

**MODİFİYE BİR FRENCH PRES HÜCRESİNİN
YAPIMI ve BAKTERİ PARÇALAMA
ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Selçuk DEMİR

**Y. Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
2011
Her hakkı saklıdır**

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Y. LİSANS TEZİ

MODİFİYE BİR FRENCH PRES HÜCRESİNİN YAPIMI ve BAKTERİ
PARÇALAMA ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ

Selçuk DEMİR

TOKAT
2011

Her hakkı saklıdır

T.C
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MODİFİYE BİR FRENCH PRES HÜCRESİNİN YAPIMI ve BAKTERİ
PARÇALAMA ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

bu çalışmanın bir kısmının bu tezde kullanılmadığını
olarak sunulmadığını beyan ederim.

Prof. Dr. İsa GÖKÇE danışmanlığında, **Selçuk DEMİR** tarafından hazırlanan bu çalışma 25/02/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile **Kimya Anabilim Dalı**'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ömer İŞILDAK

İmza:

Üye : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

İmza:

Yukarıdaki sonuçları onaylarım



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Selçuk DEMİR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MODİFİYE BİR FRENCH PRES HÜCRESİNİN YAPIMI ve BAKTERİ PARÇALAMA ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ

Selçuk DEMİR

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Bu çalışmada modifiye bir Fransız presinin yapımı ve bu Fransız presinin *E.coli* (DH5 α) hücrelerini parçalama işlemini ne kadar gerçekleştirebildiği araştırılmıştır. Ayrıca Fransız presi operasyonundan elde edilen sonuçlar sonikasyonla hücre parçalama sisteminden alınan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Öncelikle besiyerlerinde üretilen *E. coli* hücreleri santrifüjlenip TAE tampon çözeltisi ile değişik konsantrasyonlarda hücre çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre çözeltileri Fransız presi ve sonikatör sistemleriyle parçalanmaya çalışılmıştır. Parçalama işlemi öncesinde hazırlanan çözeltilerin OD₆₀₀'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Daha sonra bu çözeltiler Fransız presinden geçirilmiş ve her geçişten sonra absorbansları aynı şekilde tekrar ölçülmüştür. Bu işlemin sonucunda absorbanslardaki değişikliğe göre hücrelerin parçalanma yüzdesi belirlenmiştir. Aynı işlemler sonikatör ile hücre parçalama sistemiyle de tekrarlanmıştır. Son olarak parçalama yüzdelere bakılarak sonikatör ve Fransız presi sistemlerinin hücre parçalama becerileri karşılaştırılmıştır.

2011, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, Sonikasyon, Fransız presi, Hücrelerin parçalanması.

ABSTRACT

Ms Thesis

CONSTRUCTION OF A MODIFIED FRENCH PRESSURE CELL AND INVESTIGATION OF ITS DISINTEGRATION OF BACTERIA

Selçuk DEMİR

Gaziosmanpasa University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

In this study, production of a modified French press and the percentage of lysis of *E. coli* cells (DH5 α) by this french press are examined. In addition to this, the results obtained from French press and sonication are compared with each other. First of all, the *E. coli* cells produced in their cultures are centrifuged and then using by TAE buffer solutions, cell solutions at different concentrations are prepared. These solutions of *E. coli* cells are then tried to lyse with French press and sonication systems. Before these two operations, the absorbance values of these solutions of cells are determined at OD₆₀₀. Then these solutions are passed through French press and their optical densities are determined again for every pass. At the end of this operation, percentage of lysis of cells in the solutions are determined by the difference in their absorbances. After these, the same operations are performed by the sonication method. At the end of this study, success of these French press and sonication methods are compared.

2011, 40 pages

Keywords: *E. coli*, Sonication, French press, Cell lysis.

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca maddi manevi destek veren ve en zor şartlarda bile yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE' ye,

Başta, yüksek lisans ders aşamasında her türlü bilgisini paylaşmaktan sakınmayan ve yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ hocam olmak üzere Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya Bölümündeki herkese,

Fransız Presinin yapımı aşamasında teknik bilgisiyle ufkumuzu açan ve yardımlarını esirgemeyen Turhal Makine Fabrikası İmalat Müdür Yardımcısı Sayın Özgür TOKMAK'a ve Turhal Makine Fabrikası çelik konstrüksiyon atölyesi ustabaşı Sayın Süleyman ŞAHİN başta olmak üzere tüm fabrika personeline,

Benim bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ilkokul öğretmenim Sayın Morgül VARIŞLI'ya,

Her şeyden önce 27 yıllık hayatımın her anını borçlu olduğun annem Yeter DEMİR, babam Turan DEMİR ve Kardeşim Durak DEMİR'e,

Ders döneminden Fransız presinin imalatına ve tezin yazımına kadar her konuda yardımcı olan, beni dinleyen, en zor anlarımda destek olan ve kahrımı çeken eşim Sayın Dilek ÇETİNKAYA DEMİR'e,

Yüksek lisansla ilgili çalışmalarımın dolaylı bazen zaman ayıramadığım minik kızım Duru DEMİR'e sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Selçuk DEMİR
Mart 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELER.....	3
2.1. Hücre.....	3
2.2. Hücre Zarı.....	4
2.3. Hücre Zarının Özellikleri.....	5
2.4. Bakteriler.....	6
2.5. Koliform Bakteriler.....	8
2.5.1. Koliformların Sınıflandırılması.....	8
2.6. <i>E.coli</i> (<i>Escherichia coli</i>)	9
2.7. <i>Escherichia coli</i> 'nin Sınıflandırılması.....	13
2.8. <i>E. coli</i> 'nin barsaklarda oluşturduğu infektifite mekanizmaları.....	13
2.8.1. Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i> (EPEC).	13
2.8.2. Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i> (ETEC).....	14
2.8.3. Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i> (EIEC).....	14
2.8.4. Verositotoksinojenik <i>Escherichia coli</i> (VTEC).....	15
2.8.5. Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i> (EaggEC: EAEC).....	15
2.8.6. Difuz Aderent <i>Escherichia coli</i> (DAEC).....	15
2.9. <i>E. coli</i> 'nin barsak dışında oluşturduğu infektifite mekanizmaları.....	16
2.9.1. Üropatojenik <i>Escherichia coli</i> (UPEC):.....	16
2.9.2. Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i> (NMEC):.....	16
2.10. <i>Escherichia coli</i> 'nin Rutin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri.....	16
2.10.1. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi:	16
2.10.2. Katı besiyeri yöntemi.....	17
2.10.3. Membran filtrasyon yöntemi.....	17
A) Toplam Enterobacteriaceae'nin İzolasyonu.....	18
B) Coli-aerogenes bakteriler izolasyonu.....	18
C) Koliform bakteri izolasyonu:	18
D) Fekal koliform bakterilerin izolasyonu:	18
E) <i>Escherichia coli</i> izolasyonu:	19

F) <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (VTEC)' nin izolasyonu:	19
2.11 <i>Escherichia coli</i> ' nin hızlı İdentifikasyon teknikleri.....	19
2.11.1. Selektif besiyerlerine dayalı yöntemler.....	19
2.11.1.1. LST-MUG yöntemi:.....	19
2.11.1.2. Kromojenik-fluorojenik substrat + MUG:.....	20
2.11.1.3. API20 E:	20
2.11.2. Antikor-Antijen kompleksine dayalı yöntemler.....	20
2.11.2.1. İmmunoblotting ve İmmunopresipitasyon metotları.....	20
2.11.2.2. Radyoimmunoassay.....	21
2.11.2.3. İmmunofluoresan tekniği.....	21
2.11.3. Enzime dayalı yöntem.....	21
2.11.3.1. Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	21
2.11.4. Gene Dayalı Analizler.....	22
2.11.4.1. PCR (Polymerase Chain Reaction):	22
2.11.4.2. Hibridizasyon yöntemi:.....	22
2.12. Rekombinant DNA Teknolojisi:.....	23
2.13. Mikroorganizmaları Parçalama Yöntemleri:.....	24
2.13.1. Sonikasyon:.....	25
2.13.2. Ozmotik şok:.....	26
2.13.3. Dondurma-Çözme:.....	26
2.13.4. Çözücülerin Kullanılması:.....	26
2.13.5. Enzimlerin Kullanılması	27
2.13.6. Fransız Basınç Hücresi (French Press):.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Fransız Presinin İmalatı:.....	28
4. BULGULAR	32
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	36
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	40

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
pH	Çözeltideki H ⁺ iyonu aktifliğinin ölçüsü

Kısaltmalar	Açıklama
ADP	Adenozin difosfat
APHA	American Public Health Association
ATP	Adenozin trifosfat
cm	Santimetre
CT	Kolera Toksini
DAEC	Difuz Aderent <i>Escherichia coli</i>
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EaggEC: EAEC	Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendaimintetraasetik asit
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
EMB	Eosin Metilen Blue
EMS	En Muhtemel Sayı Yöntemi
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
FEEC	Fakültatif enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
GAD	Glutamatdekarboksilaz
HUS	Hemolitik üremik sendrom
ISO	Uluslararası Standartlar Örgütü

KDa	Kilo Dalton
LST	Lauryl sulfate Tryptose
LT	Isıya duyarlı toksin
mm	Milimetre
mt	Metre
Nm	Nanometre
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SLTEC	Shiga like toxin
ST	Kaynamaya duyarlı toksin
TSA	Triptik Soy Agar
TSE	Türk Standartlar Enstitüsü
UPEC	Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>
VRB	Violet Red Blue Agar
VTEC	Verositotoksinojenik <i>Escherichia coli</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Hücre ve organelleri	3
Şekil 2.2. Hücre zarının yapısı	4
Şekil 2.3. Bakterilerin Şekilleri	6
Şekil 2.4. <i>E.coli</i> hücrelerinin elektron mikroskobu altında görünümü	10
Şekil 3.1. İçi boş silindir. (Ana gövde)	28
Şekil 3.2. İçi boş silindirin altındaki tabla.....	29
Şekil 3.3. İçi boş silindirin içinde çalışacak piston.	30
Şekil 3.4. Fransız presini oluşturan 3 ana parçanın bir arada görünümü.....	30
Şekil 3.5. Fransız presinin son hali	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. Fransız presinde hücre parçalama denemesi	32
Çizelge 4.2. Fransız presinde hücre parçalama denemesi	32
Çizelge 4.3. Sonikatörde hücre parçalama denemesi	33
Çizelge 4.4. Fransız presinde hücre parçalama denemesi	33
Çizelge 4.5. Sonikatörde hücre parçalama denemesi	34
Çizelge 4.6. Fransız presinde hücre parçalama denemesi	34
Çizelge 4.7. Sonikatörde hücre parçalama denemesi	35

1. GİRİŞ

E. coli insan bağırsağının zararsız konakçısıdır. *E. coli* hücresinin boyu yaklaşık 2 mikrometre ve çapı 1 mikrometreden biraz küçüktür. Koruyucu bir dış zar ve iç plazma zarıyla stoplazması ve nükleoiti sarılmıştır. İç ve dış zarlar arasında hücrenin şekil ve sertliğini sağlayan peptidoglikanlardan (aminoasitlerle çapraz bağlı şeker polimerleri) oluşan ince ancak güçlü tabaka bulunur. Plazma zarı ve onun dışındaki tabakalar, hücre zarını oluşturur. Bakteri türleri arasında hücre zarındaki farklılıklar mor menekşe boyasına karşı olan farklı ilginin nedenidir. Gram boyasının temeli de budur; gram pozitif bakteriler boyayı tutarken gram negatif bakteriler tutmaz. *E. coli*'nin dış zarı diğer gram negatif bakterilerinki gibi yapı bakımından plazma zarına benzerken, bileşimi farklıdır. Gram pozitif bakterilerin (Örneğin *Bac. subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) dış zarları yoktur ve plazma zarını saran peptidoglikan tabaka gram negatif bakterilerinkine göre çok daha kalındır. Arkae bakterilerde sertlik bir başka çapraz bağlı şeker polimerinin (yalancı peptidoglikan) farklı bir tipi tarafından sağlanır. Öbakterilerin plazma zarları, proteinlerin içine yerleştiği ince bir lipid molekülleri çift tabakasıdır. Arkae bakterilerin zarları benzer görünümde olmakla beraber öbakterilerinkinden çok farklı lipidleri vardır (Anonim,2007).

Laboratuarda kullanılan standart *E. coli* strainini (suşunun) adı K12'dir. *E. coli* K12'nin ve O157:H7 serotipli bir suşun genom dizinleri çözülmüştür. K12 genomu yaklaşık 4200 genden oluşmaktadır, O157:H7 genomu ise K12'ninkiden %25 daha büyüktür. K12 suşu hastalık yapan faktörler taşımaz ve hatta K12'nin ilk izolasyonundan günümüze geçen yıllar zarfında kapsül yapma yeteneğini kaybederek laboratuvar ortamına uyum sağlamış, artık doğal ortamında (yani insan bağırsağında) başka *E. coli* türleriyle rekabet edemeyecek kadar zayıflamıştır (Anonim, 2007).

E. coli'nin modern biyoteknolojide önemli bir yeri vardır. Araştırmacılar bu bakteriyi büyük miktarda DNA veya protein üretmek amacıyla bir fabrika gibi kullanırlar. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk faydalı uygulamalarından biri *E. coli*'nin manipüle edilerek onun diyabetli hastalar için insülin üretmesini sağlamak olmuştur. Bakterilerin

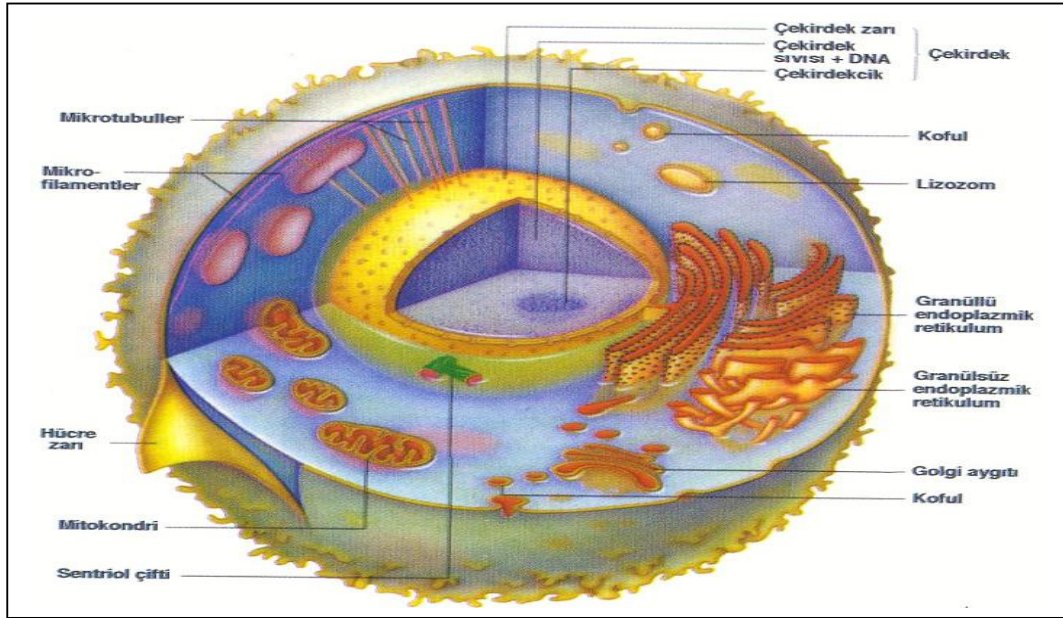
organik maddelerin transformasyonundaki rolü 19'uncu yüzyılın ortalarına kadar anlaşılamamıştır. Buna rağmen insanoğlu ilk çağlardan beri mikroorganizmaları gıda (peynir, ekmek, bira, şarap, sirke vs.) alanında kullanagelmiştir. Son yıllarda biyokimya ve moleküler biyolojideki gelişmeler mikroorganizmaların anti-kanser ajan olarak özellikle kanser tedavisinin omurgasını oluşturan kemoterapide kullanımını gündeme getirmiştir. Kanser gen tedavisinde onkolitik ajan olan virüslerin vektör olarak kullanımı çok iyi bilinmesine rağmen, bugüne kadar bakterilerin antikanser potansiyeli ile ilgili fazla araştırma yapılmamıştır. İlk kez 1978'de malignant beyin tümörleri için bakteriler onkolitik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan bu çalışmada, hastalık oluşturmeyan *Clostridium butyricum* M55 sporlarının karotid artere enjeksiyonu yapılmıştır. Bu sporlar beyin tümörlerine ulaştıktan bir hafta sonra da onkolizis olduğu gözlenmiş ve cerrahi olarak çıkarılmıştır Benzer olarak, bakteriyoloji ve moleküler biyolojideki gelişmeler, kanser tedavisinde bakteriyel uygulama alanlarını ve olanakları genişletmiştir (Anonim, 2004).

Hücreleri parçalayarak fraksiyonlarına ayırma yöntemleri, temelde hücrenin membranının (sınırlarının) çeşitli fiziksel ya da kimyasal tekniklerle yok edilmesini kapsar. Hücre elemanlarının işlevlerini kaybetmeden parçalanmasını sağlayan çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bir dokudaki çeşitli hücre tiplerini birbirinden ayırmak mümkün olduğu gibi, hücreler de işlevleri bozulmadan organellerine ve/veya makromoleküllerine ayrılabilir. Eğer dikkatli bir uygulama yapılırsa nükleus, mitokondri, kloroplast gibi organeller oldukça sağlam durumda kalabilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Hücre

Robert Hooke, mikroskopla incelemekte olduğu şişe mantar parçasının yan yana dizili bitişik bölümlerden oluştuğunu görmüş, etrafları çevrili ve içleri boş olan yapılarına uygun olarak, bu yapı birimlerine hücre (cellula) adını vermiş ve bu ismi 1665 yılında yayınladığı kitapta da kullanmıştır. Daha sonra 1671 yılında Grew ve 1672 yılında Malpighi, bitkilerde de aynı yapı birimlerinin olduğunu bulmuşlardır. 19. yüzyılın ortalarında "hücre kuramı" ortaya atılmıştır. Günümüze dek geliştirilen hücre kuramı (hücrelerin yapısını, özelliklerini, oluşumlarını vb. tanımlayan kuram) biyolojide büyük ilerlemeler sağlamıştır. Atomların molekülleri, moleküllerin makro molekülleri, makro moleküllerin makro moleküler kompleksleri oluşturmasıyla, dokuların en küçük yapı taşları olan ve yaşamın tüm özelliklerini sergileyen hücreler oluşmaktadır.



Şekil 2.1. Hücre ve Organelleri (Anonim, 2009)

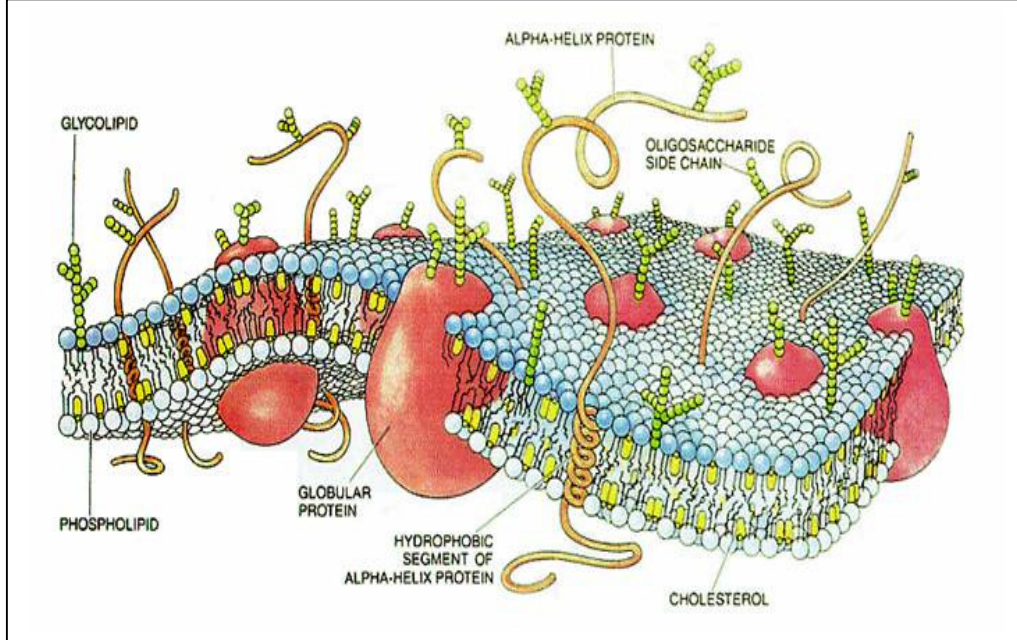
Genel olarak tüm hücreler temelde aynı yapıya sahiptirler. Fakat buldukları dokuya ve dolayısıyla fonksiyonlara bağlı olarak bazı özelleşmeler gösterirler. Bitkisel ve

hayvansal her organizma, bu temel yapı taşlarından oluşur. Hücreler, çoğunlukla bir zar içerisindeki sitoplazma ve çekirdekten meydana gelir ve ancak mikroskop yardımı ile görülebilirler (Anonim, 2003).

2.2. Hücre Zarı

Hücre zarı, oldukça karmaşık ve devingen yapısıyla, hücre canlılığının çok önemli bir bileşenidir. Hücre canlılığının ve özgün hücre işlevlerinin sürekliliğini mümkün kılan çok önemli bazı fonksiyonları yerine getirir (Anonim, 2008).

Hücre zarı ya da hücre membranı, hücrenin dış kısmında bulunan, molekülleri özelliklerine göre hücre içine alan veya dışarı bırakan katmandır. Hücre zarının yapısıyla ilgili çok sayıda model düşünülmüş fakat en sonunda mozaik zar modeli denilen model kabul edilmiştir



Şekil 2.2. Hücre Zarının Yapısı (Anonim, 2008)

Bu modelde proteinler zarın hem iç, hem dış yüzeyinde mozaik şekilde dağılırlar ve devamlı bir tabaka meydana getirmezler. Hücre zarında bulunan zar proteinleri; bu

modelde yağ tabakasının her iki yüzünde olan ekstrinsik proteinler, yağ tabakasının içine gömülmüş olanlar ise; intrinsik proteinler olarak kabul edilmiştir. Hücre zarı lipit denizinde yüzen, protein ve glikoproteinlerden yapılmış, almaç denilen özel bölgelerle dışarıya açılır (Anonim, 2008).

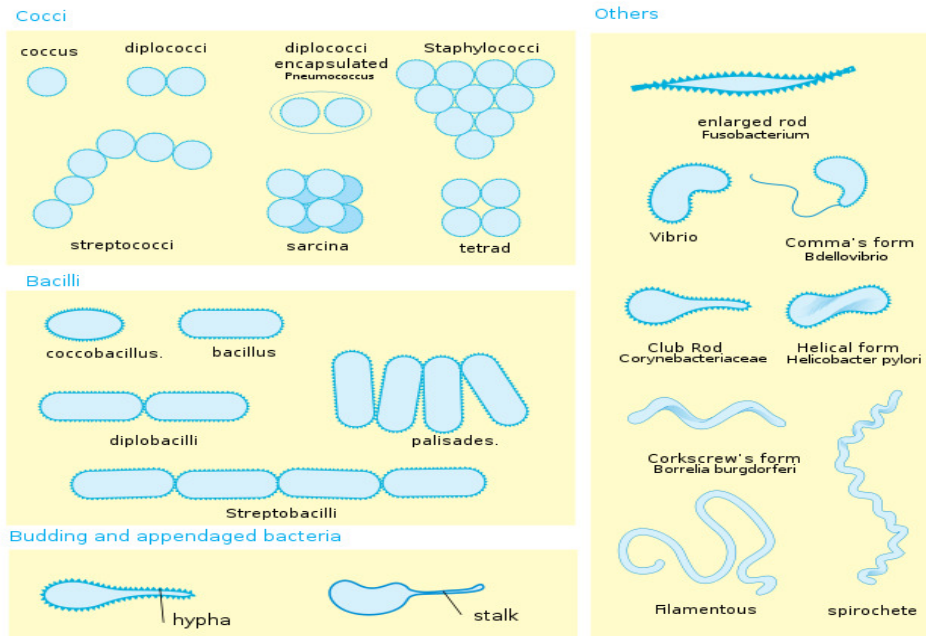
2.3. Hücre Zarının Özellikleri

- Hücre içi ile hücre dışı ortamlar arasında seçici bir şekilde madde alışverişini sağlayarak hücrenin atıklarını hücre dışı ortama verir, hücre dışından hücreye gerekli maddeleri alır ve hücre içi ortamın özgün yapısını korumaya yardımcı olur.
- Komşu hücrelerle iletişimi ve madde alışverişini sağlar.
- Hücreyi dış ortamdan ayırır.
- Hücreye şekil verir.
- Madde giriş-çıkışını düzenler.
- Canlı yapıdadır.
- Kalınlığı 6-10 nm'dir.
- Protein, yağ ve karbonhidratlardan oluşur.
- Aktif taşıma olayını düzenler.
- Hücrenin beslenmesine yardımcı olur.
- Komşu ve yabancı hücreyi bulur.
- Hücreye alınacak hormonları tanır.
- Hücrenin yıpranan kısımlarını onarır.

- Metabolizma atıklarının dışarı atılmasını sağlayarak iç ortamı düzenler.
- Hücre içi ortamın özgün bileşimini hücre dışı ortamdaki ayırır.
- Prokaryot hücreye sahip canlılarda zardaki solunum enzimleri sayesinde enerji üretimi sağlanır (Anonim, 2008).

2.4. Bakteriler

Mikroorganizmaların keşfinden önce, doğada var olan bütün canlıların hayvan ve bitki kaynaklı olduğu düşünülürdü. 1600'lü yıllarda Antony van Leeuwenhoek tarafından mikroskopun bulunmasıyla, hayvan ve bitkilerin yanı sıra mikroskopik canlıların da var olduğu ortaya çıkmış, bu canlıların insanlarda hastalık yaptığı ortaya çıkınca önemleri artmış ve günümüzde bile hala üzerlerinde araştırma yapılmaya devam edilmiştir (Arda, 1999).



Şekil 2.3. Bakterilerin Şekilleri (Anonim 2003)

Bakteriler tek hücreli mikroorganizma grubudur. Tipik olarak birkaç mikrometre uzunluğunda olan bakterilerin çeşitli şekilleri vardır, kimi küresel, kimi spiral şekilli, kimi çubuksu olabilir. Yeryüzündeki her ortamda bakteriler mevcuttur.

Toprakta, deniz suyunda, okyanusun derinliklerinde, yer kabuğunda, deride, hayvanların bağırsaklarında, asitli sıcak su kaynaklarında, radyoaktif atıklarda büyüeyebilen tipleri vardır. Tipik olarak bir gram toprakta bulunan bakteri hücrelerinin sayısı 40 milyon, bir mililitre tatlı suda ise bir milyondur; toplu olarak dünyada beş nonilyon (5×10^{30}) bakteri bulunmaktadır. Bunlar dünyadaki biokütlenin çoğunu oluşturur. Bakteriler gıdaların geri dönüşümü için hayati bir öneme sahiptirler ve gıda döngülerindeki çoğu önemli adım, atmosferden azot fiksasyonu gibi, bakterilere bağlıdır. Ancak bu bakterilerin çoğu henüz tanımlanmamıştır ve bakteri şubelerinin sadece yaklaşık yarısı laboratuarda kültürlenebilen türlere sahiptir (Anonim, 2010).

Bir tek bakteri hücresinin katı bir yüzey üzerinde kümeler halinde çoğalarak oluşturduğu topluluğa koloni denir (Drlica, 2003).

İnsan vücudunda bulunan bakteri sayısı, insan hücresi sayısının on katı kadardır. Özellikle deride ve sindirim yolu içinde çok sayıda bakteri bulunur. Bunların çok büyük bir çoğunluğu bağışıklık sisteminin koruyucu etkisiyle zararsız kılınmış durumda olsalar, ayrıca bir kısmı da yararlı (probiyotik) olsalar da, bazıları patojen bakterilerdir ve enfeksiyöz hastalıklara neden olurlar; kolera, frengi, şarbon, cüzzam ve veba bu cins hastalıklara dahildir. En yaygın ölümcül bakteriyel hastalıklar solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Bunlardan verem tek başına yılda iki milyon kişi öldürür. Bunların çoğu sahra altı Afrika'da bulunur. Kalkınmış ülkelerde bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve çeşitli hayvancılık faaliyetlerinde antibiyotikler kullanılır. Bundan dolayı antibiyotik direnci yaygınlaşmaktadır. Endüstride bakteriler, atık su arıtması, peynir ve yoğurt üretimi, biyoteknoloji, antibiyotik ve diğer kimyasalların imalatında önemli rol oynarlar (Anonim, 2010).

2.5. Koliform Bakteriler

2.5.1. Koliformların Sınıflandırılması

Enterobacteriaceae familyasında yer alan fakültatif anaerob, gram negatif, sporsuz, laktozdan asit ve gaz oluşturan çubuk şeklindeki mikroorganizmalardır. Citrobacter, Enterobacter, Escherichia ve Klebsiella bu grupta yer almaktadır. Doğada koliform grubu mikroorganizmalara sıkça rastlamak mümkündür. Koliform grubu mikroorganizmaların hepsi dışkı kökenli değildir. İnsan ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemlerinde gelişen grup, fekal koliform olarak tanımlanmakta ve bunların varlığı kesinlikle fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak gösterilmektedir. Bu grubun en yaygın üyesi *E. coli*'dir. Grubun diğer üyeleri toprak ve bitki kökenli saprofit koliformlardır.

Fekal koliformların analizi su, kabuklu ve kabukluların elde edildiği suyun analizi hariç 45,5°C'de yapılır. Su, kabuklu ve kabuklu suyunun analizi ise 44,5°C'de yapılır (Entis, P. 1989). Fekal koliform grubunun çoğunluğu *E. coli*'den ibarettir. Fakat bu ısıda laktozu fermente edebilen Klebsiella gibi diğer enterikler de fekal koliform olarak belirtilmektedir (Feng ve Ark., 1982).

1892 yılında Sharding *E. coli*'nin fekal kontaminasyonun, bir indikatörü olduğunu ileri sürmüştür. Bunun nedeni, *E. coli*'nin yaygın bir şekilde insan ve hayvan dışkısında bulunması ve diğer yerlerde bulunmamasıdır. Üstelik *E. Coli* glukozu fermente etme yeteneğinden dolayı kolay bir şekilde izole edilir, bundan dolayı bilinen diğer gastro intestinal patojenlerden daha kolay izole edilir. *E. coli*'nin gıda ve suda bulunması fekal kontaminasyonun bir göstergesi olmasının yanı sıra bilinen diğer patojenlerin varlığını ortaya koyma ihtimalinin de göstergesidir. Sağlık risklerinin indirekt bir indikatörü olarak *E. coli*'nin kullanım konsepti güvenilir olsa da uygulama komplikedir. Çünkü ortamda laktozu fermente edebilen Enterobacter, Klebsiella ve Citrobacter gibi diğer enterik bakteriler fenotipik olarak *E. coli*'ye benzemektedir. Bu yüzden bunlar kolay bir şekilde belirlenemez. Bunun sonucunda koliform terimi bu grup enterik bakterileri içine alan bir terim olarak tanımlanmaktadır. Koliformlar taksonomik bir sınıflandırmaya

sahip değildir fakat laktozu 35°C'de 48 saatte fermente ederek asit ve gaz oluşturan gram negatif, fakültatif anaerob, çubuk şeklindeki bakteriler grubunda yer alırlar (Feng ve Ark., 1982).

Koliformların izolasyonları düşük maliyetli ve kısa süreli olduğu için Salmonella ve Shigella gibi spesifik patojen mikroorganizmaların varlığını tespit etmede indikatör olarak kullanılmaktadırlar. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında, deniz ve göllerde *E. coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmez. Fekal koliformlar 44,5 °C' de laktozu fermente ederek gaz oluştururlar (Çakır, 2000).

Koliformların bulunması su ya da gıda üretim yerlerinde sanitasyon kalitesinin bir indikatörü olarak kullanılır. Fekal koliformlar kabuklu ve kabuklunun elde edildiği su için standart indikatördür. *E. coli* ise fekal kontaminasyonun ya da hijyenik olmayan üretimin bir indikatörüdür (Sığırtmaç, 2008).

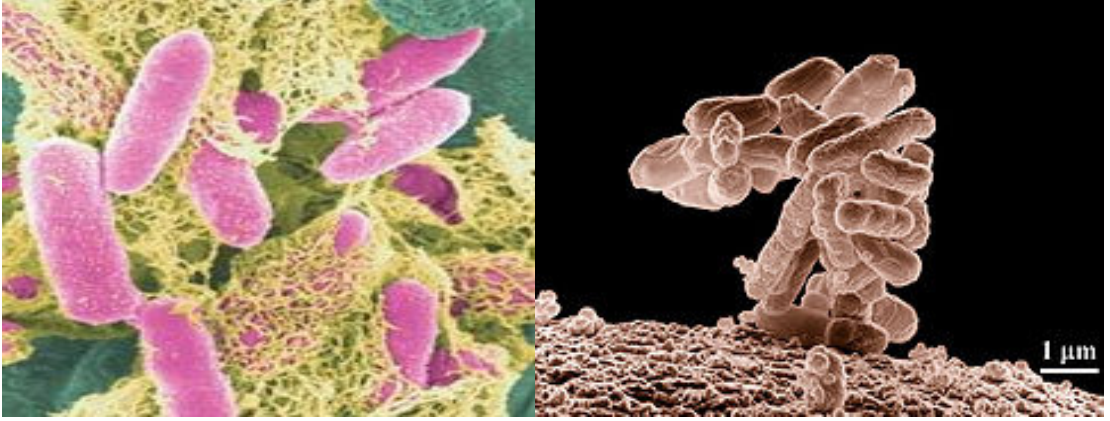
Escherichia coli fekal bir kontaminasyonun göstergesi olması yanında genetik yapısı en iyi bilinen canlı olma özelliğine de sahiptir. Suslarının birçoğu zararsız olan bu bakterinin bazı susları insanlarda arteriosklerozis, hemolitik üremik sendrom ve çeşitli immünolojik hastalıklar, menenjit, septisemi ve şiddetli ishaller gibi insan ve hayvanlarda ölüme sebebiyet veren enfeksiyonlara neden olmaktadır (Çakır, 2000).

2.6. *E. coli* (*Escherichia coli*)

Genelde *E. coli* kısaltması ile veya koli basili olarak bilinen *Escherichia coli* memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan faydalı bakteri türlerinden biridir (Anonim, 2009).

E.coli küçük miktarlarda rekombinant protein üretiminin yapılabileceği ve proteinlerin biyolojik özelliklerini anlamamızı kolaylaştıran en önemli biyolojik yapıdır (Feliu ve Ark., 1998).

İçme sularında *E. coli* varlığı ise kanalizasyon ya da hayvansal atıklardan kaynaklanan bir kirliliğin en güçlü kanıtıdır (Dehghani, 2005).



Şekil 2.4. *E.coli* Hücrelerinin Elektron Mikroskobu Altında Görünümü (Anonim, 2003)

E. coli hücre metabolizması üzerinde birçok konuda birçok araştırma yapılmış bir model organizmadır. *E. coli* bazen rekombinant protein üretiminde de kullanılabilir. Hücre içi proteinlerin saflaştırılması için ilk basamak hücrelerin parçalanmasıdır (Song ve Ark., 1997).

Koliform bakteri ailesindeki mikroorganizmaların yaşam alanları genelde insanların ve sıcakkanlı diğer canlıların sindirim sistemleridir. Koliform bakteriler su ortamına konulduklarında eninde sonunda ölürlür. Fakat *Salmonelle* ve *Shigella* bakterileri daha hızlı ölür ve su arıtma sistemlerinde bu bakteri türleri benzer zorluklar çıkarır. İşte bu yüzden koliform bakterilerin suda bulunması tehlikelidir ve o su güvenli değildir (Brock ve Ark., 1984).

Geçtiğimiz 30 yılda biyokimyada başta *E. coli* olmak üzere bakterilerle yapılan çalışmalar önemli yer tutmuştur. *E. coli* 'nin laboratuvar koşullarında kolaylıkla yetişmesi, boyutunun ufak olması, patojenitesinin olmaması ve yaygın bir mikroorganizma olması insandan sonra en çok çalışma yapılan canlı olmasına sebep olmuştur (Watson, 1976).

E. coli hücresinin boyu yaklaşık 2 mikrometre ve çapı 1 mikrometreden biraz küçüktür. Koruyucu bir dış zar ve iç plazma zarıyla stoplazması ve nükleoitini sarılmıştır. İç ve dış

zarlar arasında hücrenin şekil ve sertliğini sağlayan peptidoglikanlardan (aminoasitlerle çapraz bağlı şeker polimerleri) oluşan ince ancak güçlü tabaka bulunur. Plazma zarı ve onun dışındaki tabakalar, hücre zarfını oluşturur. Bakteri türleri arasında hücre zarfındaki farklılıklar mor menekşe boyasına karşı olan farklı ilginin nedenidir. Gram boyasının temeli de budur; gram pozitif bakteriler boyayı tutarken gram negatif bakteriler tutmaz. *E. coli*'nin dış zarı diğer gram negatif öbakterilerinki gibi yapı bakımından plazma zarına benzerken, bileşimi farklıdır. Gram pozitif bakterilerin (Örneğin *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) dış zarları yoktur ve plazma zarını saran peptidoglikan tabaka gram negatif bakterilerinkine göre çok daha kalındır. Arkae bakterilerde sertlik bir başka çapraz bağlı şeker polimerinin (yalancı peptidoglikan) bir farklı tipi tarafından sağlanır. Öbakterilerin plazma zarları, proteinlerin içine yerleştiği ince bir lipid molekülleri çift tabakasıdır. Arkae bakterilerin zarları benzer görünümde olmakla beraber öbakterilerinden çok farklı lipidleri vardır.

Plazma zarı iyonlar ve bileşikler hücre içine ve dışına taşıyabilen proteinlere sahiptir. Birçok öbakterilerin yine plazma zarlarında, ADP'den ATP sentezinde önemli rolü olan elektron taşıyıcı proteinler (Sitokromlar) bulunmaktadır. Fotosentetik bakterilerde plazma zarından türemiş iç zarlar klorofil ve diğer ışık tutan pigmentler içerir.

E. coli stoplazması yaklaşık 15000 ribozom, yaklaşık 1000 farklı enzimin her birine ait binlerce kopya, çok sayıda metabolit ve kofaktör ile çeşitli inorganik iyonlar içerir. bazı koşullarda polisakkarit granülleri ya da lipid damlacıkları birikir. Nükleoit ise, çembersel bir DNA molekülünü içermektedir. *E. coli* hücrelerini DNA molekülü kendisinin 1000 katı uzunlukta olmasına karşın, proteinlerle paketlenerek en uzun boyutu 1 mikrometreden küçük olan nükleoit şeklinde sıkıca katlanmıştır. Tüm bakterilerde olduğu gibi, genetik materyal bir zarla sarılmamıştır. Nükleoitteki DNA'ya ek olarak birçok bakterinin stoplazması, bir ya da daha fazla plazmid adı verilen daha küçük çembersel DNA bölümleri içerir. Doğal olarak bazı plazmidler çevrelerindeki toksinler ve antibiyotiklere karşı direnç kazanır. Laboratuarda, bu DNA bölümleri bakteriler için gerekli olmadığından deneysel uygulamalara yatkın ve moleküler genetikçiler için son derece yararlıdır.

DNA transferi işleminin gerçekleşebilmesi için alıcı hücre en az verici hücre kadar metabolik olarak aktif olmalıdır. Alıcı hücrelerin aç kalması ya da oksidatif

fosforilasyonlarındaki herhangi bir örtüşme durumu DNA transferinin başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olabilir (Birge, 2000).

Yaygın bir bakteri olmasından dolayı *E. coli* mikrobiyolojide sıkça çalışılmıştır ve moleküler biyolojide bir gereç haline gelmiştir. Yapısı bellidir, hayat bilimlerini çalışan her seviyede öğrenci ve araştırmacı için ideal bir araştırma organizmasıdır (Anonim, 2007).

Bakteriyel konjügasyon, genetik rekombinasyon, operon kavramları ilk *E. coli* 'de keşfedilmiştir. DNA'nın çoğalması, RNA transkripsiyonu, protein sentezi gibi, moleküler biyolojinin pek çok önemli mekanizması, metabolizmanın çoğu ayrıntısı bu organizmada yapılan araştırmalarla anlaşılmıştır. En az on Nobel Ödülü *E. coli* 'de yapılan araştırmalara dayanır (Anonim, 2007).

E. coli' nin modern biyoloji mühendisliğinde önemli bir yeri vardır. Araştırmacılar bu bakteriyi büyük miktarda DNA veya protein üretmek amacıyla bir fabrika gibi kullanırlar. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk faydalı uygulamalarından biri *E. coli* 'nin manipüle edilerek onun diyabetli hastalar için insülin üretmesini sağlamak olmuştur (Anonim, 2007).

Son on yılda biyokimya, moleküler biyoloji ve bakteriyolojideki ilerlemeler, bakterilerin antikanser ajan olarak kullanımının yanı sıra, antikanser ilaçların verilmesinde kemoterapiye duyarlı ajan ve gen tedavisi için vektör olarak kullanımına kadar kullanışlı birçok yönlerini ortaya koymuştur (Anonim, 2004).

Laboratuarda kullanılan standart *E. coli* suşunun adı K12'dir. *E. coli* K12'nin ve O157:H7 serotipli bir suşun genom dizinleri çözülmüştür. K12 genomu yaklaşık 4200 genden oluşmaktadır. O157:H7 genomu ise K12'ninkiden %25 daha büyüktür. K12 suşu hastalık yapan faktörler taşımaz ve hatta K12'nin ilk izolasyonundan günümüze geçen yıllar zarfında kapsül yapma yeteneğini kaybederek laboratuvar ortamına uyum sağlamış, artık doğal ortamında (yani insan bağırsağında) başka *E. coli* türleriyle rekabet edemeyecek kadar zayıflamıştır (Anonim, 2007).

Özellikle *Escherichia coli* genleri ve enzimleri, kansere karşı vücut dışında etkisiz olan fakat vücut içinde oldukça aktif türlerine dönüşebilen ön-ilaç uygulamalarında yer almaktadır. Ayrıca *Pseudomonas* ekzotoksinlerine konjuge edilmiş IL-4, direkt olarak malignan beyin tümörlerine uygulanmış ve normal beyin hücreleri haricindeki hücrelerin IL-4 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlandığı görülmüş ve böylece normal beyin dokusuna zarar vermeden tümörün büyük bir kısmının tahrip edildiği saptanmıştır. Bu derleme, bazı kanser tiplerinin tedavisi için kullanılan bakteriyel orijinli antikanser ajanlar üzerine odaklanmıştır (Anonim, 2004).

2.7. *Escherichia coli*'nin Sınıflandırılması

Escherichia coli, Alman pediatrist Theodor Escherich tarafından 1885 yılında identifiye edildi ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırıldı (Sığırtmaç, 2008). Barsak dışı enfeksiyonlarda patojenliği anlaşılmış ve 1919 yılında Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilinceye kadar *Bacterium coli* adı kullanılmıştır (Bilgehan, 2000). *Escherichia coli*, normal barsak florasında zorunlu anaerob bakterilerden 100 kat daha az bulunmasına rağmen, rutin dışı kültürlerinde sıklıkla izole edilen bir bakteridir. Barsak dışı vücut bölgelerinde önemli bir fırsatçı patojendir. 1960'lı yıllardan beri bazı *E. coli* kökenlerinin barsakta patojen olduklarına ilişkin bilgiler artmaya başlamıştır (Erdem, 1999).

2.8. *E. coli*'nin barsaklarda oluşturduğu infektifite mekanizmaları.

2.8.1. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC)

Bu suslar bir ya da daha çok verositotoksin üretirler. İshaller sulu ve kanlıdır. Gelişmiş ülkelerde infantil diyarelerin sebebidir. Enteropatojenik *Escherichia coli* (EPEC) salgını kontamine bazı et ürünlerinin yanı sıra kontamine içme suyunun tüketimi ile ilgilidir. Yetişkin insanlarda EPEC'in infektif dozu 10^6 organizmadır. EPEC' in patojenitesi bağlayıcı ve yok edici lezyonlara neden olan intimin proteinini içerir (Hicks ve Ark.,

1998). Fakat bakterinin barsak hücrelerine yapışıp lokalize olmasını sağlayan EPEC adherens faktör olarak bilinen plazmid encoded proteinini de içerir. Hastalık sırasında ateş yüksektir. Shiga benzeri toksinleri yüksek seviyelerde üretmezler (Feng ve Ark., 2002) .

2.8.2. Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)

Genellikle düşük bir ateşe neden olabilirler ya da ateş görülmez. Sulu bir ishale neden olurlar ve tipik gastroenteritis etmenidirler. Turist ishali olarak tanımlanan hastalıklara ve özellikle sıcak mevsimlerde bebek ishallerine neden olurlar. Enfektif dozları yüksektir. Yetişkin insanlarda doz en azından 10^8 hücre olarak belirlenmiştir. Fakat gençler, yaşlılar ve hastalar daha düşük hücre seviyesinde hastalığa duyarlı olabilirler. infektif dozu yüksek olduğundan dolayı Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC)'nin analizi gıdalarda yüksek seviyelerde *E. coli* bulunmadıkça yapılamaz. ETEC belirlenirse kontamine gıdaların potansiyel tehlikesinin de göz önünde bulundurulması gerekir (Çakır, 2000).

2.8.3. Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC)

Enteroinvaziv *E. coli* susları genellikle laktoz negatif ya da laktozu geç fermente eden, lizini dekarboksilize etmeyen, anaerojenik, hareketsiz olma gibi atipik özellikler taşıyan mikroorganizmalardır. Diğer enterovirulent tiplerden farklı olarak, invaziv özellik taşırlar ve fekal lökositlere rastlanır. Mukoid ve kanlı bir dışkı görülür. Ateş yüksektir, enterotoksin yapmazlar. Bu gruba giren bakterilerde enfektif doz düşüktür (Çakır ve Ark., 2001). Enteroinvaziv *Escherichia coli* ve Shigella genetik olarak neredeyse aynıdır ve yaygın olarak birçok antijene sahiptir. Shigella, 10 ile birkaç yüz hücre oranında infektif doza sahip iken Enteroinvaziv *Escherichia coli* (EIEC)'nin sağlıklı yetişkinlerde enfeksiyon meydana getirmesi için en az 10^6 organizmaya ihtiyacı vardır. Tipik *E. coli*'nin aksine EIEC hareketsiz, lizini dekarboksilize etmeyen, anaerojenik, laktozu fermente etmeyen mikroorganizmalardır. EIEC'in patojenitesi temel olarak kolonik dokulara invaze olması ve onları tahrip etmesine dayanır (Feng ve Ark., 2002).

2.8.4. Verositotoksinojenik *Escherichia coli* (VTEC)

Verositotoksin *Escherichia coli* ya da Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) vero hücrelerine karşı (Vero hücreleri: Afrika yeşil maymun böbrek hücre kültürü) sitotoksin üreten *E. coli* suslarıdır. EHEC susları çeşitli toksinler oluştururlar ve bunlardan sadece bir kaçı tanımlanabilmiştir. EHEC, hemorajik kolitis ya da potansiyel olarak ölümcül olan hemolitik üremik sendrom (HUS)'a yol açabilen kanlı diyareye neden olur. İlk kez 1955 yılında tanımlanmış olan hemolitik üremik sendrom (HUS), en fazla ölüme neden olan hastalıktır. Sulu ve çok kanlı bir dışkı görülür ancak ateş yoktur. EHEC verotoksin ya da Shiga toksin üretimi ile belirlenir. O'Brien ve ark. (1982)'nin bu verotoksin ile *Shigella dysenteriae* tip 1'in sigatoksini arasındaki yakın ilişkiyi göstermesiyle, bu mikroorganizma literatürde Shigella benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC) olarak adlandırılmıştır.

2.8.5. Enteroagregatif *Escherichia coli* (EaggEC: EAEC)

Bu suslar hayvanlarda epidemiyolojik çalışmalardan sonra ortaya çıkmıştır. Tropik ülkelerde, çocuklarda süreklilik gösteren ishale ve ayrıca her yasta akut diyareye neden olan bir virotiptir (Halkman ve Ark., 2001). Enteroagregatif *E. coli* mikroskop altında tuğla yığını görüntüsü veren, otoaglutinasyona yol açan birbirine yapışık bakterilerdir (Bilgin, 2006).

2.8.6. Difuz Aderent *Escherichia coli* (DAEC)

Enteroagregatif *E. coli*'den daha az karakterize edilmiştir. Daha önceden EPEC grubunda yer alan ve Hep-2 hücre modeline göre diffuz adezyon ile karakterize edilen bu grup diffusively adherent *Escherichia coli* (DAEC) olarak adlandırılmıştır. Çocuklarda süreklilik gösteren diyareye neden oldukları bildirilmiştir (Halkman ve Ark., 2001).

2.9. *E. coli*'nin barsak dışında oluşturduğu infektifite mekanizmaları

2.9.1. Üropatojenik *Escherichia coli* (UPEC)

Sistitis ve pyelonefritise sebebiyet veren bu suslar sıklıkla hastalardan izole edilmiştir (Anonim, 2008). Birçok virulens faktör taşıdığı ve bu virulens faktörlerden en önemlisinin P fimbria olduğu, bunun P grubu kan antijenlerine bağlandığı ve bu antijenin üroepitelyanın %99'unda bulunduğu, aerobaktin ile hemolizin salgıladığı bildirilmiştir (Bilgehan, 2000).

2.9.2. Neonatal Meningitis *Escherichia coli* (NMEC)

Escherichia coli'lerin %80'i yeni doğanlarda meningitis yapmaktadır. Meningitise neden olan ve %80 kadarı da Niesseria meningitidis antijenine benzer K1 kapsül antijeni içeren bu etkenlere daha çok anne dışkısında rastlanılmaktadır (Bilgehan, 2000). Ayrıca az da olsa yaşlılarda da menenjitte sebep olurlar ve mortalitesi yüksektir (Erdem, 1999).

2.10. *Escherichia coli*'nin Rutin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

Herhangi bir gıda maddesinde *Escherichia coli*, total koliform ya da fekal koliformların izolasyonu ve sayılması için kullanılan metotlar, koliform grup aranmasını kapsamakta ve hemen hepsi laktozun fermentasyonuna dayanmaktadır (Çakır, 2000).

2.10.1. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

Koliform grup bakteriler, fekal koliform grup bakteriler ve *E. coli* sayılmasında kullanılan bu yöntem varsayma, doğrulama, tamamlama fazından ibaret multi basamaklı istatistiksel bir metottur (Anonim, 1992). Türk Standartlar Enstitüsü (TSE), Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) ve American Public Health Association (APHA)'nin

belirlediği uygun besiyerlerine numunelerin ekimleri yapılarak *E. coli*, koliform ve fekal koliform varlığı belirlenebilir (Çakır, 2000).

2.10.2. Katı besiyeri yöntemi

Bu yöntemden izolasyon amaçlı sayım çalışmalarında yararlanılır. Daha çok katı besiyeri olarak Violet Red Bile (VRB) Agar kullanılır (Çakır, 2000). Koliformların katı besiyerinde izolasyonu için kullanılan VRB Agar neutral red içermektedir. Buda laktozu fermente eden kolonilerin pembe renkte üremesini sağlamaktadır (Feng ve Ark., 2002). Koliform grup bakteri aranmasında kullanılan diğer katı besiyerleri ise; Enrichment Lauryl Sulphate, Aniline Blue Agar, Fecal Coliform Agar, Brilliant Gren Agar, Endo Agar ve benzerleridir (Çakır, 2000).

2.10.3. Membran filtrasyon yöntemi

Su ve diğer sıvı gıdaların analizinde kullanılan bir yöntemdir (Feng ve Ark., 2002). Koliform ve fekal koliformların laktozun fermentasyonuna bağlı olarak oluşturdukları aldehitin ölçümüne dayanmaktadır (Çakır, 2000). Örnek, membran filtreden geçirilerek bakterilerin filtre üzerinde tutulması amaçlanmıştır. Bu filtreler daha sonra uygun bir besiyeri üzerine arada hava kalmayacak şekilde yerleştirilerek oluşan koloni sayısına bakarak materyaldeki mikroorganizma sayısı belirlenir. Örnekte az sayıda mikroorganizmanın bulunması halinde bu yöntemle belirlenmesi ve inkübasyondan sonra filtrelerin tekrar kullanılabilmesi, filtrasyon tekniğinin önemini ve avantajını vurgulamaktadır. Bu yöneme göre, fekal koliform sayımında filtre TSA besiyerine yerleştirildikten sonra katı gıdalar için 25°C’de 4–5 saat, diğer gıdalar için 35°C’de 4–5 saat inkübe edilerek dejenere olmuş, stres altındaki bakterilerin tekrar aktivite kazanmalarını sağlayarak ön inkübasyon uygulanmaktadır. Daha sonra filtreler buradan m-FC Agar besiyerine alınır ve 44.5°C’de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bir ya da daha fazla mavi renkli koloni gelişimi görülen alanlar işaretlenerek sonuç değerlendirilir. Tamponlanmış Trypton Bile Agar, m-ENDO Agar, besiyeri emdirilmiş steril pedler, membran Tergitol–7 kullanılan diğer besiyerleridir. Türk Standartlar

Enstitüsü (TSE), Amerikan Halk Sağlığı Kuruluşu (APHA) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) koliform ve *E. coli* için kullanılan standart analiz yöntemlerini belirlemişlerdir. Türk Standartlar Enstitüsü (TSE) ve Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO)'nün koliform grup mikroorganizma aramak için kullanılan standart analiz yöntemlerine göre, örnek hazırlanıp dilasyonları yapıldıktan sonra 5 dilusyondan 3'er adet Lauryl Sulfat Triptoz Broth besiyerine 1'er ml ekim yapılır ve 37⁰C'de 24–48 saat inkübe edildikten sonra pozitif sonuç veren tüpler muhtemel koliform olarak değerlendirilir (Çakır, 2000).

A) Toplam *Enterobacteriaceae*'nin İzolasyonu

Safra varlığında bu grup bakteriler glukozdan asit oluşturarak gelişir. Violet Bile Glucose Agar bu amaçla kullanılan bir besiyeridir (Sığırtmaç, 2008).

B) *Coli-aerogenes* bakteriler izolasyonu

Safra ya da benzer selektif ajanların varlığında 30° C'de laktozdan asit ve gaz oluştururlar (Sığırtmaç, 2008).

C) Koliform bakteri izolasyonu

Safra ya da diğer benzer selektif ajanlar varlığında 35–37°C' de laktozdan asit ve gaz üreterek gelişirler (Sığırtmaç, 2008).

D) Fekal koliform bakterilerin izolasyonu

Safra ya da diğer benzer selektif ajanların varlığında 44–45.5°C' de laktozdan asit ve gaz üreterek gelişirler. Burada ısı kritik nokta olarak belirlendiğinden bu test daima ısı banyosunda yapılmalıdır (Sığırtmaç, 2008).

E) *Escherichia coli* izolasyonu

44–45,5°C’ de laktozdan asit ve gaz oluşturan koloniler indol pozitif, Metil red pozitif, Voges proskauer negatif, Sitrat negatif (IMVİC) testleri uygulandıktan sonra *E. coli* tipl olarak değerlendirilir. Fakat şunu belirtmek gerekir ki verositotoksijenik *E. coli* O157:H7, 44°C’ de çok zayıf bir şekilde gelişir. Buna ilaveten çoğu taksonomist Shigella’nın (Enteroinvaziv *E. coli*’nin bazı serovarları ile benzer özelliklerinden dolayı) *Escherichia* sınıfından ayırt edilmesinin imkânsız olduğunu düşünürler (Harigan, 1998).

F) *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC)’ nin izolasyonu

İzolasyon %1 sorbitol içeren Mac Conkey (SMAC) Agarda yapılır. Bu besiyeri sefiksim ve potasyum tellurit eklenerek elde edilen besi yeri olan CT-SMAC agar daha fazla selektif edilebilir. Plaklar 37°C’ de inkübe edilir. Renksiz koloniler analiz edilir (Harigan, 1998).

2.11. *Escherichia coli*’nin hızlı İdentifikasyon teknikleri

2.11.1. Selektif besiyerlerine dayalı yöntemler

2.11.1.1. LST-MUG yöntemi

Son yıllarda *E. coli* belirlenmesinde kullanılan 4-methyleumbelliferyl (MUG), Lauryl sulfate Tryptose (LST) besiyerine katılarak *E. coli*’nin yapısında bulunan β -D glucurinidase enzimi sayesinde 4- methyleum belliferon’a dönüşür. 4-methyleum belliferon 365 nm uzunluğundaki UV ışığına maruz kaldığında besiyerinde ya da koloni etrafında mavimsi floresan vererek koloninin tanımlanmasını kolaylaştırır. MUG başlıca LST ve VRB agar olmak üzere *E. coli*’nin izole edilebileceği bütün besiyerlerine rahatlıkla eklenebilir. Fakat *E. coli*’nin, Eosin Metilen Blue (EMB) agarda oluşturduğu

yeşil floresan MUG'un oluşturduğu mavimsi floresanı baskılayabileceğinden, EMB agara MUG ilave edilmesi sahte negatif sonuçlara yol açabilir (Doyle, 1987).

2.11.1.2. Kromojenik-fluorojenik substrat + MUG

E. coli aranması amacıyla en yaygın kullanılan besiyeri olan Lauryl sülfat MUGX-GAL (LMX) brotudur. Bu besiyerinin içeriğinde bulunan kromojenik substrat (5-Bromo-4-kloro-3-indol- β -D galaktopiranozid), koliformlar tarafından parçalanmakta ve yeşil renk oluşmaktadır. Yine bu besiyeri içerisinde bulunan MUG, *E. coli* varlığında parçalanmakta ve mavi floresan vermekte ve bu analizin sonucu 18 saat içerisinde elde edilmektedir (Pitkanen ve Ark., 2007).

2.11.1.3. API20 E

API20 E test çubuğu, gram negatif enterik bakterilerin belirlenmesinde kullanılan 20 seçkin test kompartımanını içerir. Kompartımanların içerisinde bulunan maddeler dehidredir. Her bir kompartımanın içeriği bakteriyel süspansiyonla rehidre edilebilir. Bazı kompartımanlar pH değişimine bağlı olarak farklı renklere sahiptir. Diğer kompartımanlar üretilen son ürüne bağlı olarak reaktiflerle belirlenmek zorundadır (Anonim, 2007).

2.11.2. Antikor-Antijen kompleksine dayalı yöntemler

2.11.2.1. İmmunoblotting ve İmmunopresipitasyon metotları

Bu metotların bilinen belirli antijen ya da antikorların seviyesini ölçmek için yararlı oldukları bildirilmektedir. Özellikle kompleks bir miks türden bilinmeyen antijenleri tanımlama ve karakterize etmek için immunoblotting yararlı bir şekilde kullanılır (Roitt ve Ark., 1996).

2.11.2.2. Radyoimmunoassay

Solid faz üzerindeki antijen-antikor kompleksine radyoizotop işaretli (Genel olarak işaretleme iyot gibi gamma yazıcı izotoplarla yapılır) antijen bağlanması ile olur. İşaretli ajanlar, bağlanma bölgesinde antijenlerle ve doymuş antikorlarla bir konsantrasyonda karıştırılır (Kuby, 1998).

2.11.2.3. İmmunofloresan tekniği

Hücre, doku bölümünde bağlı olan antikorlar floresan bir boya ile işaretlenerek antikor molekülleri görülebilir. İmmunofloresan olarak bilinen bu teknikte en yaygın kullanılan floresan boyalar, fluorescein ve rhodamine'dir. Her iki boya antikorun spesifitesini etkilemeksizin antikorun Fc bölgesi ile birleştirilebilir. Her iki boya bir dalga boyundaki ışığı absorbe eder ve daha uzun dalga boyunda ışık yayar. Yayılan ışık genellikle UV ışığı kaynağı ile desteklenen floresan mikroskobu ile görülür (Kuby, 1998).

2.11.3. Enzime dayalı yöntem

2.11.3.1. Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

1970'li yıllardan beri immunoassay performansa karşı standart olan Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA), ölçümde kullanılır. Belki de en yaygın kullanılan, en iyi anlaşılan immunoassay yöntemidir. ELISA birçok formatta geliştirilmiştir. Konakçı antikor üretimine cevabı ya da enfeksiyon ajanındaki antijenleri belirleyebilir. Solid faz üzerinde antijenin bazı determinantlarına spesifik antikorların, diğer determinant gruplarına da enzim işaretli antikorların bağlanması ve substrat aracılığı ile enzim aktivite düzeyinin foto kolorimetre ile ölçülmesi prensibine dayanır (Andreotti ve Ark., 2003).

2.11.4. Gene Dayalı Analizler

2.11.4.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Son yıllarda *E. coli*'nin belirlenmesinde sıkça karşılaşılan doğrulama analizleri gibi problemler gene dayalı belirleme metotları ile elimine edilmektedir (Hu ve Ark., 1999). Gen prob teknolojisi sadece belirlemeyi hızlandırmakla kalmaz aynı zamanda ek doğrulama testlerini de elimine eder. Hızlı gene dayalı metotlar arasında en iyi bilineni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. PCR yüksek derecede duyarlılık ve spesifite sağlar, ayrıca birkaç saat içerisinde sonuç verir. Son yıllarda *E. coli*'nin belirlenmesinde direkt DNA tabanlı metotlarının kullanımı dikkat çekmiştir. β -D glukronidase (GUD) ile kodlanmış art arda dizili *uidA* geni ve glutamatdekarboksilaz (GAD) ile kodlanmış *gad A-B* geni en sık kullanılan probdur (Martins ve Ark., 1993). *uidA* ve *gad A-B* genleri, çoğu *E. coli*'de belirlenmiştir (McDaniels ve Ark., 1996). Çeşitli çalışmalar Shigella türleri *E. vulneris* ve *E. fergusonii* gibi en azından çok sayıda bakterinin *uidA* genotip analizinde sahte pozitif sonuç verdiğini göstermiştir (Rice, 1995). Buna ilaveten PCR hedef organizmada bulunan bütün DNA'ları tespit eder ve canlı hücreler ile canlı olmayan hücreler arasındaki farkı belirleyemez (Lindahl, 1993). Bu da içilebilir suda su güvenliği ve suyun islenmesi ile ilgili canlı ve ölü organizmalar arasındaki farkı belirtmede önemlidir (Jeffrey ve Ark., 1994).

2.11.4.2. Hibridizasyon yöntemi

Hücre kültürüne ait genetik materyallerdeki spesifik genlerin, işaretli problarla ortaya konması ve sayısal olarak çoğaltılması esasına dayanır (Kuby, 1998).

Bakterilerin organik maddelerin transformasyonundaki rolü 19'uncu yüzyılın ortalarına kadar anlaşılamamıştır. Buna rağmen insanoğlu ilk çağlardan beri mikroorganizmaları gıda (peynir, ekmek, bira, şarap, sirke vs.) alanında kullanagelmiştir. Son yıllarda biyokimya ve moleküler biyolojideki gelişmeler mikroorganizmaların anti-kanser ajan olarak özellikle kanser tedavisinin omurgasını oluşturan kemoterapide kullanımını

gündeme getirmiştir. Kanser gen tedavisinde onkolitik ajan olan virüslerin vektör olarak kullanımı çok iyi bilinmesine rağmen, bugüne kadar bakterilerin antikanser potansiyeli ile ilgili fazla araştırma yapılmamıştır. İlk kez 1978’de malignant beyin tümörleri için bakteriler onkolitik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan bu çalışmada, hastalık oluşturmayan *Clostridium butyricum* M55 sporlarının karotid artere enjeksiyonu yapılmıştır. Bu sporlar beyin tümörlerine ulaştıktan bir hafta sonra da onkolizis olduğu gözlenmiş ve cerrahi olarak çıkarılmıştır Benzer olarak, bakteriyoloji ve moleküler biyolojideki gelişmeler, kanser tedavisinde bakteriyel uygulama alanlarını ve olanakları genişletmiştir (Anonim, 2004).

Antikanser ajan olarak mikroorganizmaların kullanım alanları şunlardır.

1. Onkolitik ajan olarak patojenik bakterilerin kullanımı,
2. Antikanser ilacı yapan ajanlar olarak bakterilerin kullanımı,
3. Tümörün seçici olarak tahribi için bakteriyel toksinler ve genetik olarak modifiye edilmiş bakterilerin kullanımı,
4. Kanser gen tedavisi için *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica*’nın bakteriyel vektör olarak kullanımı,
5. Kemoterapide kansere duyarlı bakterilerin kullanılmalrı,
6. Bazı mikrobiyal orijinli enzimlerin kanser tedavisinde ilaç olarak kullanımı (Anonim, 2004).

2.12. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisinin ürünleri, proteinlerden işlenmiş organizmalara kadar değişmektedir. Yararlı proteinlerin büyük ticari miktarları bu tekniklerle oluşturulabilmektedir. Mikroorganizmalar özel amaçlar için tasarlanabilmektedir; bitkiler veya hayvanlar yararlı özellikleriyle tarım ya da tıpta kullanılmak üzere, genetik yönden işlenmektedir. Genetik mühendislik birkaç yıldan beri umut veren bir teknolojiden milyarlarca dolarlık bir endüstriye dönüşmüştür. Büyümenin çoğunlukla ilaç endüstrisinde yoğunluk kazandığı görülmektedir. Eritropoietin, teknolojinin daha yeni ürünlerinden tipik olanıdır ve eritrosit üretimini uyaran bir protein hormonudur. Böbrek hastalığı olan insanlarda bu proteinin eksikliğinde kansızlık görülmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisiyle oluşturulan eritropoietin, bu tür insanların tedavisinde kullanılabilir; hedef, tekrarlayan kan nakillerini azaltmaktır.

Bu teknolojinin diğer uygulamaları görülmeye devam etmektedir. Rekombinant DNA teknolojisiyle oluşturulmuş enzimler, deterjan, şeker ve peynir üretiminde halen kullanılmaktadır. İşlenmiş proteinler besin değerini arttırmak, tat ve koku vermek üzere ek besinler olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar işlenerek ya da tümüyle yeni metabolik yollar içermek üzere donanarak, topraktan mineral ve petrol özütlemek, yağ lekelerini çıkarmak, zararlı çöp ve lağım sularını temizlemek için kullanılmaktadır. Kuraklığa, soğuğa, kimyasallara ve hastalıklara dirençli işlenmiş bitkilerle, tohum verimliliği arttırılmakta ve tarım ilaçlarına olan gereksinim azaltılmaktadır. Bir hücreden tam bir çekirdeğin çıkarılması ve sonra çekirdeği uzaklaştırılmış bir yumurta hücresine aktarılmasıyla tam bir hayvan klonlaması yapılabilmektedir. Bu teknolojinin uzun vadede türlerimiz ve küresel çevre üzerindeki sonuçlarını öngörmek olası değildir; ancak hücre metabolizması ve ekoloji bilgilerimizin sürekli gelişmesi gerekmektedir.

2.13. Mikroorganizmaları Parçalama Yöntemleri

Hücre sıvısında dağılmış halde bulunan rekombinant proteinlerin ekstraksiyonu konusundaki problemlerden dolayı birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden bazıları özel ekipmanlar gerektirmektedir (Ludmil ve Ark., 2002).

Hücreleri parçalayarak fraksiyonlarına ayırma yöntemleri, temelde hücre sınırlarının çeşitli fiziksel ya da kimyasal tekniklerle yok edilmesini kapsar. Hücre elemanlarının işlevlerini kaybetmeden parçalanmasını sağlayan çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bir dokudaki çeşitli hücre tiplerini birbirinden ayırmak mümkün olduğu gibi, hücreler de işlevleri bozulmadan organellerine ve/veya makromoleküllerine ayrılabilir. Eğer dikkatli bir uygulama yapılırsa nükleus, mitokondri, kloroplast gibi organeller oldukça sağlam durumda kalabilir.

2.13.1. Sonikasyon

İnsanın duyma sınırının üzerindeki frekanslarda (18 KHz üstü) ses dalgaları (ultrases, ultrason) sıvı bir ortamdaki hücrelere uygulandığında parçalanmaya yol açar. Bu uygulama süspansiyondaki su moleküllerinin kinetik enerjisini artırır; basınç farklılıkları çok sayıda mikro hava kabarcıklarının oluşmasına yol açar. Bu kabarcıklar hızla hareket edip bir süre sonra patlayarak yoğun şok dalgaları yaratırlar. Patlama sırasında ses enerjisinin yoğun parçalama enerjisine dönüşümüyle ortamdaki hücreler (özellikle bakteri hücreleri) parçalanırlar. Bu amaçla kullanılan aletler elektrik enerjisini kesikli karakterde mekanik enerjiye çevirerek, titanyumdan yapılmış bir prob yardımıyla ultrases dalgalarını solüsyon içindeki materyale iletir.

Laboratuvar ölçeğinde düşünüldüğünde hücre parçalama teknikleri içerisinde her ne kadar sanayide kullanılması imkansız da olsa en kullanışlısı sonikasyondur (James ve Ark., 1972).

Sonikasyonun son zamanlarda kullanım alanları da artmaktadır. Örnek olarak: İçme sularında dezenfektan olarak geleneksel olarak klor kullanılmaktadır. Fakat klor kullanımı kanserojen ve toksik yan ürünlerin oluşmasına sebebiyet verebileceğinden alternatif yöntemlerin bulunmasını gerekli hale gelmiş ve ultrason dalgalarının bu işlem için kullanımı düşünülmeye başlanmıştır (Mahvi ve Ark., 2005).

Artan tüketici talebi nedeniyle, pastörizasyon ve sterilizasyona alternatif olabilecek, gıda içeriği ve toplam gıda kalitesine etkisi az olan, yeni gıda üretim yöntemleri önem kazanmaktadır. Ultrasound yöntemi ya da sonikasyon gıda endüstrisinde alternatif teknolojilerden birisidir. Ultrasound prosesi henüz başlangıç aşamasını yaşamaktadır, endüstriyel çapta teknoloji geliştirmek ve ultrasoundun gıda özellikleri üzerindeki etkisini tam olarak açıklamak için, pek çok çalışma yapılması gerekmektedir (Delikara, 2006).

Mekanik yolla veya ultrasonikasyonla yapılan parçalama işlemleri sırasında sürtünme nedeniyle açığa çıkan ısıyı yok etmek üzere genellikle uygun şekilde (kabı buz içinde

tutarak, sıvı azot yardımıyla vb.) soğutma yapılması gereklidir. Ultrasonikasyon sırasında mikroskobik baloncukların oluşumu ve patlamasıyla oluşan mekanik şok ile, hücredeki yapısal ve fonksiyonel komponentler parçalanmakta ve hücrenin lizisine neden olmaktadır. Mikroorganizma hücrelerinden hücrel materyal ekstraksiyonu için, ultrasoundla hücre lizisi iyi bilinen bir laboratuvar metodudur (Skauen, 1976).

2.13.2. Ozmotik şok

Hücrelerin yüksek ozmotik basınçlı bir çözeltilen (örneğin %20'lik sukroz) hipotonik bir ortama (örneğin su) geçirilmesi durumunda suyun hücrelerin içine girmesi zarlarda patlamaya yol açar. Bu yöntem hücre duvarı (hücre çeperi) bulunmayan ya da yok edilmiş hücreler için uygundur.

2.13.3. Dondurma-Çözme:

Hücrelerin çok düşük sıcaklık derecelerinde (örneğin -20°C) tutulup sonra yeniden ısıtılarak çözündürülmesi ve bu işlemin birkaç kez tekrarlanması parçalanmaya yol açar. İşlemin temeli, donan su moleküllerinin hacminin genişlemesi ve hücrelerde oluşan buz kristallerinin hücre zarına zarar vererek parçalanmayı sağlamasıdır.

2.13.4. Çözücülerin Kullanılması:

Bu uygulama prensibi hücre zarındaki bileşiklerin çözüldüğü uygun bir çözücü yardımıyla zar yapısının eritilmesidir. Bu amaçla kullanılan organik çözücüler (örneğin etil asetat, toluen vb.) zardaki lipidleri çözerek yapıyı bozarlar. Deterjanlar (örneğin sodyum dodesil sülfat vb.) ise uygun pH koşullarında zardaki protein ve lipoproteinlerle etkileşime girerek onları uzaklaştırır. Bazik çözeltilerin (pH 11-12,5) uygulanması ise hücre duvarının hidrolizine yol açar.

2.13.5. Enzimlerin Kullanılması

Bu amaçla kullanılan litik enzimler özellikle mikroorganizmalar için uygundur. Örneğin en çok kullanılan enzimlerden biri olan lizozim bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasındaki beta-1,4-glikozidik bağları hidroliz etmektedir. Bu enzim özellikle gram pozitif bakteriler üzerinde etkilidir. Gram negatif hücrelerin parçalanması için hücrelerin bir süre EDTA uygulamasında tutulması gerekir. EDTA lipopolisakkarit moleküllerini birbirine bağlayan Ca^{2+} iyonlarının ortamdaki çekilmesini sağlamakta ve böylece lizozimin içteki peptidoglikan tabakasına ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, tripsin, proteinaz K gibi proteazlar ve (maya hücreleri için) zimoliyaz da bu amaçla kullanılan enzimlerdir. Enzimatik işlem genelde mekanik parçalanmaya dayanıklı yapılar için uygulanmaktadır.

2.13.6. Fransız Basınç Hücresi (French Press)

Basınç yardımıyla da hücrelerin parçalanması mümkündür. Basınç yardımıyla hücre parçalama aletlerinin başında Fransız basınç hücresi gelir. Bu alet, çelik silindir bir kap, piston ve silindir üzerindeki basıncın giderilmesi için kullanılan bir vanadan oluşur. Sistem gerek biçimi gerekse çalışma mekanizması açısından büyük metal bir şırıngaya benzer. Hücre süspansiyonu silindirik kabın haznesine döküldükten sonra piston arada hava kalmayacak şekilde takılır ve hidrolik basınç motoruyla süspansiyon üzerine basınç (yaklaşık 10 ton/cm²) uygulanır. Basınç istenilen değere ulaştığında vana biraz açılır ve hücre süspansiyonunun damla damla akması sağlanır. Ani basınç değişimi *E. coli* hücrelerinin parçalanmasına sebep olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Fransız Presinin İmalatı

Fransız presinin imalatına öncelikle içi boş silindirin imal edilmesiyle başlanmıştır. Bunun için öncelikle malzemeler temin edilmiştir.

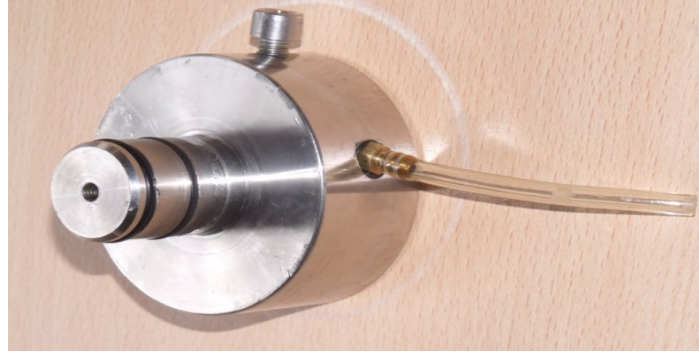


Şekil 3.1. İçi Boş Silindir (Ana Gövde).

Temin edilen malzeme 3 metre uzunluğunda ve 7,5 cm çapında içi dolu bir silindiridir. Bu silindirden ilk olarak 25 cm boyunda bir parça kesilmiş ve bu parça işlenmiştir. İçinde çapı 28 mm olan bir deliğin açılması tek taraftan mümkün olmamıştır. Bu yüzden her iki taraftan matkapla delinerek delik açılmıştır. Fakat tam ortada iki deliğin birleştiği yerde pürüzlü yüzeyler kalmıştır. Bunun önlenmesi için mevcut deliğin içine hidrolik pres yardımıyla 28 mm çapında çelik bilye defalarca çakılmış ve sonunda delik istenilen hale gelmiştir. Hazırlanan bu ana gövde deneme aşamasında fazla ısınma sebebiyle mekanik korozyona uğramış bu yüzden de iç kısmındaki pürüzsüz yüzey zarar görmüştür. Bu zarar neticesinde sızdırmazlık problemi oluşmuş hücrelerin bir kısmı kaybedileceğinden ve sistem içerisinde istenilen basınç elde edilemeyeceğinden deneylere ara verilerek Fransız presi tekrar tasarlanmıştır. Yeni tasarımda dış çapı 40

mm olan içi boş bir Cr-Ni boru alınmış bu boru içerisine uygun boyutlarda teflon malzeme işlenerek ısıtma soğutma yöntemiyle bağlantı yapılmıştır.(Şekil 3.1) Diğer parçalar bu yeni gövdeye göre tekrar işlenmiştir.

Bu işlemten sonra içi boş silindirin altındaki tabla işlenmiştir. (Şekil 3.2.) Tablanın silindirin içine geçeceği kısmının çapı silindirin çapından 0.05 mm daha küçük işlenmiştir. Tablanın silindirin içine geçen kısmının boyu 4 cm'dir. Bu 4 cm'lik kısmın ucuna yakın yerine sızdırmazlığın sağlanabilmesi için o-ring kanalları açılmıştır. Son olarak tablaya 2 adet delik açılmıştır. Bu deliklerden biri metrik sisteme göre 6'lık olup vananın çalışması içindir. Diğer delik ise asıl basınçlandırılmış bakteri topluluğunun çıkacağı deliktir. İki deliğin kesiştiği noktada bir adet 5,5-6,0 mm çapında çelik bilye bulunmaktadır. Vida sıkıldığında bilye iki deliğin kesiştiği noktayı tıkayacak böylece bakteriler dışarı çıkamayacak ve sistem piston yardımıyla basınçlandırılabilir. İstenilen basınç değerine ulaşıldığında ise vida yavaşça açılacak, böylece bilye yuvayı yavaş yavaş açacak ve parçalanmış bakteriler damla damla akmaya başlayacaktır



Şekil 3.2. İçi boş silindirin altındaki tabla.

Son olarak içi boş silindirin içinde çalışacak pistonun işlenmesine gelinmiştir. Bu piston da silindirin içine rahat girsin diye silindirin içindeki deliğin çapından 0.05 mm daha dar işlenmiştir. Daha sonra aynen silindir altı tablada olduğu gibi pistonun da ucuna sızdırmazlığın sağlanabilmesi için Oring kanalı açılmıştır. Tek oring sızdırmazlığı sağlayamadığından ve milin salınım yapmasından dolayı 2 adet oring kanalı daha açılmıştır. (Şekil 3.3.)



Şekil 3.3. İçi boş silindirin içinde çalışacak piston



Şekil 3.4. Fransız Presini Oluşturan 3 Ana Parçanın Bir Arada Görünümü.

French presi oluşturan 3 ana parçanın fotoğrafı yukarıdadır. (Şekil 3.4) Fakat presleme işlemi için gerekli olan hidrolik pres ve metal kasanın birbirine montajı yapıldıktan sonra bu 3 parça anlam kazanmıştır. (Şekil 3.5)

Bu parçaların tamamı Cr-Ni malzemeden imal edildiğinden herhangi bir paslanma, aşınma ve korozyon olayı meydana gelmeyecektir. Buna rağmen olası bir aşınma riskine karşı içi boş silindirin içine teflon malzeme kaplanmıştır. Çünkü bu parçalardan

elde edilmesi, işlenmesi en zor olan parça içi boş silindiridir. Eğer herhangi bir aşınma olursa içerisindeki teflon kaplama sklp yerine kolaylıkla yenisi monte edilebilir.



şekil 3.5. Fransız Presinin Son Hali

4. BULGULAR

Deney sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında absorbans değerindeki değişiklikten yola çıkarak parçalanmış bakteri yüzdesi bulunmaya çalışılmıştır. Absorbans değerlerinin oranı bakterilerin parçalanma oranını vermektedir. Hesaplamalar bu kabul üzerinden yapılmıştır. OD_{600nm}'de absorbans değerinin 1 olması ortamda 8×10^8 tane bakteri olduğunun göstergesidir. Aşağıda Fransız basınç hücresinin hücre parçalanma yüzdesi verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fransız Presinde Hücre Parçalanma Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	1,514	0
1	1,257	17
2	1,178	22
3	1,131	25
4	1,015	33
5	0,908	40

Çizelge 4.1.'den de anlaşılacağı üzere Fransız presi 5 geçişte %40 parçalanma sağlamıştır. Aşağıda yine Fransız basınç hücresi kullanılarak elde edilen deney sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.2. Fransız Presinde Hücre Parçalanma Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	0,767	0
1	0,655	15
2	0,588	23
3	0,530	31

Çizelge 4.2.'den de anlaşılacağı üzere Fransız presi 3 geçişte %31 parçalanma sağlamıştır.

Çizelge 4.3'de Sonikatörde her seferinde $5 \times 3 = 15$ sn ve ampl = %50 değerindeki geçişlerden sonra elde edilen hücre parçalama yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sonikatörde Hücre Parçalama Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	0,677	0
1	0,671	1
2	0,644	5
3	0,606	10
4	0,598	12
5	0,545	19

Tablo 4.3.'den de anlaşılacağı üzere sonikatörde 5 geçiş sonunda %19 parçalanma elde edilmiştir. Fransız presinde bir başka denemede ise aşağıdaki sonuçlar alınmıştır.

Çizelge 4.4. Fransız Presinde Hücre Parçalama Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	0,839	0
1	0,549	35
2	0,422	50
3	0,400	52

Çizelge 4.4'de de görüldüğü gibi Fransız presinde 3 geçişte %52 parçalanma gerçekleşmiştir. Bu deneyde diğer deneylerden daha iyi sonuç alındığı gözlemlenmiştir. Bunun en önemli sebebi Fransız basınç hücresinde istenilen basıncın elde edilebilmiş

olmasıdır. Aşağıda sonikatör sistemi kullanılarak yapılan bir başka deneyin sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 4.5. Sonikatörde Hücre Parçalama Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	0,863	0
1	0,809	6
2	0,763	12
3	0,702	19

Çizelge 4.5’den de anlaşıldığı gibi sonikatörde 3 geçişte %19’luk bir hücre parçalama sağlanmıştır.

Aşağıdaki deneyde yine Fransız basınç hücresi kullanılarak hücre parçalama işlemi sonunda alınan sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.6. Fransız Presinde Hücre Parçalama Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	0,777	0
1	0,600	23
2	0,570	27
3	0,441	43

Çizelge 4.6’dan da anlaşılacağı üzere Fransız presinde 3 geçişte %43’lük hücre parçalama başarısı elde edilmiştir.

Son deney ise sonikatör kullanılarak ve geçiş sayısını arttırarak hücrelerin ne kadar parçalanabileceğini görmek için yapılmış ve aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. Sonikatörde Hücre Parçalama Denemesi

Geçiş Sayısı	Optik Densite(600 nm)	Parçalanma Oranı (%)
Başlangıç	0,810	0
1	0,758	6
2	0,726	10
3	0,688	15
4	0,661	18
5	0,642	21
6	0,615	24
7	0,599	26
8	0,576	29
9	0,562	31
10	0,546	33

Çizelge 4.7'den de anlaşılacağı üzere Sonikatörde 10 geçiş sonrasında %33'lük bir hücre parçalama becerisi elde edilmiştir. Bu değer Fransız basınç hücresi kullanılarak tek geçişte elde edilen parçalanma yüzdesine ancak ulaşmıştır.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapmış olduğumuz Fransız presinden alınan sonuçlar itibariyle değerlendirme yapılacak olursa sisteminin çalışmış olması umut vermektedir. Fakat Fransız presindeki sızdırmazlık problemleri de hala devam etmektedir. Bu sızdırmazlık probleminin çözülmesi için kullanılan o-ringlerin yerine sadece bu sistem için tasarlanmış özel o-ringler kullanılabilir.

Sonikatörde sadece az bir miktar çözeltiyle çalışılabilirken Fransız presinin bir avantajı da 100 ml'ye kadar çözeltileri kolaylıkla tek seferde parçalayabilmesidir. Fakat, sonikatör sistemindeki ısınma problemi Fransız presi için de gündeme gelmiştir. Isınma probleminin giderilmesi sistemin performansını arttıracaktır. Bu yüzden sonikatör sisteminde kullanılan buz içinde parçalama yöntemi Fransız presi için de düşünülebilir. Fransız presi ile hücre parçalama işlemi sonikatöre göre daha uzun zaman almaktadır. Eğer sızdırmazlık problemleri giderilirse bir geçişte en az %50 oranında hücre parçalama işlemi gerçekleşeceği düşünülmektedir. Bu da Fransız presinin daha kullanışlı olması anlamına gelecektir.

KAYNAKLAR

- Andreotti, P.E., Ludwig, G.V., Peruski, A.H., Tuite, J.J., Morse, S.S., Peruski Jr, L.F. 2003. Immunoassay of Infectious agents. Reprinted with permission from BioTechniques (35), 850–859
- (Anonim), 1992. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd (Edt.). APHA, Washington, DC,
- (Anonim), 1992–1993. Centers for Disease Control and Prevention. Update: Multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42, p. 258–263.
- (Anonim), 1996. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45, p. 44.
- (Anonim), 2003. Hücre, http://tr.wikipedia.org/wiki/H%C3%BCcre#_Yap.C4.B1s.C4.B1. (07.05.2010)
- (Anonim), 2004. Bakterilerin Kullanım Alanları, <http://www.main-board.eu/biyoloji/336111-bakterilerin-kullanim-alanlari.html> (25.02.2010)
- (Anonim), 2007. E.coli(Escherichia coli), <http://ziraat.yyu.edu.tr/tr/modules/exicon/print.php?entryID=1> (07.05.2010)
- (Anonim), 2007. Http://www.ifr.brsc.ac.uk / Public/Food_nfoSheet. (23.12.2009)
- (Anonim), 2008. <Http://www.ifr.brsc.ac.uk / Public/FoodnfoSheet>, (20.12.2009).
- (Anonim), 2008. Hücre Zarı. http://tr.wikipedia.org/wiki/H%C3%BCcre_zar%C4%B1. (30.04. 2010)
- Anonim), 2009. E.coli, http://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli. (03.02.2010)
- (Anonim), 2010. Bakteri, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteri>. (10.05.2010)
- Arda.,M.,1999.Temel Mikrobiyoloji. 2. baskı, Ankara, s. 13–15.
- Bilgehan, H., 2000. “Escherichia” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan,: Klinik Mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, 10. baskı, İzmir. s. 3–17.
- Birge, E. A., 2000. Bacterial and Bacteriophage Genetics, Springer-Verlag Inc, Fourth Edition, p 341-369, New York
- Bilgin, Y., 2006. Escherichiae coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacterbaumannii ve Staphylococcus aureus suslarında çeşitli aminoglikozidlerin duyarlılıklarının araştırılması (uzmanlık tezi) İstanbul,
- Brock, T. D. ve Smith, D. W. ve Madigan, M. T., 1984, Biology of Microorganisms, Fourth Edition, Prentice Hall International Inc., New Jersey. p 586-607.
- Çakır, İ., 2000. Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, Koliform Grup Bakteriler ve E. coli, (Edt.) : Halkman, A. K., 2. baskı, Basak matbaacılık. 335–343. Ankara.
- Çakır, İ., Dogan, B.H., Baspınar, E., Keven, F., Halkman, A.K., 2001.The need for confirmation in coliform and E. coli Enumeration in Foods . Turk J. Vet. Anim. Sci. 26, p. 1049–1053,
- Dehghani, M. H., 2005. Effectiveness of Ultrasound on the Destruction of E.coli. American journal of Environmental science, 1 (3), 187-189.
- Delikara,B.,2006. L.monocytogenes’in sonikasyonla inaktivasyonuna farklı amplitüd , pH ve sıcaklığın etkisi. Yüksek Lisans Tezi,Biyoloji ABD,Eskişehir.

- Doyle, M.P., Schoeni, J.L., 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53. p. 2394–2396.
- Drlica, K., 2003. *Understanding DNA and Gene Cloning*. John Wiley and Sons, Inc, Fourth Edition, p 84-89,166-169, NJ .
- Entis, P., 1989. Hydrophobic grid membrane filter/MUG method for total coliform and *Escherichia coli* Enumeration in foods: collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.* 72. P.936–950,
- Erdem, B., 1999. Enterobacteriaceae, In: Ustaçelebi S, (Edt.): *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1. Baskı, s. 471–515. Ankara.
- Feliu, J. X. ve Cubarsi, R. ve Villaverde, A. 1998. Optimized Release of Recombinant Proteins by Ultrasonication of *E.coli* Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 5 (58), 536-540.
- Feng, P., Hartman, P.A., 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43. p.1320–1329.
- Feng, P., Weagant, S.D., Grant, M.A., 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 4, Revised.
- Halkman, A.K., Noveir, R.M., Dogan, B.H., 2001. *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Harigan, W.F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3.baskı.166– 167.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., Phillips, A.D., 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect. Immun.* 6.p.1570–1578.
- Hu, Y., Zhang, Q., Meitzer, J.C., 1999. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 87.p.867–876.
- James, C.J. ve Coakley, W.T. ve Hughes, D.E.,1972. Kinetics of Protein release from yeast sonicated in batch and flow systems at 20Khz. *Biotechnology and Bioengineering Journals Vol 14.* p 33-42.
- Jeffrey, W. H., Nazaret, S., Von Haven, R., 1994. Improved method for recovery of mRNA from aquatic samples and its application to detection of mer expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 60. p.1814–1820.
- Kuby, J., 1998. *Immunology: Antigen- Antibody Interactions*, 3. (Edt) .Chapter 6. P. 156-164, Pub: Feeman,
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362. p. 709–715.
- Ludmil,B. ve Jameela, A., 2002. Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* , Vol.35,(4). p. 428-431.
- Martins, M.T., Rivera, I.G., Clark, D.I., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., Olson, B.H., 1993. Distribution of uidA gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of β -glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* 59. p. 2271–2276.
- McDaniels, A.E., Rice, E.W., Reyers, A.L., Johnson, C.H., Haugland, R.A., Atelma, G.N.Jr., 1996. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotype and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62. p.3350–3354.

- Mahvi, A.H. ve Dehghani, M.H. ve Vaezi, F.,2005. Ultrasonic technology effectiveness in total koliforms disinfection of water. *Journal of Applied Science*. 5. p.856-858.
- O'Brien, A.D., La Veck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B., 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J.Infect Dis*, 146. p. 763–769,
- Pitkanen, T., Paakkari, P., Ilkka, T.M., Tanski, H.H., Paulin, L., Hainnen, M.L., 2007. Comparison of media for Enumeration of Coliform Bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods*, 68. p. 522–529.
- Rice, E.W., Covert, T.C., Johnson, S.A., Reasoner, D.J., 1995. Detection of *Escherichia coli* in water using a colorimetric gene probe assay. *J. Environ. Sci. Health A* 30. p. 1059–1067.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., 1996. Immunological Techniques. in: *Immunology*, 4.edition. Chapter 28. Edt: Louise Cook. Pub: Dianne Zack. London,
- Sığırtmaç, N.,2008, *Escherichia coli*'nin farklı şekerleri kullanma yeteneği üzerine bir çalışma,s.12, Kars.
- Skauen, D., 1976, A comparison of heat production and cavitation intensity in several ultrasonic cell disrupters, *Ultrasonics* 14. p. 173-176.
- Song,D.D. ve Jacques,N.A.,1997. Cell Disruption of *Escherichia coli* by Glass Bead Stirring for the Recovery of Recombinant Proteins. *Anal Biochemistry*. 248, p 300-301
- Watson, D., 1976, *Molecular Biology of the Gene*, W.A. BENJAMIN Inc., Third Edition, p 59-82, Canada.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Selçuk DEMİR
Doğum Tarihi ve Yer : 17.02.1983 /Yenimahalle
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 05462992961
E-mail : selcuk66demir@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Hacettepe Üniversitesi-Kimya Mühendisliği	2006
Lise	Halide Edip Adivar Lisesi	2001

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-Halen	MKEK Kırıkkale Barut Fabrikası	Üretim Mühendisi
2006-2010	Muammer Tuksavul Turhal Şeker Fabrikası	Üretim Mühendisi