

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EDİRNE İLİNDEKİ ÇEVRESEL SULARDA KİRLİLİK İNDİKATÖRÜ**  
**MİKROORGANİZMALARIN VE YENİ ÇIKAN BAKTERİYEL**  
**PATOJENLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI**

**MÜJDAT ÖZGÜR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**  
**DOÇ. DR. ECE ŞEN**  
**EDİRNE 2013**

**EDİRNE İLİNDEKİ ÇEVRESEL SULARDA KİRLİLİK İNDİKATÖRÜ  
MİKROORGANİZMALARIN VE YENİ ÇIKAN BAKTERİYEL  
PATOJENLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI**

**Müjdat ÖZGÜR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**2013**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ece ŞEN  
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad) :

İmza

Doç. Dr. Ece ŞEN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet AYBEKE

Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ

Tarih: 01/10/2013

**T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**DOĞRULUK BEYANI**

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

01/10/ 2013

Müjdat ÖZGÜR

Yüksek Lisans Tezi

Edirne İlindeki Çevresel Sularda Kirlilik İndikatörü Mikroorganizmaların ve Yeni Çıkan Bakteriyel Patojenlerin Moleküler Yöntemlerle Saptanması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

## ÖZET

İnsanın yaşamında gerekli olan su, çevresel ve antropojenik kaynaklı kimyasal, fiziksel ve mikrobiyal kirlilik riski taşımaktadır. Bu tez çalışmasının amacı Edirne İli kent merkezi ve yakınlarındaki bazı süs havuzları, nehirler, dere ve Ergene Nehri kıyısında bulunan bir çeltik tarlası olmak üzere toplam on istasyondan su örneği alarak mikrobiyal kirlilik indikatörü bakteriler ve bazı yeni/yeniden ortaya çıkan, son yıllarda önem kazanan patojenlerin varlığının ve kantitatif incelemelerinin, konvansiyonel seçici/ayırt edici besiyerlerine ekim yapılarak ve moleküler yöntemlerle araştırılmasıdır. Membran filtrasyonu ve 22<sup>0</sup>C ve 36<sup>0</sup>C’de inkübasyon yöntemiyle toplam koloni sayısı, koliformlar, *Escherichia coli*, fekal enterokoklar, sülfid indirgeyen anaerob *Clostridium*’lar ve *Aeromonas* cinsi bakterilerin izolasyonu ve sayımı yapıldı. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (real time PCR) (Q-PCR) yöntemiyle *Escherichia coli*’nin beş patojenik tipi (EHEC, ETEC, EPEC, EIEC ve EAEC), *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila* ve *Leptospira interrogans* bakterilerinin varlığı araştırıldı.

Sonuçlara göre, nehirler, dere ve çeltik tarlasındaki mikrobiyal kirlilik düzeylerinin süs havuzlarına göre daha yüksek olduğu görüldü. Q-PCR yöntemiyle *Leptospira interrogans* ve *Escherichia coli*’nin patojenik tiplerinden EIEC incelediğimiz su örneklerinde tespit edilmedi, ancak, bazı numunelerde bu bakterinin diğer patojenik tipleri ve ayrıca *E.faecalis*, *C.perfringens*, *L.pneumophila* patojenleri saptandı. Çalışma, klasik kirlilik indikatörü olan koliform bakteriler kadar *C.perfringens* bakterisinin de su numunelerinde fekal kirliliği etkin olarak gösterdiğini ve patojen bakterilerin varlığıyla fekal kirlilik indikatörü bakterilerin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle saptanması arasında pozitif korelasyon bulunduğunu kanıtlamıştır.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı : 90

Anahtar Kelimeler : Edirne, çevresel sular, indikatör, patojen, bakteri, moleküler yöntemler, konvansiyonel yöntemler

Master Thesis

Detection of Pollution Indicator Microorganisms and Emerging Bacterial Pathogens by Using Molecular Methods in Environmental Water Samples from Edirne Region

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

## ABSTRACT

Water which is essential for human life carries the risk of chemical, physical and microbial pollution coming from environmental and anthropogenic sources. The aim of this dissertation is investigating the presence and quantification of microbial pollution indicator bacteria and some newly emerging or re-emerging pathogens which are recently gaining importance by inoculating into conventional selective/differential media and by using molecular methods for the water samples collected from a total of 10 stations including decorative fountains, rivers, a creek and a rice field located near the Ergene river in Edirne and surroundings. Investigation of the total colony counts of coliform bacteria, *E.coli* fecal enterococci, sulfate reducing anaerobic Clostridia and bacteria of the *Aeromonas* sp. were done by using membrane filtration and incubation at 22<sup>0</sup>C ve 36<sup>0</sup>C. Presence of five pathogenic types of *E.coli* (EHEC, ETEC, EPEC, EIEC and EAEC), *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila* and *Leptospira interrogans* bacteria were investigated by using real time PCR (RT-PCR) (Q-PCR) methods.

According to the results, the microbial pollution levels in rivers, creek and rice field were higher than the levels of the decorative fountains. *Leptospira interrogans* and EIEC, one of the pathogenic types of *Escherichia coli* was not detected in any of the water samples that we tested by the RT-PCR method, however, other pathogenic types of this bacterium and also *E.faecalis*, *C.perfringens*, *L.pneumophila* pathogens were found in some of these samples. This study has been proven that the detection of *C.perfringens* in water samples demonstrated the presence of fecal pollution as efficient as the detection of coliform bacteria which are the classical fecal pollution indicators and a positive correlation exists between the presence of pathogens and fecal pollution levels detected by using classical and molecular methods.

Year : 2013

Number of Pages : 90

Keywords : Edirne, environmental water, indicator, bacteria, molecular methods, classical methods

## TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aőamasında destek ve bilgisini esirgemeyen, bilgi, fikir ve tecrübelerinden yararlandığım değerli tez danıőmanım Sayın Doç. Dr. Ece ŞEN'e,

Deneysel çalışmalarda katkıda bulunan Sayın Araç. Gör. Deniz YÜKSEL'e (T.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü),

Çalıőmalarım sırasında desteğini ve hoőgörüsünü esirgemeyen eőim Meral KUTLU ÖZGÜR'e, kızım Őebnem ÖZGÜR'e ve mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri TÜBAP- 2012-181 kod nolu projesi ile desteklenmiőtir.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yüzeysel Sulardaki Mikrobiyolojik Kalite .....	4
2.2. İndikatör ve Patojen Mikroorganizmalar .....	6
2.2.1. Toplam Koliform, Fekal (Termotoleran) Koliform ve <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.2.2. Fekal Enterokoklar .....	10
2.2.3. Sülfid İndirgeyen Sporlu Anaerob <i>Clostridium</i> lar .....	12
2.2.4. <i>Legionella pneumophila</i> .....	13
2.2.5. <i>Leptospira interrogans</i> .....	15
2.2.6. <i>Aeromonas</i> sp. ....	18
2.2.7. Toplam Koloni (Jerm) Sayısı .....	20
2.8. Sudaki Patojen ve İndikatör Bakterilerin Aranmasında Kullanılan Yöntemler .....	21
2.8.1. Konvansiyonel Yöntemler .....	21
2.8.1.1. Çoklu Tüp Yöntemi (En Muhtemel Sayı) .....	22
2.8.1.2. Membran Filtrasyon Yöntemi .....	23
2.8.3. Moleküler Yöntemler .....	24
2.8.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	25
2.8.3.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) .....	26
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Araştırma Alanı .....	31
3.2. Su Örneklerinin Alınması .....	32



3.3. Örneklerin Membran Filtrasyon Yöntemiyle Çalışılması .....	32
3.3.1. Kullanılan Ekipman .....	32
3.3.2. Kullanılan Besiyerleri, Seyrelticiler ve Reaktifler .....	33
3.3.3. Örneklerin Çalışılması .....	33
3.4. Örneklerin Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR) Yöntemiyle Çalışılması .....	38
3.4.1. Kullanılan Ekipman .....	38
3.4.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Bileşenler .....	38
3.4.3. Örneklerin Çalışılması .....	38
3.4.3.1. DNA İzolasyonu .....	38
3.4.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (Q-PCR ya da Real-Time PCR) .....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	42
4.1. Örneklerin Alındığı İstasyonlarla İlgili Bulgular .....	42
4.2. Membran Filtrasyon Tekniği ile Yapılan Çalışmaların Bulguları .....	43
4.2.1. Toplam Koloni (Jerm) Sayısı .....	43
4.2.2. Toplam Koliform ve <i>E. Coli</i> Sayısı .....	46
4.2.3. Fekal Enterokok Sayısı .....	50
4.2.4. Sülfid İndirgeyen Sporlu Anaerob <i>Clostridium</i> ların Sayısı .....	52
4.2.5. <i>Aeromonas</i> sp. sayımı .....	54
4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Yapılan Çalışmaların Bulguları .....	57
4.2.1. EHEC (Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i> ) Tespiti .....	57
4.2.2. ETEC (Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i> ) Tespiti .....	59
4.2.3. EPEC (Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i> ) Tespiti .....	62
4.2.4. EIEC (Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i> ) Tespiti .....	65
4.2.5. EAEC (Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i> ) Tespiti .....	65
4.2.6. <i>Enterococcus faecalis</i> Tespiti .....	68
4.2.6. <i>Clostridium perfringens</i> Tespiti .....	71
4.2.6. <i>Legionella pneumophila</i> Tespiti .....	74
4.2.7. <i>Leptospira interrogans</i> Tespiti .....	76
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	79
6. KAYNAKLAR .....	87
7. ÖZGEÇMİŞ .....	90

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Suların Kullanım Amaçlarına, Kalitelerine ve Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması .....	5
<b>Tablo 3.1.</b> Su örneklerinin alındığı istasyonlar .....	31
<b>Tablo 3.2.</b> Primer dizileri, hedefledikleri genler ve bakteriler .....	40
<b>Tablo 3.3.</b> Gerçek Zamanlı PZR Isı Döngüsü Programı .....	41
<b>Tablo 4.1.</b> Su örneği alınan istasyonlardan yapılan yerinde ölçümler.....	42
<b>Tablo 4.2.</b> 22 <sup>0</sup> C’de ve 36 <sup>0</sup> C’de seyreltme faktörüyle çarpılarak her bir istasyondaki toplam koloni (jerm) sayısı kob/ml olarak verilmiştir .....	42
<b>Tablo 4.3.</b> İstasyonlardaki toplam koliform ve <i>E. coli</i> sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir .....	47
<b>Tablo 4.4.</b> İstasyonlardaki toplam fekal enterokok sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir .....	50
<b>Tablo 4.5.</b> İstasyonlardaki toplam sülfid indirgeyen sporlu anaerop <i>Clostridium</i> ların sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir .....	52
<b>Tablo 4.6.</b> İstasyonlardaki <i>Aeromonas</i> sp. sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir .....	55
<b>Tablo 4.7.</b> Membran filtrasyon yöntemiyle araştırılan ve sayılan bütün mikroorganizmalar .....	57
<b>Tablo 4.8.</b> EHEC STX1’in su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	59
<b>Tablo 4.9.</b> ETEC LT’nin su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	62
<b>Tablo 4.10.</b> EPEC’nin su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	65
<b>Tablo 4.11.</b> EAEC’nin su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	68
<b>Tablo 4.12.</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ’in su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	71
<b>Tablo 4.13.</b> <i>Clostridium perfringens</i> ’in su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	74

<b>Tablo 4.14.</b> <i>Legionella pneumophila</i> 'nın doğrudan su örneğinden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı .....	76
<b>Tablo 4.15.</b> Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle doğrudan su örneklerinden yapılan tespit çalışmalarının toplu sonuçları .....	77
<b>Tablo 4.16.</b> Membran filtrasyon yöntemiyle üretilen bakteri kolonilerinin gerçek zamanlı PZR yöntemiyle yapılan çalışmaların sonuçları .....	78
<b>Tablo 5.1.</b> “Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği“ne göre kıta içi yüzeysel su kaynakları bakteriyolojik parametreler için kalite kriterleri .....	84
<b>Tablo 5.2.</b> Bakteriyolojik parametreler bakımından istasyonların su kalite kriterlerine göre sınıflandırılması .....	84

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Seyreltme serilerinin hazırlanması .....	35
Şekil 3.2. Seyreltmelerden yapılan membran filtrasyon işlemi .....	35
Şekil 4.1. 22 <sup>0</sup> C'de maya özütü ped besiyerinde üreyen 100'den fazla koloni örneği. Görüntü 8 nolu istasyondaki 10 <sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır .....	44
Şekil 4.2. 22 <sup>0</sup> C'de maya özütü ped besiyerinde farklı büyüklük ve görüntüdeki kolonilerden örnek. Görüntü 9 nolu istasyondaki 10 <sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır .....	45
Şekil 4.3. 36 <sup>0</sup> C'de maya özütü ped besiyerinde görülen 100'den fazla koloni örneği. Görüntü 7 nolu istasyondaki 10 <sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır .....	45
Şekil 4.4. 36 <sup>0</sup> C'de maya özütü ped besiyerinde farklı büyüklük ve görüntüdeki az sayıda kolonilerden örnek. Görüntü 7 nolu istasyondaki 10 <sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır .....	46
Şekil 4.5. TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerinde 36 <sup>0</sup> C'de görülen 100'den fazla karışık koloni örneği. Sarı, turuncu ve kırmızı renkteki koloniler şüpheli kolonilerdir. Görüntü 8 nolu istasyondaki 10 <sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır .....	48
Şekil 4.6. TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerinde 36 <sup>0</sup> C'de görülen birçok farklı renkte ve büyüklükte karışık koloni örneği. Sarı renkteki koloniler şüpheli kolonilerdir. Diğer renkteki koloniler şüpheli değildir. Görüntü 2 nolu istasyondaki 10 <sup>-2</sup> ml'lik ekimden alınmıştır .....	48
Şekil 4.7. TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerinde 36 <sup>0</sup> C'de görülen az sayıdaki şüpheli sarı koloniler. Görüntü 1 nolu istasyondaki 1 ml'lik ekimden alınmıştır .....	49
Şekil 4.8. Şekil 4.7.'deki petri kabının alttan görünümü. Koliform bakteriler laktozu fermente ederek oluşan asidik ortam besiyerindeki bromtimol mavisini sarıya çevirmiştir .....	49
Şekil 4.9. Slanetz-Bartley (Azid) ped besiyerinde 36 <sup>0</sup> C'de görülen 100'den fazla şüpheli koloni örneği. Görüntü 6 nolu istasyondaki 10 ml'lik ekimden alınmıştır .....	51

<b>Şekil 4.10.</b> Slanetz-Bartley (Azid) ped besiyerinden üreyen kolonilerle alınan membran 44 <sup>0</sup> C’de safra eskülin azid agarda 2 saat beklediğinde ten renginden siyah renge kadar değişen kolonilerden örnek .....	51
<b>Şekil 4.11.</b> Slanetz-Bartley (Azid) ped besiyerinde tek tek görünen koloni örneği. Görüntü 2 nolu istasyondan 10 <sup>-2</sup> seyreltmeden yapılan ekimden alınmıştır .....	52
<b>Şekil 4.12.</b> Sülfid demir agarda 9 nolu istasyondan yapılan ekimde görülen yoğun siyah koloniler iç içe geçmiş .....	53
<b>Şekil 4.13.</b> Sülfid demir agarda görülen sayılabilir siyah koloniler .....	54
<b>Şekil 4.14.</b> Aeromonas selektif agarda koloni sayısı 100’den fazla olan petri örneği. Görüntü 2 nolu istasyondaki 10 <sup>-2</sup> ml’lik ekimden alınmıştır .....	55
<b>Şekil 4.15.</b> Aeromonas selektif agarda daha az sayıda ve farklı büyüklükte görünen kolonilerden örnek. Görüntü 9 nolu istasyondan 10 <sup>-3</sup> seyreltmeden yapılan ekimden alınmıştır .....	56
<b>Şekil 4.16.</b> EHEC STX1 primeriyle kültürden erime eğrisi. Dikey eksendeki df/dt, yatay eksendeki sıcaklığın artışıyla değişen floresan oranını göstermektedir .....	58
<b>Şekil 4.17.</b> EHEC STX1 primeriyle kültüründen çoğalma eğrisi. Dikey eksendeki RFU, yatay eksendeki döngü sayısı ile artan göreceli DNA miktarını göstermektedir.....	58
<b>Şekil 4.18.</b> ETEC LT doğrudan su örneğinden erime eğrisi .....	60
<b>Şekil 4.19.</b> ETEC LT doğrudan su örneğinden çoğalma eğrisi .....	60
<b>Şekil 4.20.</b> ETEC LT kültürden erime eğrisi .....	61
<b>Şekil 4.21.</b> ETEC LT kültürden çoğalma eğrisi .....	61
<b>Şekil 4.22.</b> EPEC doğrudan su örneğinin erime eğrisi .....	62
<b>Şekil 4.23.</b> EPEC doğrudan su örneğinin çoğalma eğrisi .....	62
<b>Şekil 4.24.</b> EPEC kültür örneğinin erime eğrisi .....	64
<b>Şekil 4.25.</b> EPEC kültür örneğinin çoğalma eğrisi .....	64
<b>Şekil 4.26.</b> EAEC doğrudan su örneğinin erime eğrisi .....	66
<b>Şekil 4.27.</b> EAEC doğrudan su örneğinin çoğalma eğrisi .....	66
<b>Şekil 4.28.</b> EAEC kültür örneğinin erime eğrisi .....	67
<b>Şekil 4.29.</b> EAEC kültür örneğinin çoğalma eğrisi .....	67
<b>Şekil 4.30.</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ’in su örneğindeki erime eğrisi .....	69
<b>Şekil 4.31.</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ’in su örneğindeki çoğalma eğrisi .....	69
<b>Şekil 4.32.</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ’in kültürdeki erime eğrisi .....	70
<b>Şekil 4.33.</b> <i>Enterococcus faecalis</i> ’in kültürdeki çoğalma eğrisi .....	70
<b>Şekil 4.34.</b> <i>Clostridium perfringens</i> ’ in su örneğindeki erime eğrisi .....	72

Şekil 4.35. <i>Clostridium perfringens</i> ' in su örneğindeki çoğalma eğrisi .....	72
Şekil 4.36. <i>Clostridium perfringens</i> ' in kültürdeki erime eğrisi .....	73
Şekil 4.37. <i>Clostridium perfringens</i> ' in kültürdeki çoğalma eğrisi .....	73
Şekil 4.38. <i>Legionella pneumophila</i> 'nın su örneğindeki erime eğrisi .....	75
Şekil 4.39. <i>Legionella pneumophila</i> 'nın su örneğindeki çoğalma eğrisi .....	75

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
°C	: Santigrad Derece
cm	: santimetre
CTAB	: hexadecyltrimetylammoniu mbromide
dk	: dakika
DNA	: Deokiribonükleikasit
dNTP	: deoksinükleozit trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EAEC	: Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EHEC	: Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
EMS	: En muhtemel sayı
EIEC	: Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
EPEC	: Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
FRET	: Floresan rezonans enerji transferi
Gr	: Gram
G	: Guanin
HPC	: Heterotrophic plate count
kob	: koloni oluşturan birim
ISO	: The International Organization for Standardization
lt	: litre
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
mM	: milimolar
NA	: Nutrient agar

NaCl	: Sodyum Klorür
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: potansiyel hidrojen
PP	: polipropilen
PYR	: L-pirolidonil naftilamid
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: revolution per minute
rRNA	: ribozomal Ribonükeik asit
sn	: saniye
S	: Sitozin
T	: Timin
TSA	: Triptik soy agar
TKS	: Toplam Koloni Sayısı
TTC	: 1,3,5-trimetiltetrazolyumklorür
yy	: yüzyıl
WHO	: World Health Organization
$\mu\text{g}$	: mikrogram
$\mu\text{l}$	: mikrolitre
$\mu\text{m}$	: mikrometre
$\mu\text{M}$	: mikromolar



# BÖLÜM 1

## GİRİŞ VE AMAÇ

En hayati ihtiyacımız olan su, bütün toplumsal faaliyetlerimizi yürütmemiz açısından kritik bir öneme sahiptir [1]. Ayrıca insan sağlığı açısından en önemli çevresel etkenlerden birisidir. Öte yandan su, yaşam ortamının oluşmasında temel öğelerden biri olduğu gibi aynı zamanda kendisi bir yaşam ortamıdır [2]. Yaşam için olmazsa olmaz ön koşullardan biri olması nedeniyle, suyun yaşam ortamında bulunması ve kalitesi son derece önemlidir [3].

İnsanlar, yaşamsal ve ekonomik gereksinimleri için suyu hidrolojik çevrimden alırlar ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye iade ederler. Bu işlemler sırasında suya karışan maddeler suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek, "su kirliliği" olarak adlandırılan olguyu ortaya çıkarırlar [4]. Su kirliliğine neden olan etmenler genel olarak evsel ve endüstriyel kökenli atık sular şeklinde sınıflandırılabilirse de, su kirlenmesi çok daha karmaşık bir karaktere sahiptir [4].

İklim değişikliği, artan şehirleşme ve nüfus artışı nedeniyle temiz su kaynaklarının azalması ve tükenmesi son yıllarda uluslararası alanda üzerinde giderek daha fazla düşünülen ve tartışılan bir konu haline gelmiştir. Dünyadaki su tüketiminin sürekli artması ve gelecekte de artmasının beklenmesi konuyu önemli hale getirmektedir [1].

Suların mikrobiyolojik kirliliği kısa vadeli riskleri oluşturmaktadır, yani enfeksiyon ajanına bir defa bile maruz kalınması durumunda ağır hastalıklar oluşabilir ve ciddi travmalara sebep olabilir [5]. Dünyada ve ülkemizde görülen bulaşıcı hastalıklar arasında suyla bulaşan hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Sularla bulaşan hastalıklarla mücadelenin etkin olarak yürütülebilmesi ve alınacak tedbirlerin belirlenmesi için bu hastalıkların iyi bilinmesi önem arz eder [5].

Uluslararası seyahatlerin yaygınlaşması, insanların demografik ve davranış özelliklerinin değişmesi, ekolojik değişiklikler, halk sağlığı çalışmalarının yetersizliği ve mikroorganizmalardaki yapı ve davranış değişiklikleri, su ile bulaşan enfeksiyonların sıklığını etkileyen faktörlerdir [6].

Gelecekte yaşam süresi giderek artan nüfusun bağışıklık sistemi, nüfusun artan yaş düzeyiyle azalacağından mikrobiyolojik riskler çok daha fazla önem kazanacaktır [5]. Yüzey suları (dere, nehir, baraj, göl, gölet, çeşitli havuzlar) özellikle kontaminasyona çok açıktır. Tarımsal kullanım ve lağım-insan aktiviteleri kaynaklı atık su deşarjının artışı, suların mikrobiyolojik kalitesinde önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Suların mikrobiyolojik kirlenmesine neden olan bakteriler, virüsler ve diğer hastalık yapıcı canlılar, genellikle hastalıklı veya portör (hastalık taşıyıcı) olan hayvan ve insanların dışkılarından kaynaklanır. Bazı hayvanların idrarlarının ve kalıntılarının suya karışmasıyla da zoonotik hastalıklar meydana gelebilir. Bulaşıcı etki ya bu atıklarla doğrudan temasla veya bu atıkların karıştığı sulardan dolaylı olarak gerçekleşir. Dışkı kirlenmesinin yanında sular, doğada bulunan (toprakta ve bitkilerde) diğer mikroorganizmalarla da kontamine olabilirler. Bu mikroorganizmalara patojen gözü ile bakılmaz ancak bazen fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilirler [7].

Su kaynaklarının kirliliği sadece sağlık açısından değil ekolojik denge açısından da önem taşımaktadır. Endüstri atıkları, kanalizasyon suları, tarım amaçlı gübreleme, taşmalar, seller ve diğer kirlenici etmenler ile meydana gelen su kirliliği çevre sağlığının bozulmasında büyük rol oynamaktadır [8].

Bu çalışmadan;

- 1- Edirne ili civarında ve Edirne kent merkezinde seçilmiş yüzeysel su örneklerinden kirlilik indikatörü bakterileri ve bazı yeni/yeniden ortaya çıkan patojen bakterileri moleküler yöntemlerle çalışarak tespit edilmesi,
- 2- Moleküler yöntemlerle çalışılan indikatör bakterilerin membran filtrasyon yöntemiyle de çalışılarak iki yöntemin karşılaştırılması,
- 3- Membran filtrasyon yöntemiyle suların toplam mikrobiyal yükü ile insanlarda fırsatçı enfeksiyonlara ve hayvanlarda enfeksiyonlara sebep olan *Aeromonas* cinsinin tespit edilmesi,
- 4- Membran filtrasyon yöntemiyle klasik ve yeni indikatör bakteriler ile yeni çıkan bakteriyel patojenlerin sayılarındaki paralelliklerinin karşılaştırılması,

5- Suların bakteriyolojik parametreler bakımından kirlilik sınıfının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Edirne kent merkezindeki fiskiyeli su havuzlarından daha önce buna benzer bir çalışma yapılmamıştır. 2012 Yılı Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü İl Çevre Durum Raporu'na göre Edirne ilindeki nehirlerden su örnekleri alınıp fiziksel ve kimyasal parametreler bakımından analiz edilmiş, ancak bakteriyolojik parametreler analiz edilmemiştir. Edirne ilindeki nehirlerin kimyasal parametrelere göre kirlilik sınıfları belirtilmiş olmasına rağmen mikrobiyolojik parametrelere çalışılmadığından bu nehirlerin mikrobiyolojik kalite sınıfı belli değildir [9].

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. Yüzeysel Sulardaki Mikrobiyolojik Kalite

Sular doğal yapılarında az miktarda mikroorganizma içerirler. Ancak ekolojik sistem içerisinde havadan, topraktan, hayvan-bitki artıkları ve organik atıklardan gelen mikroorganizmalar suların mikroorganizma içeriklerini zenginleştirmektedirler [10].

En kolay kontamine olan su grubu akarsulardır ve bunların sahip olduğu bakteri florasını üçe ayırmak mümkün olmaktadır. Birinci grup, suyun doğal yapısında bulunan bakteriler (*Spirillum*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Chromobacterium* ve bazı *Micrococcus* ve *Sarsinia* türleri), ikinci grup, toprak kökenli bakteriler (*Bacillus*, *Streptomyces*, *Aerobacter* ve *Enterobacteriaceae* familyasının saprofit cinsleri), üçüncü grup, insan ve hayvanların barsak mikroflorasında doğal olarak bulunan bakterilerdir (*Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium welchii*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholera*, *Shigella spp.* vb.) [10].

Birçok yerde akarsular kanalizasyon atıkları da dahil olmak üzere, organik maddeler tarafından aşırı derecede kirletilmektedirler. Sanayi kentlerinde de yine akarsular organik ve inorganik maddelerle kirlenmektedir. Göl sularında akarsulara göre daha az bakteri bulunmaktadır. Göllerin ortalarından alınan sular, kıyılara yakın yerlerden alınan sulardan daha temizdir. Kısacası, yüzeysel suların kalitesi çoğunlukla düşüktür, çünkü kirli ve mikroplu olması yanında çok defa askıdaki katı maddeler içermesi nedeniyle bulanıktır [3].

Sular kalitelerine göre yüksek kaliteli, az kirlenmiş, kirli ve çok kirlenmiş su olmak üzere dört sınıfta değerlendirilir [3].

**Tablo 2.1.** Suların Kullanım Amaçlarına, Kalitelerine ve Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması [11].

<b>Kullanım amacına göre sular</b>	<b>Kalite derecesine göre sular</b>	<b>Kaynağına göre sular</b>
İçme suları	<b>Yüksek kaliteli sular (I. Sınıf)</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Yalnız dezenfeksiyon ile içme suyu olarak</li><li>2. Rekreatif amaçlar için (yüzme gibi vücut teması gerektirenler)</li><li>3. Alabalık üretimi</li><li>4. Hayvan üretimi ve çiftlik ihtiyacı</li></ol>	Yüzeysel sular (Dere, çay, nehir, göl, baraj vb.)
Rekreatif suları	<b>Az kirlenmiş sular (II. Sınıf)</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. İleri veya uygun bir arıtma ile içme suyu olarak</li><li>2. Rekreatif amaçlar için</li><li>3. Balık üretimi (Alabalık hariç)</li><li>4. Sulama suyu olarak</li><li>5. I. Sınıf sular dışında kalan diğer kullanımlar için</li></ol>	Yeraltı suları
Şifalı özellikleri bulunan sular	<b>Kirlenmiş sular (III. Sınıf)</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Gıda, tekstil gibi kaliteli su gerektiren sanayiler hariç, uygun bir arıtmadan sonra sanayide kullanılabilir.</li></ol>	
Sulama suyu	<b>Çok kirlenmiş sular (IV. Sınıf)</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. I., II. ve III. sınıf sular dışında kalan, kalite olarak düşük kalitedeki sulardır.</li></ol>	

Suların bakteriyolojik olarak kirlenmesi; yetersiz arıtma veya organik materyallerin suya karışması sonucu meydana gelmektedir. Bu organik materyallerin parçalanması ise bakteriler ve mantarlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Normalde temiz sular bakterilerin uzun süre yaşayabileceği bir ortam değildir. Kirlenme sonucu bakteriler için uygun üreme ortamları oluşmaktadır. Kullanılan suların kirli olması direkt veya indirekt olarak halk sağlığı için risk oluşturmaktadır. Kirli sularla sulanan sebze ve meyvelerin tüketimi, kontamine sularda avlanan balıkların tüketimi yada bu sularda yüzme bir çok patojen bakteri kaynaklı enfeksiyon yada toksikasyonlara neden olmaktadır. Su ile nakledilen hastalıklar içinde en sık görülenler mikrobiyal ve paraziter kökenli olanlardır [12].

Ülkemizde nüfusun hızlı artışı, sanayileşmenin büyümesi, tarımda gübre ve ilaç kullanımının yaygınlaşması ve çevre bilincinin yeterince yerleşmemesi gibi nedenlerle mevcut yüzey ve yer altı sularının kirliliği aşırı boyutlara ulaştığı saptanmıştır. Öyle ki bazı havzaların yüzey sularında 4. dereceden kirlenmiş sular bulunmaktadır. Bunlardan, Meriç-Ergene, Marmara, Sakarya, Gediz, Küçük Menderes, Büyük Menderes, Burdur ve Akarçay (Afyon) havzalarında bulunan çay, nehir ve göllerde aşırı kirlenmeler tespit edilmiştir [2].

## **2.2. İndikatör ve Patojen Mikroorganizmalar**

Bazı su kaynaklı patojenlerin sulardan tespit edilmesi ve tanımlanmasında kullanılabilen metotların uygulanması çok zordur. Bazıları için ise bu metotlar mevcut değildir. Bakteriyel patojenlerin tespiti için ise metotlar mevcut olsa da, hassas besin ihtiyaçları ve çevresel şartlara değişik şekildeki duyarlılıkları bu bakterilerin de tespitini güçleştirmektedir. Patojen bakterilerin araştırılmasında yaşanan bu güçlükler ve uygulanabilen metotların zaman alıcı olması nedeniyle, suya bağlı risklerin yönetimi ve önleyici tedbirlerin alınmasında patojen mikroorganizmaların araştırılması sorunlu bir alandır. Analiz edilen suların az miktarda oluşu, bu mikroorganizmaların sularda seyrek oluşu ve su kütlelerindeki dağılımlarının homojen olmayışı nedeniyle, bir analiz sonucundan suyun toplam kütlesi için bir anlam çıkarmanın mümkün olamaması da patojen bakterilerin araştırılmasında diğer önemli zayıf yanlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm bu sebeplerle, 20. yüzyılın başından itibaren patojenleri suda aramak yerine suda olmadıklarını göstermek için dolaylı yolların kullanılmasına karar

verilmiştir. 100 yıl önce bu alanda çalışan araştırmacılar, dışkıda her zaman bulunan ve basit bakteriyolojik besi yerlerinde kolaylıkla tespit edilen zararsız organizmaların kullanımını, sudaki dışkı materyalinin varlığının göstergesi olarak önermişlerdir. Bu yolla, bu gösterge mikroorganizmalar gastrointestinal hastalık sebebi mikroorganizmaların potansiyel varlıklarının bir işareti olarak değerlendirilmiştir [5].

Gösterge mikroorganizma kavramı uzun yıllardır başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Mikrobiyolojik su kalitesi için, bazı durumlarda spesifik patojen yoğunluklarının değerlendirmesini içeren mikrobiyolojik yöntemler kullanılsa da pek çok durumda fekal gösterge mikroorganizmalarının analizleri yapılmaktadır [5]. Bugün en sık kullanılan fekal gösterge parametreleri; termotoleran koliform, *E.coli* ve fekal (intestinal) enterokoklardır. Çeşitli çevresel ve fiziksel faktörler, gösterge olarak fekal bakterilerin kullanılmasına etki edebileceğinden, su kalitesinin izlenmesindeki etkinlikleri ile ilgili pek çok soru/sorun bulunmaktadır. Bu sebeple tek gösterge veya yaklaşım, su sistemlerinin dışkı materyaliyle kontaminasyonu ile ilişkili tüm sorunları yansıtmamaktadır [5].

*E.coli* kullanışlı bir gösterge iken kullanımda bazı sınırlamaları da vardır. Enterik virüs ve protozoalar dezenfektanlara *E.coli*'den daha dirençli olduklarından, *E.coli* olmayışı enterik virüs ve protozoonların olmadığı gösterilmesinde yeterli değildir. Bu sebeple bakteriyofajlar ve/veya bakteri sporları gibi daha dirençli mikroorganizmaların hesaba katılması istenebilir. Bu parametreler, enterik virüsler ve parazitler ile kontamine olduğu bilinen kaynak sularının kullanımında veya toplumda viral ve parazitik hastalıkların yüksek seviyelerinde araştırılabilir [5].

Tatlı suların izlenmesinde intestinal enterokok ya da *E.coli*'den biri kullanılabilir. Bu bakterilere ek olarak *Clostridium perfringens*'in de dahil olduğu anaerob sporlu *Clostridium* cinsi bakteriler de kirlilik indikatörü olarak kullanılabilirler [5, 8].

Bir mikroorganizmanın uygun bir fekal indikatör olarak anlamlı sonuçlar verebilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bunlar:

- İnsan dışkısında yüksek miktarda bulunmalı
- Kolayca ve basit metotlarla tespit edilmeli
- Suda çoğalmamalı
- Suda uzun süre yaşayabilmeli

- Arıtma işlemlerine olan duyarlılığı su kaynaklı patojenlere benzer olmalı
- İnsan dışkısına özgü olmalı
- Dışkı harici kaynaklarla suya bulaşmamalı
- Patojenler kadar çevre koşullarına dayanıklılık göstermeli [8].

### **2.2.1. Toplam Koliform, Fekal (Termotoleran) Koliform ve *Escherichia coli***

Koliform grubu bakteriler Enterobacteriaceae ailesinin bir grubudur. Enterobacteriaceae ailesi, Gram negatif basiller içinde en büyük ve heterojen ailedir. Enterobacteriaceae ailesinde bulunan türler biyokimyasal özellikleri, antijenik yapıları ve nükleik asit hibridizasyon ve DNA dizi analizlerine göre sınıflandırılmaktadır. Her geçen gün bu büyük aileye yeni üyeler eklenebilmekte ya da genetik analizler sonucu var olan türlerin isimleri değişebilmektedir [13, 14].

Bu bakterilerin genel ve ortak özelliklerine bakacak olursak: Yaklaşık 0.3-0.5 µm en ve 1-6 µm boyunda, çoğu hareketli, bazıları hareketsiz, düz Gram negatif, çomak biçiminde bakterilerdir. Endospor oluşturmazlar. Fakültatif anaeropturlar. Genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla ürerler. Bazıları tek karbon kaynağı olarak glikozu kullanırlar. Fermantatif metabolizmaları var olup glikozu parçalayarak asit ve bir çoğu gaz oluştururlar. *Shigella dysenteriae* O grup 1 ve *Xenorhabdus nematophylus* dışındaki Enterobacteriaceae bakterilerinin tümü oksidaz negatif ve katalaz pozitifdir. *Erwinia* ve *Yersinia* cinslerindeki bazı kökenler dışında tümü nitratları nitritlere indirgerler [15].

Koliform grubu bakteriler, Enterobacteriaceae ailesinin tüm özelliklerinin yanında 36°C'de laktozlu seçici besiyerinde 48 saat içerisinde laktozu fermente ederek asit oluşturan bakterilerdir [5]. Bu bakteri grubunda, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Serratia* cinslerine ait türler bulunmaktadır [8].

Bir koliform grubu üyesi olan *E.coli*, 1-1,5 µm eninde, 2-6 µm boyunda düz, uçları yuvarlak bakteriyolojik boyalarla iyi boyanan, hareketli, fakültatif anaerob Gram negatif çubuklardır [14, 8]. Gelişme sıcaklıkları 3-50°C (optimum 37-41°C) arasındadır. Çoğaldıkları pH ise 4 ve 10 değerleri arasındadır [8].

*Escherichia coli* nadir mutantlar hariç çok aktif bir beta-galaktosidaz'a sahiptir. Mannitol, indol, ve metil red testleri (+); adonitol, inositol, voges proskauer, sitrat, üreaz, jelatin, KCN testleri (-); sakaroz, salisin ve dulsitol testleri değişkendir. Lisin dekarboksilaz genellikle (-)'dir [8].



*E. coli* nutrient agar ve kanlı agar, enterobakteriler için bazı selektif ve diferensiyel besi yerlerinde (Mac Conkey Agar, Eosine Methylene Blue Agar, vs.) 37°C’de 24 saatte gözle görülebilir -S tipli koloniler meydana getirir. *E. coli*’nin bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturur. *E. coli* laktozu ayrıştırdığı için Mac Conkey Agar’da pembe renkli koloniler, Eosine Methylene Blue Agar’da ise metalik refle görünümünde koloniler oluşturur. Nutrient Buyyon’da 24 saatte 37°C’de bulanıklık yaparak ürer [8].

*E. coli*, kalınbarsak ve dışkıda en bol bulunan fakültatif anaeroptur. Barsak florasının bir üyesi olmasının yanında toplum kaynaklı ve hastane enfeksiyonlarına sebep olan fırsatçı bir patojendir [14]. *E.coli*’nin patojen suşları ile normalde barsakta kommensal yaşayan ve patojen olmayan suşlarının birçok özellikleri ortaktır. Bu nedenle dışkı florasında bulunan *E.coli* suşları içinden virulan tipleri ayırt ederek barsak enfeksiyonlarının tanısını koymak kolay değildir. EC2 Gastrointestinal hastalıklara altı farklı *E.coli* grubu neden olmaktadır [14].

Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), tüm dünyada fakir ve gelişmekte olan ülkelerde özellikle altı aylıktan küçük bebeklerde diyare etkenidir [14]. EPEC geçmişte gelişmiş ülkelerde kreşlerdeki epidemilerle ilişkili bulunmuştur [13].

Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), gelişmekte olan ülkelerde, iki yaşın altındaki çocuklarda bakteriyel diyare etkenlerinden biridir. ETEC suşlarının yaygın olduğu bölgelerde yaşayan toplumun önemli bir kısmı bağışıklı. Ancak bu bölgelere dışarıdan gelen erişkinlerde diyareye neden olur. Buna turist diyaresi adı verilir [14].

Enterohemorajik *E.coli* (EHEC) suşları verotoksin oluşturan *E. coli* suşları yada Shiga toksin oluşturan *E. coli* suşları olarak da adlandırılır. Bu güne kadar 50’den fazla EHEC serotipi tanımlanmış olmakla birlikte en sık neden olan serotip O157:H7’dir. EHEC enfeksiyonları sıcak mevsimlerde ve beş yaşın altındaki çocuklarda sık görülür [14].

Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC), çoğunlukla sulu ishallere neden olur [14].

Enteroagregatif *E.coli* (EAEC) suşları dünyanın birçok yerinde ve her yaşta görülebilmekle beraber, çocuklarda ve endemik bölgelere seyahat edenlerde daha sık görülür [14].

Diffüz-aderan *E.coli* (DAEC) enfeksiyonları ile 1-5 yaş arasındaki çocuklardaki sulu ishalin önemli oranda birlikteliği saptanmıştır. Ancak DAEC için patogenez ve klinik tam olarak heniz açıklanamamaktadır [14].

Toplam koliform bakteri sayısı, su kalitesinin en güvenilir göstergesi olarak kullanılır. Koliform bakteriler insan ve hayvan bağırsağında bulunabileceği gibi çevresel ortamda da bulunabilir ve potansiyel fekal kirliliğin göstergesi olabilirler. Fekal koliformlar ve *E.coli* ise sadece insan ve hayvan bağırsağında bulunur ve sulardaki varlıkları için yapılan testler, insan ve hayvan orijinli dışkı kirliliğin doğrulanması için gereklidir [5].

Fekal kirlenme ile daha yakın ilişkide olan fekal koliformlar toplam koliformların alt grubunu oluşturur. Bu bakteriler, aerop ve fakültatif anaerop, gram negatif, spor formu olmayan, 36°C’de 24-48 saatte laktozdan gaz ve asit üreten kokino-basil bakteriler olarak tanımlanan toplam koliformların tüm özelliklerine sahip olmasının yanında, 44°C’de üreyerek laktozdan gaz ve asit oluşturur. Bu sebepten fekal koliform yerine “termotoleran koliform” terimi daha doğrudur ve termotoleran koliform tanımı taksonomik kriterlere dayanmaz. Termotoleran koliformlarda gelişmiş sıcaklık fenotipinin fizyolojik temeli, termotoleran uyum proteini olarak açıklanır. Termotoleran koliformlar *Klebsiella* ve *Escherichia* cinsinin türlerini içerir. Bazı *Enterobacter* ve *Citrobacter* türleri de termotoleran koliform için tanımlanan şartlarda üreyebilir. Fakat *E.coli* hemen her zaman fekal kökenli olan *Enterobacteriaceae* ailesinin tek biyotipidir. Bu sebeple, termotoleran koliform terimi kullanılacağı zaman fekal kirliliğin göstergesi olarak *E.coli* bunun yerini rahatlıkla alabilir. Fekal koliform terimi pek çok ülkede tartışma konusudur ve örneğin İngiltere’de, su mikrobiyolojisi terminolojisinde fekal koliform bakterileri *E.coli* olarak değerlendirilmektedir [5].

Tüm bunların yanında pek çok çalışma, uygun fekal gösterge olarak *E.coli* ve termotoleran koliform grubun her ikisinin kullanımında bazı sınırlamaların olduğunu göstermiştir. Pek çok termotoleran *Klebsiella* türleri açıkça fekal kirlilik olmadığında da karbonhidrat seviyeleri yüksek çevresel şartlardan izole edilmiştir. Benzer şekilde, termotoleran koliformların diğer üyeleri de, *E.coli* dahil, içme suyu dağıtım sistemlerinde yeniden üremeye ilişkili olarak temiz alanlarda tespit edilmiştir. Tüm bunlardan yola çıkarak, sularda bir gösterge olarak kullanılan bu mikroorganizmaların dezavantajları; fekal kontaminasyon olmadan başka çevrelerden tespit edilmeleri ve

fekal patojenler ile kıyaslandıklarında su çevrelerinde düşük yaşam kapasitelerine sahip olmaları şeklinde özetlenebilir [5].

### 2.2.2. Fekal Enterokoklar

Enterokoklar, duvarlarında D grubu antijen içermelerinden dolayı eskiden D grubu streptokoklar içinde sınıflanan Gram pozitif koklardır. Yapılan DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda 1984 yılında enterokoklar yeni bir cins olarak sınıflandırılmıştır. *Enterococcus* cinsi içinde 33 tür bulunmaktadır [5].

Enterokoklar, tekli, ikili veya kısa zincirler halinde bulunan Gram pozitif koklardır. Fakültatif anaerop, katalaz negatiftir ve optimum 35<sup>0</sup>C'de ürer. Ancak izolatların çoğu 10-45<sup>0</sup>C'de üreyebilir. Kanlı agarda hemolizsiz, alfa-hemoliz yada beta hemoliz yapmış büyük beyaz koloniler oluştururlar. PYR pozitiftir. % NaCl ve %40 safra tuzları varlığında canlılığını korur. Eskülünü hidrolize eder [14].

Sıklıkla kullanılan bir terim olan enterokok; 60<sup>0</sup>C'ye 30 dk dayanıklı, 10-45<sup>0</sup>C'de üreyen, pH 9.6'da ve %6.5 NaCl'de üreme kriterlerini sağlayan *Enterococcus* cinsi üyeleri olarak tanımlanan tüm türleri içerir. En sıklıkla bulunan çevresel türler bu kriterlere sahiptir ve böylece pratikte fekal streptokok, enterokok, intestinal enterokok ve *Enterococcus* grup terimi eş anlamlı olarak kullanılır [5].

*Enterococcus* türlerinin oranı hayvan ve insan dışkısında aynı değildir. Her iki cinsteki pek çok tür, enterokok terimi altında toplanır. Kirli su çevrelerinde en baskın türler *E.faecalis*, *E faecium* ve *E.durans*'dır [5].

Enterokoklar hayvan ve insanların bağırsağında bulunur ve suda üremezler. Klorlama ve çevresel şartlara *E.coli*'den daha dirençlidirler ve daha uzun yaşarlar. *E.coli* ölüm hızı oranı güneş ışınları arttığı zaman hızla artarken, enterokokların ölüm hızı oranı güneş ışını yoğunluğu ile çok değişmez. Ayrıca *E.coli* ve enterokokların her ikisi de kloru duyarlı olsa da enterokoklar *E.coli*'den biraz daha fazla direnç gösterirler. Tüm bunlardan dolayı enterokoklar geçmiş kirliliğin bir göstergesidir. Enterokoklar için yapılan çalışmalar, *E.coli*'nin yokluğunda yüksek sayıdaki koliform mevcudiyeti gibi diğer testlerden şüpheye düşülen sonuçların yorumlanmasına da yardımcı olur [5].

İntestinal enterokoklar, yaygın olarak doğal su ekosistemlerinde fekal kirliliğin kullanışlı bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu organizmalar, yüzme amaçlı kullanılan tatlı su ve deniz sularından kaynaklı sağlık sorunlarıyla yakın bir ilişki gösterir. Bunlar

koliform bakteriler gibi her yerde değil, her zaman sıcakkanlı hayvanların dışkılarında bulunur. Bununla birlikte deniz sularında ölüm hızları koliformların sayılarındaki düşüşten daha yavaştır ve kalıcılık özellikleri potansiyel su kaynaklı patojenlerinkine benzerdir. Toplam koliformlar için tatlı sularda T<sub>90</sub> (organizmaların %90'ının ölmesi için geçen süre) 58 saat iken deniz sularında yaklaşık 2,2 saattir. Benzer bir davranışı termotoleran koliformlar ve *E.coli* de göstermiştir. Enterokoklar ile benzer bir çalışma yürütülmemiştir. Ancak çeşitli araştırmacıların laboratuvar çalışmaları göstermiştir ki enterokoklar da deniz sularında tatlı sulardakinden çok daha hızlı ölürlür. Yine de enterokok için ölüm hızı farklılığı *E.coli*'deki kadar büyük değildir [5].

### 2.2.3. Sülfid İndirgeyen Sporlu Anaerop *Clostridium*lar

*Clostridium* türleri iri, anaerop, Gram pozitif hareketli ve sporlu çomaklardır. Genellikle Gram ile boyandığı zaman negatif boyanır veya değişken boyama özelliği gösterirler [13, 14].

*Clostridium perfringens* büyük, dikdörtgen biçimli, hareketsiz bakteridir. Uzunluğu 20 µm kadar olabildiği gibi 2,5 µm genişliğine ulaşabilir. Sporları oval şekilli ve santral yerleşimli olmasına karşılık, klinik örneklerden ve kültürlerinden hazırlanan preparatlarda nadiren görülür. Laboratuvar şartlarında hemoliz yaparak kolaylıkla ürerler. Bakteriler A-E olarak kodlanan beş tipe ayrılırlar. Bu ayırım salgıladıkları dört öldürücü toksine göre yapılmaktadır. Bakteri insanda hastalık yapmadan kolonize olduğu gibi, ağır seyreden enfeksiyon hastalıklarına da neden olabilmektedir. *C. perfringens*, gazlı gangren, besin zehirlenmesi ve nekrotizan enterit gibi kendisine özgül klinik tabloların yanında birçok organ ve dokuda enfeksiyon oluşturur [14].

*C.perfringens* insan ve hayvanların barsak florasında, toprak ve kontamine sularda bulunur. Spor, çerve şartlarına uzun süre dayanıklıdır. *C.perfringens* enfeksiyonları başlıca başlıca üç klinik tablo ile karşımıza çıkar; yumuşak doku enfeksiyonları, besin zehirlenmesi ve nekrotizan enterit. İlk iki tablo *C.perfringens* tip A, nekrotizan enterit ise *C.perfringens* tip C tarafından oluşturulur [14].

*Clostridium perfringens* su analizlerinde önemli bir rol oynar. Vejetatif hücrelerle kıyaslandığında ısıya dirençli spor formunda bulunabilmesi, bu organizmaların sulardan tespiti için bir avantaj olarak kullanılır. *C.perfringens* en önemli sülfid indirgeyen *Clostridium* cinsi bakteridir ve insan ve hayvan dışkısında

doğal olarak bulunur. Clostridial sporlar sularda koliform bakterilerden, *E.coli*'den ve enterokoklardan daha uzun yaşar ve eski fekal kirliliğin göstergesi olarak kullanılır. Sporlar her zaman klorlamayla da inaktive olmaz [5].

Yüzey suları gibi çevresel sularda, geniş bir dağılıma sahip olan *Clostridium* türlerinin pek çoğu bulunabilir. *Clostridium* türlerinin pek çoğu 44°C'de remezken *C.perfringens* rer. Bu nedenle 44°C'de inkübasyon, bazı numunelerde *C.perfringens*'in izole edilmesi için seçiciliği artırabilir [5].

Tropikal sularda yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmada fekal göstergeler ve sağlık sonuçları arasında güçlü bağlantının kurulamaması, bu çeşit yüzme sularında su kaynaklı patojenlerin göstergesi olarak kullanılan *E.coli* veya fekal enterokokların uygun özelliklere sahip olmaması olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle tropikal sularda gösterge mikroorganizmalara alternatif olarak, sülfit indirgeyen *Clostridia* ve *C.perfringens* sporlarının araştırılması önerilmektedir [5].

*C.perfringens* sporları büyük lde fekal orijinlidir. Her zaman lağım sularında  $10^{4-5}$  cfu/100 ml bulunur ve çevresel şartlara oldukça dayanıklıdır. İlginç bir not olarak, domuz dışkısı insaninkine benzer şekilde  $4.8 \times 10^5$  cfu/g *C.perfringens* içerirken, köpek dışkısı  $9 \times 10^8$  cfu/g *C.perfringens* içerdiği belirtilmektedir [5].

*C.perfringens* sporlarının genelde lağımdan etkilenmiş sularda virüsler ve protozoalar için gösterge organizma olarak kullanılması uygundur ve dezenfektanlara dirençli patojenlerin gösterilmesinde avantaj sağlarlar [5].

#### **2.2.4. Legionella pneumophila**

Legionella cinsi içinde 48'den fazla tür ve 70'den fazla serogrup vardır. İnsanlarda hastalık yapan başlıca tür *L.pneumophila*'dır. *L. micdadei* ve bir-iki tür daha bazen pnömoniye yol açabilir. *L.pneumophila* serogrup1 ve 6 insanlarda enfeksiyona neden olan en önemli serotiplerdir [13, 14].

*L.pneumophila*, ilk kez 1976 yılında Philadeldpia'da bir Amerikan ordu toplantısı sırasında pnmomi salgınına neden olan patojen olarak keşfedildi. Benzer bakterilerin 1947'den itibaren solunum sistemi ile ilgili salgınlar oluşturdukları retrospektif incelemelerle belirlenmiştir. *L.pneumophila*, farklı olarak yüksek demir ve karmaşık besinlere ihtiyacı olan ince, Gram negatif, zorunlu aerop basildir [13, 14].

*L.pneumophila* bakterisi Lejyoner hastalığına neden olur ve normalde içme suyu veya rekreasyonel sudan ziyade aerosoller ile yayılan önemli su kaynaklı bir patojendir [14].

*Legionella* cinsindeki bakteriler Gram negatif çomaklar olup genellikle pleomorfik bir görünüme sahiptir. Dokuda kısa basiller halinde görülürken laboratuvar ortamında üretildiği zaman pleomorfik görülürler. Gram boyaması esnasında safranin yerine bazik fuksin kullanılması önerilir. Gienez, Warthin-Starry gümüşleme boyaları ile daha iyi boyanabilirler [14].

Zorunlu aerop olan bakteri nazlıdır. Kullanılan besiyerine L-sistein ve demir ilavesi gerekir. Bunlar eklenmeden klasik kanlı agarda bakteriyi üretmek mümkün değildir. Demir ihtiyacını çeşitli yöntemlerle karşılayan bakteri bu kabiliyetini kaybettiği zaman virulansını da kaybeder. Bakterileri çoğu hareketli ve katalaz pozitifdir. Üreyi ve nitratı hidroliz edemezler [14].

Serolojik taramalar *Legionella* enfeksiyonlarının büyük bir kısmının asemptomatik seyrettiğini göstermektedir. *Legionella* başlıca Pontiak ateşi ve Lejyonelloz olmak üzere iki farklı klinik tabloya sebep olur [14].

Pontiak ateşi bakteri alındıktan 6-12 saat içinde başlayan ateş, baş ağrısı, kas ağrısı, halsizlik ve titreme ile giden gribe benzeyen bir klinik tablodur [14].

Lejyonelloz ise 2-10 günlük bir kuluçka döneminden sonra başlar. Ateş, titreme, kuru öksürük, baş ağrısı, hipoksi, ishal ve bilinç değişikliği meydana gelir. Klinik tablonun hızlı seyretmesi önemli bir özelliğidir. Önce akciğer tutulur, daha sonra karaciğer böbrekler, mide barsak sistemi ve sinir sistemi gibi birden fazla organ ve sistemin olaya karışması ile tablo ağırlaşabilir. Yaşlılarda ve hücresel bağışıklık yetmezliği olanlarda klinik tablo çok daha ağır seyreder. Bu gruplarda daha ağır olmak üzere ölüm oranı % 10-15'tir. Yaşlılık, sigara kullanımı, KOAH, steroid kullanımı, ilaçlar ile veya hastalık sonucu bağışıklık sisteminin baskılanmış olması şeker hastalığı enfeksiyonu kolaylaştırır. Bu grup hastada pnömoni bulguları görüldüğünde ayırıcı tanıda mutlaka lejyonelloz düşünülmelidir [14].

*Legionella* türlerinin doğadaki yerleşim ortamı sudur. İnsana yapay su sistemlerinden geçer. Havalandırma sistemlerinin soğutma kuleleri, sıcak su tankları, duş başlıkları ve musluklar, su tesisatında yaygın şekilde bulunabilen biyofilm katmanları, hastanelerde solunum terapi ekipmanları insandaki enfeksiyonun en çok

bilinen kaynağı olarak gözlenmişlerdir. *Legionella* bakterisi suyun aerosolize olarak havaya saçılması ile solunum yolundan veya doğrudan aspirasyon ile vücuda alınır [17].

*Legionella* türlerinin insandan insana bulaştığı gösterilememiştir. Bakterinin ulaşmasında her zaman çevresel bir rezervuarın rolü olduğundan, Lejyoner hastalığı çevresel enfeksiyon olarak da tanımlanır [17].

*Legionella*'ların sularda mavi-yeşil algler ve suda serbest yaşayan amiplerle simbiyotik bir ilişki içinde oldukları; bu canlıların ortama saldıkları metabolizma ürünlerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullandıkları, amiplerin içinde yaşayıp çoğalabildikleri, kimi zaman amip kistlerinin içinde paketlenen ve ısı, dezenfektanlar gibi olumsuz çevre şartlarından bu sayede korunabildikleri bilinmektedir. Doğal sular, şehir şebeke suyu üretim tesislerinde çöktürme filtrasyon-dezenfeksiyon gibi tekniklerle işlenirken, suyun tortu ve organizma içeriği büyük oranda tutulur. Ancak çok küçük miktarda da olsa bu işlemlerden özellikle parazit kistleri içinde- kaçabilen *Legionella*'lar bina su sistemlerine ulaşırlar ve yerleşip çoğalma imkanı bulurlar. Serbest yaşayan *Legionella* canlı ama kültürü yapılamayan, düşük metabolik faaliyet gösteren bir formda olabilir. Bu sayede biyositlerin etkilerine daha dirençli hale gelir [14, 17].

*Legionella*'lar fekal kökenli olmadıklarından, *E.coli* bu bakterinin varlığını veya yokluğunu ortaya koymak için bir gösterge değildir [17].

Su örneklerinden bakterinin izolasyon oranları her araştırmada değişiklikler gösterir [18]. *Legionella* türlerinin sebep olduğu toplumdan kazanılmış pnömoni sıklığı, İngiltere'de %2, Almanya'da %5, Fransa'da %10 olarak bildirilmiştir [19]. Ülkemizde toplum kaynaklı lejyoner hastalığı daha çok seyahat ilişkili vakalar olarak ortaya çıkmaktadır ve yine ülkemizdeki veriler lejyoner hastalığının tüm pnömoniler arasında % 5- 10 arası sıklıkta olduğuna işaret etmektedir [7, 20, 21].

### **2.2.5. *Leptospira interrogans***

Leptospiralarda geleneksel sınıflama sistemi, patojenik tür olan *Leptospira interrogans* ile bağımsız yaşayan ve patojenik olmayan *Leptospira biflexa* ayrımını yapmaya yönelik olarak biyokimyasal ve serolojik özgülüğe dayandırılmıştır. Bu türler daha sonra, *L. interrogans*'ın 200'den fazla ve *L. biflexa*'nın 60 serovarına ayrılır. Serovarlar daha ileri olarak, *L. interrogans* ve *L. biflexa* serogrupları olarak organize

edilmişlerdir. Serogruplar paylaşılan antijen özellikleri temeline göre düzenlenmiştir ve bunlar öncelikle laboratuvar kullanımı içindir [13].

İkinci bir sınıflandırma sistemi, geleneksel sınıflamadaki iki tür içerisinde yüksek derecede heterojenlik gösteren DNA-DNA hibritleme çalışmalarına dayanmaktadır [13].

Leptospiralar, 5-15 µm uzunlukta, sıkı şekilde helezonlaşmış, ince, bükülebilir, 0.1-0.2 µm genişlikte spiralleri bulunan spiroketlerdir. Bir uçları sıklıkla kanca oluşturacak şekilde bazen de iki ucu kıvrık olabilir. Aktif olarak hareketlidirler ve bu durum en iyi karanlık alan mikroskobu kullanılarak gösterilebilir. Basit boyalarla kolaylıkla boyanmazlar, ancak gümüşleme ve Giemsa boyaları ile boyanabilirler [13, 14].

Besiyerlerinin, uzun zincirli yağ asitleri, amonyum tuzları ve vitamin içermesi gereklidir. *Leptospira* gerekli enerjiyi uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu yoluyla temin eder. Azot kaynağı olarak amonyum tuzlarını kullanır. *Leptospira* aerobik şartlarda, 28-30<sup>0</sup>C'de, proteinden zengin yarı katı besiyerlerinde en iyi üremeyi gösterirler. Ayrıca embriyolu yumurtanın koryoallontoik membranında da üretilebilirler [14].

*Leptospira* çok ince ve hareketli olduğu için sağlam mukoza ve hasarlı deriden içeri girebilirler. Kan yoluyla merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere birçok dokuya yayılım gösterebilir. Bakteriler hızla çoğalarak küçük damar endotel hücrelerinde hasara yol açarlar. Menenjit, hepatit, böbrek fonksiyon bozukluğu ve kanamalara neden olurlar. Hastalığın şiddeti alınan bakterinin miktarı, bakterinin virulansı ve konak bağışıklık sistemi ile yakından ilgilidir [14].

*Leptospira* insanlarda leptospiroz hastalığına neden olur. *Leptospira* başta fareler olmak üzere, sığır koyun keçi, köpek kedi, geyik ve tavşan gibi birçok hayvanı enfekte eder. Birçok hayvan türünde kronik böbrek tutulumu olup bunun sonucunda bol miktarda *Leptospira* idrarla atılmaktadır. İnsanlarda meydana gelen enfeksiyon genellikle *Leptospira* ile kontamine yiyecek ve içeceklerin alınması ile olur [14].

*Leptospira* temelde bir hayvan enfeksiyonudur ve insanlarda leptospiroz hastalığına neden olur. *Leptospira* başta fareler olmak üzere sığır, koyun, keçi, köpek, kedi, geyik ve tavşan gibi birçok hayvanı enfekte eder. Birçok hayvan türünde kronik böbrek tutulumu olup bunun sonucunda bol miktarda *Leptospira* aktif hastalık ve



belirtisiz taşıyıcılık dönemlerinde idrarları ile çıkarırlar. İnsanlarda meydana gelen enfeksiyon genellikle *Leptospira* ile kontamine yiyecek ve içeceklerin alınmasıyla yada hayvan çıkartıları ile kirlenmiş olan su veya diğer maddelerin temasının takiben kaza eseri enfeksiyona sebep olur. Madenciler, lağım işçileri, çiftçiler ve balıkçılar enfeksiyon açısından en riskli kişilerdir [13, 14].

*Leptospira* enfeksiyonları subklinik hastalıktan renal yetmezlik, karaciğer yetmezliği ve hemorajik diyatez ile birlikte olan ölümcül hastalığa kadar değişebilir. İnkübasyon dönemi ortalama 5- 14 gündür. Leptospirozlu hastaların % 90'ında hastalık hafif, anikterik ve kendi kendini sınırlayan ateşli bir hastalık şeklindedir. Kalan % 10 olguda ise Weil hastalığı şeklinde rastlanır ve ateş, sarılık, kanama, renal yetmezlik ve nörolojik bulgular ön plandadır [22].

Anikterik leptospiroz yüksek ateş, titreme, ciddi baş ağrısı, bulantı, kusma ve miyalji gibi akut influenza benzeri semptomlarla başlar. Özellikle sırt, karın ve baldır kaslarını tutan miyalji leptospiral enfeksiyonun önemli bir özelliğidir. Birçok olguda öksürük, göğüs ağrısı ve az sayıdaki hastada hemoptizi pulmoner tutulumun bulgularıdır. Fizik muayenede en sık saptanan bulgu ateştir. Önemli klinik bulgular konjunktival hiperemi, fotofobi, göz ağrısı, kas tonusunda artış, hepatosplenomegali ve lenfadenopatidir. Hastaların çoğunda aseptik menenjit vardır. Semptomatik hastalar bitemporal ve frontal yoğun ağrıdan şikayet ederler. Lenfositik pleositoz meydana gelir ve artan hücre sayısı  $\text{mm}^3$ 'de 500'ün altındadır. BOS proteini hafif artmıştır, glukoz düzeyi normaldir. Hastalığın başlangıcından 5- 7 gün sonra *Leptospira*'lar idrardan izole edilebilir [22].

Leptospirozun ciddi formu olan Weil hastalığı daha çok *L.icterohaemorrhagiae/copenhageni* enfeksiyonlarında tarif edilmekle birlikte *Leptospira*'ların diğer serotipleriyle de görülebilir. Sarılık, renal disfonksiyon, hemorajik diyatez ve yüksek mortalite ile karakterizedir. Başlangıçtan 4-9 gün sonra sarılık, kardiyak aritmiler, renal ve vasküler disfonksiyon gelişir. Weil hastalığı seyrinde görülen sarılık ciddi olabilir ve deriye portakal sarısı bir renk verir. Sarılık tipik olarak hepatik kapillerlerin vasküler hasarı nedeniyle oluşur, hepatosellüler nekroz yoktur. Hepatomegali ve batın sağ üst kadranda hassasiyet bulunur. Serum bilirubin seviyeleri genellikle 20 mg/dl'nin, serum transaminaz seviyeleri ise 200 U/l'nin altındadır. Akut olarak ikter gelişen hastada, serum transaminaz seviyeleri orta derecede yükselmişken,

kreatinin fosfokinaz düzeyinin belirgin artmış olması, leptospirozun diğer akut hepatitlerden ayırt edilmesinde yardımcı olur. Akut renal yetmezlik, sıklıkla sarılığın eşlik ettiği hastalığın ikinci haftasında üremi ve oligürinin hızlı başlangıcı ile karakterizedir. Kan üre azot düzeyleri 100 mg/dl'nin altındadır ve serum kreatinini hastalığın akut döneminde 2-8 mg/dl düzeyindedir. Trombositopeni gelişebilir ve ilerleyici böbrek disfonksiyonuna eşlik edebilir. Anürinin gelişmesi kötü prognoz işaretidir. Pulmoner tutulum sıktır. Öksürük, dispne, göğüs ağrısı görülebilir. Weil hastalığında epistaksis, peteşi, purpura ekimoz gibi hemorajik bulgular görülür [22].

Suda veya toprakta haftalar ve aylarca yaşayabilir. Deniz suyunda bile 24 saat yaşayabilir. Özellikle tropikal iklim özelliğini gösteren yerlerde sık olup, çöller hariç tüm dünyada bulunabilir. Onların çevredeki yoğunluğu uygun evcil ve vahşi taşıyıcı hayvanların varlığı ile çevresel değişiklikler, mevsimler ve nemle ilişkilidir. Serovarların bulunma eğilimi sıcak tropikal bölgelerde ılıman alanlardan fazladır. Bu tropik alanlarda hayvanlarda yoğunluğu ve çeşitliliği yansıtabilir. Konak serovar ilişkisi yabancı serovarların özel türlerde taşıyıcılık için adaptasyonunu gösterebilir [23].

Hastalığın kontrolünde potansiyel olarak kontamine olmuş kabul edilen sularla temasın önlenmesi ve kemiricilerin kontrolünün yapılması önemli rol oynar [14].

Leptospiroza dünyada bazı bölgelerde endemik olarak rastlanmaktadır. Yağmurların bol olduğu ilkbahar ve sonbahar aylarında daha sık görülmektedir [22]. Hastalığın pik insidansı yaz suresinde ve erken sonbahardır. Sıklıkla genç erkekler enfekte olurlar. Bunda kontamine sularla meslek dışı aktiviteler nedeni ile uğraşların etkisi olduğu bildirilmiştir. Çocukların yüzey suları ve toprakla temasının çok olmasına rağmen leptospiroz onlarda sık saptanmamıştır [23].

Son zamanlarda insanın çevre ile ilişkisini izleyebilen ilave bulaş yolları ve enfeksiyon tanımlanmıştır. Coğu gelişmiş ülkede kontamine sularda yüzme, nehirde rafting gibi kişisel aktiviteler ile ilgili bulaşlar ve epidemiler bildirilmiştir. Özellikle macera turuna katılan turistlerde ve endemik ülkelerde su ile ilgili aktivitelerle görülebilir [23].

Leptospirozun büyük epidemileri Orta ve Güney Amerika ve Karayibler'de tufanlar, tropikal fırtına ve kasırga ile ilişkili açıklanamayan ateşli hastalıkların araştırılmasından sonra bildirilmiştir. Irmak, dere, küçük çay boyunca yürüyüşler, kirli

göl veya su birikintisinde yüzülmesi ile yemek hazırlanan alanda kemiricilerin bulunması gibi durumlar hastalıkla ilişkili tanımlanan risk faktörleridir [23].

Türkiye’de leptospiroz ile ilgili çalışmalar sıklıkla hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalar ile insanlarda olgu sunumları niteliğindedir. Türkiye’de leptospiroz insidansı ve prevalansının bildirildiği geniş seri çalışmalar yoktur [23].

#### **2.2.6. *Aeromonas* sp.**

*Aeromonas* cinsi bakterilerin, taksonomileri ve isimlendirilmeleri konusunda sürekli değişiklikler yapılmaktadır. Önceleri *Pseudomonadacea* ailesinde sınıflandırılmış, ancak daha sonra Gram negatif ve polar kirpiğe sahip olmalarından dolayı *Vibrionaceae* ailesi içine alınmışlardır. Aynı zamanda *Vibrio*, *Photobacterium* ve *Plesiomonas* cinslerini içeren *Vibrionaceae* ailesi ile yapılan filogenetik çalışmalar, *Aeromonas*ların vibriolarla benzer olmadıkları anlaşılmış. En son *Vibrionaceae*’den alınıp *Aeromonadaceae* ailesine konmuştur [24, 25].

İnsanlar için önemli olan üç tür vardır; *Aeromonas hydrophila* kompleks, *Aeromonas veronii* biotip *sobria* ve *Aeromonas caviae* kompleks [14].

*A. hydrophila* tatlı su ekosistemlerinin yerli florasına ait olan ve uygun koşullar altında çabucak çoğalabilen bir bakteridir. *Aeromonas* cinsi üyeleri aynı zamanda klorlanmış ve klorlanmamış içme suları, kuyu suları, dereler, deniz suları, ham çamur, işlenmiş çamur ve aktif çamur, atık su drenaj sistemleri ve yüzme havuzları gibi sucül çevrelerin yanı sıra etlerde, balıklarda, deniz kabuklularında, kümes hayvanlarında, süt ve süt ürünlerinde de bulunabilmektedirler. Gram negatif çomaklardır [24].

*Aeromonas* 1-4 µm uzunluğunda, hareketli bir basillerdir. Bazen kokobasil ya da uzun filamanlı basiller şeklinde de görülebilirler. Mikroskop altında tek tek, ikili veya kısa zincirler şeklinde görülürler. Koloni morfolojileri Gram negatif enterik bakterilere benzerlik göstermektedir ve kanlı agarda büyük bir hemoliz yaparlar. *Aeromonas* türleri Gram negatif enterik bakteriler için kullanılan besiyerlerinde kolayca ürerler ve tanımlamada karışıklığa neden olurlar. Oksidaz ve katalaz testleri pozitifdir. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermente ederler. *Aeromonas* türleri enterik Gram negatif bakterilerden oksidaz pozitif olmaları ile ayrılırlar. *Aeromonas*lar O/129 dirençli olmaları ve %6 NaCl içeren ortamlarda üreyememeleri ile *Plesiomonas* ve *Vibrio* türlerinden ayrılır [14, 24, 25].

*A. hydrophila* insanlara su kaynaklarından ve gıda maddelerinden bulaşmakta, ayrıca yaraların kirli su veya toprakla teması sonucu fırsatçı enfeksiyonlara, ishale, yara enfeksiyonlarına ve septisemiye neden olmaktadır. Bundan başka akut lösemi ve kemik iliği hastalığı olan ve immün sistemleri baskılanmış olan kişiler de *A. hydrophila* ile kolayca enfekte olabilmektedirler [14, 26].

Gastrointestinal hastalık çocuklarda ani ve şiddetli olmakla beraber yetişkinlerde kronik seyirlidir. İshal, karın ağrısı, bulantı ve kusma ile seyreder. Şiddetli olgular basilli dizanteriyi andırır. Bu olgulardan alınan gaita örneklerinden eritrosit ve lökosit saptanır [14].

Kontamine sular ve toprak ile temas sonucu yara enfeksiyonu gelişir. Bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, yara enfeksiyonu ilerleyebilir. *Aeromonas* türü bakteriler bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde bakteriyemi yapabilir. Bağışıklık sisteminin baskılanması, karaciğer hastalıkları, kronik böbrek yetmezliği ve diabetes mellitus kolaylaştırıcı faktörler arasında yer alır. Bu olgularda ölüm % 35-40 civarındadır. Kontakt lens kullananlarda göz enfeksiyonları yapabilirler. Bunlardan başka solunum sistemi enfeksiyonları, menenjit ve septik artrit oluşturabilirler [14].

*Aeromonas* enfeksiyonlarının semptomatolojisinde ve etken tür dağılımında coğrafik bölge farklılığı vardır. Coğrafik lokalizasyon dışında, materyalin toplandığı mevsim veya izolasyonunda kullanılan kültür vasatlarının farklılığı, çalışma bulgularındaki değişiklikleri açıklayabilmektedir [27].

Deniz suyu ve tatlı su örneklerinden *Aeromonas*ların izolasyonunda ısının üremeye fazla etkili olmadığı, lağım ve atık suların denizle ağızlaştığı yere yakınlığı ile orantılı olarak bakteri izolasyon oranlarının arttığı görülmüştür [24].

Çeşitli ülkelerde ishali dışkı örneklerinde *Aeromonas* türleri izole edilmiştir. Ülkemizde de yapılan birçok çalışma vardır. Yapılan çalışmalarda *Aeromonas* türleri izole edilmiştir [24].

### **2.2.7. Toplam Koloni (Jerm) Sayısı**

Yapıları ne olursa olsun sular, çok miktarda topraktan ve bitkilerden, genel olarak çevreden gelen mikroorganizmaları ihtiva etmektedir. Bu mikroorganizmaların sayımı suyun kalitesinin değerlendirilmesi ve gözlemi için faydalı bilgiler sağlamaktadır [17].

Sudan mikroorganizmaların geniş şekilde elde edilmelerini hedefleyen basit kültüre dayanan çeşitli testler ‘‘Heterotrophic Plate Count’’ (HPC) olarak adlandırılır. Fakat literatürde heterotroflar genelde üremek için organik karbona ihtiyaç gösteren mikroorganizmalar olarak tanımlandıklarından heterotrof ve HPC terimleri eşit anlamlı değildir [5].

Toplam koloni sayısını tespit etmek için yapılan testler bakteri, maya ve kfleri kapsar. lkeden ülkeye adı değişen HPC, kültürü yapılabilen mikroorganizmalar, plak sayımı (plate count) ve koloni sayımı (colony count) gibi terimler eşit anlamlıdır ve birbirinin yerine kullanılabilirler [5].

Evrensel bir koloni sayım tekniği bulunmamaktadır. Standart metotlar bir biçim vermişe de koloni sayım metotları geniş aralıkta kalitatif ve kantitatif sonuçlara götüren çok çeşitli test Őartlarını içerir. Sıcaklıklar 20-40°C civarında, inkübasyon zamanları birkaç saatten 7 güne ve besin Şartları düşükten yükseğe değişebilmektedir. Koloni sayımları neticesinde elde edilen mikroorganizma sayısı; numunenin alındığı yerler arasında, sezonlar arasında ve tek bir yerdeki ardışık numuneler arasında oldukça farklı olabilir. Koloni sayım metotlarında elde edilen mikroorganizmalar, bazı zamanlar muhtelif kirlilik kaynaklarından gelen mikroorganizmalar olabilse de genellikle suyun doğal (zellikle non patojen) mikroflorasının bir parçasıdır [5].

Her su eşitidi, toprak ve bitki örtüsü gibi pek çok noktadan kaynaklanan çeşitli mikroorganizmaları sürekli bulundurmakta ve bu mikroorganizmaların sayımı, su kalitesinin araştırılması ve değerlendirilmesinde faydalı bilgiler sağlamaktadır. Ortam sıcaklığındaki sularda üreyebilen pek çok mikroorganizma 22°C’deki kültür ortamında daha iyi üremektedir. En iyi 37°C’de üreyen mikroorganizmalar ise, genellikle daha az rer ve muhtemelen insan ve/veya hayvan kaynaklıdır. Dolayısıyla bu iki sıcaklıkta daha iyi üreyen mikroorganizma grubu, ayrı ayrı sayılmakta ve suların genel kalite değerlendirmesinde kullanılmaktadırlar [5].

Toplam koloni sayımının insan sağlığı için iyi bir risk göstergesi olmadığı Dünya Sağlık rgt (DSÖ) tarafından tanımlanmıştır[5].

Koloni sayımlarının anlamı, uzun dönem izlemede sıklığa bağlı olarak beklenen değerlerin değişiminin saptanmasına dayanır. Sayımlardaki ani bir artış, ciddi bir kirlenmenin erken bir uyarısı olabilir [5].

Koloni sayım testlerinin su mikrobiyolojisinde kullanımları uzun bir geçmişe sahiptir. 19. yy sonunda koloni sayımı, arıtma işlemlerinin uygun yapıldığının ve böylece su güvenliğinin sağlandığının indirek göstergesi olarak kullanılmıştır. Güvenli bir gösterge gibi kullanılmaları, 20. yüzyıl boyunca spesifik fekal gösterge bakterilerinin benimsenmesi ile azalmıştır [5].

Epidemiyolojik çalışmalardan veya su kaynaklı patojenlerin mevcudiyeti ile koloni sayımları arasındaki korelasyondan anlaşılmıştır ki, koloni sayımları tek başına doğrudan sağlık riski ile ilişkili değildir. Koloni sayısındaki beklenmedik artışlar bazen fekal kontaminasyon ile yakından ilişkili olabilir ancak bunun için *E.coli* veya diğer fekal spesifik göstergeler için kullanılan yöntemler, sağlık riskinin mevcut olup olmadığının tespiti için şarttır [5].

## **2.8. Sudaki Patojen ve İndikatör Bakterilerin Aranmasında Kullanılan Yöntemler**

### **2.8.1. Konvansiyonel Yöntemler**

Rutinde kullanılan iki yöntem vardır: Çoklu tüp yöntemi ve membran filtrasyon yöntemi [7].

#### **2.8.1.1. Çoklu Tüp Yöntemi (En Muhtemel Sayı)**

Özellikle *Escherichia coli* bakterisinin tanımlanmasından sonraki yıllarda sularda bu mikroorganizmanın varlığının saptanması, diğer mikroorganizmaların da olabileceğini gündeme getirmiş ve 1910'lu yıllardan itibaren, günümüzde de bir takım değişikliklerle kullanılmaya devam edilen "Çoklu tüp yöntemi (veya En Muhtemel Sayı)" kullanılmaya başlanmıştır [28].

Çoklu tüp yönteminde bir seri özel bir sıvı besiyeri konmuş ve içinde küçük Durham tüpleri bulunan tüpe belirli miktarlarda su örneği ekilerek üreme ve gaz oluşturma yönünden test edilir. Gaz oluşturanlar daha sonra koliformlar için özel bir besiyerine tekrar ekilir. Yine gaz oluşturlarsa suda koliform bakteri var demektir. Ancak bunun fekal koliform olduğunu doğrulamak için 44<sup>0</sup>C'de tekrar inkübe etmek gerekir. 44<sup>0</sup>C'de gaz oluşturlarsa fekal koliform varlığına karar verilir. Bakteri sayımı suyun kantitatif ekimine göre hazırlanan tablolardan yapılır [7].

Deney genellikle 15 tüpe yapılmaktadır. Deneyde 15 tüpten, her beş tüpe, üç ayrı numune hacminin (10, 1, 0,1 ml ) birer kısmı ilave edilir. Şayet evsel olan bir numune ile çalışılacaksa seyreltme yapmak gerekir. Bu durumda ekim ya tek bir seyreltmeden 10, 1, 0.1 ml'lik hacimler de duruma göre ardışık olarak gelen seyreltmelerden en az 3 'ünde (bu 10-4, 10-5, 10-6, 10-7 de olabilir) 1 'er veya 10'ar ml'lik ekimlerin yapılması gerekir. Bunun dışında genellikle içme suyu olarak kullanılan memba sularının bakteriyolojik analizlerinde 50 ml veya 100 ml ekimler bunlara ait tablolar da mevcuttur. Buna benzer bir çalışma da 5 veya 10 tüpe 10'ar ml numune ilave edilerek yapılmaktadır. "Tahmin deneyi", "Doğrulama deneyi", "Tamamlama testi" olmak üzere çoklu-tüp yöntemi üç kademe yapılr. Pratik uygulamalarda ilk iki kademe ile sonuca gidilmektedir. Tamamlama testi bütün şüpheleri ortadan kaldırıp, % 95'lik bir doğruluk derecesi elde etmek için yapılmaktadır[29].

Bu yöntemle elde edilen sonuçlar "en olası sayı" olarak ifade edilir. Uygun koşullar yerine getirildiğinde ve sonuçlar fiziksel ve kimyasal verilerle desteklendiğinde işlenmemiş suyun kalitesini ortaya koymada ve arıtma işleminin (dezenfeksiyon değil) etkinliğini saptamada en etkili yöntem olarak kabul edilebilir. En muhtemel sayı formüle veya standart tablo aracılığıyla hesaplanabilir. Ancak eğer bakteriler kümeleşmişse veya içinde numune bulunan şişe yeterince sallanmamışsa sonuçlar yanlış çıkabilir [30].

### **2.8.1.2. Membran Filtrasyon Yöntemi**

Çoklu tüp yönteminin birtakım kısıtlılıkları ve yanlış negatif sonuç verebilme olasılığının bulunmasının anlaşılması üzerine, 1950'li yıllarda "Membran Filtrasyon Yöntemi" olarak adlandırılan yeni bir analiz yöntemini geliştirilmiştir [28].

Membran filtrasyon yöntemi sularda uygulandığı gibi gıdalarda da uygulanabilir. Buna göre membran filtrasyonun genel olarak uygulanışı şöyledir:

- Membran filtrasyon sistemi sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi, ekipmanın özelliğine göre otoklavda yapılabildiği gibi, pratik olarak alkol ya da uygun bir kimyasal kullanılarak da yapılabilir. Otoklavlama parametresi 121 °C'da 20 dakika iken, kimyasal dezenfeksiyon uygulanırsa dezenfektanın kolaylıkla sistemden

uzaklaştırılması gerekir. Aksi halde; sistemde kalan dezenfektan, analizi yapılacak mikroorganizma üzerinde olumsuz etki oluşturur.

- Bu nedenle, alkol uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmının yakılarak giderilmesine ek olarak, analiz öncesinde 50 ml kadar steril damıtık suyun filtre edilmesi, sistemde kalabilen dezenfektanın yıkanması için etkili bir uygulamadır.

- Aseptik koşullara uyularak filtrenin yerleştirileceği taban steril su ile ıslatılır ve filtre buraya yerleştirilir. Koruyucu plastik tabaka kendiliğinden kalkar, bu kısım filtreden ayrılır. Sonra süzme haznesi yerine takılır.

-Beklenen ya da hedef sayıya uygun miktarda sıvı hazneye konulur, pompa çalıştırılır ve sıvı örnek membran filtreden geçirilir.

- Süzme işlemi tamamlandıktan sonra çepelerde kalmış olması muhtemel mikroorganizmaların da alınması için 10–20 ml kadar steril su ile çalkalanır. İlave steril su geçirme işlemi, klor gibi inhibitör maddelerin varlığında daha da önemlidir.

- Filtrenin mikroorganizmaların tutulmuş olduğu yüzeyi üstte kalacak şekilde Petri kutusundaki besiyerine yerleştirilir. Petri kutuları, tabanları alta gelecek şekilde inkübasyona bırakılır.

- Besiyeri olarak ped üzerine emdirilmiş hazır besiyeri kullanılıyor ise üretici firmanın talimatı doğrultusunda steril su ilave edilerek besiyeri aktive edilir.

- Membran filtreden fiilen geçirilen miktar esas alınarak sonuçlar kob/ml ya da kob/g olarak verilir.

Aşağıda çeşitli örnekler verilmiştir:

-100 ml su örneği filtre edilmiş ve sonuçta 24 koloni sayılmış ise sonuç 24 kob/100 ml olarak verilir.

-5 gram şeker 45 ml steril seyreltme çözeltisinde eritilmiş, buradan alınan 5 ml filtreden geçirilmiş ve 17 koloni sayılmış ise; filtrasyon öncesinde  $10^{-1}$  seyreltme yapılmış demektir. Bu çözeltinin her ml'sinde 0,1gr ve 5 ml'sinde ise 0,5 gr şeker vardır. 17 koloni 0,5 gramdan elde edildiğine göre, sonuç 34 kob/g olarak verilir.

-100 ml su örneği filtre edilmiş ve koloni gelişmesi görülmemiş ise sonuç <1kob/100 ml olarak verilir. Yaygın uygulamada bu sonuç "yok/100 mL" olarak da verilmektedir.

-100 ml dere suyunda *Salmonella* aranması amacıyla yapılan filtrasyondan sonra filtre 50 ml kadar ön zenginleştirme besiyerine atılıp, buradan standart *Salmonella* analizi ile selektif zenginleştirme, selektif katı besiyeri, tipik kolonilerin tanımlama aşamaları ile



örnekte *Salmonella* var/yok testi yapılmış olur. Görüldüğü gibi burada membran filtrasyon tekniği bir anlamda var/yok testinin bir bölümü olarak kullanılmaktadır. 100 ml su analizinde filtre doğrudan besiyeri üzerine konularak sayım yapılır. Ancak buradaki uygulamada sıvı besiyeri kullanıldığı için analiz prensibi değişmektedir [31].

Özet olarak sularda membran filtrasyon yönteminde 0.20 µm yada 0.45 µm por çapı olan steril membran filtreler filtrasyon aletine yerleştirilir. İstenilen miktarda su süzülür. Sonra filtre sterilizasyon koşullarına uyularak kontamine etmeden alınır alınır ve özel bir besiyeri bulunan petrilere genellikle 22°C, 37°C ve 44°C' de inkübe edilir. Özel besiyeri bulunan petrilere aranan bakterinin oluşturduğu tipik koloniler sayılır [7, 31].

### 2.8.3. Moleküler Yöntemler

Geçtiğimiz 20 yıl içinde moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler bir dizi yeni metodun bulunmasıyla sonuçlandı. Bu yöntemler genellikle hızlı ve organizmaların spesifik zincirlerin tespitinde uygun olabilir. Bu yöntemler içme su hijyeni alanında gelecekteki uygulamalarında önemli bir potansiyele sahiptir. İnterlaken'deki (İsviçre) uluslararası uzmanların toplantısında, moleküler yöntemlerin uygulanması içme su kalitesinin yönetimi çerçevesinde düşünülmesi gerektiği sonucuna vardılar. Yeni metotlar, epidemiyolojide ve salgın araştırmalarında işlenmiş suların rutin testlerine göre daha çok etkileyecektir [32].

İlk moleküler testlerin dayandığı ilke, bir test örneğindeki özgül nükleik asit dizisiyle bu diziye özgü bir nükleik asit probunun hibridizasyonu ve sonrasında da bu çiftleşmiş hibridin saptanmasıdır. Örneğin tek iplikli DNA veya RNA probu, örnekte bulunan komplementer RNA veya denatüre DNA ile birleşerek hibrid oluşturur. Prob, enzim, antijenik madde, kemilüminisan bir molekül veya radyoizotop ile işaretli olup, oluşan hibrid kullanılan işarete göre belirlenir. Probu dikkatli seçilmesi ve hibridizasyon koşullarının güçlü olması özgüllüğü ileri derecede artırır [13].

Bakterilerde ribozomal RNA; 5S, 16S ve 23S alt ünitelerinden oluşur. Bu bölgelerden; 5S, 16S, 23S ve 16S-23S rRNA intergenik bölgenin saptanması bakterilerin moleküler tanısında önemli yer tutmaktadır. Bu bölgelerden özellikle 16S rRNA geni tanı amaçlı en çok kullanılan bölge olmuştur. Bu bölge, aynı cins ve tür içinde yüksek oranda korunmuştur. Farklı cins ve türlerde ise farklı diziler içermektedir.

Bundan dolayı 16S rDNA dizi analizi, tanı, bakterilerin sınıflandırılması, yeni türlerin belirlenmesi ve türler arası ilişkilerin belirlenmesi amacıyla tercih edilen bölge olmuştur. 16S rRNA geni, yaklaşık 1550 baz çifti uzunluğunda olup değişken ve korunmuş bölgelerden oluşur. Ünlversal primerler, genellikle korunmuş bölgelere komplementer seçilir. Tanı amacıyla DNA dizi analizi yapıldığında çoğunlukla ilk 500 baz çiftlik kısım incelenir. Yeni tür belirlenmesi ve türler arası farklılıkların saptanmasında tüm bölgenin araştırılması gerekmektedir. Yeni türlerin saptanmasında 16S rRNA gen dizisinde en az % 0,5 veya %1 fark bulunması gerekmektedir [14].

Tanı amacıyla dizi analizi yapıldığında, özellikle nadir görülen, yavaş üreyen, kültürü yapılamayan bakterilerin tanısında kullanılmaktadır. Konvansiyonel yöntemlerle tür ve cins düzeyinde tanımlanamayan bakteriler, 16S rDNA dizi analiziyle büyük oranda tanımlanabilmektedir [14].

### **2.8.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Sentetik DNA ve DNA dizi analiziyle ilgili gelişmeler, DNA'nın *in vitro* çoğaltılması üzerine polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) adında yeni bir yöntemin doğmasına sebep oldu. Polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler biyoloji uygulamalarının bir kaynağı olarak kullanılabilir özel genlerin büyük miktarlarda oluşmasını sağlar ve deney tüplerinde DNA molekülünü milyonlarca kez çoğaltır. PZR işleminde, DNA moleküllerini kopyalayan DNA polimeraz enzimi kullanılır [33].

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiniükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PZR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar [34].

Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde

diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PZR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PZR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır [34].

Potansiyel olarak her döngünün % 100 gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucu  $2^{20}$  kat ürün meydana gelir [34].

PZR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimeraz enzimidir. Normalde enzim miktarı, 25-30 PZR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Verimliliği azaltan diğer bir faktör de konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışıdır [34].

PZR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve  $MgCl_2$ 'dür [34].

PZR'de genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılabilir [34].

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerlerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır [34].

Termostabil (sıcaklığa dayanıklı) DNA polimeraz enziminin PZR'de kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Önceleri kullanılan *Escherichia coli*'nin DNA polimeraz I enzimi sıcaklığa dayanıklı olmadığı için, her PZR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden enzim ekleme zorunluluğu duyulmaktaydı. Ancak günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlarla bu sorun ortadan kalktığından enzimin amplifikasyonun başlangıcında tüplere konulması yeterli olmaktadır. Termostabil DNA polimerazlardan PZR'de en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz'dır [34].

Gen çoğalması dahil PZR'nin birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan ya da ticari olarak elde edilebilirler [34].

PZR'de kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur [34].

PZR çeşitli maddeler ile engellenebildiği gibi aynı zamanda bu maddelerin kullanımıyla arttırılabilir. Birçok faktör PZR'nin engellenmesine yol açar [34].

Çok duyarlı bir teknik olduğundan dolayı, PZR çok küçük miktarlardaki DNA'yı çoğaltmak için kullanılabilir. Hücre karışımlarındaki DNA'yı çoğaltma ve analiz etme özelliği, PZR'yi hastalıkların teşhisine dayalı mikrobiyolojide de yaygın bir araç haline getirmiştir [34].

Su mikrobiyolojisinde PZR'deki bir problem, tahlil hacminin birkaç mikrolitre olması, su numune hacmi ise 100-1000 ml arasındadır. Bej ve ark. (1991) örneklerin konsantrasyonu için bir filtrasyon metodu yayınladı, fakat başka bir problem de doğal su örnekleri, nükleik asitle birlikte konsantre olan, genellikle inhibitör maddeler içerirler (hüyük asit ve demir gibi). Bu nedenle pozitif (ve negatif) kontrollerin olması her çevresel örneğin PZR'sinde inhibisyon ve özgüllüğün kontrolü için kritik bir öneme sahiptir. Ayrıca PZR'den elde edilen sinyaller yaşayan yada ölü mikroorganizmalar nedeniyle kritik öneme sahip olabilir. Geliştirme aşamasındaki diğer seçenekler, mRNA yada rRNA'daki gibi kısa ömürlü hedefleri içerir. PZR'nin en önemli avantajı hedef organizmaların kültürlenmesi gerekmiyor. Buna iyi bir örnek insan fekal kirliliğini diğer hayvanlardan ayırt etmek için insan *Bacteroides spp.*'nin spesifik tespitidir [28].

Klonlama, genetik tiplendirme, dizileme vb. amaçlar için kullanılan farklı PZR çeşitleri vardır. Bunlar; Multiplex PZR, Yuvalanmış PZR (Nested PCR), Ters Tanskripsiyon PZR (Reverse Transcription PCR), Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR), Demirlenmiş PZR (Anchored PCR), Asimetrik PZR, Ters PZR (Inverse PCR) ve In situ PZR [14, 34].

İn vitro nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin en sık kullanılanlarından olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği 1990'lı yılların başında su ve çevre mikrobiyolojisinin gündemine girmiş ve özellikle kültür ortamında üretilmesi ve

izolasyonu zor mikroorganizmaların saptanması için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır [28].

Zaman içerisinde suların mikrobiyolojik kontrolüne yönelik çok sayıda analiz yöntemi geliştirilmiş olmakla birlikte, analiz yöntemlerinde kullanılan cihaz veya malzemelerin hemen her mikroorganizma için farklı olması, mevcut analiz yöntemlerinin genelde mikroorganizmaları kültür ortamında üretmeye yönelik olmalarından dolayı uzun zamanda sonuç vermesi ve 1990'lı yıllardan itibaren indikatör mikroorganizma olarak adlandırılan ve suyun mikrobiyolojik kalitesini ortaya koyduğu düşünülen mikroorganizmalar dışında kalan çok sayıda mikroorganizmanın da içme sularında bulunabileceğinin saptanması; güvenilir ve hızlı analiz yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır [28].

Gerçek zamanlı PZR, amplifikasyon sonrasında elektroforeze gerek kalmadan, PZR ürünlerinin oluşurken gözlenebildiği bir yöntemdir. Amplifikasyon sırasında kullanılan floresan bir boya olan SYBR-Green I boyası, PZR ürünleri oluşurken, çift zincirli DNA'ya bağlanır ve PZR ürünlerinin gözlenmesini sağlar. SYBR-Green I boyasının yanı sıra gerçek zamanlı PZR'de sıklıkla hibridizasyon problemlerinden yararlanılmaktadır. Hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı, floresan rezonans enerji transferi (FRET) yöntemine dayalı yöntem özellikle, dirençli bakterilerin saptanmasında kullanılmaktadır. Birden fazla dalga boyunda floresan alınabilen dolayısıyla birden fazla prob çifti kullanılarak birden fazla bölgede mutasyon saptanabilen cihazlar geliştirilmiştir. Mutasyonların gösterilebilmesi yöntemin önemli avantajıdır. Gerçek zamanlı PZR'nin diğer bir önemli avantajı ise kantitatif PZR sonucu alınmasına sağlamasıdır. PZR sonrası herhangi bir işleme gerek kalmadığı için bulaşma oranı düşük, otomatize bir yöntemdir. Bununla birlikte, amplifikasyon sonrası diğer moleküler tekniklerin uygulanması zor olabilmektedir. Ayrıca, elde edilen PZR ürünün boyutu gözlenememektedir [14].

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan gerçek zamanlı PZR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar [35].

### 2.8.3.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Nükleik asit melezleme (hibridizasyon) yöntemleri; tek iplikli nükleik asit moleküllerinin tamamlayıcı dizileri ile uygun koşullar altında kendiliğinden eşleşerek çift iplikli melez moleküller (hibridler) oluşturma özelliğine dayanır. Bu tip melezleme reaksiyonları tamamlayıcı nükleotid dizileri içeren tüm tek iplikli nükleik asit molekülleri (DNA/DNA, RNA/RNA ve RNA/DNA) arasında gerçekleşebilir. Bu özgün reaksiyonlar, hem RNA hem de DNA molekülleri üzerindeki belirli nükleotid dizilerini tayin etmek amacıyla kullanılır. Yöntemin uygulanması için, araştırılan nükleik asit dizisini tamamlayıcı olan tek iplikli nükleik asit (DNA veya RNA) dizilerine gereksinim vardır. Ayrıca bu dizilerin radyoaktif ve radyoaktif olmayan bir belirleyici ile işaretlenmesi gereklidir. Böylece melezleme reaksiyonu sonucu oluşan çift iplikli molekül görülebilir hale getirilir. Tanımlanmak istenen nükleik asit bölgesini tamamlayıcı olan ve belirleyici olarak kullanılan tek iplikli özgün nükleik asit parçalarına prob adı verilir [34].

Yöntem, belirli bir doku veya hücrelerden izole edildikten sonra jel elektroforezi ile ayrılan ve nitroselülöz veya naylon membranlara transer edilen DNA moleküllerinin veya özgün RNA dizilerinin saptanması ve analizi için uygulandığı gibi, gerek RNA gerekse DNA dizilerinin belirli hücre veya dokulardaki varlığı ve dağılımını belirlemede (in situ melezleme) de kullanılmaktadır [34].

Prob floresan bir boya ile işaretlendiğinde, probun hücresel ribozomlara bağlandığı mikroskopik olarak görülebilir. Hücreleri uygun reaktiflerle muamele ettiğimizde, membran geçirgen hale gelir ve prob/boya karışımının hücre içine girişine izin verir. Probu direkt olarak ribozomlardaki rRNA ile hibridizasyonundan sonra, hücreler benzer şekilde floresan özellik kazanır ve bir floresan mikroskopu altında incelenebilir. FISH olarak bilinen bu teknik, kültüre edilmiş veya doğal ortamlardaki hücrelere direkt olarak uygulanabilir. Kısacası FISH filogenetik bir boyadır [34].

FISH teknolojisi mikrobiyal ekoloji ve klinik tanıda sıkça kullanılmaktadır. FISH ekolojide mikroskopik teşhiste ve organizmaları yaşam ortamlarında direk olarak izlemek amacıyla kullanılabilir. FISH aynı zamanda mikrobiyal toplulukların kompozisyonunu direk olarak mikroskopta belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, kültüre edilmiş bir organizmaya ihtiyaç duyar. Bunun yanı sıra bir numunenin mikroskopik olarak incelenmesi ile tehlikeli bir patojenin varlığı doğrulanabilir [34].

Doğal rnekler filogenetik çoklu problarla da muamele edilebilirler. Her biri belirli bir organizma veya organizma grubu ile reaksiyona girecek Şekilde dizayn edilmiş ve her biri kendi floresan boyasını içeren uygun probları kullanarak, FISH bütün bir habitatı karakterize etmede kullanılabilir [34].

Koliformların ve enterokokların tespiti için bir dizi FISH yöntemi geliŐtirildi [33].

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Araştırma Alanı

Araştırma için Mayıs 2013 tarihinde Edirne il merkezinden ve çevresinden belirlenen toplam 10 istasyondan su örneği alındı. Bu istasyonları belirlerken patojen ve indikatör mikroorganizmaların bulunma ihtimali olup toplumun geniş bir kesimini etkileyebilecek yüzeysel sular hedef alınmıştır. Bunun için Edirne kent merkezinden etrafı asfalt yolla çevrili olmayıp insanların yoğun ve yakın temasta bulunduğu beş adet süs havuzundan, kent merkezine yakın bir dereден, Meriç, Tunca, Ergene Nehirlerinden ve Ergene Nehri kenarında bulunan bir çeltik tarlasından örnek alındı.

**Tablo 3.1.** Su örneklerinin alındığı istasyonlar.

<b>İstasyon No:</b>	<b>İstasyonun Bulunduğu Yer/Nokta</b>
1. İstasyon	Meriç Nehri (Meriç Köprüsü)
2. İstasyon	Tunca Nehri (Tunca Köprüsü)
3. İstasyon	1. Süs Havuzu
4. İstasyon	2. Süs Havuzu
5. İstasyon	3. Süs Havuzu
6. İstasyon	4. Süs Havuzu
7. İstasyon	5. Süs Havuzu
8. İstasyon	Dere
9. İstasyon	Ergene Nehri (Uzunköprü Ergene Köprüsü)
10. İstasyon	Ergene Nehri Kenarı Çeltik Tarlası (Uzunköprü)



### **3.2. Su Örneklerinin Alınması**

Her istasyondan 1 lt'lik steril sodyum tiyosülfatlı plastik (polipropilen) şişeye, 250 ml'lik steril sodyum tiyosülfatsız plastik (PP) şişeye ve 4 adet 50 ml'lik steril plastik Falkon tüpüne su örneği alındı. 1 lt'lik steril sodyum tiyosülfatlı plastik (PP) şişe, su örneklerinin membran filtrasyon yöntemiyle analizi için alındı. Sodyum tiyosülfat sudaki serbest kloru (varsa) bağladığından aradığımız bakterilerin analiz yapana kadar şişenin içindeki serbest klordan etkilenmesini önlemek için konuldu. Özellikle şehir şebeke suyuyla beslenen süs havuzlarının suyunda serbest klor olabileceği öngörülerek bu uygulamaya gidildi. 250 ml'lik steril sodyum tiyosülfatsız plastik (PP) şişe, laboratuarda suyun serbest klor ve pH'ın ölçümü için alındı. 4 adet 50 ml'lik steril plastik Falkon tüpü de moleküler analizler için alındı.

Su numunesi alınırken dışarıdan kontaminasyonu önlemek için ellere eldiven giyilip alüminyum folyo ile sarılmış steril şişelerin paketi açıldı. Örnek alınırken önce Falkon tüplerinin kapakları dikkatlice açılıp dört tüpü aynı anda su kenarında en uygun noktadan tüplerin ağız kısmı aşağıya gelecek şekilde 50 cm içeriye ve 30 cm derine batırıldı. Önce 45 derece açığa getirilip daha sonra ağızları yukarıya getirilerek tüplerin ağızları dikkatlice kapatıldı. Akıntılı bölgelerden 45 derece açı akıntıya karşı gelecek şekilde örnek alındı. Aynı şekilde 1 lt ve en son 250 ml şişelere de numuneler alındı. Numuneler alındıktan sonra güneş ışınlarından korunmak ve soğuk zincirde laboratuara ulaştırmak için buz akülü saklama kabına konuldu. Ayrıca her istasyondan numune aldıktan sonra su sıcaklığı, hava durumu, havanın sıcaklığı ve nem oranı ölçülerek kaydedildi. Bütün su numuneleri aynı günde toplam 5 saat içerisinde alındı ve hiç bekletmeden membran filtrasyon yöntemiyle istenilen parametreler doğrultusunda ilk ekimleri yapıldı. Falkon tüpleri moleküler çalışmalar için -20<sup>0</sup>C'de derin dondurucuya konuldu.

### **3.3. Örneklerin Membran Filtrasyon Yöntemiyle Çalışılması**

#### **3.3.1. Kullanılan Ekipman**

Membran filtrasyon sistemi, 36±2°C'ye ayarlanabilen inkübatör, 22±2°C'ye ayarlanabilen soğutmalı inkübatör, 45±1°C'ye ayarlanabilen su banyosu, otoklav, sterilizatör, deiyonize su cihazı, 3-3,5 ml'ye ayarlanabilen dozajlı şırınga, buzdolabı,

-20°C'ye ayarlanabilen dondurucu dolap, hassas terazi, manyetik karıştırıcı ısıtıcı, koloni sayacı, Bunzen beki, pH Metre, serbest klor ölçümü için komparatör, petri kabı (90mm ve 60 mm çaplı), 1 ml ve/veya 10 ml'lik pipetler, deney tüpleri, öze, anaerop ortam sağlayıcı kavanoz, mezür (100 ml, 250 ml, 500 ml ve 1 lt), cam balon, deney tüplerini taşımak için uygun spor ve tel sepet.

### 3.3.2. Kullanılan Besiyerleri, Seyrelticiler ve Reaktifler

Kullanılan besiyerleri, seyrelticiler ve reaktifler sularda çalışılan parametrelere göre değişmektedir. Bu besiyerleri/reaktifleri hangileri olduğu uygulanacak standartta (TS EN ISO) belirtilmektedir. Membran filtrasyon tekniği kullanılan toplam koloni (jerm) ve *Aeromonas* sp. parametrelerinin araştırılması ve sayımı için bir standart uygulanmadı.

*E. coli* ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı için TS EN ISO 9308-1 (Nisan 2004) standardı uygulandı [36].

Fekal enterokokların araştırılması ve sayımı için TS EN ISO 7899-2 (Nisan 2002) standardı uygulandı [37].

Sülfid indirgeyen anaerop (*Clostridia*) bakterilerin araştırılması ve sayımı için TS 8020 EN ISO 26461-2 (Eylül 1997) standardı uygulandı [38].

Toplam koloni sayımı için Maya özütü kullanıma hazır pet besiyeri kullanıldı. Maya özütü besiyerinin içeriği; bir litreye 6 gr tripton ve 3 gr susuz maya ekstraktı olacak şekilde ayarlanmıştır.

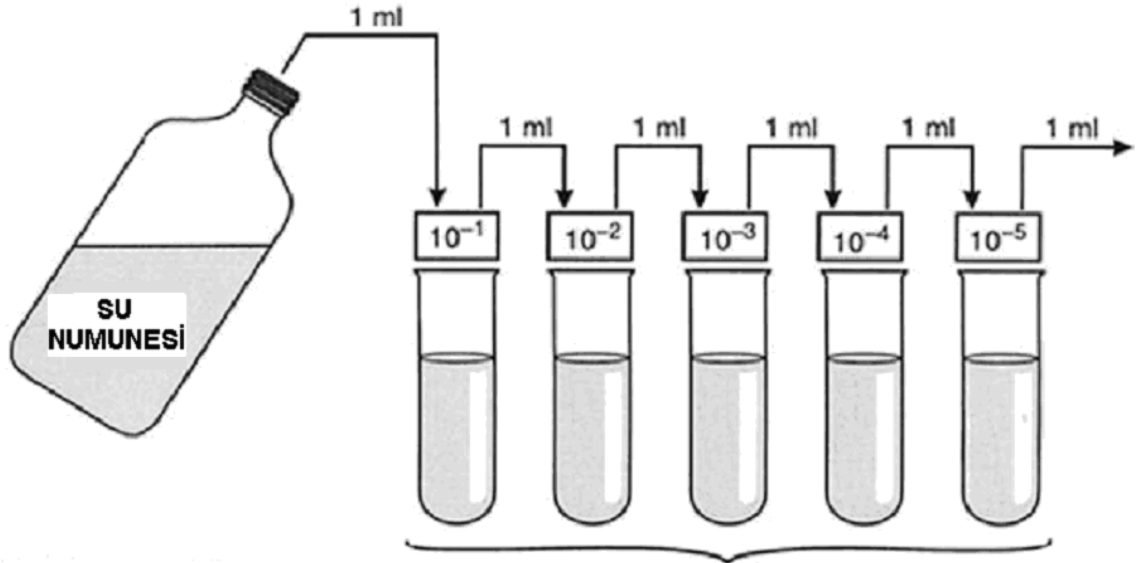
*Aeromonas* cinsinin araştırılması ve sayımı için *Aeromonas* Selektif Agar ve bu besiyerine ait katkısı kullanılmıştır. *Aeromonas* Selektif Agar içeriği; bir litrede 5 gr triptoz, 2 gr yeast extract, 11,4 gr dextrin, 3 gr sodyum klorür, 2 gr potasyum klorür, 0,1 gr magnezyum sülfat, 0,06 gr ferric chloride, 0,1 gr sodyum deoxycolate, 0,08 gr bromtimol mavisi ve 13 gr agar. Besiyerine ait özel katkının bir flakonunda 10 ml steril distile suyla hazırlanmak üzere 10 mg Ampisilin içerir.

### 3.3.3. Örneklerin Çalışılması

Önce kullanılacak bütün besiyerleri hazır hale getirildi ve üzerlerine ekilecek örneklerin isimleri yazıldı. Kullanılan kurutulmuş pet besiyerlerini hazırlamak için dozajlı şırınganın ucuna takılan 0.2 µm por çapındaki hepa filtre ile deiyonize su steril

edilerek 3-3,5 ml petrilere konuldu. Membran filtrasyonla çalışmak üzere membran filtre sistemi hazır hale getirildi. Ek olarak yüzeysel suların kaba kirliliğini almak için membran filtrasyon sistemine ön filtre yerleştirildi.

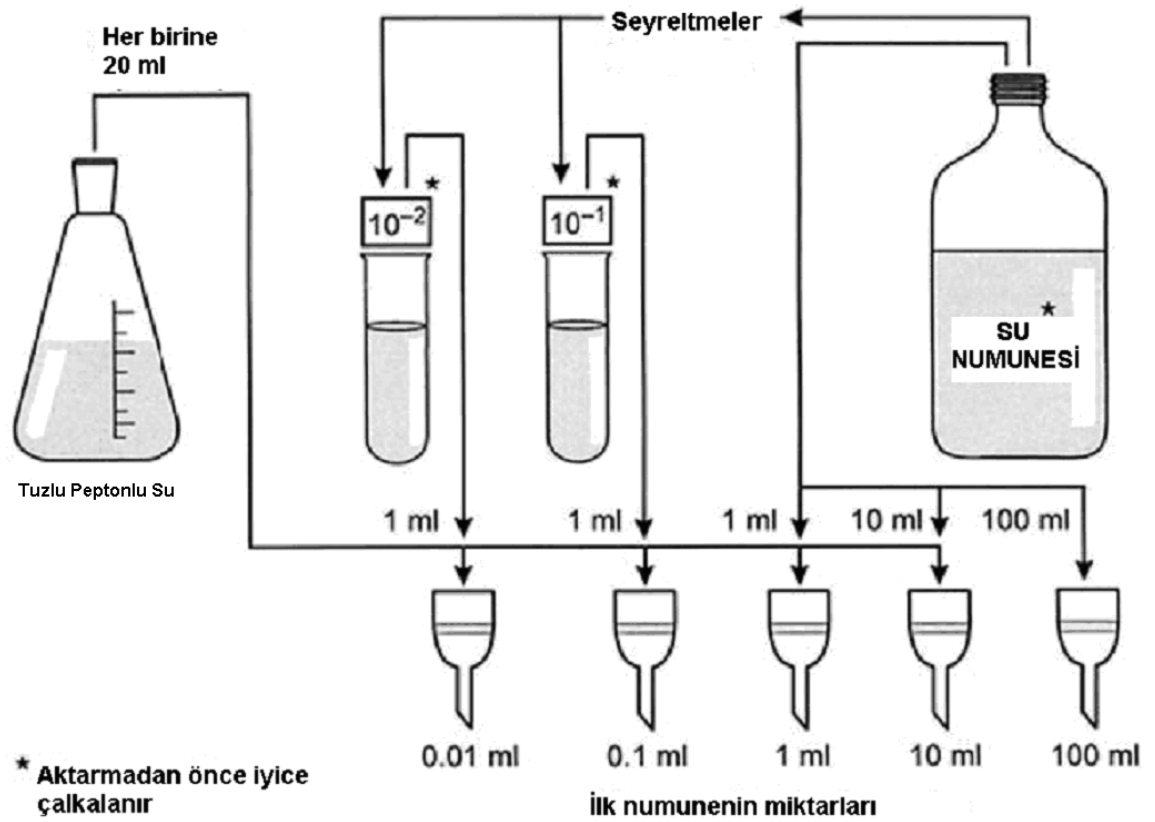
*E. coli* ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı için, bir litrelik sodyum tiyosülfatlı plastik şişeler iyice çalkalandıktan sonra 100 ml su örneği önce 8 µm por çapındaki ön filtreden, daha sonra 0.45 µm por çapındaki membran filtreden süzüldü. Membran filtre altta hiçbir hava kabarcığı kalmayacak şekilde ve ters çevrilmeden TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerine yerleştirildi. İşlem, kirli sularda istenmeyen üremenin engellenmesi ve doğru sayı tespit etmek amacıyla 44±0.5°C’de inkübe edilecek diğer petri için tekrarlandı. Bu şekilde hazırlanmış petrilere biri 21±3 saat boyunca 36±2°C sıcaklıkta diğeri 21±3 saat boyunca 44±0.5°C sıcaklıkta inkübe edildi. Deneyin hassasiyetini arttırmak için süre 44±4 saate uzatılıp ikinci okuma işlemi gerçekleştirildi. Doğrulaması yapılacak kolonilerin rengi dikkate alındı. Böylece, membran altındaki besiyerinde sarı bir renk oluşturan koloniler olması halinde, doğrulanacak koloniler sarı ve kırmızı-turuncu koloniler oldu. Eğer petrideki şüpheli koloni sayısı ya da istenmeyen kolonilerin sayısı 100’den fazla ise koloniler sayılabilecek duruma gelene kadar seyreltme yapılarak işlem tekrarlandı. Seyreltme işlemi, tuzlu peptonlu su kullanarak su örneğinden deney tüplerinde bir seri seyreltme hazırlandı. Her bir su örneğinin hangi seyreltme faktörünün kullanılacağı ilk ekimden sonraki çıkan sonuca göre karar verildi. Seyreltmeden sonraki ekimlerden sayılabilecek en az seyreltilmiş faktör dikkate alındı. Ayrıca seyreltilmiş örneklerden ekim yaparken mikroorganizmaların membran üzerine eşit dağılabilmesi için filtre sistemindeki hunilere 20 ml tuzlu peptonlu su ilave edildi.



Seyreltmeler yapıldıktan sonra tüpler çalkalanır

9 ml Tuzlu Peptonlu Su İçeren Tüpler

Şekil 3.1. Seyreltme serilerinin hazırlanması [5].



Şekil 3.2. Seyreltmelerden yapılan membran filtrasyon işlemi [5].

Doğrulama ve sayım için ileri ekimler öncelikli olarak  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edilmiş petrilere yapıldı. Eğer  $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edilmiş petri üzerinde daha fazla sayıda tipik koloni var ise  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  ve  $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edilmiş petrilere tipik kolonileri doğrulandı.

İleri ekimler  $44\pm 4$  saatlik inkübasyondan sonra yapıldı. Ancak  $21\pm 3$  saat inkübasyondan sonra membranlar şüpheli kolonilerle birlikte çok sayıda tipik olmayan koloni içerenlerin ekimleri bu safhada yapıldı. Şüpheli kolonilerin sayısı 10'un üzerinde ise 10, şüpheli kolonilerin sayısı 10'un altında ise tüm şüpheli koloniler ileri doğrulamaya alındı. Oksidaz testi için şüpheli koloni öze ile alınarak önce TSA üzerine sonra Triptofanlı sıvı besiyerine ekildi (10 şüpheli koloni için tek petri 10'a bölünerek kullanıldı) ve  $21\pm 2$  saat boyunca  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edildi. Bu süre sonunda hazır kağıt şeritler kullanılarak TSA besiyerinden oksidaz testine bakıldı (30 sn içinde koyu mavi-mor rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi. Koliform bakteriler oksidaz negatiftir ve kağıt üzerinde renklenme olmaz). Oksidaz (-) olan kolonilere Triptofanlı sıvı besiyerine Kovacs reaktifinden 0,2-0,3 ml damlatılarak indol oluşturup oluşturmadığına bakıldı.

Sayılmış ve doğrulanmış karakteristik koloni sayısına bakılarak, filtre edilmiş hacmin içerisindeki toplam koliform, *E.coli* sayısı "kob" olarak ifade edildi ve seyreltilmiş numunelerde kesin sonuç seyreltme faktörüyle çarpılarak verildi.

Enterokoklarının araştırılması ve sayımındaki başlangıç ekimi ile seyreltmeler *E. coli* ve Koliform bakterilerdeki gibi çalışıldı. Kullanılan besiyeri Slanetz-Bartley ped besiyeri. Bu şekilde hazırlanmış petrilere  $44\pm 4$  saat boyunca  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edildi. Merkezi veya etrafı kırmızı, mor veya pembe renkte olan bütün bombeli koloniler muhtemel enterokok olarak kabul edildi. Doğrulama için Slanetz-Bartley pet besiyerinden pens yardımı ile membran filtre ters çevrilmeden Safra Eskülin Azid Agar (1 saat boyunca  $44^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta önceden ısıtılmış) üzerine konuldu ve 2 saat boyunca  $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edildi. Koloniyi çevreleyen ortamda ten renginden siyah renge kadar değişen renkler oluşturan bütün tipik kolonilerin pozitif olduğu kabul edildi ve bunlar bağırsak enterokokları olarak sayıldı.

Sayılmış ve doğrulanmış karakteristik koloni sayısına bakılarak, filtre edilmiş hacmin içerisindeki bağırsak enterokokları sayısı "kob" olarak ifade edildi ve seyreltilmiş numunelerde kesin sonuç seyreltme faktörüyle çarpılarak verildi.

Sülfite indirgeyen anaerob bakterilerin (*Clostridia*) araştırılması ve sayımındaki başlangıç ekimi ile seyretmeler *E. coli* ve Koliform bakterilerdeki gibi çalışıldı. Farklı olarak su örnekleri 0,2 µm por çaplı membran filtreden geçirildi ve ters çevrilerek boş bir petri kabına altında hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde konuldu. Daha sonra eritilmiş ve 50°C’de su banyosunda bekletilen Sülfite Demir Agar her örnek için 10 ml olacak şekilde petrilere döküldü (membranın üzeri tamamen kaplandı). Bu şekilde hazırlanmış petrilere anaerob jara yerleştirilerek 37±1°C sıcaklıkta inkübe edildi. 20±4 saat ve 44±4 saat’ten sonra incelendi. 24 saat sonunda yoğun üremesi olan petrilere inkübasyonu 48 saate uzatılmadı (süre uzadığında siyah haleler dağıldığından kolonileri saymak mümkün olmaz). Süre sonunda siyah hale ile çevrili bütün siyah koloniler okundu ve sayıldı.

Sayılmış ve doğrulanmış karakteristik koloni sayısına bakılarak, filtre edilmiş hacmin içerisindeki sülfite indirgeyen anaerob bakterilerin (*Clostridia*) sayısı “kob” olarak ifade edildi ve seyreltilmiş numunelerde kesin sonuç seyreltme faktörüyle çarpılarak verildi.

Toplam koloni (jerm) sayımında başlangıç ekimi ile seyretmeler *E. coli* ve Koliform bakterilerdeki gibi çalışıldı. Farklı olarak su örneği başlangıçta 100 ml yerine 1 ml ekildi. Ekim 1 ml olduğu için membran filtre sistemindeki hunilere 20 ml tuzlu peptolu su konuldu. Kullanılan besiyeri maya özütü pet besiyeridir. Toplam koloni sayımı için, 68±4 saat boyunca 22±2°C sıcaklıkta ve 44±4 saat boyunca 36±2 °C sıcaklıkta inkübe etmek üzere iki petriye ekim yapıldı. İnkübasyondan sonra petrilere incelenerek gözle görülen her bir koloni sayıldı. Sayılmış koloni sayısına bakılarak, 1 ml içerisindeki toplam koloni sayısı “kob” olarak ifade edildi ve seyreltilmiş örneklerde kesin sonuç seyreltme faktörüyle çarpılarak verildi.

*Aeromonas* cinsinin araştırılması, sayımı ve seyreltmeler için *E. coli* ve Koliform bakterilerdeki gibi çalışıldı. Kullanılan besiyeri *Aeromonas* Selektif Agar besiyeri. 24±2 saat boyunca 36±1 °C sıcaklıkta inkübe edildikten sonra tipik olarak çevresi mor sarı büyük koloniler *Aeromonas sp.* olarak okundu ve sayıldı. *Aeromonas* cinsi bakterilerin sayımı “kob” olarak ifade edildi ve seyreltilmiş numunelerde kesin sonuç seyreltme faktörüyle çarpılarak verildi.

### 3.4. Örneklerin Gerçek Zamanlı PZR (Q-PCR) Yöntemiyle Çalışılması

#### 3.4.1. Kullanılan Ekipman

Gerçek zamanlı PCR cihazı, 3000 rpm'ye ayarlanabilen homojenizatör, 14000 rpm'ye ayarlanabilen mikrosantrifüj cihazı, 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl hacim kapasiteli pipet, 2 ml santrifüj tüpleriyle uyumlu olan ve 95°C'ye çıkabilen ısıtıcı blok.

#### 3.4.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Bileşenler

Toplama tüpü, DNA kolonu, parçalama tamponu (%2 CTAB – hexadecyl trimethyl ammonium bromide-, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl), bağlama tamponu, yıkama tamponu, çözücü tampon, ≥%99 v/v izopropanol, ≥%99 v/v etanol, her bir bakteri türü ve/veya patojenik tipi için primerler, 2 ml hacimli nükleaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüpü, 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl hacim kapasiteli nükleaz içermeyen steril pipet ucu ve pipet kutusu.

#### 3.4.3. Örneklerin Çalışılması

##### 3.4.3.1. DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy Bakteriyel DNA İzolasyon kiti kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki gibidir:

- 1- Bir mikrofüj tüpüne 600 µl parçalama tamponu eklenmiştir. Zenginleştirme yapılan numunelerde katı besiyerinden alınan yaklaşık 200 mg mikrobiyal sürüntü numunesi tamponun içine bırakılmıştır. Zenginleştirme yapılmayan su numunelerinde, 2 ml numune 14000 rpm'de 4 dk santrifüj edilmiş, üst sıvı atılmıştır.
- 2- Numunenin homojenizatörde 2dk, 3000 rpm'de homojenizasyonundan sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
- 3- Tüp 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar bağlama tamponu (6.75M guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-HCl pH 8.0) eklenmiş ve homojenizatörle karıştırılmıştır.
- 4- Karışım DNA kolonuna eklenmiş, 14000 RPM de 1 dk santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.

- 5- Kolona 500 µl inhibitör eleme tamponu (5 M thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6, %40 EtOH) eklenmiş, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır.
- 6- Kolona 500 µl yıkama tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v etanol) eklenmiş, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa tekrarlanmıştır.
- 7- Kolun 14000 rpm'de 1 dk boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl çözücü tampon eklenmiş, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir.
- 8- Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır

#### **3.4.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (Q-PCR ya da Real-Time PCR)**

Gerçek zamanlı PZR için kullanılan primer çiftleri ve primerlerin referansları Tablo 3.2.'de verilmiştir. Bütün reaksiyonlarda Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyon 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0,1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x SybrGreen-I, 5 ng/µl kalıp DNA ve her bir primerden 0,5 µM içermektedir. Cihazda, Tablo 3.3.'te verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Gerçek zamanlı PZR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 60°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR verileri Roche Light Cycler Nano Software 3.2.'de analiz edilmiştir. Eşik döngü sayısı (C<sub>T</sub>) 40'ın altında ve erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) Tablo 'de verilen aralıkta olan numuneler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Deneylerde steril deiyonize su numunesinden çıkarılan DNA izolatu negatif kontrol kalıbı olarak kullanılmıştır.



**Tablo 3.2.** Primer dizileri, hedefledikleri genler ve bakteriler.

Hedef Bakteriler	Primer İsmi	Primer Dizisi 5'-3'	Hedef Ürün Tm (°C)	Hedef Gen	Referans
EIEC	EIEC_215 F	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACA	81-82	virA (virulence of plasmid)	Fukushima vd. 2003
	EIEC_215 R	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC			
ETEC	ETEC_LT_218F	GCACACGGAGCTCCTCAGTC	81-82	LT (heat-labile enterotoxin)	
	ETEC_LT_218R	TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT			
	ETEC_ST_190F	GCTAATGTTGGCAATT TTTATTTCTGTA	76-77	ST (heat-stable enterotoxin)	
	ETEC_ST_190R	AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA			
EHEC	stx1_95F	GTCACAGTAACAAACC GTAACA	80-82	Shiga toxin 1	
	stx1_95R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA			
EHEC	stx2_108F	CGACC CCTCT TGAACATA	81-82	Shiga toxin 2	
	stx2_108 R	GATAG ACATC AAGCCCTCGT			
EAEC	EAEC_25 4F	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	78-79	aggR transcriptional activator for EAEC aggregative adherence fimbria I expression)	
	EAEC_25 4R	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			
<i>C.perfringens</i>	Cp_154F	GGTTCATTAATTGAAA CTGGTG	76-78	Enterotoxin	
	Cp_154R	AACGCCAATCATATAA ATTACAGC			
EPEC	EPEC_32 6F	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	85≤	bfpA (structural gene for the BFP of typical EPEC)	Aranda vd. 2007
	EPEC_32 6R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			
<i>L.interrogans</i>	LI_202F	GCGATTCAGTTTAATCCTGC	80-81	secY (preprotein translocase for Leptospira)	Ahmed vd. 2009
	LI_202R	GAGTTAGAGCTCAAATCTA			
<i>E.faecalis</i>	EFS_360 F	AACCTACCCATCAGAGGG	87-88	16S rRNA	Bartosch vd. 2004
	EFS_360 R	GACGTTCACTACTAACG			
<i>L.pneumophila</i>	Lpn-386F	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC	85-86	16S rRNA	Wellinghausen vd. 2001
	Lpn-386R	CCAACAGCTAGTTGACATCG		16S rRNA	

**Tablo 3.3.** Gerçek Zamanlı PZR Isı Döngüsü Programı.

<b>Tespit Formatı</b>		<b>Reaksiyon Hacmi</b>		
SYBR Green		20 µl		
<b>Programlar</b>				
<b>Program İsmi</b>	<b>Döngü Sayısı</b>	<b>Analiz Modu</b>		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	40	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
<b>Sıcaklık Hedefleri</b>				
<b>Hedef (°C)</b>	<b>Okuma Modu</b>	<b>Bekletme (hh:mm:ss)</b>	<b>Hız (°C/s)</b>	<b>Okuma (°C başına)</b>
<b>Ön İnkübasyon</b>				
95		00:10:00	4,8	–
<b>Çoğalma</b>				
95		00:00:20	4,8	–
55		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
<b>Erime Eğrisi</b>				
95		00:00:05	–	–
60		00:01:00	–	–
95	Sürekli	–	1	10
<b>Soğuma</b>				
40	Tek	00:00:10	2,5	–

## BÖLÜM 4

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Örneklerin Alındığı İstasyonlarla İlgili Bulgular

Su örneği alınan istasyonlarda yerinde ölçümler yapıldı. Örneklerin alındığı sırada hava durumu, havanın sıcaklığı ve nem oranı, suyun sıcaklığı, pH'ı ve serbest klor miktarı Tablo 4.1.'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Su örneği alınan istasyonlardan yapılan yerinde ölçümler.

İstasyon No:	Hava Durumu	Hava Sıcaklığı (°C)	Havanın Nem Oranı (%)	Su Sıcaklığı (°C)	Suyun pH'ı	Suyun Serbest Klor Miktarı (mg/L)
1	Açık	22.7	67	21.7	7.5	0
2	Açık	26	62	21.4	7.8	0
3	Açık	25.9	58	18.7	8	0.1
4	Açık	27.1	47	19	7.9	0
5	Açık	28.8	41	20.3	8	0.1
6	Açık	28.5	45	21.4	7.8	0
7	Açık	29.1	39	21.7	7.5	0.1
8	Açık	31.2	42	18.6	7.7	0
9	Açık	29.7	39	24.5	8.1	0
10	Açık	32.4	39	34.5	8.1	0

## 4.2. Membran Filtrasyon Tekniği ile Yapılan alışmaların Bulguları

Membran filtrasyon yöntemiyle toplam yedi parametre çalışıldı. Bunlar 22<sup>0</sup>C’de toplam koloni, 36<sup>0</sup>C’de toplam koloni, koliform grubu bakteriler, *E. coli*, fekal enterokoklar, sülfid indirgeyen anaerop *Clostridium*lar ve *Aeromonas* sp.

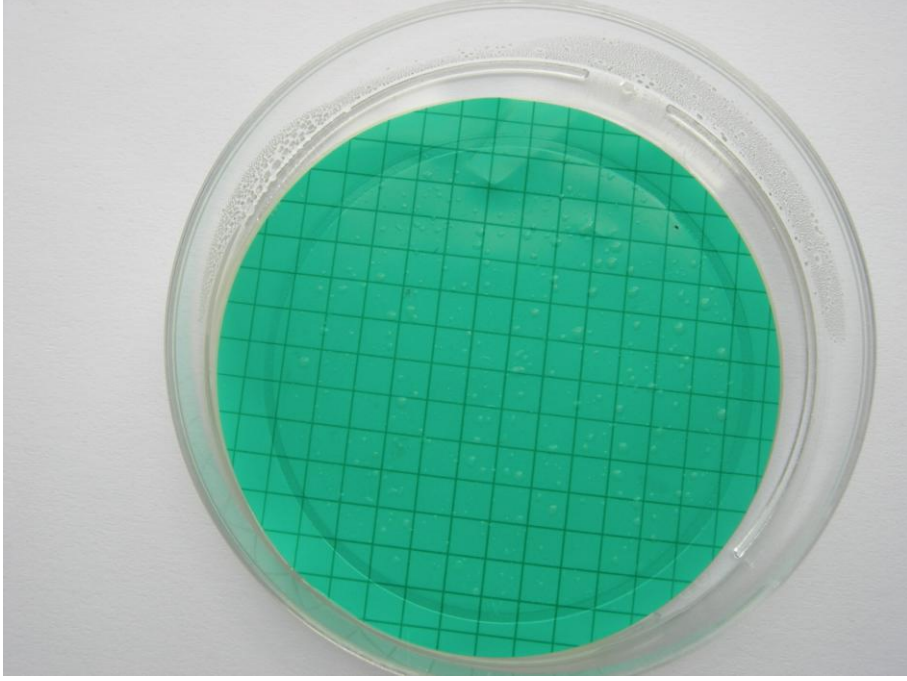
### 4.2.1. Toplam Koloni (Jerm) Sayısı

Her istasyondan toplam koloni sayısı (TKS) için 22<sup>0</sup>C’de 72 saat ve 36<sup>0</sup>C’de 48 saat süreyle 1 ml su örneği ekilerek inkübasyona bırakıldı. Ancak daha ilk 24 saatte her iki sıcaklıkta da petri kaplarında yoğun üreme görüldüğünden bütün numuneler seyreltilerek tekrar ekim yapıldı. Su örneklerinin seyreltme işlemi için peptonlu fizyolojik su ile şekil 3.1’deki gibi 10<sup>-5</sup>’e kadar seyreltme serisi hazırlandı. Seyreltilmiş numunelerin ekiminden sonra inkübasyon süreleri dolana kadar her 24 saatte koloni sayımı yapıldı. İnkübasyon süresi dolduktan sonra seyreltme faktörü en düşük olan petrilereki sayılabilir koloniler dikkate alındı. Buna göre sayılan koloniler seyreltme faktörüyle çarpılarak çıkan sonuçlar Tablo 4.2.’deki gibidir.

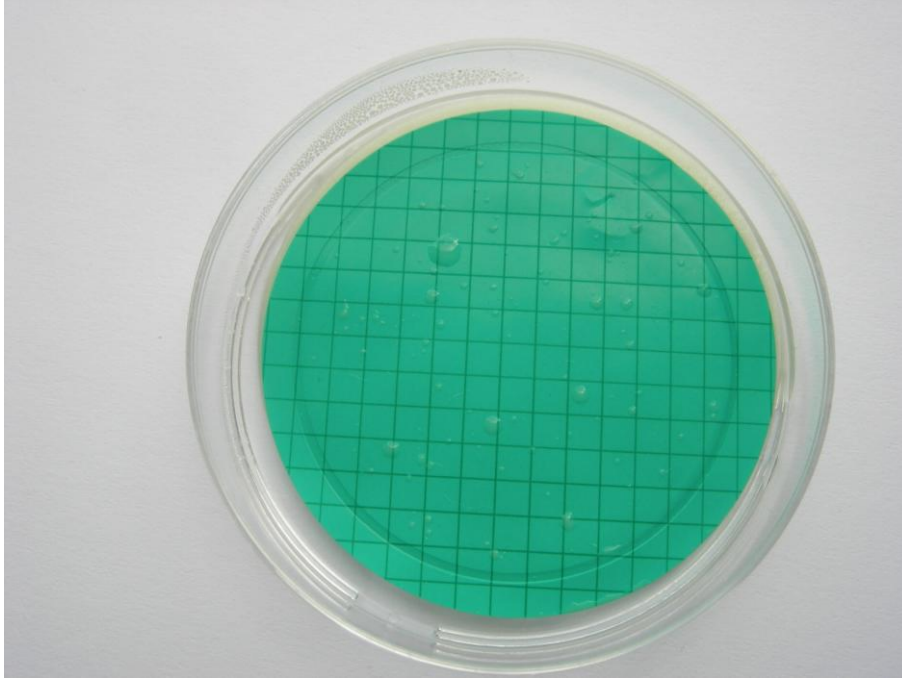
**Tablo 4.2.** 22<sup>0</sup>C’de ve 36<sup>0</sup>C’de seyreltme faktörüyle çarpılarak her bir istasyondaki toplam koloni (jerm) sayısı kob/ml olarak verilmiştir.

İstasyon No:	22 <sup>0</sup> C’de TKS kob/ml	36 <sup>0</sup> C’de TKS kob/ml
1	400	2000
2	150000	40000
3	30000	6000
4	80000	14000
5	40000	9000
6	100000	3000
7	600	5000
8	170000	200000
9	107000	250000
10	110000	620000

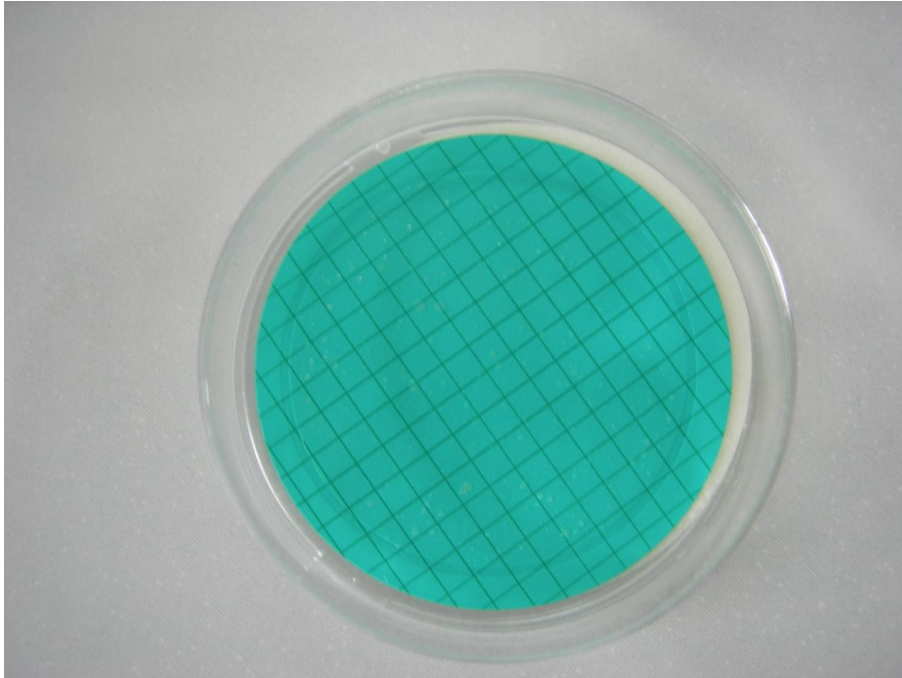
Toplam koloni (jerm) sayımı seçici olmayan maya özütü ped besiyerine ekildiğinden bakterilerle birlikte küf ve mayalar da üreyebilir. Farklı büyüklükte ve görünümde, yani heterojen yapıda bütün koloniler sayılmıştır. Koloniler çoğunlukla şeffaf renkte görülmektedir.



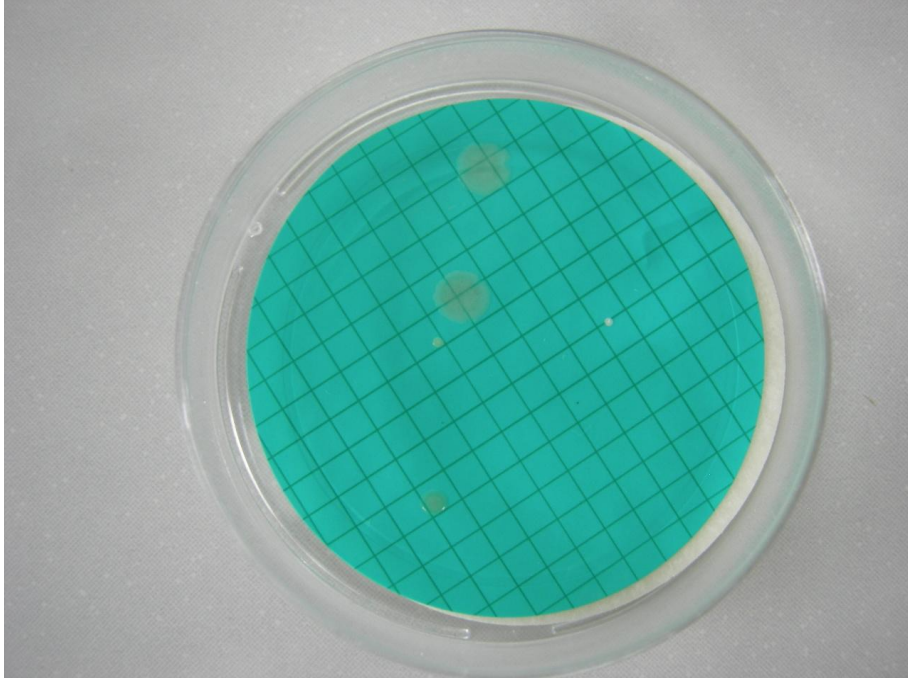
**Şekil 4.1.** 22<sup>0</sup>C’de maya özütü ped besiyerinde üreyen 100’den fazla koloni örneği. Görüntü 8 nolu istasyondaki 10<sup>-3</sup> ml’lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.2.** 22<sup>0</sup>C'de maya özütü ped besiyerinde farklı büyüklük ve görüntüdeki kolonilerden örnek. Görüntü 9 nolu istasyondaki 10<sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.3.** 36<sup>0</sup>C'de maya özütü ped besiyerinde görülen 100'den fazla koloni örneği. Görüntü 7 nolu istasyondaki 10<sup>-3</sup> ml'lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.4.** 36<sup>0</sup>C’de maya özütlü ped besiyerinde farklı büyüklük ve görüntüdeki az sayıda kolonilerden örnek. Görüntü 7 nolu istasyondaki 10<sup>-3</sup> ml’lik ekimden alınmıştır.

#### **4.2.2 Toplam Koliform ve *E. Coli* Sayısı**

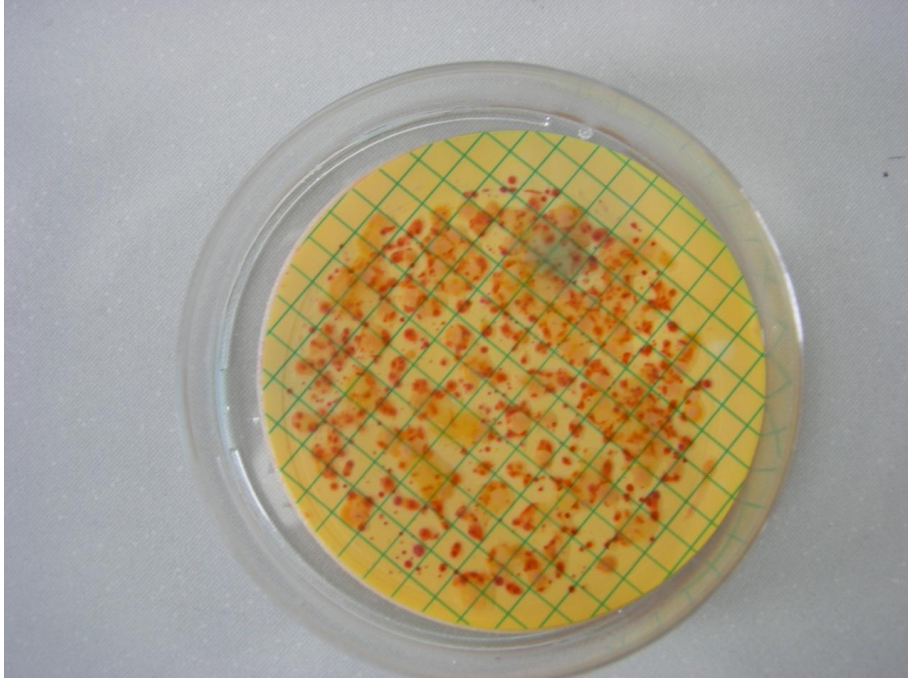
Her istasyondan toplam koliform ve *E. coli* araştırılması ve sayımı için öncelikle 100 ml ekim yapıldı. Deneyin hassasiyetini arttırmak amacıyla her istasyondan 100 ml 44°C’de de ekim yapıldı. 44°C’deki inkübasyon, istenmeyen Gram negatif başka türlerin üremesini engelleyip termotoleran (fekal) koliformların daha rahat üremesini sağlamak amacıyla yapıldı.

Özellikle ilk 24 saatte yoğun üreme görülen koloniler seyreltilerek tekrar ekim yapıldı. Toplam koliform ve *E. coli* sayımı için 10<sup>-4</sup>’e kadar seyreltme serileri hazırlandı. Koloni sayılarını hesaplariken şüpheli kolonilerin petri kabında sayılabildiği en küçük seyreltme faktöründeki sayı dikkate alınarak hesaplandı.

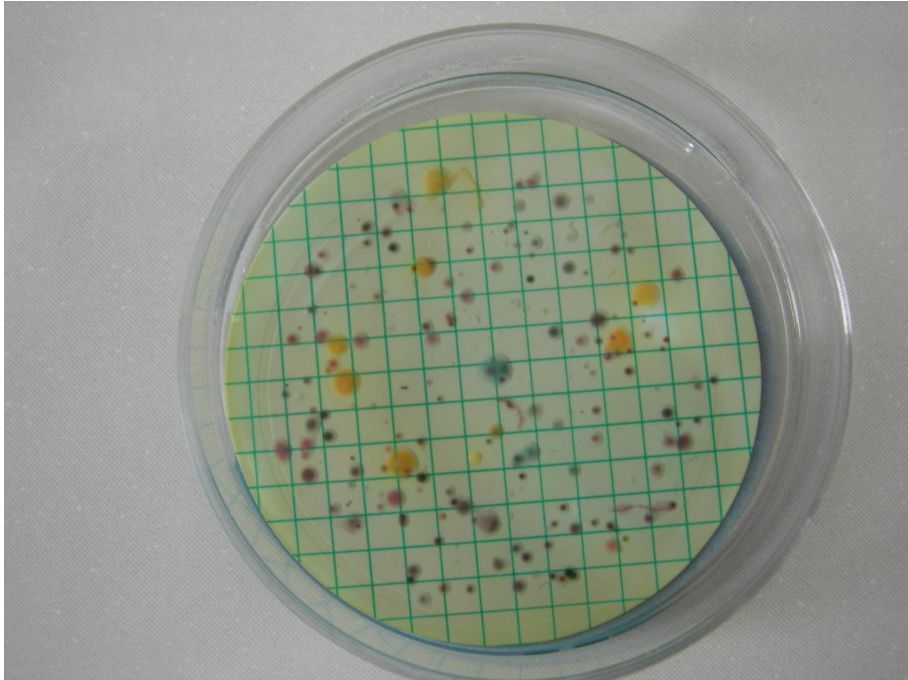
**Tablo 4.3.** İstasyonlardaki toplam koliform ve *E. coli* sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir.

İstasyon No:	Toplam Koliform kob/ 100 ml	<i>E. coli</i> kob/100 ml
1	1000	200
2	100000	60000
3	4000	800
4	2000	1000
5	1000	500
6	1000	600
7	3000	1000
8	14000000	10000000
9	2000000	1000000
10	40000	0

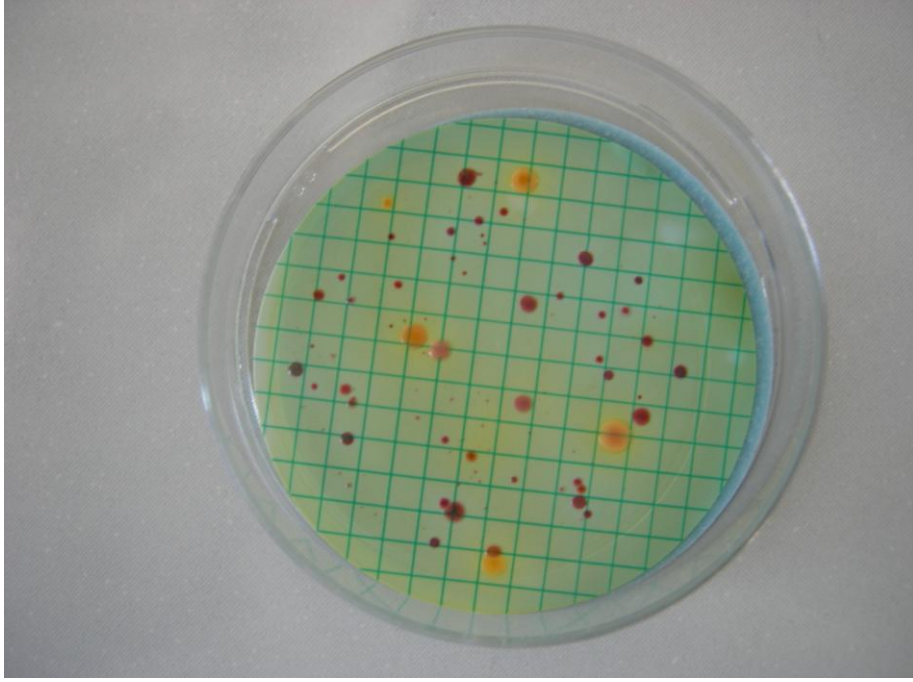




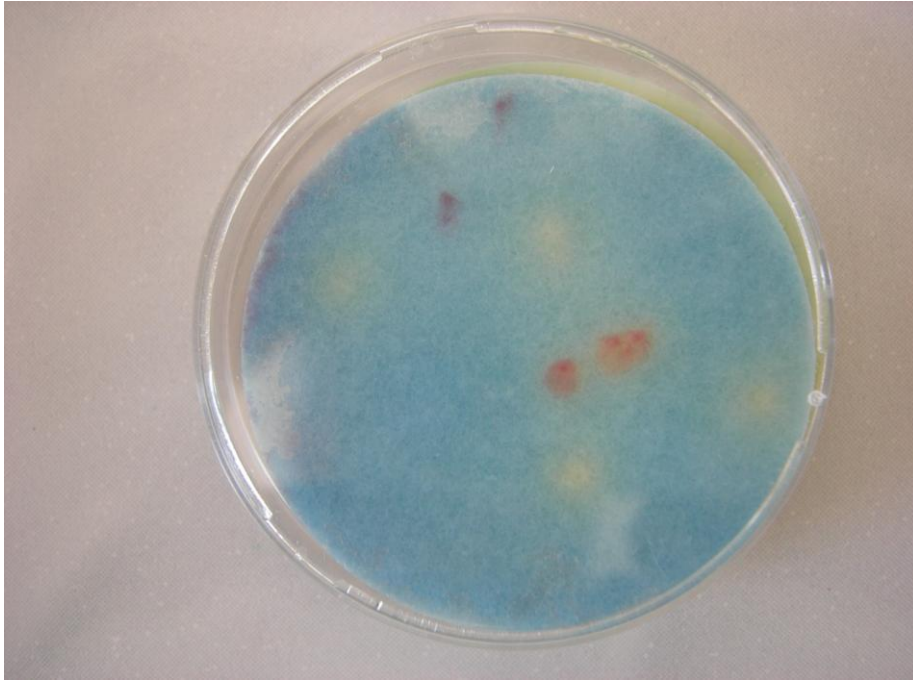
**Şekil 4.5.** TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerinde 36<sup>0</sup>C’de görülen 100’den fazla karışık koloni örneği. Sarı, turuncu ve kırmızı renkteki koloniler şüpheli kolonilerdir. Görüntü 8 nolu istasyondaki 10<sup>-3</sup> ml’lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.6.** TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerinde 36<sup>0</sup>C’de görülen birçok farklı renkte ve büyüklükte karışık koloni örneği. Sarı renkteki koloniler şüpheli kolonilerdir. Diğer renkteki koloniler şüpheli değildir. Görüntü 2 nolu istasyondaki 10<sup>-2</sup> ml’lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.7.** TTC-Tergitol laktozlu ped besiyerinde 36<sup>0</sup>C’de görülen az sayıdaki şüpheli sarı koloniler. Görüntü 1 nolu istasyondaki 1 ml’lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.8.** Şekil 4.7.’deki petri kabının alttan görünümü. Koliform bakteriler laktozu fermente ederek oluşan asidik ortam besiyerindeki bromtimol mavisini sarıya çevirmiştir.

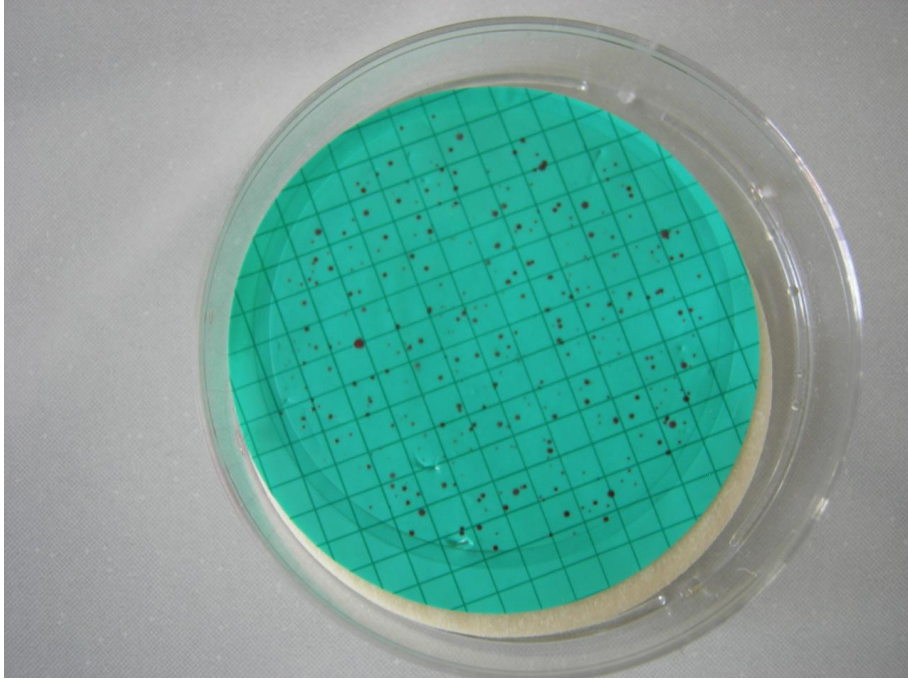
#### 4.2.3. Fekal Enterokok Sayısı

Her istasyondan fekal enterokok sayısı araştırılması ve sayımı için 36<sup>0</sup>C’de 48 saat süreyle 100 ml ekim yapıldı. Ekimden sonra geçen ilk 24 saatte yoğun üreme görülen örneklerden seyreltme serisi hazırlanarak ekim yapıldı.

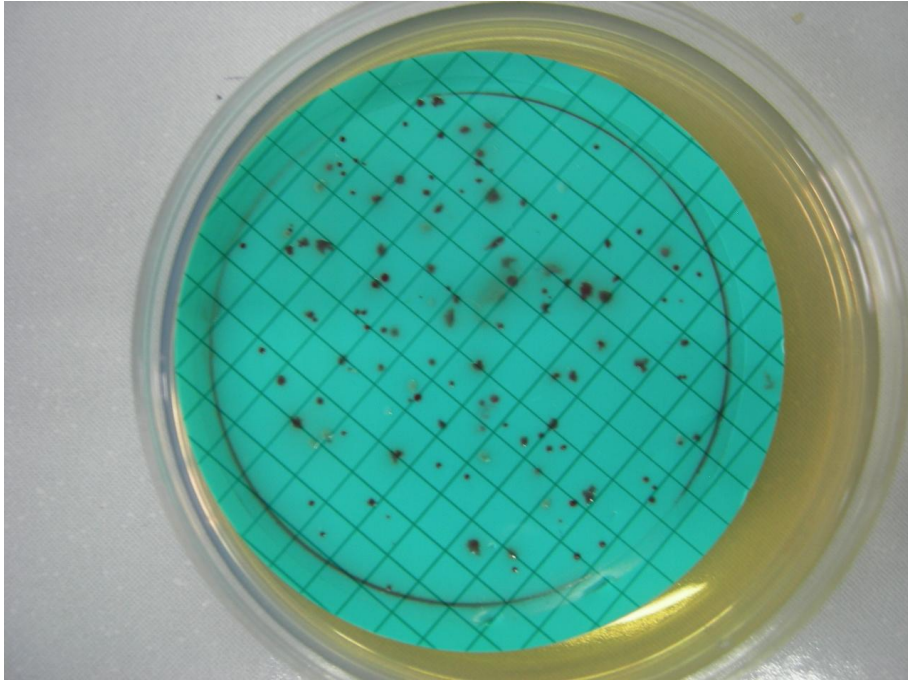
Fekal enterokok sayımı için 10<sup>-4</sup>e kadar seyreltme serileri hazırlandı. Koloni sayılarını hesaplarken şüpheli kolonilerin petri kabında sayılabildiği en küçük seyreltme faktöründeki sayı dikkate alınarak hesaplandı.

**Tablo 4.4.** İstasyonlardaki toplam fekal enterokok sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir.

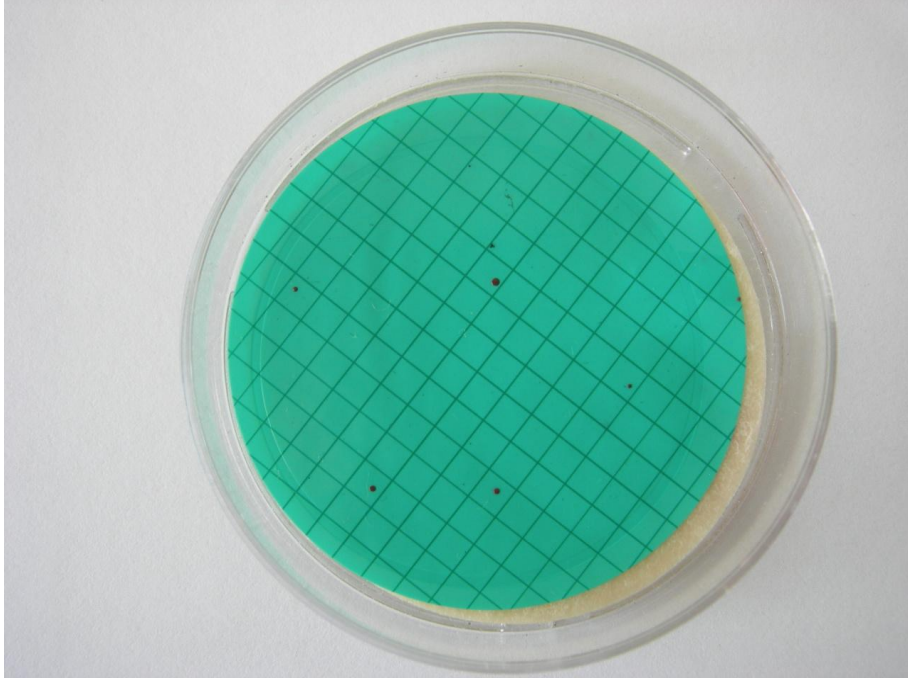
İstasyon No:	Fekal Enterokok kob/ 100 ml
1	900
2	50000
3	20000
4	20000
5	1000
6	1200
7	600
8	1600000
9	24000
10	27000



**Şekil 4.9.** Slanetz-Bartley (Azid) ped besiyerinde  $36^{\circ}\text{C}$ 'de görülen 100'den fazla şüpheli koloni örneği. Görüntü 6 nolu istasyondaki 10 ml'lik ekimden alınmıştır.



**Şekil 4.10.** Slanetz-Bartley (Azid) ped besiyerinden üreyen kolonilerle alınan membran  $44^{\circ}\text{C}$ 'de safra eskülin azid agarda 2 saat beklediğinde ten renginden siyah renge kadar değişen kolonilerden örnek.



**Şekil 4.11.** Slanetz-Bartley (Azid) ped besiyerinde tek tek görünen koloni örneği. Görüntü 2 nolu istasyondan  $10^{-2}$  seyreltmeden yapılan ekimden alınmıştır.

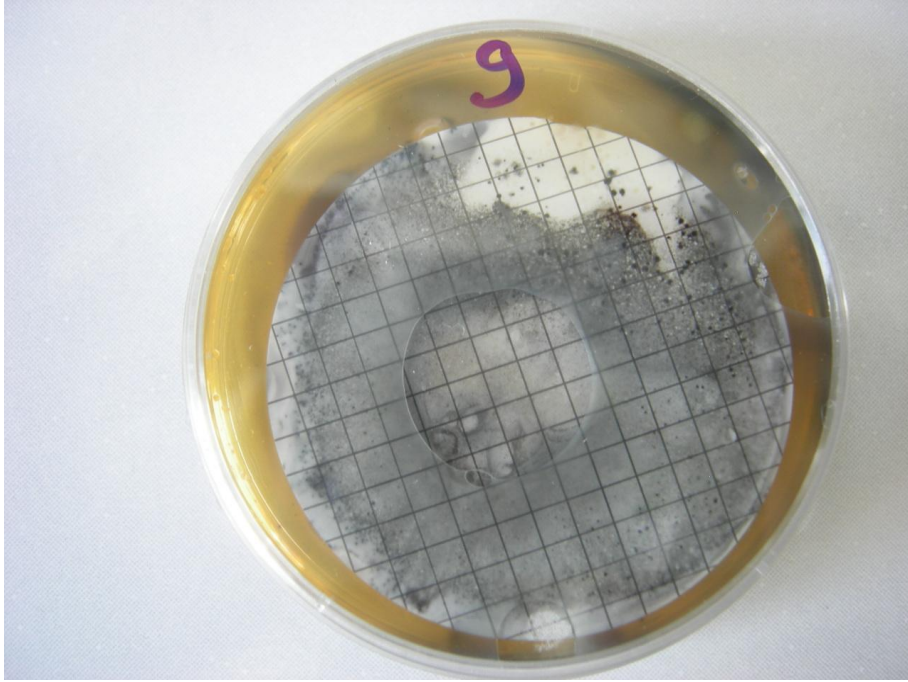
#### **4.2.4. Sülfid İndirgeyen Sporlu Anaerop *Clostridium*ların Sayısı**

Her istasyondan sülfid indirgeyen sporlu anaerop *Clostridium*ların sayımı için ekilen 100 ml su örneği  $36^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat süreyle anaerop kavanozda inkübasyona bırakıldı. Ekimden sonra geçen ilk 24 saatte sayılabilen petrilerdeki koloniler sayıldı, yoğun üreme görülen örneklerden  $10^{-3}$ 'e kadar seyreltme serisi hazırlanarak ekim yapıldı.

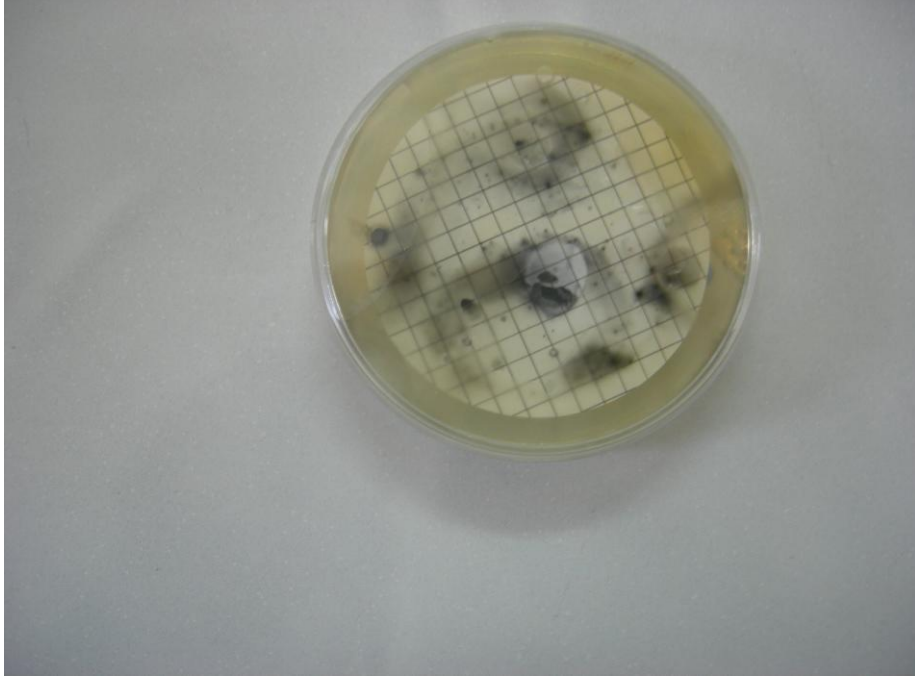
Koloni sayılarını hesaplarken kolonilerin petri kabında sayılabildiği en küçük seyreltme faktöründeki sayı dikkate alınarak hesaplandı. 3 ve 7 nolu istasyonlarda üreme görülmediğinden tekrar ekim yapıldı. Tekrar ekimde de üreme görülmedi.

**Tablo 4.5.** İstasyonlardaki toplam sülfid indirgeyen sporlu anaerop *Clostridium*ların sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir.

İstasyon No:	sülfid indirgeyen sporlu anaerop <i>Clostridium</i> lar kob/ 100 ml
1	1000
2	7000
3	0
4	2000
5	100
6	2000
7	0
8	100000
9	100000
10	15000



**Şekil 4.12.** Sülfid demir agarda 9 nolu istasyondan yapılan ekimde görülen yoğun siyah koloniler iç içe geçmiş.



**Şekil 4.13.** Sülfid demir agarda görülen sayılabilir siyah koloniler.

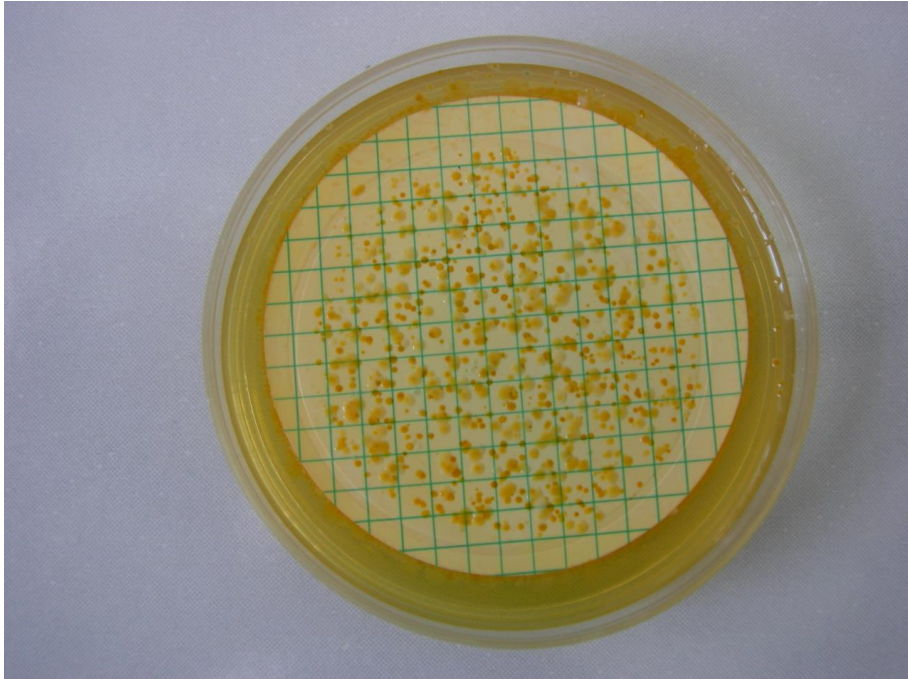
#### **4.2.5 *Aeromonas* sp. sayımı**

Her istasyondan *Aeromonas* sp. sayısı araştırılması ve sayımı için 36<sup>0</sup>C’de 24 saat süreyle 100 ml ekim yapıldı. Ekimden sonra geçen 24 saatte yoğun üreme görülen örneklerden 10<sup>-4</sup>’e kadar seyreltme serisi hazırlanarak ekim yapıldı.

Koloni sayılarını hesaplarken şüpheli kolonilerin petri kabında sayılabildiği en küçük seyreltme faktöründeki sayı dikkate alınarak hesaplandı. 2, 3 ve 4 nolu istasyonlarda üreme görülmediğinden tekrar ekim yapıldı. Tekrar ekimde de üreme görülmedi.

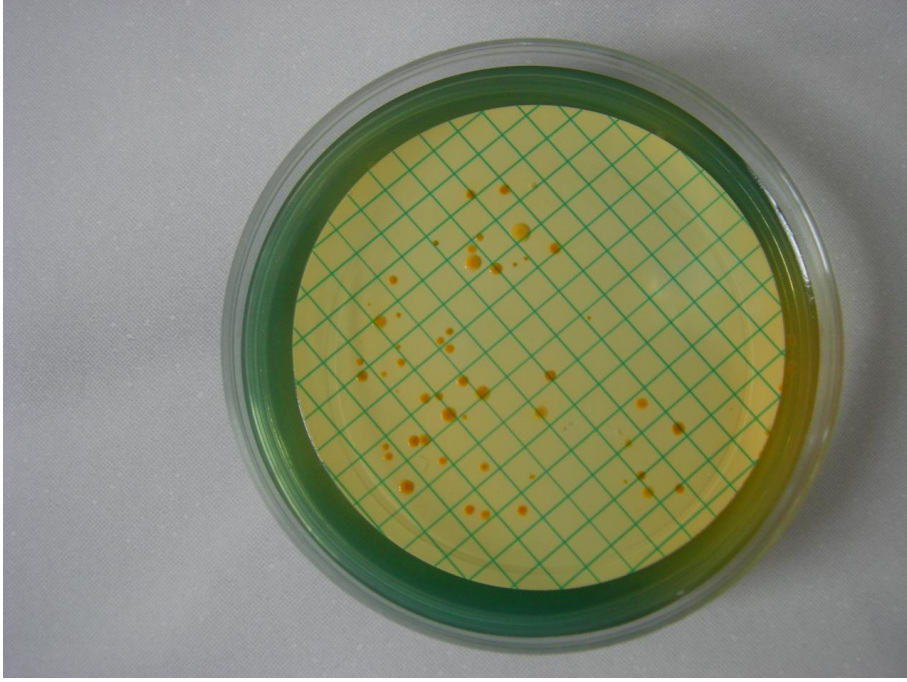
**Tablo 4.6.** İstasyonlardaki *Aeromonas* sp. sayıları kob/100 ml olarak verilmiştir.

İstasyon No:	<i>Aeromonas</i> sp. kob/ 100 ml
1	5500
2	500000
3	0
4	0
5	0
6	130000
7	70000
8	6500000
9	520000
10	3000000



**Şekil 4.14.** *Aeromonas* selektif agarda koloni sayısı 100'den fazla olan petri örneği. Görüntü 2 nolu istasyondaki  $10^{-2}$  ml'lik ekimden alınmıştır.





**Şekil 4.15.** Aeromonas selektif agarda daha az sayıda ve farklı büyüklükte görünen kolonilerden örnek. Görüntü 9 nolu istasyondan  $10^{-3}$  seyreltmeden yapılan ekimden alınmıştır.

**Tablo 4.7.** Membran filtrasyon yöntemiyle araştırılan ve sayılan bütün mikroorganizmalar.

stasyon No	22 <sup>0</sup> C'de TKS kob/ml	36 <sup>0</sup> C'de TKS kob/ml	Toplam Koliform kob/100ml	<i>E. coli</i> kob/100ml	Fekal Enterokok kob/100ml	Sülfit İndirgeyen Anaerop <i>Clostridium</i> lar kob/100ml	<i>Aeromonas</i> sp. kob/100ml
1	400	2000	1000	200	900	1000	5500
2	150000	40000	100000	60000	50000	7000	500000
3	30000	6000	4000	800	20000	0	0
4	80000	14000	2000	1000	20000	2000	0
5	40000	9000	1000	500	1000	100	0
6	100000	3000	1000	600	1200	2000	130000
7	600	5000	3000	1000	600	0	70000
8	170000	200000	14000000	10000000	1600000	100000	6500000
9	107000	250000	2000000	1000000	24000	100000	520000
10	110000	620000	40000	0	27000	15000	3000000

#### 4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Yapılan Çalışmaların Bulguları

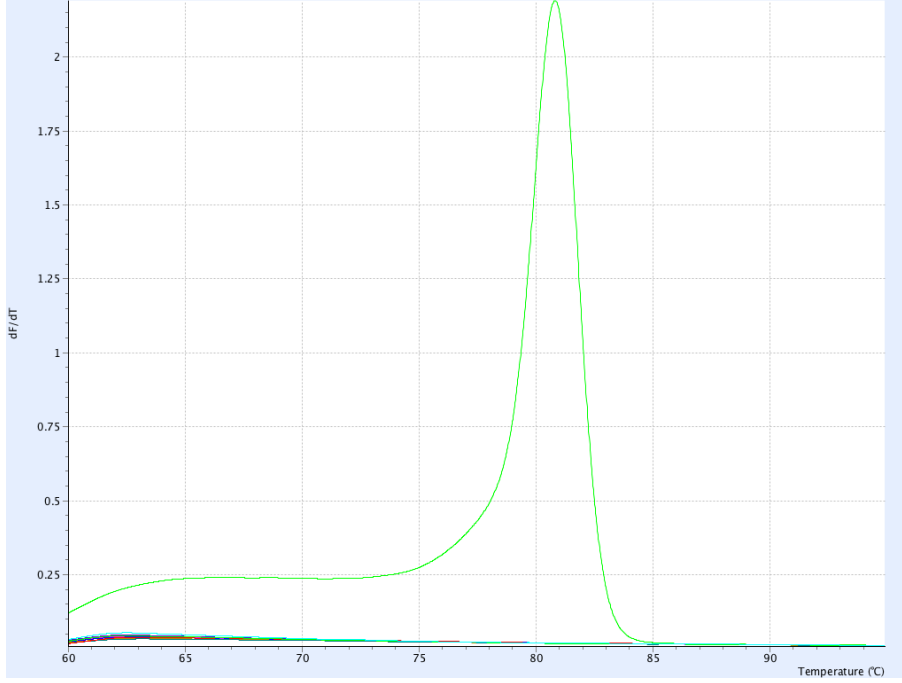
Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle toplam 9 parametre çalışıldı. Bunlar; *E. coli*'nin 5 patojenik tipi (EHEC, EPEC, ETEC, EAEC ve EIEC), *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila* ve *Leptospira interrogans*.

Eşik döngü sayısı (C<sub>T</sub>) 40'ın altında ve erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) Tablo 3.3.'de verilen aralıkta olan numuneler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Deneylerde steril deiyonize su numunesinden çıkarılan DNA izolatu negatif kontrol kalıbı olarak kullanılmıştır.

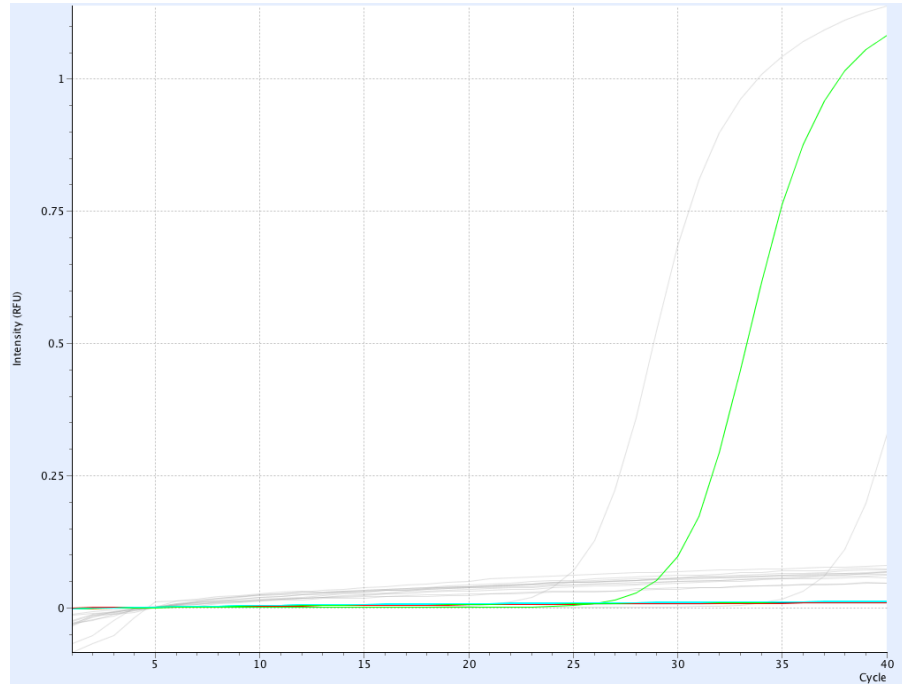
##### 4.2.1. EHEC (Enterohemorajik *Escherichia coli*) Tespiti

EHEC tespiti için iki farklı primer (EHEC STX1 ve EHEC STX2) kullanılmıştır. Önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon

yöntemiyle doğrulanan *E. coli* kolonileri TSA besiyerindeki zenginleştirilmiş kültürden çalışıldı. Yapılan çalışmada sadece 8 nolu istasyondan EHEC STX1 primeriyle TSA besiyerindeki kültürden tespit edildi.



**Şekil 4.16.** EHEC STX1 primeriyle kültürden erime eğrisi. Dikey eksendeki  $df/dt$ , yatay eksendeki sıcaklığın artışıyla değişen floresan oranını göstermektedir.



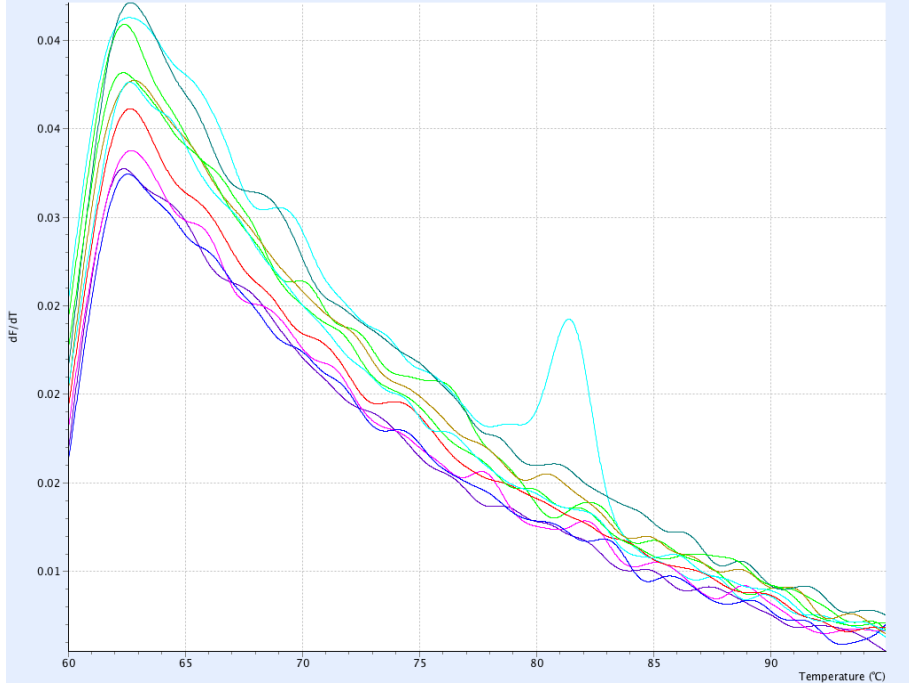
**Şekil 4.17.** EHEC STX1 primeriyle kültüründen çoğalma eğrisi. Dikey eksendeki RFU, yatay eksendeki döngü sayısı ile artan göreceli DNA miktarını göstermektedir.

**Tablo 4.8.** EHEC STX1'in su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

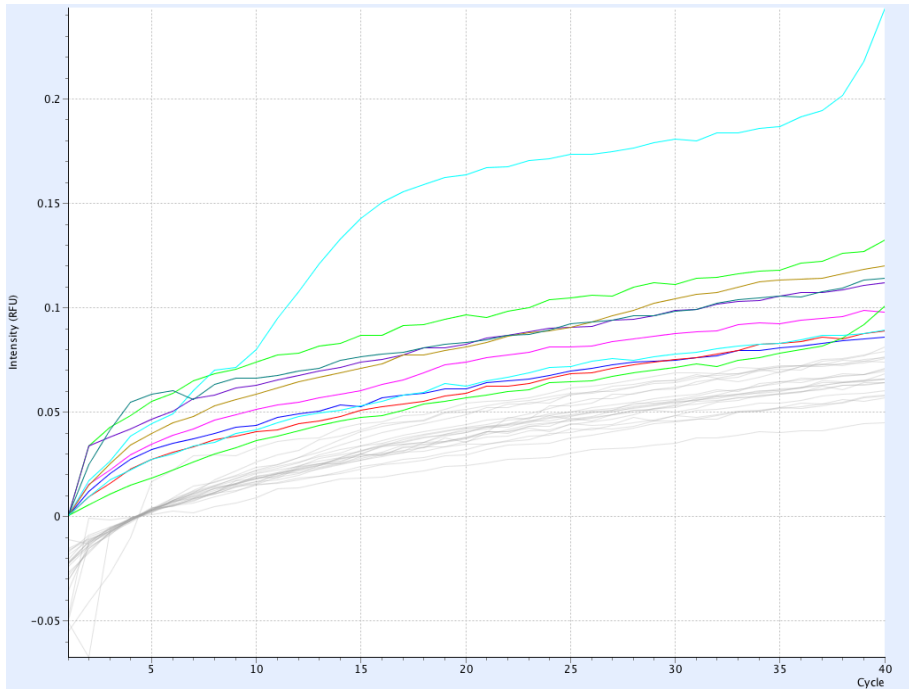
Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı C <sub>T</sub>	Erime Sıcaklığı T <sub>m</sub>	Sonuç
EHEC STX1	1	Su	0	71.942	Negatif
	2		0	71.844	Negatif
	3		0	71.844	Negatif
	4		0	71.844	Negatif
	5		0	71.844	Negatif
	6		0	71.844	Negatif
	7		0	71.841	Negatif
	8		0	71.841	Negatif
	9		0	71.841	Negatif
	10		0	71.841	Negatif
	Neg Kontrol	0	71.841	Negatif	
	1	Kültür	0	77.938	Negatif
	2		0	76.744	Negatif
	3		0	76.744	Negatif
	4		0	76.744	Negatif
	5		0	76.744	Negatif
	6		0	76.744	Negatif
	7		0	76.752	Negatif
	8		<b>29.375</b>	<b>80.819</b>	<b>Pozitif</b>
	9		0	76.752	Negatif
10	0		76.752	Negatif	
NegKontrol	0	0	Negatif		

#### 4.2.2. ETEC (Enterotoksijenik *Escherichia coli*) Tespiti

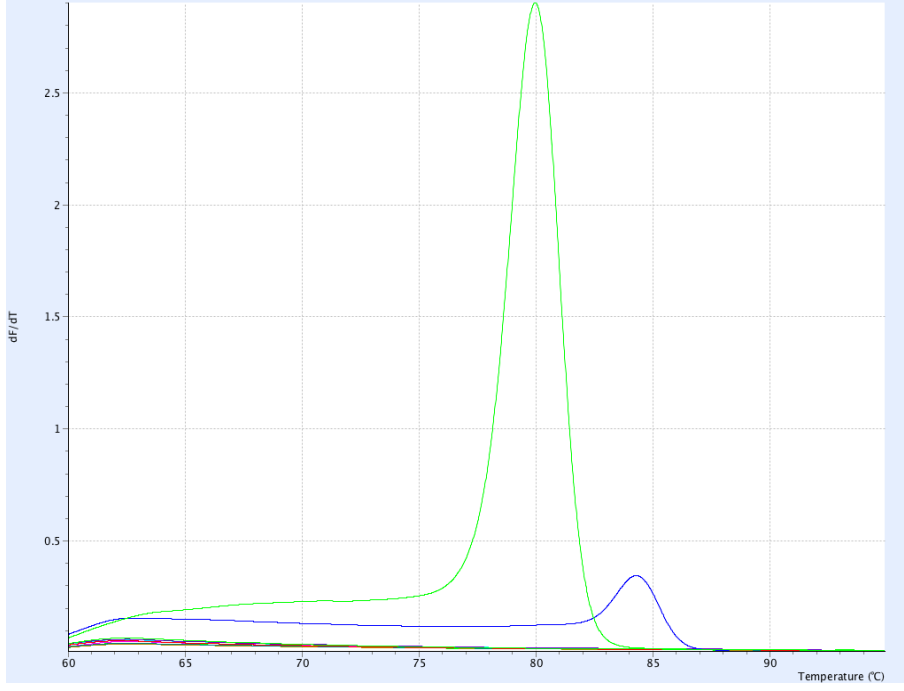
ETEC tespiti için iki farklı primer (ETEC LT ve ETEC ST) kullanılmıştır. Önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon yöntemiyle doğrulanan *E. coli* kolonilerinin TSA besiyerinde yapılan kültürden çalışıldı. Yapılan çalışmada 2 nolu istasyondan doğrudan su örneğinden ETEC LT tespit edildi. 9 nolu istasyondan da TSA besiyerindeki kültürden ETEC LT tespit edildi. ETEC ST primeriyle yapılan çalışmada pozitif örnek tespit edilmedi.



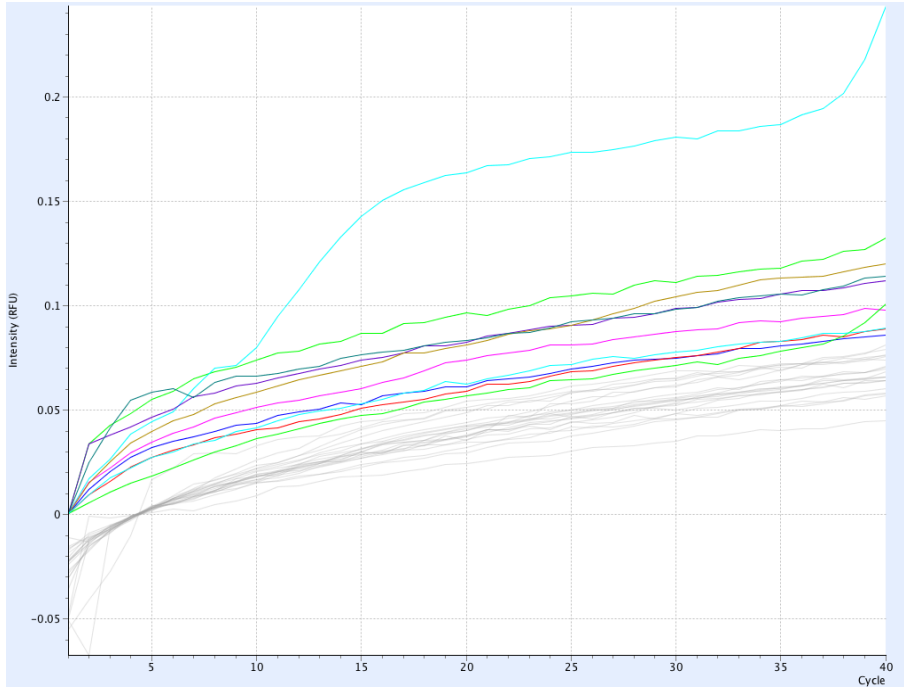
Şekil 4.18. ETEC LT doğrudan su örneğinden erime eğrisi.



Şekil 4.19. ETEC LT doğrudan su örneğinden çoğalma eğrisi.



Şekil 4.20. ETEC LT kültürden erime eğrisi.



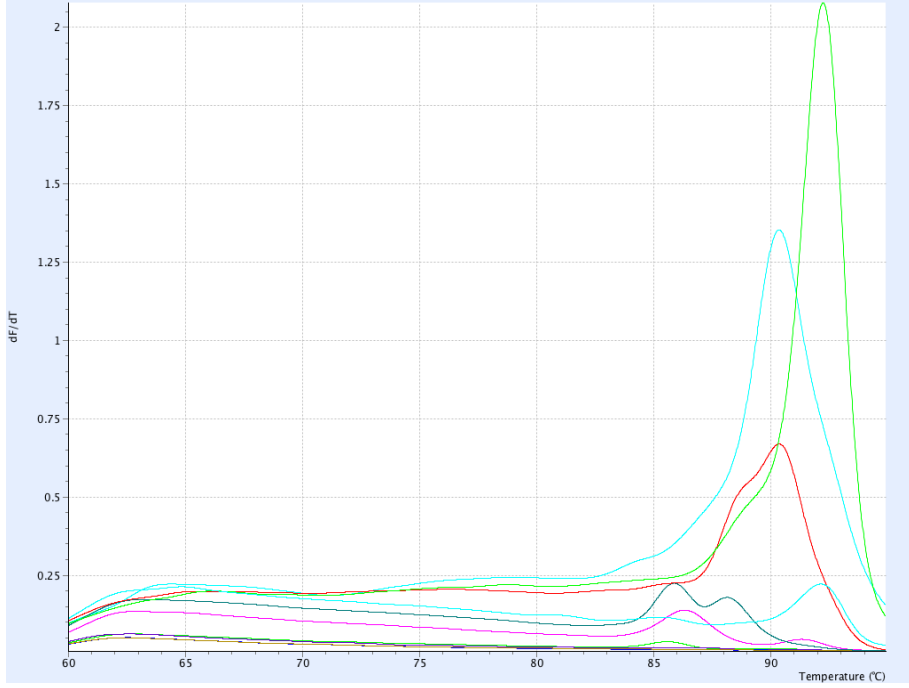
Şekil 4.21. ETEC LT kültürden çoğalma eğrisi.

**Tablo 4.9.** ETEC LT'nin su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

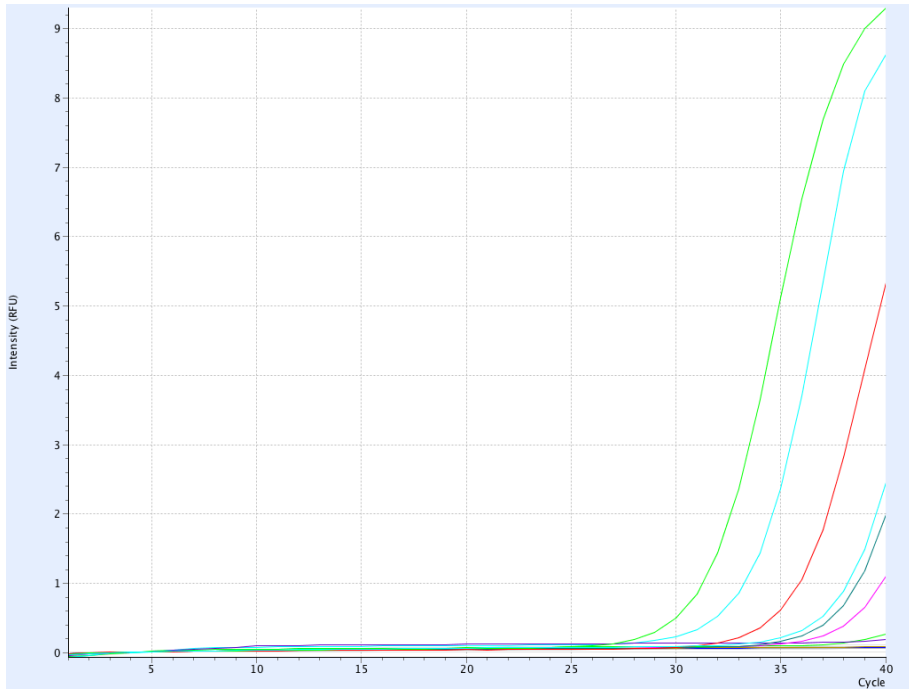
Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı C <sub>T</sub>	Erime Sıcaklığı T <sub>m</sub>	Sonuç
ETEC LT	1	Su	0	77.455	Negatif
	2		<b>6.354</b>	<b>81.386</b>	<b>Pozitif</b>
	3		0	77.455	Negatif
	4		0	77.651	Negatif
	5		0	77.455	Negatif
	6		0	77.455	Negatif
	7		0	77.457	Negatif
	8		0	77.457	Negatif
	9		0	77.457	Negatif
	10		0	77.457	Negatif
	NegKontrol		0	0	Negatif
	1	Kültür	0	75.017	Negatif
	2		0	75.017	Negatif
	3		0	75.017	Negatif
	4		0	75.017	Negatif
	5		37.133	84.287	Negatif
	6		0	75.017	Negatif
	7		0	75.017	Negatif
	8		0	75.017	Negatif
	9		<b>24.916</b>	<b>80</b>	<b>Pozitif</b>
	10		0	75.017	Negatif
	NegKontrol		0	0	Negatif

#### 4.2.3. EPEC (Enteropatojenik *Escherichia coli*) Tespiti

EPEC tespiti için tek primer kullanılmıştır. Önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon yöntemiyle doğrulanan *E. coli* kolonilerinin TSA besiyerinde yapılan kültürden çalışıldı. Yapılan çalışmada doğrudan su örneklerinden 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10 nolu istasyonlardan EPEC tespit edildi. TSA besiyerindeki kültürlerden yapılan çalışmada bütün istasyonlardan EPEC tespit edildi.

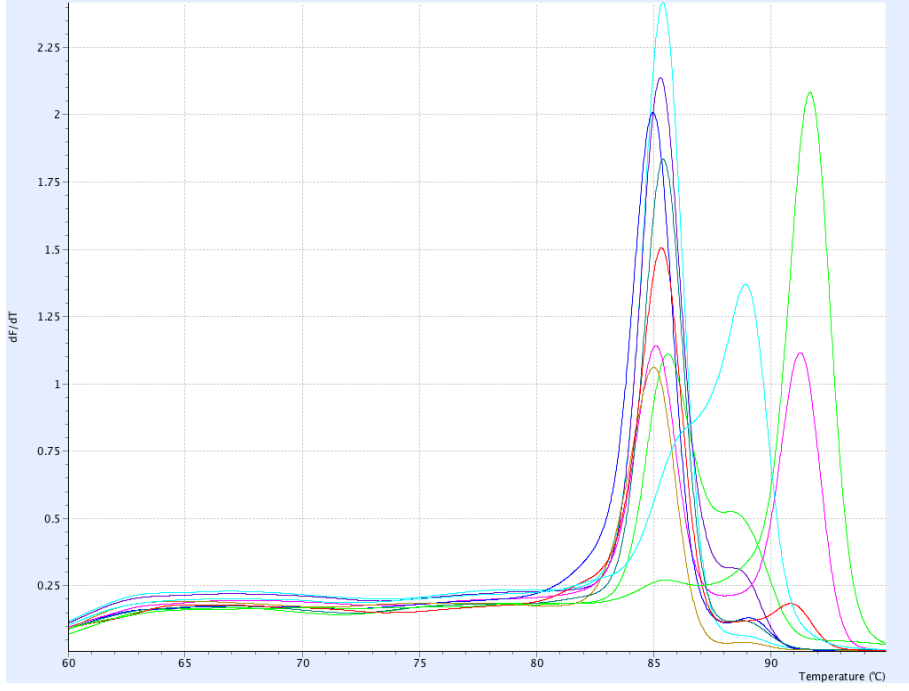


Şekil 4.22. EPEC doğrudan su örneğinin erime eğrisi.

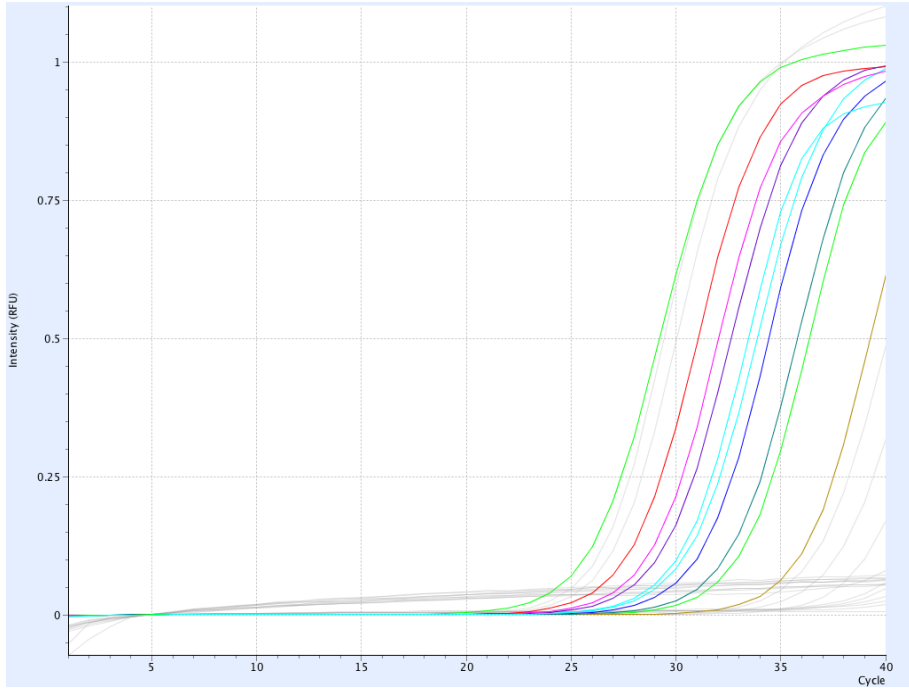


Şekil 4.23. EPEC doğrudan su örneğinin çoğalma eğrisi.





Şekil 4.24. EPEC kültür örneğinin erime eğrisi.



Şekil 4.25. EPEC kültür örneğinin çoğalma eğrisi.

**Tablo 4.10.** EPEC'nin su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

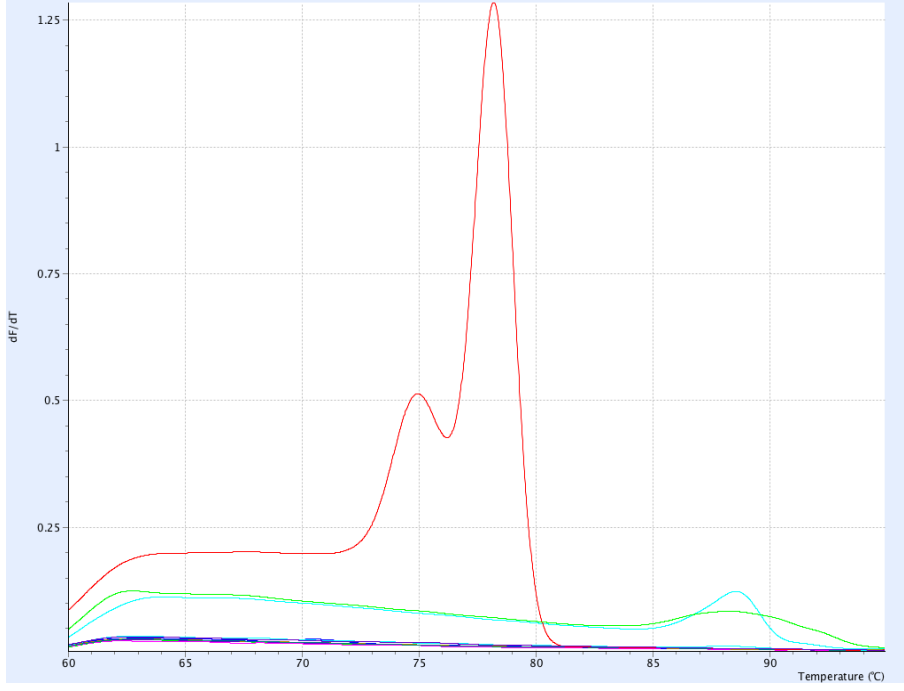
Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı $C_T$	Erime Sıcaklığı $T_m$	Sonuç
EPEC	1	Su	0	85.585	Pozitif
	2		29.964	90.356	Pozitif
	3		0	75.018	Negatif
	4		36.881	86.318	Pozitif
	5		0	75.018	Negatif
	6		0	75.018	Negatif
	7		35.837	85.876	Pozitif
	8		33.138	90.355	Pozitif
	9		28.45	92.236	Pozitif
	10		35.282	92.141	Pozitif
	NegKontrol	0	0	Negatif	
	1	Kültür	32.301	85.612	Pozitif
	2		29.773	85.393	Pozitif
	3		28.528	85.294	Pozitif
	4		27.979	85.101	Pozitif
	5		30.375	84.972	Pozitif
	6		35.216	85.007	Pozitif
	7		31.727	85.418	Pozitif
	8		26.983	85.338	Pozitif
	9		25.071	91.68	Pozitif
	10		29.416	88.932	Pozitif

#### 4.2.4. EIEC(Enteroinvaziv *Escherichia coli*) Tespiti

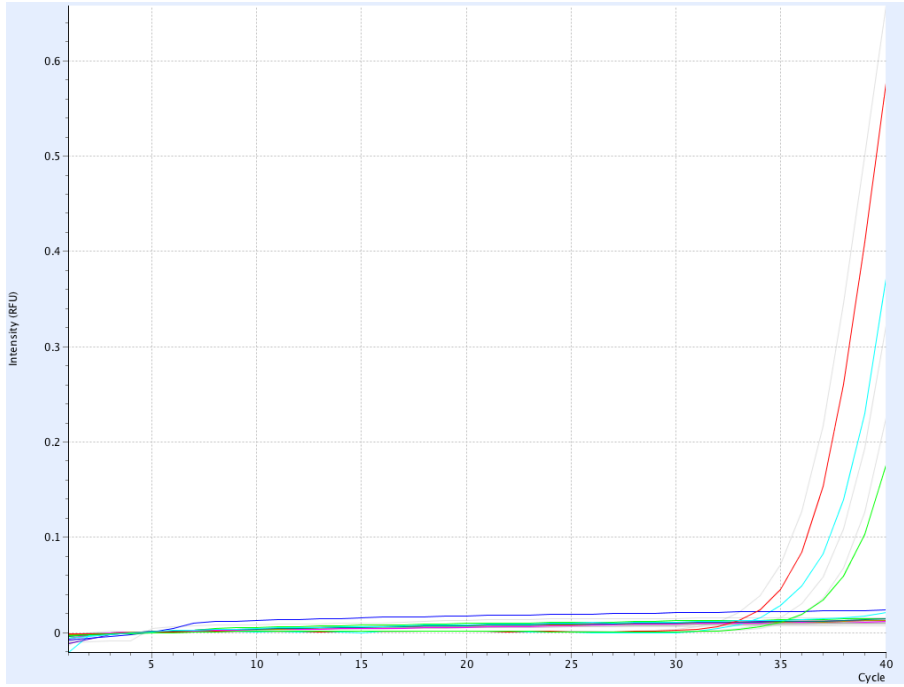
EIEC tespiti için tek primer kullanılmıştır. Önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon yöntemiyle doğrulanan *E. coli* kolonilerinin TSA besiyerinde yapılan kültürden çalışıldı. Yapılan çalışmada hiçbir istasyondan, doğrudan su örneklerinden veya TSA besiyerindeki kültürlerden EIEC tespit edilmedi.

#### 4.2.5. EAEC (Enteroagregatif *Escherichia coli*) Tespiti

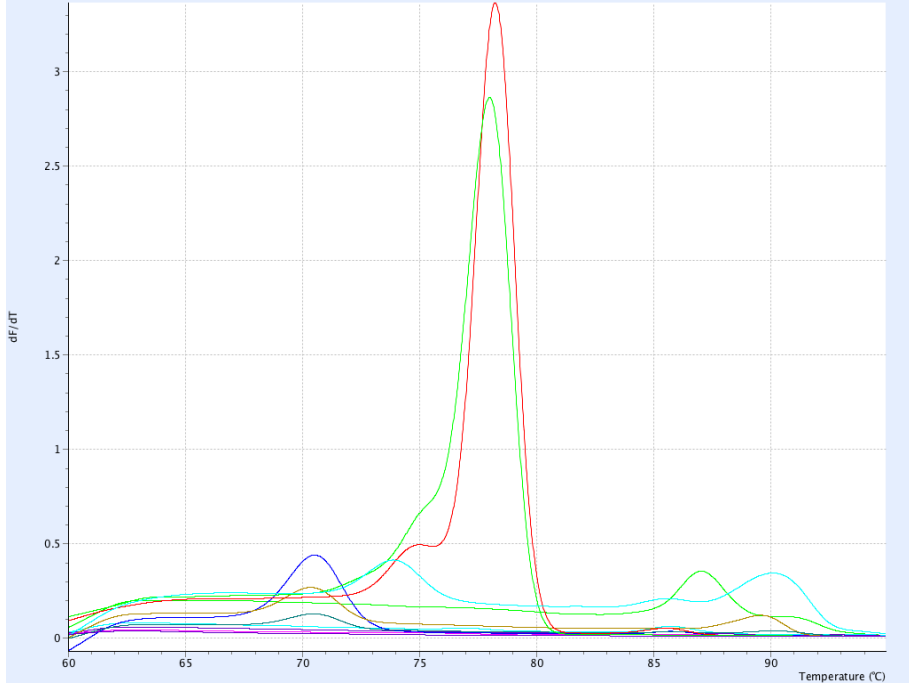
EAEC tespiti için tek primer kullanılmıştır. Önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon yöntemiyle doğrulanan *E. coli* kolonilerinin TSA besiyerinde yapılan kültürden çalışıldı. Yapılan çalışmada doğrudan su örneklerden sadece 8 nolu istasyonda, TSA besiyerindeki kültürlerden de 8 ve 9 nolu istasyonlardan EAEC tespit edildi.



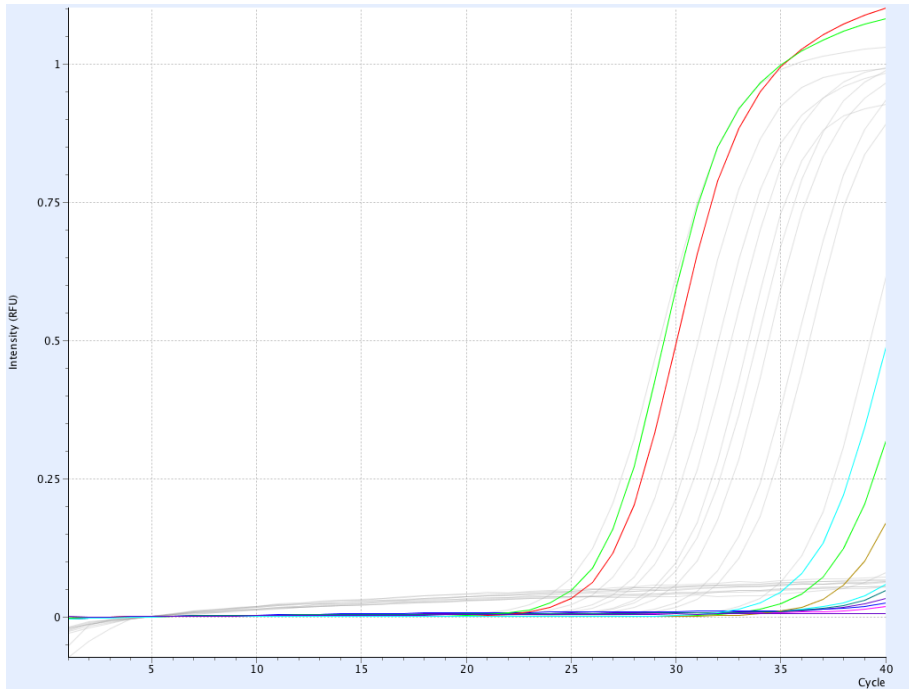
Şekil 4.26. EAEC doğrudan su örneğinin erime eğrisi.



Şekil 4.27. EAEC doğrudan su örneğinin çoğalma eğrisi.



**Şekil 4.28.** EAEC kültür örneğinin erime eğrisi.



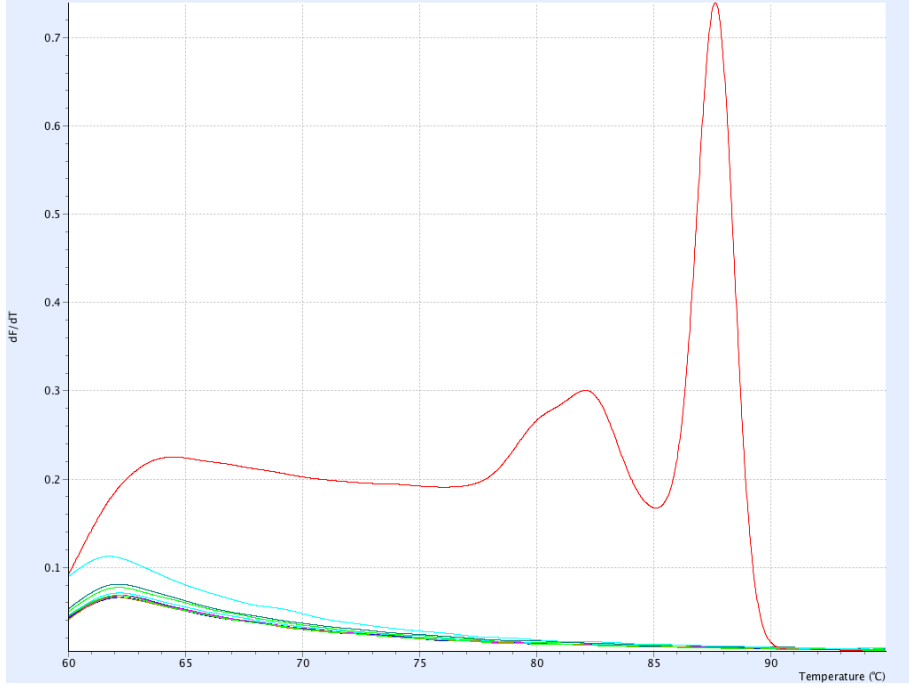
**Şekil 4.29.** EAEC kültür örneğinin çoğalma eğrisi.

**Tablo 4.11.** EAEC'nin su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

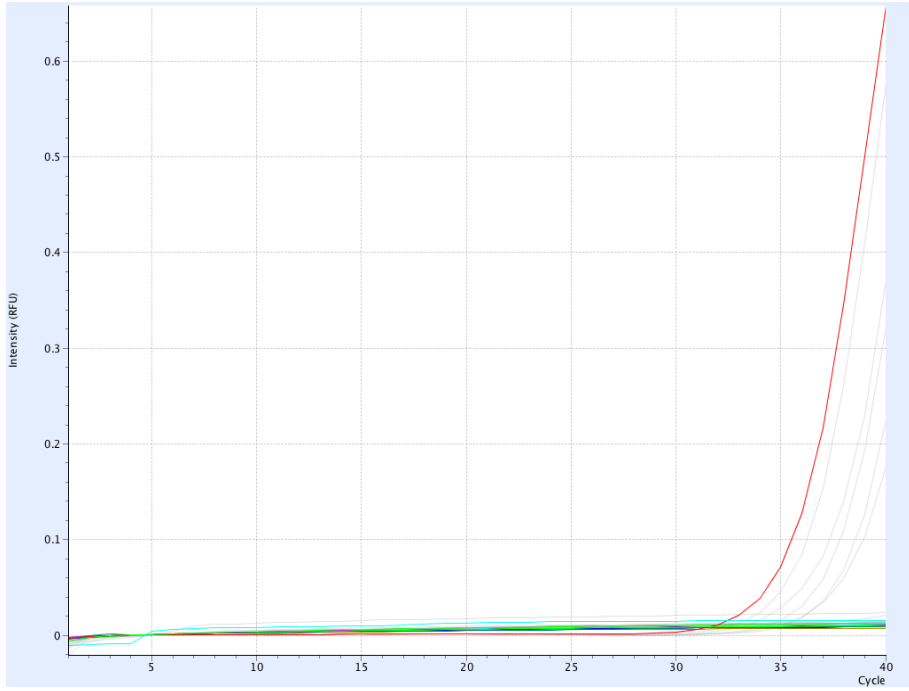
Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı C <sub>T</sub>	Erime Sıcaklığı T <sub>m</sub>	Sonuç
EAEC	1	Su	0	71.036	Negatif
	2		36.788	88.546	Negatif
	3		0	71.378	Negatif
	4		0	71.036	Negatif
	5		0	71.036	Negatif
	6		0	71.036	Negatif
	7		0	71.036	Negatif
	8		<b>35.597</b>	<b>78.191</b>	<b>Pozitif</b>
	9		38.384	71.036	Negatif
	10		0	71.036	Negatif
	NegKontrol		0	71.036	Negatif
	1	Kültür	37.077	87.035	Negatif
	2		37.371	85.729	Negatif
	3		36.779	73.178	Negatif
	4		0	75.455	Negatif
	5		0	73.178	Negatif
	6		38.438	89.584	Negatif
	7		36.96	73.178	Negatif
	8		<b>26.085</b>	<b>78.239</b>	<b>Pozitif</b>
	9		<b>25.513</b>	<b>78</b>	<b>Pozitif</b>
	10		35.914	73.887	Negatif

#### 4.2.6. *Enterococcus faecalis* Tespiti

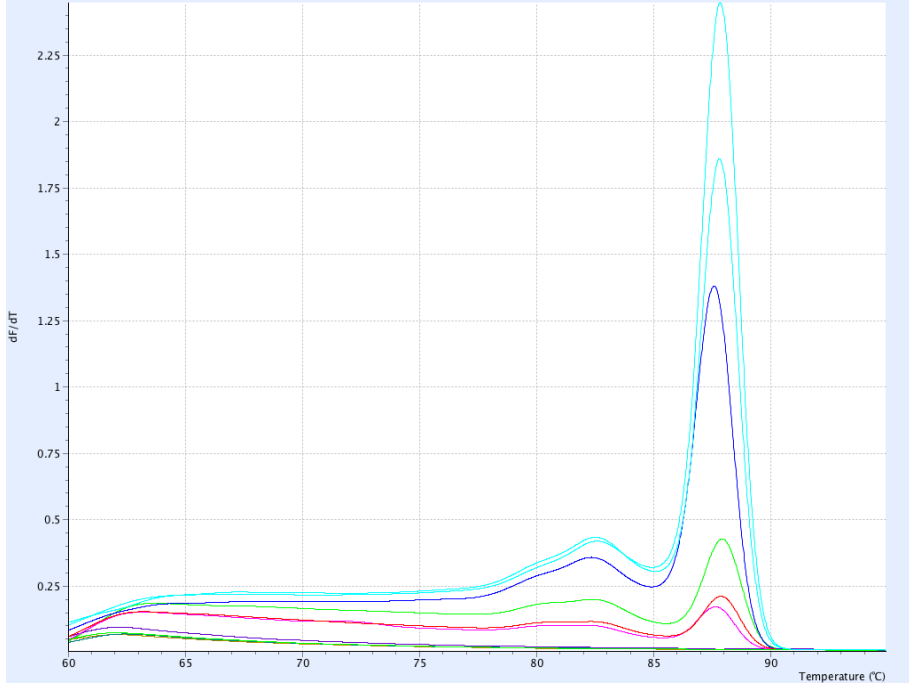
*Enterococcus faecalis* önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon yöntemiyle doğrulanan kolonilerden çalışıldı. Yapılan çalışmada doğrudan su örneklerden sadece 8 nolu istasyondan, seçici besiyerindeki kültürlerden de 1, 2, 4, 5, 8 ve 10 nolu istasyonlardan *Enterococcus faecalis* tespit edildi.



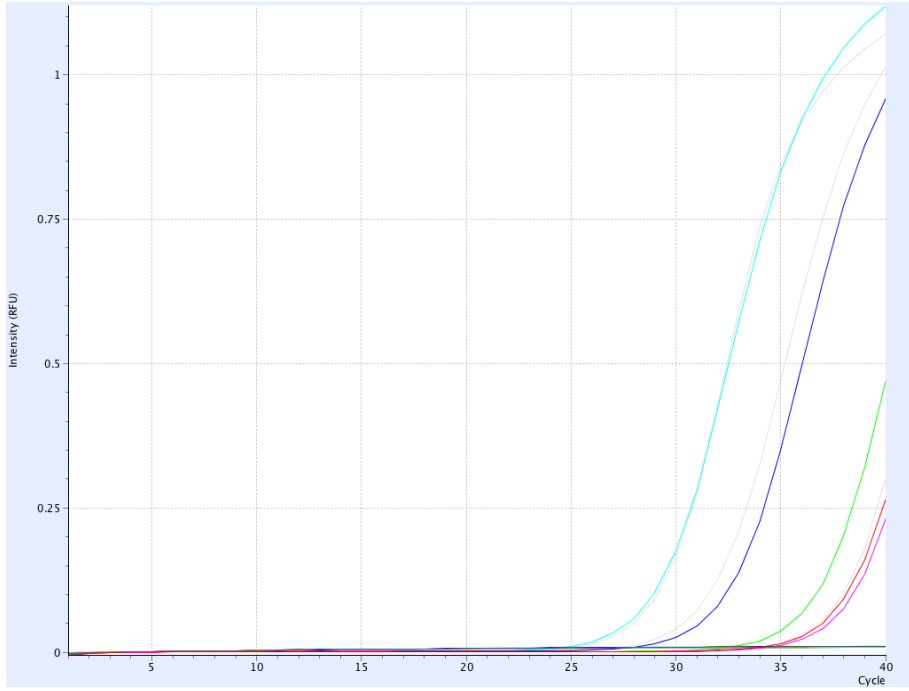
Şekil 4.30. *Enterococcus faecalis*'in su örneğindeki erime eğrisi.



Şekil 4.31. *Enterococcus faecalis*'in su örneğindeki çoğalma eğrisi.



Şekil 4.32. *Enterococcus faecalis*'in kültürdeki erime eğrisi.



Şekil 4.33. *Enterococcus faecalis*'in kültürdeki çoğalma eğrisi.

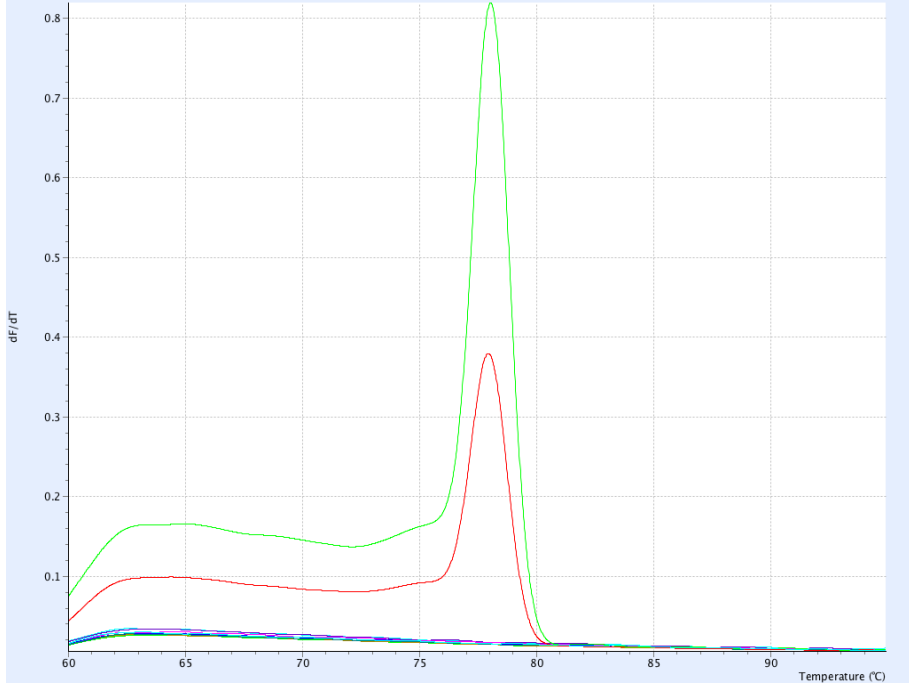
**Tablo 4.12.** *Enterococcus faecalis*'in su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı C <sub>T</sub>	Erime Sıcaklığı T <sub>m</sub>	Sonuç
<i>E.faecalis</i>	1	Su	0	72.963	Negatif
	2		0	72.963	Negatif
	3		0	72.963	Negatif
	4		0	72.963	Negatif
	5		0	72.963	Negatif
	6		0	72.963	Negatif
	7		0	72.963	Negatif
	8		<b>34.959</b>	<b>87.631</b>	<b>Pozitif</b>
	9		0	72.963	Negatif
	10		0	72.963	Negatif
	NegKontrol	0	0	Negatif	
	1	Kültür	<b>36.112</b>	<b>87.922</b>	<b>Pozitif</b>
	2		<b>28.392</b>	<b>87.839</b>	<b>Pozitif</b>
	3		0	84.508	Negatif
	4		<b>37.829</b>	<b>87.642</b>	<b>Pozitif</b>
	5		<b>31.862</b>	<b>87.577</b>	<b>Pozitif</b>
	6		0	84.508	Negatif
	7		0	84.508	Negatif
	8		<b>37.54</b>	<b>87.869</b>	<b>Pozitif</b>
	9		0	85.115	Negatif
10	<b>31.046</b>		<b>87.81</b>	<b>Pozitif</b>	

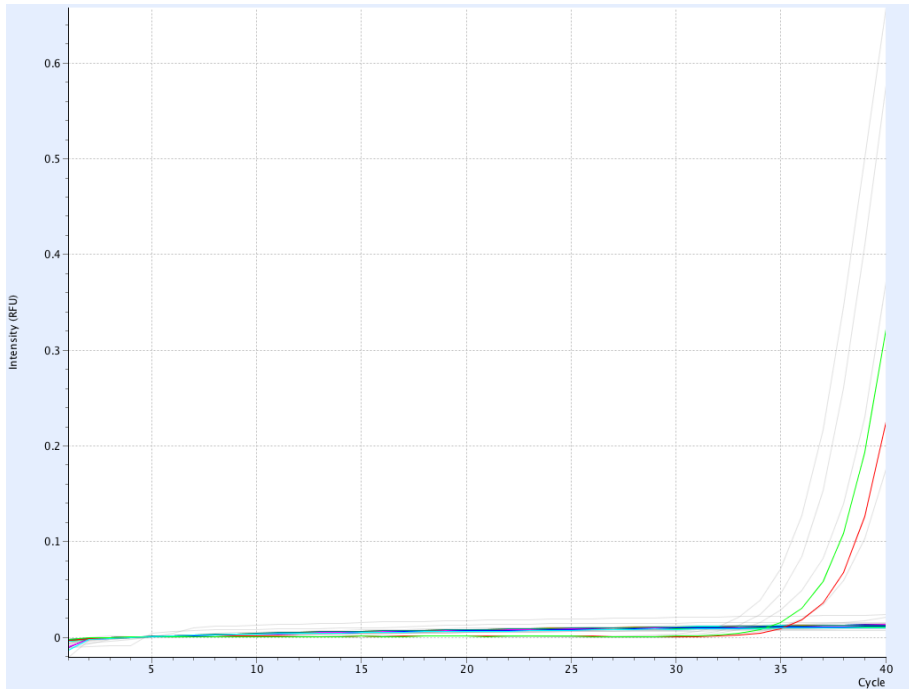
#### 4.2.6. *Clostridium perfringens* Tespiti

*Clostridium perfringens* önce doğrudan su örneğinden, daha sonra da membran filtrasyon yöntemiyle doğrulanan kolonilerden çalışıldı. Yapılan çalışmada doğrudan su örneklerden 8 ve 9 nolu istasyonlardan, seçici besiyerindeki kültürlerden de 1, 2, 4, 5, 8, 9 ve 10 nolu istasyonlardan *Clostridium perfringens* tespit edildi.

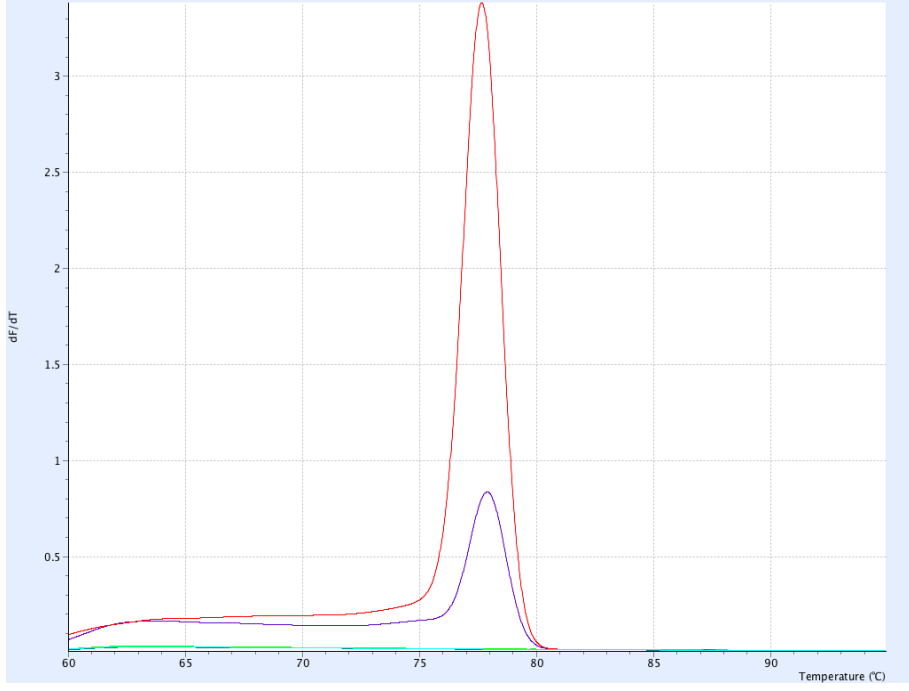




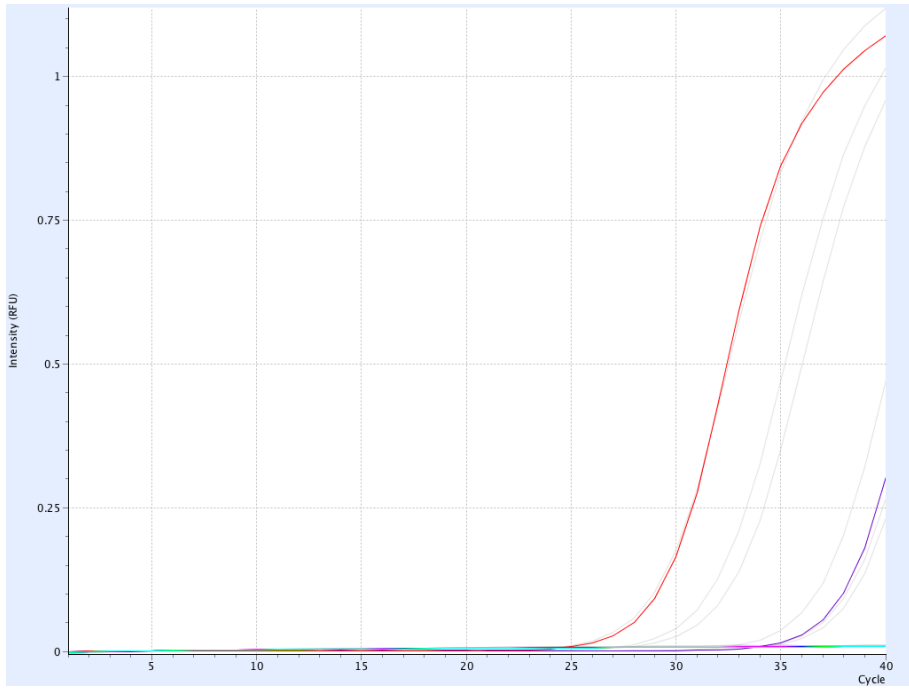
Şekil 4.34. *Clostridium perfringens*' in su örneğindeki erime eğrisi.



Şekil 4.35. *Clostridium perfringens*' in su örneğindeki çoğalma eğrisi.



Şekil 4.36. *Clostridium perfringens*' in kültürdeki erime eğrisi.



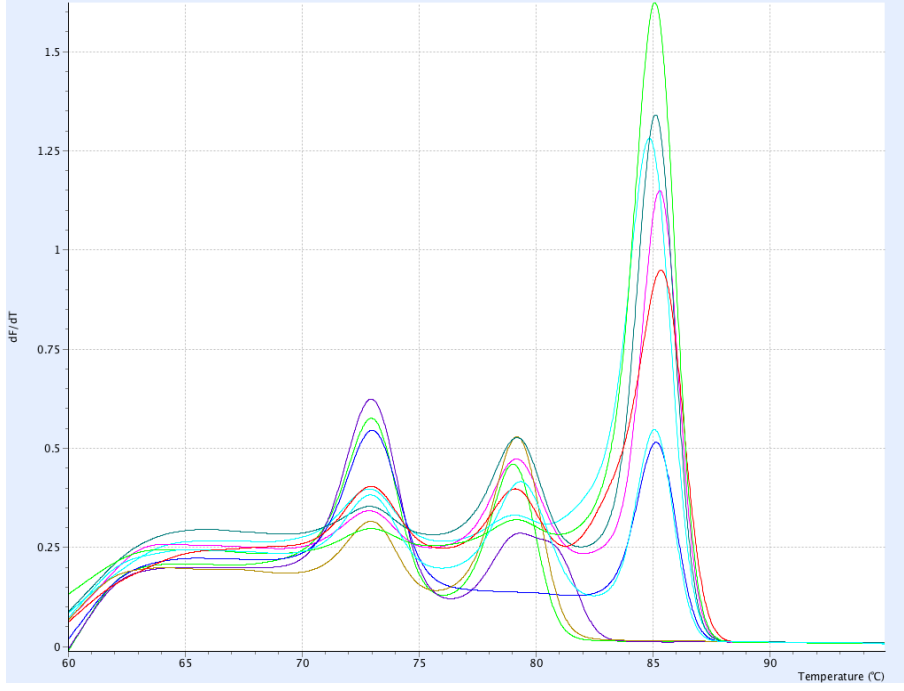
Şekil 4.37. *Clostridium perfringens*' in kültürdeki çoğalma eğrisi.

**Tablo 4.13.** *Clostridium perfringens*'in su örneğinden ve kültürden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

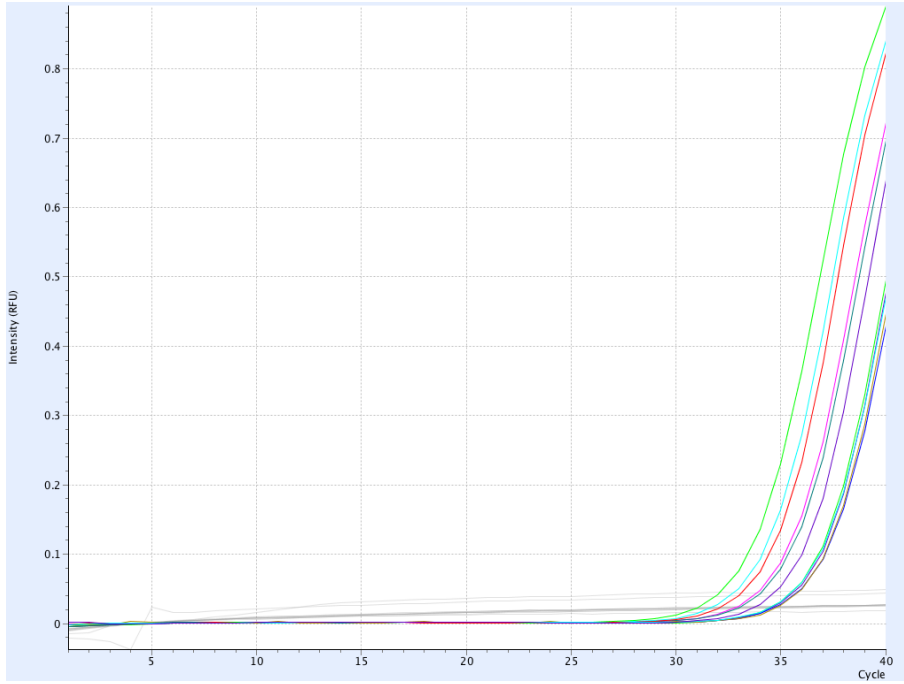
Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı C <sub>T</sub>	Erime Sıcaklığı T <sub>m</sub>	Sonuç
<i>C.perfringens</i>	1	Su	0	72.353	Negatif
	2		0	72.353	Negatif
	3		0	72.353	Negatif
	4		0	72.353	Negatif
	5		0	73.17	Negatif
	6		0	72.353	Negatif
	7		0	72.353	Negatif
	<b>8</b>		<b>37.89</b>	<b>77.945</b>	<b>Pozitif</b>
	<b>9</b>		<b>37.171</b>	<b>78.043</b>	<b>Pozitif</b>
	10		0	72.353	Negatif
	NegKontrol		0	0	Negatif
	<b>1</b>	Kültür	<b>35.814</b>	<b>77.791</b>	<b>Pozitif</b>
	<b>2</b>		<b>34.231</b>	<b>77.772</b>	<b>Pozitif</b>
	<b>4</b>		<b>33.399</b>	<b>77.91</b>	<b>Pozitif</b>
	<b>5</b>		<b>36.524</b>	<b>77.995</b>	<b>Pozitif</b>
	6		0	0	Negatif
	<b>8</b>		<b>30.687</b>	<b>77.887</b>	<b>Pozitif</b>
	<b>9</b>		<b>30.93</b>	<b>77.921</b>	<b>Pozitif</b>
	<b>10</b>		<b>36.676</b>	<b>78.167</b>	<b>Pozitif</b>
	NegKontrol		0	0	Negatif

#### 4.2.6. *Legionella pneumophila* Tespiti

*Legionella pneumophila*'nın su örneklerinden yapılan çalışmasında 2,4,7,8,9 nolu istasyonlardan tespit edildi.



Şekil 4.38. *Legionella pneumophila*'nın su örneğindeki erime eğrisi.



Şekil 4.39. *Legionella pneumophila*'nın su örneğindeki çoğalma eğrisi.

**Tablo 4.14.** *Legionella pneumophila*'nın doğrudan su örneğinden eşik döngüsü ve erime sıcaklığı.

Hedef Organizma	İstasyon No:	Örnek Tipi	Döngü Sayısı $C_T$	Erime Sıcaklığı $T_m$	Sonuç
<i>L.pneumophila</i>	1	Su	36.124	82.989	Negatif
	2		<b>33.496</b>	<b>84.851</b>	<b>Pozitif</b>
	3		36.231	82.989	Negatif
	4		<b>34.582</b>	<b>85.242</b>	<b>Pozitif</b>
	5		36.465	82.989	Negatif
	6		36.408	82.989	Negatif
	7		<b>34.768</b>	<b>85.271</b>	<b>Pozitif</b>
	8		<b>33.818</b>	<b>85.423</b>	<b>Pozitif</b>
	9		<b>32.841</b>	<b>85.26</b>	<b>Pozitif</b>
	10		36.214	82.989	Negatif
	NegKontrol		0	0	Negatif

#### 4.2.7. *Leptospira interrogans* Tespiti

*Leptospira interrogans*'ın su örneklerinden yapılan çalışmada hiçbir pozitif örnek tespit edilmedi.

**Tablo 4.15.** Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle doğrudan su örneklerinden yapılan tespit çalışmalarının toplu sonuçları.

İstasyon No	EHEC STX1	EHEC STX2	ETEC LT	ETEC ST	EPEC	EIEC	EAEC	<i>E. faecalis</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. interrogans</i>
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
9	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

+ : pozitif tespit edilen örnekler, - : negatif tespit edilen örnekler

**Tablo 4.16.** Membran filtrasyon yöntemiyle üretilen bakteri kolonilerinin gerçek zamanlı PZR yöntemiyle yapılan çalışmaların sonuçları.

İstasyon No	EHEC STX1	EHEC STX2	ETEC LT	ETEC ST	EPEC	EIEC	EAEC	<i>E. faecalis</i>	<i>C. perfringens</i>
1	-	-	-	-	+	-	-	+	+
2	-	-	+	-	+	-	-	+	+
3	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	+	-	-	+	+
5	-	-	-	-	+	-	-	+	+
6	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	+	-	-	-	+	-	+	+	+
9	-	-	+	-	+	-	+	-	+
10	-	-	-	-	+	-	-	+	+

+ : pozitif tespit edilen örnekler, - : negatif tespit edilen örnekler

## BÖLÜM 5

### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Edirne ilindeki çevresel sularda indikatör ve bazı patojen bakterilerin araştırılması amacıyla membran filtrasyon ve gerçek zamanlı PZR yöntemiyle çalışıldı. PZR yöntemiyle araştırılan mikroorganizmaların tespiti ve göreceli olarak DNA miktarını verirken membran filtrasyon yöntemiyle araştırılan mikroorganizmaların sayımları da yapıldı.

Su örneği alınan bütün istasyonlara genel olarak bakıldığında farklı çevresel ve yüzeysel su örneklerini temsil etmektedir. Bu istasyonlardan 5 tanesi Edirne şehir merkezinde bulunan süs havuzları, 3 tanesi nehir, 1 tanesi dere ve 1 tanesi de çeltik tarlasıdır. Tablo 4.7.'de şehir şebeke suyu kullanılan 5 süs havuzundaki araştırılan ve sayılan mikroorganizmaların sayıları diğer çevresel sulara göre daha az olduğu görülmüştür. Süs havuzlarında şehir şebeke suyunun kullanılması (şebeke suyunda serbest klor bulunmaktadır) ve temizliklerinin yapılması, bu havuzlardaki mikroorganizma sayısına etki ettiği düşünülmektedir.

Çevresel sular her türlü kirleticiye maruz kaldığından aranılan bakterilerden *Leptospira interrogans* hariç tamamı tespit edilmiştir. *Leptospira interrogans*, özellikle fare başta olmak üzere bazı yabani kemiriciler ve memeli hayvanların idrarıyla suya karışır[7]. Yüksek pH'da ve durgun sularda uzun süre canlı kalabilirler [13,14]. Süs havuzları dışındaki istasyonlar akarsu olduğundan ya da sudaki sayıları tespit edilemeyecek kadar az sayıda bulunmalarından dolayı tespit edilemediği düşünülmektedir.

Membran filtrasyon yöntemiyle toplam koliform ve *E.coli*'nin araştırılması ve sayımında, özellikle süs havuzlarında ve Meriç Nehri'nde diğer istasyonlara göre daha az sayıda olduğu görülmüştür. Diğer istasyonlarda toplam koliform ve *E.coli* sayısının



oldukça fazla görülmesi, insan ya da sıcakkanlı hayvanlardan yoğun miktarda dışkı materyalinin suya yeni karıştığını göstermektedir. Toplam koliform görülüp *E.coli*'nin görülmediği tek istasyon 10 nolu istasyon yani Ergene Nehri kenarında bulunan çeltik tarlasıdır. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi bu istasyondaki hava sıcaklığı ve özellikle su sıcaklığı diğer istasyonlara göre oldukça fazladır. *E.coli*'nin diğer indikatör bakterilere göre olumsuz şartlara daha dayanıksız olduğu bilinmektedir [5]. Suyun berrak görünümde ve derinliği çok az olması güneş ışınlarının etkisiyle kısa sürede *E.coli*'nin öldüğü kanısına varılmıştır. Nitekim gerçek zamanlı PZR yöntemiyle bu istasyonda *E.coli*'nin patojenik tiplerinden EPEC'in tespit edilmesi bu kanıyı güçlendirmektedir.

Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle *E.coli*'nin beş patojenik tipi için tespit çalışması yapılmıştır. Bu yöntemle hem doğrudan su örneklerinden hem de membran filtrasyon yöntemiyle üretilip doğrulanmış koloni örneklerinden tespit çalışmaları yapılmıştır. Her iki örnekten yapılan çalışmada EPEC dikkate değer şekilde çok tespit edilmiştir. Çevresel su örneklerinden EPEC'in diğer patojenik *E.coli* tiplerine göre daha çok tespit edildiğine dair bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Klinik örneklerden EPEC'in bebeklerde ve 2 yaşın altındaki çocuklarda ishal salgınlarına neden olduğu bildirilmiştir [7]. *E.coli*'nin patojenik tiplerinden EIEC hiçbir örnekte tespit edilmemiştir. Diğer patojenik tipler de Tablo 4.15 ve Tablo 4.16'da görüldüğü gibi çok az sayıda tespit edilmiştir.

Membran filtrasyon yöntemiyle fekal enterokokların araştırılması ve sayımında bütün istasyonlarda tespit edilmiş olup, toplam koliform ve *E.coli* sayılarından farklı olarak süs havuzlarının üç tanesinde de yüksek sayıda olduğu görülmüştür. Enterokoklar hayvan ve insanların bağırsağında bulunur ve suda üremezler. Klorlama ve çevresel şartlara *E.coli*'den daha dirençlidirler ve daha uzun yaşarlar. *E.coli* ölüm hızı oranı güneş ışınları arttığı zaman hızla artarken, enterokokların ölüm hızı oranı güneş ışını yoğunluğu ile çok değişmez. Ayrıca *E.coli* ve enterokokların her ikisi de klorla duyarlı olsa da enterokoklar *E.coli*'den biraz daha fazla direnç gösterirler. Tüm bunlardan dolayı enterokoklar geçmiş kirliliğin bir göstergesidir [5]. Fekal enterokokların tespit edilmesi çevresel suların toplam koliform ve sayıları *E.coli*'de olduğu gibi insanların ve sıcakkanlı hayvanların dışkısından geçmişte de suya karıştığını göstermektedir. Geçmişteki dışkı kirliliğinin yoğunluğu istasyonlardaki su örneklerinden tespit edilen fekal enterokok sayılarıyla doğru orantılıdır.

Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle fekal enterokoklardan suda en çok bulunan türü *Enterococcus faecalis*'in doğrudan su örneklerinden ve membran filtrasyon yöntemiyle üretilip doğrulanmış koloni örneklerinden tespit çalışmaları yapılmıştır. Doğrudan su örneklerinden sadece 8 nolu istasyondan tespit edilirken kültürde üretilmiş bakteri kolonilerinden 1, 2, 4, 5, 8 ve 9 nolu istasyonlardan tespit edilmiştir. Membran filtrasyon yöntemiyle bütün istasyonlardan fekal enterokok tespit edilirken gerçek zamanlı PZR'de fekal enterokoklardan sadece *Enterococcus faecalis* araştırıldığından bütün istasyonlardan tespit edilmemiştir.

Hem konvansiyonel hem de moleküler yöntemlerle yapılan çalışmalarda klasik indikatör bakterilerle sonradan indikatör bakteri olarak kullanılmaya başlanan sülfid indirgeyen *Clostridium*lar arasında paralellik ve duyarlılık karşılaştırılması yapıldı. Klasik indikatörlerden koliform bakteriler, *E. coli* ve fekal enterokok görülüp de sülfid indirgeyen *Clostridium*ların görülmediği sadece iki süs havuzu vardır. Sülfid indirgeyen *Clostridium*lar çevresel şartlara diğer indikatör bakterilerden daha dayanıklı olduklarından iki süs havuzunda görülmemesi, insanlardan ya da hayvanlardan meydana gelen dışkı kirliliğinde klasik indikatör bakterilerin sayısı sülfid indirgeyen *Clostridium*ların sayısına göre çok fazla olmasıyla ve süs havuzlarına temizlik v.b. bakımların yapılmasıyla açıklanabilir. Bu iki süs havuzu dışındaki istasyonlarda hem klasik indikatör bakteriler hem de sülfid indirgeyen *Clostridium*lar görülmüştür.

İndikatör ve patojen bakterilerin karşılaştırılması yapıldı. Konvansiyonel yöntemle yapılan çalışmada indikatör bakterilerin görülüp de *Aeromonas* cinsi bakterilerin görülmediği üç süs havuzu vardır. *Aeromonas* cinsi bakterilerin üç tane süs havuzunda görülmemesi muhtemelen bu havuzlarda kullanılan klorlu şebeke suyundan etkilenmiş olabileceğindedir. *Aeromonas* cinsi bakterilerin görülmediği süs havuzlarında indikatör bakteri sayılarının da düşük görülmesi hem patojen hem de indikatör bakterilerin klorlu sudan etkilendiklerini düşündürmektedir.

Membran filtrasyon yöntemiyle 22<sup>0</sup>C'de ve 36<sup>0</sup>C'de toplam koloni sayımı (total jerm) yapılmıştır. Her su çeşidi, toprak ve bitki örtüsü gibi pek çok noktadan kaynaklanan çeşitli mikroorganizmaları sürekli bulundurmakta ve bu mikroorganizmaların sayımı, su kalitesinin araştırılması ve değerlendirilmesinde faydalı bilgiler sağlamaktadır. Toplam koloni sayısı bir suyun mikrobiyolojik yükü ve kalitesi hakkında fikir verebilmesine karşılık insan sağlığı için iyi bir risk göstergesi olmadığı

DSÖ tarafından tanımlanmıştır [5]. Toplam koloni sayısı ile indikatör ve patojen bakteri sayısı arasında doğrudan bir bağlantı yoktur[5]. 36<sup>0</sup>C'de üreyen TKS'ye bakıldığında dolaylı bir bağlantının olduğu görülmüştür. İndikatör bakteri sayısının az olduğu istasyonlarda 36<sup>0</sup>C'de üreyen TKS'nin de az olduğu, aynı şekilde indikatör bakteri sayısının çok olduğu istasyonlarda 36<sup>0</sup>C'de üreyen TKS'nin de çok olduğu görülmüştür. 22<sup>0</sup>C'de üreyen TKS sayısı ile indikatör bakterilerin sayıları arasında nehirlerde bir paralellik olduğu gözlenmiştir. Süs havuzlarında ise 7 nolu istasyonda bir paralellik gözlenirken diğer istasyonlarda 22<sup>0</sup>C'de üreyen TKS sayısı indikatör bakterilerin sayısına göre oldukça fazla olduğu görülmüştür.

Gerçek zamanlı PZR yöntemiyle doğrudan su örneklerinden çalışılan patojen bakterilerden *Legionella pneumophila* 2, 4, 7, 8 ve 9 nolu istasyonlarda tespit edilmiştir. *L.pneumophila* aerosolle bulaşabilmekte ve ülkemizde lejyoner hastalığının tüm pnömoniler arasında % 5-10 arasında sıklıkta olduğu bildirilmiştir [7]. Edirne il merkezindeki iki süs havuzunda bu bakterinin tespit edilmesi özellikle yaşlılarda ve bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde enfeksiyon riskini arttırmaktadır. *L.pneumophila* hastane enfeksiyonları da yapabildiğinden bakterinin tespit edildiği istasyonlar çevresel bir rezervuar rolü oynamaktadırlar.

Membran filtrasyon ve gerçek zamanlı PZR yöntemiyle araştırılan mikroorganizmalar arasında duyarlılık ve paralellik karşılaştırması yapıldı. Her iki yöntemle de çalışılan bakterilerin tespit etmedeki duyarlılığı karşılaştırıldığında, gerçek zamanlı PZR'nin doğrudan su örneklerinden yapılan çalışmasında membran filtrasyon yöntemine göre daha duyarsız olduğu tespit edilmiştir. Bakteri kültürlerinden alınan örneklerden yapılan çalışmada ise benzer duyarlılık tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR yöntemi çok daha özgün olduğundan ortak çalışılan bakterilerde farklılıklar vardır. Membran filtrasyon yönteminde *E.coli*, fekal enterokok ve sülfite indirgeyen *Clostridium*'ların araştırılması ve sayımı yapılırken gerçek zamanlı PZR'de *E.coli*'nin beş patojenik tipi, fekal enterokoklardan sadece *Enterococcus faecalis* ve sülfite indirgeyen *Clostridium*'lardan *Clostridium perfringens*'in tespit çalışması yapılmıştır. Membran filtrasyon yöntemiyle tespit edilen patojen ve patojen olmayan *E.coli* türünün tamamını kapsamaktadır. Fekal enterokok tanımı en çok bulunan tür olan *Enterococcus faecalis* yanında başka *Enterococcus* türlerini de içermektedir [5]. Sülfite indirgeyen *Clostridium*'lar tanımı çoğunlukla *Clostridium perfringens*'i tanımlamakla birlikte

başka *Clostridium* türlerini de içermektedir[5]. Tüm bu sebeplerden dolayı her iki yöntemle tespit edilen bakteriler arasında bir paralellik aramak doğru değildir. Gerçek zamanlı PZR'den elde edilen sinyallerle bakterinin canlı olup olmadığı belli olmadığından kritik bir öneme sahiptir [28]. Mesela 10 nolu istasyondaki su örneğinden membran filtrasyon yöntemiyle *E.coli* görülmemişken gerçek zamanlı PZR'de *E.coli*'nin patojenik tiplerinden EPEC tespit edilmiştir. Bu da bize göstermektedir ki bu istasyonda canlı *E.coli* olmadığı halde EPEC'e ait DNA molekülü ortamda bulunmaktadır. Membran filtrasyon yöntemiyle bütün istasyonlardan fekal enterokok görülürken gerçek zamanlı PZR yönteminde 3, 6, 7 ve 9 nolu istasyonlarda kültürde üretilen bakteri kolonilerinden izole edilen DNA'lardan bile *Enterococcus faecalis* tespit edilmemiştir. Bu durum, *Enterococcus faecalis* tespit edilemeyen istasyonlarda başka *Enterococcus* türlerinin olduğunu göstermektedir. Her iki yöntemin *Clostridium perfringens* tespiti sadece 6 nolu istasyonda farklıdır. Bunun muhtemel sebepleri, bu istasyondaki su örneğinde ya *Clostridium perfringens* dışında başka bir sülfid indirgeyen *Clostridium* türü var ya da PZR ile tespit edilemedi.

Çalışılan iki yöntemin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları karşılaştırıldı. Gerçek zamanlı PZR yönteminin membran filtrasyon yöntemine göre sonuç elde etme süresinin çok kısa olduğu, çok daha özgün, daha az miktarda örnekle çalışabildiği ve su örneklerini kültüre almadan da aranılan bakterinin tespit edilebildiği görülmüştür. Buna karşılık az miktarda su örneğiyle çalışınca duyarlılığın azaldığı, tespit edilen bakterinin canlı olup olmadığının belli olmadığı ve maliyetinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Membran filtrasyon yöntemiyle araştırılan ve sayılan mikroorganizmalar ışığında suların kirlilik sınıfları belirlenmiştir. 30.11.2012 tarihinde Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nın yayınlamış olduğu "Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği"ne göre kıta içi yüzeysel su kaynakları kalitesi 4 sınıfa ayrılmıştır. Söz konusu yönetmeliğin Ek-5 Tablo-5'teki bütün parametrelerin sınıflandırmadaki değerleri belirlenmiştir. Bakteriyolojik açıdan su kalitesinin belirlenmesi için fekal koliform ve toplam koliform parametreleri belirtilmiştir [44].

**Tablo 5.1.** “Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği“ne göre kıta içi yüzeysel su kaynakları bakteriyolojik parametreler için kalite kriterleri.

Bakteriyolojik parametreler	Su kalite sınıfları			
	1. sınıf	2. sınıf	3. sınıf	4. sınıf
Fekal koliform (EMS/100 ml)	$\leq 10$	10-200	200-2000	> 2000
Toplam koliform (EMS/100 ml)	$\leq 100$	100-20000	20000-100000	> 100000

**Tablo 5.2.** Bakteriyolojik parametreler bakımından istasyonların su kalite kriterlerine göre sınıflandırılması.

İstasyon No:	Toplam Koliform sayısına göre su kalitesi	Fekal Koliform sayısına göre su kalitesi
1	2. sınıf	2. sınıf
2	3. sınıf	4. sınıf
3	2. sınıf	3. sınıf
4	2. sınıf	3. sınıf
5	2. sınıf	3. sınıf
6	2. sınıf	3. sınıf
7	2. sınıf	3. sınıf
8	4. sınıf	4. sınıf
9	4. sınıf	4. sınıf
10	3. sınıf	1. sınıf

Tablo 5.2’de istasyonların toplam koliform ve fekal koliform sayılarına bakıldığında 1 nolu istasyon hariç, nehirlerin ve derenin bakteriyolojik parametreler bakımından kirlenmiş ve çok kirlenmiş sular sınıfında oldukları tespit edilmiştir. Bu durum nehirlere yoğun miktarda insan ve/veya sıcakkanlı hayvan dışkısının nehirlere karıştığını göstermektedir. Şehir merkezindeki süs havuzları da az kirlenmiş ve kirlenmiş sular sınıfına girmektedir. Kirlilik sınıfının yüksek olduğu istasyonlarda

araştırılan patojen ve diğer indikatör bakteri sayılarının da çok yüksek olduğu görölmüştür.

Sonuç olarak bu çalışma, Edirne merkezi ve çevresinde belirlenmiş istasyonların mikrobiyolojik su kaliteleri hakkında bir fikir edinmemizi sağlamıştır. Nehirlerde ve derelerde indikatör ve patojen bakteri sayısı, farklı noktalarda ve derinlikte, farklı mevsimlerde ve atık su miktarına göre çok değişken olabilir. Dolayısıyla sadece belirli bir noktadan ve bir mevsimde alınan su örneği ile bu istasyonların mikrobiyolojik kalitesinin yıl içindeki değişimlerini ve genel mikrobiyolojik kalitesi hakkında bir fikir yürütmek zordur. Yine de, bir defalık çalışmayla bile araştırılan bakteri sayılarının bazı istasyonlarda oldukça yüksek olması hastalık riskini arttırdığını ve kirli suların çevresel bir hastalık kaynağı olduğu düşünölmektedir. Sadece insan sağlığı için değil, suda yaşayan canlıların (özellikle sürüngenler ve balıklar) ve ekolojik dengenin de olumsuz etkilendiği düşünölmektedir. Bu çalışma aynı zamanda gelecekte daha iyi yapılacak çalışmalar için bir yol gösterici olacağı da düşünölmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] TÜBİTAK Bilim Teknoloji ve Yenilik Politikaları Daire Başkanlığı, Su Alanı Ulusal Ar-Ge ve Yenilik Stratejisi Hazırlanmasına İlişkin Bilgi Notu, Ek 6 (Ankara, 2010).
- [2] M. Akın ve G. Akın, *Suyun Önemi, Türkiye’de Su Potansiyeli, Su Havzaları ve Su Kirliliği*, Ankara Üniversitesi Dil Tarih Coğrafya Fakültesi Derg., 105, (2007)
- [3] Ç. Güler, *Su Kalitesi* (Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 43, Ankara, 1997).
- [4] Z. Koloren, B. Taş ve D. Kaya, *Gaga Gölü (Ordu, Türkiye)’nün Mikrobiyolojik Kirlilik Seviyesinin Belirlenmesi*, Karadeniz Fen Bil. Derg., 2, 3, 74-85, (2011).
- [5] U. Berberoğlu, *Su Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları El Kitabı* (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2012).
- [6] H. Irmak, *Sularla İlişkili Hastalıklar* (Sinem Matbaacılık, Ankara, 2006).
- [7] A. Willke Topçu, G. Söyletir ve M. Doğanay, *İnfeksiyon Hastalıkları* (Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1996).
- [8] M. Akhan, *Bir Kaynak Suyu Tesisindeki Mikrobiyal Kontaminasyon Kaynaklarının İncelenmesi* (İstanbul Üniversitesi Sağlık Bil. Ens., Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Ömer Çetin, İstanbul, 2007).
- [9] Edirne Valiliği Çevre ve Şehircilik İl Müdürlüğü İl Çevre Durum Raporu, Edirne,(2012).
- [10] [www.akademi.net/USG/USG2004/SKCK/skck07](http://www.akademi.net/USG/USG2004/SKCK/skck07)
- [11] H. Soylu, *Edirne İlindeki Çevresel Sular ve İçme-Kullanma Sularının Bakteriyolojik Amest Testi ile Mutajenitelerinin Araştırılması* (Trakya Üniversitesi Fen Bil. Ens., Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Doç. Dr. Ece Şen, Edirne, 2012).
- [12] M. E. Erkan, A. Vural, *Dicle Nehrinin Hijyenik Kalitesi Üzerine Bir Araştırma*, Dicle Tıp Dergisi, 33,4, 205-209, (2006).
- [13] O.Ş. Yenen, *Tıbbi Mikrobiyoloji* (Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2010)
- [14] C. Özkuyumcu (Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009).
- [15] H. Bilgehan, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı* (Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2009).

- [16] B. Öngen, *Escherichia coli İshallerinde Laboratuvar Tanısı*, AnkemDerg., ek 2,22,197-210, (2008).
- [17] Sağlık Bakanlığı, İnsani Tüketim Amaçlı Sulardan Numune Alımı, Taşınması ve Analizlerine İlişkin El Kitabı (Ankara, 2008).
- [18] J. Costa, I. Tiago, M. S. da Costa, *Presence and persistence of Legionella spp. in ground water*, Appl. Environ. Microbiol., 71, 663-671, (2005).
- [19] F. Köksal, N. Oğuzkurt, M. Samastı, *İstanbul'da Üç Eğitim Hastanesinin Depo ve Musluk Sularında LegionellaBakterilerinin Araştırılması*, Klimik Derg., 15, 1, 16-18, (2002).
- [20] K. Ricketts, C. Joseph, *The distribution of travel-associated Legionnaires' disease within selected European countries, and a comparison with tourist patterns*, Epidemiol. Infect., 134, 887-893, (2006).
- [21] K. Ricketts, B. Mc Naught, C. Joseph, *Travel-associated legionnaires' disease in Europe*, 2004 Euro Surveill, 11, 107-110, (2006).
- [22] M. Sünbül, *Leptosiroz*, Ankem Derg., 20 (Ek 2), 219-221, (2006).
- [23] N. Saltoğlu, *Leptosira İnfeksiyonları: Türkiye ve Dünyada Durum*, XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 108-110, (2003).
- [24] O. Baylan ve S. Yılmaz, *İntestinal ve Ekstraintestinal infeksiyonların bir etkeni: Aeromonas*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kongresi, 34, 262-272, (2004).
- [25] I. H. Igbiosa, E. U. Igumbor, F. Aghdasi, M. Tom and A. I. Okoh, *Emerging Aeromonas Species Infections and Their Significance in Public Health*, The Scientific World Journal, 10, 1100, (2012).
- [26] A. Uzel ve F. Uçar., *İzmir İlindeki Çeşitli Kaynaklardan Aeromonas hydrophila'nın İzolasyon, İdentifikasyon ve Toksik Özellikleri*, Turk J.Biol., Ek Sayı 24, 25-32, (2000).
- [27] E. Koneman, S. Allen, W. Janda, P. Schreckenberger, W. Jr. Winn, *Curved gram negative basilli and oxidase positive fermenters: Campylobacteraceae and Vibrionaceae* (Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott Comp, Philadelphia, 1997).
- [28] M. Hasde, R. Oğur ve Ö. F. Tekbaş, *Ankara İl Merkezinde Bulunan Askeri Birliklerdeki Kuyu Sularının Polimeraz Zincir Reaksiyon Sistemi ile Mikrobiyolojik Analizlerinin Yapılması*, 44, 4, 373-377,(2002).
- [29] URL [http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu\\_icerikleri/3.../cm2\\_ders\\_notu.pdf](http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3.../cm2_ders_notu.pdf)



- [30] R. Oğur, Ö.F. Tekbaş, *Temel Su Analiz Teknikleri* (GATA, Aydın Matbaacılık, Ankara, 2005).
- [31] A. K. Halkman, *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, (Başak Matbaacılık, Ankara, 2005).
- [32] URL. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/iwachap13.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/iwachap13.pdf)
- [33] M. T. Madigan, J. M. Martinko, Onbirinci Baskıdan Çeviri Editörü: C. Çökmüş, *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi* (Palme Yayıncılık, Ankara, 2010).
- [34] G. Temizkan, N. Arda, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler* (Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008).
- [35] T. Günel, *Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR"*, Türkiye Klinikleri J. Med. Sci., 27, 763-767, (2007).
- [36] TS EN ISO 9308-1 (Nisan 2004).
- [37] TS EN ISO 7899-2 (Nisan 2002).
- [38] TS 8020 EN ISO 26461-2 (Eylül 1997).
- [39] A. Ahmed, M. F. M. Engelberts, K. R. Boer, N. Ahmed ve R. A. Hartskeerl, *Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic Leptospira species in clinical materials*, PLoS ONE 4, 9, e7093 (2009).
- [40] S. Bartosch, A. Fite, G. T. Macfarlane and M. E. T. Mc Murdo, *Characterization of bacterial communities in feces from health yelderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*, Applied and environmental microbiology, 70, 6, 3575-3581 (2004).
- [41] H. Fukushima, Y. Tsunomori and R. Seki, *Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food-or waterborne pathogens in stools*, Journal of Clinical Microbiology 41, 11, 5134-5146 (2003).
- [42] K. R. S. Aranda<sup>1</sup>, S. H. Fabbri<sup>1</sup>, U. Fagundes-Neto<sup>1</sup> and I. C. A. Scaletsky, *Single multiplex assay to identify simultane ously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Brazilian children*, FEMS microbiology letters, 267, 2, 145-150 (2007).
- [43] N. Wellinghausen, C. Frost and R. Marre, *Detection of legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR*, Appl. Environ. Microbiol. 67, 3985-3993 (2001).
- [44] Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği (2012)

## ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Bulgaristan'ın Kırcaali şehrinde doğdu. İlk 8 yıllık öğrenimini 1989 yılında Bulgaristan'da tamamladı. 1993 yılında Kırklareli 60.Yıl Sağlık Meslek Lisesi'nden mezun oldu ve aynı yıl Kırklareli'de Sağlık Bakanlığı'nın personeli olarak Sağlık Memuru ünvanıyla göreve başladı. 1995 yılında T.Ü. Kırklareli Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Sağlık Teknikerliği (Sağlık Memurluğu) Bölümünden mezun oldu. 1998 yılında kazandığı T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2002 yılında mezun oldu. Edirne Halk Sağlığı Laboratuvarında Biyolog olarak çalışmaktadır. Evli ve bir kız babasıdır.