleri primer	12.5 µl
dNTPs	20 µl
tag polymeraz	0.5 µl
steril distile su	32.5 µl
TOPLAM	98 µl

Oluşan karışım 5 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 4 tüpün içine 3 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cycler' a yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.11 İpaH geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12.5 µl
Mg	7.5 µl
Geri primer	12.5 µl
İleri primer	12.5 µl
dNTPs	20 µl
tag polymeraz	0.5 µl
steril distile su	32.5 µl
TOPLAM	98 µl

Oluşan karışım 5 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 4 tüpün içine 3 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cycler' a yerleştirilmiştir.

3.2.9 Tez çalışmasın da her bir gen için kullanılan primerlerin PCR protokolü

Her bir gen bölgesi için kullanılmış olan PCR protokolleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.12 Cnf₂ geninin PCR protokolü

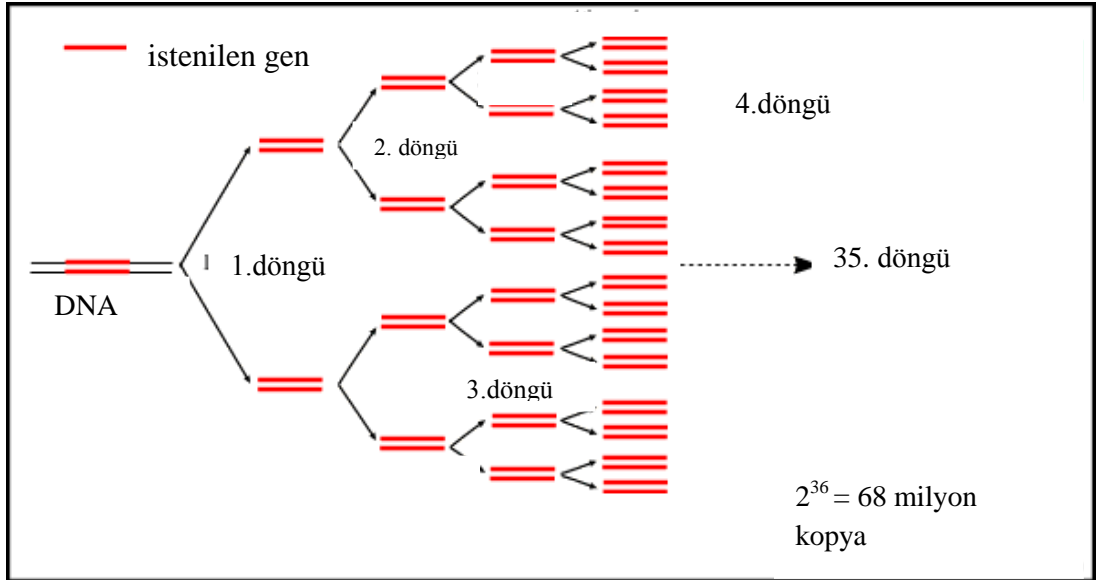
Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95 °C	30 sn.	1
72 °C	1 dk.	5
95 °C	30 sn.	20
63 °C	30 sn.	20
72 °C	30 sn.	20
72 °C	5 dk.	-

Çizelge 3.13 Hin geninin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94 °C	2 dk.	1
94 °C	1.5 dk.	30
62 °C	30 sn.	30
72 °C	1.5 dk.	30
72 °C	7 dk.	-

Çizelge 3.14 İpaH genin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94 °C	2 dk.	1
94 °C	1dk.	35
62°C	1 dk.	35
72 °C	2.5 dk.	35
72 °C	10 dk.	-



Şekil 3.5 Bir PCR döngüsünün şematize hali

3.2.10 Jel Elektrofrez, boyama ve görüntüleme

Belirlenen gen ürünlerinin her biri mini elektrofrez tankında ethidium bromide boyası ile hazırlanmış %1'lik agaroz jelde 240 Volt, 80 amper' de 1 saat yürütülmüş ve UV lambası altında incelenmiştir. Fotoğraf makinesiyle resimleri çekilmiş ve bulgulara eklenmiştir.

4.BULGULAR

Çalışma'nın ilk aşamasında pozitif kontrol olabilmesi için referans olarak gelen *E. coli*, *S. typhi*, *S. sonnei* bakteri suşları laboratuvarında ekimi yapılarak çoğaltılmıştır.

Çalışma boyunca Eylül 2009-Ağustos 2010 tarihleri arasında olmak üzere her ay istasyon bölgelerden su örnekleri toplanmıştır. Su örnekleri alınırken pH ölçümleri ve sıcaklık ölçümleri yapılmıştır.

4.1 Deniz suyu sıcaklığı ve pH' lardan elde edilen bulgular

Aylara ve bölgelere göre elde edilen sıcaklık ve pH' lar. Aşağıdaki (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4)' te verilmiştir.

Çizelge 4.1 Konyaaltı bölgesi için aylara göre su sıcaklıkları ve pH' ları

Aylar	pH	Sıcaklık °C
Ağustos	7.81	28.7
Eylül	7.79	26
Ekim	7.80	24
Kasım	7.88	23
Aralık	7.99	18
Ocak	8.00	17.6
Şubat	8.22	16
Mart	8.10	16
Nisan	8.12	17
Mayıs	7.93	20
Haziran	7.94	23
Temmuz	7.86	27

Çizelge 4.2 Side bölgesi için aylara göre su sıcaklıkları ve pH'ları

Aylar	pH	Sıcaklık °C
Ağustos	7.88	29
Eylül	7.88	26.5
Ekim	7.86	25
Kasım	7.85	24
Aralık	7.85	19
Ocak	7.83	18
Şubat	7.84	16.5
Mart	7.85	17
Nisan	7.85	18
Mayıs	7.90	21
Haziran	7.87	23
Temmuz	7.86	26

Çizelge 4.3 Liman bölgesi için aylara göre su sıcaklıkları ve pH'ları

Aylar	pH	Sıcaklık °C
Ağustos	7.77	27
Eylül	7.73	25
Ekim	7.73	23
Kasım	7.80	22.5
Aralık	7.89	18
Ocak	7.91	17.4
Şubat	8.08	15.7
Mart	8.01	15.9
Nisan	8.02	16
Mayıs	7.96	20
Haziran	7.80	21.6
Temmuz	7.81	24

Çizelge 4.4 Kemer bölgesi için aylara göre su sıcaklık ve pH'ları

Aylar	pH	Sıcaklık °C
Ağustos	7.85	26.8
Eylül	7.87	25.5
Ekim	7.89	23.5
Kasım	7.89	22.5
Aralık	7.92	17.5
Ocak	7.95	17
Şubat	7.97	15
Mart	7.94	16
Nisan	7.88	17
Mayıs	7.89	19
Haziran	7.81	21.4
Temmuz	7.83	23

4.2 Referans suşların üretimi ile ilgili bulgular

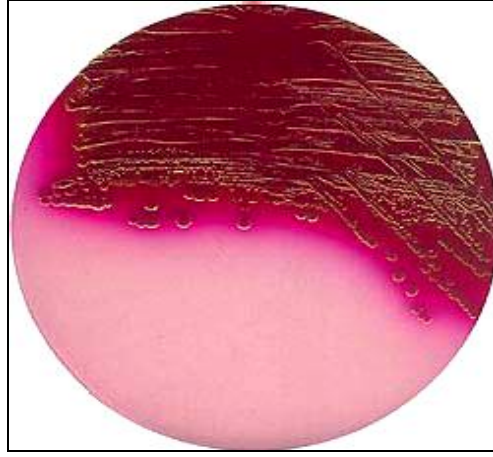
E.coli bakterisi MacConkey besiyeri, nutrient agar besiyeri, endo agar besiyerinde 37 °C' de üretilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen resimler Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3' te verilmiştir.



Şekil 4.1 MacConkey besiyerinde *E. coli* (orijinal)



Şekil 4.2 *E. coli*'nin nutrient agar'da üremiş hali (orjinal)

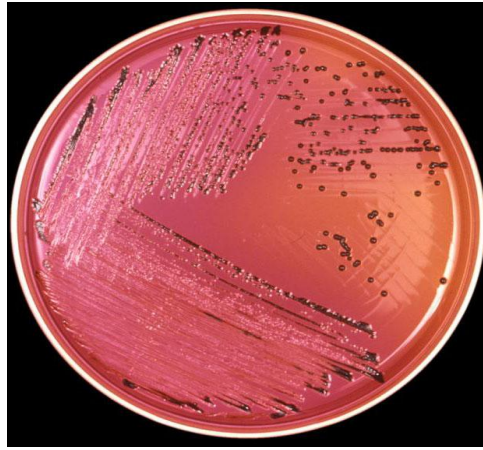


Şekil 4.3 *E. coli*'nin endo agar da üremiş hali (orjinal)

S. typhi bakterisinin nutrient agarda, MacConkey agarda, XLD agar besi yerinde 37 °C' de üretilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen resimler Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.4 MacConkey besi yerinde *S. typhi* (orijinal)



Şekil 4.5 XLD besi yerinde *S. typhi* (orijinal)

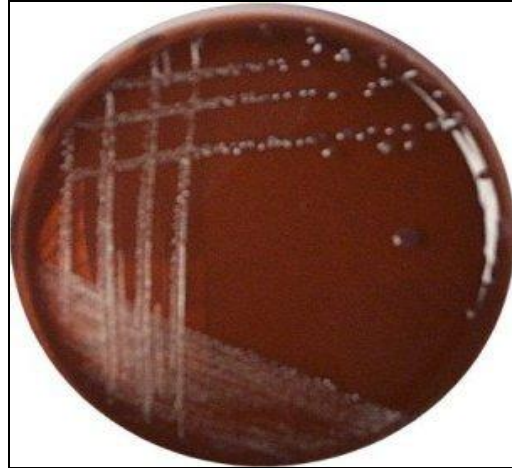


Şekil 4.6 Nutrient agarda *S. typhi* (orijinal)

S. sonnei bakterisinin MacConkey agarda, XLD agar besi yerinde 37 °C’ de üretilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen resimler Şekil 4.7, Şekil 4.8’ de verilmiştir.



Şekil 4.7 MacConkey agar da *S. sonnei* (orijinal)



Şekil 4.8 EMB agar da *S. sonnei* (orijinal)

S. typhi, *E. coli* bakterileri aynı zaman da nutrient broth sıvı besi yerinde de üretilmiştir. Örnekler Şekil 4.9, Şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.9 *S. typhi* nutrient broth'ta üremiş hali (orijinal)



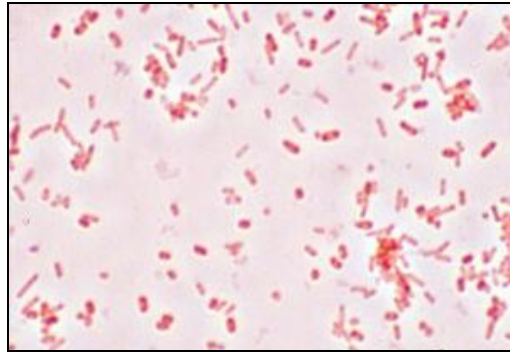
Şekil 4.10 *E. coli* 'nin nutrient broth'ta üremiş hali(orijinal)

4.3 Mikroskobik çalışma sonucu elde edilen bulgular

Gram boyama yapılan su örnekleri ve referans bakteriler mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 4.11 Gram negatif *E. coli*



Şekil 4.12 Gram-negatif *S. typhi* (orijinal)



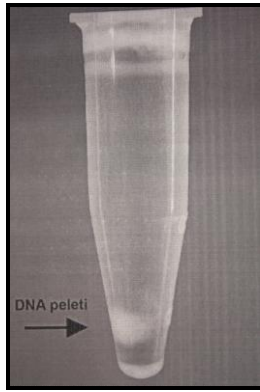
Şekil 4.13 Gram-negatif *S. sonnei* (orijinal)

4.4 PCR çalışmalarına ilişkin bulgular

Çalışmamızda toplam 4 bölge 12 ay olmak üzere 48 kez alınan deniz suyu örneklerinden ve 3 adet referans bakteriden alınan örneklerle toplam 51 örneğinin bakteri DNA'sı izole edilmiştir.

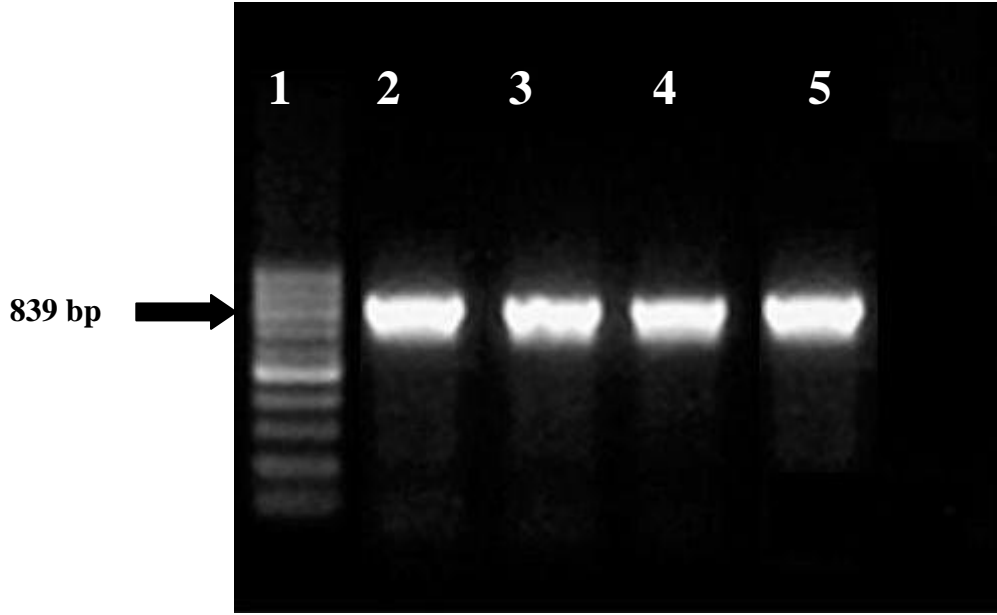
E. coli, *S. typhi* ve *S. sonnei* referans suşlarından elde edilen DNA'ların Cnf₂, Vir, Hin, ipaH primerleri kullanılarak 4 gen bölgesi için 16 kez PCR yapılmıştır.

DNA izolasyonunda elde edilen DNA peleti şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14 DNA peleti

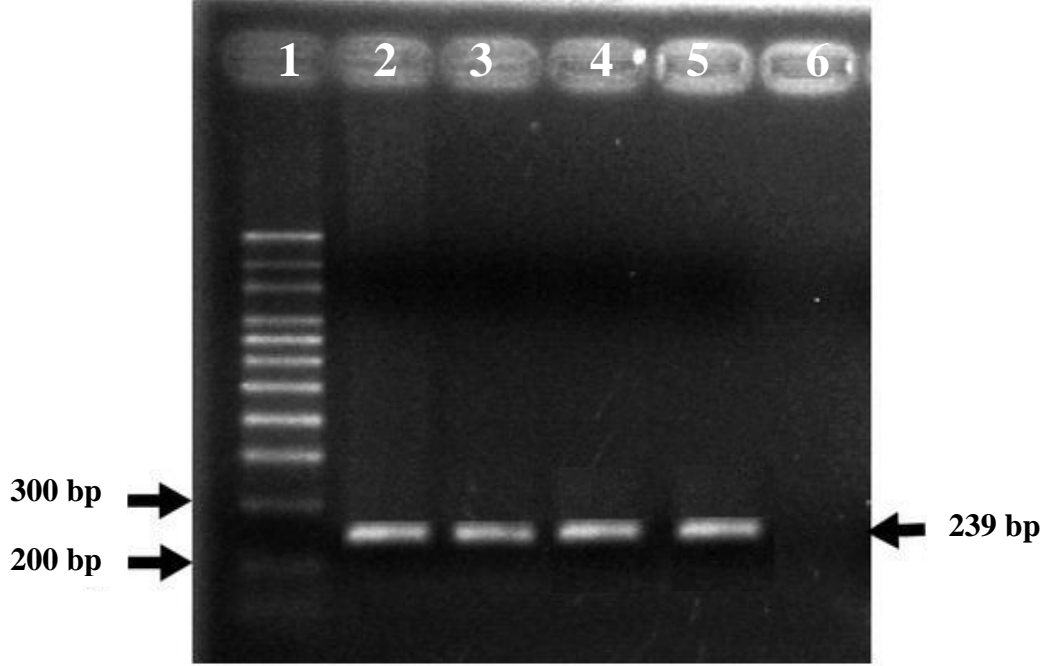
E. coli bakterisi Cnf₂ gen bölgesi için PCR ürünü 839 baz çifti uzunluğunda olup tek bir bant halinde gözlenmiştir.



Şekil 4.15 *E. coli* genomik DNA'sının Agaroz jelde görünüşü

- 1) DNA işaretleyicisi
- 2) *E. coli* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 3) *E. coli* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 4) *E. coli* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 5) *E. coli* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 6) Negatif kontrol

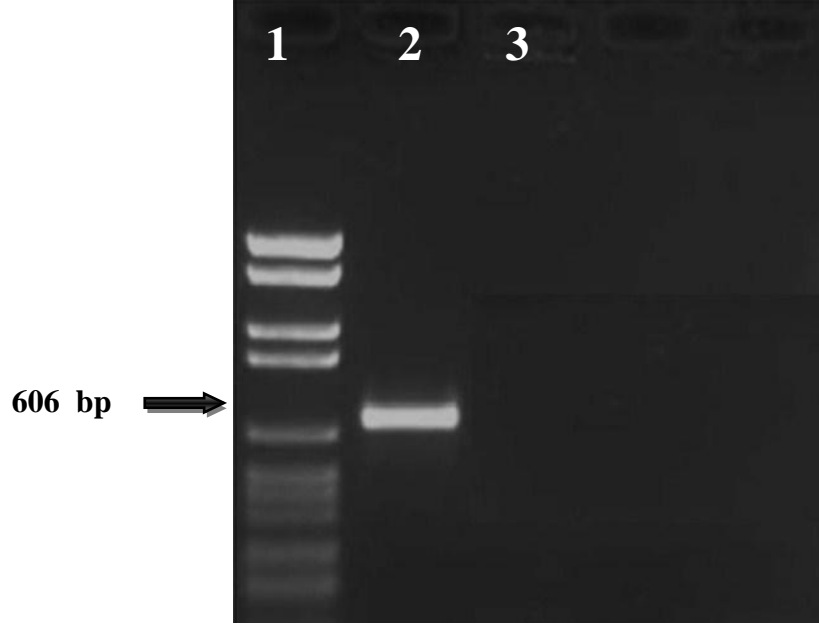
E. coli bakterisi Hin gen bölgesi için PCR ürünü 239 baz çifti uzunluğunda. olup tek bir bant halinde gözlenmiştir.



Şekil 4.16 *E. coli* genomik DNA'sının agaroz jelde görünüşü

- 1) M: DNA işaretleyicisi
- 2) 2. *E. coli* (Hin gen bölgesi) örneği
- 3) 3. *E. coli* (Hin gen bölgesi) örneği
- 4) 4. *E. coli* (Hin gen bölgesi) örneği
- 5) 5. *E. coli* (Hin gen bölgesi) örneği
- 6) Negatif kontrol

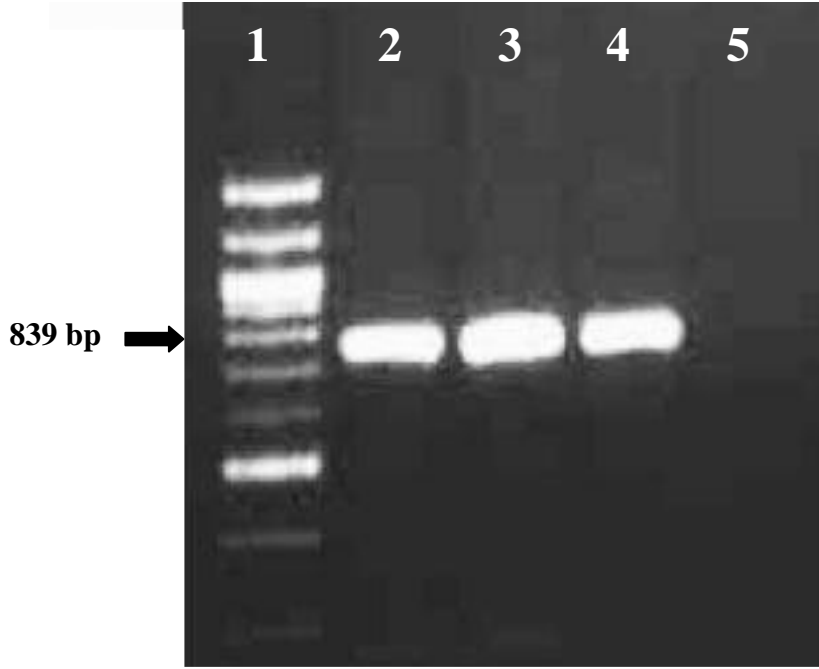
E. coli bakterisi İpaH gen bölgesi için PCR ürünü 606 baz çifti uzunluğunda olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



Şekil 4.17 *E. coli* genomik DNA'sının agaroz jelde görünüşü

- 1) DNA işaretleyicisi
- 2) *E. coli* (İpaH gen bölgesi) örneği
- 3) Negatif kontrol

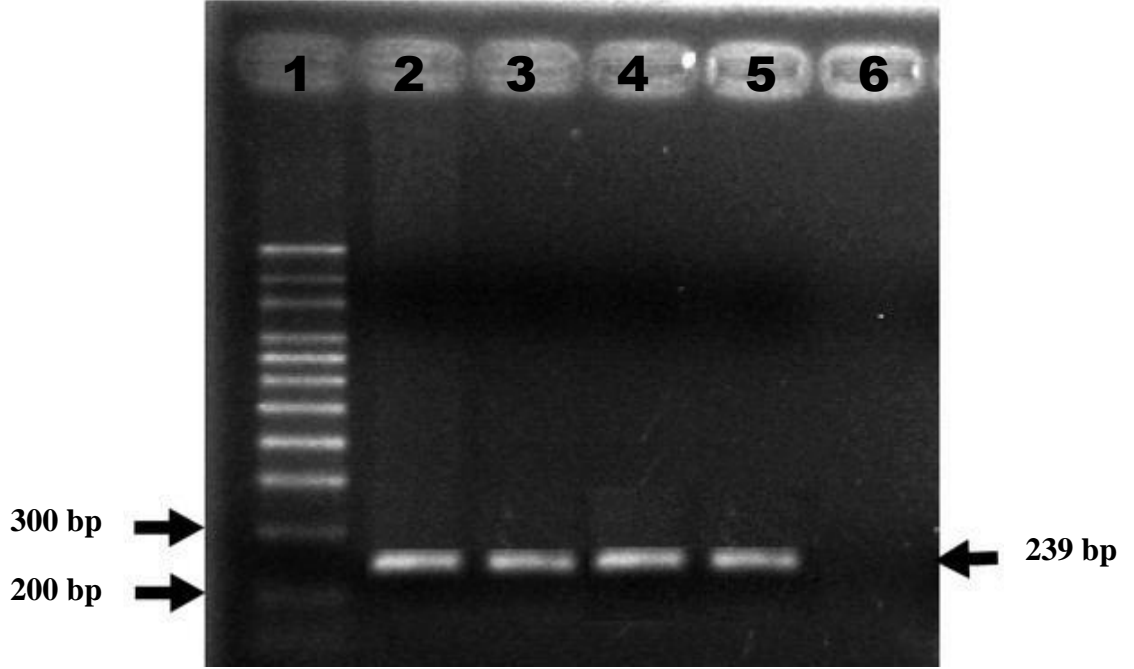
S. typhi bakterisi Cnf₂ gen bölgesi için PCR ürünü 839 baz çifti uzunluğunda olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



Şekil 4.18 *S. typhi* genomik DNA'sının agaroz jel'de görünüşü

- 1) 1. DNA işaretleyicisi
- 2) 2. *S. typhi* (CNFgen bölgesi)
- 3) 3. *S. typhi* (CNF gen bölgesi)
- 4) 4. *S. typhi* (CNF gen bölgesi)
- 5) 5) Negatif kontrol

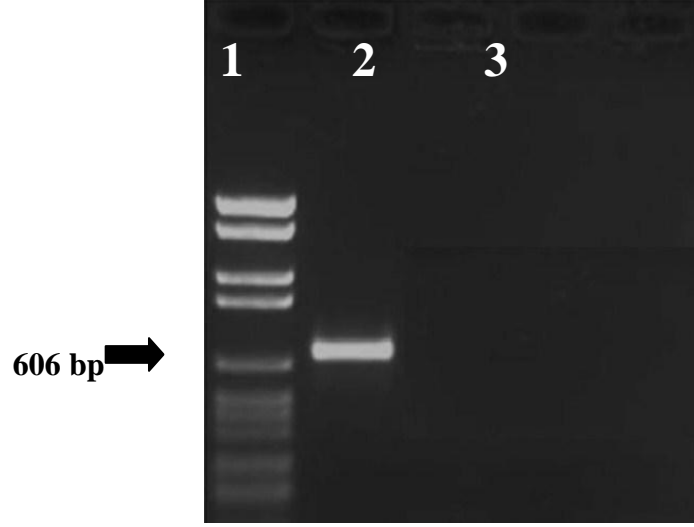
S. typhi bakterisi Hin gen bölgesi için PCR ürünü 239 baz çifti olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



Şekil 4.19 *S. typhi* genomik DNA'sının agaroz jel'de yürütülmüş hali

- 1) M: DNA işaretleyicisi
- 2) 2. *S. typhi* (Hin gen bölgesi)
- 3) 3. *S. typhi* (Hin gen bölgesi)
- 4) 4. *S. typhi* (Hin gen bölgesi)
- 5) 5. *S. typhi* (Hin gen bölgesi)
- 6) Negatif kontrol

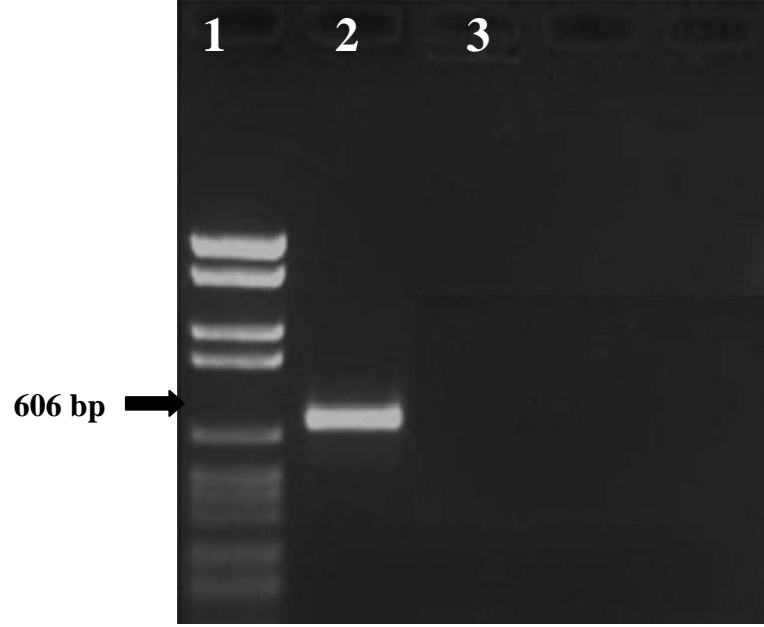
S. typhi bakterisi İpaH gen bölgesi için PCR ürünü 606 baz çifti uzunluğunda .
olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



Şekil 4.20 *S. typhi* genomik DNA'sının agaroz jel görünüşü

- 1) DNA işaretleyicisi
- 2) 2 *S. typhi* (İpaH gen bölgesi) örneği
- 3) Negatif kontrol

S. sonnei bakterisi İpaH gen bölgesi için PCR ürünü 606 baz çifti olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



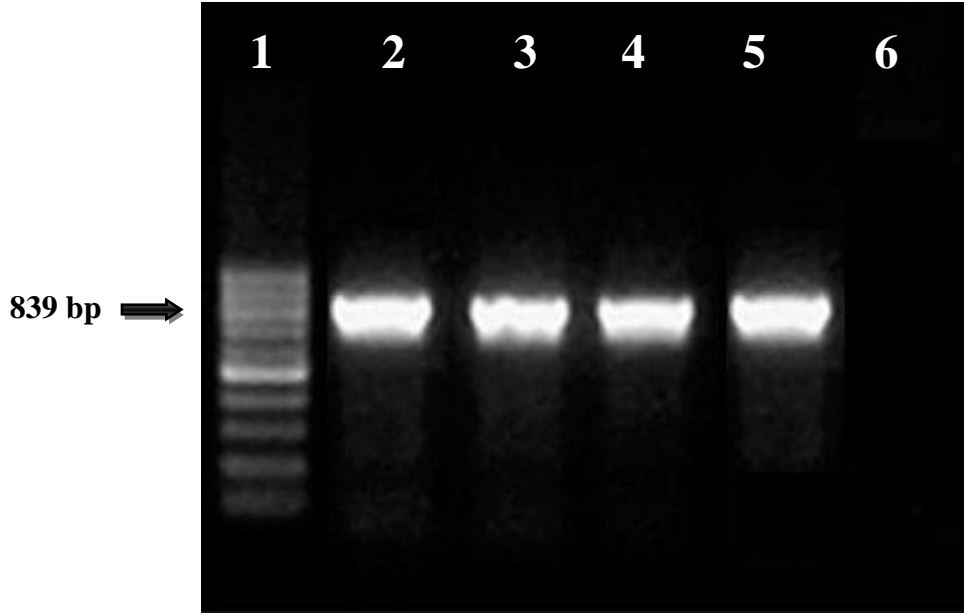
Şekil 4.21 *S. sonnei* genomik DNA'sının agaroz jel görünüşü

1)1 DNA işaretleyicisi

2) 2.*S. sonnei* (İpaH gen bölgesi) 1.örneği

3) 3.Negatif kontrol

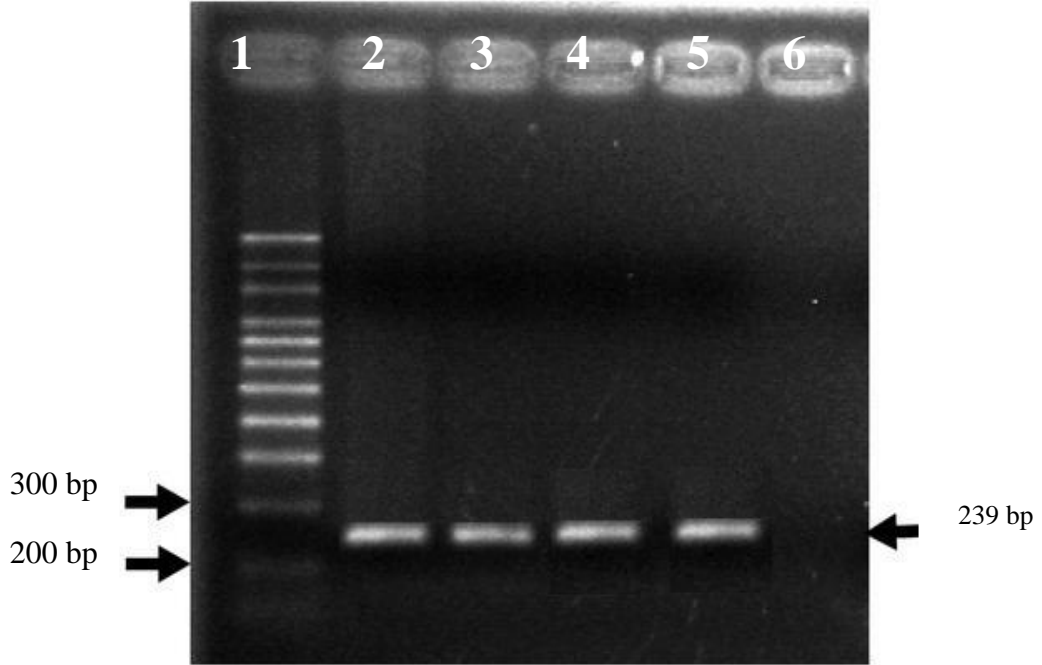
S. sonnei bakterisi Cnf₂ gen bölgesi için PCR ürünü 839 bp. olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



Şekil 4.22 *S. sonnei* genomik DNA'sının agaroz jel görünüşü

- 1) DNA işaretleyicisi
- 2) *S. sonnei* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 3) *S. sonnei* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 4) *S. sonnei* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 5) *S. sonnei* (Cnf₂ gen bölgesi) örneği
- 6) Negatif kontrol

S. sonnei bakterisi Hin gen bölgesi için PCR ürünü 239 bp. olup tek bir bant halinde gözlenmiştir



Şekil 4.23 *S. sonnei* genomik DNA'sını agaroz jel görünüşü

- 1) 1.DNA işaretleyicisi
- 2) 2..*S. sonnei* (Hin gen bölgesi) örneği
- 3) 3.. *S. sonnei* (Hin gen bölgesi) örneği
- 4) 4. *S. sonnei* (Hin gen bölgesi) örneği
- 5) 5. *S. sonnei* (Hin gen bölgesi) örneği
- 6) Negatif kontrol

4.5 Deniz suyundan elde edilen DNA'ların PCR sonuçları

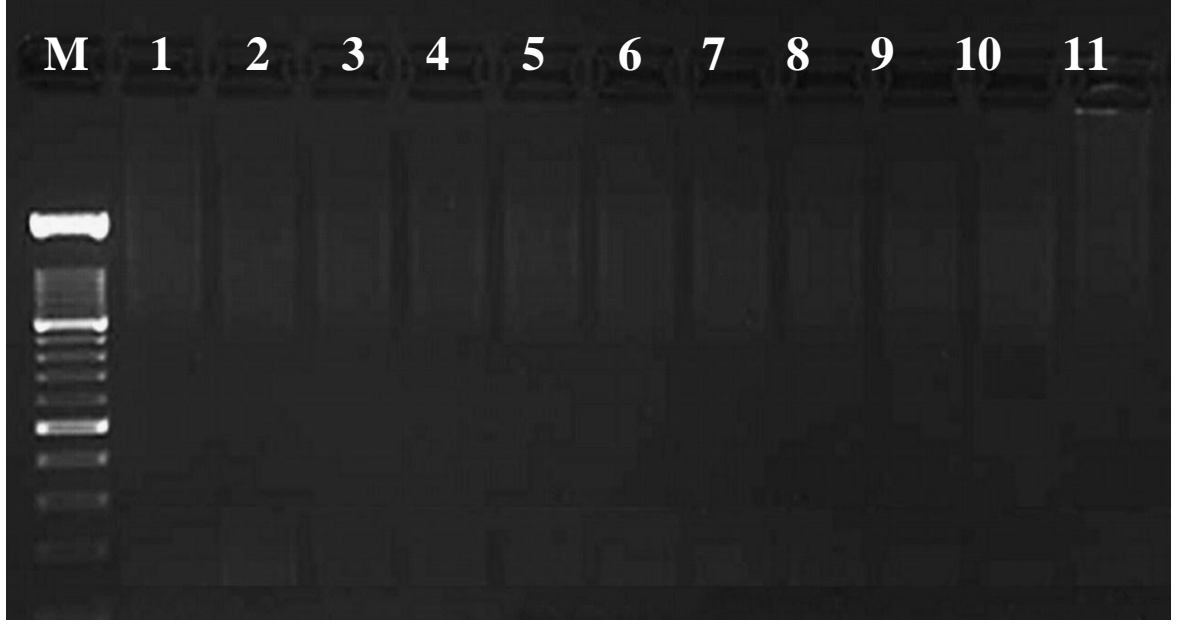
Her ay 1 istasyon için *E. coli* Cnf₂, Hin, ipaH, *S. typhi* için Cnf₂, Hin, ipaH, *S. sonnei* için Cnf₂, Hin, İpaH primerleri kullanılarak toplam 48 adet PCR yapılmıştır.

Tüm istasyonlarda yapılan PCR çalışmaları sırasında yalnızca 7. ve 8. yani Temmuz ve Ağustos aylarında *E. coli* Cnf₂ ve Hin genleri pozitif olarak gözlenmiştir.

S. typhi, *S. sonnei* 12 ay boyunca hiçbir istasyonda gözlenmemiştir.



Şekil 4.24 Konyaaltı bölgesin de *E. coli* Cnf₂ gen bölgesinin 1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan , 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.25 Konyaaltı bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. typhi* bakterisi Hin gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan , 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



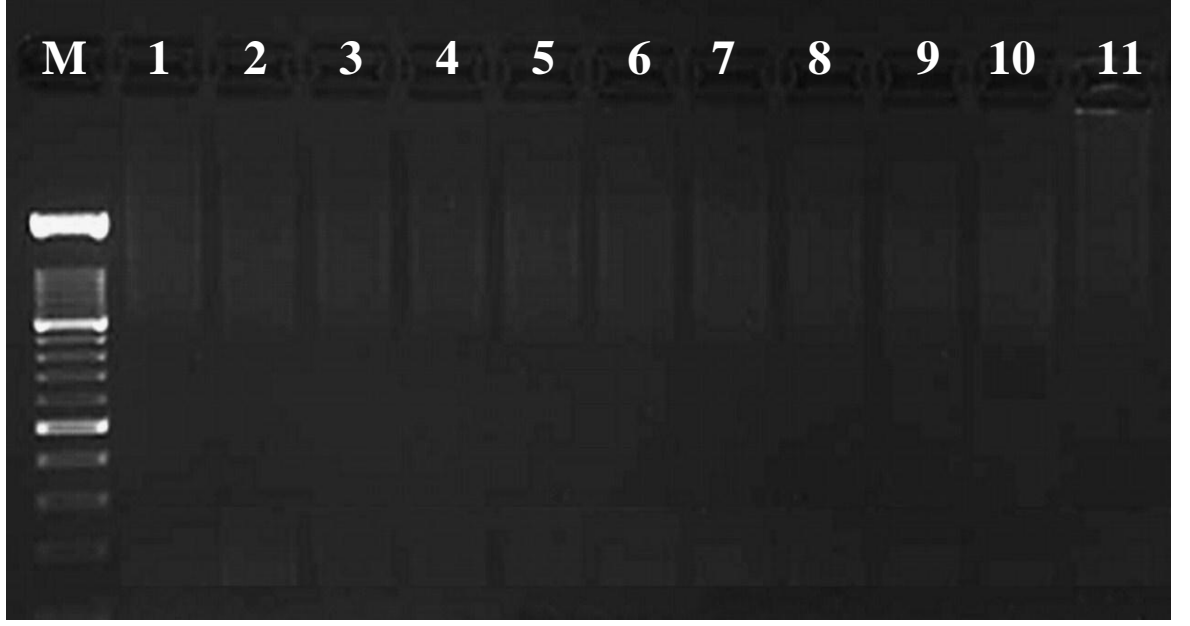
Şekil 4.26 Konyaaltı bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. sonnei* bakterisi ipaH gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan , 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.27 Liman bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *E. coli* bakterisi Cnf₂ gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



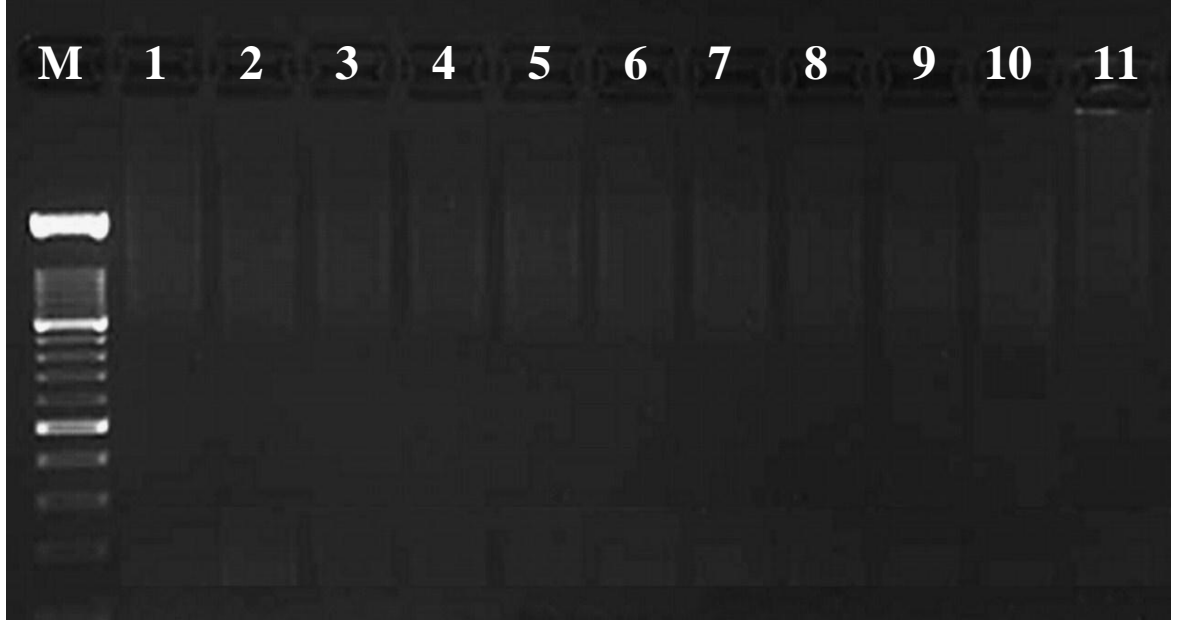
Şekil 4.28 Liman bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. typhi* bakterisi Hin gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.29 Liman bölgesinde aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. sonnei* bakterisi ipaH gen bölgesinin aylara göre PCR sonuçları **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım**



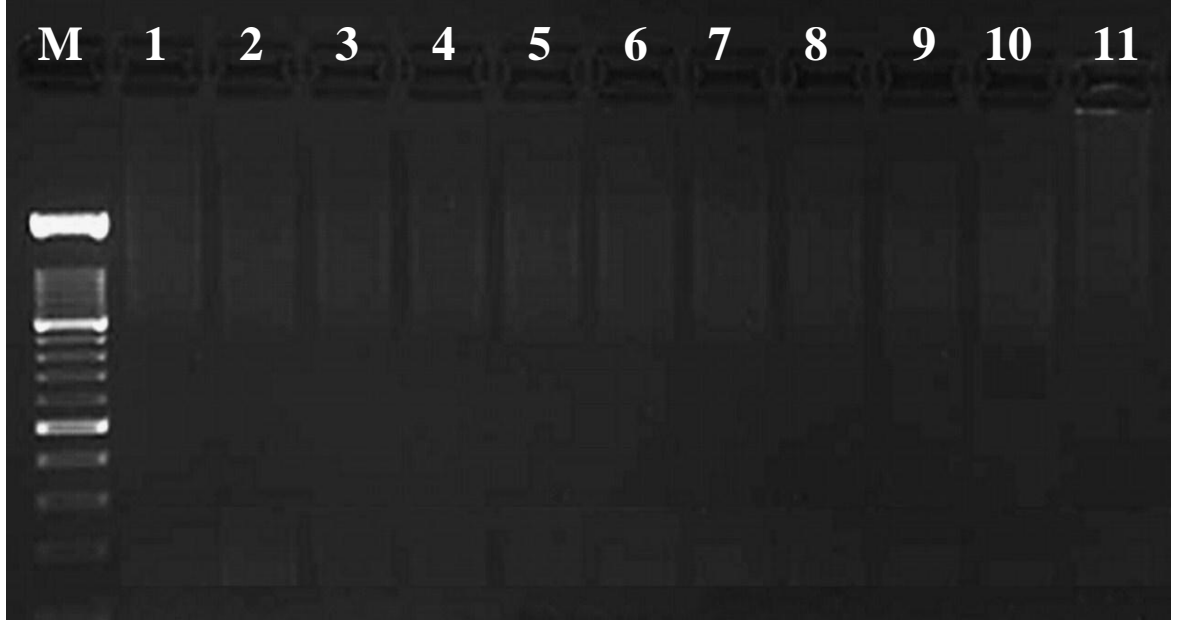
Şekil 4.30 Kemer bölgesinde aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *E. coli* bakterisi Cnf₂ gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.31 Kemer bölgesinde aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. typhi* bakterisi Hin gen bölgesinin 1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan , 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım aylarına göre PCR sonuçları



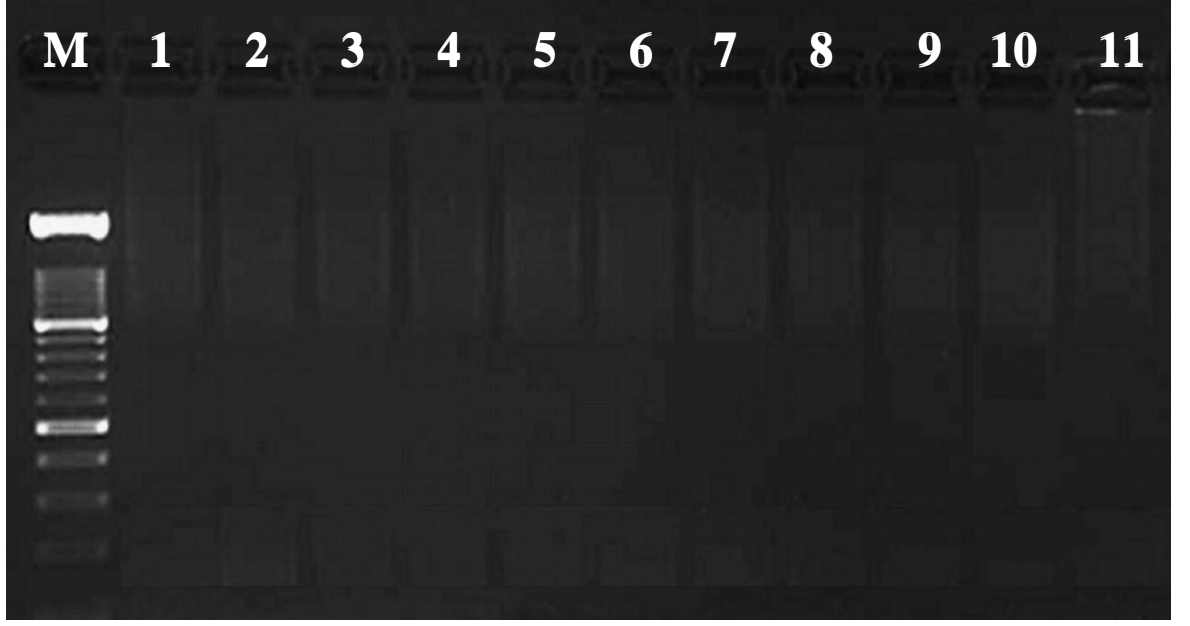
Şekil 4.32 Kemer bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. sonnei* bakterisi ipaH gen bölgesinin 1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan , 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.33 Side bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *E. coli* bakterisi Cnf₂ gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.34 Side bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. typhi* bakterisi Hin gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları



Şekil 4.35 Side bölgesin de aylara göre alınan su örneklerinden izole edilen DNA'da *S. sonnei* bakterisi ipaH gen bölgesinin **1.Ocak, 2.Şubat, 3.Mart, 4.Nisan, 5.Mayıs, 6.Haziran, 7.Temmuz, 8.Ağustos, 9.Eylül, 10.Ekim, 11. Kasım** aylarına göre PCR sonuçları

5.TARTIŞMA

Escherichia coli, *Salmonella typhi* ve *Shigella sonnei* başta insanlar olmak üzere hayvanlar da enfeksiyon oluşturduğu için önemli bir patojendir. Bu tez çalışmasında deniz sularından alınan su örneklerinde patojen olan *E. coli*, *S. typhi*, *S. sonnei* suşlarında Cnf, Hin, ipaH gen bölgelerine bakarak kirlilik indikatörlerinin varlığı saptamaya çalışılmıştır.

Dünya Sağlık örgütü (DSÖ) zoonotik hastalıkları hayvanlar ve insanlar arasında doğal olarak nakledilen hastalıklar olarak tanımlamaktadır. Zoonotik hastalıklar hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkeler için bir sorun oluşturmaktadır. Bu hastalıklar insanlara içme suları ve deniz sularından bulaşabilmektedir.

E. coli, *S. sonnei*, *S. typhi* bakterileri sucul çevrelerde yaygın olarak bulunur. Deniz suyundan sıklıkla izole edilir. Bu bakteriler çevresel kaynaklardan insanlara ve deniz ürünlerine sıklıkla bulaşır ve insanlarda enfeksiyona neden olur (Pass 2002).

Temmuz ve Ağustos aylarında en çok *E. coli* bakterisinin neden olduğu ishaller görülmektedir. Bunlara turist ishali de denmektedir. Bu tür ishaller, kanalizasyon sularının karıştığı, kirli suda yüzmek veya bu kirli suların bulaştığı gıdaların tüketilmesi sonucunda oluşmaktadır. Aynı zaman da açık yaralar da enfeksiyona yol açmakla birlikte idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur (Way vd. 1993). İnsanda patojen olan *S. sonnei* ishal, mide bulantısı, kusma, mide krampları olmak üzere bir çok hastalığa yol açar.

Tez çalışmasında kullanılan 1. bakteri türü *E. coli*' dir. *E. coli* başlıca ishalleri hastalıklar olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit gibi hastalıklara yol açmaktadır. Aldığımız deniz suyu örneklerinde *E. coli* indikatörünü tespit için Cnf₂, Hin, İpaH virulans gen bölgeleri seçilmiştir. *E. coli* virulans gen bölgelerinin tespiti için yapılan PCR sonucunda Konyaaltı, Kemer sahil bölgelerinde sadece Cnf₂ gen bölgesi pozitif PCR sonucu vermiştir. Bu sonuç, Temmuz, Ağustos aylarında deniz suyu sıcaklığındaki artışla beraber turizm faaliyetlerinin artmasına bağlı fekal kirliliğin arttığını doğrulamaktadır. Pass (2002) çalışmasında da tatlı su

örneklerinden izole edilen DNA' da *E. coli* bakterisi Cnf₂ gen bölgesine ve fekal indikatörlerde pozitif bantlara rastlanmıştır.

Çalışmada kullanılan 2. bakteri *S. typhi* insanlarda tifo, sepsisemi ve gastroenterit gibi enfeksiyonlara yol açar. *S. typhi* varlığının tespiti için Hin gen bölgesi seçilmiştir. Çalışma deniz suyu örneklerinden elde edilen DNA'larda Hin pozitif virulans gen bölgesi tespit edilememiştir. Way 1993 çalışmasında da 37 °C' deki deniz suyundan alınan örneklerde DNA izolasyonu yapılmış ve *S. typhi* bakterisi Hin geni için PCR optimizasyonu uygulanmıştır. Bu örneklerde *S. typhi* bakterisi Hin gen bölgesine ait pozitif banta rastlanmamıştır. Bu sonuç bizim çalışmamızda bulunan sonucu desteklemektedir.

Çalışmada kullanılan 3. Bakteri türü *S. sonnei* türlerinin tespiti için İpaH gen bölgesi seçilmiştir. İpaH geni bütün *Shigella* türleri için seçici bir gendir. Çalışmamızda deniz suyu örneklerinin PCR optimizasyonu sonucunda ipaH gen bölgesine rastlanılmamıştır. Kong 2002 tarafından yapılan PCR çalışmasında da aynı bizim çalışmamızda gözlemlediğimiz gibi deniz suyunda hiçbir *Shigella* türüne rastlanmadığı görülmüştür.

Duarte (2009) PCR sonuçlarına göre *S. sonnei* bakterisi ipaH gen bölgesine deniz suyu örneklerinde rastlanılmamıştır. Fakat bazı coğrafik bölgelerde *E. coli* varlığı rapor edilmiştir. Yaptığımız moleküler biyolojik çalışmalar sonucu izole ettiğimiz deniz suyu örneklerinde benzerlik göstermiştir.

Literatürde fekal bakterilere ait virulans genlerinin varlığının saptanması amacıyla tekli veya çoklu PCR yöntemlerinin kullanıldığı diğer çalışmalar mevcuttur (Gilbride 2006, Wilderer vd. 2002). Çoklu veya tekli PCR yöntemi kullanılarak yapılan tespit çalışmalarının mikrobiyolojik tespit yöntemlerine kıyasla daha çabuk , daha ekonomik ve kesin olduğu vurgulanmıştır (Cann vd. 2004).

Çalışmamızda kullanılan PCR yöntemi ile bu virulans gen tespiti yani indikatör tespiti örnek alındığı gün yapılabilmektedir. Ancak mikrobiyolojik yöntemle 1 – 2 hafta içerisinde aynı sonuca varmak mümkün olabilmektedir (Arda 1995). Buda çalışmamızın bilime olan olumlu katkısıdır.

Bu araştırmada kullanılan moleküler metodoloji ile deniz suyundaki bakterilerin varlığı tespit edilmiş ancak bakteri miktarı ve insan sağlığını etkileyebilecek düzeyde olup olmadığı belirlenememiştir. Bu sonuçlar miktar tespiti ile ilgili daha sonra yapılacak Real-Time PCR teknolojisi çalışmalarına temel oluşturacaktır.

Koliform bakteriler ancak belirli sayısal yeterliliğe ulaşınca hastalığa neden olmaktadır. Çalışmamız sonucu Konyaaltı ve Kemer gibi özellikle yaz aylarında turistik faaliyetinin çok olduğu deniz kıyısında *E.coli* indikatörünün varlığı ortaya çıkmıştır.

6. SONUÇ

Ağustos 2009 - Ağustos 2010 ayları arasında Antalya körfez bölgesi sınırları içerisinde bulunan konyaaltı, side, kemer, liman sahillerindeki 4 istasyondan deniz suyu örnekleri toplanmış, özellikle kanalizasyon kaynaklı indikatör koliform patojenlerden *E. coli*, *S.typi*, *S. sonnei*'nin moleküler biyolojik yöntemlerden biri olan PCR yöntemi ile hızlı tespitini yapmak amaçlanmıştır. Bu bölge de daha önce moleküler biyolojik çalışma yapılmadığından çalışma bir ilk olarak kabul edilmektedir. Moleküler biyolojik methodlar hızlılığı ve güvenilirliği açısından tercih edilmiştir.

Çalışmada toplam 48 su örneğini toplanmıştır. Yapılan bakteri DNA'sı izolasyonu sonucu ve PCR Reaksiyonu ve Optimizasyonu sonucu 7. ve 8. aylarda *E.coli* bakterisine rastlanmıştır.

Genelde bakteriye rastlanılmamasına karşın karşın kaba filtreden geçirilen örnekler de istenmeyen maddelere rastlanılmıştır.

Türkiye de turizm aktivitelerinin yaklaşık % 40'ı Antalya kıyılarında gerçekleşmektedir. Bu aktiviteler aynı zamanda su ve katı atıklara dayalı çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Kirliliğin çok olmamasına rağmen,

- Hızlı nüfus artışı sonucu Antalya kıyılarının hızla kirlendiği,
- Yağış ve karasal girdilerin körfezin kirliliğine katkıda bulunduğu dikkate alınmalıdır.

Bu çalışmanın bulguları ışığında, Konyaaltı, Lara, Side, Kemer plajlarının kantitatif bakteri tayini ile kesin kirlilik tespitinin yapılması ve taşıma kapasitesini hesaplanarak plaj yönetim planı oluşturulması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- ABDULLAH, F.B., CHAIEB, K., SNOUSSI, M., BAKHROUF, A., GADDOUR K., 2007. Phenotypic Variations and Molecular Identification of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells Under Starvation in Seawater. *Current Microbiology*, 55, 485–491.
- ADAMEZYK, J., HESSELSON, M., IVERSON, N., HORN, M., LEHNER, A., NIELSON, P.H., SCHLOTTER, M., ROSLEV, P., WAGNER, M. 2003. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6875–6887.
- ALVAREZ, J., PORWOLLİK, S., LACONCHA, I., GISAKIS, V., VIVANCO, A.B., GONZALEZ, I., ECHENAGUSÍA, S., ZABALA, N., BLACKMER, F., MCCLELLAND, M., REMENTERÍA, A., GARAÍZAR, J. 2003. Detection of *Salmonella enterica* serovar California strain spreading in Spanish feed mills and genetic characterization with DNA microarrays. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 7531–7534.
- ALEXANDRINO, M., GROHMANN, E., SZEWZYK, U. 2004. Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. *Water Res.* 38, 1340–1346
- AMANN, R., LEMMER, H., WAGNER, M. 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 205–215.
- AMANN, R., LUDWIG, W. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 4, 555–565.
- ANDERSON, K.L., WHITLOCK, J.E., HARWOOD, V.J. 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3041–3048.
- ANONYMOUS, 2007. (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)
- ARDA M. 1995, *Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler)*, Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No:3 Armoni Ltd. Şti., Ankara
- BERG, G. 1967. *Transmission of Virus by the water route*. Willey Interscience, New York, N.Y.
- BILGEHAN, H. 2000. *Clinic microbiology, special bacteriology and bacterial infections*, (in Turkish). Barış Yayınları, İzmir, 680.
- BITTON, G., 2005. *Wastewater Microbiology*, 2nd ed., New York: Wiley-Liss.

- BLACKALL, L.L., BURRELL, P.C., GWILLIAM, H., BRADFORD, D., BOND, P.L., HUGENHOLTZ, P. 1998. The use of 16S rRNA gene clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities. *Water Sci. Technol.* 37 (4–5), 451–454.
- BULL, A.T., WARD, A.C., GOODFELLOW, M. 2000. *Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573–606.
- CANN, P., RANARIJAONA, S., MONPOEHO, S., GUYADER, F.L., FERRÉ, V. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology*, 155, 11–15.
- CHAN, O.C., LIU, W.T., FANG, H.H.P. 2001. Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water Sci Technol* 2001;43:77–82.
- CHOMVARIN, C., NAMWAT, W., WONGWAJANA, S., ALAM, M., THAEW-NONNGIEW, K., SINCATURUS, A., ENGCHANIL, C. 2007 Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology*, 53, 229- 237.
- CURDS, C.R. 1975. PROTOZOA. IN: CURDS, C.R., HAWKES, H.A. (Eds.), *Ecological Aspects of Used-Water Treatment: Vol. 1. The Organisms and Their Ecology*. Academic Press, London,. 203–268.
- DUARTE, G.D. 2009 Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction, *Diagnostic Microbiol. & inf. Disease*. 1-9
- EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W., GREENBERG, A.E., EDITORS. 2005. *Standard methods for examination of water and wastewater*. Washington, D.C.: American Public Assos.
- FELSKE, A., WOLTERINK, A., VAN LIS, R., AKKERMANS, A.D.L. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16s rRNA sequences in Drentse A grassland spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *soils (The Netherlands)*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 871–879.
- FERRIS, M.J., WARD, D.M., 1997. Seasonal disturbances of dominant 16s rRNA-defined populations in a hot *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1375–1381.
- FRENG P., STEPHEN D., WEAGANT 1998 *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, Chapter 4.
- HARWOOD, V.J., LEVINE, A.D., SCOTT, T.M., CHIVUKULA, V., LUKASIK, J., FARRAH, S.R., ROSE, J.B. 2005. Validity of the indicator organism paradigm

for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 3163–3170.

HARWOOD, V.J., WHITLOCK, J., WITHINGTON, V. 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3698–3704.

GIANNELLA RA (1996). *Salmonella*. In: Baron's Medical Microbiology (Barron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch

GIESEKE, A., PURKHOLD, U., WAGNER, M., AMANN, R., SCHRAMM, A. 2001. Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1351–1362.

GILBRIDE, K.A., CESNIK, A., GAWAT, J., FRIGON, D., FULTHORPE, R.R. 2006. Effect of chemical and physical parameters on a pulp mill biotreatment bacterial community. *Water Res.* 40, 775–787.

GRANT, S.B., PENCROY, C.P., MAYER, C.L., BELLIN, J.K., PALMER, C.J. 1996. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in raw and treated municipal sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3466–3469.

IBEKWE, A.M., WATT, P.M., GRIEVE, C.M., SHARMA, V.K., LYONS, S.R. 2002. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4853–4862.

LEE, D-Y., LAUDERA, H., CRUWYSA, H., FALLETAA, P., BEAUDETTEB, L.A., 2008. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens, *Science of Total Environment*, 1-9

LEMARCHAND, K., MASSON, L., BROUSSEAU, R. 2004. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 145–172.

MAYNARD, C., BERTHIAUME, F., LEMARCHAND, K., HAREL, J., PAYMENT, P., BAYARDELLE, P., 2005. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. *Applied Environmental Microbiology*, 71(12),8548–57.

MITCHELL, R. 1972. *Water Pollution Microbiology*. John Wiley & Sons Inc.

MOURA, A, TACA, M., HENRIQUES, I., DIAS, J., FERREIRA, P., CORREIA, A., 2007. Characterization of bacterial diversity in two aerated lagoons of a wastewater treatment plant using PCR–DGGE analysis. *Microbiological Research*, 1-10.

- MURRAY, A.E., LIES, D., LI, G., NEALSON, K., ZHOU, J., TIEDJE, J.M. 2001. DNA/DNA hybridization to microarrays reveals genespecific differences between closely related microbial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9853–9858.
- MUYZER, G. ve SMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. *Anton Leeuw Int JG* 73:127–41.
- 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, 7436–7444.
- PASS, M. A., ODEDRA, R., BATT, R. M. 2000. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* Virulence Genes. *J. Clinical Microbiol. Methods*, 2000
- PAYMENT, P., BERTA, A., PREVOST, M., MENARD, B., BARBEAU, B. 2000. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence River (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. *Can. J. Microbiol.* 46, 565–576 (Erratum: *Can. J. Microbiol.* 47, 965–967).
- ROMPRÉ, A., SERVAIS, P., BAUDART, J., DE-ROUBIN, M.-R., LAURENT, P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J. Microbiol. Methods* 49, 31–54.
- SAHLSTROM, L., ASPEN, A., BAGGE, E., DANIELSSON-THAM, M.-L., ALBIHN, A. 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 38, 1989–1994.
- SANZ, L.J, KOCHLING T., 2007 Moleculer biology techniques used in wastewater treatment: An overview, *Process Biochemistry*, 42, 119-133.
- SAVARD, P.P., CRESCENZO, G. D., MOUAL, H.L., 2005. Dimerization and DNA binding of the *Salmonella enterica* PhoP response regulator are phosphorylation independent. *Microbiology*, 151, 3979–3987.
- SAHLSTROM, L., ASPEN, A., BAGGE, E., DANIELSSON-THAM, M.-L., ALBIHN, A. 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res.* 38, 1989–1994.
- SCHLOTTER, M., LEBUHN, M., HEULIN, T., HARTMANN, A. 2000. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 647–660.
- SCHROEDER, E.D. 1977. *Water and Wastewater Treatment* . McGraw-Hill.Co.
- SHARMA, V.K., DEAN-NYSTROM, E.A. 2003. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxin. *Vet. Microbiol.* 93, 247–260.

- SCOTT, T.M., ROSE, J.B., JENKINS, T.M., FARRAH, S.R., LUKASIK, J. 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5796–5803.
- THERON, J., CILLIERS, J., PREEZ, M. D., BROZEL, V.S., VENTER S.N 2000. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop semi-nested PCR procedure. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 539-546.
- WAGNER, M., LOY, A. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218–227.
- WAY, J.S., JOSEPHSON, K.L., PILLAI, S.D., ABBASZADEGAN, C.P., PEPPER, I.L. 1993. Specific Detection of *Salmonella* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 1473-1479.
- WILDERER, P.A., BUNGARTZ, H.-J., LEMMER, H., WAGNER, M., KELLER, J., WUERTZ, S. 2002. Modern methods and their potential in wastewater science and technology. *Water Res.* 36, 370–393.
- YU, Z., MOHN, W.W. 2001. Bacterial diversity and community structure in an aerated lagoon revealed by ribosomal intergenic spacer analyses and 16S ribosomal DNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1565–1574.
- ZHANG, X., YAN, X., GAO, P., WANG, L., ZHOU, Z., ZHAO, L. 2005. Optimized sequence retrieval from single bands of temperature gradient gel electrophoresis profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge system. *J. Microbiol. Methods* 60, 1–11.

ÖZGEÇMİŞ

Mine DAĞAŞAN SADIKLAR 1984 yılında Antalya'da doğdu . İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2006 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Şubat 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde yüksek lisans eğitimine başladı.