

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

114385

TATLI SU MİDYESİNDE (*UNIO ELONGATULUS EUCIRRUS*
BOURGUIGNAT, 1860) *SALMONELLA* BAKTERİSİNİN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE TESPİTİ

Engin ŞEKER

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

114385

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ

2001

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TATLI SU MİDYESİNDE (*UNIO ELONGATULUS EUCIRRUS*
BOURGUIGNAT, 1860) *SALMONELLA* BAKTERİSİNİN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE TESPİTİ

Engin ŞEKER

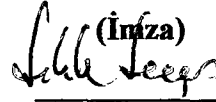
DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / / Tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği /
Oyçokluğu İle Başarılı / Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.


(İmza)

Danışman

Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU


(İmza)

Üye

Prof. Dr. Selahattin ŞEKER

(İmza)

Üye

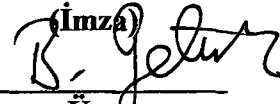
Prof. Dr. Yılmaz Dündar


(İmza)

(İmza)

Üye

Prof. Dr. Adile Muş

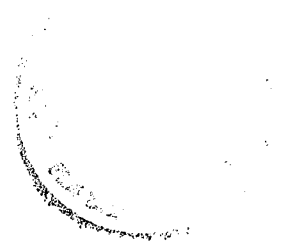

(İmza)

Üye

Doç. Dr. Burhan ÇETİNKAYA

Bu Tezin Kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / /

Tarih ve Sayılı Kararıyla Onaylanmıştır.



ÖZET**DOKTORA TEZİ****TATLI SU MİDYESİNDE (*UNIO ELONGATULUS EUCIRRUS*
BOURGUIGNAT, 1860) *SALMONELLA* BAKTERİSİNİN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE TESPİTİ****Engin ŞEKER****Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı****2001, Sayfa: 46**

Bu çalışmada, Elazığ Keban Baraj gölünün iki farklı bölgesinden elde edilen 627 adet tatlı su midyesinde (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) kültür yöntemi ve Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) tekniği yardımıyla *Salmonella* arandı. Buna göre baraj gölünün Koçkale bölgesinden toplanan 397 midyenin 19'unda (%4.79) *Salmonella* izolasyonu ve identifikasyonu yapıldığı halde, Pertek bölgesinden temin edilen 230 midyede bu etkene rastlanılmadı.

Midye dokularından hazırlanan homojenizatlar Rappaport Vasilliadis buyyonunda ön zenginleştirmeden geçirildikten sonra, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar ve *Salmonella* - *Shigella* selektif besiyerlerine ekimler yapıldı. Üreyen *Salmonella* şüpheli suşlara biyokimyasal testler uygulandı ve bu suşlardan DNA izole edildi. Ekstrakte edilen DNA' lar *Salmonella*' nın 16S rRNA geninden türetilen bir çift cins spesifik primer kullanılarak PCR'de amplifikasyona tabi tutuldu. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde değerlendirildiğinde, 19 şüpheli suşun hepsinde *Salmonella* spesifik gen bölgesinin mevcut olduğu saptandı.

Çalışma bölgelerinden alınan 45 su örneğinden ise kültür metodu ve PCR tekniği ile *Salmonella* izolasyonu yapılamadı.

Salmonella'nın insanlarda tifo ve paratifo başta olmak üzere septisemi ve gastroenteritis gibi hastalıklara neden olduğu dikkate alındığında, elde edilen verilerin ışığında baraj gölünün Koçkale bölgesindeki tatlı su midyelerinin 1380 sayılı Su Ürünleri Kanununa göre insan sağlığı açısından çiğ tüketilmeleri uygun görülmemektedir. *Salmonella* bakterisinin ısıya dayanıklı olmamasına rağmen bu yöre midyeleri iyice pişirilse dahi *Salmonella*'ların toksikolojik özelliği devam edeceğinden tüketiminde dikkatli olunmalıdır. Ayrıca, iyi bir işlemde geçirildikten sonra bu midyelerin hayvan yemi olarak değerlendirilmesinin de ekonomiye büyük katkısı olacaktır.

Geniş bir uygulama alanına sahip PCR'nun bu çalışma ile su ürünlerinde de başarılı bir şekilde uygulanacağı görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELEER:Tatlı Su Midyesi, *Salmonella*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ABSTRACT

PhD Thesis

**DETECTION OF *SALMONELLA* BY POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR) IN FRESH WATER MUSSEL (*UNIO ELONGATULUS EUCIRRUS*
BOURGUIGNAT, 1860).**

Engin ŞEKER

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Aquaculture

2001, Page: 46

In this study, *Salmonella* were investigated in 627 fresh water mussels collected from two different regions of Keban Dam Lake by means of culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques. From 19 (4.79%) out of 397 mussels collected in Koçkale Region, *Salmonella* were isolated and identified, but the agent was not detected in mussels obtained from Pertek region.

Homogenates prepared from tissue of mussels, after pre-enrichment in Rappaport Vasiliadis, were inoculated onto Brilliant Green Phenol Red Lactose agar and *Salmonella-Shigella* selective mediums. Biochemical tests and DNA extraction were carried out *Salmonella* suspicious isolates. DNA extracted from these isolates were amplified by PCR using a pair of genus-specific primers derived from 16S rRNA gene of *Salmonella*. Analysis of PCR products on agarose gel electrophoresis showed that the *Salmonella* specific gene was present in all 19 isolates.

Salmonella could not be isolated from 45 water samples with culture technique and PCR technique.

The fact that, *Salmonella* causes important diseases in humans such as septicaemia, gastroenteritis, typhoid and paratyphoid, was taken into consideration, in the light of the data obtained in this study, fresh water mussels in Koçkale Region of Keban Dam Lake should not be consumed uncooked according to the water products law number 1380. Although *Salmonella* is not resisted to high temperature, their toxicity continues even mussels area cooked properly, so that they should be consumed carefully. Moreover, the use of these mussels as animal food will contribute significantly to the country's economy.

In this study, it was demonstrated that PCR which has very wide application could also be used in the field of Aquaculture.

KEY WORDS: Freshwater Mussel, *Salmonella*, Polymerase Chain Reaction



TEŞEKKÜR

Beni bilimsel çalışmaya sevk eden, konu seçimi ile araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde her türlü yardım ve katkılarını esirgemeyen kıymetli danışman hocalarım sayın Prof.Dr.Mustafa SARIEYYÜPOĞLU' na ve Doç.Dr.Burhan ÇETİNKAYA' ya, laboratuvar imkanlarını sağlayan Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığına ve çalışmalarımda büyük desteklerini gördüğüm Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, Araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve personeline, serolojik gruplandırmada yardımcı olan, Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Merkezinde görevli Uzman Veteriner Hekim Selahattin ŞEN'e, materyal temininde yardımcı olan yöre balıkçılarına, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim dalı asistanlarından Ünal İSPİR, Cebrahil TÜRK, Önder AKSU ve personelimiz Ahmet BİNGÖL' e, çalışmalarımda gereken olanakları sağlayan Su Ürünleri Fakültesi akademik ve idari personeline, mesai arkadaşlarıma, ayrıca her zaman manevi desteği ile güç veren ve projenin yazımında yardımcı olan eşim Mehtap ŞEKER'e ve çalışmayı maddi yönden destekleyen Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu'na (FÜNAF) teşekkür ederim.

Bütün çalışmalarımızda olduğu gibi bu projenin oluşmasında da yakın ilgi ve desteğini gördüğüm 1999 yılında rahmetli olan Su Ürünleri Fakültesi dekanımız merhum hocamız Prof. Dr. Sıtkı GÜLER'i rahmetle anarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Tatlı Su Midyesinin (<i>Unio elongatulus eucirrus</i>) Genel Özellikleri	3
2.2. <i>Salmonella</i> 'ların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri	5
2.3. <i>Salmonella</i> 'nın Su Ürünlerindeki Önemi.....	7
2.4. <i>Salmonella</i> 'nın Bulaşma Yolları ve Neden Olduğu Hastalıklar	8
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	10
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Çalışma Alanı ve Araştırma Materyali.....	16
3.1.2. Mikrobiyolojik Besiyerleri	16
3.1.3. Referans Kültürler ve <i>Salmonella</i> Antiserumları.....	18
3.1.4. Kullanılan Malzemeler	18
3.2. Metot.....	21
3.2.1. <i>Salmonella</i> 'nın Kültür Yöntemi ile İzolasyon ve İdentifikasyonu	21
3.2.2. Serogruplandırma Çalışması	23
3.2.3. <i>Salmonella</i> 'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile İdentifikasyonu	23
3.2.3.1. DNA İzolasyonu.....	23
3.2.3.2. PCR	24
4. SONUÇLAR	25
4.1. <i>Salmonella</i> İzolasyon ve İdentifikasyonu	26
4.2. <i>Salmonella</i> Serogruplandırması	28
4.3. <i>Salmonella</i> 'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile İdentifikasyonunun Yapılması	30
5. TARTIŞMA	31
KAYNAKLAR	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.1. Tatlı Su Midyesinin (<i>Unio elongatulus eucirrus</i>) Sistematikteki Yeri	4
Şekil 2.4.1. <i>Salmonella</i> Enfeksiyonlarının Yayılışı	9
Şekil 2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Safhaları	14
Şekil 2.5.2. Bir PCR Döngüsü	15
Şekil 2.5.3. Sıcaklık ile Bir PCR Siklusunun Oluşumu.....	15
Şekil 3.1.1.1. Keban Baraj Gölünde Midyelerin Toplandığı Bölgeler	17
Şekil 3.1.4.1. DNA Thermocycler (Termal çevirici - PCR Cihazı) (Hybaid, İngiltere).....	19
Şekil 3.1.4.2. Elektroforez ve Güç Kaynağı.....	19
Şekil 3.1.4.3. Ultraviyole Transilluminatör	20
Şekil 3.1.4.4. Mini Çalkalayıcı (Biospec Products, Oklahoma, USA)	20
Şekil 4.1. Tatlı Su Midyesinin (<i>Unio elongatulus eucirrus</i>) Dıştan Görünüşü	25
Şekil 4.1.1. MacConkey Agarda Üreyen Laktoz Negatif, Gri-Beyaz <i>Salmonella</i> Kolonileri	27
Şekil 4.1.2. <i>Salmonella – Shigella</i> (SS) Agarda Renksiz Mat <i>Salmonella</i> Kolonileri.....	27
Şekil 4.1.3. Brilliant Green Phenol Red Laktoz (BG) Agarda <i>Salmonella</i> Kolonileri	28
Şekil 4.3.1. Tatlı Su Midyesinden İzole Edilen <i>Salmonella</i> Bakterisinden Elde Edilen DNA'ların, PCR' da Analizi Sonucu Oluşan 572 bp' lik Bantları Gösteren Ethidium Bromide ile Boyanmış % 1.5' luk bir Agaroz Jel	30

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No:

Tablo 4.1.1. Tatlı Su Midyelerinden İzole Edilen 19 <i>Salmonella</i> Bakterisinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	29
--	----



1. GİRİŞ

Son yıllarda hızla artan dünya nüfusu, plansız kentleşme, nükleer denemeler, tarım ilaçları, yapay gübreler, evsel atıklar, deterjanlar ve sanayi kuruluşlarının arıtmadan deşarj ettikleri çeşitli kimyasal maddeler ve özellikle şehir kanalizasyon atıklarının su kaynaklarına karışması, dünyamızı önemli ölçüde kirleterek bugün olduğu gibi gelecekte de en büyük problemlerden birisini oluşturacaktır. Hijyen kurallarının yeterince uygulanmadığı, atık su sistemlerinin istenilen düzeyde olmadığı ülkelerde çevre kirliliğinin bir parçası olarak; insan ve hayvan dışkılarıyla atılan bağırsak patojeni mikroorganizmalar deniz, göl ve akarsulara karışmakta ve içinde yaşayan canlıları da kontamine edebilmektedir. Özellikle besin hijyenine ilişkin kontrol mekanizmalarının az olduğu ülkemizde kirli sulardan çıkarılan midye ve balık gibi su ürünlerinin birçok hastalık oluşturacak mikroorganizmaları insanlara bulaştırmada önemli rolleri olabileceği açıktır.

Diğer gıda maddelerinde olduğu gibi su ürünlerinde de hastalık yapıcı çeşitli mikroorganizmalar gelişebilmektedir. Bunlar genellikle; *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Campylobacter* ve *E. coli* gibi bakterilerdir. *Salmonella* insan ve balıklarda septisemi ve gastroenteritis oluşturması nedeniyle zoonoz karaktere sahiptir. Kanalizasyonların boşaltıldığı su ortamlarını kontamine eden bu bakterinin aynı zamanda akuatik canlıları da enfekte etme ihtimali yüksektir. Kirli sulardaki patojen etkenler gerek taze ve gerekse dondurularak muhafaza edilen midyelerde uzun süre canlı kalabilmektedir. *Salmonella*'nın da; iyi pişirilmemiş midyeler ve balıkların tüketilmesiyle veya bunların işlenmesi sırasında açık yaralardan insanlara bulaşmaları söz konusudur.

Gerek beşeri ve gerekse veteriner hekimlikte bakteriyel hastalıkların teşhisinde kültür metodu ve biyokimyasal analizlerin yanı sıra, aglutinasyon, immunodiffüzyon, immunofloresans, hemaglutinasyon, radioimmun assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), komplement fikzasyon gibi serolojik testler, histopatolojik yöntemler ve moleküler biyolojide büyük önem kazanan Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) tekniği de kullanılmaktadır (Anderson,1974; Bollock,1989; Kubilay ve Timur, 1997; Plumb and Bowser, 1983; Tanrıkul ve diğ., 1996).

Su ürünleri içerisinde yer alan özellikle tatlı su midyelerinin mikrobiyolojisi hakkında kapsamlı araştırmaların sayısı azdır. Bu çalışmada da, son yıllarda geliştirilmiş en önemli bir metot olan PCR ile Elazığ Keban Baraj gölündeki tatlı su midyelerinde (*Unio elongatulus eucirrus*) salmonellozisin prevalansının saptanması amaçlanmıştır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, insanlar ile sıcak kanlı hayvanlarda geniş kullanım alanına sahip olan PCR tekniği, bu çalışma ile de ölkemizde tatlı su midyelerinde ilk kez uygulanmıştır. Ayrıca bu teknik, yıllardır kullanılmakta olan ve en güvenilir neticeleri veren költür metodu ile karşılaştırılarak, PCR'nin suda yaşayan canlıların bakteriyel hastalıklarının teşhisinde uygulanabilirliğine ilişkin temel oluşturulmaya çalışılmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Bu çalışmada; tatlı su midyesinin tanınması, bu canlılarda aranması planlanan *Salmonella* hakkında bilgi edinilmesi ve PCR tekniğinin tatlı su midyesinin mikrobiyolojisine uyarlanması amaçlandığından öncelikle midye olmak üzere *Salmonella* ve PCR ile ilgili genel bilgiler verilmeye çalışıldı.

2.1. Tatlı Su Midyesinin (*Unio elongatulus eucirrus*) Genel Özellikleri

Yumuşakçalar yüksek uyum nitelikleriyle, hava ortamı hariç diğer tüm ortamlarda yayılış gösteren hayvan gruplarından biridir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda saptanan tür sayısı yaklaşık 100.000 kadardır. Bunlardan 80.000'i salyangozlar (gastropoda), 10.000'i midyeler (bivalvia) ve geri kalanı ise diğer gruplara aittir. Yumuşakçaların kökeni deniz olmasına karşın, tatlı su ve karasal ortamlarda da denizlerdekine yakın sayıda tür vardır. Yumuşakçaların büyük kısmı bentiktir. Bivalvia sınıfında bulunan midyeler ve istiridyeler genellikle bilateral simetridir (Alpbaz, 1993; Atay, 1984; Bilecik, 1989; Demirsoy, 1999). Baş bölgesi körelmiştir. Ayağın arka kısmında, genellikle, geniş bir delikle dışarı açılan, büyük bir bez topluluğu (byssus bezi) bulunur. Bu bezlerin salgıları, su ile temas edince katılarak lif şeklini alır. Byssus lifleri, midyenin geçici yada devamlı olarak bir yere tutunmasına yardımcı olur, bazılarında ise yuva yapımında kullanılır. Solunum organları bir çift solungaçtır (ktenidyum). Genellikle besinlerini süzerek alırlar. Çoğu ayrı eşeyli az bir kısmı da hermofrodittir (Bilgin, 1980; Çağlar, 1974; Çetinkaya, 1996; Demirsoy, 1999).

Ülkemizdeki midyeler; denizlerde ve tatlı sularda olmak üzere iki grupta bulunurlar. Tatlı sularda yayılış gösterdiği bilinen midyelerin tür sayısı 17, denizlerde ise 153'tür. Bir çok araştırmada (Anonim, 1984b; Alpbaz, 1993; Atay, 1984; Bilecik, 1989; Enç, 1973; Göğüş ve Kolsarçı, 1992; Gökten, 1983; Grabow et al., 1991; Kınacıgil, 1994; Uysal, 1970; Ünlütürk, 1984; Viarengo and Canesi, 1991; Yılmaz, 1989); midyelerin sahillere yakın alanlarda ve 60 m derinliğe kadar bir yere tutunarak yaşadıkları bildirilmiştir. Ayrıca yer değiştirmedikleri için de su hareketleriyle gelen organik maddelerle beslendikleri, böylece bir midyenin ortalama bir litre suyu bir saat içinde kabukları arasından geçirerek filtre ettiği ifade edilmiştir. Bazı araştırmacılar

(Bilgin ve Şeşen, 1991; Çağlar, 1974; Çetinkaya, 1996; İnal, 1992; Schütt, 1992); tatlı su midyelerinin göl ve nehir midyesi olmak üzere iki çeşidinin bulunduğunu ifade etmişlerdir. Ülkemiz tatlı sularında; *Unio elongatulus eucirrus*, *Unio crassus bruquierianus*, *Unio tigridis*, *Unio stevenianus*, *Unio ascanius*, *Anodonta piscinalis*, *Lequiminaia wheatleyi*, *Corbicula fluminalis*, *Sphaerium corneum* ve *Pisidium casertanum* gibi bazı midyeler bulunmaktadır. Bu araştırmaya konu teşkil eden tatlı su midyesinin (*Unio elongatulus eucirrus* BOURGUIGNAT, 1860) sistematikteki yeri Şekil 2.1.1.'de gösterilmiştir (Bilgin,1980; Bilgin ve Şeşen, 1991; Çağlar, 1974; Demirsoy, 1999; Haas, 1969; Koral ve Ayval, 1982; Schütt, 1992; Schütt and Şeşen,1993; Soylu, 1990).

Regnum: Animale

Subregnum: Metazoa

Phylum: Mollusca

Classis: Bivalvia

Subclassis: Lamellibranchiata

Ordo: Heterodonta

Familia: Unionidae

Genus: Unio

Species: *Unio elongatulus*

Sub species: *Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860

Şekil 2.1.1. Tatlı Su Midyesinin (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) sistematikteki yeri.

Midyelerden göllerde yaşayanların kabukları çok ince olup çabuk kırılırlar. Nehir midyeleri ise küçük kabuklara sahiptir ve daha fazla akarsularda yaşarlar ancak göllerde de bulunabilirler. Tatlı su midyelerinin kabukları uzunlamasına yumurta şeklinde, kahverengi siyah görünümde, bir yere tutunmak için byssus ipliklerine sahip olup, üzerlerinde siyah bantlar halinde yaş halkaları vardır (Bilgin ve Şeşen, 1991; Çağlar, 1974; İnal, 1992; Ropes and Jearld, 1987; Soylu, 1990).

2.2. *Salmonella*'ların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri

Doğada çok yaygın olarak bulunan *Salmonella* etkenleri, adlarını, Amerikalı bakteriyolog Salmon'dan almaktadırlar. *Enterobacteriaceae* familyasının genel özelliklerini gösteren *Salmonella*'lar 0.7 - 1.5 x 2.0 - 5.0 mikrometre boyutlarında, Gram negatif çomak şeklinde, aerob ve fakültatif anaerob, fekal veya oral yollarla yayılan bakterilerdir. Çoğunlukla boyalı preparatlarda tek tek görülen *Salmonella* bakterileri sporsuz, kapsülsüz olup, *S. pullorum* ve *S. gallinarum* hariç hareketlidirler. Optimal üreme sıcaklığı 37°C olup, 20 ile 42°C'ler arasında da gelişebilirler. Kolonileri genellikle 2 - 4 mm çapında olmakla birlikte 1 mm çaplı küçük koloniler de görülebilir. Biyokimyasal aktiviteleri oldukça yüksektir. Bu nedenle, *Salmonella* izolasyonunda kullanılan besi yerlerinin bileşimi, önemli iki özelliğin ortaya çıkarılması esasına dayanmaktadır. Bu özellikler; H₂S oluşturmaları (*S. cholerae suis*'in bazı suşları ve *S. paratyphi A*'nın bir çok suşu hariç) ve laktozu fermente edememeleri olup, *E. coli*'den ayrımlarında kullanılan en önemli testlerdir. *Salmonella* bakterilerinin tümü üreaz enzimine sahip değildir, dolayısıyla üreyi ayrıştırıramazlar. Oksidaz, fenilalanin deaminaz, voges proskauer, indol, malonat kullanımı, Ortho- Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase, jelatin hidrolizi, triptofan deaminaz testleri negatif, metil red, lizin dekarboksilaz (*S. paratyphi A* hariç), ornitin dekarboksilaz (*S. gallinarum* ve *S. typhi* hariç), nitrat redüksiyonu pozitifdir. Glikoz, mannitol ve sorbitolu fermente ederler. Salisin, sakkaroz ve inositolü genellikle fermente edemezler (Arda ve diğ. 1994; Bekar, 1997; Bilgehan, 1995; Quinn et al., 1994, Merchant and Packer, 1967)

Salmonella aranmasında ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerinde tipik kolonilerin gösterilmesi, şüpheli suşların biyokimyasal tanısı ve aglütinasyon testleri ile serolojik tiplendirilmesi yapılmaktadır. Bu son iki test paralel yürütülebileceği gibi önce serolojik tanı, sonra biyokimyasal tanı da yapılabilir. *Salmonella* izole ve identifikasyonunda, Rappaport Vassiliadis, Selenit Cystine Broth ve Tetrathionate Broth gibi zenginleştirilmiş besi yerleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte; Endo agar, MacConkey agar, Eosin Metilen Blue agar, *Salmonella - Shigella* agar, Christensen agar, Brilliant Green agar, Dezoksikolat sitrat agar, Xylose Lysine Desoxycholate agar ve Rambach agar gibi selektif besi yerlerinden yararlanılmaktadır. *Salmonella - Shigella* agarda, laktoz negatif bakteriler renksiz, pozitif bakteriler ise

kırmızı koloni oluştururlar. Eğer koloninin ortasında siyah bir nokta var ise H₂S pozitifdir. Brilliant Green agarda, laktoz pozitif bakteriler yeşil, negatifler ise kırmızıdır. Selektif besi yerlerinde gram pozitif bakterilerden başka koliform bakterilerin ve *Proteus*'ların çoğu inhibe olur, yalnız *Salmonella*'lar saf kültür halinde ürer. Bunlar besiyerinin parlak kırmızı ortamı üzerinde hafif pembemsi renkte opak koloniler oluştururlar (Anonim, 1994b; Anonim, 1998; Bager and Petersen, 1991; Bekar, 1997; Bilgehan, 1995; Carter, 1984; Farmer et al., 1987; Fricker et al., 1985; Krieg, 1984; Quinn et al., 1994; Vassiliadis et al., 1981).

Enterobacteriaceae familyasına bağlı mikroorganizmaların identifikasyonunda çabuk sonuca giden sistemler geliştirilmiştir. Bu metotlardan biri de Lassen'in (1975) üçlü tüp sistemidir. Bu sistemde, birinci tüpte; glikoz, laktoz fermentasyonu ve H₂S oluşumu incelenir. Ayrıca lizin dekarboksilaz, Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase ve fenilalanin deaminaz testleri de yapılır. İkinci tüpte; mannitol, hareket ve nitrat redüksiyonu, üçüncü tüpte ise; üreaz, indol ve triptofan deaminaz testleri uygulanmaktadır.

Salmonella etkenlerinin kesin identifikasyonları, biyokimyasal özelliklerinin ve antijenik yapılarının incelenmesiyle yapılmaktadır. Biyokimyasal özelliklerine göre *Salmonella* olduğu anlaşılan suşlar önce polivalan O antiserumu ile lam üzerinde aglütinasyona tabi tutulur. Daha sonra aglütinasyonun görüldüğü polivalan serumun grup antiserumlarıyla suşun serogrubu tayin edilir. Serolojik grubu tespit edilen suşun H antiserumlarıyla aglütinasyonu sonucu serotipi saptanır (Anonim, 1991; Arda, 2000; Bekar, 1997; Bilgehan, 1995; Carter, 1984; Merchant and Packer, 1967; Quinn et al., 1994).

Gıda maddelerinde, *Salmonella* belirlenmesinde kültürel ve biyokimyasal analizlerin yapılması yaklaşık yedi günlük bir süreyi gerektirdiğinden, hızlı yöntemlerin geliştirilmesine olan gereksinim geçmişte olduğu gibi günümüzde de devam etmektedir. Bugün kültürel yöntem dışında; kültürel-enzimatik testler, lateks agglutinasyon testleri, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi, PCR ve impedanz yöntemleri kullanılarak da *Salmonella* belirlenmektedir (Bailey, 1998; Fluit, 1993). Bakteriyel ve viral etkenlerden ileri gelen bazı enfeksiyonlarda spesifik etkenin her zaman izole ve identifikasyonu mümkün olmamakta, primer etken yerine sekonder bakteriler izole edilmekte, hastalığın teşhis ve sağaltımı da buna göre yapılmaktadır. Böylece hastaların

iyileştirilmesi çok gecikmekte veya mümkün olmamaktadır. Enfeksiyonların erken, kesin ve güvenilir teşhislerinde son yıllarda pratiğe konan biyoteknolojik yöntemler oldukça yararlı olmakta ve konvansiyel tekniklerin boşluklarını doldurmaktadır. Bu yeni teknolojik metotlar; etkenlerin genetik materyallerinin hibridizasyonu ve immunojenik substansların (protein, glikoprotein, vs.) saptanması şeklinde başlıca iki grup altında toplanır. Hibridizasyon teknikleri, genellikle materyallerde (doku, organ, hücre kültürü, ekstrakt, sekret, vs.) bulunabilen patojenlerin veya bu dokulara ait hücre DNA' larındaki spesifik genlerin işaretli problarla ortaya konması ve sayısal olarak çoğaltılması (amplifikasyonu) amacıyla kullanılmaktadır (Saiki et al., 1988; Steffan and Atlas, 1991). Şimdiye kadar *Salmonella*'ların identifikasyonu amacıyla çok az çalışmada PCR tekniği kullanılmakla birlikte, bu teknik spesifitesi ve duyarlılığı nedeniyle diğer sistemlerden daha avantajlıdır (Barrow, 1993; Erlich et al., 1991).

2.3. *Salmonella*'nın Su Ürünlerindeki Önemi

Su ürünlerinde *Salmonella* ilk olarak 1934 yılında Doğu Kanada kıyılarında yakalanan bir balıktan izole edilmiş, daha sonraları ise tatlı ve tuzlu sulardan yakalanan birçok balıkta farklı *Salmonella* türleri izole edilmiştir (Morse et al., 1978b; Souther et al., 1972; Twiddy, 1995; Van Den Heever and Frey, 1994; Wyatt et al., 1979).

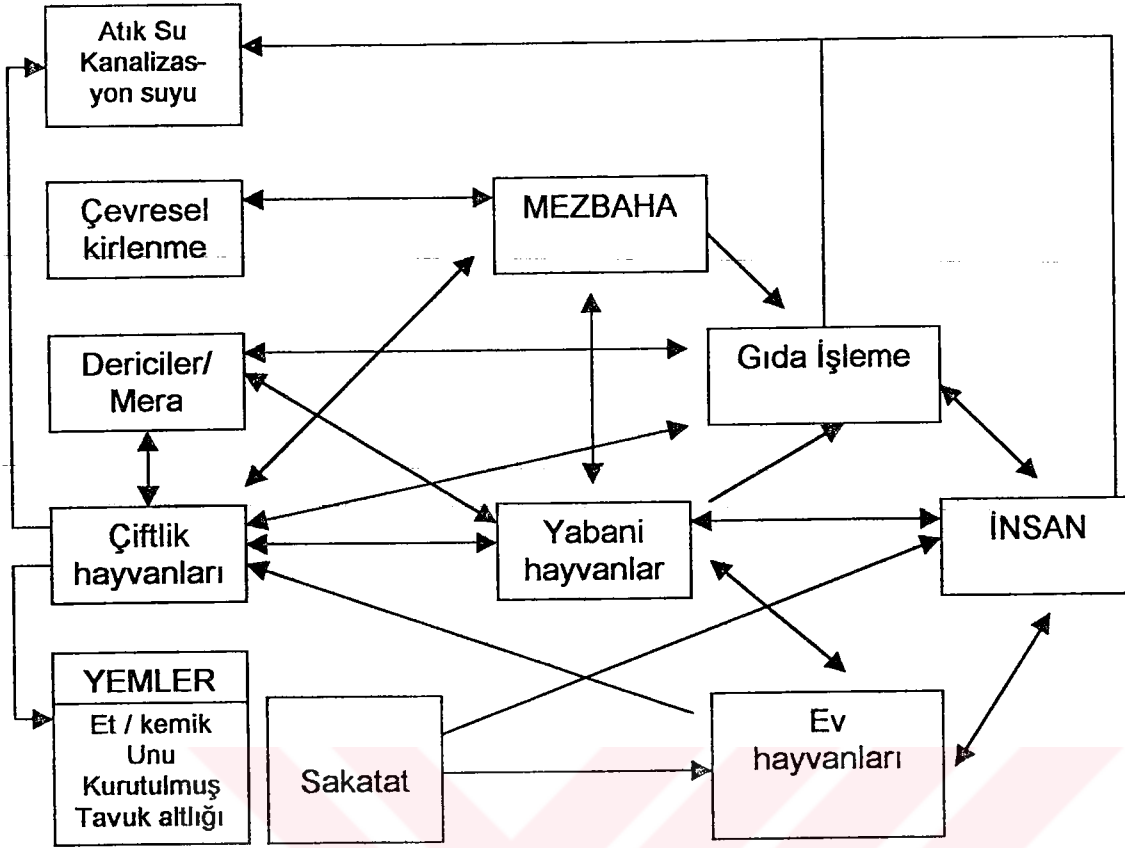
İnsan ve hayvanların *Salmonella* enfeksiyonuna yakalanmalarında suyun enfeksiyon kaynağı olarak rolü büyüktür. Prensip olarak temiz sularda *Salmonella* bakterileri çoğalamazlar. Fakat kirli ve bu bağlamda bakteriler için besin kaynağı içeren, uygun pH ve sıcaklığa sahip sularda *Salmonella* cinsi bakteriler rahatlıkla çoğalabilirler (Guthrie, 1992; Martinez et al., 1991). Evlerden ve sanayi tesislerinden gelen *Salmonella* ihtiva eden kirli suların dere, ırmak ve göl sularına karışmasıyla bu sular enfekte edilmektedir. Organik maddeleri bolca bulunduran bu sular, hastalık etkenlerini taşıması ve mikroorganizmalar için elverişli bir besiyeri olması bakımından büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Anonim, 1988; Sarımehtemtoğlu ve diğ., 1995). Bu nedenle su ürünleri yönetmeliğinin 17. maddesine göre; atık suların döküldüğü sahadaki alıcı sularda su ürünlerinin avlanmaları yasaklanmıştır (Anonim, 1995).

Her ne kadar midye ve balık gibi su ürünleri *Salmonella* için doğal kaynak değilseler de, yaşadıkları sulardaki bakterilerle kontamine olabilirler (Bernoth, 1990). *Salmonella*'nın yumuşakçalarda bulunuş oranı ile deniz sularının kirliliği arasında bir korrelasyon vardır (İnal ve diğ., 1979; Şentürk, 1994). Organik madde kirliliğinin olduğu sularda yaşayan midye ve balıklarda bakteriyel, viral kontaminasyonların olduğu bildirilmiştir (Gonzalez et al., 1993; Jehl - Pietri et al., 1990).

Midye ve istiridyelerin bakteri florası, balıkların bakteri florasıyla büyük bir benzerlik göstermektedir. Yeni avlanmış midye ve istiridyelerde mikroorganizma miktarı çok yüksek olabilir. Midyede bulunabilen *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Yersinia enterocolitica* besin hijyeni açısından önem taşırlar. Söz konusu bu etkenlerin çeşitli ülkelerde kitlesel gıda zehirlenmelerine yol açtığı bildirilmiştir (İnal, 1992). Midye tüketimiyle insanlara geçen enfeksiyon etkenlerinin başında *Salmonella* gelmektedir. Midyeleri kontamine eden kirli sulardaki patojen bağırsak bakterileri, gerek taze midyelerde gerekse dondurularak saklananlarda uzun süre canlı kalarak insanlara bulaşabilirler (Martinez et al., 1991; Reda, 1993; Yılmaz, 1989; Youssef et al., 1992). Midyelerin manto kısımlarının bakteriyolojik muayenesinde *Salmonella*'nın sık bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak, deniz midyeleri ekseriyetle pişirilerek yenildiklerinden mikropların bu yolla geçme olasılığı azdır. (Nishio et al., 1981).

2.4. *Salmonella*'nın Bulaşma Yolları ve Neden Olduğu Hastalıklar

Salmonella doğada çok yaygın bakteri olup, insan ve hayvanlara çeşitli yollar ile bulaşır (Şekil 2.4.1). Bulaşmada en önemli enfeksiyon kaynakları, portör canlılar, insanlar için hayvansal kökenli gıdalar, hayvanlar için yemler, insan ve hayvan gaitası ile kirlenmiş sular ve yabani hayvanlardır. *Salmonella* serotipleri insanda olduğu gibi; sığır, koyun, keçi, domuz, kümes hayvanları, kemirici hayvanlarda da çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu hayvanların pek çoğu çeşitli *Salmonella* türleri için asıl konakçısıdır (Anonim., 1984a; Arda ve diğ., 1999; Barrow, 1993; Bocek et al., 1992; Guthrie, 1992).



Şekil 2.4.1. *Salmonella* Enfeksiyonlarının Yayılışı (Anonim, 1984a).

Salmonella bakterisi midye, kerevit, istiridye ve balık gibi deniz ve tatlı su canlılarında (Bernoth, 1990; Bocek et al., 1992; Ertaş ve diğ.,1999; Meçgel, 1992; Morse et al., 1978a; Morse et al., 1978 b, ; Muz ve diğ., 1999; Sarıyüpoğlu, 1987); kurbağa, kertenkele, kaplumbağa, salyangoz ve solucanlarda (Özek ve diğ., 1965; Özek ve diğ., 1970; Töreci ve Anđ, 1991) tespit edilmiştir. Bu canlılar *Salmonella*'nın insanlara bulaşmasında direkt veya besin maddelerinin kontaminasyonu suretiyle de indirekt olarak rol oynarlar. *Salmonella* bakterisi yemlerle birlikte alındığı zaman balıklarda enteritise de yol açtığı bilinmektedir (Love and Minkler, 1972; Sarıyüpoğlu, 1984; Sarıyüpoğlu, 1987; Taylor, 1968). Gastroenteritis etkenleri arasında yer alan başta *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* olmak üzere, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio* ve *Aeromonas* gibi bakteri grupları arasında *Salmonella*'lar tüm gastroenteritis olgularının % 60-90'ından sorumludur (Guthrie, 1992; Töreci ve Anđ, 1991).

S. typhimurium, *S. paratyphi B*, *S. heidelberg*, *S. thompson* ve *S. newport* pek çok ülkede gastroenteritislerde etken olarak en sık izole edilen *Salmonella* serotipleridir. Zoonoz olan Salmonellozis son yıllarda gerek hayvan gerekse insanlarda önemli bir sorun haline gelmiştir (Hickman-Brenner et al., 1991; Pohl et al., 1991). *S. enteritidis* enfeksiyonlarının tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de dramatik bir artış gösterdiği bildirilmiştir (Töreci ve Anđ, 1991; Tuncer ve diğ., 1995; Ulutan ve diğ., 1995).

Salmonellozis yaygınlık bakımından solunum sistemi hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alır ve insanlarda başlıca üç tip hastalık oluşturmaktadır. Bunlar;

a) Genel enfeksiyonlar; *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. paratyphi B*; *S. paratyphi C* ve *S. typhimurium* gibi serotiplerin meydana getirdiği tifo ve paratifolar bu tip enfeksiyonlardır.

b) Sepsis ve lokal organ enfeksiyonları; İnsanlarda genel enfeksiyon ve besin zehirlenmesi yapabilen ve bir kısmı hayvanlar için patojen olan bazı *Salmonella*'lar tarafından meydana getirilen enfeksiyon tipidir. Bu tip enfeksiyonlarda insanlardan *S. paratyphi C*; *S. cholerae suis*; *S. typhimurium* ve *S. enteritidis* izole edilmiştir.

c) Enteritis ve enterokolitis enfeksiyonları; *S. paratyphi B*; *S. paratyphi C*; *S. enteritidis*; *S. typhimurium*; *S. suipestifer*; *S. montevideo*; *S. anatum* ve *S. newport* gibi serotipleri insanlarda enteritis ve enterokolitise neden olurlar (Bilgehan, 1995; Kalender ve Muz, 1999; Karagül ve diğ., 1992; Meçgel, 1992; Töreci ve Anđ, 1989).

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Salmonella teşhisinde rutin olarak kullanılan bakteriyolojik ve serolojik testler, uzun zaman almaları ve antijenik yakınlığı olan diğer türlerle kros reaksiyon vermelerinden dolayı önemli ölçüde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmeler, özellikle PCR tekniği diğer pek çok mikroorganizmada olduğu gibi *Salmonella* teşhisinde de uygulanmaktadır (Bailey, 1998).

PCR; aranan etkenlerin genetik materyallerini saptamak amacıyla gerçekleştirilen, nispeten kısa bir zaman içinde hedeflenen nükleik asitin (DNA), biyokimyasal olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (Bej et al., 1991; Mullis, 1990; Saiki et al., 1988; Taylor, 1993).

PCR, 1983 yılında geliştirilmiş, daha sonra bu teknik insan hemoglobin genlerinin ortak hücrelerinin ortaya konulması amacıyla kullanılmıştır (Coote, 1990; Erlich et al., 1991; Saiki et al., 1988; Watson et al., 1992). Yapılan bu ilk araştırmalardan sonra, güvenilir, çabuk, spesifik ve sensitif olması nedeniyle PCR tekniğinin uygulama alanları her geçen gün hızla artmaktadır. PCR, mikrobiyolojinin yanı sıra, enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde, genetik hastalıkların doğum öncesi saptanmasında, in vitro olarak fertilize edilen insan embriyolarının cinsiyet tayininde, sadece bir tel saç, az bir kandan DNA amplifiye edilerek suç araştırmaları gibi adli tıpla ilgili konularda, ekoloji ve gıda kontrolüne kadar pek çok alanda uygulanmaktadır. Bu teknik, hastalıkların ve genetik bozuklukların klinik teşhisinin yanı sıra su ve gıda maddeleri gibi çevre numunelerinde DNA sekanslarının araştırılmasında da kullanılmaktadır (Çetinkaya, 1998; Arda ve diğ., 1994; Steffan and Atlas, 1991; Virella, 1997). PCR ve bazı modifikasyonları ile, özellikle son birkaç yılda saf ve karışık kültürlerde (Widjoatmodjo et al., 1992), yumurta (Woodward and Kirwan, 1996), et (Aabo et al., 1995) ve gaita (Cohen et al., 1994; Mahon and Lax, 1993) gibi klinik materyallerde *Salmonella* 'ların teşhisi gerçekleştirilmiştir.

PCR'ın geleneksel metotlara göre pek çok avantajları vardır. Bu yöntemde; hedef organizmadan elde edilen genin bir parçası milyonlarca sayıda çoğaltılarak kolayca tespit edilebilecek seviyeye getirilmektedir. PCR, halen mevcut diğer kültür tekniklerinden daha duyarlı olup, teşhiste 12-48 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermektedir. Bu yöntem özellikle mikobakteriler gibi çok yavaş çoğalan mikroorganizmalar araştırıldığı zaman çok daha uygundur. İlk zamanlar PCR, spesifik tek bir organizma için uygulandığından, fazla masraflı ve tecrübe gerektirmekteydi. Şimdi ise basit bir PCR laboratuvarı daha düşük maliyetle oluşturulmaktadır. Bu teknik hastalık teşhisinde doğrudan pratik uygulamaya sahip olduğu gibi, aynı zamanda nedeni bilinmeyen hastalıklarda, epidemiyoloji sahasında patojen etkenin identifikasyonunda ve mikroorganizmaların sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır (Arda, 1995; Arı, 1999; Coote, 1990; Marx, 1988; Quirke, 1992).

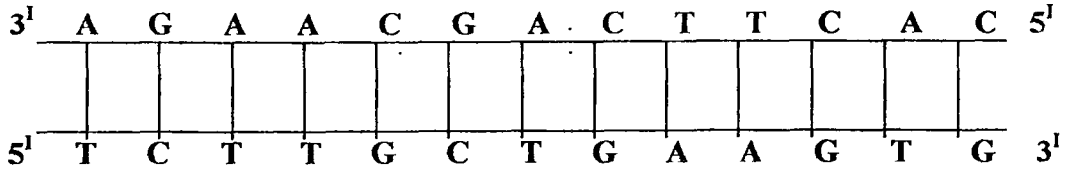
PCR'nin bu avantajları olmakla birlikte bazı dezavantajları da vardır. Duyarlılığı; tekniği kontaminasyona karşı hassas kılmakta ve deneyin sonucunun değerlendirilmesinde problem oluşturmaktadır. PCR' nin kullanımındaki önemli bir sorun da gaita analizidir. Materyal olarak direkt gaitanın kullanımı yanlış negatif sonuçların elde edilmesine (düşük sensitivite) neden olur. PCR' nin canlı mikroorganizmaların DNA' ları gibi residüel DNA' ları da tespit etmesi önemli bir dezavantajdır. Örneğin; bir etkenin DNA' sının pastörize edilmiş süttten identifikasyonu, o etkenin pastörizasyona dayanıklı olduğunun kanıtı değildir. Bu gibi durumlarda numunelerden besi yerlerine ekim yapılması da zorunlu hale gelir. Yani bireyden elde edilen numuneden bir organizmanın DNA'sının elde edilmesi bireyin canlı organizma taşıdığıının delili olamaz (Allard et al., 1990; Arda, 2000; Cohen et al., 1994; Çetinkaya, 1998; Quirke, 1992; Sarkar and Sommer, 1990; Woodward and Kirwan, 1996).

PCR'da kullanılan önemli reaksiyon bileşenleri; hedef DNA, Termostabil DNA polimeraz (Taq Polimeraz), primerler, deoksinükleotitler (Adenin, Timin, Guanin, Sitozin) ve Mg iyonlarıdır. PCR karışımında bulunan materyaller arasında ; 1) Hedef DNA, 2) Aranana DNA'ya ait iki tür spesifik oligonukleotid primerleri (15-30 bazlık, tek iplikcikli), 3) Termostabil DNA polimeraz 4) PCR buffer (KCl, MgCl₂, TritonX-100, Tris-HCl) ve 5) Dört tür dNTP (nükeotit) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) vardır (Arda, 2000; White et al., 1989). PCR' da işlem gören primer konsantrasyonu çok önemlidir, çok düşük primer konsantrasyonu PCR ürünlerinin çok az ya da hiç oluşmasına neden olurken, çok yüksek konsantrasyonu da hedef olmayan (istenmeyen) DNA dizilerinin çoğalmasına veya primerlerin birbirlerine bağlanarak "Primer Dimer" adı verilen spesifik olmayan bantların oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle primer konsantrasyonunun 0.1-1.0 µl arasında olması önerilmiştir (Arda, 1995; Coote, 1990; Sanderson and Hermon-Taylor, 1992; White et al., 1989). *Salmonella*'ların 16S ve 23S rRNA genlerinden türetilen primerler *Salmonella*'ya spesifiktir ve sadece *Salmonella* izolatlarını saptamaktadır. Böylece *Citrobacter*, *Klebsiella* ve *Serratia* türlerinden kaynaklanabilecek kros-reaksiyon ihtimali söz konusu değildir. *Salmonella* ile yakından ilişkili olan *Enterobacteriaceae* familyasının suşlarını içeren *Salmonella* dışındaki diğer izolatların hiçbiri yanlış pozitif reaksiyon meydana getirmemektedir (Lagatolla et al., 1996; Lin and Tsen, 1996; Nielsen et al., 1997).

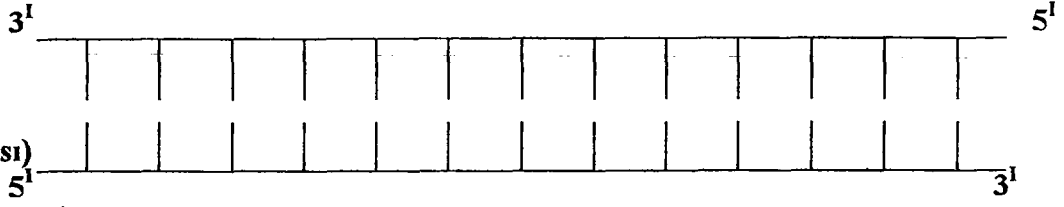
PCR; denatürasyon (nükleik asit'in iki iplikçığının birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi), hibridizasyon (primerlerin bağlanması) ve polimerizasyon (sentez) olarak adlandırılan aşamaların (Şekil 2.5.1) farklı ve kontrollü sıcaklık koşullarında tekrarlanmasından ibaret olup, bu üç basamak bir siklusu oluşturur. Bu işlem 25-30 kez tekrar edilerek üzerinde çalışılan hedef DNA'nın milyonlarca sayıda çoğaltılmasını sağlar (Şekil 2.5.2 – 2.5.3). PCR reaksiyonu sonucunda belirli uzunlukta bir veya birden fazla DNA parçacıkları elde edilir. PCR ile amplifiye edilmiş ürünlerin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan metot, bu ürünleri Ethidium bromide ile boyalı agaroz jel üzerine yükleyerek elektroforez işlemine tabi tutmak ve sonuçta ayrılan bantları ultra viyole transilluminatör ile gözle görülür bir hale getirmektir (Arda, 1995; Bej et al., 1991; Çağlayan, 1991; Çetinkaya, 1998; Persing, 1991; Saiki et al., 1988).



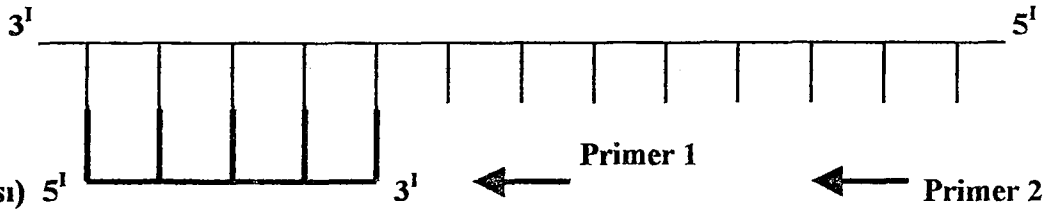
**Çift İplikli DNA
(Hedef DNA)**



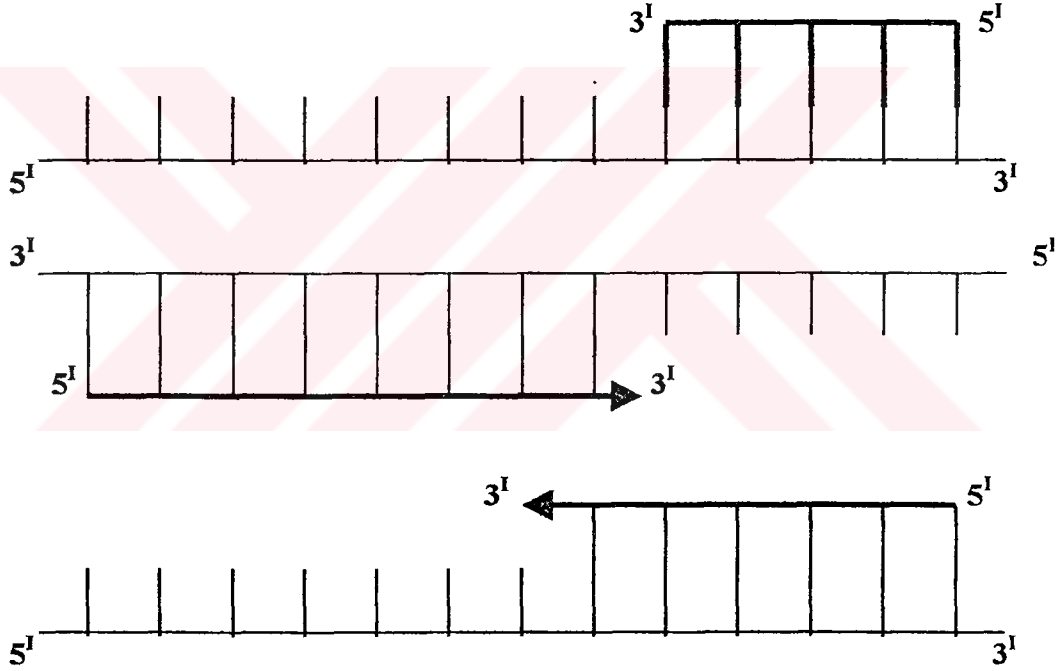
**Denatürasyon
(İplikçiklerin Ayrılması)**



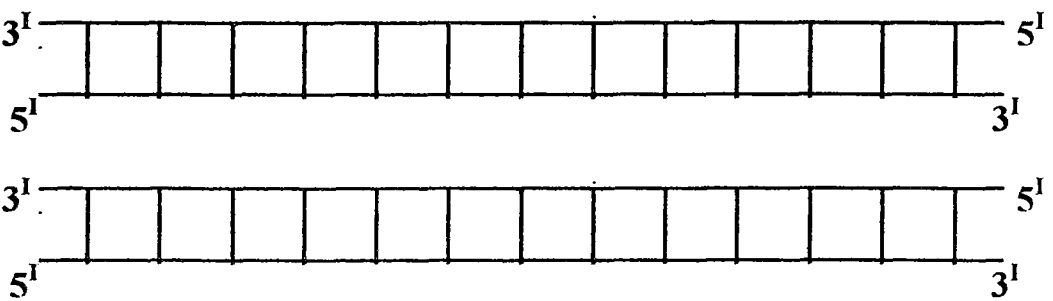
**Hibridizasyon
Primerlerin Bağlanması)**



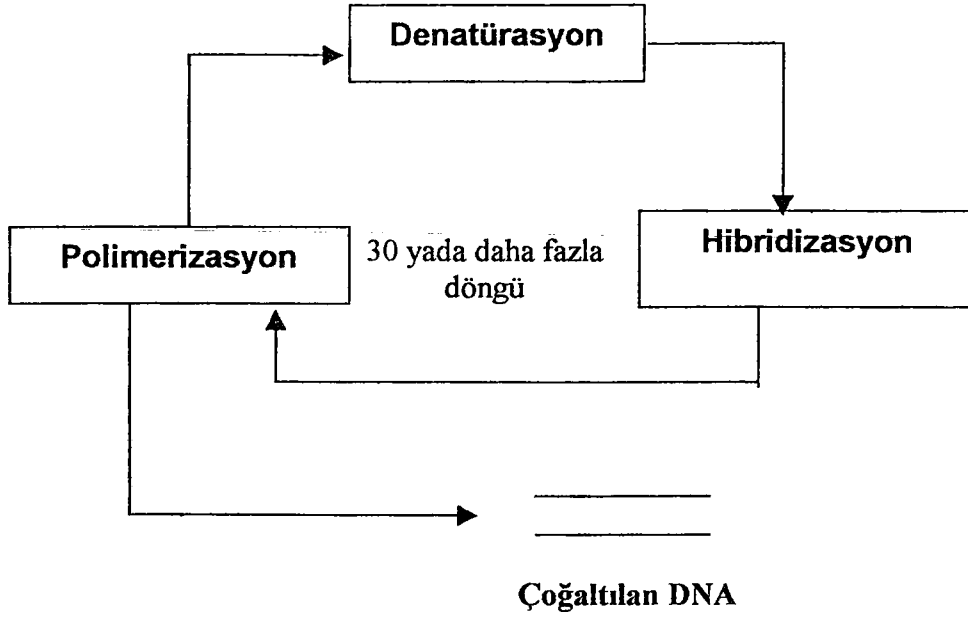
**Polimerizasyon
(Sentez)**



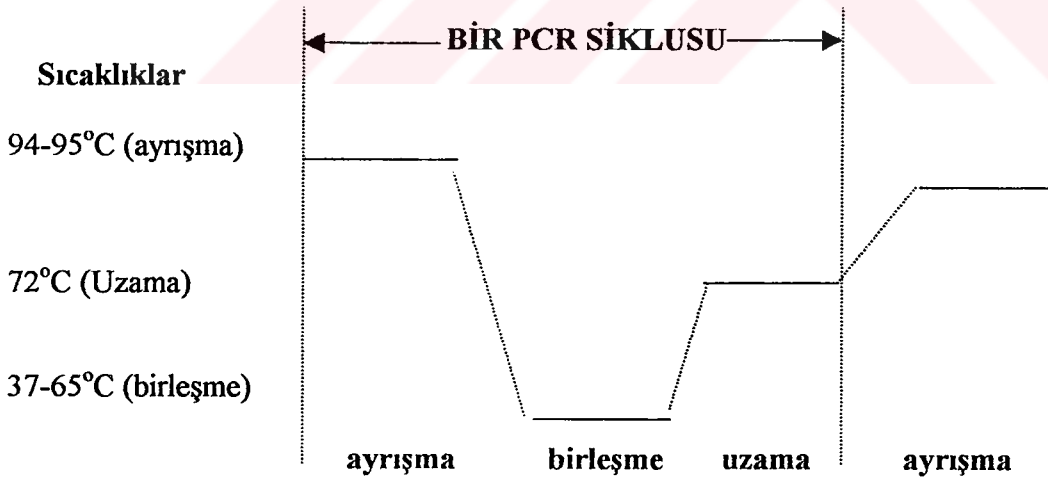
Çoğaltılan DNA



Şekil 2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) Safhaları (Saiki et al., 1988).



Şekil 2.5.2. Bir PCR Döngüsü (Saiki et al., 1988).



Şekil 2.5.3. Sıcaklık ile bir PCR siklusunun oluşumu (Saiki et al., 1988).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

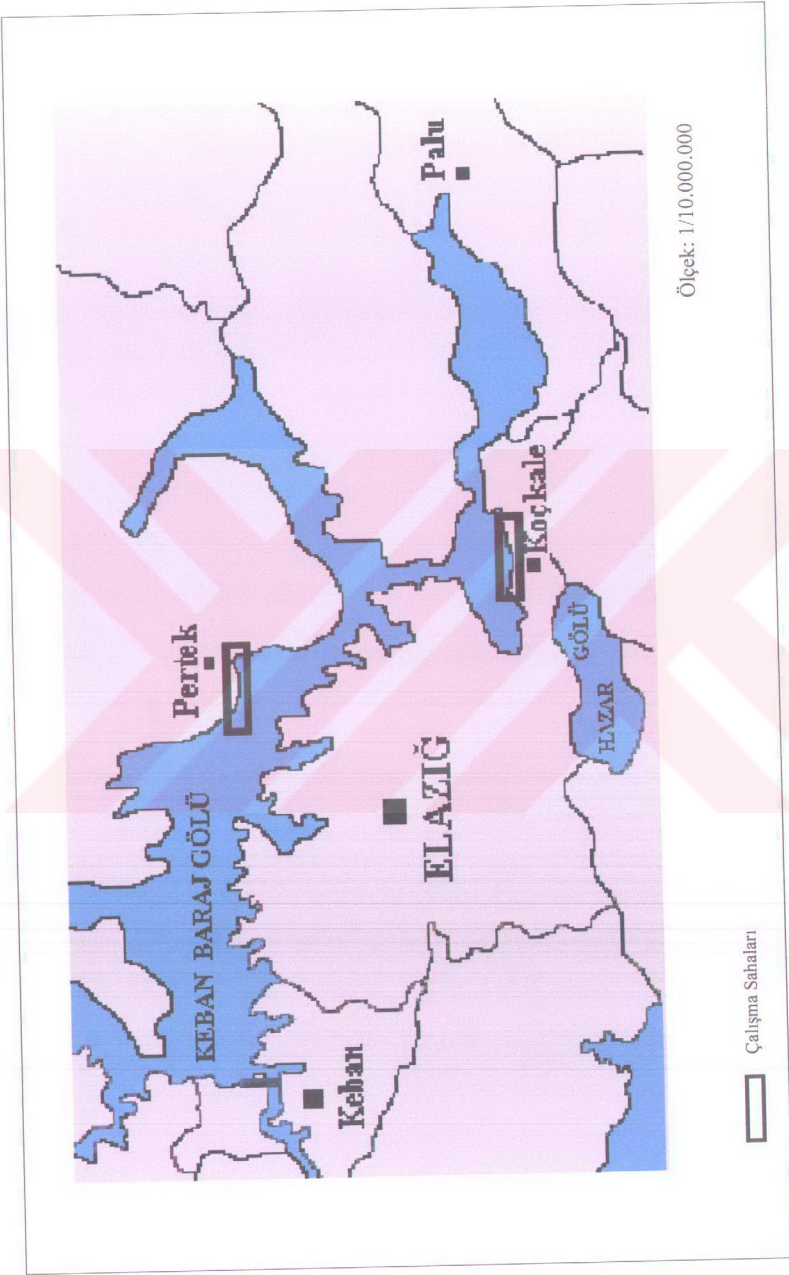
3.1.1. Çalışma Alanı ve Araştırma Materyali

Keban Barajı, Elazığ ilinin 45 km kuzey batısında Keban ilçesi yakınında, Fırat nehri üzerinde inşa edilmiştir. Göl sahası; Elazığ, Tunceli, Erzincan, Sivas ve Malatya sınırları içerisinde olup, 67.500 hektarlık rezervuar alanına sahiptir. Elektrik üretimi, sulama ve balıkçılık amaçlı kullanılan bir göldür (Anonim, 1994). Midyeler (*Unio elongatulus eucirrus*), Eylül 1999 – Nisan 2000 tarihleri arasında Keban Baraj gölünün, Koçkale ve Pertek bölgelerinden temin edildi. Koçkale bölgesi, Elazığ ilinin güney doğusunda olup merkeze 22 km uzaklıktadır ve şehir atık suları arıtma istasyonundan geçirildikten sonra bu bölgeden baraj gölüne dökülmektedir. Pertek bölgesi ise; Tunceli il sınırları içerisinde olup, Elazığ iline 25 km uzaklıktadır (Şekil 3.1.1.1).

Araştırma bölgeleri olan, Koçkale' den 397, Pertek' den ise 230 adet olmak üzere toplam 627 tatlı su midyesi toplandı. Ayrıca her iki bölgeden de farklı zamanlarda 45 su numunesi alındı. Midye ve su örneklerinin bakteriyolojik incelemeleri, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi ile Veteriner Fakültesi laboratuvarlarında, *Salmonella* polivalan serumları ile lam aglutinasyon testleri Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirildi.

3.1.2. Mikrobiyolojik Besiyerleri

Salmonella izolasyonu için; zenginleştirme besiyeri olarak Rappaport Vassiliadis pepton broth (Merck), ayırt edici besiyeri olarak MacConkey agar (Difco), *Salmonella-Shigella* agar (Difco), Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar (Merck) ve Pepton Water, izole edilen *Salmonella* suşlarının saf kültürlerini elde etmek için ise Nutrient broth besiyerleri kullanıldı (Anonim, 1998; Arda, 1995; Fricker et al., 1985). *Salmonella* identifikasyonunda; Lassen (1975)' in Norveç üçlü tüp yöntemi, Simmon's citrate agar, Dekarboksilaz besiyeri ve karbonhidrat fermantasyon besiyerlerinden yararlanıldı (Bekar, 1997; Bilgehan, 1995).



Şekil 3.1.1.1. Keban Baraj Gölünde Midyelerin Toplandığı Bölgeler

3.1.3. Referans Kùltürler ve *Salmonella* Antiserumları

Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) tekniğinin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek ve uygun DNA ekstraksiyon yöntemini belirleyebilmek için, *Salmonella enteritidis* ve *E. coli* bakterileri, Ankara Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Mikrobiyoloji laboratuvarı kùltür koleksiyonundan sağlandı. *Salmonella* polivalan O (A,B,C,D,E,F,G), grup spesifik antiserumları ise, yine Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ile piyasadan temin edildi.

3.1.4. Kullanılan Malzemeler

Laboratuvarda; PCR siklusları için gerekli sıcaklık ve zamanın programlanabildiği ısıtma bloklarına sahip DNA Thermocycler (Termal Çevirici – PCR Cihazı, Hybaid, İngiltere) (Şekil 3.1.4.1), elektroforez ve güç kaynağı (Şekil 3.1.4.2), ultraviyole transilluminatör (Şekil 3.1.4.3), dipfiriz, otoklav, etüv, sterilizasyon fırını, mikrosantrifüj, mini çalkalayıcı (Biospec Products, Oklahama, USA) (Şekil 3.1.4.4), zirkonyum boncukları, homojenizatör, eppendorf pipetleri, benmari, pH metre, hassas terazi, binoküler mikroskop, fotoğraf makinesi ve kamera sisteminden yararlandı.

Ayrıca midye ve su örneklerinin incelenmesinde, çeşitli cam malzeme ile steril bistüri, pens ve makas kullanıldı. Midyelerin çıkarılması için, gölde bazı uzak alanlara balıkçı tekneleri ile gidildi. Kasık çizmesi giyilerek midyeler kıyıda ve su içerisinde toplandı, su dolu plastik bidonlarla laboratuvara taşındı.



Şekil 3.1.4.1. DNA Thermocycler (Termal Çevirici - PCR Cihazı)



Şekil 3.1.4.2. Elektrofrez ve Güç Kaynağı