

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI
Danışman: Prof. Dr. Semiha Arayıcı

**KIYISAL SULAR VE MİDYELERDEN
İZOLE EDİLEN ENTERİK BAKTERİLERİN
ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

**Şeyma Uysal Manav
MSc. Biyolog**

İstanbul - 2013

İstanbul, 28 Mayıs 2013

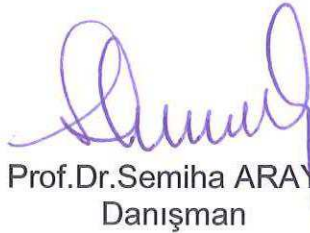
**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 50.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın doktora öğrencisi Şeyma UYSAL MANAV'ın,

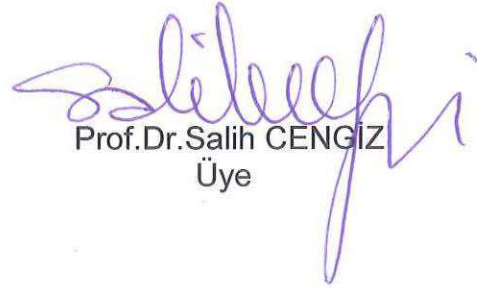
“Kıyasal Sular ve Midyelerden İzole Edilen Enterik Bakterilerin Antibiyotik Direncinin Moleküler Karakterizasyonu”

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

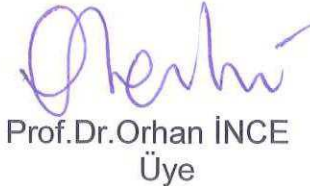
Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.



Prof.Dr.Semiha ARAYICI
Danışman
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Salih CENGİZ
Üye



Prof.Dr.Orhan İNCE
Üye



Yard.Doç.Dr.Vecdet ÖZ
Üye



Yard.Doç.Dr.Hüseyin ÇAKAN
Üye

Bu tez İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir.

Doktora Tez Proje Numarası : 6141

Acil İhtiyaç Proje Numarası : 20489

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasındaki değerli katkı ve desteğinden dolayı İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İmdat ELMAS'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında değerli önerileriyle tezin olgunlaşmasında etkili olan, desteğini ve emeğini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Semiha ARAYICI'ya çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren ve yol gösteren, hem bilimsel yönüyle hem de bireysel olarak örnek aldığım çok değerli hocam Doç.Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e en derin şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarımda desteğini esirgemeyen hocam Doç.Dr. Cemal SANDALLI'ya emeği için çok teşekkür ederim.

İstatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde verdiği emek ve desteği için değerli arkadaşım Yrd.Doç.Dr. Atakan ÖNGEN'e çok teşekkür ederim.

İ.Ü. Çevre Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen analizlerdeki desteğinden dolayı Doç.Dr. Nüket Sivri'ye teşekkür ederim.

Bana olan güvenlerini hiç yitirmeyerek beni büyük bir özveriyle destekleyen, yaşamın her anında sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, bugüne gelmemi onların sabır ve anlayışlarına borçlu olduğum çok değerli AİLEM'e ve en iyi dostum minik DEFNE'me sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımdaki başarılarımda, sevinçlerimde, hüznlerimde sabırla ve özveriyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Barış MANAV'a ve varlığı ile yaşamımı mutlu kılan, hayata gözlerini açmaya hazırlanan canım oğlum ÇINAR'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLolar DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
EKLER DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Deniz Suyu Kalitesinin İzlenmesinde İndikatör Bakteriler: Fekal Koliformlar.....	5
2.2. Denizlerde Bakteriyolojik Kirliliğin İzlenmesinde Biyoindikatör Organizma: <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamark, 1819).....	6
2.3. Mikrobiyolojik Su Kalite Kriterleri ve Standartlar.....	11
2.4. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....	14
2.5. Antibiyotiklere Karşı Direnç Gelişimi.....	15
2.5.1. Doğal (İntrinsik) Direnç.....	15
2.5.2. Kazanılmış Direnç.....	16
2.5.2.1. Kromozomal Direnç.....	16
2.5.2.2. Ekstrakromozomal Direnç.....	16
2.5.2.2.1. Plazmidler.....	16
2.5.2.2.2. Transpozonlar.....	17
2.5.2.2.3. İntegronlar.....	18
2.6. Sucul Ekosistemde Antibiyotik Direnci.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Araştırma Alanı.....	26
3.2. Örneklemeye.....	29
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	30

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.3.2. Kullanılan Gereçler.....	32
3.4. Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.5. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	35
3.6. Analiz Yöntemleri.....	41
3.6.1. Numune Hazırlama.....	41
3.6.2. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi.....	42
3.6.3. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonları.....	42
3.6.3.1. Kromojenik Besiyerleri ile Bakteri İdentifikasyonu.....	42
3.6.3.2. Biyokimyasal Testler.....	43
3.6.3.2.1. İMVİC Testleri.....	43
3.6.3.2.1.1. İndol Testi.....	43
3.6.3.2.1.2. Metil Kırmızısı (MR) Testi.....	44
3.6.3.2.1.3. Voges-Proskauer (VP) Testi.....	44
3.6.3.2.1.4. Sitrat Testi.....	44
3.6.3.2.2. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Testi.....	45
3.6.3.2.3. Üre Testi.....	45
3.6.3.2.4. Hareket Testi.....	45
3.6.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	46
3.6.5. Çoklu Antibiyotik Dirençliliği (MAR) İndeksi.....	47
3.6.6. Bakteri Kültürlerinin Muhafazası.....	47
3.6.7. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	48
3.6.8. DNA İzolasyonu.....	48
3.6.9. DNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi.....	49
3.6.9.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
3.6.9.2. DNA Saflık ve Miktar Tayini.....	50
3.6.10. İntegraz Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Analizi...	50
3.6.10.1. <i>Int I-1</i> geninin PCR ile Analizi.....	50
3.6.10.2. <i>Int I-2</i> geninin PCR ile Analizi.....	50
3.6.11. İntegronların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Analizi	51
3.6.11.1. Sınıf 1 İntegronların PCR ile Analizi.....	51

3.6.11.2. Sınıf 2 İntegronların PCR ile Analizi.....	51
3.6.12. Tetrasiklin Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Analizi...	52
3.6.12.1. <i>tet</i> (A) Geninin PCR ile Analizi.....	52
3.6.12.2. <i>tet</i> (B) Geninin PCR ile Analizi.....	52
3.6.13. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	53
3.6.14. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	53
3.6.15. Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronların Klonlanması.....	54
3.6.15.1. Ligasyon.....	54
3.6.15.2. Transformasyon.....	55
3.6.15.3. Rekombinant Kolonilerin Seçimi.....	55
3.6.16. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu.....	56
3.6.17. Klonlamanın Doğrulanması Amacıyla Rekombinant Kolonilerden PCR ile Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronların Saptanması.....	57
3.6.18. DNA Dizi Analizi.....	58
3.6.19. Biyoinformatik Analiz.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. Fizikokimyasal Parametreler.....	59
4.2. Toplam Koliform Bakteri Sayısı (TKBS).....	62
4.3. Bakteri İdentifikasyonu.....	67
4.4. Biyokimyasal Testler.....	69
4.5. Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları.....	70
4.6. Çoklu Antibiyotik Dirençliliği (MAR) İndeksi.....	72
4.7. Genomik DNA İzolasyonu.....	73
4.8. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin PCR ile Belirlenmesi.....	75
4.9. Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronların Klonlanması.....	78
4.10. İntegron Gen Kasetlerinin Dizi Analizi ile Karakterizasyonu.....	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	84
6. ÖNERİLER.....	88
6. KAYNAKLAR.....	89
7. EKLER.....	98
8. ÖZGEÇMİŞ.....	106

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1	: <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819)'in sistematikteki yeri...	7
Tablo 3.1.	: Örnekleme Noktaları.....	27
Tablo 3.2.	: Kromojenik UTI agarda üreyen bakterilerin koloni renkleri.....	43
Tablo 3.3.	: <i>int I-1</i> , <i>int I-2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , sınıf 1 ve sınıf 2 integronların PCR analizinde kullanılan oligonükleotid primerler.....	53
Tablo 3.4.	: Dizi analizinde kullanılan T7 ve SP6 promoter primerlerin nükleotid dizisi.....	58
Tablo 4.1	: Kıyısal su istasyonlarında ölçülen fizikokimyasal parametrelerin minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin mevsimsel değişimi.....	59
Tablo 4.2	: Kıyısal su istasyonlarına ait toplam koliform bakteri sayıları (TKBS).....	62
Tablo 4.3	: <i>M.galloprovincialis</i> örneklerine ait toplam koliform bakteri sayılarının minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin mevsimsel değişimi.....	65
Tablo 4.4	: <i>E.coli</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçları.....	69
Tablo 4.5	: İzole edilen <i>E. coli</i> suşlarına ait antibiyotik duyarlılıkları.....	70
Tablo 4.6	: <i>E.coli</i> suşlarına ait genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri.....	74
Tablo 4.7	: Kıyısal su ve <i>M.galloprovincialis</i> örneklerinden izole edilen antibiyotiklere dirençli <i>E.coli</i> suşlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonları.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	: <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in genel görünüşü.....	7
Şekil 2.2	: <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'in iç organları.....	8
Şekil 2.3	: <i>Mytilus galloprovincialis</i> 'de filtrasyon.....	10
Şekil 2.4	: Ters yönlü tekrar dizileri (IR) ve transpozaz genini içeren IS26 elementinin yapısı.....	18
Şekil 2.5	: Ters yönlü tekrar dizileri (IR) ve <i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> ve <i>bla_{TEM}</i> genlerini içeren Tn3 transpozonunun yapısı.....	18
Şekil 2.6	: Gen kasetlerinin genel yapısı.....	19
Şekil 2.7	: İntegronların genel yapısı.....	20
Şekil 2.8	: Antibiyotik direncinin çevrede yayılımı.....	21
Şekil 3.1	: Örneklem Noktalarının Konumu.....	27
Şekil 3.2	: D1 no'lu istasyon (Ataköy)	28
Şekil 3.3	: D2 no'lu istasyon (Yeşilköy).....	28
Şekil 3.4	: D3 no'lu istasyon (Menekşe).....	28
Şekil 3.5	: D4 no'lu istasyon (Menekşe Küçükçekmece Bağlantı Noktası).....	28
Şekil 3.6	: D5 no'lu istasyon (Avcılar).....	28
Şekil 3.7	: D6 no'lu istasyon (Zeytinburnu).....	28
Şekil 3.8	: D7 ve M1 nolu istasyonlar (Büyükçekmece).....	29
Şekil 3.9	: D8 ve M2 nolu istasyonlar (Menekşe-Ambarlı).....	29
Şekil 3.10	: D9 ve M3 no'lu istasyonlar (Rumeli Kavağı).....	29
Şekil 3.11	: Yetişkin <i>M.galloprovincialis</i>	41
Şekil 3.12	: Kapama kasları bistüri ile açılan <i>M.galloprovincialis</i>	41
Şekil 3.13	: Kromojenik UTI agarda (Himedia) üreyen bakterilerin koloni görünümü.....	43
Şekil 3.14.	: pGEM®-T Easy vektör üzerindeki çoklu klonlama bölgesi ve promoterlerin dizisi.....	54

Şekil 4.1	: Kıyısal su istasyonlarında pH ve deniz suyu sıcaklıklarının İstasyonlar arası değişimi.....	60
Şekil 4.2	: Kıyısal su istasyonlarında çözülmüş oksijen (mg/l) ve deniz suyu sıcaklıklarının istasyonlar arası değişimi.....	61
Şekil 4.3	: Kıyısal su istasyonlarına ait toplam koliform bakteri sayılarının (TKBS) istasyonlar arası değişimi.....	63
Şekil 4.4	: Kıyısal su istasyonlarında ortalama toplam koliform bakteri sayısı (TKBS) ve deniz suyu sıcaklıklarının mevsimsel değişimi.....	64
Şekil 4.5	: Kıyısal su istasyonlarında TKBS (EMS/100 ml) ile deniz suyu sıcaklığı arasındaki mevsimsel ilişki.....	64
Şekil 4.6	: <i>M.galloprovincialis</i> örneklerine ait ortalama toplam koliform bakteri sayılarının (TKBS) mevsimsel değişimi.....	66
Şekil 4.7	: <i>M.galloprovincialis</i> ve <i>M.galloprovincialis</i> 'in yetiştiği deniz suyu örneklerinde tespit edilen toplam koliform bakteri sayısı (TKBS) arasındaki ilişki.....	67
Şekil 4.8	: <i>M.galloprovincialis</i> örneklerinde tespit edilen bakteri türleri.....	68
Şekil 4.9	: Kıyısal su istasyonlarında tespit edilen bakteri türleri.....	68
Şekil 4.10	: Çalışma süresince tespit edilen bakteri türlerinin mevsimsel değişimi.....	69
Şekil 4.11	: Kıyısal su istasyonlarına ait enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri.....	71
Şekil 4.12	: <i>M.galloprovincialis</i> örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri...	72
Şekil 4.13	: <i>M.galloprovincialis</i> örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksleri dağılımı.....	72
Şekil 4.14	: Kıyısal su istasyonlarına ait enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksleri dağılımı.....	73
Şekil 4.15	: <i>E.coli</i> suşlarına ait genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	73

Şekil 4.16 : Sınıf 1 (<i>intI-1</i>) ve sınıf 2 (<i>intI-2</i>) integraz genleri PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.....	75
Şekil 4.17 : Sınıf 1 integron PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.....	76
Şekil 4.18 : Sınıf 2 integron PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.....	77
Şekil 4.19 : Tetrasiklin direnç genleri PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.....	77
Şekil 4.20 : Mavi ve beyaz kolonilerin görünümü.....	78
Şekil 4.21 : Sınıf 1 ve sınıf 2 integronları taşıyan rekombinant plazmid DNA'ların agaroz jel elektroforegramı.....	78
Şekil 4.22 : İntegronları içeren rekombinant plazmidlerin amplikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.....	79
Şekil 4.23 : Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların taşıdığı gen kaset sıralarının şematik gösterimi.....	83

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
PCR	: Polymerase Chain Reaction
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NBLAST	: Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
PBLAST	: Protein Basic Local Alignment Search Tool
cfu	: Colony forming unit
MAR	: Multiple Antibiotic Resistance
MPN	: Most Probable Number
°C	: Santigrad derece
kb	: kilobaz
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
rpm	: Revolutions per unite (dakikada devir sayısı)
uv	: Ultraviyole

EKLER DİZİNİ

Ek 1 : Standart EMS Tablosu.....	98
Ek 2 : <i>Enterobacteriaceae</i> Familyası İçin Zon Çapları Yorumlama Standartları..	98
Ek 3 : <i>E.coli</i> suşlarının taşıdığı sınıf 1 ve sınıf 2 integronların baz dizilimleri....	99

ÖZET

Kıyusal Sular ve Midyelerden İzole Edilen Enterik Bakterilerin Antibiyotik Direncinin Moleküler Karakterizasyonu

Mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde, tıp ve veteriner hekimlikte yaygın şekilde kullanılan antibiyotikler ve bunlara bağlı olarak gelişen antibiyotik direnci, tüm dünyada yoğun ilgi alanı bulmaktadır. Fekal kirliliğe neden olan dirençli bakterileri içeren evsel atık sular, yeterli düzeyde veya hiç arıtılmadan sucul ortama deşarj edilerek, rekreasyon ve balıkçılık aktiviteleri amaçlı kullanılan deniz ekosistemlerinde antibiyotik direncinin kazanımına ve yayılımına katkıda bulunurlar. Çevrede doğal olarak bulunan dirençli mikroorganizmalar ile insan veya hayvan kaynaklı mikroorganizmalar arasında aktarılan direnç genleri, mikroorganizmaların gen havuzunda uzun vadeli ve geri dönüşümsüz etkiler meydana getirerek çok sayıda direnç genine sahip olmalarına neden olur.

Bu çalışmada endüstrileşme ve nüfus yoğunluğunun gittikçe arttığı İstanbul'da bakteriyel kirlenmeye maruz kalan kıyusal sulardaki fekal kirlilik yoğunluğu ve kıyusal sular ve midyelerde bulunan enterik bakterilerin antibiyotik direncinin bölgeye özgü moleküler karakterleri araştırılmıştır.

Haziran 2010-Mayıs 2011 tarihleri arasında yürütölen bu çalışmada, İstanbul Güneybatı sahilinde 6 farklı istasyondan deniz suyu örnekleri ile İstanbul Avrupa Yakasında 3 farklı istasyondan *Mytilus galloprovincialis* ile *M.galloprovincialis*'in yetiştiiği deniz suyu örnekleri toplanmıştır. Mevsimsel olarak alınan örneklerde, bakteriyolojik kirliliği belirlemek amacıyla toplam koliform bakteri sayımı yapılmış ve örneklerden izole edilen *E.coli* suşlarının Disk Difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. *E.coli* suşlarında, integras 1 genine spesifik *intI-1* ve integras 2 genine spesifik *intI-2* geni ile tetrasikline dirençli olan suşlarda *tet(A)* ve *tet(B)* direnç genlerinin varlığı PCR analizi ile incelenmiştir. *intI-1*ve *intI-2* pozitif *E.coli* suşlarında sınıf 1 ve sınıf 2 integronların varlığı araştırılarak, her bir integronun taşıdığı antibiyotik direnç genleri dizi analizi ile belirlenmiştir.

Kıyusal su örneklerinde toplam koliform bakteri sayısı 7×10^1 - $>11 \times 10^3$ EMS/100ml, *M.galloprovincialis*'lerde TKBS 3×10^2 - $>11 \times 10^4$ EMS/100 ml aralığında ölçölmüştür. İzole edilen örneklerde en yoğun gözlenen bakteri türü *E.coli* (%61,11) olup, bu suşlarda en yüksek direnç frekansı ampisilin (%54,54) antibiyotiğinde gözlenmiştir. Tetrasikline dirençli suşlar arasında *tet(B)* direnç geninin yaygın olduğu belirlenmiştir. 101 *E. coli* suşunun PCR analizleri sonucunda 55 *E. coli* suşunda *int I-1* geni (0,5 kb), 60 *E.coli* suşunda *int I-2* geni (0,9 kb) ve 4 *E.coli* suşunda sınıf 1 integron (1,2-2,0 kb), 6 *E. coli* suşunda sınıf 2 integron (2,1 kb) tespit edilmiştir. Sınıf 1 ve sınıf 2 integronun *dfrA1*, *dfrA12*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *sat2* ve *bla_{oxa-2}* gen kasetlerini içerdiği belirlenmiştir.

Bu çalışma ile kıyusal sular ve midyelerde fekal kökenli bakterilerin yoğunluğu belirlenerek, izole edilen enterik bakterilerde antibiyotik direncinden kaynaklanan çevre kirliliği ve rasyonel antibiyotik kullanımının teşviki konularına açıklık getirilmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte antibiyotik direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu ile Türkiye deniz ekosistemine özgü antibiyotik direnç profilinin oluşturulması için gerekli olan temel bilgiler sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik Direnci, Fekal koliform, Kıyusal sular, *Mytilus galloprovincialis*, Sınıf 1 integron, Sınıf 2 integron, tet(A), tet(B), intI-1, intI-2.

ABSTRACT

Molecular Characterization of Antibiotic Resistance of Enteric Bacteria Isolated from Coastal Waters and Mussels

Antibiotics commonly used in medicine and veterinary medicine for prevention and treatment of microbial infections and consequently developing antibiotic resistance has been garnering great interest worldwide. Domestic waste water with resistant bacteria that cause fecal pollution is discharged to the aquatic environment with inadequate or no purification, contributing to developments and expansion of antibiotic resistance in marine ecosystems used for recreation and fishing activities. Resistance genes transferred between resistant microorganisms naturally present in the environment and human or animal microorganisms create long-term and irreversible impacts on gene pool of microorganisms, causing a large number of resistance genes.

This study examines density of fecal pollution in coastal waters exposed to bacterial contamination in Istanbul, where industrialization and increasing population has been gradually increasing, and region-specific molecular characters of antibiotic resistance of enteric bacteria in coastal waters and mussels.

This study was conducted between June 2010 and May 2011 whereby sea water were sampled from 6 different stations in the Southwest coast of Istanbul, and also *Mytilus galloprovincialis* and sea water in *M.galloprovincialis* grow were collected from 3 different stations in the European Side of Istanbul. Total coliform bacteria were counted in seasonally collected samples to detect bacteriological pollution, and antibiotic susceptibilities of *E.coli* strains isolated from the samples were identified by Disk Diffusion method. For *E. coli* strains, presence of *intI-1* specific to the integrase 1 gene and *intI-2* specific to the integrase 2 gene, and presence of resistance genes *tet(A)* and *tet(B)* in tetracycline resistant strains were examined through PCR analysis. Presence of class 1 and class 2 integrons in *intI-1* and *intI-2* positive *E. coli* strains was investigated, and antibiotic resistance genes carried by each integron were identified through sequencing analysis.

The total number of coliform bacteria in coastal water samples was measured in a range of 7×10^1 - $>11 \times 10^3$ EMS/100ml and for *M.galloprovincialis*, in a range of TKBS 3×10^2 - $>11 \times 10^4$ EMS/100 ml. *E. coli* is the most frequently observed bacterial species in isolated samples (61.11%), and the highest frequency of resistance in these strains was observed in ampicillin antibiotic (54.54%). The resistant strain *tet(B)* was found out to be frequent among tetracycline resistant strains. As a result of PCR analyses on 101 *E.coli* strains, the *int I-1* gene (0,5 kb) was detected in 55 *E.coli* strains, the *int I-2* gene (0,9 kb) in 60 *E.coli* strains, class 1 integron (1,2-2,0 kb) in 4 *E.coli* strains and class 2 integron (2,1 kb) in 6 *E.coli* strains. Class 1 and class 2 integrons were found out to contain the gene cassettes *dfrA1*, *dfrA12*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *sat2* and *bla_{oxa-2}*.

This study aims at identifying the density of bacteria of fecal origin in coastal waters and mussels, and clarifying the issues of environmental pollution caused by antibiotic resistance in isolated enteric bacteria and promotion of the rational use of antibiotics. Additionally, basic information required to ensure the molecular characterization of antibiotic resistance genes and to create an antibiotic resistance profile specific to the marine ecosystem of Turkey is provided.

Key Words: Antibiotic Resistance, Fecal Coliform, Coastal Water, *Mytilus galloprovincialis*, Class 1 integron, Class 2 integron, *tet(A)*, *tet(B)*, *intI-1*, *intI-2*.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotikler ve antibiyotik dirençli bakteriler, antibiyotiklerin tıp, veterinerlik ve tarım uygulamalarında gelişigüzel ve yüksek miktarlarda kullanımı sonucu doğrudan veya dolaylı olarak toprak ve su çevresine değişik miktarlarda deşarj edilirler (Türkdoğan F.I. 2009, Zhang X.X. 2009, Kemper N. 2008). Kentsel atık su arıtma tesislerinden gelen bu kirleticiler tarafından deniz, nehir ve göl gibi alıcı su ortamları ve diğer çevre ortamları önemli ölçüde kirlenmektedir (Goni-Urriza M. 2000).

Antibiyotiklerin büyük bir kısmı insan ve hayvan vücudundan çok az dönüştürülerek veya hiç değişmeden üre ve dışkı ile birlikte atılırlar (Jørgensen S.E. 2000). İnsanlar tarafından kullanılan antibiyotiklerin aktif maddeleri atık su arıtımı esnasında tamamen uzaklaştırılmazlar ve böylece hiç değişmeden atık su arıtma tesislerinden alıcı ortama deşarj edilirler (Kümmerer K. 2003). Araziye yayılmış olan arıtma çamurlarında ve çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinden elde edilen gübrede bulunan antibiyotik aktif maddeleri sızıntı ile yer altı sularına ve sucul çevreye ulaşırlar. Balık çiftliklerinde kullanılan antibiyotikler ise doğrudan sucul çevrede birikirler (Halling-Sørensen B. 1998, Kümmerer K. 2004). Hedef organizması bakteriler olan antibiyotiklerin çok düşük konsantrasyonlarda atık su arıtma tesislerinden alıcı ortama sürekli olarak deşarj edilmesi, mikrobiyal ekoloji üzerinde olumsuz etki meydana getirdiği gibi mikroorganizmaların antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirmesine de neden olabilmektedir (Sungpyo K. 2007, Jørgensen S.E. 2000, Costanzo S.D. 2005, Hirsch R. 1999).

Atık su deşarjı nedeniyle alıcı ortamdaki suyun kalite özelliklerinin bozulması ulusal ve uluslararası kapsamda ve önemde bir “su kalitesi” sorunudur. Ülkemizde su kalitesinin korunması ve su kirlenmesinin önlenmesi amacıyla uygulanan Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği’nde rekreasyon amacıyla kullanılan kıyı ve deniz sularının sağlaması gereken maksimum standart değerler belirtilmiştir. Kentsel veya endüstriyel nitelikli atıksu kaynaklarından doğrudan derin deniz deşarjında veya atıksu arıtma tesislerinden arıtılmış olarak çıkan suların alıcı su ortamlarına boşaltılmasında yönetmelikte belirtilen deşarj standart değerlerine uyulması gerekmektedir (Resmi Gazete Sayı: 25687. 2004). Atıksu deşarjının olumsuz etkilerine karşı çevreyi korumak amacıyla, kentsel veya

endüstriyel atıksuların toplanması, arıtılması ve deşarjı ile atıksu deşarjının izlenmesi, raporlanması ve denetlenmesi Kentsel Atıksu Arıtımı Yönetmeliği'nde belirtilen esaslar doğrultusunda kontrol altına alınmıştır (Resmi Gazete Sayı: 26047. 2006).

Tüm kurum ve kuruluşlar, yer altı ve yerüstü su kaynakları potansiyelinin her türlü kullanımının korunmasını ve su kirliliğinin önlenmesini sağlamak amacıyla ilgili yönetmeliklerde belirlenen hükümlere uymak ve bunları uygulamakla yükümlüdürler. Yönetmeliklerde belirtilen esaslara aykırı davranıldığı belirlenen durumlarda 2872 sayılı Çevre Kanunu'nun ilgili hükümleri ile 5237 sayılı Türk Ceza Kanun'unun 181. ve 182. maddeleri gereğince adli nitelikte para cezası ve/veya hürriyeti bağlayıcı cezalar uygulanmaktadır (Resmi Gazete Sayı 2872. 1983, TCK. 2004). İnsan veya diğer canlı türleri üzerinde tedavisi güç hastalıklara sebep olacak veya canlı türlerinin neslinin devamını tehlikeye sokacak şekilde doğal ekosisteme kalıcı zarar verecek atıkların suya, toprağa veya havaya bırakılması TCK'da çevreye karşı işlenen suçlar kapsamında değerlendirilmektedir (Katoğlu, T. 2005, TCK. 2004).

Sucul çevrede antibiyotik direnç gen havuzunun oluşmasında ve direnç genlerinin yayılmasında fekal kirlilik indikatörü bakteriler önemli rol oynarlar. (Goni-Urriza M. 2000, Levy S.B. 2004). Yeterli düzeyde veya hiç arıtılmadan doğrudan alıcı ortama deşarj edilen kanalizasyon suları, tarım alanlarından drene olan yağmur suları ve gübre en önemli indikatör bakteri olan fekal koliform kaynaklarıdır (Dang H. 2008). Fekal koliformlar, mikrobiyolojik olarak kirlenen sularda yaşayabilme yeteneğindeki midye türleri tarafından deniz suyundan biyofiltrasyon ile filtre edilirler. Bu özellikleri nedeniyle midye türleri, kıyısulardaki uzun vadeli mikrobiyal kirliliğin izlenmesinde biyoindikatör organizma olarak kullanılırlar (Coelho M.P.P. 1999, De Donno A. 2008). Kıyısularda bulunan indikatör bakteri miktarının, su ve midye yoluyla bulaşan gastrointestinal enfeksiyon hastalıklarının ortaya çıkması ile önemli derecede ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Prüss A. 1998). Bu bağlamda su kaynaklarının kullanımı ve midyenin gıda olarak tüketilmesi yoluyla antibiyotiğe dirençli bakteriler ve direnç genlerinin, insan veya hayvanlara bulaşması çevre ve halk sağlığı açısından büyük bir risk taşımaktadır (Fleming L.E. 2006, Kruse H. 1994, Rehnstam-Holm A.S. 2005).

Antibiyotiklerin üretim ve tüketimindeki artışa bağlı olarak gelişen antibiyotik direnci, sucul çevrede doğal olarak bulunan mikroorganizmalar ile insan ve hayvan kaynaklı mikroorganizmalar arasında direnç genlerinin aktarımına neden olur (Baquero F. 2008). Bu aktarım sonucunda mikroorganizmaların gen havuzunda önemli değişiklikler gözlenir. Bu uzun vadeli ve geri dönüşümsüz etkiler sonucunda ekolojik dengenin bozulması, mikroorganizmaların doğal seleksiyona uğrayarak çok sayıda direnç genlerine sahip olmasına neden olmaktadır (Jørgensen S.E. 2000, Levy S.B. 2004). Bu şekilde sucul çevrede direnç genlerinin gittikçe artışı ekolojik bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (Kümmerer K. 2004).

Antimikrobiyal ajanlar kendilerine karşı direnç geliştirme yeteneği olan bakteri toplulukları üzerinde kuvvetli seçici bir baskı uygularlar. DNA moleküllerinde bulunan genlerde modifikasyonlara neden olan mutasyon veya yeni direnç genlerinin kazanımını sağlayan horizontal gen transferi, bakterilerin antimikrobiyal ajanlara maruz kalması sonucu ortaya çıkan seçici baskının üstesinden gelmede organizmanın yeteneğine katkıda bulunurlar (Kuyucu N. 2007, Levy S.B. 2004).

Antibiyotik direnç genlerinin sucul ekosisteme atık su arıtma tesisleri tarafından aktarılması ile oluşan antibiyotik direnci tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çok önemli bir “çevresel kirlilik” problemidir. Atıksu arıtma tesislerinin dizayn ve işleyişlerindeki farklılıklar atıksulardaki dirençli genlerin ve dirençli bakterilerin sucul ortamda bulunmasına etki edebilmektedir. Atıksularda bulunan bakterilerde, yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak meydana gelen antibiyotik direnç çeşitliliği ve atıksu arıtma tesislerinde farklı arıtma prosedürlerinin uygulanması sonucunda bölgeye ve ülkeye özel direnç tabloları gelişebilmektedir (Rysz M. 2004).

Deniz suyundan kaynaklanan bakteriyel suşların %90'ı bir antibiyotiğe, %20'den fazlası ise en az beş farklı antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir (Baquero F. 2008). Antibiyotik direnç genlerinin atık sular, deniz suları, yüzey suları, nehirler, göller ve içme suları gibi sucul çevrelerde de tıp ve veterinerlikte kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler rapor edilmiştir (Akiyama T. 2010, Maal-Bared R, 2013, Coleman B.L. 2013, Dada A. C, 2013, Watkinson A. J, 2007). Deniz sedimentinden alınan örneklerde sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar (Hall R.M. 1998) ve kıyısal sulardan alınan

örneklerde tetrasiklin sınıfı antibiyotiklere karşı direnç gelişimi araştırılmıştır (Dang H. 2008, Guardabassi L. ve ark.2000).

Ülkemizde sucul çevrede bulunan fekal koliformların antibiyotik direnç fenotipi ile ilgili çalışmalar rapor edilmesine rağmen, antibiyotik direncinin moleküler mekanizmaları ve ekolojileri üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Özgümüş O.B. 2007, 2009, Çolakoğlu F. ve ark.2010, Sandallı C. ve ark. 2010). Önceki çalışmalar, sucul ekosistemde antibiyotiklere direncin evrimi ve hareketli antibiyotik direnç determinantlarının moleküler epidemiyolojisi gibi konuların yeni olduğunu ve araştırmaların belirli bir bölge ile sınırlı kaldığını göstermektedir. Dolayısıyla sucul ekosistemlerdeki bakteriyel populasyonlarda yapılacak antibiyotik direnç profili ile ilgili daha kapsamlı ve çeşitli moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu açıkça görülmektedir. Bu bağlamda, geliştirdiğimiz çalışmamızda antibiyotiklere dirençli bakterilerin atık sular, dereler veya diğer su akımları vasıtasıyla denizlere ulaşarak rekreasyon ve balıkçılık aktiviteleri amaçlı kullanılan deniz ekosistemlerine yayılmasında rol oynayan integronlar ve direnç genleri araştırılmıştır. Bu amaçla, örnekleme istasyonları fekal kirliliğin yoğun olduğu İstanbul Güneybatı sahil şeridi üzerindeki farklı noktalardan seçilmiştir. Bununla beraber yoğun olarak tüketilen ve insan sağlığı açısından tehlike oluşturan *M.gallopovincialis*'lerin örneklendiği istasyonlar, özellikle gıda olarak tüketime sunulan midyelerin toplandığı bölgelerle sınırlandırılmıştır.

Bu bilgiler ışığında; “Kıyısız Sular ve Midyelerden İzole Edilen Enterik Bakterilerin Antibiyotik Direncinin Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı çalışmamızda, endüstrileşme ve nüfus yoğunluğunun gittikçe arttığı İstanbul ilinde, evsel atık suların çevre sulara uygun olmayan deşarjı sonucu oluşan bakteriyolojik kirliliğe bağlı olarak, kıyısız sular ve midyelerde bulunan fekal kökenli bakterilerin yoğunluğu araştırılmış ve antibiyotik direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu ile Türkiye deniz ekosistemine özgü antibiyotik direnç profilinin oluşturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DENİZ SUYU KALİTESİNİN İZLENMESİNDE İNDİKATÖR

BAKTERİLER: FEKAL KOLİFORMLAR

Suyun sağlık açısından kalitesinin değerlendirilmesinde en hassas ve en özgün yol, suya enterik bakterilerin karıştığıının göstergesi olan mikroorganizmaların araştırılmasıdır. Koliform bakteriler suda kolay ve hızlı bir şekilde tespit edilebildikleri, çevre koşullarına dirençli oldukları, patojen bakterilerle bir arada yaşayabildikleri, bağırsak kökenli oldukları ve dışkıda yüksek miktarda buldukları için suyun kalitesinin belirlenmesinde uygun bir mikrobiyal indikatör olarak kabul edilmiştir (Öztürk B. 2005).

Koliform bakteriler, *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alan, fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen, 35-37°C'de 24-48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturarak fermente eden, galaktosidaz aktivitesi gösteren, oksidaz negatif ve çubuk şeklindeki bakterilerdir. Koliform bakteriler, genel karakteristik özelliklerine göre, toplam koliform veya fekal koliform olarak adlandırılır ve gruplandırılırlar. Bu grupta bulunan bakterilerden normal florası insanların ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemleri olanlar fekal koliform olarak tanımlanmakta ve bunlar fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedirler. Toplam koliform bakteriler ise suyun genel kalitesi hakkında bilgi vermektedirler (Ashbolt N. J. ve ark. 2001).

Fekal kirlilik indikatörü olarak, koliform bakteriler içinde en fazla *Escherichia coli* bakterisi kullanılmaktadır. *E.coli*, *Enterobacteriaceae* ailesine ait, 2- 6 µm boyunda ve 1.0-1.5 µm eninde, düz, yuvarlak çomakçık şeklinde, spor oluşturmeyen gram negatif bakterilerdir. Optimum yaşam sıcaklığı 37-40°C ve pH 5-9'dur. *E.coli* insan, sıcakkanlı hayvanlar ve kuşların normal bağırsak floralarında bol miktarda bulunur ve çok seyreltik atık sularla bulaşmasında bile saptanabilir. Dolayısıyla fekal koliform bakteriler içinde yer alan *E.coli*, fekal kirlilik ile bağırsak hastalıkları arasındaki ilişkiyi gösterir (Geissler K. ve ark. 2000).

E.coli fekal indikatör bakterisi olmasının yanı sıra genetik yapısı en iyi bilinen mikroorganizmadır. Diğer mikroorganizmaların aksine kolayca direnç kazanabilmektedir ve bu özelliği ile *E.coli* antibiyotik direncinin araştırılmasında iyi bir indikatördür. Bağırsak bakterilerinin karıştığı suların kullanımı, bu bakterilerin insanlar arasında aktarımına neden olmaktadır. Antibiyotiklere direnç genlerinin bu bakteriler içerisinde yer alan *E.coli* ile taşınması toplumda dirençli suş oranını artırmaktadır (Danishta I. 2010).

Çardak M. ve arkadaşları (2010), İstanbul Boğazı'nda *Enterobacteriaceae* üyelerinin tür dağılımını ayrıntılı bir şekilde araştırdıkları çalışmalarında en yaygın türün *E.coli* (%28) olduğunu ortaya koymuşlardır. İstanbul Güneybatı sahilinde yapılan bir diğer çalışmada enterik bakteriler içerisinde en sık *E.coli* (%36,7) türünün bulunduğu bildirilmiştir (Sivri N. ve ark. 2010). Matyar F. (2012), Doğu Akdeniz kıyılarında yaptığı çalışmada ise deniz suyundan izole edilen bakterilerde en yaygın türün *E.coli* (%8,2) olduğunu rapor etmiştir.

2.2. DENİZLERDE BAKTERİYOLOJİK KİRLİLİĞİN İZLENMESİNDE BİYOİNDİKATÖR ORGANİZMA: *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* (LAMARK, 1819)

Midyeler, Bivalvia sınıfı içinde yer alan Mytilidae familyasındandır (Tablo 4.1). Bu familyanın en önemli türleri *Mytilus galloprovincialis*, (kara midye veya Akdeniz midyesi), *Mytilus edulis* (mavi midye veya Avrupa midyesi), *Modiolus barbatus* (at midyesi) ve *Perna* sp. (Afrika midyesi)'dir. Ülkemiz sularında bulunan ve ekonomik değeri yüksek olan *Mytilus galloprovincialis*, Doğu Akdeniz kıyıları hariç Karadeniz'e kadar tüm kıyılarda özellikle İstanbul Boğazı ve Marmara Denizi'nin bütün kıyılarında doğal yataklar halinde bulunurlar (Kumlu M. 2001).

Tablo 2.1. *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)'in sistematikteki yeri.

Alem	<i>Animalia (Hayvanlar)</i>
Şube	<i>Mollusca (Yumuşakçalar)</i>
Sınıf	<i>Bivalvia LINNAEUS, 1758 (Çift kabuklular)</i>
Altsınıf	<i>Pteriomorphia BEURLEN, 1944</i>
Takım	<i>Mytiloidea FERUSSAC, 1822</i>
Aile	<i>Mytilidae RAFINESQUE, 1815</i>
Cins	<i>Mytilus LINNAEUS, 1758</i>
Tür	<i>Mytilus galloprovincialis LAMARCK, 1819</i>

Midyeler, üçgenimsi ve bilateral simetrlili canlılardır. *M. galloprovincialis*'in kabukları ön (anterior), arka (posterior), ventral ve dorsal kenardan oluşur. Kısa olan ön kenar kabukların birbiri ile bağlantısını sağlar. Kabukların tepe kısmında kubbeli yapıda umbo bulunur. Arka kenar ise, midye kabuklarının açıldığı yarım daire şeklindeki uç kısımdır. Ventral kenar, bissus ipliklerinin çıktığı kenardır. Ventral kenar bu noktada dışarı doğru yükselme yaparak düz bir şekilde arkaya doğru uzanır. Bissus iplikleri, midyelerin birbirlerine ve her türlü sert zeminler üzerine sağlam bir şekilde tutunmasını sağlarlar. Ventral kenarın tam tersinde kavisli yapıdaki dorsal kenar bulunur. Dorsal kenarın ön kenara yakın olan kısmında, kabukların birbirine bağlı durmasını sağlayan, boynuz benzeyen ligament yer alır. Ligament, kabukların kapama kaslarının kapama kuvvetlerinin tersi yönde bir kuvvete sahiptir. Ölen midyede kaslar kapama kuvvetini kaybettiklerinden ligamentin aksi yöndeki elastikiyetinden dolayı kabuklar açık kalır (Şekil 2.1) (Gosling E. 2004, Eyüpoğlu B. 2010).

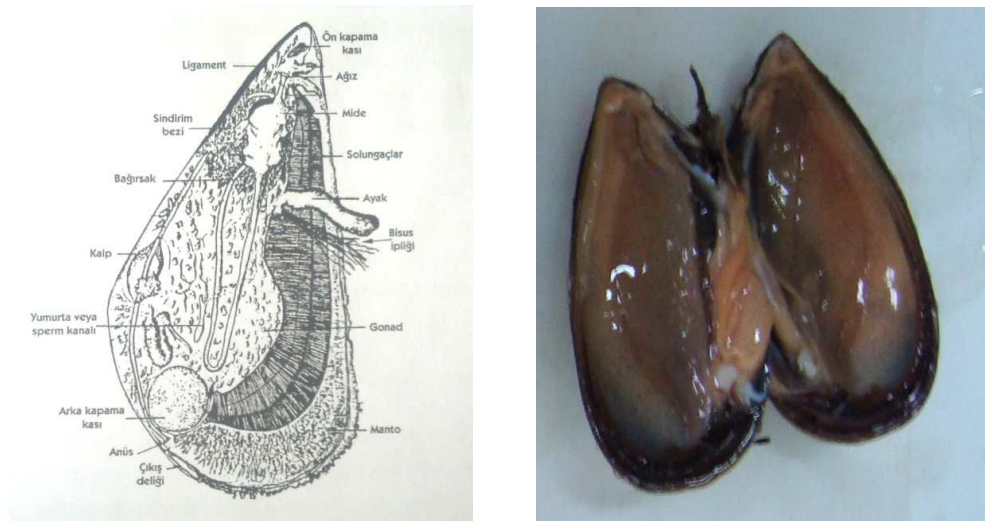


Şekil 2.1. *Mytilus galloprovincialis*'in genel görünüşü.

Midyelerin bir çift halindeki kabukları iki ya da üç kat aragonit ve kalsitten oluşur. Kabuğun dışı mor-siyah ve kahverenginin çeşitli tonlarında, içi ise sedef parlaklığındadır. Kabukların üzerinde, umbodan itibaren küçük eliptik daireler şeklinde başlayan ve kenara paralel olarak devam eden büyüme çizgileri bulunur. Midye uygun olmayan ekolojik şartlara maruz kaldığında, büyüme çizgilerinde anormal bir sıklaşma, yukarı doğru kabarma veya aşağıya doğru çökme oluşur. Bu türün yaygın boy uzunluğu 7 – 8 cm olmasına rağmen maksimum 10-11 cm kadar olabilir.

Midyenin kabukları ayrılarak kabuk kapama kasları kesildikten sonra görülebilecek iç organlar Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Kabuğa yapışmış olan ve sarımsı-griden kahverengiye kadar değişen renge sahip olan kısım mantodur. Ön kenarda, ön kapama kası altında dört adet ağız kolları (labial palps) ve ağız bulunur. Vücut içerisine su giriş ve çıkışını sağlayan ve besin partiküllerini filtre eden organ solungaçlardır. Solungaçlar ile içeri giren besin partikülleri ağız kolları aracılığı ile ağıza yönlendirilirler. Ağızdan giren besinler midede ayrıştırıldıktan sonra bağırsaklara girer ve sindirilemeyen kısımlar anüs ile dışarı atılır.

Ağızdan sonra ligament ekseninde dil şeklinde ve koyu kahverengi kıvrımsı renkte ayak bulunur. Ayağın uç ve arka tarafı vantuz şeklindedir ve midyenin yer değiştirmesini ve zemine tutunmasını sağlar. Midyenin boyuna göre ayağın uzunluğu da farklılık gösterebildiği gibi midye ayağını kendi boyu kadar da uzatabilir (Gosling E. 2004).



Şekil 2.2. *Mytilus galloprovincialis*'in iç organları.

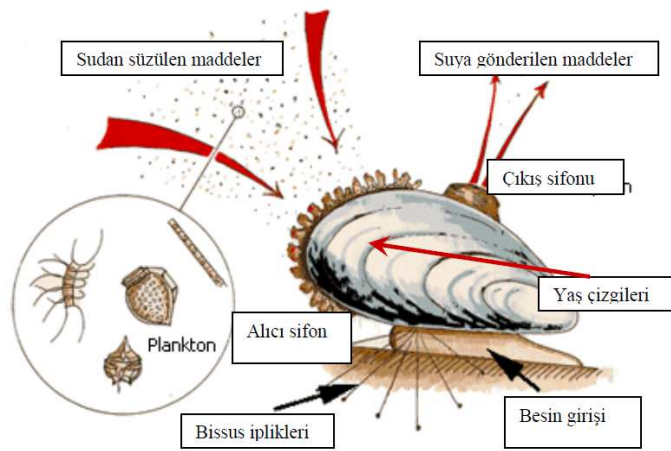
Midyeler ayrı eşeylidir fakat çok düşük oranlarda da olsa hermafroditlik görülebilir. *M.galloprovincialis*'in üreme sistemi bütün vücuda yayılmış kanallar ve kanalcıklardan meydana gelir. Midyelerin yumurta ve sperm salımı direkt olarak genital açıklıklarından su içine doğrudur ve döllenme su içinde gerçekleşir. Üreme döneminde bireylerin erkek ya da dişi olduğu gonad renklerinden ayırt edilir. Erkeklerde gonadlar krem-beyaz, dişilerde ise portakal sarısı tonlarındadır. Midyeler, buldukları bölgelere göre değişen büyüme oranına bağlı olarak cinsel olgunluğa altı ay ile bir yıl arasında ulaşırlar. *M.galloprovincialis*'lerde yumurtlama iki periyot halinde eylül sonundan mayıs-haziran ayına kadar devam eder (Karayücel S. 1996).

M.galloprovincialis'lerde büyüme oranını etkileyen en önemli faktör sıcaklık olmakla beraber tuzluluk, derinlik ve beslenme de önemli bir etkidir. Midyeler için en uygun büyüme koşulları pH=7-9, tuzluluk ‰25-30 ve sıcaklık 15-20°C'dir. Büyüme sıcaklığın 20°C, tuzluluğun ‰40'ın üzerine çıktığında veya sıcaklığın 10°C, tuzluluğun ‰25'in altına düştüğünde azalmaya başlar (Bayne B.L. 1976, Karayücel S. 1996).

Solic M. ve arkadaşları (1999), *M.galloprovincialis*'lerde ve Sonier R. ve arkadaşları (2008), *Crassostrea virginica*'da yaptıkları deneysel çalışmalarda, yüksek sıcaklığın kabuklu deniz canlılarında biriken fekal koliform bakteri konsantrasyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir. Stabili ve arkadaşları (2005), Kuzey Ege'de yaptıkları çalışmalarında *M.galloprovincialis*'de fekal koliform bakteri miktarının yaz aylarında aniden yükseldiği sonucuna varmışlardır.

M.galloprovincialis'ler, fitoplankton ve asılı haldeki organik maddelerle beslenirler. Midyeler, solungaç tüyleriyle sudaki 2–100 µm boyutlarında olan organik ve inorganik her türlü partikülü filtre ederler (Şekil 2.3). Ortalama 7-8 cm boyundaki bir midye, saatte 10-15 litre suyu filtreleme özelliğine sahiptir. *M.galloprovincialis*'lerde filtrasyon hızı, midye ve partikül büyüklüğüne, partikülün türü ve yoğunluğuna, su akıntısı ve sıcaklığına bağlıdır (Bayne B.L. 1976). Midyelerde büyüme ile ortamın besin konsantrasyonu arasında önemli bir ilişki vardır. Midyelerde büyüme, ilkbaharda su sıcaklığının ve buna paralel olarak ortamdaki fitoplankton ve zooplankton varlığının artması ile başlar. Suyun çok soğuk olduğu dönemlerde ise büyümede bir duraklama gözlenir (Okumuş İ. ve ark. 1998, Campos, C.J.A. 2013).

Suyu süzerek beslenen *M.galloprovincialis*'lerde tespit edilen fekal koliform bakteri düzeyleri, deniz suyunda belirlenenden çok daha yüksektir (Stabili L. 2005). Roslev P. ve arkadaşları (2009), *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının *M. edulis* tarafından filtrasyonunu ve midyede birikimini laboratuvar koşullarında yaptıkları deneylerle incelemişlerdir. Çalışmaya göre, incelenen suşların *M. edulis* tarafından hızlı bir şekilde akümüle edildiğini ve *M. edulis*'in bünyesinde biriktirdiği bakteri konsantrasyonunun, 4-6 saat sonra midyelerin içinde bulunduğu deniz suyundakinden 30-300 kat daha fazla konsantrasyonla maksimum seviyeye eriştiğini gözlemlemişlerdir.



Şekil 2.3. *Mytilus galloprovincialis*'de filtrasyon.

Mytilus galloprovincialis, aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmaları nedeniyle kıyısulardaki kirliliğin izlenmesinde biyoindikatör tür olarak kullanılmaktadır.

- *Mytilus galloprovincialis*, bulunduğu çevredeki bakteri, virüs, kimyasal ve toksin gibi kirletici maddeleri bünyelerinde biriktirirler ve kirliliğe karşı oldukça dirençlidirler. Bu nedenle yüksek konsantrasyondaki kirliliği tolere edebilme yeteneğindedirler.
- Bir yıldan daha fazla yaşam süren midyelerin kullanılması, uzun dönem boyunca gerçekleştirilen örneklemelerde kıyısulardaki kirlilik düzeyinin tahmininde önemlidir.
- Midyeler yerleşik düzende yaşayan omurgasızlardır, bu nedenle bölgesel çalışmalarda örnekleme alanını çok iyi temsil ederler.

- Geniş aralıktaki sıcaklık ve tuzluluk değişimlerini kısa sürede tolere edebilirler.
- Geniş bir coğrafik dağılıma sahiptirler ve kıyısal alanlarda çok yaygın ve kolay bulunurlar.
- Midyelerin kabuklarının dayanıklı ve koruyucu olması sayesinde örnekleme, taşıma ve depolama esnasında dokuların zarar görmesi ve kirlenmesi minimum düzeydedir. Bu nedenle midyelerin örnekleme ve laboratuvar şartlarında kirlilik analizleri kolaylıkla gerçekleştirilir.
- Hareketsiz olmaları nedeniyle incelenen bir alan için kimyasal kirlilik durumunun belirteçleri olarak hareketli türlere göre daha elverişlidirler (Cottard G.I. ve ark. 1998, Jović M. ve ark. 2011, De Donno A. ve ark. 2008).

2.3. MİKROBİYOLOJİK SU KALİTE KRİTERLERİ VE STANDARTLAR

Atık su deşarjı nedeniyle alıcı ortamdaki suyun kalite özelliklerinin bozulması, ulusal ve uluslararası kapsamda ve önemde bir “su kalitesi” sorunudur. Ülkemizde yer altı ve yerüstü su kaynaklarının korunarak en iyi bir biçimde kullanımının sağlanması ve su kirlenmesinin önlenmesi amacıyla Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği yürürlüğe girmiştir. Alıcı ortamın fekal atıkların boşaltımı ile mikrobiyolojik açıdan kirlenmesi sonucu ortaya çıkabilecek olumsuz etkilerini önlemek amacıyla mikrobiyolojik su kalite standartları belirlenmiştir. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği’nde, rekreasyon amacıyla kullanılan kıyı ve deniz sularının sağlanması gereken standart değerler, toplam koliform için 1.000 EMS/100 ml, fekal koliform için 200 EMS/100 ml olarak kabul edilmiştir. Yönetmeliğin kıta içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterlerinde; fekal koliform 10 EMS/100 ml, toplam koliform 100 EMS/100 ml olan sular *I. Sınıf*; fekal koliform 200 EMS/100 ml, toplam koliform 20.000 EMS/100 ml olan sular *II. Sınıf*; fekal koliform 2.000 EMS/100 ml, toplam koliform 100.000 EMS/100 ml olan sular *III. Sınıf* ve fekal koliform 2.000 EMS/100 ml’ den fazla, toplam koliform miktarı 100.000 EMS/100 ml’ den fazla olan sular *IV. Sınıf* sular olarak bildirilmiştir (Resmi Gazete Sayı: 25687. 2004).

İnsan sağlığı ve çevreyi korumak üzere yüzme ve rekreasyon amaçlı kullanılan suların kalitesini belirlemek ve bu suların özellikle mikrobiyolojik kirlenmeler ile kirlenmesinin

engellenmesini sağlamak için uygulanan kriterler Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği'nde düzenlenmiştir. Buna göre yüzme ve rekreasyon amacıyla kullanılan sulardan alınan örneklerin % 80'inin toplam koliform 1.000 EMS/100 ml, fekal koliform 200 EMS/100 ml kılavuz değerini, % 95'inin toplam koliform 10.000 EMS/100 ml, fekal koliform 2.000 EMS/100 ml zorunlu değerini sağlaması gerekmektedir (Resmi Gazete Sayı: 26048. 2006).

Su ürünleri üretimi yapılan deniz ve kıyı sularının alıcı ortam standartları, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 1380 sayılı Su Ürünleri Kanunu'na dayanılarak hazırlanan Su Ürünleri Yönetmeliği'nde düzenlenmiştir. Buna göre alıcı ortama ait kabul edilebilir değerler fekal koliform için 10 EMS/100 ml, toplam koliform için 70 EMS/100 ml olarak belirlenmiştir. Alınan örneklerin %20' sinde fekal koliform miktarı 100 EMS/100 ml'yi, %10'nunda toplam koliform miktarı 230 EMS/100 ml'yi geçmemelidir. Yönetmelikte çift kabuklu yumuşakçalarda intervalvular (kabuklararası) sıvıda ve ette tespit edilen fekal koliform miktarının 300 EMS/100 g'dan fazla olmaması gerektiği belirtilmiştir (Resmi Gazete Sayı: 22223. 1995).

Fekal koliform için kabul edilen bu sınır değerler, Kabuklu Su Ürünlerinin Yetiştigi Sulara İlişkin Kalite Standartları Hakkında Tebliğ, Ek-2'de ayrıca belirtilmiştir. Tebliğ, kabuklu su ürünlerinin yetiştigi suları ve bu suların kalite standartlarını belirleyerek, kabuklu su ürünleri yetişen suların korunmasını ve kirlenmenin önlenmesini amaçlamaktadır (Resmi Gazete Sayı: 26894. 2008).

Kentsel veya endüstriyel nitelikli atıksu kaynaklarından doğrudan derin deniz deşarjında veya atıksu arıtma tesislerinden arıtılmış olarak çıkan suların alıcı su ortamlarına boşaltılmasında Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde belirtilen deşarj standart değerlerine uyulması gerekmektedir (Resmi Gazete Sayı: 25687. 2004). Atıksu deşarjının olumsuz etkilerine karşı çevreyi korumak amacıyla, kentsel veya endüstriyel atıksuların toplanması, arıtılması ve deşarjı ile atık su deşarjının izlenmesi, raporlanması ve denetlenmesi Kentsel Atıksu Arıtımı Yönetmeliği'nde belirtilen esaslar doğrultusunda kontrol altına alınmıştır (Resmi Gazete Sayı: 26047. 2006). Kabuklu Su Ürünlerinin Yetiştigi Sulara İlişkin Kalite Standartları Hakkında Tebliğe göre, kabuklu su ürünleri yetişen sulara atık su arıtma tesislerinden yapılacak deşarjların, tebliğde

belirtilen kalite standartlarını değiştirmemesi gerekmekte olup, bunun dışında her türlü atık veya atık suyun kabuklu su ürünleri yetişen sulara verilmesi yasaklanmıştır (Resmi Gazete Sayı: 26894. 2008).

Tüm kurum ve kuruluşlar, yer altı ve yerüstü su kaynakları potansiyelinin her türlü kullanımının korunmasını ve su kirliliğinin önlenmesini sağlamak amacıyla ilgili yönetmeliklerde belirlenen hükümlere uymak ve bunları uygulamakla yükümlüdürler. Yönetmeliklerde belirtilen esaslara aykırı davranıldığı belirlenen durumlarda 2872 sayılı Çevre Kanunu'nun ilgili hükümleri gereğince idari nitelikte cezai yaptırım uygulanmaktadır (Resmi Gazete Sayı 2872. 1983). Çevre mevzuatı esaslarına aykırı fiillerin suç teşkil ettiği hallerde ise idari nitelikteki cezaların yanı sıra 5237 sayılı Türk Ceza Kanun'unun 181. ve 182. Maddeleri gereğince adli nitelikte para cezası ve/veya hürriyeti bağlayıcı cezalar uygulanmaktadır. İnsan veya diğer canlı türleri üzerinde tedavisi güç hastalıklara sebep olacak veya canlı türlerinin neslinin devamını tehlikeye sokacak şekilde doğal ekosisteme kalıcı zarar verecek atıkların suya, toprağa veya havaya bırakılması TCK'da çevreye karşı işlenen suçlar kapsamında değerlendirilmektedir (Katoğlu T. 2005, TCK. 2004).

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA), su kalite kriterlerine göre rekreasyon amacıyla kullanılan tatlı sularda *E. coli* miktarının 126 CFU/100 ml, enterokok sayısının 33 CFU/100 ml, deniz sularında 30 günlük sürede alınan 5 örnek için enterokok sayısının ise 35 CFU/100 ml olması gerektiğini bildirmiştir (Dufour A.P. ve ark. 1986).

Avrupa Birliği 76/160/EEC sayılı Yüzme Suyu Kalitesi Yönetmeliği, Avrupa Birliği'ne üye ülkeler genelinde, yüzme amacıyla kullanılan suların kalitesinin güvence altına alınması amacıyla düzenlenmiş ve bu suların bakteriyolojik, kimyasal ve fiziksel su kalite kriterlerini belirlemiştir. Buna göre yüzme ve rekreasyon amacıyla kullanılan sulardan alınan örneklerdeki toplam koliform miktarının 500 EMS/100 ml kılavuz değeri ile 10.000 EMS/100 ml zorunlu değerini, fekal koliform miktarının ise 100 EMS/100 ml kılavuz değeri ile 2.000 EMS/100 ml zorunlu değerini sağlaması gerekmektedir (European Union. 1976).

Avrupa Birliği 2006/113/EC sayılı Kabuklu Canlıların Yaşadığı Suların Kalitesi Yönetmeliği, Avrupa Birliği'ne üye ülkeler tarafından kabuklu deniz ürünlerinin yaşadığı sular olarak tanımlanan tuzlu sular ve kıyı suları ile bu sularda yaşayan kabuklu canlıların korunmasını sağlamak ve bu amaçla alınan tedbirler neticesinde daha kaliteli ürün elde edebilmek amacıyla düzenlenmiştir. Yönetmeliğe göre kabuklu canlılarda intervalvular (kabuklararası) sıvıda ve ette tespit edilen fekal koliform miktarının 300 EMS/100 ml'den fazla olmaması gerektiği bildirilmiştir (European Union. 2006).

2.4. ANTİBİYOTİKLER VE ETKİ MEKANİZMALARI

Antibiyotikler, bazı bakteri ve mantar türü mikroorganizmalar tarafından sentez edilen ve diğer mikroorganizmalar için öldürücü ya da üremelerini engelleyici etki gösteren ve tedavide kullanılan kimyasal maddelerdir (Kümmerer K. 2009). Bakteri üzerine seçici toksisite gösteren antibiyotikler, konak organizmanın hücrelerine zarar vermeden, enfeksiyon etkeni bakteri hücrelerinin gelişmesi ve üremesini önleyerek (bakteriyostatik) ya da bakteri hücrelerini doğrudan öldürerek (bakterisid) etki ederler (Scholar E.M. ve ark. 2000).

Antibiyotikler doğal olarak etkili olabildikleri bakteri türlerinin genişliğine bağlı olarak dar, orta ya da geniş spektrumlu olarak sınıflandırılırlar. Sınırlı sayıda mikroorganizma türüne etki eden dar spektrumlu antibiyotiklerden, penisilin sadece Gram-pozitif bakterilere etkili iken, aminoglikozidler, sülfonamidler ve trimetoprim yalnızca aerobik bakterilere karşı etkilidir. Orta spektrumlu antibiyotikler genellikle bazı Gram-negatif bakterileri türlerine karşı azaltılmış aktiviteli maddeleri içerir (örneğin; ampisilin, amoksisilin, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler). Birden fazla mikroorganizma türüne etki eden geniş spektrumlu antibiyotikler ise üçüncü kuşak sefalosporinler, tetrasiklinler ve kinolonlar gibi hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkili olan maddeleri içerirler (Gangle B.J. 2005, Schwalbe R. ve ark. 2007).

Antibiyotikler farklı etki mekanizmalarına sahiptirler. Bu etki mekanizmaları, bakteri hücre duvarındaki belli proteinlere bağlanarak, hücre duvarının devamlılığı için

süregelen sentezi inhibe edenler (β -laktam antibiyotikler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar), bakteride protein sentezini sağlayan ribozomların çeşitli bölgelerine bağlanarak, bakterinin büyümesi ve yaşaması için gerekli proteinlerin sentezini inhibe edenler (aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, linkozaminler), öncü madde sentezini, DNA üretimini ve RNA transkripsiyonunu inhibe ederek nükleik asit sentezini engelleyenler (sulfonamidler, trimetoprim, kinolonlar, rifampin), hücre zarı faaliyetlerini değiştirenler (polimiksinler), bakterinin metabolizması için gerekli olan bir maddenin sentezini inhibe ederek antimetabolik etki gösterenler (sulfonamidler, trimetoprim) şeklinde sınıflandırılmaktadır (Schwalbe R. 2007, Tenover F.C. 2006).

2.5. ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DİRENÇ GELİŞİMİ

Mikroorganizmalar, antibiyotiklerin öldürücü ya da üremeyi durdurucu etkisine karşı direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Direnç, yaygın antibiyotik kullanımına bağlı olarak geliştiği gibi mikroorganizmaların olumsuz çevre koşullarında yaşamlarını sürdürmeleri için kullandıkları savunma sürecinin bir parçası da olabilmektedir (Yüce A. 2001).

2.5.1. Doğal (İntrinsik) Direnç

Doğal direnç, mikroorganizmaların tür özeliği olarak antibiyotiğin hedefi olan yapıyı taşımamalarının veya antibiyotiğin yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasının bir sonucudur. Örneğin; rifampisin antibiyotiği hidrofobik olduğundan gram-negatif bakteri duvarını geçemez ve doğal direnç ortaya çıkar (Yüce A. 2001).

Antibiyotiklerin mikroorganizmalara etki edebilmesi için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Metabolik olarak inaktif olan mikroorganizmalar antibiyotiklere fenotipik olarak dirençli olabilirler fakat bunlardan oluşan yeni nesiller antibiyotiklere duyarlıdır. Örneğin; penisilinlere duyarlı olan bakterilerin herhangi bir nedenle hücre duvarını kaybederek bakterinin L formuna dönüşmeleri sonucunda bakteriler hücre duvarı inhibitörü antibiyotiklere dirençli olurlar. Birkaç nesil sonra bakteri hücreleri hücre duvar üretimine devam ederek

bakteriyel öncüllerinin formuna dönüştüklerinde tekrar hücre duvarını kazanacaklarından penisiline duyarlılık kazanabilirler (Öztürk R. 2002, Çevikbaş A. 1990).

2.5.2. Kazanılmış Direnç

Mikroorganizmalar, genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak önceden duyarlı olduğu bir antibiyotiğe karşı direnç kazanabilir (Yüce A. 2001). Bakteriyel genomdaki değişiklikler sonunda seleksiyonla dirençli nesiller ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik orijinli bu direnç kromozom ve ekstrakromozomal elemanların kontrolü altındadır (Öztürk R. 2002).

2.5.2.1. Kromozomal Direnç

Mikroorganizmaların kromozomunda kendiliğinden oluşan mutasyonlar sonucu meydana gelen değişiklikler mikroorganizmanın antibiyotiğe karşı duyarlılığını değiştirir (Yüce A. 2001). Antibiyotiğin varlığı duyarlı organizmaları baskılamak için seçici mekanizma olarak iş görür ve antibiyotik dirençli mutantların büyümesini destekler. Kendiliğinden mutasyonlar 10^{-7} - 10^{-12} sıklıkta meydana gelirler, bu nedenle klinikte bu tip direnç azdır fakat rifampisin ile tedavide kendiliğinden mutasyon 10^{-5} - 10^{-8} oranında olduğundan, rifampisine dirençli mutantların ortaya çıkması nedeni ile tedavi başarısızlığı yüksektir (Aleksun M.N. 2007, Öztürk R. 2002).

2.5.2.2. Ekstrakromozomal Direnç

Mikroorganizmalar, antibiyotiklere plazmid, transpozon ve integron adı verilen genetik elementler ile kromozom dışı direnç gösterirler.

2.5.2.2.1. Plazmidler

Plazmidler, bakteri hücresinde kromozomdan bağımsız olarak kendilerini replikasyon ile çoğaltabilen kromozom dışı genetik elementlerdir. Bakteri plazmidleri, 4-400 kilobazlık sirküler yapıda, çift zincirli DNA molekülleridir (Siefert J.L. 2009). Bakteri

hücresinin metabolik işlevleri için gerekli genetik bilgi kromozom üzerinde olduğundan, genellikle plazmidlerin kaybedilmesi veya kazanılması hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını etkilemez. Plazmid üzerinde antibiyotiklere ve ağır metallere direnç genleri, virulans genleri ve plazmidin kendi varlığını sürdürebilmesi ve transferi için gerekli proteinler kodlanır (Georgopapadaku N.H. 2002, Rice L.B. 2001).

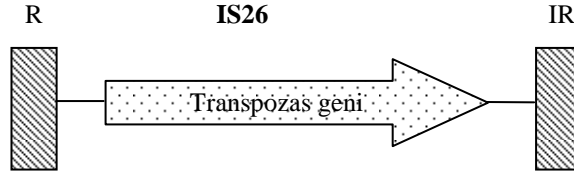
Bazı plazmidler, replikasyonları için gerekli olan replikasyon orijinini, kendilerini bir bakteriden bir başka bakteriye aktarmak için yaptıkları konjugasyonda gerekli olan ve transferlerinden sorumlu olan genler ile konjugasyonda transferin gerçekleştiği transfer orijinine sahiplerdir (Rice L.B. 2001).

Direnç plazmidleri (R-plazmidler), bir veya daha çok sayıda antibiyotik direnç genlerini taşıyabilir. Bu direnç genleri küçük hareketli genetik elementler olan transpozon, integron ve gen kasetleri içinde yerleşerek direnç topluluğundaki diğer direnç genleri ile bağlantılı plazmidlere veya kromozomlara geçebilirler. Bu şekilde birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gelişmektedir (Levy S.B. 2004).

2.5.2.2.2. Transpozonlar

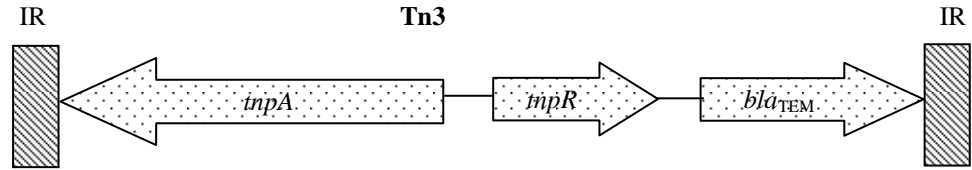
Transpozonlar, bakteri kromozomunun farklı yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmidten plazmide, plazmidten DNA veya bakteriyofaja aktarılabilen hareketli genetik elementlerdir. Bu genetik elementler (2-20 kb) kendi kendilerine replike olamazlar fakat kromozomla veya plazmidlerle birlikte replike olabilirler (Georgopapadaku N.H. 2002).

Transpozonlarla benzer özelliklere sahip insersiyon dizileri (0,2-6 kb) kendi sınırlarında ters yönlü tekrarlanan dizileri içerirler. Bu diziler kromozom veya plazmidin transpozisyonu için gerekli olan transpozaz enzimlerinin genlerini kodlarlar. İnsersiyon dizileri, transpozonlardan farklı olarak antibiyotik direnç genlerini taşımazlar (Şekil 2.4) (Liu X. 2009, Mollet B. ve ark. 1983).



Şekil 2.4. Ters yönlü tekrar dizileri (IR) ve transpozaz genini içeren IS26 elementinin yapısı.

En basit transpozon olan Tn3 transpozonu, 38 baz çiftlik ters yönlü tekrar eden dizileri (IR) ve *tnpA*, *tnpR* ve *bla_{TEM}* genlerini içerirler. *bla_{TEM}* geni, ampisilin direncinden sorumlu TEM tipi β -laktamazı, *tnpA* geni, transpozonun transpozisyonundan sorumlu olan transpozaz olarak bilinen TnpA proteinini, *tnpR* geni ise transpozisyonun resolüsyon safhasında görevli TnpR proteinini kodlamaktadır (Şekil 2.5) (Partridge S.R. ve ark. 2005).



Şekil 2.5. Ters yönlü tekrar dizileri (IR) ve *tnpA*, *tnpR* ve *bla_{TEM}* genlerini içeren Tn3 transpozonunun yapısı.

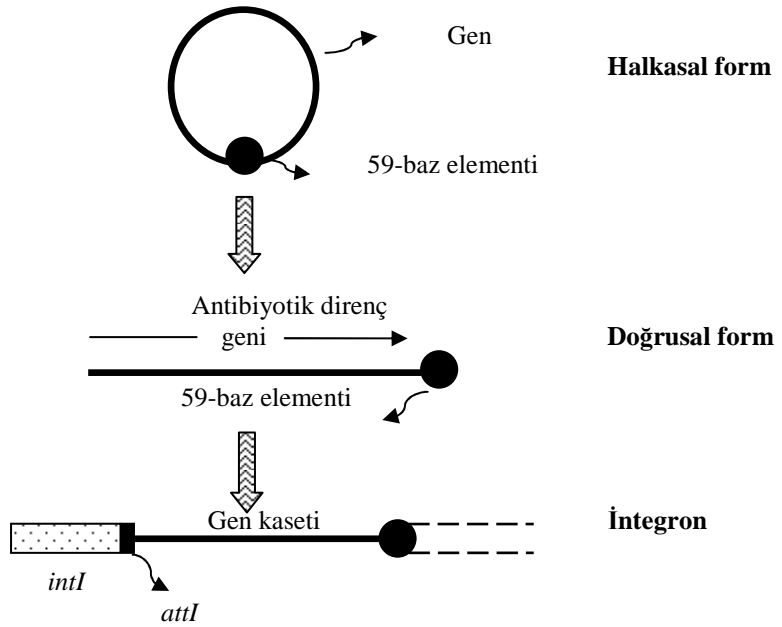
Transpozonlar, bakteri popülasyonları arasında çoklu antibiyotik direncinin çok kısa süre içerisinde ortaya çıkmasında ve yayılmasında önemli rol oynarlar. Transpozonlar ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin ve trimetoprim'e karşı direnç gelişiminden sorumludurlar (Rahube T.O. 2010).

2.5.2.2.3. İntegronlar

İntegronlar, spesifik bir yere yerleşmiş olan bir veya daha fazla antibiyotik direnç genini ve gen kasetleri olarak adlandırılan mobil elementlerdeki direnç genlerini yakalayabilen, bölgeye spesifik rekombinasyon sistemleri için bir gen içeren hareketli DNA elementleridir. İntegronlar içerisindeki korunmuş kaset dizilimleri, farklı plazmidlerdeki

integronlar arasında kaset değişimine neden olabildiklerinden direnç gelişiminde önemli rol oynarlar (Hall R. M ve ark. 1995).

İntegronların korunmuş iki bölgesi arasına yerleşen gen kasetleri küçük, serbest, halkasal formda ve yapısında 59 baz elemanı (*attC*) adı verilen rekombinasyon bölgesini ve tek bir gen içeren hareketli genetik elemanlardır. 59 baz elemanının yapısı ve uzunluğu (57-141 baz çifti) ait olduğu gene göre farklılık gösterir (Hall R.M. ve ark. 1995, Labbate M. ve ark. 2009). 59 baz elemanının iki ucunda birbirinin ters komplementeri olan yedi bazlık iki kor bölgesi (GTTRRRY ve RYYAAC, R: pürin, Y pirimidin) bulunur. İntegraz genleri bu rekombinasyon bölgesini tanıyıp gen kasetlerini integronun yapısına katarlar (Schmitz F.J. ve ark. 1999, Recchia G. Ve ark. 1995). Halkasal formdaki gen kasetlerinin replikasyon özellikleri olmadığından replike olamazlar (Collis C.M. ve ark. 1992). Halkasal formdaki gen kasetleri integronla ilişkili bölgeye spesifik rekombinasyon reaksiyonu sonucu doğrusal forma dönüşerek integrona eklenirler (Şekil 2.6) (Hall R.M. ve ark. 1998).

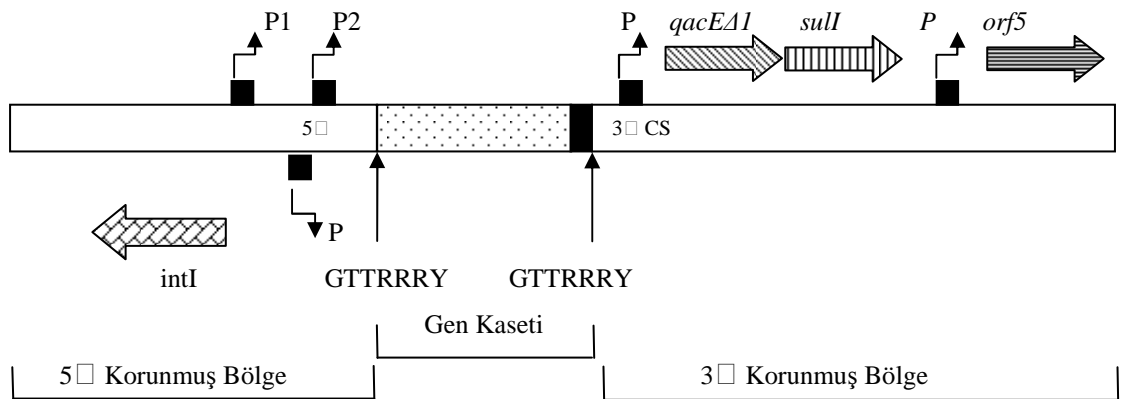


Şekil 2.6. Gen kasetlerinin genel yapısı.

İntegronların 5' korunmuş bölgesinde (5'CS), integraz enzimini kodlayan integraz geni (*intI*), gen kasetlerinin integre olduğu rekombinasyon bölgesi (*attI*) ve gen

kasetlerine bağı genlerin ekspresyonunu kolaylaştıran promotör bölgesi (P_{ant}) bulunur. 3' korunmuş bölgesi (3'CS) ise etidyum bromid ve kuarterner amonyum bileşiklerine direnç gelişiminden sorumlu *qacEΔ1* geni ve sülfonamidlere direnç sağlayan *sulI* genini içerir (Şekil 2.7) (Hall R.M. ve ark. 1995).

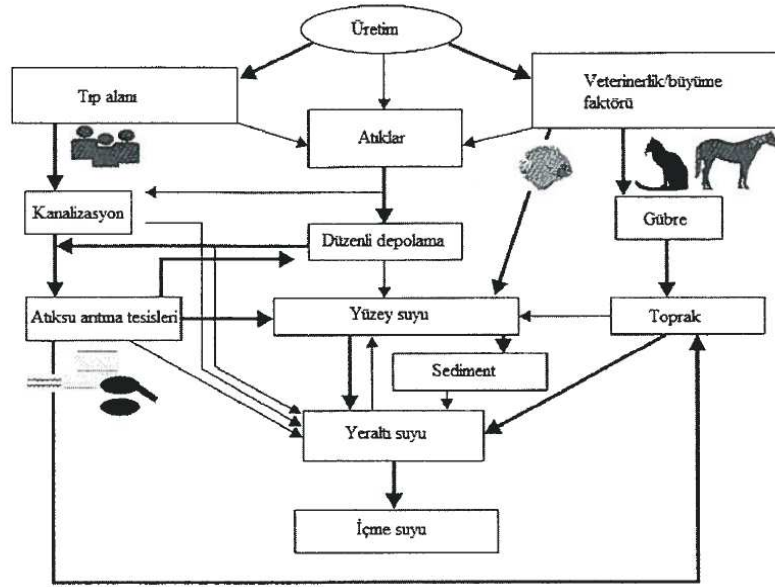
İntegronlar, 5' korunmuş bölgede bulunan integraz genindeki farklılara göre sınıflara ayrılmıştır. Bunlardan özellikle üç tanesinin (sınıf 1, 2 ve 3) direnç genleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen gram-negatif bakterilerde yaygın olarak sınıf 1 integronlar bulunmaktadır (Hall R.M. ve ark. 1998). Sınıf 1 integronun 5'CS bölgesi, gen kasetlerinin bölgeye spesifik giriş ve çıkışından sorumlu olan tip 1 integraz proteinini kodlayan *intI-1* genini, *attI1* ve P_{ant} promotörünü içerir. 3'CS bölgesi ise *qacEΔ1*, *sulI* genini ve fonksiyonu bilinmeyen açık okuma çerçevesi (*orf5* ve *orf6*) içerir. Sınıf 2 integronların yapısı, genel olarak sınıf 1 integronların yapısına benzemektedir. 5'CS bölgesinde tip 2 integraz proteinini kodlayan *intI-2* geni ve *attI2* içermesine rağmen 3'CS bölgesinde *sulI* genini içermezler (Collis C.M. ve ark. 1992, Carattoli A. 2001). Sınıf 3 integronlar *intI-3* integraz geninden dolayı farklılık gösterirler (Roy P.H. 1995). Sınıf 4 integronlar ise *Vibrio cholerae* genomunda yer almaktadır ve antibiyotik direnci ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir (White P. A. ve ark. 2001).



Şekil 2.7. İntegronların genel yapısı

2.6. SUCUL EKOSİSTEMDE ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Antibiyotikler ve antibiyotik dirençli bakteriler, antibiyotiklerin tıp, veterinerlik ve tarım uygulamalarında gelişigüzel ve yüksek miktarlarda kullanımı sonucu doğrudan veya dolaylı olarak toprak ve su çevresine değişik miktarlarda deşarj edilirler (Türkdoğan F.I. 2009,Zhang, X.X. 2009, Kemper, N. 2008). Kentsel atık su arıtma tesislerinden gelen bu kirleticiler tarafından deniz, nehir ve göl gibi alıcı su ortamları ve diğer çevre ortamları önemli ölçüde kirlenmektedir (Şekil 2.8) (Goni-Urriza M. 2000).



Şekil 2.8. Antibiyotik direncinin çevrede yayılımı.

Antibiyotikler, mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için hem tıp alanında hem de veterinerlikte yaygın şekilde kullanılan tıbbi bileşiklerdir. Antibiyotiklerin büyük bir kısmı insan ve hayvan vücudundan çok az dönüştürülerek veya hiç değişmeden üre ve dışkı ile birlikte atılırlar (Jørgensen, S.E. 2000). İnsanlar tarafından kullanılan antibiyotiklerin aktif maddeleri atık su arıtımı esnasında tamamen uzaklaştırılmazlar ve böylece hiç değişmeden atık su arıtma tesislerinden alıcı ortama deşarj edilirler (Kümmerer, K. 2003).

Araziye yayılmış olan arıtma çamurlarında ve çiftlik hayvanı yetiştiriciliğinden elde edilen gübrede bulunan antibiyotik aktif maddeleri sızıntı ile yer altı sularına ve sucul

çevreye ulaşırlar. Balık çiftliklerinde kullanılan antibiyotikler ise doğrudan sucul çevrede birikirler (Halling-Sørensen, B. 1998, Kümmerer, K. 2004). Çeşitli yollarla çevreye giren antibiyotik aktif maddeleri hastane atık sularında (Brown, D.K. 2006), arıtma tesisi çıkışında (Hirsch, R. 1999), kentsel atık sularda (Golet, E.M. 2001), yeraltı sularında (Hirsch, R. 1999), yüzey sularında (Hirsch, R. 1999), sedimentte (Halling-Sørensen, B. 1998) ve nehir sularında (Halling-Sørensen, B. 1998, Yang, S. 2003) çok düşük konsantrasyonlarda bulunabilmektedir.

Hedef organizması bakteriler olan antibiyotiklerin çok düşük konsantrasyonlarda atık su arıtma tesislerinden alıcı ortama sürekli olarak deşarj edilmesi, mikrobiyal ekoloji üzerinde olumsuz etki meydana getirdiği gibi mikroorganizmaların antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç geliştirmesine de neden olabilmektedir (Sungpyo, K. 2007, Jørgensen, S.E. 2000, Costanzo, S.D. 2005, Hirsch, R. 1999).

Koliform bakterilerle oluşan hastane ve toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, yoğun kullanımına bağlı olarak giderek artan oranda bir direnç gelişimi söz konusudur (Ay S. 2003, Kalem F. 2008, Kaya O. 2006). Sağlam H.S ve arkadaşları (2012), toplum kökenli üriner enfeksiyon etkeni 255 *E.coli* bakterisinde direnç sıklıklarını ampisillin-sulbaktama (%35,1), trimetoprim-sulfametoksazole (%34,9), siprofloksasine (%32,8), amoksisilin-klavulonik aside (%31,3), sefuroksime (%25,9), gentamisine (% 19,3) ve amikasine (%0,3) olarak tespit etmişlerdir.

Klinik kökenli antibiyotiğe dirençli bakterilerin yanı sıra atık sular, deniz suları, yüzey suları, nehirler, göller ve içme suları gibi sucul çevrelerde de tıp ve veterinerlikte kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler rapor edilmiştir (Akiyama, T. 2010, Maal-Bared, R, 2013, Coleman B.L. 2013, Dada, A. C, 2013, Watkinson, A. J, 2007).

İstanbul güneybatı sahilinde yapılan çalışmada deniz suyundan izole edilen enterik bakterilerde en yüksek direnç oranı ampisilin antibiyotiğine (%100) karşı saptanırken imipenem antibiyotiğine direnç saptanmamıştır (Sivri N. ve ark. 2010). Vural H.Ç. ve arkadaşları (2011), İzmit körfezinde yaptıkları çalışmada *E.coli* suşlarının antibiyotiklere dirençliliklerini tetrasikline (%50), sulbaktam-ampisiline (%62,5),

penisiline (%62,5), amikasine (%12,5), kloromfenikole (%37,5), trimethoprim-sulfametoksazole (%62,5) olarak tespit etmişlerdir. Kamruzzaman M. ve arkadaşları nehir ve göllerin yüzey sularından izole edilen *E.coli* suşlarında ampisilini en dirençli, imipenem ve meropenem antibiyotiklerini ise en duyarlı antibiyotikler olarak rapor etmişlerdir.

Antibiyotiklerin üretim ve tüketimindeki artışa bağlı olarak gelişen antibiyotik direnci sucul çevrede doğal olarak bulunan mikroorganizmalar ile insan ve hayvan kaynaklı mikroorganizmalar arasında direnç genlerinin aktarımına neden olur (Baquero, F. 2008). Bu aktarım sonucunda mikroorganizmaların gen havuzunda önemli değişiklikler gözlenir. Bu uzun vadeli ve geri dönüşümsüz etkiler sonucunda ekolojik dengenin bozulması, mikroorganizmaların doğal seleksiyona uğrayarak çok sayıda direnç genlerine sahip olmasına neden olmaktadır (Jørgensen, S.E. 2000, Levy, S.B. 2004). Bu şekilde sucul çevrede direnç genlerinin gittikçe artışı ekolojik bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (Kümmerer, K. 2004).

Deniz suyundan kaynaklanan bakteriyel suşların % 90'ı bir antibiyotiğe, % 20'den fazlası ise en az beş farklı antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir (Baquero, F. 2008). Antibiyotik direnç genlerinin farklı sucul çevrelerde bulunuşu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Schwartz ve ark. (2003) atık su arıtma tesislerinden gelen atıksular, yüzey suları ve biofilm tabakasından aldıkları örneklerde ampisilin, vankomisin ve β -laktam sınıfı antibiyotiklere karşı direnç genlerini saptamışlardır. Deniz sedimentinden alınan örneklerde sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar (Hall, R.M. 1998) ve kıyısulardan alınan örneklerde tetrasiklin sınıfı antibiyotiklere karşı direnç gelişimi araştırılmıştır (Dang, H. 2008).

Antibiyotik direnç genlerinin sucul ekosisteme atıksu arıtma tesisleri tarafından aktarılması ile oluşan antibiyotik direnci tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çok önemli bir "çevresel kirlilik" problemidir (Rysz, M. 2004). Atıksu arıtma tesislerinin dizayn ve işleyişlerindeki farklılıklar atıksulardaki dirençli genlerin ve dirençli bakterilerin sucul ortamda bulunuşuna etki edebilmektedir. Atıksuların atıksu arıtma tesislerinde arıtılması esnasında içerdikleri bakteriyel populasyonun dağılımında, kalitatif ve kantitatif değişiklikler meydana gelmektedir. Genellikle arıtma işlemi

sırasında antibiyotiğe dirençli bakterilerin sayısının azalması beklenir (Guardabassi, L. 2002). Guardabassi ve ark. (2002) atıksu arıtma tesislerindeki üçüncül arıtma işleminden sonra elde edilen atık sularındaki antibiyotiğe dirençli koliform bakteri yaygınlığının, arıtımı yapılmamış kanalizasyon sularındakinden daha az olduğunu belirlemişlerdir. Buna karşın Bell J.B. ve ark. (1983) tarafından yapılan çalışmada, arıtımı yapılan atıksulardaki aktarılabılır direnç genlerini içeren fekal koliform bakteri yüzdesinin arıtımı yapılmamış kanalizasyon sularında bulunandan daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Atıksularda bulunan bakterilerde, yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak meydana gelen antibiyotik direnç çeşitliliği ve atık su arıtma tesislerinde farklı arıtma prosedürlerinin uygulanması sonucunda bölgeye ve ülkeye özel direnç tabloları gelişebilmektedir.

Özgümüş O.B ve arkadaşları (2007), Rize’de halkın kullandığı içme sularından (musluk ve pınar suları) izole ettikleri çoğul antibiyotik dirençli fekal koliform bakterilerdeki antibiyotik direncinin hareketli genetik elemanlar olan konjugatif R plazmidleri, transpozonlar ve integronlar tarafından taşındığını tespit etmişlerdir. İçme sularında bulunan fekal kökenli 117 *E.coli* suşundan üçünde *dhfr1-aadA1* (1586 bç) ve *dfrA17-aadA5* (1683 bç) gen kasetlerini içeren sınıf 1 integronları belirlemişlerdir. Tetrasiklin direncinin moleküler mekanizmasını da inceledikleri çalışmalarında, tetrasikline dirençli 8 *E.coli* suşundan dördünde *tet(A)* genini, ikisinde *tet(B)* genini, birinde hem *tet(A)* hem de *tet(B)* genini saptamışlar fakat *tet(C)* genini tespit edememişlerdir. Aynı araştırmacılar bölgedeki nehir sularından izole edilen Enterobacteriaceae ailesi üyesi koliform bakterilerde araştırdıkları sınıf 1 ve sınıf 2 integronları, çoğul antibiyotik dirençli birçok suşun da hareketli genetik elemanlar vasıtasıyla yayabileceğini göstermişlerdir. Sınıf 1 integronların taşıdığı gen kasetlerini *dfrA1*, *dfr2d*, *dfrA7*, *dfrA16*, *dfrA17*, *dfr2d*, *aadA1*, *aadA5*, *bla_{OXA30}* ve sınıf 2 integronların taşıdığı gen kasetlerini ise *dfrA1*, *sat1* ve *aadA1* olarak belirlemişlerdir (Özgümüş O.B ve ark. 2009).

Çolakoğlu F. ve arkadaşları (2010), Rize deniz suyu örneklerinden izole ettikleri koliform bakterilerde, tetrasikline dirençli suşlar arasında *tet(B)* geninin yaygın olduğunu fakat *tet(A)* ve *tet(C)* genlerinin bulunmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bir *E. coli* suşunun sınıf 1 integron (2.0 kb), diğer bir *E. coli* suşunun ise sınıf 2 integron

(2.2 kb) taşıdığını ve DNA dizi analizi ile sınıf 1 ve sınıf 2 integronların sırasıyla *bla_{OXA-30}-aadA1* ve *dfrA1-sat2-aadA* gen kasetlerini içerdiğini göstermişlerdir.

Çevre kökenli direnç genlerinin takibinde tetrasikline karşı direnç oranının anahtar role sahip olması, insan enfeksiyonlarının tedavisinin yanı sıra veterinerlik, kültür balıkçılığı ve ziraatte bu antibiyotiğin yoğun kullanımından kaynaklanmaktadır. Enterobacteriaceae ailesi bakterilerde birçok tetrasiklin direnç geni belirlenmiştir. Bu genlerden özellikle *tet(A)* ile *tet(E)* arasındaki sınıflara hem klinik hem de sucül kökenli bakterilerde sıklıkla rastlanmaktadır (Chopra I ve ark. 2001). Karadeniz Bölgesinin kuzeydoğusunda bulunan nehirlerden izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi tetrasikline dirençli koliform bakterilerin %15,3'ünde *tet(A)*, %19,2'sinde *tet(B)* ve %1,9'unda hem *tet(A)* hem de *tet(B)* genini belirlemişlerdir. İncelenen diğer tetrasiklin direnç genlerinden *tet(C)*, *tet(D)* ve *tet(E)* genlerinin ise bulunmadığını bildirmişlerdir (Sandallı C. 2010). Guardabassi L. ve arkadaşları (2000), *tet(A)* ve *tet(B)* genleri tarafından sağlanan tetrasikline direnç mekanizmalarının sucül ve klinik kökenli *Acinetobacter baumannii* suşlarında yaygın olduğunu rapor etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Marmara Denizi'nin güneybatı sahilinde Zeytinburnu ile Avcılar arasında kalan bölgedeki 6 farklı istasyondan deniz suyu örnekleri alınmıştır. İstanbul Avrupa Yakasında, gıda olarak tüketime sunulan midyelerin toplandığı 3 farklı istasyon seçilmiş ve bu istasyonlardan *Mytilus galloprovincialis* ile *M.galloprovincialis*'in yetiştiği deniz suyu örnekleri toplanmıştır. Mevsimsel olarak alınan 36 deniz suyu ve 180 midye örneğinde, bakteriyolojik kirliliği belirlemek amacıyla toplam koliform bakteri sayımı yapılmış ve örneklerden izole edilen *E.coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Antibiyotik hassasiyetleri belirlenen suşlarda, integraz 1 genine spesifik *intI-1* ve integraz 2 genine spesifik *intI-2 geni ile* tetrasikline dirençli olan suşlarda *tet(A)* ve *tet(B)* direnç genlerinin varlığı araştırılmıştır. *E.coli* suşlarında ayrıca sınıf 1 ve sınıf 2 integronların varlığı tespit edilmiş ve her bir integronun taşıdığı antibiyotik direnç genleri dizi analizi ile belirlenmiştir.

3.1. ARAŞTIRMA ALANI

Bu çalışmada Haziran 2010 - Mayıs 2011 tarihleri arasında, İstanbul Güneybatı sahil şeridi üzerinde 6 istasyondan deniz suyu ve İstanbul Avrupa Yakası sahil şeridi üzerinde 3 istasyondan midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve midyelerin yetiştiği deniz suyu örnekleri mevsimsel periyotlarda toplanmıştır (Şekil 3.1-10).

Kıyusal bölge kirlilik girdisi ve etkileri göz önüne alınarak belirlenen istasyonların kolay ifade edilebilmesi amacıyla deniz suyu örnekleri alınan istasyonlar "D", *Mytilus galloprovincialis* örnekleri toplanan istasyonlar "M" harfi ile kodlanmıştır (Tablo 3.1). D7, D8 ve D9 ile kodlanan istasyonlardan alınan deniz suyu örnekleri, numune olarak alınan *M.galloprovincialis*'in yetiştiği suları temsil etmektedir.

Tablo 3.1. Örnekleme Noktaları

Örnekleme Noktaları	İstasyon No
Ataköy	D1
Yeşilköy	D2
Menekşe	D3
Menekşe Küçükçekmece Bağlantı Noktası	D4
Avcılar	D5
Zeytinburnu	D6
Büyükçekmece	D7
Menekşe-Ambarlı	D8
Rumeli Kavağı	D9
Büyükçekmece	M1
Menekşe-Ambarlı	M2
Rumeli Kavağı	M3



Şekil 3.1. Örnekleme Noktalarının Konumu



Şekil 3.2. D1 no'lu istasyon
(Ataköy)



Şekil 3.3. D2 no'lu istasyon
(Yeşilköy)



Şekil 3.4. D3 no'lu istasyon
(Menekşe)



Şekil 3.5. D4 no'lu istasyon
(Menekşe Küçükçekmece Bağlantı Noktası)



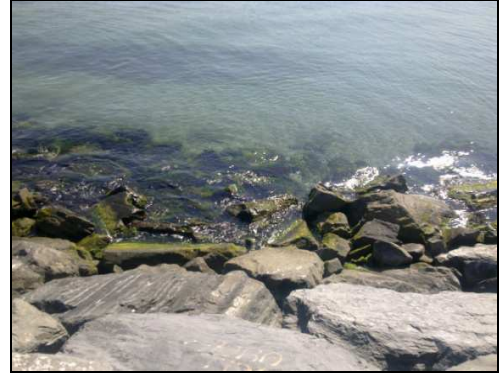
Şekil 3.6. D5 no'lu istasyon
(Avcılar)



Şekil 3.7. D6 no'lu istasyon
(Zeytinburnu)



Şekil 3.8. D7 ve M1 nolu istasyonlar
(Büyükçekmece)



Şekil 3.9. D8 ve M2 nolu istasyonlar
(Menekşe-Ambarlı)



Şekil 3.10. D9 ve M3 no'lu istasyonlar
(Rumeli Kavağı)

3.2. ÖRNEKLEME

Deniz suyu örnekleri, toplam 9 istasyondan “Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği”ne uygun olarak iki paralelli olarak alınmıştır. Buna göre deniz yüzeyinden direkt olarak alınan deniz suyu örnekleri steril örnek alma şişelerine konularak, +4°C’de 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Alınan deniz suyu örneklerinde fizikokimyasal parametrelerden sıcaklık, tuzluluk, çözünmüş oksijen ve pH yerinde ölçülmüştür.

Belirlenen 3 istasyondan, her bir istasyonu temsil edecek şekilde toplam 15 yetişkin (5-7 cm) midye (*M.galloprovincialis*) örneği toplanıp, steril örnek alma şişesi içinde +4°C’lik soğuk ortamda muhafaza edilerek, 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.3. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

LSB (Lauryl Sulfate Broth) Besiyeri	Himedia (M080)
Brilliant Green Bile Broth	Merck (1.05454)
HiCrome® UTI Agar	Himedia (M1353R)
<i>Kovacs'</i> Ayıracı	Merck (109293)
Metil Kırmızısı	Merck (106076)
α -naftol	Merck (822289)
KOH (Potasyum Hidroksit)	Merck (109112)
Polipepton	Merck (1.07043.1000)
K_2HPO_4 (Dipotasyumhidrojenfosfat)	Merck(105109)
Simmon's Sitrat Agar	Merck (1.02501.0500)
Kligler Iron Agar (KIA)	Merck (1.03913.0500)
Üre Agar	Merck (1.08492)
Üre Solüsyonu (% 40)	Sigma (U7129)
SIM Medium Besiyeri	Merck (1.05470)
Mueller Hinton Agar	Himedia (M173)
Antibiyogram Diskleri:	
Nalidiksik Asit (NA ₃₀)	Himedia (SD021)
Amoksisilin/Klavulanik asid (AC ₃₀)	Himedia (SD063)
Ampisilin (A ₁₀)	Himedia (SD077)
Amikasin (AK ₃₀)	Himedia (SD035)
İmipenem (I ₁₀)	Himedia (SD073)
Kloramfenikol (C ₃₀)	Himedia (SD006)
Seftazidim (CA ₃₀)	Himedia (SD062)
Streptomisin (S ₁₀)	Himedia (SD091)
Tetrasiklin (T ₃₀)	Himedia (SD037)
Trimethoprim/Sulfametaksazol (CO ₂₅)	Himedia (SD010)
Bakteri Saklama Seti	Orbak
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen (69506)
Etanol (% 95)	Merck (1.00971.2500)

Agaroz	Himedia (RM187)
Etidyum Bromür (10mg/mL)	Appllichem (A11511)
TBE (Tris-Borik Asid-EDTA) Tamponu (10X)	Promega (V4251)
DNA Yükleme Boyası (6X)	Fermentas (R0611)
DNA Ladder, 100bp plus (0,5 µg/µL)	Fermentas (SM0321)
Go Taq Flexi DNA Polymerase	Promega (M8305)
-Go Taq [®] Flexi Buffer (5X)	
-Go Taq [®] DNA Polimeraz (5U/µL)	
-Magnezyum Klorür (25mM)	
dNTP Mix (her biri 10 mM)	Promega (U1515)
Oligonükleotid Primerler	Integrated DNA
<i>intI-1/intI-2/Sınıf 1/Sınıf 2/tetA/tetB</i>	Technologies, Inc.
Wizard [®] SV Gel and PCR Clean up System	Promega (A9281)
pGEM [®] -T Easy Vector Systems	Promega (A1380)
-pGEM [®] -T Easy Vektörü (50 ng/ µL)	
-Ligasyon Tampon Çözeltilisi (2X)	
-T4 DNA Ligaz	
- <i>E.coli</i> JM109 Kompetan Hücreleri (>10 ⁸ cfu/µg)	
Ampisilin	Appllichem (A0839)
X-Gal	Promega (V3941)
IPTG	Promega (V3955)
LB (Luria Bertani) Agar	Sigma (L2897)
Tripton	Acumedia (7351A)
Maya Özütü	Acumedia (7184A)
NaCl (Sodyum klorür)	Appllichem (A2942)
NaOH	Merck (1.09137.1000)
KCl (Potasyum klorür)	Merck (104936)
MgCl ₂ (Magnezyum klorür)	Appllichem (A4425)
MgSO ₄ (Magnezyum sülfat)	Merck (106067)
Glukoz	Sigma (68270)
Wizard [®] Plus SV Minipreps	Promega (A 1330)
DNA Purification Systems	
BigDye [®] Terminator V3.1	Applied Biosystems

Cycle Sequencing Kit	(4337455)
T7 Promoter Primer	Promega (Q5021)
SP6 Promoter Primer	Promega (Q5011)

3.3.2. Kullanılan Gereçler

Buzdolabı	Bosch
Bilgisayar	Acer
Buz Makinası	ITV
Çalkalamalı İnkübatör	IKA
Çözünmüş Oksijen/pH Ölçüm Cihazı	Hanna
Derin Dondurucu	Bosch
Distile Su cihazı	Nüve
Dizi Analizi Cihazı	ABI PRISM 3100 [®] Genetic Analyzer
Elektroforez Görüntüleme Sistemi	DNR,Bio-imaging Systems, MiniLumi
Etüv	Nüve
Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Hassas Terazı	Shimadzu
Isıtıcı Tabla	HLC
Isı Döngü Cihazı	Techne
Mikrodalga Fırın	Bosch
Manyetik Karıştırıcı	IKA
Otomatik Pipet Seti: 0,1-2,5 µL/ 1-20 µL/ 10-100 µL/ 100-1000 µL	Eppendorf
Otoklav	Nüve
pH Metre	Hanna
Spektrofotometre	Biotek, Epoch
Su Banyosu (100°C)	Nüve
Sterilizatör	Ecocell
Santrifüj	Biofuge
Mini Santrifüj	Beckman Coulter

Spin Santrifüj

Bioneer

Steril Kabin

Chemocell

Vorteks

Velp Scientifica

Yatay Elektroforez

Cleaver Scientific

3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Peptonlu Su (% 0,1)

1g Pepton

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (% 0,85)

8,5 g NaCl

8,5 g NaCl 1 litreye tamamlanarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Metil Kırmızısı (MR) Ayıracı

0,1 g Metil kırmızısı

300 mL Etil alkol (% 95)

Metil kırmızısı etil alkolde çözdürülerek, üzerine 200 mL distile su eklenmiştir. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Voges Proskauer (VP) Ayıracı

α -naftol (% 5)

5 g α -naftol

100 mL Etil alkol

α -naftol etil alkol içerisinde çözdürülerek +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Potasyum Hidroksit (KOH) (% 40)

40 gr KOH

Distile su 100 mL’ye tamamlanarak +4°C’de muhafaza edilmiştir.

TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) Tamponu (10 X)

107,8 g Tris baz
7,44 g EDTA
5 g Borik asit
pH: 8,3

Bileşenler distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) Tamponu (0,5 X)

50 mL 10X TBE

Distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

EtBr (Etidyum Bromür, C₂₁H₂₀BrN₃)

1 g EtBr

Distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Ampisilin (C₁₆H₁₈N₃NaO₄S) (50 mg/mL)

2 g Ampisilin

Distile su ile 40 mL'ye tamamlanarak filtre ile steril edilmiştir. Ependorf tüplere bölüştürülerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

IPTG (isopropyl – β-D-thiogalactopyranoside, C₉H₁₈O₅S) (0,1 M)

1,2 g IPTG

Distile su ile 50 mL'ye tamamlanarak filtre ile steril edilmiştir. Ependorf tüplere eşit miktarda dağıtılarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

NaCl (1M)

58,44 g NaCl

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak filtre ile steril edilmiştir.

KCl (1M)

74,55 g KCl

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak filtre ile steril edilmiştir.

Mg⁺² (2M)

20,33 g MgCl₂6H₂O

24,65 g MgSO₄7H₂O

Distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak filtre ile steril edilmiştir.

Glukoz (2M)

360,32 g Glukoz

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak filtre ile steril edilmiştir. Ependorf tüplere eşit miktarda dağıtılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

LSB (Lauryl Sulfate Broth) Besiyeri

Bileşenler	Miktar
Triptoz	20 g
Laktoz	5 g
Sodyum klorid	5 g
Dipotasyum fosfat	2,75 g
Monopotasyum fosfat	2,75 g
Sodyum lauryl sülfat	0,1 g
Sıcaklık	25°C
pH	6,8±0,2

35,6 g LSB besiyeri distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Besiyeri, içerisinde durham tüpü bulunan tüplere, 20 mL olacak şekilde dağıtılarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Brilliant Green Bile Broth Besiyeri

Bileşenler	Miktar
Pepton	10,0g
Safra tuzu	20,0g
Laktoz	10,0g
Brilliant green	0,0133g
pH	7,2±0,2

40 g Brilliant Green Bile Broth besiyeri distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Besiyeri içerisinde durham tüpü bulunan tüplere 10 mL olacak şekilde dağıtılarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

UTI Agar

Bileşenler	Miktar
Pepton	15 g
Kromojenik karışım	2,45 g
Agar	15 g
Sıcaklık	25°C
pH	6,8 ± 0,2

32,45 g UTI agar distile su ile 1 litreye tamamlanarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

MR-VP (Metil Kırmızısı-Voges Proskauer) Besiyeri

Bileşenler	Miktar
Polipepton	7 g
Glukoz	5 g
Dipotasyum fosfat (K ₂ HPO ₄)	5 g
Sıcaklık	25°C
pH	6,9 ± 0,2

Bileşenler distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Besiyeri tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Sitrat Agar

Bileşenler	Miktar
Amonyum dihidrojen fosfat	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NaCl	5,0 g
Sodyum sitrat	2,0 g
MgSO ₄	0,2 g
Bromotimol mavisi	0,08 g
Agar-agar	13,0 g
pH	6,6 ± 0,2

22,5 g Sitrat Agar distile su ile 1 litreye tamamlanarak 95°C'de çözdürülmüştür. Tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Tüpler yatık olarak katılaştırılmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir.

İndol Besiyeri

Bileşenler	Miktar
Pepton	10 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
pH	7,1 ± 0,2

Bileşenler distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Besiyeri tüplere 2 mL olacak şekilde dağıtılarak, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Üre Agar

Bileşenler	Miktar
Peptone from meat	1,0 g
D(+) Glucose	1,0 g
NaCl	5,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Phenol red	0,012 g
Agar-agar	12,0 g
pH	6,8±0,2

21 g üre agar distile su ile 1 litreye tamamlanarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra 40-45°C’ye soğutulan besiyerine, ısı ile sterilizasyonda bozulduğu için filtre ile steril edilmiş % 40’ lık üre solüsyonundan ilave edilmiştir. Besiyeri tüplere 7 mL olacak şekilde dağıtılarak yatık olarak katılaştırılmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Kligler Iron Agar (KIA) Besiyeri

Bileşenler	Miktar
Peptone from casein	15,0 g
Peptone from meat	5,0 g
Meat extract	3,0 g
Yeast extract	3,0 g
NaCl	5,0 g
Lactose	10,0 g
D(+) Glucose	1,0 g
Ammonium iron (III) citrate	0,5 g
Na ₂ O ₃ S ₂	0,5 g
Phenol red	0,024 g
Agar-agar	12,0 g
pH	7,4± 0,2

52 g Kligler Iron Agar distile su ile 1 litreye tamamlanarak 95°C’de çözdürülmüştür. Besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Tüpler yatık olarak katılaştırılmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

SIM Medium Besiyeri

Bileşenler	Miktar
Peptone from casein	20,0 g
Peptone from meat	6,6 g
Ammonium iron(II)citrate	0,2 g
Sodium thiosulfate	0,2 g
Agar-agar	3,0 g
pH	7.3±0,2

30 g SIM medium distile su ile 1 litreye tamamlanarak 95°C’de çözdürülmüştür. 4 mL besiyeri tüplere dağıtılarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Mueller Hinton Agar:

Bileşenler	Miktar
Beef, infusion from	300 g
Casein acid hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar	17 g
Sıcaklık	25°C
pH	7,3±0,2

38 g Mueller Hinton Agar distile su ile 1 litreye tamamlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

LB (Luria Bertani) Sıvı Besiyeri:

Bileşenler	Miktar
Trypton	10 g
Maya Özütü	5 g
NaCl	5 g
pH	7,5 ± 0,2

Bileşenler distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Besiyeri tüplere 20 mL olacak şekilde dağıtılarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. +4°C’de muhafaza edilmiştir.

LB (Luria Bertani)-Ampisilin Sıvı Besiyeri:

Bileşenler	Miktar
Trypton	10 g
Maya Özütü	5 g
NaCl	5 g
pH	7,5 ± 0,2
Ampisilin	100 µg/mL

Bileşenler distile su ile 1 litreye tamamlanarak, 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. 50-55°C’ye kadar soğutulduktan sonra ampisilin eklenmiştir.

LB (Luria Bertani)-Ampisilin/X-Gal/IPTG Agar:

Bileşenler	Miktar
Trypton	10 g
Maya Özütü	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Ampisilin	100 µg/mL
X-Gal	50mg/mL
IPTG	100mM

35 g LB agar distile su ile 1 litreye tamamlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. 50-55°C’ye kadar soğutulduktan sonra ampisilin eklenmiştir. Petriler +4°C’de muhafaza edilmiştir. Ekim yapılmadan 30-45 dakika önce petrilere, ışık almayacak şekilde 20 µl X-Gal (50 mg/mL) ve 100 µl IPTG (100 mM) yayılmıştır.

SOC Besiyeri (100 mL):

Bileşenler	Miktar
Trypton	2 g
Maya Özütü	0,5 g
1M NaCl	1mL
1M KCL	0,25 mL
2M Mg ⁺²	1 mL
2M Glukoz	1 mL
pH	7,0± 0,2

Tryptone, maya özütü, NaCl ve KCl distile su ile 97 mL’ye tamamlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığına gelene kadar soğutulduktan sonra son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 2M Mg⁺² stok solüsyonu ve 2M glukoz ilave edilmiştir. Steril distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

3.6. ANALİZ YÖNTEMLERİ

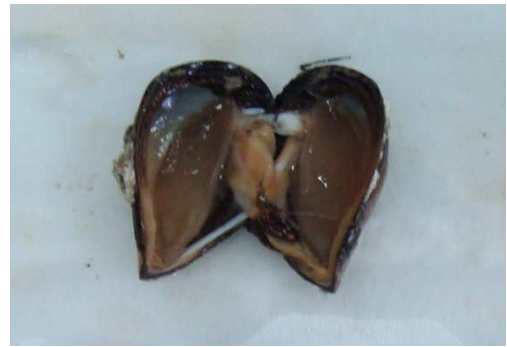
3.6.1. Numune Hazırlama

Örnekleme istasyonlarından toplanarak laboratuvara ulaştırılan *Mytilus galloprovincialis* örneklerinden, kabukları açılan, zarar gören ve ölü midye örnekleri çıkarılıp, analiz için yetişkin (5-7 cm) ve canlı midye örnekleri seçilmiştir (Şekil 3.11). Midye kabuk yüzeyleri, basınçlı su altında fırça ile iyice temizlenip yosun, poliket gibi canlılardan arındırılmıştır. Her bir *M.galloprovincialis* örneği, steril bistüri yardımıyla kapama kaslarından kesilerek kabukları açılmıştır (Şekil 3.12). Tüm iç organlar valvüller arası sıvı ile beraber steril tüplere aktarılarak homojenize edilmiştir (West P.A ve ark. 1986).

M.galloprovincialis içeriği LSB besiyerine inoküle edilerek Çoklu Tüp Fermentasyon Yöntemi ile koliform bakterilerin sayısı belirlenmeden önce seri dilüsyonlar yapılmıştır. Bunun için 1 mL homojenata 9 mL % 0,1 steril peptonlu su eklenerek 1:10 dilüsyon, 5 mL 1:10 dilüsyon karışımına 45 mL % 0,1 steril peptonlu su ilave edilerek 1:100 dilüsyon elde edilmiştir. Deniz suyu örneklerinde bulunan koliform bakterilerin sayısının belirlenmesinde, 10 mL deniz suyuna 90 mL steril distile su ilave edilerek 1:10 oranında dilüsyon yapılmıştır. Seyreltme sıvısı steril olduğundan seyreltilen çözeltilerde bakteri sayısı değişmemiştir (West P.A ve ark. 1986).



Şekil 3.11. Yetişkin *M.galloprovincialis*



Şekil 3.12. Kapama kasları bistüri ile açılan *M.galloprovincialis*

3.6.2. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

Deniz suyu ve midye örneklerindeki koliform bakterilerin sayısı, Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC) ve Amerikan Halk Sağlığı Kuruluşu (APHA) tarafından önerilen Amerikan Standartları metodu temel alınarak Çoklu Tüp Fermentasyon Yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem hasar görmüş veya az sayıda mikroorganizma içeren örneklerde ve katı besiyeri kullanımının uygun olmadığı durumlarda daha hassas ve güvenilir sonuçlar verdiği için tercih edilmiştir. Yönteme göre; dilüsyon yapılan örnekler, her biri 20 mL LSB besiyeri içeren 9 tüpe, 3x10 mL, 3x1mL ve 3x0,1 mL olacak şekilde ekim yapılarak, 35-37°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, bakteriyel büyümeden dolayı oluşan bulanıklık ile sıvı besiyeri içerisinde ters çevrilmiş halde bulunan durham tüplerinde meydana gelen gaz oluşumu, fekal koliform pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dilüsyon oranı dikkate alınarak 100 mL örnekteki toplam koliform bakteri sayısı, standart EMS tablosundan yararlanılarak hesaplanmıştır (bkz Ek 1). Muhtemel koliformların sayısını doğrulamak için gaz oluşumu gözlenen LSB tüplerinden Brilliant Green Bile Broth içeren tüplere birer öze dolusu ekim yapılmıştır. 37°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra pozitif sonuç veren tüpler koliform grup olarak doğrulanmıştır (APHA,1998).

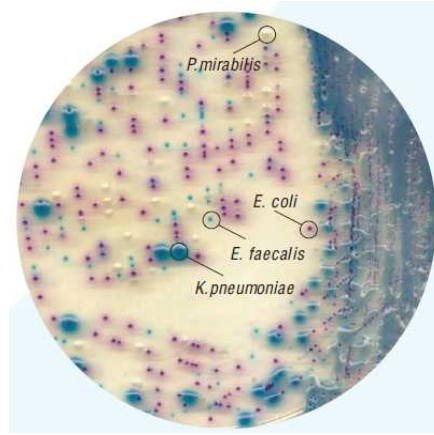
3.6.3. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonları

3.6.3.1. Kromojenik Besiyerleri ile Bakteri İdentifikasyonu

Bakteri identifikasyonunda, farklı mikroorganizmaların özel besi ortamlarında farklı renklerde koloniler oluşturacak şekilde çoğalmaları esasına dayanan kromojenik yöntem uygulanmıştır (Şekil 3.13). Bunun için LSB besiyerinden, kromojenik besiyeri olan HiCrome UTI agar (Himedia) plaklarına pasaj yapılarak 44,5°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan morumsu-pembe renkli koloniler *E. coli* olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.2)

Tablo 3.2. Kromojenik UTI agarda üreyen bakterilerin koloni renkleri

Mikroorganizmalar	Gelişim	Koloni Rengi
<i>Escherichia coli</i>	+++	Morumsu pembe
<i>Proteus mirabilis</i>	+++	Açık kahverengi
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	Mora dönük mavi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	Renksiz
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	Mavi



Şekil 3.13. Kromojenik UTI agarda (Himedia) üreyen bakterilerin koloni görünümü

3.6.3.2. Biyokimyasal Testler

Mikroorganizmaların tanımlanması ve doğrulanmasında, kromojenik yöntem dışında biyokimyasal testler de uygulanmıştır. Bu testlerden enterik bakteriler için geçerli olan IMVIC Testleri, hareket testi ve hidrojen sülfür testi ile tür tayinleri yapılmıştır.

3.6.3.2.1. IMVIC Testleri

3.6.3.2.1.1. İndol Testi

İndol testi yardımıyla, mikroorganizmaların triptofandan indol oluşturabilme özelliği incelenmiştir. Bu amaçla UTI agarda saf olarak üretilen *E. coli* bakterisinden 1-2

koloni, 2 mL indol besiyerine ekim yapılarak 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültüre 0,5 mL Kovaks ayracı damlatılmıştır. Besiyeri yüzeyinde kırmızı renkli bir halka oluşması indol pozitif olarak değerlendirilmiştir (Atlas R.M. 1946, Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.3.2.1.2. Metil Kırmızısı (MR) Testi

Metil kırmızısı testinde, indikatör bir besiyerinde glukozun karışık asit fermentasyonu sonucu oluşan asidik pH değişikliği gösterilmiştir. pH indikatörü olarak metil kırmızısı ayracı kullanılmıştır. Saf olarak üretilen *E. coli* bakterisi, 5 mL MR-VP besiyerine ekim yapılarak, 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Kültüre 2 damla metil kırmızısı damlatılmıştır. İndikatörün pH < 4,4'deki kırmızı renk değişimi pozitif, pH > 6,0'daki sarı renk değişimi negatif olarak değerlendirilmiştir (Atlas R.M. 1946, Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.3.2.1.3. Voges-Proskauer (VP) Testi

Voges Proskauer testi, mikroorganizmaların glikozdan asetil metil karbinol oluşturma yeteneklerine dayanmaktadır. 5 mL MR-VP besiyerine, saf olarak üretilen *E. coli* bakterisi ekilerek, 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan kültüre 3 damla % 40'luk KOH damlatıldıktan sonra 6 damla α -naftol solüsyonu damlatılmıştır. Tüpler iyice karıştırılıp havaya maruz kalmaları için kapakları açılarak 10-15 dakika beklenmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması negatif olarak değerlendirilmiştir (Atlas R.M. 1946, Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.3.2.1.4. Sitrat Testi

Sitrat testi ile bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanma yetenekleri belirlenmiştir. Test tüplerinde yatık agar olarak hazırlanan Simmon's Sitrat agara, saf olarak üretilen *E. coli* bakterisi öze yardımıyla yayılarak ekim yapılmıştır. Tüp kapağı gevşek olarak kapatılıp atmosferik ortamda, 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri renginin koyu maviye dönüşmesi pozitif, orijinal yeşil renkte kalması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.3.2.2. Hidrojen Sülfür (H₂S) Testi

Bu test ile bakterilerin sistin, sistein gibi kükürt içeren aminoasitlerden ya da sülfatlardan H₂S oluşturup oluşturamadıkları, hidrojen sülfürün besiyeri bileşimindeki demir ile birleşerek siyah renkli demir sülfüre dönüşmesi ile belirlenmiştir. Saf olarak üretilen *E. coli* bakteri kolonisi öze ile alınarak yatık olarak tüplerde katılaştırılmış olan soğan kabuğu rengindeki Kligler Iron Agar (KIA) yüzeyine zig zaglar çizilerek ve dip kısmına batırılarak ekim yapılmıştır. Tüp kapağı gevşek olarak kapatılıp 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin siyaha dönüşmesi H₂S oluşturduğunu göstermiştir (Atlas R.M. 1946, Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.3.2.3. Üre Testi

Üre testi ile üreyi hidrolize eden üreaz enzimini oluşturmayan mikroorganizmaların birbirlerinden ayırımı sağlanmıştır. Bunun için saf olarak üretilen *E. coli* bakterisi Christensen üre agara ekilerek, 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri renginin pembe olması pozitif sonuç, değişmemesi negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.3.2.4. Hareket Testi

Hareket testi ile bakterilerin hareketli olup olmadığı yarı katı besiyerindeki üremelerine bakılarak belirlenmiştir. Saf olarak üretilen *E. coli* bakterisi iğne öze ile alınarak dik olarak hazırlanmış SIM Medyum besiyerine batırma ekim yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Kültürler 25°C' de 24-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sadece ekim çizgisinde gözlenen üreme hareket negatif, gelişmenin sadece ekim çizgisi boyunca değil tüm besi yerinde olması hareket testi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Morello J.A. ve ark. 2003).

3.6.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Midye (*M.galloprovincialis*) ve deniz suyu örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, Clinical and Laboratory Standarts Institute® (CLSI) M2-A9 standardının önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer) ile belirlenmiştir (CLSI, 2006). Değerlendirme aynı standardın M100-S18 ek tablolar kitapçığında yayınlanan kriterlere uygun olarak yapılmıştır (CLSI, 2008).

Bu çalışmada β -laktam inhibitörü olarak, ampisilin (A, 10 μ g), amoksisilin/klavulanik asit (AC, 30 μ g); aminoglikozid grubundan amikasin (AK, 30 μ g), streptomisin (S, 10 μ g); kinolon grubundan nalidiksik asit (NA, 30 μ g); sülfonamid grubundan, trimetoprim-sülfametoksazol (CO, 25 μ g); tetrasiklin grubundan tetrasiklin (T, 30 μ g); amfenikol grubundan kloramfenikol (C, 30 μ g); karbapenem grubundan imipenem (I, 10 μ g); sefalosporin grubundan seftazidim (CA, 30 μ g) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Disk difüzyon metodu ile antibiyotik hassasiyet testleri yapılmak üzere UTI agarda saf olarak üretilen *E.coli* suşları, 3 mL steril serum fizyolojik içeren tüplere eklenerek, 0,5 McFarland (1.5x10⁸ cfu/mL) bulanıklık serisine uygun olarak seyreltilmiştir. Standart bakteri süspansiyonunun 4 mm kalınlığındaki Muller Hinton Agar plaklarına steril eküvyon çubukları ile ekimleri yapılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra dispenser yardımıyla diskler arasında 25 mm, petri kenarında en az 10 mm mesafede olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C \pm 2’de 16-18 saat inkübasyondan sonra her bir antibiyotik diski etrafında oluşan inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. Ölçülen zon çapları CLSI kitapçığındaki *Enterobacteriaceae* ile ilgili tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak, *E. coli* suşunun test edilen antibiyotiğe karşı hassasiyeti “duyarlı”, “orta derecede duyarlı” veya “dirençli” olarak değerlendirilmiştir (bkz Ek 2). CLSI kriterlerine uygun olarak kullanılan Muller Hinton Agar ile antibiyotik disklerin kullanılabilirliğini ve yapılan deneyin geçerliliğini göstermek için kontrol bakteri olarak *E. coli* ATTC 25922 suşu kullanılmıştır.

3.6.5. Çoklu Antibiyotik Dirençliliği (MAR) İndeksi

Çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksi, incelenen popülasyonlardaki bakteri direnç yayılımını göstermektedir. Çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksi, test organizmalarının dirençli olduğu antibiyotik sayısının toplam analiz edilen antibiyotik sayısına oranı ile hesaplanmıştır. Hesaplanan MAR indeksi sonucunun 0,2'den büyük olması birden fazla antibiyotiğin kullanıldığı ortam kökenli bakteri suşlarının varlığını göstermiştir (Krumperman P.H. 1983).

3.6.6. Bakteri Kültürlerinin Muhafazası

İzole edilen *E. coli* suşlarını saklamak amacıyla boncuklu bakteri saklama tüplerini içeren OrBak bakteri saklama seti kullanılmıştır. Bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni, stok kültürden sıklıkla örnek alınması gerektiği durumlarda, bir tüp içinde bulunan bakteri ile kaplı 10-15 boncuktan sadece bir boncuğun tüpten çıkarılarak, uygun bir sıvı veya katı besiyerine aktarılabilme kolaylığını sağlamasıdır. Böylelikle derin dondurucuda korunan stok kültürün kontaminasyon riski en aza indirgenmiş olmaktadır.

E. coli bakterisine ait kültür uygun bir katı besiyerinde geliştirildikten sonra gelişen kültürden öze ile alınan bakteri kolonisi, tüp içinde bulunan sıvı besiyerinin içine inoküle edilmiştir. Boncukların süspansiyon ile iyice temas etmesi amacıyla tüp hafifçe çalkalanarak, oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüpte kalan sıvının fazlası pipet ile alınarak, tüp -20°C'de dondurulmuştur. Tüp içinde boncuklar arasında sıvı kalması donma işlemi sonrasında boncukların birbirine yapışmasına yol açtığından ve amaca uygun olarak tek boncuğun alınmasını önlediğinden tüp içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir.

Dondurulan kültürün kullanılmasında, dondurucudan çıkarılan tüp içindeki seramik boncuklardan birinin, tüpü eğerek LB besiyeri içine düşmesi sağlanmış ve kontaminasyon oluşmamasına dikkat edilmiştir. Boncuğun bulunduğu LB besiyeri çalkalanarak, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan tüp daha sonra yeniden kullanılmak üzere dondurucuya kaldırılmıştır.

Örneklerin karışmaması ve kolaylıkla bulunabilmesi amacıyla bir kodlama sistemi geliştirilmiştir. Kodlama sisteminde; “M101K11”, ilk karakter örneklem istasyon numarasını (D1-D9; M1-M3), ikinci karakter örnek numarasını (01-15), üçüncü karakter örnekleme yapıldığı mevsimi (İ: İlkbahar, Y:Yaz, S: Sonbahar, K: Kış), dördüncü karakter örnekleme yapıldığı yılı (2010-2011) simgelemektedir.

3.6.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

Mikrobiyolojik analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinin yapılması amacıyla Windows 7 uyumlu SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) yazılımı kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA), Post-Hoc Tukey's honesty non-parametric test ve korelasyon analizleri uygulanmıştır.

3.6.8. DNA İzolasyonu

İzole edilen *E. coli* suşlarının taşıdığı antibiyotik direnç genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenebilmesi için, *E.coli*'ye ait kalıp DNA molekülünün saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla derin dondurucuda muhafaza edilen *E. coli* suşları, LB besiyerine inoküle edilerek, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *E.coli* gelişen tüplerden saf suş elde etmek amacıyla LB besiyerinden kromojenik besiyeri UTI agar plaklarına pasaj yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üreyen saf koloniler seçilerek DNA izolasyonunda başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. *E. coli*'den genomik DNA izolasyonu silika temelli ticari kit DNeasy® Blood&Tissue Kit (Qiagen) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

1. Petrilerden seçilen *E. coli* hücreleri (max. 2×10^9 hücre), içinde steril distile su bulunan tüplere aktararak vortekslenmiştir. 5.000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
2. Pellete 180 µL Buffer ATL ve 20 µL proteinaz K eklenerek vortekslenmiştir. 56 °C'de lizis işlemi tamamlanana kadar (yaklaşık 1 saat) inkübe edilmiştir.
3. Lizis tamamlandıktan sonra örnekler 15 saniye vortekslenmiştir. Örneklere 56°C'de inkübe edilmiş 200 µL Buffer AL ve 200 µL etanol (% 96) eklenerek vortekslenmiştir.

4. Karışım DNeasy Mini spin kolona pipetlenmiştir. 6.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp, içinde biriken sıvı ile beraber atılmıştır.
5. DNeasy Mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolona 500 µL Buffer AW1 pipetlenerek, 6.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp, içinde biriken sıvı ile beraber atılmıştır.
6. DNeasy Mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolona 500 µL Buffer AW2 pipetlenerek, 20.000xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp, içinde biriken sıvı ile beraber atılmıştır.
7. DNeasy Mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolonu kurutmak amacıyla 20.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp, içinde biriken sıvı ile beraber atılmıştır.
8. DNeasy Mini spin kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolona 200 µL Buffer AE pipetlenerek, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. 6.000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek spin kolon atılmıştır.
9. Mikrosantrifüj tüpü içinde biriken izolat + 4°'de muhafaza edilmiştir.

3.6.9. DNA Kalite ve Kantitesinin Belirlenmesi

3.6.9.1. Agaroz Jel Elektrofözezi

Genomik DNA izolasyonu ile elde edilen DNA'nın kalitesi, izolatın agaroz jel elektrofözezinde yürütülerek ultraviyole ışık kaynağı altında incelenmesi ile belirlenmiştir. Bunun için % 1 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanmıştır. Her bir jel uygulaması için 1 g agar tartılarak üzerine 100 mL 0,5 X TBE tamponu ilave edilmiştir. Agaroz jel mikrodalga fırında kaynatılıp, 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 0,5 µg/mL etidyum bromür (EtBr) ile iyice karıştırılmıştır. Jel, tank içinde homojen olarak yayılmasına dikkat edilerek döküldükten sonra tank taracları jel içine gömülmüş ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Jel tamamen donduktan sonra elektrofözez tankı cihaza yerleştirilerek, üzerini örtecek kadar 0,5 X TBE tamponu ile doldurulmuştur. Parafin üzerinde DNA örnekleri 1/6 oranında yükleme boyası ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. DNA izolatları, jelle 100 volt uygulanarak 20 dakika yürütülmüş ve ultraviyole ışık kaynağı altında görüntülenmiştir (Sambrook J. 2001).

3.6.9.2. DNA Saflık ve Miktar Tayini

İzolasyon sonucunda elde edilen bakteri DNA'sının saflık derecesi ve miktarı, 2 µL DNA örneği kullanılarak nanodrop okuyuculu spektrofotometrede (Biotech, Epoch), 260nm ve 280nm dalga boylarında ölçülen absorbands değerlerinin (OD_{260}/OD_{280}) birbirine oranlanması ile belirlenmiştir (Sambrook J. 2001).

3.6.10. İntegraz Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Analizi

3.6.10.1. *Int I-1* geninin PCR ile Analizi

PCR analizi, integraz 1 genine spesifik *intI-1* oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). PCR reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1 U Taq DNA polimeraz, 35,8 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 60°C 1 dk, 72°C 1 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (Mazel D ve ark. 2000). PCR karışımına, amplifikasyon performansını doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak 80 ng/µL *int I-1* genini içerdiği bilinen DNA örneği ile kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

3.6.10.2. *Int I-2* geninin PCR ile Analizi

PCR analizi, integraz 2 genine spesifik *intI-2* oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). PCR reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1 U Taq DNA polimeraz, 35,8 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 60°C 1 dk, 72°C 1 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (Mazel D ve ark. 2000). PCR karışımına, amplifikasyon performansını doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak 80 ng/µL *int I-2*

genini içerdği bilinen DNA örneği ile kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

3.6.11. İntegronların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Analizi

3.6.11.1. Sınıf 1 İntegronların PCR ile Analizi

PCR analizi, sınıf 1 integronların değişken bölgelerine spesifik 5'CS-3'CS oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). PCR reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1,6U Taq DNA polimeraz, 35,68 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 56°C 1 dk, 72°C 2,5 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5 dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (Levesque C. ve ark. 1995). PCR karışımına, amplifikasyon performansını doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak 80 ng/µL sınıf 1 integronları içerdği bilinen DNA örneği ile kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

3.6.11.2. Sınıf 2 İntegronların PCR ile Analizi

PCR analizi, sınıf 2 integronların değişken bölgelerine spesifik hep51-hep 74 oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). PCR reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1,5 U Taq DNA polimeraz, 35,7 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 55°C 1 dk, 72°C 2 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (White P.A. ve ark. 2001). PCR karışımına, amplifikasyon performansını doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak 80 ng/µL sınıf 2 integronları içerdği bilinen DNA örneği ile kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

3.6.12. Tetrasiklin Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Analizi

3.6.12.1. *tet* (A) Geninin PCR ile Analizi

PCR analizi, tetrasiklin dirençliliğinden sorumlu *tet*(A) gen kasetlerine spesifik oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). PCR reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1 U Taq DNA polimeraz, 35,8 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 58°C 1 dk, 72°C 1 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (Aarestrup F.M. ve ark. 2003). PCR karışımına, amplifikasyon performansını doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak 80 ng/µL *tet*(A) genini içerdiği bilinen DNA örneği ile kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

3.6.12.2. *tet* (B) Geninin PCR ile Analizi

PCR analizi, tetrasiklin dirençliliğinden sorumlu *tet*(B) gen kasetlerine spesifik oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3). PCR reaksiyon karışımı, toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1 U Taq DNA polimeraz, 35,8 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA kullanılarak hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 55°C 1 dk, 72°C 1 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (Aarestrup F.M. ve ark. 2003). PCR karışımına, amplifikasyon performansını doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak 80 ng/µL *tet*(B) genini içerdiği bilinen DNA örneği ile kontaminasyon kontrolü amacıyla negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

Tablo 3.3. *int I-1*, *int I-2*, *tet(A)*, *tet(B)*, sınıf 1 ve sınıf 2 integronların PCR analizinde kullanılan oligonükleotid primerler

Gen	Primer	Nükleotid Dizisi	Literatür
Sınıf 1 İntegron	5'CS: 3'CS:	5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	Levesque, C. 1995
Sınıf 2 İntegron	<i>hep 51</i> : <i>hep74</i> :	5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3' 5'-CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA-3'	White, P.A. 2001
<i>tet(A)</i>	F: R:	5'-GTAATTCTGAGCACTGTCGC-3' 5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	Aarestrup, F.M. 2003
<i>tet(B)</i>	F: R:	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3' 5'-ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	Aarestrup, F.M. 2003
<i>int I-1</i>	F: R:	5'-GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG-3' 5'-ACATGGGTGTAAATCATCGTC-3'	Mazel et al. 2000
<i>int I-2</i>	F: R:	5'-CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3' 5'-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3'	Mazel et al. 2000

3.6.13. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR analizi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için % 1 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanmıştır (Sambrook J. 2001). Agaroz jeldeki kuyucuklara PCR ürünleri ile birlikte DNA bant büyüklüklerini karşılaştırmak amacıyla DNA marker (Fermentas, 100 bp) yüklenmiştir. Amplifikasyon ürünleri 100 voltta 45 dakika yürütülüp, ultraviyole ışık kaynağı altında incelenerek bantlar görüntülenmiştir.

3.6.14. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılmasında, dizi analizi tepkimelerini etkileyen ve ortamda kullanılmayan nükleotid ve primerlerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri Wizard® SV Gel and PCR Clean up System kullanılarak aşağıdaki protokole göre saflaştırılmıştır.

1. PCR ürünlerine eşit miktarda membran bağlama çözeltisi eklenerek SV mini kolona pipetlenmiştir.
2. SV mini kolon oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. SV Mini kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
3. SV mini kolona 700 µL membran yıkama çözeltisi pipetlenerek 16.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp içinde biriken sıvı boşaltılmıştır.

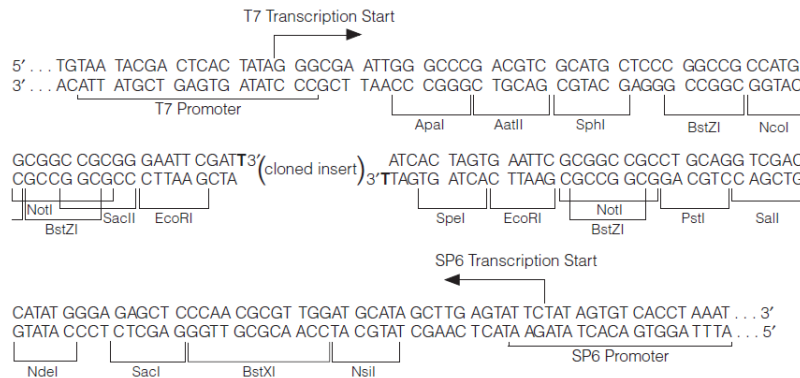
4. SV mini kolon yeniden 500 µL membran yıkama çözeltisi ile yıkanarak 6.000xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Tüp içinde biriken sıvı boşaldıktan sonra kolonu kurutmak amacıyla 16.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
6. SV mini kolon 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarılarak 50 µL nükleaz-free su pipetlenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 16.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Tüp içindeki saflaştırılan PCR ürünü + 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Saflaştırılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde, 100 volt uygulanarak 20 dakika yürütülmüş ve ultraviyole ışık kaynağı altında görüntülenmiştir.

3.6.15. Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronların Klonlanması

3.6.15.1. Ligasyon

PCR yöntemi ile çoğaltılan ve saflaştırılan sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar, pGEM-T Easy plazmid vektörüne (Promega) klonlanmıştır. pGEM®-T Easy vektör üzerindeki çoklu klonlama bölgesi ve promoterlerin dizisi Şekil 3.14'de gösterilmiştir. Ligasyon reaksiyon karışımı, toplam hacim 10 µL olacak şekilde 1 µL pGEM-T Easy vektörü, 5 µL 2X ligasyon tampon çözeltisi, 1 µL T4 DNA ligaz ve 3 µL PCR ürünü kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 16°C'de bir gece boyunca inkübe edilerek ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.14. pGEM®-T Easy vektör üzerindeki çoklu klonlama bölgesi ve promoterlerin dizisi

3.6.15.2. Transformasyon

Ligasyon ürünleri *Escherichia coli* JM109 kompetan hücrelerine (Promega) aktarılarak çoğaltılmıştır. Bunun için buzda çözdürülen JM109 kompetan hücrelerinden 50 µL alınarak 1,5 mL'lik tüplere konulmuştur. Kompetan hücrelerini içeren tüplere, 2 µL sınıf 1 ve sınıf 2 integronları içeren ligasyon ürünleri ilave edilerek tüp hafifçe çalkalandıktan sonra 20 dakika buzda bekletilmiştir. Hücrelere 45-50 saniye 42°C'de ısı şoku uygulanarak plazmidin hücre içine girmesi sağlanmıştır. Bu esnada tüpün çalkalanmamasına dikkat edilmiştir. Daha sonra tüpler hızlı bir şekilde buza konularak 2 dakika bekletilmiştir. Transformasyonu yapılan bakterilere oda sıcaklığındaki SOC besiyerinden 950 µL eklenerek, bakteriler 37°C' de 150 rpm hızla, çalkalamalı inkübatörde 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her transformasyon kültüründen 100 µL alınarak, 100 µg/mL ampisilin içeren LB agarlı petriye, 50 mg/mL X-Gal'den (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 20 µL ve 100 mM IPTG (izopropil-β-D-thiogalaktozid)'den 100 µL ilave edildikten 30 dakika sonra petriye yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de bir gece bekletilerek plazmidi içeren hücrelerin büyümeleri sağlanmıştır.

3.6.15.3. Rekombinant Kolonilerin Seçimi

Laktozun glikoz ve galaktoza parçalanmasını aktive eden beta galaktosidaz enzimi, plazmidin *lacZ* geni tarafından kodlanır. Klonlanan gen, plazmidin *lacZ* geninin içine girmesi ile genin yapısını bozarak, beta galaktosidaz enzim sentezini inaktive eder. Transforme bakteriler, laktoz analogu X-Gal ve *lacZ* represörünü inaktive eden IPTG ile ampisilin içeren besi ortamında ürerler ancak beta galaktosidaz sentezlenemediğinden X-Gal'i ayrıştıramaz ve koloniler beyaz renk olarak görülür. Eğer *lacZ* geni inaktive olmamışsa, sentezlenen enzim, X-Gal'i ayrıştırarak koloni etrafında mavi renk meydana getirir. Bunlar plazmidi alan ama klonlama gerçekleşmeyen bakterilerdir.

Buna göre, sınıf 1 ve sınıf 2 integronları taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içeren bakteriler ampisilin/X-Gal/IPTG içeren LB besiyerinde büyüyerek beyaz renkli koloniler oluştururken, sadece pGEM-T Easy plazmidini içerenler, mavi renkli koloniler oluşturduğundan, rekombinant kolonilerin seçimi koloni rengine göre belirlenmiştir.

3.6.16. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu

Transforme olmuş bakterilerin çoğaltılması amacıyla, petrilere sınıf 1 ve sınıf 2 integronları içeren plazmidleri taşıyan beyaz koloniler ve pozitif kontrol olarak mavi koloniler steril kürdan yardımı ile seçilmiştir. Ampisilin (100 µg/mL) içeren 5 mL LB besiyerine aktararak, 37 °C'de 16 saat 200 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda rekombinant plazmidler Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre izole edilmiştir.

1. Gece boyunca büyütülen bakteri kültüründen 5 mL alınarak 10.000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
2. Pellete 250 µL hücre süspansiyon çözeltisi eklenerek vortekslenmiştir. Pelletin tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
3. 250 µL hücre lizis çözeltisi ilave edildikten sonra tüp 4 kez ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında hücre süspansiyonu berraklaşana kadar yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir.
4. 10 µL alkali proteaz çözeltisi ilave edilerek tüp tekrar 4 kez ters düz edilerek karışması sağlanmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. 350 µL nötralizasyon çözeltisi ilave edildikten hemen sonra hızlı bir şekilde tüp 4 kez ters düz edilerek karıştırılmıştır. Elde edilen bakteriyal lizat maksimum devirde (14.000xg) 10 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant spin kolona pipetlenerek 14.000xg'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp, içinde biriken sıvı ile beraber atılarak, spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
7. Spin kolona 750 µL kolon yıkama çözeltisi ilave edilerek 14.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüp, içinde biriken sıvı ile beraber atılarak spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
8. Spin kolona yeniden 250 µL kolon yıkama çözeltisi ilave edilerek 14.000xg'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Spin kolon bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 100 µL nükleaz- içermeyen su ilave edilerek 14.000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

10. Elde edilen plazmid DNA çözeltisi -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Plazmid DNA örnekleri %1’lik agaroz jel elektroforezinde, 100 voltta 20 dakika yürütülerek ultraviyole ışık kaynağı altında görüntülenmiştir.

3.6.17. Klonlamanın Doğrulanması Amacıyla Rekombinant Kolonilerden PCR ile Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronların Saptanması

Mavi-beyaz koloni seçimi, istenilen genleri içeren rekombinant plazmidleri taşıyan bakteriyel kolonilerin seçiminde yararlı olmasına rağmen bazen mavi koloniler hedef genleri içerebileceği gibi bazı beyaz koloniler de istenilen geni içermeyebilir. Bu nedenle oluşan beyaz renkli kolonilerin gerçekten sınıf 1 ve sınıf 2 integronları taşıyan pGEM-T Easy plazmidini içerip içermediği daha hassas bir yöntem olan PCR yöntemiyle taranarak kesin olarak belirlenmiştir.

Bu amaçla beyaz kolonilerden izole edilen plazmid DNA’lardan PCR analizi, sınıf 1 integronlara spesifik 5'CS-3'CS ve sınıf 2 integronlara spesifik hep51-hep74 oligonükleotid primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1X PCR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0,2 pmol/µL her bir primer stok solüsyonu, 1,6 U Taq DNA polimeraz, 35,68 µL steril distile su ve 80 ng/µL kalıp DNA ile PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Amplifikasyon için ısı döngü şartları 94°C 3 dk (ilk denatürasyon), 34 döngü; 94° C 45 sn, 56°C (Sınıf 1 integron) / 55°C (Sınıf 2 integron) 1 dk, 72°C 2,5 dk (primerlerin bağlanması), 72°C 5 dk (uzama) olarak ayarlanmıştır (Levesque C. ve ark. 1995, White P.A. ve ark. 2001). PCR karışımına pozitif kontrol olarak 80 ng/µL sınıf 1 ve sınıf 2 integronları içerdiği bilinen DNA örneği ile negatif kontrol olarak 3 µL steril distile su eklenmiştir.

Beyaz kolonilerden izole edilen rekombinant plazmid DNA’larından elde edilen PCR ürünleri, *E. coli* genomik DNA’larından elde edilen PCR ürünleri ile birlikte % 1’lik agaroz jel elektroforezinde, 100 voltta 30 dakika yürütülerek ultraviyole ışık kaynağı altında görüntülenmiştir.

3.6.18. DNA Dizi Analizi

PCR ürünlerinin dizi analizi, otomatik DNA dizi analizi sistemi ABI PRISM 3100[®] Genetic Analyzer kullanılarak Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda (Ankara) gerçekleştirilmiştir. pGEM-T Easy plazmidlerine aktarılan sınıf 1 ve sınıf 2 integronların dizi analizi, T7/SP6 primerleri ile BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing kiti kullanılarak çift yönlü olarak yapılmıştır (Tablo 3.4). Sekans reaksiyonu sonrası işaretli nükleotidleri ve primerleri uzaklaştırmak amacıyla örnekler dizi analizi cihazına yüklenmeden önce Etanol/EDTA/Sodyum Asetat yöntemi ile saflaştırılmıştır.

Tablo 3.4. Dizi analizinde kullanılan T7 ve SP6 promoter primerlerin nükleotid dizisi

Primer	Nükleotid Dizisi
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

3.6.19. Biyoinformatik Analiz

Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların dizi analizi ile elde edilen baz dizileri, genlere ait daha önce tanımlanan dizi analizi verileri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Baz dizilerinin homoloji gösterdiği nükleotid dizilerini saptamak için; NCBI veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programının “nBLAST” (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla benzerlik gösteren diziler bulunmuştur. Nükleotid dizileri, ExPASy Proteomics Server'daki “translate tool” programı ile 6 farklı çerçevede incelenerek protein sekansları belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELER

İstanbul Avrupa Yakası-Güneybatı sahil şeridi üzerindeki 9 istasyonda, Haziran 2010- Haziran 2011 tarihleri arasında yapılan deniz suyu örneklemesine ait pH, çözünmüş oksijen, hava ve deniz suyu sıcaklığı verileri değerlendirilmiştir. Seçilen istasyonlarda mevsimsel olarak ölçülen fizikokimyasal parametre verileri, 9 istasyonun ortalaması alınarak elde edilmiş olup Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

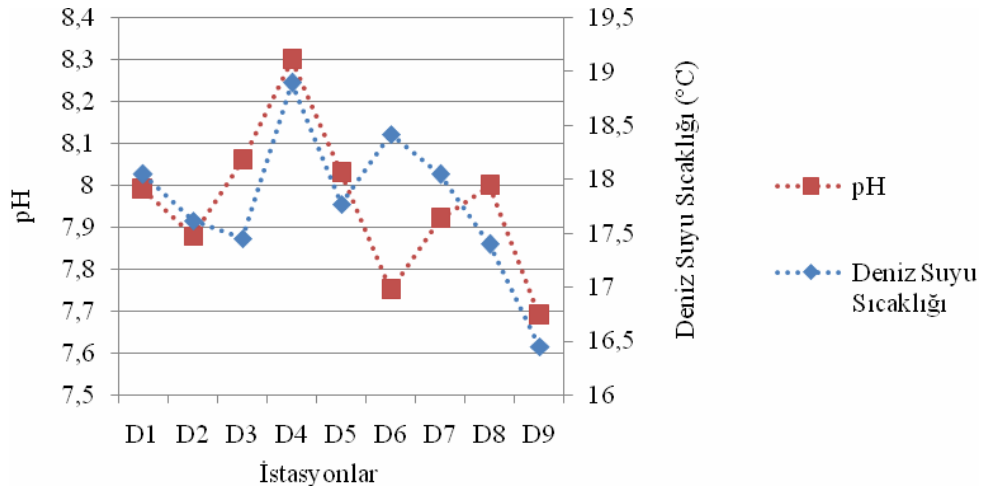
Tablo 4.1. Kıyusal su istasyonlarında ölçülen fizikokimyasal parametrelerin minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin mevsimsel değişimi.

Mevsim	Fizikokimyasal Parametreler			
	Hava Sıcaklığı (°C)	Su Sıcaklığı (°C)	pH	Çözünmüş Oksijen (mg/l)
İlkbahar	25,1-26,9 26,16±0,18	15,9-21,4 17,62±0,54	7,4-8,8 7,97±0,13	2,8-6,7 5,07±0,39
Yaz	29,0-39,7 32,56±1,10	25,1-28,0 26,37±0,29	7,6-8,5 7,86±0,08	2,5-7,6 4,52±0,49
Sonbahar	21,1-27,7 23,07±0,67	16,9-19,6 18,34±0,27	7,6-8,2 8,00±0,06	2,7-6,2 4,25±0,33
Kış	9,4-12,8 11,18±0,38	7,5-9,9 8,82±0,25	7,5-8,1 8,00±0,064	3,7-6,0 4,48±0,21

Örnekleme esnasında hava ve deniz suyu sıcaklıkları yerinde ölçülmüş ve Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü sitesinden doğrulanmıştır. Ölçülen sıcaklıklar mevsimin ve iklimin bir sonucu olup mevsim normalleriyle herhangi bir çelişki oluşturmamıştır. Çalışma süresince deniz suyu sıcaklığının hava sıcaklığına bağlı olarak 7,5°C ile 28°C arasında değiştiği görülmüştür. Deniz suyu sıcaklığı en düşük 7,5°C ile kış döneminde ve en yüksek 28°C ile yaz döneminde Menekşe-Küçükçekmece bağlantı noktasında gözlenmiştir. Hava sıcaklığı en düşük 9,4°C ile kış döneminde Rumeli Kavağı istasyonunda, en yüksek 39,7°C ile yaz döneminde Ataköy istasyonunda tespit edilmiştir. Hava ve deniz suyu sıcaklıkları paralel olarak artış ve azalış göstermiştir. Buna göre hava sıcaklığı ile deniz suyu sıcaklığı arasında güçlü

korelasyon olduğu belirlenmiş ($r=0,944$) ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,01$).

Kıyusal su istasyonlarında pH ve deniz suyu sıcaklıklarının istasyonlar arası değişimi Şekil 4.1’ de gösterilmiştir. Buna göre örnekleme istasyonlarındaki pH değerleri, yıl boyunca büyük farklılık göstermemiştir. Mevsimsel pH değerleri, en yüksek 8,8 ile Menekşe-Küçükçekmece bağlantı noktasında, en düşük 7,4 ile Zeytinburnu istasyonunda ilkbahar döneminde tespit edilmiştir. Örnekleme yapılan istasyonlardan Menekşe-Küçükçekmece bağlantı noktasında ölçülen pH değerlerinin, Zeytinburnu ve Rumeli Kavağı istasyonları ile arasında önemli bir farklılık görülmüş ($p<0,05$), diğer istasyonlar arasındaki pH değişimlerinde ise önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

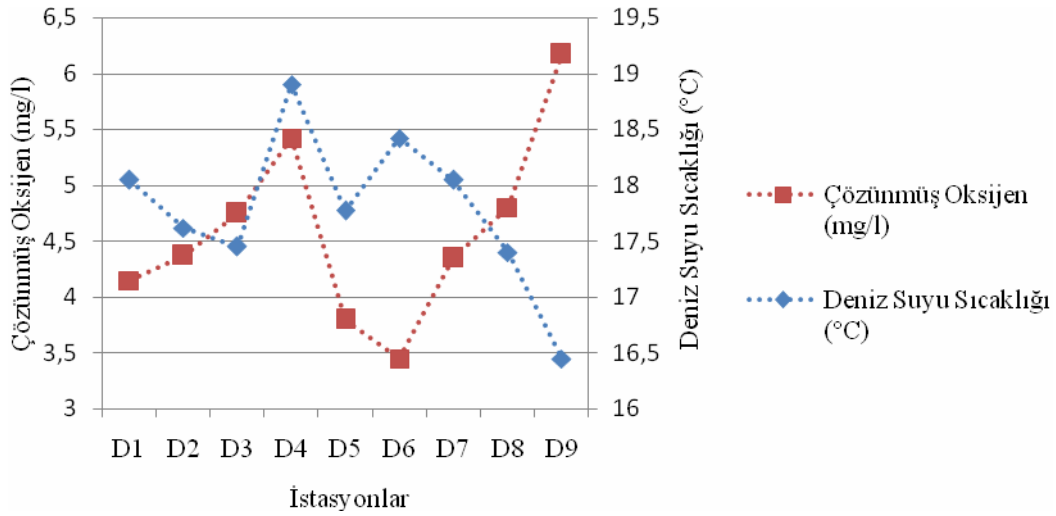


Şekil 4.1. Kıyusal su istasyonlarında pH ve deniz suyu sıcaklıklarının istasyonlar arası değişimi. D1: Ataköy, D2: Yeşilköy, D3: Menekşe, D4: Menekşe-Küçükçekmece Bağlantı Noktası, D5: Avcılar, D6: Zeytinburnu, D7: Büyükkçekmece, D8: Menekşe-Ambarlı, D9: Rumeli Kavağı.

Deniz suyu tampon çözelti karakterinde olduğundan, pH üzerine etkileyen faktörleri hızlı bir şekilde etkisizleştirme eğilimindedir. Atmosferle sürekli temas, karışım, sıcaklık, fotosentetik aktivite gibi etkenler sonucunda deniz suyunun pH değerleri ortalama 8,3 dolaylarında olmaktadır. Bu değer çevre koşullarına bağlı olarak zaman içinde zayıf bir salınım gösterebilir (Özyurt N.N. 2001). Çevre ve Orman Bakanlığı'nın, Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde rekreasyon amacıyla kullanılan kıyı ve deniz suları için pH

sınır değerlerinin 6-9 aralığında, kabuklu su ürünlerinin yetiştiği suların pH aralığının ise 7-9 aralığında olması istenir. Çalışma süresince örnekleme yapılan istasyonlarda ölçülen pH değerleri bu aralık içerisindeydi.

Deniz suyunun sucul yaşam kalitesi açısından önemli bir parametresi olan çözünmüş oksijen çözünürlüğü, deniz suyu sıcaklığı ile ters orantılıdır. Çözünmüş oksijen değerinin, sıcaklıkların artışı ile genel olarak azaldığı, bazı dönemlerde (yaz ve sonbahar) birincil üreticilerin sayısal artışına paralel arttığı gözlenmiştir. Tablo 4.1’de verilen değerler dikkate alındığında en düşük çözünmüş oksijen değeri 2,5 mg/l, en yüksek 7,6 mg/l olarak yaz döneminde tespit edilmiştir. En düşük çözünmüş oksijen miktarının ölçüldüğü Avcılar istasyonu ve Zeytinburnu istasyonunun çözünmüş oksijen değerleri, Rumeli Kavağı istasyonuna ait çözünmüş oksijen değerinden anlamlı derecede farklıdır ($p<0,05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kıyılal su istasyonlarında çözünmüş oksijen (mg/l) ve deniz suyu sıcaklıklarının istasyonlar arası değişimi. D1: Ataköy, D2: Yeşilköy, D3: Menekşe, D4: Menekşe-Küçükçekmece Bağlantı Noktası, D5: Avcılar, D6: Zeytinburnu, D7: Biyyükçekmece, D8: Menekşe-Ambarlı, D9: Rumeli Kavağı.

Su Kirliliği ve Kontrolü Yönetmeliği’nde belirtilen kıta içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterlerinde, çözünmüş oksijen değeri 3 mg/l’den az olan sular 4. Sınıf (çok kirlenmiş) sular olarak değerlendirilir. Menekşe-Küçükçekmece Bağlantı Noktası, Avcılar ve Zeytinburnu istasyonlarında çözünmüş oksijen değerlerinin, belirli dönemlerde 3 mg/l’den küçük değerler aldığı tespit edilmiştir. Çalışma süresince ölçülen çözünmüş

oksijen değerlerine göre ise Rumeli Kavağı istasyonunun 2. Sınıf (az kirlenmiş) sular sınıfında olduğu görülmüştür.

4.2. TOPLAM KOLİFORM BAKTERİ SAYISI (TKBS)

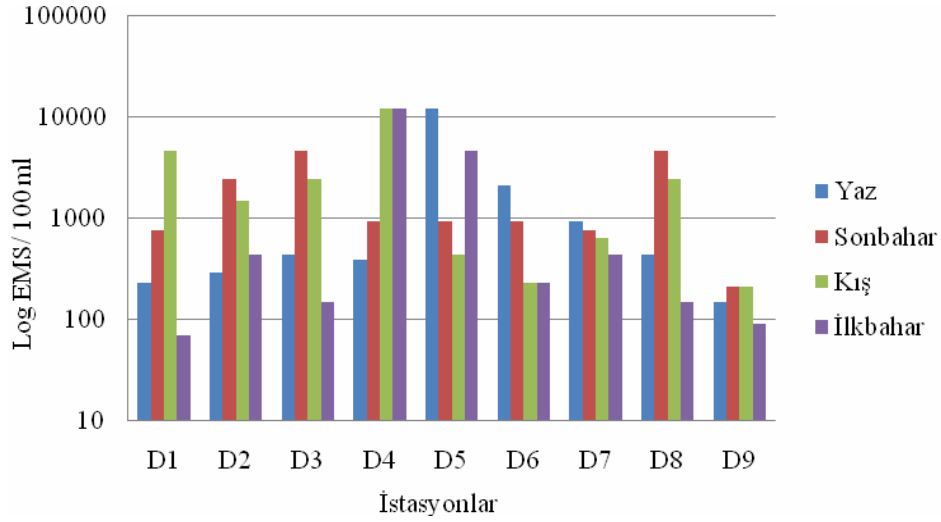
Fekal kontaminasyondan kaynaklanan kirlilik düzeyinin belirlenebilmesi amacı ile deniz suyu örneklerinde ölçülen toplam koliform bakteri sayıları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre, toplam koliform bakteri sayısı 7×10^1 EMS/100ml ile $>11 \times 10^3$ EMS/100ml arasında değişmektedir. Kıyısal su istasyonlarında kış döneminde gözlenen en yüksek TKBS değeri, hava sıcaklıklarının yükseldiği ilkbahar ve yaz döneminde düşüş eğilimi göstermiştir. Tüm istasyonlarda ölçülen yıllık ortalama toplam koliform bakteri sayıları incelendiğinde, en yüksek değerlerin Menekşe-Küçükçekmece bağlantı noktasında, en düşük değerlerin ise Rumeli Kavağı istasyonunda tespit edildiği gözlenmiştir.

Tablo 4.2. Kıyısal su istasyonlarına ait toplam koliform bakteri sayıları (TKBS).

İstasyon No	TKBS (EMS/100 ml)				
	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış	Ortalama
D1	70	230	750	4600	1.412
D2	430	290	2.400	1500	1.155
D3	150	430	4.600	2400	1.895
D4	>11.000	390	930	>11.000	6.330
D5	4.600	>11.000	930	430	4.490
D6	230	2.100	930	230	872
D7	430	930	750	640	687
D8	150	430	4.600	2400	1.895
D9	90	150	210	210	165
Ortalama	2.016	1.883	1.788	2.712	-

D1: Ataköy, D2: Yeşilköy, D3: Menekşe, D4: Menekşe-Küçükçekmece Bağlantı Noktası, D5: Avcılar, D6: Zeytinburnu, D7: Büyükçekmece, D8: Menekşe-Ambarlı, D9: Rumeli Kavağı

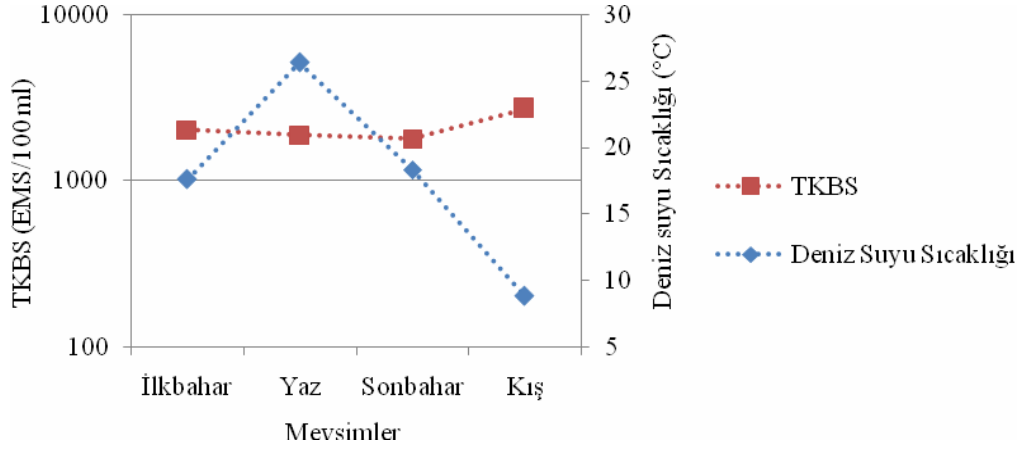
Şekil 4.3'te kıyusal su istasyonlarına ait toplam koliform bakteri sayılarının istasyonlar arası değişimini gösteren grafik verilmiştir. EMS değerleri 10^1 ile 10^3 arasında değiştiğinden grafiklerde logaritmik ölçek kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Kıyusal su istasyonlarına ait toplam koliform bakteri sayılarının (TKBS) istasyonlar arası değişimi. D1: Ataköy, D2: Yeşilköy, D3: Menekşe, D4: Menekşe-Küçükçekmece Bağlantı Noktası, D5: Avcılar, D6: Zeytinburnu, D7: Büyükkçekmece, D8: Menekşe-Ambarlı, D9: Rumeli Kavağı.

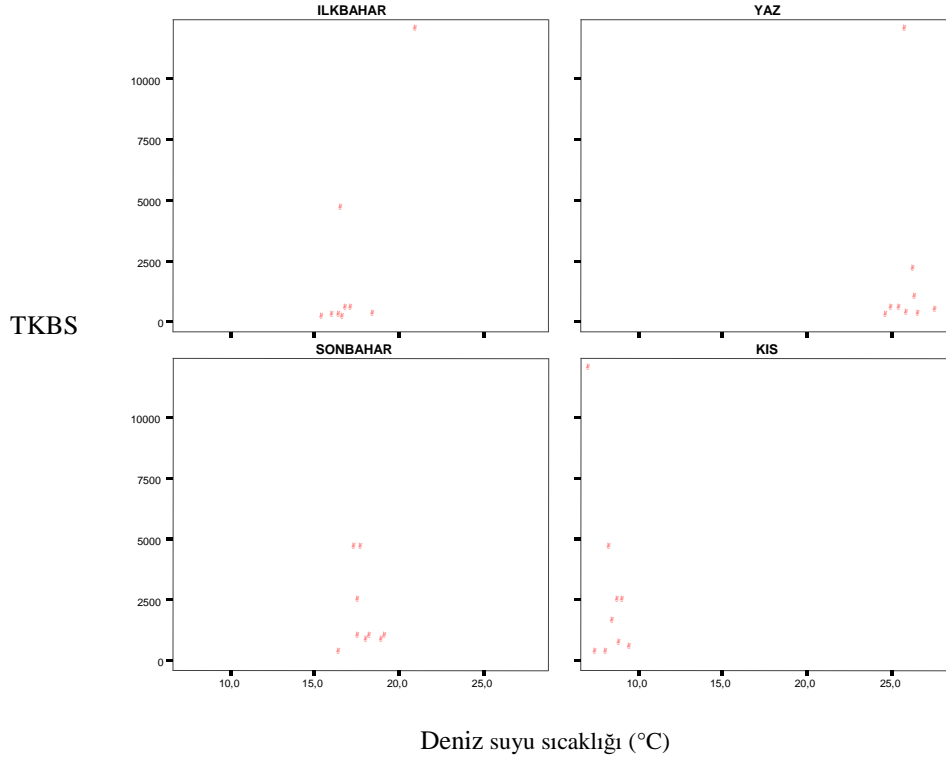
Çalışma süresince kıyusal su istasyonlarında ölçülen en yüksek toplam koliform bakteri değeri $>11 \times 10^3$ EMS/100 ml olup ilkbahar ve kış döneminde Menekşe-Küçükçekmece bağlantı noktasında ve yaz döneminde Avcılar istasyonunda tespit edilmiştir. En düşük toplam koliform bakteri değeri ise 7×10^1 EMS/100 ml ile ilkbahar döneminde Ataköy istasyonunda ve 9×10^1 EMS/100 ml ile Rumeli Kavağı istasyonunda ölçülmüştür. Kıyusal su istasyonlarında ölçülen toplam koliform bakteri sayılarının mevsimsel ve istasyonlar arası anlamlı bir farklılığının olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). İstatistiksel olarak tespit edilen bu sonuçlar, “Post-Hoc-Tukey Honesty Non-Parametric Test” ile doğrulanmıştır.

Şekil 4.4'e göre deniz suyu sıcaklığının en düşük olduğu kış döneminde toplam koliform bakteri sayısı en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Deniz suyu sıcaklığının yükseldiği ilkbahar ve yaz döneminde ise toplam koliform bakteri sayısı azalmıştır.



Şekil 4.4. Kıyusal su istasyonlarında ortalama toplam koliform bakteri sayısı (TKBS) ve deniz suyu sıcaklıklarının mevsimsel değişimi.

Deniz suyu sıcaklığı ile TKBS değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler Şekil 4.5'te verilmiştir. Buna göre deniz suyu sıcaklığı ile toplam koliform bakteri sayısı arasındaki en yüksek korelasyon, ilkbahar döneminde tespit edilmiş ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,01$).



Şekil 4.5. Kıyusal su istasyonlarında TKBS (EMS/100 ml) ile deniz suyu sıcaklığı arasındaki mevsimsel ilişki.

Mytilus galloprovincialis'in deniz suyundan filtre ederek bünyelerinde biriktirdikleri koliform bakteri sayısı Tablo 4.3'te verilmiştir. *M. galloprovincialis*'lerde toplam koliform bakteri sayısı 3×10^2 EMS/100 ml ile 12×10^4 EMS/100 ml gibi çok geniş bir aralıkta ölçülmüştür. En düşük değer Rumeli Kavağı istasyonundan, en yüksek değer ise çok belirgin bir farkla Menekşe-Ambarlı istasyonundan örneklenen *M.galloprovincialis*'lerde tespit edilmiştir. Yaz döneminde tüm istasyonlarda yüksek değerler gözlenmiş ve özellikle Büyükçekmece ve Menekşe-Ambarlı istasyonlarında birbirine çok yakın TKBS değerleri ölçülmüştür.

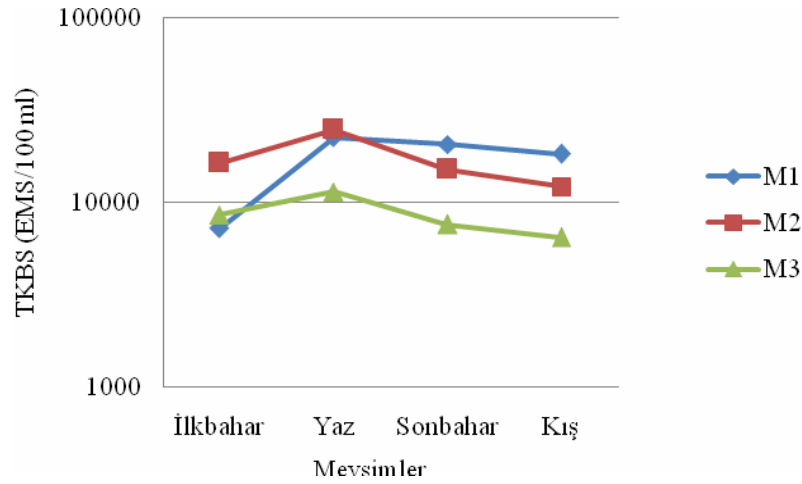
Tablo 4.3. *M.galloprovincialis* örneklerine ait toplam koliform bakteri sayılarının minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin mevsimsel değişimi.

Mevsim	İstasyon	N	TKBS (EMS/100 ml)		
			Minimum	Maksimum	Ortalama
İlkbahar	M1	15	1.600	24.000	7.226
	M2	15	900	110.000	16.393
	M3	15	1.500	29.000	8.526
Yaz	M1	15	1.500	46.000	22.600
	M2	15	400	120.000	24.800
	M3	15	300	29.000	11.400
Sonbahar	M1	15	9.300	46.000	20.640
	M2	15	900	110.000	15.153
	M3	15	1.500	46.000	7.560
Kış	M1	15	1.500	46.000	18.226
	M2	15	1.500	46.000	12.180
	M3	15	600	24.000	6.460

M1: Büyükçekmece, M2: Menekşe-Ambarlı, M3: Rumeli Kavağı.

Şekil 4.6'da verilen istasyonlar arası değişim irdelendiğinde, hava sıcaklığının azaldığı sonbahar ve kış döneminde *M.galloprovincialis*'lerde ölçülen TKBS değerlerinde de azalma olduğu görülmüştür. Mevsim ortalamalarına göre en düşük değer ise ilkbahar döneminde gözlenmiştir. Tek yönlü varyans analizi sonucunda, Büyükçekmece istasyonunda örneklenen *Mytilus galloprovincialis*'lerde, ilkbahar ile yaz ve ilkbahar ile sonbahar arasında ölçülen TKBS değerleri arasındaki mevsimsel farklılığın anlamlı

olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak ortalama TKBS değerleri arasında anlamlı bir mevsimsel farklılık saptanamamıştır ($p>0,05$).

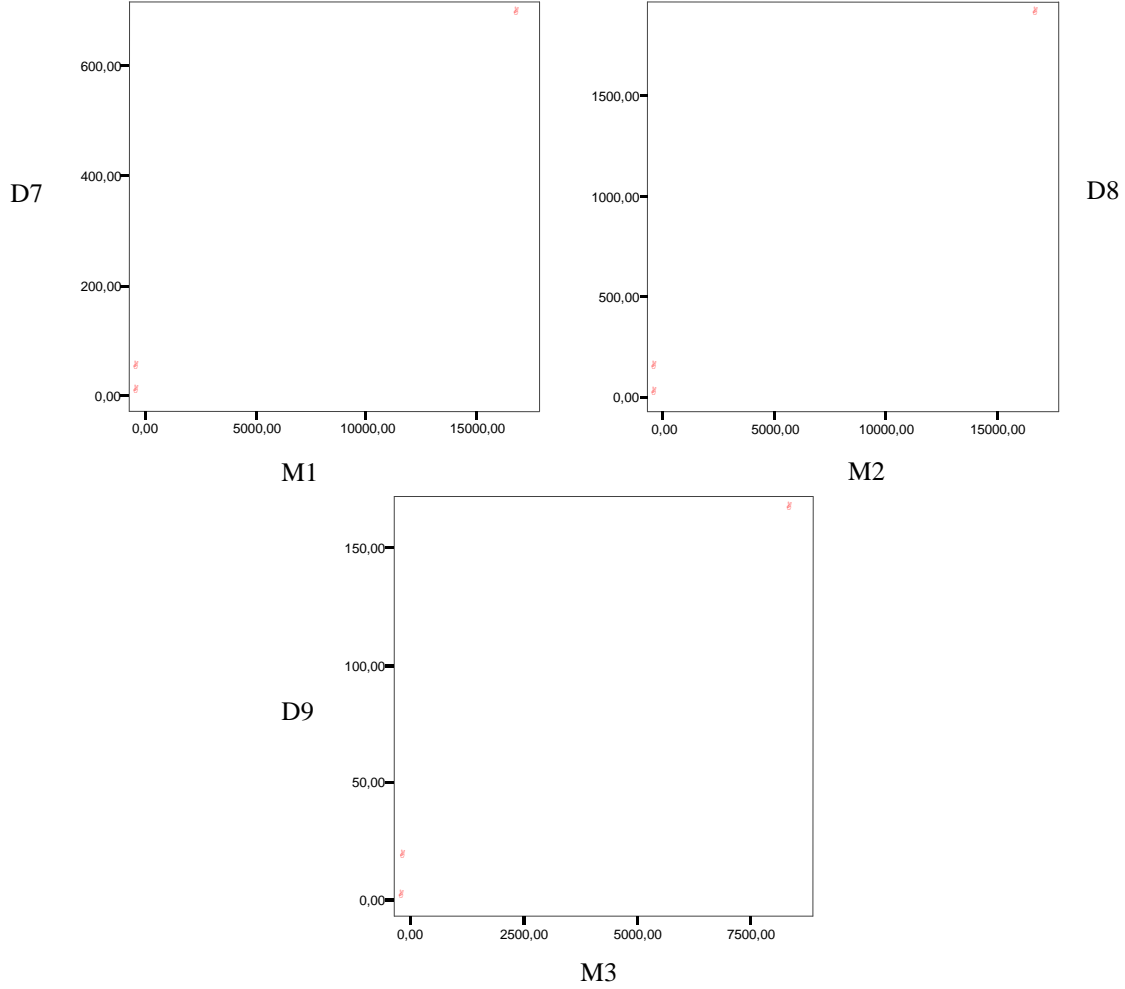


Şekil 4.6. *M. galloprovincialis* örneklerine ait ortalama toplam koliform bakteri sayılarının (TKBS) mevsimsel değişimi. M1: Büyükçekmece, M2: Menekşe-Ambarlı, M3: Rumeli Kavağı

Rumeli Kavağı ve Menekşe-Ambarlı istasyonlarından örneklenen *M. galloprovincialis*'lerde ölçülen TKBS değerlerinin mevsim ortalamaları incelendiğinde, en düşük değer kış döneminde, en yüksek değer ise yaz döneminde tespit edildiği görülmüştür (Şekil 4.6). Büyükçekmece istasyonunda yaz dönemi dışında diğer mevsim değerleri benzerdir. *M. galloprovincialis*'lerde ölçülen yıllık ortalama TKBS değerleri arasındaki istasyonlar arası farklılığın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Büyükçekmece ile Rumeli Kavağı ve Menekşe-Ambarlı ile Rumeli Kavağı istasyonlarından örneklenen *M. galloprovincialis*'lerde ölçülen yıllık ortalama TKBS değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

M. galloprovincialis'lerin bünyelerinde biriktirdikleri toplam koliform bakteri sayısı ile *M. galloprovincialis*'lerin örneklediği deniz suyundaki toplam koliform bakteri sayısı arasındaki ilişki korelasyon analizi değerlendirilmiştir (Şekil 4.7). Analiz sonucuna göre, Büyükçekmece, Menekşe-Ambarlı ve Rumeli Kavağı istasyonlarından örneklenen *M. galloprovincialis* ile *M. galloprovincialis*'in yetiştiği deniz suyunda tespit edilen TKBS değerleri arasında pozitif yönlü kuvvetli korelasyon olduğu belirlenmiş ($r=1,00$;

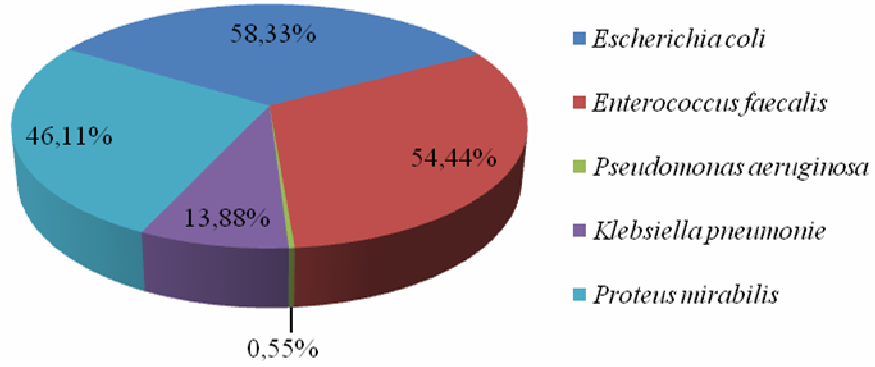
$r=1,00$; $r=0,996$) ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$; $p<0,01$).



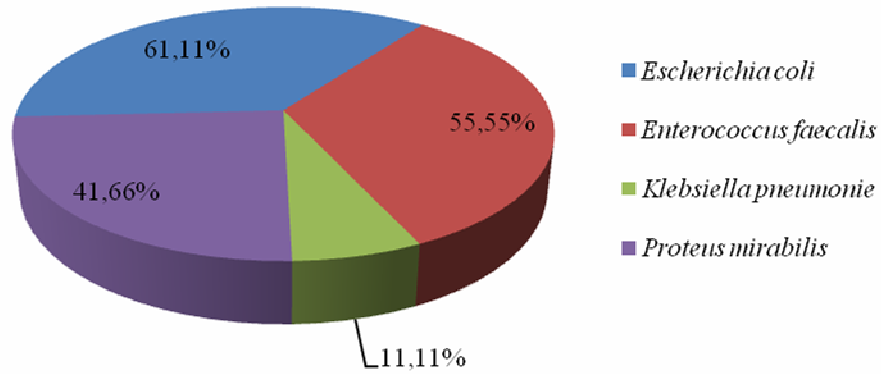
Şekil 4.7. *M.gallopvencialis* ve *M.gallopvencialis*'in yetiştiği deniz suyu örneklerinde tespit edilen toplam koliform bakteri sayısı (TKBS) arasındaki ilişki. M1: Büyükçekmece, M2: Menekşe-Ambarlı, M3: Rumeli Kavağı.

4.3. BAKTERİ İDENTİFİKASYONU

M.gallopvencialis ve deniz suyu örneklerinde identifikasyonu yapılan bakterilerin türe bağlı dağılımları Şekil 4.8 ve 4.9'da gösterilmiştir. Buna göre *M.gallopvencialis* ve deniz suyu örneklerinde sırasıyla %58,33 ve %61,11'lik değerler ile en büyük yoğunluğu *E.coli*'nin oluşturduğu görülmüştür. *E. faecalis* ve *P. mirabilis*, *E.coli*'den sonra yüksek yoğunluğa sahip diğer bakteri türleridir. En düşük yoğunluğa sahip *P.aeruginosa* ise yüzdelik dilimde %1'den az oranda tespit edilmiştir.

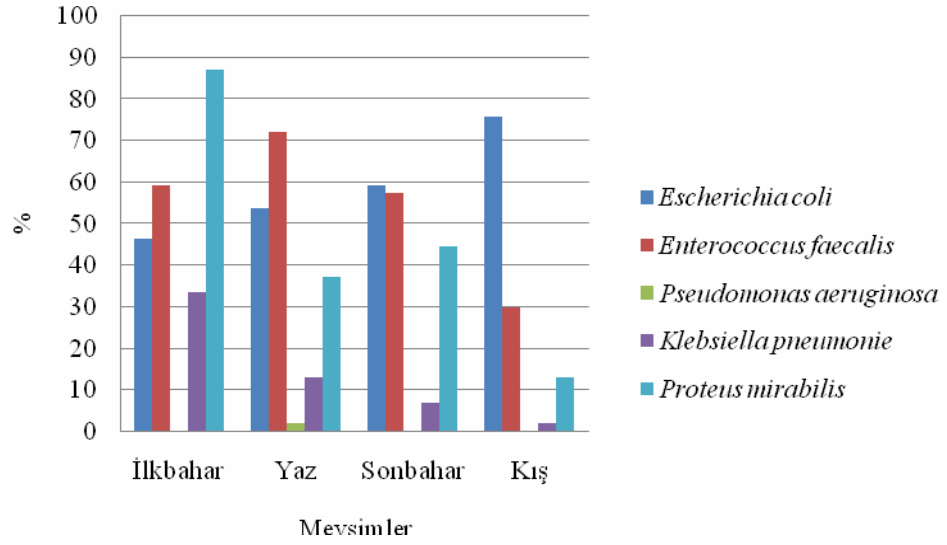


Şekil 4.8. *M. galloprovincialis* örneklerinde tespit edilen bakteri türleri.



Şekil 4.9. Kıyusal su istasyonlarında tespit edilen bakteri türleri.

Deniz suyu sıcaklığının yükseldiği yaz döneminde *E.coli* yoğunluğunda görülen azalmanın aksine ortam koşullarına *E.coli*'den daha dayanıklı olan *E.faecalis*'in oranında görülen artış dikkat çekicidir. Deniz suyu sıcaklıklarının düşmeye başladığı sonbahar ve kış döneminde ise *E.coli* yoğunluğunun arttığı, *E. faecalis*'in azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Çalışma süresince tespit edilen bakteri türlerinin mevsimsel değişimi.

4.4. BİYOKİMYASAL TESTLER

Kromojenik besiyerinden saf olarak izole edilen *E.coli* suşlarının fizyolojik ve fenotipik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan biyokimyasal testlere ait sonuçlar Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Buna göre izole edilen tüm bakterilerin gram negatif, fakültatif anaerob oldukları belirlenmiştir. İzolatların hepsinin sitrat ve üreaz negatif olmalarına karşın indol ve metil kırmızısı pozitif oldukları da saptanmış ayrıca tümünün H_2S negatif oldukları belirlenmiştir.

Tablo 4.4. *E.coli* suşlarının biyokimyasal test sonuçları

Biyokimyasal testler	<i>E.coli</i> spp.
İndol	(+)
Metil Kırmızısı	(+)
Voges Proskauer (VP)	(-)
Sitrat	(-)
Hidrojen Sülfür	(-)
Üre	(-)
Hareket	(+)

4.5. ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI

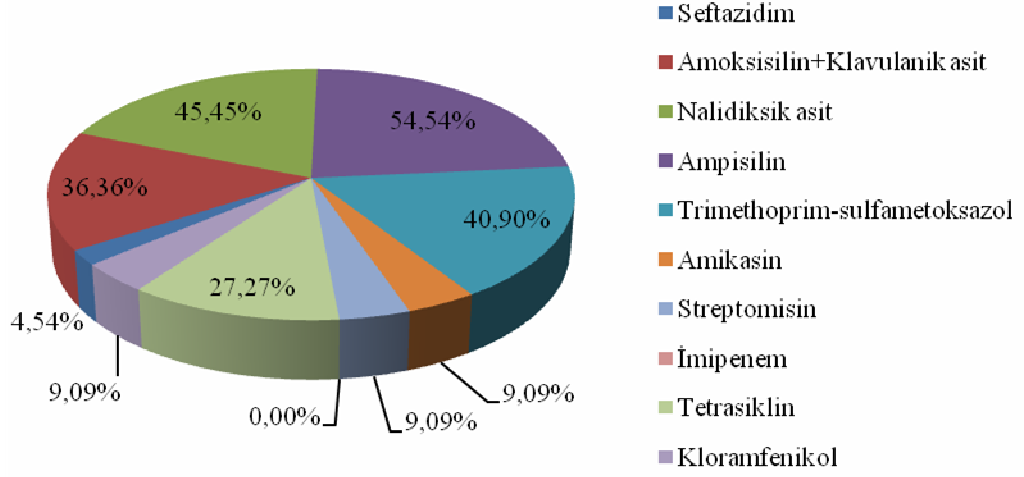
Kıyusal sular ve *Mytilus galloprovincialis* örneklerinden izole edilerek, biyokimyasal testlerle tanımı kesinleşen toplam 127 *E.coli* suşunun 10 farklı antibiyotiğe (ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, amikasin, streptomisin, nalidiksik asit, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, kloramfenikol, imipenem, seftazidim) gösterdikleri duyarlılık oranları Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Buna göre izole edilen *E.coli* suşları bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç göstermiştir.

Tablo 4.5. İzole edilen *E. coli* suşlarına ait antibiyotik duyarlılıkları.

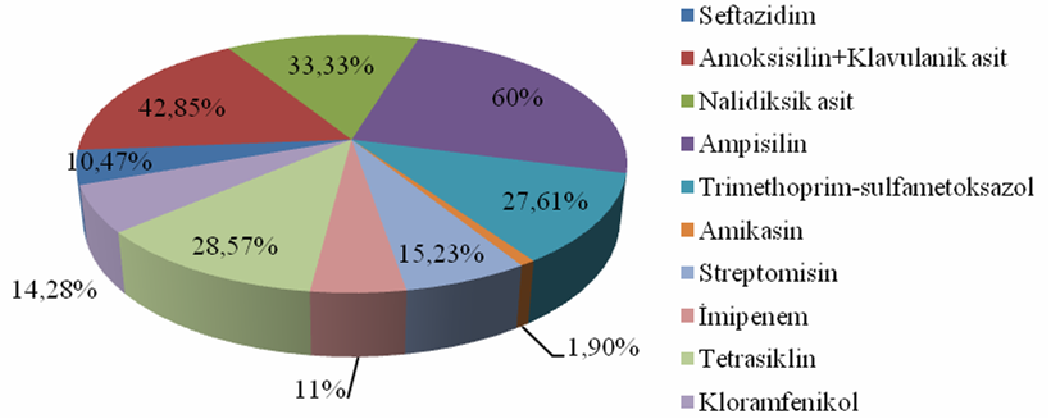
	<i>M.galloprovincialis</i> (n=105)			Kıyusal Su (n=22)			Toplam (n=127)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
CA	11	18	76	1	1	20	12	19	96
	10,47%	17,14%	72,38%	4,54%	4,54%	90,90%	9,44%	14,96%	75,59%
AC	45	16	44	8	7	7	53	23	51
	42,85%	15,23%	41,90%	36,36%	31,81%	31,81%	41,73%	18,11%	40,15%
NA	35	11	59	10	0	12	45	11	71
	33,33%	10,47%	56,19%	45,45%	0%	54,54%	35,43%	8,66%	55,90%
A	63	6	36	12	1	9	75	7	45
	60%	5,71%	34,28%	54,54%	4,54%	40,90%	59,05%	5,51%	35,43%
CO	29	1	75	9	0	13	38	1	88
	27,61%	0,95%	71,42%	40,90%	0%	59,09%	29,92%	0,78%	69,29%
AK	2	10	93	2	1	19	4	11	112
	1,90%	9,52%	88,57%	9,09%	4,54%	86,36%	3,14%	8,66%	88,18%
S	16	11	78	2	4	16	18	17	92
	15,23%	10,47%	74,28%	9,09%	18,18%	72,72%	14,17%	13,38%	72,44%
I	12	1	92	0	0	22	12	1	114
	11,42%	0,95%	87,61%	0%	0%	100%	9,44%	0,78%	89,76%
T	30	25	50	6	4	12	36	29	62
	28,57%	23,80%	47,61%	27,27%	18,18%	54,54%	28,34%	22,83%	48,81%
C	15	3	87	2	2	18	17	5	105
	14,28%	2,85%	82,85%	9,09%	9,09%	81,81%	13,38%	3,93%	82,67%

CA: Seftazidim; AC: Amoksisilin; NA: Nalidiksik asit; A: Ampisilin; CO: Trimetoprim-sülfametoksazol; AK: Amikasin; S: Streptomisin; I: İmipenem; T: Tetrasiklin; C: Kloramfenikol; R: Dirençli, I: Orta derecede duyarlı, S: Duyarlı

Örnekleme süresince kıyısal sular ve *M.gallopvıncialis* örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri Şekil 4.11-12’de gösterilmiştir. Kıyısal su istasyonlarında en yüksek direnç oranı ampisilinde (%54,54), en düşük direnç oranı seftazidimde (%4,54); *M.gallopvıncialis* örneklerinde en yüksek direnç oranı ampisilinde (%60), en düşük direnç oranı ise amikasinde (%1,90) tespit edilmiştir. Direnç yüzdeleri değerlendirildiğinde, *M.gallopvıncialis* örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında imipenem antibiyotiğine karşı direnç (%11,42) saptanırken, kıyısal sulardan izole edilen *E.coli* suşlarında imipenem antibiyotiğine karşı direnç tespit edilmemiştir.



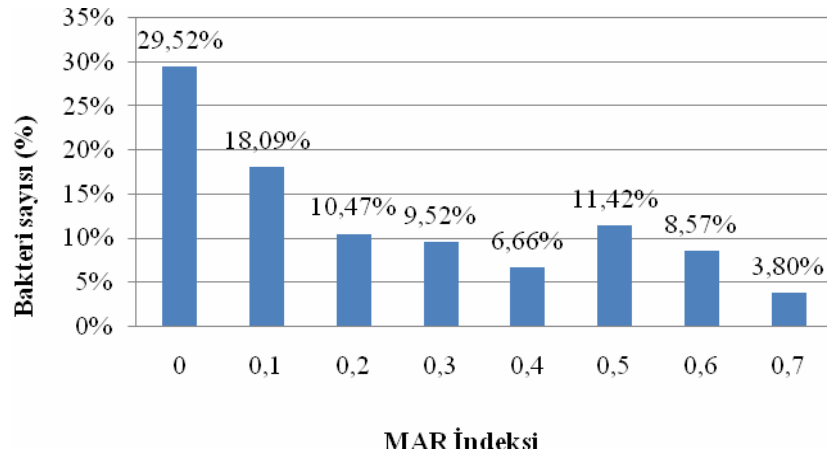
Şekil 4.11. Kıyısal su istasyonlarına ait enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri.



Şekil 4.12. *M.gallopvncialis* örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri.

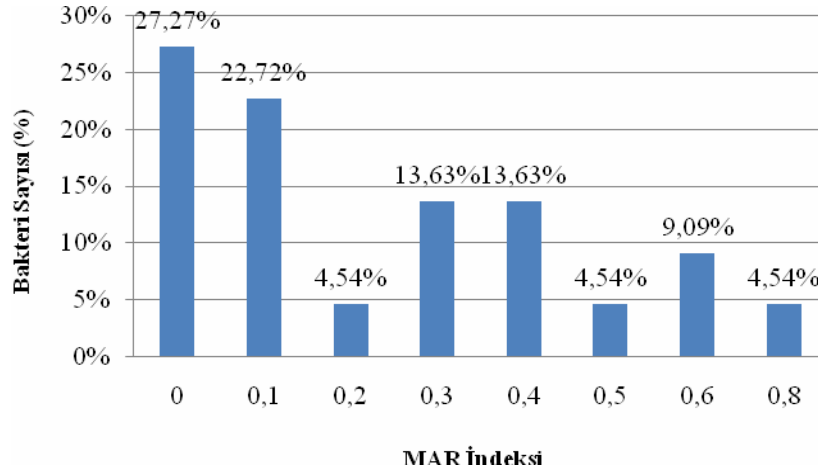
4.6. ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİ (MAR) İNDEKSİ

Kıyısal su istasyonları ile *M.gallopvncialis* örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin Çoklu Antibiyotik Dirençliliği (MAR) indeksleri dağılımı Şekil 4.13 ve 4.14'de gösterilmiştir. *M.gallopvncialis* örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında 0,2 ve daha yüksek MAR indeksine sahip bakteri yüzdesi %50,44'tür. İzole edilen bakterilerin %10,47'sinin MAR indeksi 0,2; %9,52'sinin 0,3; %6,66'sının 0,4; %11,42'sinin 0,5; %8,57'sinin 0,6 ve %3,8'sinin ise 0,7 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.13. *M.gallopvncialis* örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin istasyon farkı gözetilmeksizin çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksleri dağılımı.

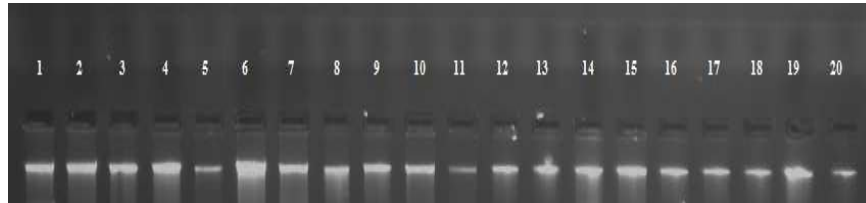
Kıyısal su örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında ise 0,2 ve daha yüksek MAR indeksine sahip bakteri yüzdesi %49,97'dir. İzole edilen bakterilerin %4,54'ünün MAR indeksi 0,2; %13,63'ünün 0,3; %13,63'ünün 0,4; %4,54'ünün 0,5; %9,09'unun 0,6 ve %4,54'ünün ise 0,8 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.14. Kıyısal su istasyonlarına ait enterik bakterilerin istasyon farkı gözlemlenmeden çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksleri dağılımı.

4.7. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen *E.coli* suşlarına ait DNA izolatları ultraviyole ışık altında parlak ve net bantlar halinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *E.coli* suşlarına ait genomik DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

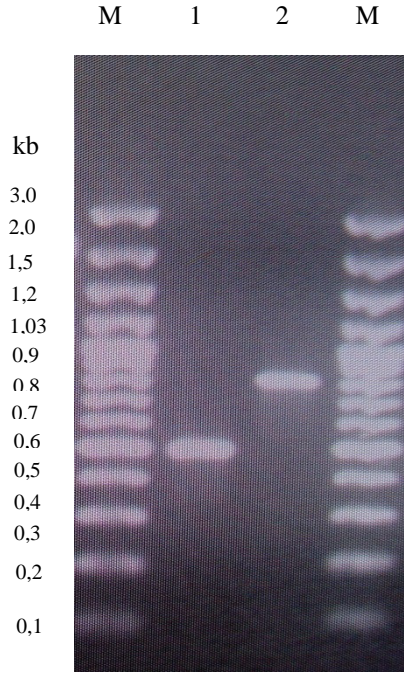
E.coli suşlarından izole edilen genomik DNA molekülünün spektrofotometrede ölçülen konsantrasyon (ng/ μ L) ve saflık ($OD_{260/280}$) değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Buna göre $OD_{260/280}$ değeri 1,8 ile 2,0 arasındaki değerlere sahip olan DNA'ların yeterli saflıkta izole edildiği belirlenmiştir.

Tablo 4.6. *E.coli* suşlarına ait genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek Kodu	OD260/280	DNA Miktarı (ng/µL)	Örnek Kodu	OD260/280	DNA Miktarı (ng/µL)	Örnek Kodu	OD260/280	DNA Miktarı (ng/µL)
M102Y10	1,91	19,142	M204S10	2,44	12,154	M307S10	1,77	17,973
M113Y10	2,043	14,338	M205S10	2,093	9,085	M308S10	2,107	5,913
M115Y10	2,078	10,779	M206S10	2,054	11,581	M309S10	1,781	13,155
M103S10	2,13	22,913	M209S10	2,021	9,633	M311S10	1,978	9,05
M105S10	2,076	16,556	M210S10	2,026	30,46	M313S10	1,957	22,847
M107S10	2,074	33,967	M212S10	2,053	11,782	M115K11	2,043	14,338
M108S10	1,774	11,154	M213S10	2,093	9,085	M314K11	1,94	16,292
M112S10	2,093	9,085	M214S10	1,778	4,811	M302İ11	1,975	15,729
M114S10	1,849	19,931	M215S10	1,826	4,23	M304İ11	1,905	20,165
M115S10	1,958	18,781	M201K11	1,946	25,451	M306İ11	2,061	13,737
M101K11	1,781	13,155	M202K11	2,074	33,967	M307İ11	1,934	17,897
M102K11	2,021	9,806	M203K11	2,043	52,829	M310İ11	1,854	16,47
M103K11	1,987	15,558	M204K11	1,881	18,981	M315İ11	2,101	63,03
M104K11	1,774	11,091	M208K11	1,967	35,758	D101K11	1,824	16,758
M105K11	2,074	5,594	M209K11	1,91	19,142	D101İ11	2,078	10,779
M108K11	2,045	13,728	M211K11	2,056	14,747	D201Y10	1,957	23,083
M109K11	1,951	16,247	M212K11	2,008	24,343	D201K11	2,421	4,579
M110K11	1,978	9,05	M213K11	2,161	20,144	D301S10	2,296	18,567
M101İ11	1,729	8,262	M215K11	1,857	10,473	D301K11	1,791	7,671
M103İ11	2	5,881	M201İ11	1,383	6,494	D301İ11	2,316	8,784
M111İ11	1,882	6,508	M202İ11	3,125	5,06	D401S10	1,905	8,087
M112İ11	1,85	3,735	M207İ11	2,043	14,338	D401K11	1,781	5,754
M114İ11	1,846	4,778	M211İ11	1,857	22,283	D401İ11	1,811	13,535
M201Y10	1,132	4,296	M213İ11	1,957	23,083	D501S10	1,875	15,164
M202Y10	1,857	10,473	M214İ11	2,103	8,338	D501K11	1,609	10,29
M204Y10	1,934	17,897	M301Y10	1,804	20,421	D601K11	1,731	16,292
M205Y10	1,857	10,473	M303Y10	2,032	19,293	D601İ11	2,13	22,913
M207Y10	2,174	23,61	M306Y10	1,857	22,441	D701S10	1,944	17,77
M208Y10	2,074	33,967	M307Y10	1,895	21,501	D701K11	1,875	12,143
M209Y10	1,865	25,219	M308Y10	1,809	20,04	D801K11	1,816	22,929
M210Y10	2,061	13,737	M309Y10	2,211	24,363	D801İ11	2,316	8,784
M214Y10	2,093	9,085	M312Y10	1,846	17,897	D901K11	1,132	4,296
M201S10	2,8	9,822	M305S10	2,031	13,182	D901İ11	1,864	26,348
M202S10	1,742	10,929	M306S10	2,053	11,782			

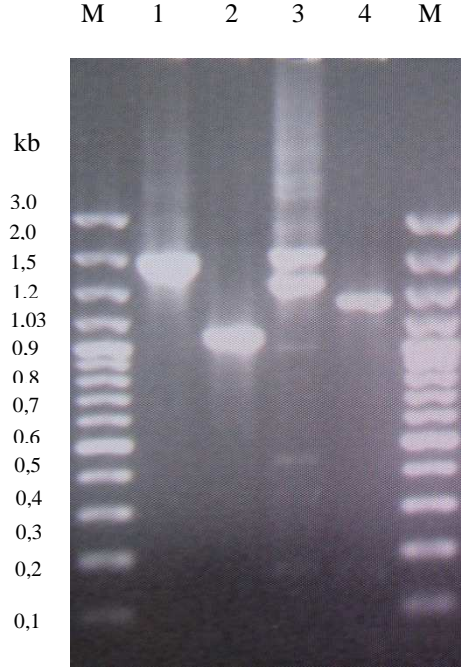
4.8. ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ GENLERİNİN PCR İLE BELİRLENMESİ

Kıyusal su ve *M.gallopvencialis* örneklerinden izole edilen 101 *E. coli* suşunda, sınıf 1 ve sınıf 2 integraz (*intI-1* ve *intI-2*) genlerine spesifik primerler kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 55 *E. coli* suşunda *int I-1* geni (0,5 kb), 60 *E.coli* suşunda ise *int I-2* geni (0,9 kb) belirlenmiştir. Şekil 4.16’da *intI-1* ve *intI-2* geni PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforegramları gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Sınıf 1 (*intI-1*) ve sınıf 2 (*intI-2*) integraz genleri PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı. M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA); 1: int I-1 (*E. coli* M115Y10); 2: int I-2 (*E. coli* M307Y10).

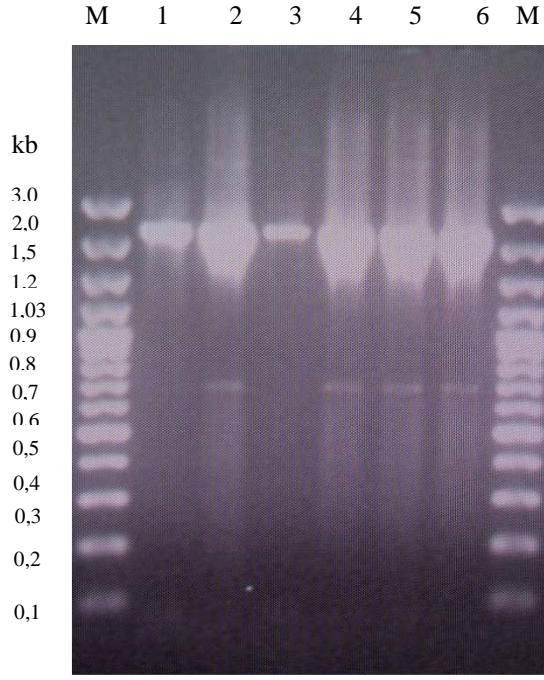
intI-1 geni tespit edilen *E.coli* suşlarının 5'CS-3'CS primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR analizleri sonucunda, 4 *E. coli* suşunda sınıf 1 integron (1,2-2,0 kb) gözlenmiştir. Antimikrobiyal direnç gen kasetlerini taşıyan sınıf 1 integronların agaroz jel elektroforegramları Şekil 4.17’de gösterilmektedir.



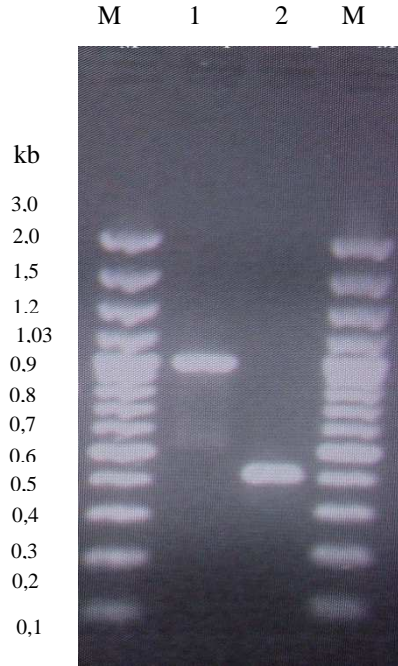
Şekil 4.17: Sınıf 1 integron PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.
M: 100 bp DNA ladder (Fermentas,USA); 1: M115Y10 (*E. coli*); 2: D701K11 (*E. coli*); 3: M214S10 (*E. coli*); 4: M211İ11 (*E.coli*).

Sınıf 2 integraz geni taşıyan *E. coli* suşlarının hep51-hep74 primerleri ile gerçekleştirilen PCR analizleri sonucunda, 6 *E. coli* suşunda antimikrobiyal direnç gen kasetlerini taşıyan sınıf 2 integron (2,1 kb) tespit edilmiştir (Şekil 4.18).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri ile tetrasikline dirençli (%28,34) ve orta derecede duyarlı (%23,62) olduğu tespit edilen *E. coli* suşlarının, tetrasiklin dirençliliğinden sorumlu *tet(A)* ve *tet(B)* genlerine spesifik primerler ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda tetrasikline dirençli *E. coli* suşlarının 7 tanesinde *tet(A)* geni, 13 tanesinde *tet(B)* geni gözlenmiştir. Tetrasikline orta derecede duyarlı *E.coli* suşlarının 5 tanesinde *tet(A)* geni, 3 tanesinde ise *tet(B)* geni tespit edilmiştir. Analiz edilen tüm *E. coli* suşları içerisinde tetrasikline orta derecede duyarlı olan sadece M214S10 suşunda hem *tet(A)* hem *tet(B)* geninin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19). *tet(A)* ve *tet(B)* genlerinin baz büyüklükleri sırasıyla 0,9 kb ve 0,4 kb olarak belirlenmiştir.



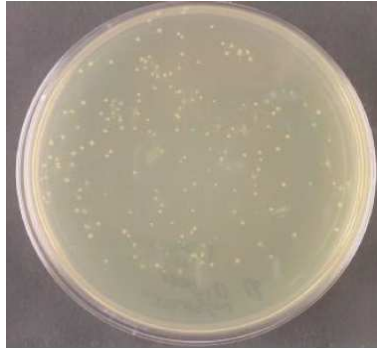
Şekil 4.18: Sınıf 2 integron PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.
M: 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA); **1:** M307Y10 (*E. coli*); **2:** D201Y10 (*E. coli*);
3: M206S10 (*E. coli*); **4:** M205Y10 (*E. coli*); **5:** M207Y10 (*E. coli*); **6:** M308Y10 (*E. coli*).



Şekil 4.19: Tetrasiklin direnç genleri PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı.
M: 100 bp DNA ladder (Vivantis, USA); **1:** *tet(A)* (*E. coli* M214S10); **2:** *tet(B)* (*E. coli* M214S10).

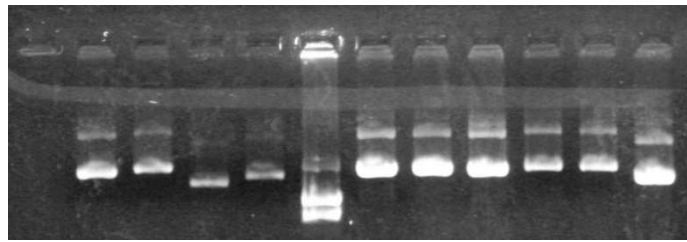
4.9. SINIF 1 VE SINIF 2 İNTEGRONLARIN KLONLANMASI

Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanması ile elde edilen mavi ve beyaz kolonilerden, integronları taşıyan rekombinant plazmidleri içeren beyaz koloniler klonlamanın gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 4.20). Beyaz kolonilerden rekombinant plazmidlerin izolasyonu ile elde edilen plazmid DNA'ları ultraviyole ışık altında parlak ve net bantlar halinde gözlenmiştir. Şekil 4.21'deki bantlar değerlendirildiğinde, beyaz kolonilerden izole edilen plazmid DNA bantlarının, içerdikleri integronlardan dolayı, sadece plazmid vektörünü taşıyan mavi kolonilerden izole edilen plazmid DNA bantlarından daha büyük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.20: Mavi ve beyaz kolonilerin görünümü.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

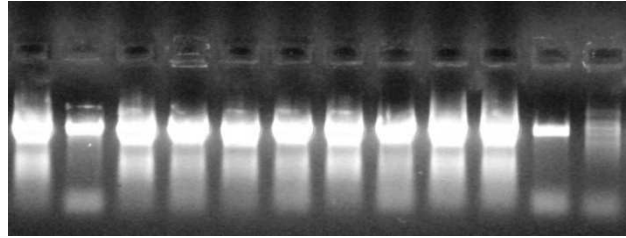


Şekil 4.21: Sınıf 1 ve sınıf 2 integronları taşıyan rekombinant plazmid DNA'ların agaroz jel elektroforegramı. 1: Negatif Kontrol; 2: M115Y10 (Sınıf 1 integron); 3: M205Y10 (Sınıf 2 integron); 4:D701K11 (Sınıf 1 integron); 5: M214S10 (Sınıf 1 integron); 6: Pozitif Kontrol (Mavi koloni); 7:M307Y10 (Sınıf 2 integron); 8: D201Y10 (Sınıf 2 integron); 9: M206S10 (Sınıf 2 integron); 10:M207Y10 (Sınıf 2 integron); 11: M308Y10 (Sınıf 2 integron); 12:M211I11 (Sınıf 1 integron).

Klonlanan genleri içeren koloniler, mavi ve beyaz kolonilerin seçimi ile belirlenmiş olmasına rağmen, beyaz kolonilerin sınıf 1 ve sınıf 2 integronları içerip içermediğini

kesin olarak belirleyerek dizi analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla seçilen beyaz kolonilerden izole edilen rekombinant plazmidlerin, integronlara spesifik primerler kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda agaroz jel elektroforezinde rekombinant plazmidlerden elde edilen amplifikasyon ürünleri, pozitif kontrol olarak *E.coli* genomik DNA'larından elde edilen amplifikasyon ürünlerinin bant büyüklükleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.22). Rekombinant plazmidler pozitif kontrol ile aynı büyüklükte bantlara sahip olduklarından, plazmidlerin sınıf 1 ve sınıf 2 integron açısından pozitif oldukları belirlenmiştir. İntegron gen kasetlerinin dizi analizleri için pozitif olarak saptanan rekombinant plazmidler seçilmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Şekil 4.22: İntegronları içeren rekombinant plazmidlerin amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforegramı. 1,3,5,7,9,11: Rekombinant plazmidlerin amplifikasyon ürünleri. 2,4,6,8,10,12: *E. coli* genomik DNA'larından elde edilen amplifikasyon ürünleri (Pozitif kontrol).

4.10. İNTEGRON GEN KASETLERİNİN DİZİ ANALİZİ İLE KARAKTERİZASYONU

Rekombinant plazmidlerin PCR analizleri sonucunda, sınıf 1 ve sınıf 2 integronları taşıdığı kesin olarak belirlenen plazmidlerden bir tanesi seçilerek, integronların içerdiği antimikrobiyal direnç gen kasetlerinin belirlenmesi amacıyla dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi ile belirlenen *E.coli* suşlarının taşıdığı gen kasetleri ve antibiyotik direnç profilleri Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Kıyusal su ve *M.gallopvencialis* örneklerinden izole edilen antibiyotiklere dirençli *E.coli* suşlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonları.

<i>E.coli</i> Suş No	Direnç Fenotipi	İntegraz Tipi	İntegron Tipi	Amplikon Büyüklüğü	Gen Kaset Sırası	<i>tet</i> Gen Tipi
M115Y10	AC, NA, A, CO, C	<i>intI-1</i>	Sınıf 1	1,9 kb	<i>dfrA12-aadA2</i>	(-)
M205Y10	NA, A, CO, T	<i>intI-2</i>	Sınıf 2	2,1 kb	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	<i>tet(B)</i>
M207Y10	AC, NA, A, CO, T	<i>intI-2</i>	Sınıf 2	2,1 kb	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	<i>tet(B)</i>
M206S10	AC, A,T	<i>intI-2</i>	Sınıf 2	2,1 kb	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	<i>tet(B)</i>
M214S10	AC, A,T	<i>intI-1</i>	Sınıf 1	2,0 kb	<i>dfrA1-aadA1</i>	<i>tet(A), tet(B)</i>
M211İ11	C	<i>intI-1</i>	Sınıf 1	1,5 kb	<i>bla_{oxa-2}</i>	(-)
M307Y10	AC, NA, A, CO, S,T,C	<i>intI-2</i>	Sınıf 2	2,1 kb	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	<i>tet(B)</i>
M308Y10	AC, NA, A, CO, S,T,C	<i>intI-2</i>	Sınıf 2	2,1 kb	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	<i>tet(B)</i>
D201Y10	AC, NA, A,CO, T	<i>intI-2</i>	Sınıf 2	2,1 kb	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	<i>tet(A)</i>
D701K11	S	<i>intI-1</i>	Sınıf 1	1,2 kb	<i>aadA5</i>	(-)

CA: Seftazidim; AC: Amoksisilin; NA: Nalidiksik asit; A: Ampisilin; CO: Trimethoprim-sulfametoksazol; AK: Amikasin; S: Streptomisin; I: İmipenem; T: Tetrasiklin; C: Kloramfenikol

M115Y10 kodlu *E. coli* suşunda 1,9 kb büyüklüğünde sınıf 1 integron saptanmıştır. Sınıf 1 integronun DNA dizi analizi ile 2 gen kaseti taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Buna göre gen kasetlerinden ilki *dfrA12* geni olup dihidrofolat redüktaz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim trimetoprime direnç sağlamaktadır. İkinci gen kaseti *aadA2* olarak tespit edilmiştir. Bu gen aminoglikozid 3''-(9)-adeniltransferaz enzimini kodlamaktadır ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun gen kaset sırası (*dfrA12-aadA2*) daha önceden rapor edilmiş *Klebsiella pneumoniae* (Genbank giriş numarası: GU585907) suşunda tespit edilenlerle % 100 benzerlik göstermiştir.

M214S10 kodlu *E. coli* suşunda tespit edilen 2,0 kb'lık sınıf 1 integronun DNA dizi analizi ile 2 gen kaseti taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Buna göre gen kasetlerinden ilki *dfrA1* geni olup dihidrofolat redüktaz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim trimetoprime direnç sağlamaktadır. İkinci gen kaseti, aminoglikozid 3''-(9)-adeniltransferaz enzimini kodlayan *aadA1* geni olarak tespit edilmiştir. Bu gen streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun gen kaset sırası

(*dfrA1-aadA1*) daha önceden rapor edilmiş *Klebsiella pneumoniae* (Genbank giriş numarası: FR748153) suşunda tespit edilenlerle % 100 benzerlik göstermiştir.

D701K11 kodlu *E. coli* suşunda 1,2 kb büyüklüğünde sınıf 1 integron saptanmıştır. Sınıf 1 integronun DNA dizi analizi ile sadece *aadA5* gen kasetini taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). *aadA5* geni aminoglikozid 3"-(9)-adeniltransferaz enzimini kodlamaktadır ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun gen kaset sırası (*aadA5*) daha önceden rapor edilmiş *Aeromonas hydrophila* (Genbank giriş numarası: FM877481) suşunda tespit edilenlerle % 100 benzerlik göstermiştir.

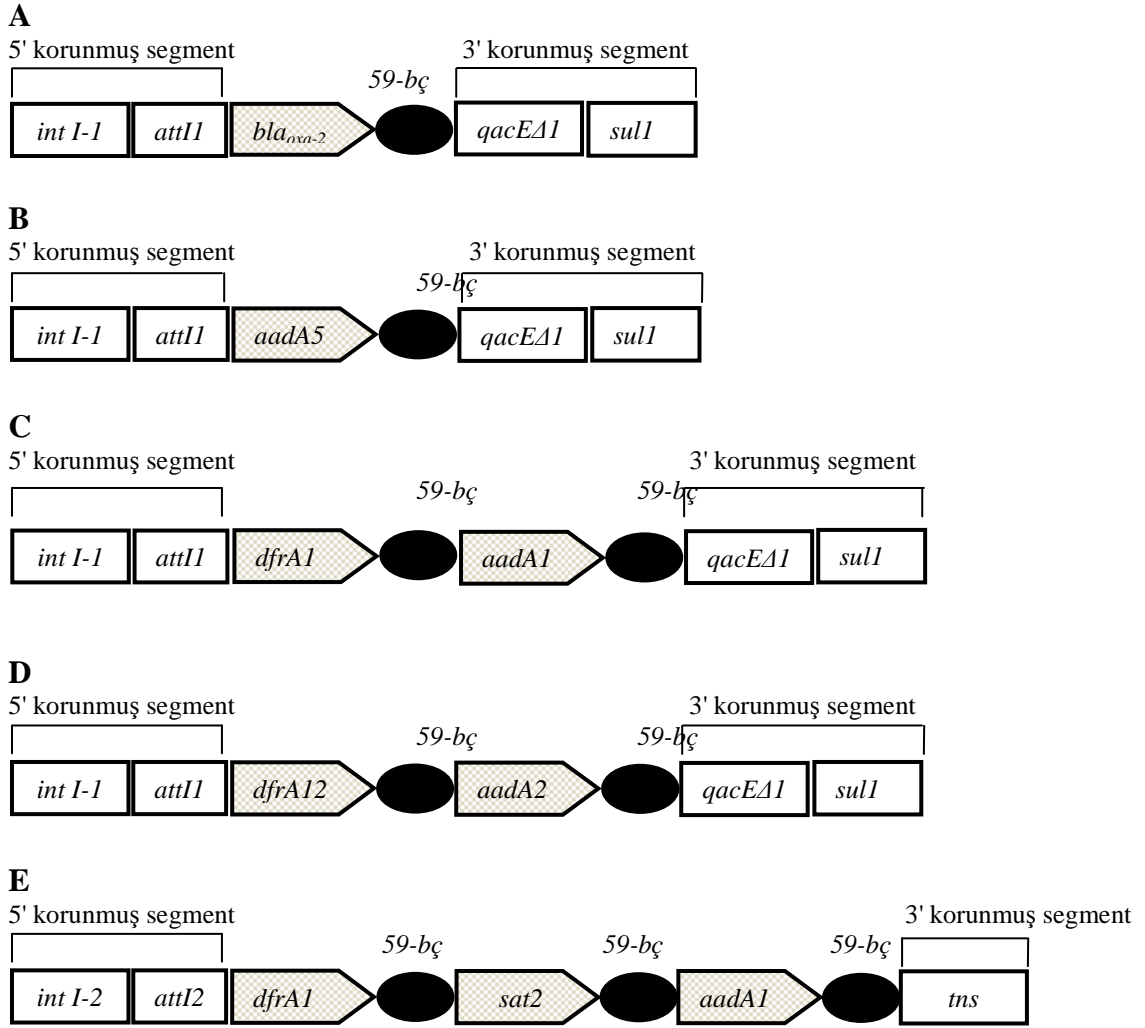
M211İ11 kodlu *E. coli* suşunda 1,5 kb büyüklüğünde sınıf 1 integron saptanmıştır. Sınıf 1 integronun DNA dizi analizi ile tek gen kaseti taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Bu gen kaseti *bla_{oxa-2}* olup ampisiline ve 1. kuşak sefalosporinlere direnç sağlayan geniş spektrumlu bir beta laktamaz kodlamaktadır. Bu genin yakınındaki bölgede fonksiyonu bilinmeyen hypothetical proteini sentezleyen *orfD* geni bulunmaktadır. Sınıf 1 integron gen kaset sırası (*bla_{oxa-2}-orfD*) daha önceden rapor edilmiş *Pseudomonas putida* (Genbank giriş numarası: FM179467) suşunda tespit edilenlerle % 100 benzerlik göstermiştir.

M206S10 kodlu *E. coli* suşunda 2,1 kb büyüklüğünde sınıf 2 integron saptanmıştır. Sınıf 2 integronun DNA dizi analizi ile 3 gen kaseti taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Buna göre gen kasetlerinden ilki *dfrA1* geni olup dihidrofolat redüktaz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim trimetoprime direnç sağlamaktadır. İkinci gen kaseti streptotrisin asetiltransferaz enzimini kodlayan *sat2* genidir ve streptotrisine direnç sağlamaktadır. Üçüncü gen kaseti ise *aadA1* olarak tespit edilmiştir. Bu gen aminoglikozid 3"-(9)-adeniltransferaz enzimini kodlamaktadır ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun gen kaset sırası (*dfrA1-sat2-aadA1*) daha önceden rapor edilmiş *Acinetobacter baumannii* (Genbank giriş numarası: DQ176450) suşunda tespit edilenlerle % 100 benzerlik göstermiştir.

M307Y10 (2,1 kb), M207Y10 (2,1 kb), M308Y10 (2,1 kb) ve D201Y10 (2,1 kb) kodlu *E. coli* suşlarında 3 gen kaseti taşıyan sınıf 2 integronlar saptanmıştır (Şekil 4.23). Buna göre gen kasetlerinden ilki *dfrA1* geni olup dihidrofolat redüktaz enzimini

kodlamaktadır. Bu enzim trimetoprime direnç sağlamaktadır. İkinci gen kaseti streptotrisin asetiltransferaz enzimini kodlayan *sat2* genidir ve streptotrisine direnç sağlamaktadır. Üçüncü gen kaseti ise *aadA1* olarak tespit edilmiştir. Bu gen aminoglikozid 3''-(9)-adeniltransferaz enzimini kodlamaktadır ve streptomisin/ spektinomisine direnç sağlamaktadır. *E. coli* suşlarında tespit edilen integronların gen kaset sırası (*dfrA1-sat2-aadA1*) daha önceden rapor edilmiş *Eschericia coli* (Genbank giriş numarası: HM439239) suşunda tespit edilenlerle sırasıyla %99 (M307Y10) ve %100 (M207Y10, M308Y10 ve D201Y10) benzerlik göstermiştir.

M205Y10 kodlu *E. coli* suşunda 2,1 kb'lık sınıf 2 integronun DNA dizi analizi ile 3 gen kaseti taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Buna göre gen kasetlerinden ilki dihidrofolat redüktaz enzimini kodlayan *dfrA1* geni olup trimetoprime direnç sağlamaktadır. İkinci gen kaseti streptotrisin asetiltransferaz enzimini kodlayan *sat2* genidir ve streptotrisine direnç sağlamaktadır. Üçüncü gen kaseti ise *aadA1* olarak tespit edilmiştir. Bu gen aminoglikozid 3''-(9)-adeniltransferaz enzimini kodlamaktadır ve streptomisin/ spektinomisine direnç sağlamaktadır. Bu integronun gen kaset sırası (*dfrA1-sat2-aadA1*) daha önceden rapor edilmiş *Acinetobacter baumannii* (Genbank giriş numarası: FJ785525) suşunda tespit edilenlerle %100 benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.23: Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların taşıdığı gen kaset sıralarının şematik gösterimi. *intI-1*: Sınıf 1 integraz geni; *intI-2*: Sınıf 2 integraz geni; *attI*: Rekombinasyon bölgesi; *qacEΔ1*: Kuarterner amonyum direnç geni; *sulI*: Sülfonamid direnç geni; **59-bç**: 50- baz çifti elemanları (*attC*); *tns*: Tn7 transpozisyon geni. **A**: M211111 (Sınıf 1 integron); **B**: D701K11 (Sınıf 1 integron); **C**: M214S10 (Sınıf 1 integron); **D**: M115Y10 (Sınıf 1 integron); **E**: M206S10; M205Y10; M207Y10; M308Y10; M307Y10; D201Y10 (Sınıf 2 integron).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmasında, İstanbul Güneybatı sahilinde 6 farklı istasyondan deniz suyu örnekleri ile İstanbul Avrupa Yakasında 3 farklı istasyondan *Mytilus galloprovincialis* ile *M.galloprovincialis*'in yetiştiği deniz suyu örnekleri toplanmıştır. Mevsimsel olarak alınan örneklerde, bakteriyolojik kirliliği belirlemek amacıyla toplam koliform bakteri sayımı yapılmış ve örneklerden izole edilen *E.coli* suşların antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. *E.coli* suşlarında, *intI-1*, *intI-2*, *tet(A)*, *tet(B)* direnç genleri ile sınıf 1 ve sınıf 2 integronların varlığı araştırılarak, her bir integronun taşıdığı antibiyotik direnç genleri dizi analizi ile belirlenmiştir.

Örnekleme süresince, bütün istasyonlardan alınan örnekleri, toplam koliform bakteri değerleri açısından genel olarak tanımlamak gerekirse, Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği sınır değerleri ile karşılaştırmak uygun olur. Kıyısularda toplam koliform bakteri sayısının 7×10^1 - $>11 \times 10^3$ EMS/100ml arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 4.2). Yapılan bu çalışmada, Rumeli Kavağı istasyonu dışında, su kalitesinin genellikle II. sınıf statüsünde olduğu belirlenmiştir. İstanbul'da daha önce yapılan çalışmalar da sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir (Karabulut E. 1999). Erginöz ve ark. (1990) kanalizasyon ile kirlenmenin Marmara Denizi'nde önemli bir yer tuttuğuna ve hemen hemen her yerde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

İstasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında, en yüksek değerler Menekşe-Küçükçekmece Bağlantı Noktası'nda tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bu istasyonda ölçülen toplam koliform bakteri değeri $>11 \times 10^3$ EMS/100ml olup, çalışma boyunca ölçülen en yüksek değerlerden biridir. Küçükçekmece göl sularının bu alana akıyor olması, kıyılarda bulunan balıkçı tekneleri ve balık restoranlarının atıkları ile kirlenmesi ve aynı zamanda sahilin plaj olarak kullanımının bu istasyonda yüksek değerler çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir.

M.galloprovincialis'lerin büyüme oranını sıcaklık, tuzluluk, derinlik ve beslenme gibi faktörler etkilemektedir (Bayne B.L. 1976). *M.galloprovincialis*'lerde toplam koliform bakteri sayılarının hava sıcaklığının azaldığı kış döneminde azaldığı, sıcaklığın en yüksek değerlere ulaştığı yaz döneminde ise artış gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.6).

Fekal koliform bakterilerin ilkbahar ve yaz döneminde *M.gallopvncialis*'lerde artışının, *M.gallopvncialis*'in üremesiyle bağlantılı olduğu ve üreme döneminde biyolojik aktiviteleri artan *M.gallopvncialis*'lerin, deniz suyundan bol süzme yaparak daha çok beslendikleri düşünülmektedir. Bu durum midyelerin bünyesinde fekal koliform bakterilerin artmasına ve midyelerin bakteriyolojik açıdan kirlenmelerine neden olmuştur. Elde edilen veriler, daha önce yapılan çalışmalarla da benzerlik göstermektedir (Solic M. ve ark.1999, Sonier R. ve ark. 2008, Stabili ve ark. 2005).

Mytilus gallopvncialis'lerde toplam koliform bakteri sayısı 3×10^2 EMS/100 ml ile 12×10^4 EMS/100 ml gibi çok geniş bir aralıkta ölçülmüştür (Tablo 4.3). *M.gallopvncialis*'in deniz suyundan filtre ederek bünyelerinde biriktirdikleri koliform bakteri değerleri, deniz suyundakinden çok daha yüksek miktarlarda tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bu durum midyelerin filtrasyon için gerekli optimum koşulların var olması ve deniz suyunda bulunan besin maddeleri ile birlikte her türlü bakteri, virüs, kimyasal ve toksin gibi kirlenici maddeleri de hızlı bir şekilde akümüle ederek bünyelerinde biriktirmesi ile açıklanabilir. Çalışma bulguları Roslev P. ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışma ile de desteklenmiştir.

Su Ürünleri Yönetmeliği'ne göre çift kabuklu yumuşakçalarda intervalvular sıvıda ve ette tespit edilen fekal koliform miktarının 300 EMS/100g'dan fazla olmaması gerektiği belirtilmiştir (Resmi Gazete Sayı: 22223. 1995). Çalışma sonuçlarımızda da görüldüğü gibi, *M.gallopvncialis*'ler yıl boyunca yüksek düzeyde bakteri (3×10^2 - 12×10^4 EMS/100ml) biriktirmiştir (Tablo 4.3) . İçme suyu ve gıdalarda fekal koliform bakteri varlığına yönetmeliklerce izin verilmediğinden, yüksek düzeyde antibiyotiklere dirençli fekal koliform bakteri biriktiren *M.gallopvncialis*'lerin gıda olarak tüketilmelerinin insan sağlığı açısından ciddi boyutta tehlike oluşturduğu ortadadır. Normanno G. ve arkadaşları (2006) da yaptıkları çalışma ile *M.gallopvncialis*'lerin gıda olarak tüketiminin fekal koliform bakteri, *E.coli*, *Salmonella* ve *Vibrio* kaynaklı zehirlenmelere neden olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan çalışmada kıyusal sular ve *M.gallopvncialis* örneklerinde 5 farklı bakteri türü tayin edilmiş ve bu bakteriler içerisinde en büyük yoğunluğu *E. coli*'nin (%61,11-%58,33) oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.8-9). Bu türün indikatör organizma olarak

standartlarda yer almasının sebeplerinden biri de bu yoğunluktur. IMVIC test sonuçları ile de tüm istasyonlarda *E.coli*'nin varlığı doğrulanmıştır. Bu sonuçlar *E.coli*'nin fekal koliform bakterilerin baskın üyesi olduğunu göstermiştir. Tüm istasyonlarda enterik bakterilerin yüksek oranda bulunması, bu sulara insan veya hayvan kökenli atıkların veya atık suların karıştığını göstermiş ve bu bulgular Shibata T. (2004) tarafından da desteklenmiştir.

Kıyısal sulardan izole edilen *E.coli* suşlarında, en yüksek direnç frekansının ampisilin (%54,54) antibiyotiğine karşı olduğu belirlenmiştir. Bu direnç oranını nalidiksik asit (%45,45), trimethoprim-sulfametoksazol (%40,90) amoksisilin-klavulanik asit (%36,36) ve tetrasiklin (%27,27) takip etmiştir. Buna karşın imipenem antibiyotiğine karşı direnç tespit edilememiş ve *E.coli* bakterisine karşı en etkin antibiyotik imipenem olduğu saptanmıştır (Tablo 4.5). Sivri N. ve arkadaşlarının (2010) İstanbul güneybatı sahilinde yaptıkları araştırma sonuçları, çalışma bulguları ile büyük benzerlik göstermiştir. Karbapenem türevi imipenemin, halen en duyarlı antibiyotik oluşu, veterinerlik ve tıpta yoğun olarak kullanılmaması ile açıklanabilir. *E.coli* bakterisinde en yüksek direnç oranları, beta-laktam antibiyotik grubundan olan penisilin sınıfında görülmüştür. Son yıllarda, özellikle geniş spektrumlu beta-laktamaz kavramının ortaya çıkması ile penisilin ve diğer beta-laktam grubu antibiyotiklerin kullanımında belirgin bir direnç sorunu ile karşı karşıya kalınmıştır. Dolayısıyla ampisilin ve amoksisilin gibi aminopenisilinlerin, gram negatif bakterilere karşı etkinliği de önemli ölçüde azalmıştır. Güçlü bakterisid etkiye sahip ve zehirliliği az olan penisilinin, kısa aralıklarla yeni türevlerinin tıbbi tedavide kullanıma sunulması nedeniyle halen en çok kullanılan antibiyotik grubunu oluşturmaktadır (Özşahin A.D. 2005, Karabay O. 2008).

Kıyısal sulardaki bakterilerin antibiyotik direnç yayılımını incelediğinde, *E.coli* suşlarının %50'sinin iki veya daha fazla antibiyotiğe dirençli oldukları görülmüştür (Şekil 13-14). *E.coli* suşlarının %4,54'ünde ise 8 antibiyotiğe karşı direnç saptanmıştır. Gözlenen yüksek MAR indeksi, örnekleme yapılan bölgelerdeki yoğun yerleşim ve kıyısal suların balıkçılık ve rekreasyonel aktiviteler amacıyla kullanımına bağlı olarak yoğun antibiyotik kullanılan insan veya hayvan atıklarının denize deşarjı nedeniyle kontamine olduğunu göstermiştir.

Kıyusal sular ve *M.gallopvovincialis* örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarında tespit edilen sınıf 1 ve sınıf 2 integronların *dfrA1*, *dfrA12*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *sat2* ve *bla_{oxa-2}* gen kasetlerini içerdiği ayrıca tetrasikline dirençli suşlar arasında *tet(B)* geninin yaygın olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7). Elde ettiğimiz sonuçlar, antibiyotik direnç fenotipleri belirlenen bu suşlarda direncin hareketli genetik elemanlar olan plazmidler, transpozonlar ve integronlar tarafından taşındığını göstermiştir. Sivri N. ve arkadaşlarının (2012), çalışmamız örnekleme bölgelerinden özellikle Menekşe istasyonu ile bağlantısı nedeniyle önem kazanan Küçükçekmece Lagünü'nde yaptıkları çalışmalarında, elde ettiğimiz gen kasetlerinden farklı olarak *dfrA15*, *dfrA17* ve *bla_{OXA30}* gen kasetlerini de belirlemişlerdir. Özgümüş O.B ve arkadaşları (2007) ise Rize içme sularından (musluk ve pınar suları) izole ettikleri fekal koliform bakterilerde, çalışma bulgularımızla benzer gen kasetlerini belirlemişler fakat tetrasiklin direncinden sorumlu en yaygın genin *tet(A)* olduğunu rapor etmişlerdir. Çolakoğlu F. ve arkadaşlarının (2010), tetrasiklin direnç mekanizmasını araştırdıkları çalışma sonuçları da elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Belirlenen integron gen kaset yapılarının, dünya genelinde yapılan çalışmalardaki klinik kökenli bakterilerde de gösterilmiş olması, farklı çevre kökenli mikroorganizmalar arasında ortak bir genetik havuzun nasıl paylaşıldığını açıklamaktadır.

6. ÖNERİLER

- Rekreasyon ve su ürünleri üretimi yapılan denizlerde meydana gelen kirliliğin kontrolü ve izlenmesi, çevre ve halk sağlığı ile biyolojik çeşitliliğin korunması açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle denizlerde fekal kirlenmenin önlenmesi ve su kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla kanalizasyon atık sularının dere ve denizler gibi alıcı su ortamlarına uygun olmayan deşarjı önlenmelidir. Bunun için çevre mevzuatında belirlenen standartlar çerçevesinde, atık su arıtma tesislerinin işletme planları güçlendirilmeli ve mevcut arıtma teknolojileri geliştirilerek, atık su arıtma tesisleri tam verimle çalıştırılmalıdır.
- Enfeksiyon hastalıklarının etkili bir şekilde tedavi edilmesi ve antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların gelişmesini ve yayılmasını en aza indirmek amacıyla akılcı (rasyonel) antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmeli, toplum bilinçlendirilmeli ve ilaç endüstrisinin ilaç pazarlama uygulamaları düzeltilmelidir.
- Yerel yönetimlerin kurumsal kapasiteleri güçlendirilmeli, mevcut yerel yönetimler arasında işbirliği ve eşgüdüm sağlanarak, yasa ve yönetmeliklerin ilgili kurumlar tarafından uygulanmasının denetimi etkili bir şekilde gerçekleştirmelidir. Böylelikle çevresel kirleticilerin kontrol altında tutulması sağlanmalıdır.
- Mevcut yasa ve yönetmeliklerin ihlal edilmesi ile ortaya çıkan, insanları ve ekosistemi tehdit eden çevresel zararları önleme hedefiyle, çevre suçlarının ceza hukuku yoluyla kovuşturulması sonucu caydırıcılığı sağlanmalıdır.
- Adli Çevre Bilimlerinde kanıt olarak değerlendirilen, çevresel kirliliğe neden olan mikrobiyal kirleticilerin belirlenmesi ve kontaminasyon kaynağının tespit edilmesi amacıyla yapılacak araştırmalarda, bu çalışmada uygulanan adli moleküler mikrobiyoloji yöntemleri ve elde edilen sonuçların kullanılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

Akiyama, T., Savin, M. C. (2010). Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6192-6201.

Alekshun, M. N., Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance, *Cell*, 128(6), 1037-1050.

Applied Biosystems, BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, Part Number 4337035, Rev. A, 09/2002, USA.

APHA (1998). Multiple-Tube Fermentation Technique for Members of the Coliform Group: Method 9221: Part 9000. *In Standard methods for the examination of water and wastewater*. Clesceri LS, Greenberg AE and Eaton AD (ed.), 20th edition, pp.9-47, American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. Washington, D.C.

Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health: Assessment of Risk and Risk Management for Water-Related Infectious Disease*. Fewtrell, L., & Bartram, J (ed) pp.289-316, International Water Assn. Publishing.

Atlas, R.M. (1946). *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. 2nd ed. 664 page, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.

Aarestrup, F.M., M. Lertworapreecha, M.C. Evans, A. Bangtrakulnonth, T. Chalermchaikit, R.S. Hendriksen, and H.C. Wegener (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries, *J. Antimicrob. Chemother.*, 52, 715-718.

Ay, S., İşeri, L. A., & Duman, B. (2003). İdrar örneklerinden izole edilen gram olumsuz mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları. *Journal of Inonu University Medical Faculty*, 10(2), 59-62.

Baquero, F., Martinez, J.L., Canto, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, *Current Opinion in Biotechnology*, 19:260-265.

Bayne, B. L. (Ed.) (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*, Vol. 10, Cambridge University Press.

Bell, J.B., Elliott, G.E., Smith, D.W. (1983). Influence of Sewage Treatment and Urbanization on Selection of Multiple Resistance in Fecal Coliform Populations, *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 227-232.

Brown, D.K., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T.H. Mawhinney, D.B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico, *Science of the Total Environment*. 366:772-783.

Campos, C. J., Kershaw, S. R., & Lee, R. J. (2013). Environmental Influences on Faecal Indicator Organisms in Coastal Waters and Their Accumulation in Bivalve Shellfish. *Estuaries and Coasts*, 1-20.

Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance, *Veterinary Research*, 32(3-4), 243-259.

Chopra I, Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.*; 65:232–60
Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*, Ninth Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute Document M2-A9, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eighteenth Information Supplement*, Clinical and Laboratory Standards Institute Document M100-S18, USA.

Coelho, M.P.P., Marques, M.E., Roseiro. J.c. (1999). Dynamics of microbiological contamination at a marine recreational site, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 38, No. 12, pp. 1242-1246.

Collis, C. M., & Hall, R. M. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles, *Molecular Microbiology*, 6(19), 2875-2885.

Coleman BL, Louie M, Salvadori MI, McEwen SA, Neumann N, Sibley K, Irwin RJ, Jamieson FB, Daignault D, Majury A, Braithwaite S, Crago B, McGeer AJ. (2013). Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*, *Water Research*, Volume 47, Issue 9, 1 June 2013, Pages 3026–3036

Cooke, M. D. (1976). Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater, and marine shellfish. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 9(6), 879-884.

Costanzo, S.D., Murby, J., Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 51, Issues 1-4, Pages 218-223.

Çardak, M., & Altuğ, G. (2010). Distribution of members of the family Enterobacteriaceae in the Istanbul Strait İstanbul Boğazı'nda Enterobacteriaceae familyası üyelerinin dağılımı. *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, Vol. 16(3): 295- 310.

Çevikbaş, A. (1990) Antimikrobiklere karşı direnç gelişmesi, *Meslek İçi Sürekli Eğitim Programı (MİSEP-1)*, İstanbul, 164-174.

Çolakoğlu, F., Özgümiş, O. B., Sandallı, C., Sevim, E. Ç., & Karaoğlu, Ş. A. (2010). Deniz Suyu Kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 Integron Gen Kasetleri ve Antibiyotik Direncinin Karakterizasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 40 (2): 97 - 108

Dada, A. C., Ahmad, A., Usup, G., & Heng, L. Y. (2013). Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environmental monitoring and assessment*, 185(2), 1583-1599.

Dang, H., Ren, J., Song, L., Sun, S., An, L. (2008). Diverse tetracycline resistant bacteria and resistance genes from coastal waters of Jiaozhou Bay, *Microb Ecol*, 55:237-246.

- Danishta, I., Ismet, M., Sonatun, D., & Jaufeerally-Fakim, Y. (2010). Antibiotic Resistance of Escherichia Coli Isolates from Environmental and Waste Water Samples in Mauritius. *Advances in Environmental Biology*, 4(1), 1-9.
- De Donno, D.A., Liaci, F., Bagordo, F., Lugoli, G., Gabutti. (2008). *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of microbiological pollution of coastal waters: A study conducted in the Salento Peninsula (Italy), *Journal of Coastal Research*, Vol. 24, No. 1A (Supplement).
- Dufour, A.P., Ericksen, T.H., Ballentine, R.K., Cabelli, V.J., Goldberg, M. ve Fox, W.E., (1986). *Bacteriological Ambient Water Quality Criteria for Marine and Fresh Recreational Waters, Ambient Water Quality Criteria for Bacteria*, EPA 44075-84-002, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Erginöz H., Köksal S., Çelik Ş., Vehid S. (1990). İstanbul Deniz Suyu Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi, *Balkan Tıp Birliği Kongresi Tebliği*, Varna
- European Union (1976). 76/160/EEC, The Bathing Water Directive.
- European Union (2006). 2006/113/EC, The Shellfish Water Directive.
- Eyüpoğlu B. (2010). Orta Karadeniz bölgesinde Akdeniz midyesinin (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819) farklı derinliklerde büyüme ve yaşama oranlarının belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Sinop Üniversitesi, 69p.
- Fleming, L.E., Broad, K., Clement, A., DeWailly, E., Elmir, S., Knap, A et al. (2006). Oceans and human health: emerging public health risks in the marine environment, *Mar Pollut Bull.* 53(10–12):545–560.
- Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 18(11), 761-770.
- Gangle B.J. (2005). Sources and Occurrence of Antibiotic Resistance in The Environment, Master of Science, University of Maryland, Baltimore, USA.
- Geissler, K., Manafi, M., Amoros, I., & Alonso, J. L. (2000). Quantitative determination of total coliforms and Escherichia coli in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 280-285.
- Georgopapadakou N.H. (2002). Antibiotic Resistance in Enterobacteria. Lewis Kim, Abigail A Salyers, Harry W. Taber, Richard G. Wax. Eds. *Bacterial resistance to antimicrobials*, Marcel Dekker, Inc.
- Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A., Giger, W. (2001). Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chem*, 73, 3632-3638.
- Goni-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P., Quentin, C. (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp, *Appl. Environ. Microbiol*, 66: 125-132.
- Gosling, E (Ed.) (2004) Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture, p. 443, Fishing News Books, Blackwell Publications.

Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. (2000). Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol*;49:929–36.

Guardabassi, L., Lo Fo Wong, D.M.A., Dalsgaard, A. (2002). The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria, *Water Research*. Volume 36, Issue 8, Pages 1955-1964.

Guillon-Cottard, I., Augier, H., Console, J. J., & Esmieu, O. (1998). Study of microbiological pollution of a pleasure boat harbour using mussels as bioindicators, *Marine Environmental Research*, 45(3), 239-247.

Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination, *Molecular Microbiology*, 15(4), 593-600.

Hall, R.M., Collis, C.M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: The role of gene cassettes and integrons, *Drug Resist Updat*. 1(2):109-19.

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, *Chemosphere*, Volume 36, Issue 2, Pages 357-393.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer K., Kratz K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of the Total Environment*, Volume 225, Issues 1-2, Pages 109-118.

Jørgensen, S.E., Halling-Sørensen, B. (2000). Drugs in the environment, *Chemosphere*, Volume 40, Issue 7, Pages 691-699.

Jović, M., Stanković, A., Slavković-Beskoski, L., Tomić, I., Degetto, S., & Stanković, S. (2011). Mussels as a bio-indicator of the environmental quality of the coastal water of the Boka Kotorska Bay (Montenegro). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(6), 933-946.

Kalem, F., Gündem, N. S., Arslan, U., & Tuncer, İ. (2008). İdrar Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia Coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılığı. *Ankem Derg*, 22(4), 193-197.

Kamruzzaman M., Shoma S., Bari S.M., Ginn A.N., Wiklendt A.M., Partridge S.R., Faruque S.M., Iredell J.R. (2013). Genetic diversity and antibiotic resistance in *Escherichia coli* from environmental surface water in Dhaka City, Bangladesh, *Diagn Microbiol Infect Dis.*, In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.016>.

Karabay, O., Hosoglu, S. (2008). Increased antimicrobial consumption following reimbursement reform in Turkey. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(5), 1169.

Karabulut E. (1999). İstanbul Metropolü Kıyılarında Mikrobiyolojik Kirlilik Yükü Dağılımı Üzerine Araştırmalar. İ.Ü. Den. Bil. ve İşl. Enst. Yüksek Lisans Tezi.

Karayucel, S. (1996). Influence of Environmental Factors on Spat Collection and Mussel (*Mytilus edulis*) Culture in Raft Systems in two Scottish Lochs, Doktora Tezi, Institute of Aquaculture University of Stirling, 267 p.

- Katoğlu, T. (2005). Yeni Türk Ceza Kanunu ve Çevreye Karşı Suçlar, *Mülkiye*, Cilt: XXIX Sayı: 246.
- Kaya, O., Akçam, F. Z., Uyar, C., Demir, C., & Yaylı, G. (2006). 2000-2004 yılları arasında izole edilen üropatojen *Escherichia coli* suşlarında artan antibiyotik direnci. *SD Ü. Tıp Fak. Derg*, 13, 22-6.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators*, 8: 1-13.
- Kruse, H., Sorum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments, *Appl. Environ. Microbiol*, 60: 4015-4021.
- Krumperman, P.H (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods, *App Environ Microbiol*, 46:165-70.
- Kuyucu, N. (2007). Antibiyotik direnci, *Çocuk Enf. Derg:Özel Sayı*:1;33-8.
- Kumlu, M. (2001). *Karides, İstakoz ve Midye Yetiştiriciliği*. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Kitapları. No: 6.
- Kümmerer, K., (2003). Significance of antibiotics in the environment, *J.Antimicrob. Chemother*, 52: 5-7.
- Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment, *J. Antimicrob. Chemother*, 54: 311-320.
- Kummerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment- a review: Part I, *Chemosphere*, 75, 417-434.
- Levy, S.B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses, *Nature Medicine*, 10, 122-129.
- Leverstein-van Hall, M.A., Box, A.T.A., Blok, H.E.M., Paauw, A., Fluit, C., Verhoef, J. (2002). Evidence of extensive interspecies transfer of integron mediated antimicrobial resistance genes among multidrug resistant enterobacteriaceae in a clinical setting, *The Journal of Infectious Diseases*, 186:1, 49-56.
- Lévesque, C., L. Piche, C. Larose, and P.H. Roy (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes, *Antimicrob. Agents Chemother*, 39, 185-191.
- Liu, X. (2009). Characterisation of antibiotic resistance gene clusters and their mobility within a collection of multidrug resistant *Salmonella* spp, Doctor of philosophy thesis, School of Biological Sciences- Faculty of Science, University of Wollongong.
- Maal-Bared, R., Bartlett, K. H., Bowie, W. R., & Hall, E. R. (2013). Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. *Science of the Total Environment*, 443, 315-323.
- Matyar, F. (2012). Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(3), 551-556.

Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene, *Antimicrob Agents Chemother*; 44:1568-74.

Maurizio Labbate, Rebecca Josephine Case, and Hatch W. Stokes. (2009). The Integron/Gene Cassette System: An Active Player in Bacterial Adaptation. In: Gogarten, Maria Boekels, J. Peter Gogarten, and Lorraine Olendzenski, eds. *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*. vol. 532, 551 page, Humana Press.

Milne, D.P., Higgins, J.E. and Brodie, I.J (1998). Investigation of the relationship between indicator bacteria in mussel flesh and intervalvular fluid and surrounding waters, Phase 3 SNIFFER Report SR97(07), pp60, *Scotland & Northern Ireland Forum for Environmental Research*

Morello J.A., Granata M.A., Mizer H.E. (2003). *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology*, Applications to Patient Care. 7th Edition, 304 page, The McGraw-Hill Companies, USA.

Mollet, B., Iida, S., Shepherd, J., & Arber, W. (1983). Nucleotide sequence of IS26, a new prokaryotic mobile genetic element, *Nucleic Acids Research*, 11(18), 6319-6330.

Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N. C., Dambrosio, A., Montagna, C., & Chiocco, D. (2006). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International journal of food microbiology*, 106(2), 219-222.

Okumus, I., & Stirling, H. P. (1998). Seasonal variations in the meat weight, condition index and biochemical composition of mussels (*Mytilus edulis* L.) in suspended culture in two Scottish sea lochs, *Aquaculture*, 159(3-4), 249-261.

Özgümüş O. B., Celik-Sevim, E., Alpay-Karaoglu, S., Sandalli, C., & Sevim, A. (2007). Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *Journal Of Microbiology-Seoul-*, 45(5), 379.

Özgümüş, O. B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E., & Sivri, N. (2009). Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *The Journal of Microbiology*, 47(1), 19-27.

Özşahin, A. D., Dığrak, M., & Kıran, Ö. E. (2005). *Escherichia coli*'nin Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Kazanmasının Araştırılması. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(2).

Öztürk, B., Güven, K.C. (2005). Deniz Kirliliği, Temel Kirleticiler ve Analiz Yöntemleri. Türk Deniz Araştırmaları Vakfı Yay. No: 21, İstanbul

Öztürk, R. (2002). Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu, *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi* No: 31, s. 83-100.

Özyurt N.N., Bayarı, C.S., Doğdu M.Ş., Arıkan A. (2001). Akkuyu Körfezi (Mersin) deniz suyunun fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkileyen süreçler, *Yerbilimleri*, 24, 113-126.

Partridge, S. R., & Hall, R. M. (2005). Evolution of transposons containing blaTEM genes, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 49(3), 1267-1268.

Promega, *Wizard® SV Gel and PCR Clean up System Technical Bulletin*, Part # TB308, Revised 12/10, USA

Promega, *pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Bulletin*, Part # TM042, Revised 12/10, USA

Promega, *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* Part # TB225, Revised 12/10, USA

Prüss, A. (1998). Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water, *International Journal of Epidemiology*, 27:1-9.

Qiagen, *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*, 1037951, 07/2006, USA

Rahube, T. O., & Yost, C. K. (2010). Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *Afr. J. Biotechnol*, 9, 9183-9190.

Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element, *Microbiology*, 141(12), 3015-3027.

Resmi Gazete. Tarih: 11/08/1983. Sayı: 18132. Kanun No: 2872 . *Çevre Kanunu*.

Resmi Gazete. Tarih: 07/01/1991. Sayı: 20748. *Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği*.

Resmi Gazete. Tarih: 26/09/2004. Sayı: 25611. Kanun No: 5237. *Türk Ceza Kanunu*.

Resmi Gazete. Tarih: 31/12/2004. Sayı: 25687. *Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği*.

Resmi Gazete. Tarih: 08/01/2006. Sayı: 26047. *Kentsel Atıksu Arıtımı Yönetmeliği*.

Rehnstam-Holm, A.S., Hernroth, B. (2005) Shellfish and Public Health: A Swedish Perspective, *Ambio*, Vol. 34, No. 2. 139-144.

Rice L.B. (2001). Mobilization of Transposons: Rationale and Techniques for Detection, In: Edited by: Gillespie Stephen H. *Methods in Molecular Medicine*, vol. 48: 254 page *Antibiotic Resistance Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Roslev, P., Iversen, L., Sønderbo, H. L., Iversen, N., & Bastholm, S. (2009). Uptake and persistence of human associated Enterococcus in the mussel *Mytilus edulis*: relevance for faecal pollution source tracking. *Journal of applied microbiology*, 107(3), 944-953.

Roy, P. (1995). Integrons: novel mobile genetic elements mediating antibiotic resistance in Enterobacteria and *Pseudomonas*, *APUA Newsletter*, 13(3), 1-4.

Rysz, M., Pedro J.J. Alvarez, P.J.J. (2004) Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments, *Water Research*, 38: 3705–3712.

Sağlam H.S., Öğütlü A., Demiray V., Karabay O., (2012). Üriner Enfeksiyonlarda Toplum Kökenli *Escherichia Coli*'nin Yeri ve Gelişen Antibiyotik Direnci, *Nobel Med*, 8(1): 67-71.

Sambrook J, Russell D.W (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd edition, 545 page, *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.

- Sandalli, C., Özgümüş, O. B., & Sevim, A. (2010). Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(11), 2099-2103.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, *FEMS Microbiol Ecol*, 43:325–335.
- Schwalbe R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (Eds.) (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. pp 7-52, CRC.
- Scholar, E. M., & Pratt, W. B. (Eds.) (2000). *The antimicrobial drugs*, 2nd ed, 624 pages, Oxford University Press, USA.
- Shibata, T., Solo-Gabriele, H. M., Fleming, L. E., & Elmir, S. (2004). Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water research*, 38(13), 3119.
- Siefert J.L. (2009). Defining the Mobilome. In: Gogarten, Maria Boekels, J. Peter Gogarten, and Lorraine Olendzenski, eds. *Horizontal gene transfer: genomes in flux*, Vol. 532, pp 551, Humana Press.
- Sivri N., Şeker D.Z. (2010). Investigation of Enteric Bacteria of Surface Waters in the Southwestern Coast of Istanbul by means of GIS. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(4): 505-511.
- Sivri, N., Sandalli, C., Ozgumus, O. B., Colakoglu, F., & Dogan, D. (2012). Antibiotic Resistance Profiles of Enteric Bacteria Isolated from Kucukcekmece Lagoon (Istanbul–Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 699-707.
- Šolić, M., Krstulović, N., Jozić, S., & Curać, D. (1999). The rate of concentration of faecal coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environment international*, 25(8), 991-1000.
- Sonier, R., Mayrand, E., Boghen, A. D., Ouellette, M., & Mallet, V. (2008). Concentration of Escherichia coli in sediments as an indicator of the sanitary status of oyster (Crassostrea virginica) aquaculture sites. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(6), 678-684.
- Stabili, L., Acquaviva, M. I., & Cavallo, R. A. (2005). Mytilus galloprovincialis filter feeding on the bacterial community in a Mediterranean coastal area (Northern Ionian Sea, Italy). *Water research*, 39(2), 469-477.
- Sungpyo, K., Diana S. A. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10:8,559 -573.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S3-S10.
- Türkdoğan, F.I., Yetilmezsoy, K. (2009). Appraisal of potential environmental risks associated with human antibiotic consumption in Turkey, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 166, Issue 1, Pages 297-308.

Watkinson, A. J., Micalizzi, G. B., Graham, G. M., Bates, J. B., & Costanzo, S. D. (2007). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Applied and environmental microbiology*, 73(17), 5667-5670.

West P.A., Coleman M. R. (1986). A tentative national reference procedure for isolation and enumeration of *Escherichia coli* from bivalve molluscan shellfish by most probable number method. *Journal of Applied Microbiology*, 61: 505–516.

White P.A, McIver C.J, Rawlinson W.D. (2001). Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*; 45:2658–61.

Vural H.Ç., Akçin A. (2011). İzmit Körfezinden İzole Edilen *Escherichia Coli*'lerde R Plazmidlerine Bağlı "Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç Özelliğinin" Belirlenmesi, *Kafkas Univ Vet Fak Derg 17 (Suppl A): S23-S30*.

Yang, S., Carlson, K. (2003). Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Research*. 37:4645–4656.

Yüce, A (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları, *Klinik Dergisi*, 14:41.

Zhang, X. X., Zhang, T., Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (3):397–414.

URL 1: [http://web.expasy.org/translate/ExPASy Proteomics Server/Translate tool](http://web.expasy.org/translate/ExPASy%20Proteomics%20Server/Translate%20tool). Erişim tarihi: 15.10.2012.

URL 2: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> Erişim tarihi: 15.10.2012.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) / NBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

URL 3: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/consleg/1976/L/01976L0160-20030605-en.pdf>. Erişim tarihi: 07.12.2012.

8. EKLER

EK 1: Standart EMS Tablosu (APHA, 1998).

Dilüsyonlar			EMS/100ml	Dilüsyonlar			EMS/100ml
10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml	
0	0	0	0	2	2	1	28
0	0	1	3	2	3	0	29
0	1	0	3	3	0	0	23
0	2	0	6	3	0	1	39
1	0	0	4	3	0	2	64
1	0	1	7	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	3	0	16	3	2	2	210
2	0	0	9	3	2	3	290
2	0	1	14	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1.100
2	2	0	21	3	3	3	>1.100

EK 2: *Enterobacteriaceae* familyası için zon çapları yorumlama standartları (CLSI, 2008).

Antibiyotik	Disk İçeriği	Zon Çapı (Yaklaşık mm)		
		R	I	S
Tetrasiklin	30 µg	14≥	15-18	≥19
Nalidiksik Asit	30 µg	13≥	14-18	≥19
İmipenem	30 µg	13≥	14-15	≥16
Amoksisilin/Klavulanik asit	30 µg	13≥	14-17	≥18
Seftazidim	30 µg	12≥	13-17	≥18
Streptomisin	10 µg	11≥	12-14	≥15
Kloramfenikol	30 µg	12≥	13-17	≥18
Ampisilin	10 µg	13≥	14-16	≥17
Amikasin	30 µg	14≥	15-17	≥18
Trimetoprim-Sulfametoksazol	25 µg	10≥	11-15	≥16

R: Dirençli, I: Orta derecede duyarlı, S: Duyarlı

EK 3: *E.coli* suşlarının taşıdığı sınıf 1 ve sınıf 2 integronların baz dizilimleri.

M115Y10 kodlu *E.coli* suşu:

ATGTGGGGCGGACGTTTCGCATGCTCCCGGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGC
ATCCAAGCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATG
TTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGCCATATGAACTCGGAATCAGTACGC
ATTTATCTCGTTGCTGCGATGGGAGCCAATCGGGTTATTGGCAATGGTCCTAATATCCCCTGG
AAAATTCGGGTGAGCAGAAGATTTTTTCGCACTACTGAGGGAAAAGTCGTTGTCATGG
GGCGAAAGACCTTTGAGTCTATCGGCAAGCCTCTACCGAACCGTCACACATTGGTAATCTCA
CGCAAGCTAACTACCGCGCCACTGGCTGCGTAGTTGTTTCAACGCTGTCGCACGCTATCGC
TTTGGCATCCGAACTCGGCAATGAACTCTACGTCGCGGGCGGAGCTGAGATATACTACTG
CACTACCTCACGCCCACGGCGTGTCTATCTGAGGTACATCAAACCTTCGAGGGTGACGCC
TTCTTCCAATGCTCAACGAAACAGAATTCGAGCTTGTCTCAACCGAAACCATTCAAGCTGT
AATCCGTACACCCACTCCGTTTATGCGCGTCGAAACGGCTAACCATCCGTCAACGGGACG
CCAAAATGCTGCGCATTTGGTTCCCTCCGCTGCGCTCCGGCTCTCGTTACGTCCAACGTTAG
CACCCTGAAACCCAGCTTTATTTAGCTCATGTTTATTCAAACGGCATTTAGCTTTTCAGGCG
TTATTCAGTGCTGTTTTCGCTTTTTTCCGGGCTTCGCCTGCATGGGCTGCGCAGGTTTTAGT
CTTTTTGGCCTCTAGCCCTTTCGTA AAAAGCGCAAGCAGCTATCGTTTTTGCAGGGCTGGGC
CGCCTCGGGGGCGCACCGTTTTTCCGGGTAGCGCCCGTCGCAATTCAGGTTTATTGGCGG
TGGTTCCCCCCCCCTTGACCTCAGGGGGAAGGGGGCCCTTGAAATTCGACCCACTTTCCGG
GGTTAGGGTCATTGAGCCCCTTTGGAATCAACGTTGCGGCCCGGGCATTTCGCTCCCC
AGGGGATGGGGCTGAAGCCATACAGCGATAATGATTGGTGGTACGGTGGCCGTAAGCT
TGATGAAACGACGCGCGAGCATTGCTCAATGATCTTATGGAGGCTTCGGCTTTCCCTGGCG
AGAGCGAGACGCTCCGCGCTATAGAAGTCACCCTTGTGTGCATGACGACATCATCCCGTGG
CGTTATCCGGCTAAGCGCGAGCTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTGCGGG
TATCTTCGAGCCAGCCATGATCGACATTGATCTAGCTATCCTGCTTACAAAAGCAAGAGAAC
ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCGGCAGCGGAGGAATCTTTGACCCGGTTCCTGAACAGGAT
CTATTCGAGGCGCTGAGGGAAACCTTGAAGCTATGAACTCGCAGCCCGACTGGGCGGGCG
ATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAATAACCGGCAAAATC
GCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATAAAAACGCCTACCTGCCAGTATCAGCCCGT
CTTACTTGAAGCTAAGCAAGCTTATCTGGGACAAAAAGAAGATCACTTGGCCTCACGCGCAG
ATCACTTGAAGAATTTATTCGCTTTGTGAAAGGCGAGATCATCAAGTCAGTTGGTAAATGA
TGTCTAACAATTCGTTCAAGCCGACCGCGCTACGCGCGGGCGCTTAACTCCGGCGTTAGATG
CACTAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAACTATCAGGTCAAGTCTGCTTAACTACTAGTGAA
TTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGAGAGCTCCCAAACGCGTTGGATCCAAAGCTAT

D701K11 kodlu *E.coli* suşu:

GCTAGGTGCAGCTCGCTGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGATTTCGATTAAGCAGACTTG
ACCTGATAGTTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGCATCTAACGCATAGTTGAGCGGCG
GGCGCAGCCCGTCCGCTTGAACGCCGAGTTAGGCATCAGGTGCCCTCGGCGGGGTCGATGC
ACTTTTCGCACATGCCGCTCAACGCAAGATTCTCTCAATCGTTGCTTTGGCATATCGAACGAA
CGCGGCCGCTCTTTCGACGCGCATTGCTAGGTGCTCGTCTCGCTACCCAGGTACGCCGCGC
GTGCCCTGCAGATGAGGGGCCGATGCTCGGCAGGCAAACGCTCCGATACCCATGCGGCAGC
AACGTCCTTAGGAGCAATGAGACCAGTTGAAGCGCTGTACCAAATGCGAGCAAGAGCAAGA
ACGACGTTCCGCTCGTCACCCTTCCAATCCGACTCTGCATTCCACTGGGCAATAGTGTGCAA
AAGCGCCTTGGAGAAATGCTCCTTCGGCACCGGCTCGAAAAACGTGGCTGCGGATGGGCT
AGTAGCGCAAGGCTGTGTTGCCTCGCCTTGGTCAGCAAAATCGCAAGATCGTGATCCAGAAC

GGCAGGCTCGAACGTTCCGGAAAGGATGTCGTGGCGGAGCCACTCACCGAACTGAAGCTCA
CGCCGCGCCGATAGCGCCAAGGCACTACTTCGCTTCGAGCGACAACAGTTAGCCCCAGCG
GTCGCCATGTTCCGCCATCGCCTGGCGGTGATGAGACTTTCAGCAAATCGAGCATTAGCGCC
TGCCGGAGCGAATCGTTAGGTGCGGGCCTGACGGTCACGAGCAAGTCTATGTCGCTGTCCGG
CTTCAGCCCTCCATCGATCGCAGATCCGAACAGGTGGATTGTGTCCAGTGTGCGAGCCAGAT
GGCGCTCGATACCGCGCGAGCGTGGGACAGCTGCTTGAAACTTGTGCAGGGAAAATTCCC
CATGATGCCAACTTTGTTTTAGGGGACTGCCCTGCTGCGTACATCGTTGCTGCTCATAAATCA
AAATCGCACATGCCGCTCAACGCAAGATTTTTTCAATCGTTGCTTTGGCATATCGAACGAAC
GCGGCCGTCTTTTTGACGCGCATTGCTAGGTGCTGCTCCTCGCTACCCAGGTACGCCGCGCGT
GCCCTGCAGATGAGGGGGCCGATGCTCGGCAGGCAAACGCTCCGATACCCATGCGGCAGCAA
CGTCCTTAGGAGCAATGAGACCAGTTGAAGCGCTGTACCAAATGCGAGCAAGAGCAAGAAC
GACGTTCCGCTCGTCACCTTCCAATCCGACTCTGCATTCCACTGGGCAATAGTGTGAAAA
GCGCCTTGAGAAAATGTCCTTCGGCACCGGCTCGAAAAACGTGGCTGCGGATGGGCCTAGT
AGCGCAAGGCTGTGTTGCCTCGCTTGGTCAGCAAATCGCAAGATCGTGATCCAGAACGGC
AGGCTCGAACGTTCCGGAAAGGATGTCGTGGCGGAGCCACTCACCGAACTGAAGCTCACGC
CGCGCCGATAGCGCCAAGGCACTACTTCGCTTCGAGCGACAACAGTTAGCCCCAGCGGTC
GCCATGTTCCGCCATCGCCTGGCGGTGATGAGACTTTCAGCAAATCGAGCATTAGCGCTGC
CGGAGCGAATCGTTAGGTGCGGCGCTGACGGTCACGAGCAAGTCTATGTCGCTGTCCGGCTT
CAGCCCTCCATCGATCGCAGATCCGAACAGGTGGATTGTGTCCAGTGTGCGAGCCAGATGGC
GCTCGATCACCGCGCGAGCGTGGGACAGCTGCTTGAAAACCTGTGTCAGGGAAAAATTACC
CATGATGCCTAACTTTGTTTTAGGGGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAA
CATCAAACATCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGTGCTTGGATGCCAATCACAGAGGAATTC
GCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCCCAAACGCCGTTGGATGCATAGCCT
T

M214S10 kodlu *E.coli* suşu:

GTGTGGGGCCGAACGTTTCAATGCTCCCGGGCCGCAATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTAA
GCAGACTTGATCTCTGATAGTTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGCATCTAACGCTTGA
GTTAAGCCGCGCCGCGAAGCGGCGTGGCTTGAACGAATTGTTAGACATTATTTGCCGACTA
CCTTGGTGATCTCGCCTTACGTAGTGAACAAATTCTTCCAAGTATGACGGGCTGATACTGG
AGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTGATACTGG
GCCGGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTCTGCCGGTTAC
TGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCAGCCAGTCGG
GCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTACAGGAACC
GGATCAAAGAGTTCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGTCTTTGTC
AGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATT
GCGCTGCCATTCTCAAATGTCAGTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGT
CGTGACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGA
AGTTTCCAAAAGGTCGTTGACCAAAGCTCGCCGCGTGTGTTTCATCAAGCCTTACGGTCACCG
TAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAT
GTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGA
GTCGATACTTCGGCGATACCGCTTCCCTCATGATGTTAACGCCTGGCACAGCGGATACCC
GAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGACCAAAGCTCGCCGCGTGTGTTTCATCAAGCCTTACGGTCAC
CGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAA
ATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTT
GAGTCGATACTTCGGCGATACCGCTTCCCTCATGATGTTAACGCCTGGCACAGCGGATCG
CAAACCTGGCGCGGCTTTTGGTACAAAAGGCGTGACAGGTTTGGCAATCCGTTGCTGCCACT
TGTTAACCTTTTGGCAGATTTGGTAACTATAATTTATGTTAGAGGGCAAGTCTTGGGTA
ACTGGCCTAAAATTGCTGGGGATTTACAGGAAAGTAAACATCACCTTCCGGCTCGATGTCTAT
TGATAGATATGATGATCTACTTGATCGATCAGGCTTTTGTATATCTCCCCACCACCTGA
ACAATGACATGATCCGTTATTTTCTTTAGGTTGGTTAAAGCATCTTTAATTGATGGAAAGAT
CACTACGTTCTCATTGTCAGATGTAAAACCTTGAACGTGTTACAACCGCATACTTTCCGTTGGG
TAATGCTCCCATGATTCAAAGTCTTGGCTTCAACCAACAGCCATTGTTATAGGTAATAG
CTTTAAACAGGAGCTGTTACCTTTGGCACTTCATGGAATATCAGGGCCATTCCCGATAACT
CCATTCTTCGATATAGCTACCATTAGTGATAGCTTACAATTCTTCCCTCAGAGGTTAACTTTG
TTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACATCGACCC

ACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGGATGCCAATCACGTGAGAATTCGCGGCCGCTGCAGGT
CGACCCATATGGGAGAGCTCCCCAACGCCGTGGATGCATAGGCTG

M21111 kodlu *E.coli* suşu:

GGTGGGGGCCGACGTTTCGCATGCTCCCGGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGC
ATCCAAGCACCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTTCGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATG
TTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAAGTTGGGCATTAAGGAAAAGTTAATGGCAAT
CCGAATCTTCGCGATACTTTTCTCCATTTTTTCTCTTGCCACTTTCGCGCATGCGCAAGAAGG
CACGCTAGAACGTTCTGACTGGAGGAAGTTTTTTCAGCGAATTTCAAGCCAAAGGCACGATAG
TTGTGGCAGACGAACGCCAAGCGGATCGTGCCATGTTGGTTTTTGATCCTGTGCGATCGAAG
AAACGCTACTCGCCTGCATCGACATTCAAGATACCTCATACTTTTTGCACTTGTATGCAGG
CGCTGTTTCGTGATGAGTTCAGATTTTTTCGATGGGACGGCGTTAACAGGGGCTTTCAGGCC
ACAATCAAGACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCGGAATTCTACTGTTTGGGTGTATGAGCTA
TTTGCAAAGGAAATTTGGTGTATGACAAAGCTCGGGCTATTTGAAGAAAATCGACTATGGCA
ACGCCGATCCTTCGACAAGTAATGGCGATTACTGGATAGAAGGCAGCCTTGAATCTCGGCG
CAGGAGCAAATTCATTTCTCAGGAAGCTCTATCGTAACGAGCTGCCCTTTCGGGTAGAACA
TCAGCGCTTGGTCAAGGATCTCATGATTGGGGAAGCCGGTTCGCAACTGGATACTGCGTGCAA
AGACGGGCTGGGAAAGCCGTATGGGTTGGTGGTAAGAATGGGTTGAGTGGCCCAATGGGCT
CCGAATCTTCGCACTGAAAATTGATACGCCAAAAGAATGGATGATCTTTTCAAAGGGAGG
CAATCGGGCGGGCAATCCTTCCCTCTATTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGAGGTAATTCG
GACCAGATTTTCGATGGACGGCGTTAACAGGGGCTTGCAGGCCCAATCAAGCCCAAGATT
GGGATCAGCATGCGGAATTTACTGTTGGGGTATGAGCTATTGCAAAGGAAATGGGGATGAC
AAAGCTTGGCGCTATTGAAGAAAATTGACTATGGCAACGCCGATCCTTTGACAAGTAAGGC
GATTACGGATAGAAGGCAGCCCTGCAATTTCCGGCGCAGGAGCAAATTCATTTTTTCAGGAA
GCTCTATTGTAACGAGCTGCCCTTTCGGGTAGAACATCAGCGCTTGGTCAAGGATTTTCATGA
TTGTGAAGCCGGTCGCAACTGGATACTGCGTGCAAAGACGGGCTGGGAAGGCCGTATGGGT
TGGTGGGTAGGATGGGTTGAGTGGCCGACTGGCTCCGTATTCTTCGCACTGAATATTGATAC
GCCAAACAGAATGGATGATCTTTTCAAAGAGGGAGGCAATCGTGCGGGCAATCCTTCGCTCTA
TTGAAGCGTTACCGCCCAACCCGGCAGTCAACTCGGACGCTGCGCGATAAAACCGCGCAGC
GCCGTTACTTCAACGTTAGTACCACTGAAACCCTCCTTTATTCGCCCATGTTTATTCAAAC
GGCATTCAAGTTTCTCAAACGCTGTGCAGCGCTGGGTTTTGCCGTTTCTCTGGGCTTCGCTGGT
GGCGTTACGCTGGTTTGTGGTCTTTTTGGCCTCTGGCCCTTGTGTAGCAAGCGCGAGCAGCTA
TTTTTTTCGTAAGTGTGTGCCGCTCGGTGGCACCGTGCCTTTTCGCAGTTAGCGCCCGTCGC
CAAGTTACGTTATCCGTTTTGGCTTCTGGCTCTAACATTTCCGGTCAAGCCGACCCGATTCT
GCGGTCCGCTTACCTCGCCGTTAGATGACTAAGCACATAATTGCTCACAGCCAAACTATC
AGGTCAAGTCTGCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGA
GCTCCCCAACGCCGTGGGATGCATAGGCCCC

M307Y10 kodlu *E.coli* suşu:

AATGAGGGCCGAACGTTTCGAATGCTCCCGGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTCG
GGATCCCGGTTCGCGCATGCACGATTTGTAATAACAGAGTGTCTTGTATTTTTAAAGAAAGTC
TATTTAATAACAAGTGATTATATTAATTAACGGCAAGCATCAGCGGGTGACAAAACGAGCATG
CTTACTAATAAAAATGTTAACCTCTGAGGAAGAATTGTGAAACTATCACTAATGGTAGCTATA
TCGAAGAATGGAGTTATCGGGAATGGCCCTGATATTCCATGGAGTGCCAAAGGTGAACAGC
TCCTGTTTAAAGCTATTACCTATAACCAATGGCTGTTGGTTGGACGCAAGACTTTTTGAATCAA
TGGGAGCATTACCCAACCGAAAAGTATGCGGTTCGTAACACGTTCAAGTTTTACATCTGACAAT
GTGAACGTATTGATCTTTCCATCAATTAAGATGCTTTAACCAACCTAAAGAAAATAACGGA
TCATGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGAGATATACAAAAGCCTGATCGATCAAGTAGATACAC
TACATATATCTACAATAGACATCGAGCCGGAAGGTGATGTTTACTTTCCTGAAATCCCCAGC
AATTTTAGGCCAGTTTTTACCCAAGACTTCGCCTCTAACATAAATTATAGTTACCAAATTTGG
CAAAGGGTTAACAAGTGGCAGCAACGGATTTCGCAAACCTGTCACGCCTTTTGTACCAAAA
GCCGCGCCAGGTTTTCGATCCGCTGTGCCAGGCGTTAGGCGTCATATGAAGATTTCCGGTGT
CCCTGAGCAGGTGGCGGAAACATTGGATGCTGAGAACCATTTCATTGTTTCGTGAAGTGTTCG

ATGTGCACCTATCCGACCAAGGCTTTGAACTATCTACCAAAAAGTGTGAGCCCCTACCGGAAG
GATTACTTCTCGGATGATGACTCTGATGAAGACTCTGCTTGCTATGGGGCATTTCATCGACCA
AAAGCTTGGCCGGAAGATTGAACTCACCTAACATGGAACGATCTAGCCTCTATCGAAACATT
TGGCGGGTCGCCGCCGAAGTATCGACTCAACTTTTCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCA
TCTTGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTGGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGC
CCACACAGTGATATTGATTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCG
AGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCG
CTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCAGTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGC
GAACTGCAATTTGGAGAATGGCGGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCAC
GATCGACATTGATCTGGCTATCTTGTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCCTTGGTAG
GTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCTGTTTCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAAT
GAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGACGAGCGAAATGTAGTGC
TTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCT
GCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGGC
AGGCTTACTTTGGACAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTT
CACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCAGGCAAATAATGTCTAACAAATTCGTTCAA
GCCGACGCGCTTCGCGGCGCGGCTTAAGTCAAGCGTTAGAGAGCTGGGGAAGACTATGCG
CGATCTGTTGAAGGTGGTTCTAAGCCTCGTACTTGCGATGGCATCAATCACTAGTGAATTCG
CGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGGATGGAGCATGCTG

D201Y10 kodlu *E.coli* suşu:

ATCATGGGGCGACGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGATTTCGATTTCGGGATCC
CGGATCGCGCATGCACGATTTGTAATAACAGAGTGTCTTGTATTTTTAAAGAAAGTCTATTT
AATACAAGTGATTATATTAATTAACGGTAAGCATCAGCGGGTGACAAAACGAGCGTGCTTA
CTAATAAAATGTTAACCTCTGAGGAAGAATTGTGAAACTATCACTAATGGTAGCTATATCGA
AGAATGGAGTTATCGGGAATGGCCCTGATATCCATGGAGTGCCAAAGGTGAACAGCTCCT
GTTTAAAGCTATTACCTATAACCAATGGCTGTTGGTTGGACGCAAGACTTTTGAATCAATGG
GAGCATTACCCAACCGAAAGTATGCGGTCGTAACACGTTCAAGTTTTACATCTGACAATGAG
AACGATTGATCTTTCCATCAATTAAGATGCTTTAACCAACCTAAAGAAAATAACGGATCA
TGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGGAGATATACAAAAGCCTGATCGATCAAGTAGATACTACTAC
ATATATCTACAATAGACATCGAGCCGGAAGGTGATGTTTACTTTTCTGAAATCCCCAGCAAT
TTTAGGCCAGTTTTTACCCAAGACTTCGCCTCTAACATAAATTATAGTTACCAAATCTGGCAA
AAGGGTTAACAAAGTGGCAGCAACGGATTTCGCAAACCTGTCACGCCTTTTGTACAAAAGCC
GCGCCAGGTTTGCATCCGCTGTGCCAGGCGTTAGGCGTCATATGAAGATTTTCGGTATCCC
TGAGCAGGTGGCGGAAACATTGGATGCTGAGAACCATTTCATTGTTTCGTTGAGTTCGATGT
GTACCTATCCGACCAAGGCTTTGAACTATCTACCAGAAGTGTGAGCCCCTACCGGAAGGATT
ACTTCTCGGATGATGACTCTGATGAAGACTCTGCTTGCTATGGCGCATTCATCGACCAAAG
CTTGTCCGGGAAGATTGAACTCAACTCAACATGGAACGATCTAGCCTGAGGAACCGGGGATT
GCCGAAGTATCGACTCAACTTTTCAGAGGTAGTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACG
TTGCTGGCCGTACATTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATT
GATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCAACGA
CCTTTTGGAAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCA
TTGTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGGAACTGCAATTTGGAG
AATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGGTCTG
GCTATCTTGTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGG
AACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTA
TGAAACTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCAT
TTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATG
GAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCCTCATACTTGAAGCTAGGCAGGCTTATCTTGGACA
AGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTTCACTACGTGAAAGGCG
AGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCTAACAAATTCGTTCAAGCCGACGCCGCTTCGCG
GCGCGGCTTAAGTCAAGCGTTAGAGAGCTGGGGAAGACTATGCGCGATCTGTTGAAGGTGG
TTCTAAGCCTCGTACTTGCATGGCATCAATCAGAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCG
ACCATATGGGAGAGCTCCCAACCGGATGGATGCCATAGCCCT

M206S10 kodlu *E.coli* suşu:

TTGTGGGGGCGACGTTTCGCATGCTCCCGGGCCGCAATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCCGGG
ATCCCGGTCTCGCATGCACGATTTGTAATAACAGAGTGTCTTGTATTTTTAAAGAAAGTCTAT
TTAATAACAAGTGATTATATTAATTAACGGTAAGCATCAGCGGGTGACAAAACGAGCATGCTT
ACTAATAAAATGTTAACCTCTGAGGAAGAATTGTGAAACTATCACTAATGGTAGCTATATCG
AAGAATGGAGTTATCGGGAATGGCCCTGATATTCCATGGAGTGCCAAAGGTGAACAGCTCC
TGTTAAGGCTATTACCTATAACCAATGGCTGTTGGTTGGACGCAAGACTTTTGAATCAATG
GGAGCATTACCCAACCGAAAGTATGCGGTTCGTAACACGTTCAAGTTCTACATCTGACAATGA
GAACGTATTGATCTTTCCATCAATTAAGATGCTTTAACCAACCTAAAGAAAATAACGGATC
ATGTCATTGTTTCAGGTGGTGGGGAGATATACAAAAGCCTGATCGATCAAGTAGATACACTA
CATATATCTACAATAGACATCGAGCCGGAAGGTGATGTTTACTTTCTGAAATCCCCAGCAA
TTTTAGGCCAGTTTTTACCCAAGACTTCGCCTCTAACATAAATTATAGTTACCAAATCTGGCA
AAAGGGTTAACAAGTGGCAGCAACGGATTTCGCAAACCTGTCACGCCTTTTGTACCAAAGC
CGCGCCAGGTTTTCGATCCGCTGTGCCAGGCGTTAGGCGTCATATGAAGATTCGGTGATCC
CTGAGCAGGTGGCGGAAACATTGGATGCTGAGATCCATTTTCATTGTTTCGTGAAGTGTTCGAT
GTGCACCTATCCGACCAAGGCTTTGAACTATCTACCAGAAGTGTGAGCCCCTACCGGAAGGA
TTACATCTCGGATGATGACTCTGAAGAAAACTCTGCTTGCTATGGGGCATTCTGGATGAC
GCCTAACAATTCATTCAAGCGGACACCGTTTGGGGCGCGCTTTATTCAGGAGTTAACATCAT
GAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATTGACTCAACTATCAGAGGTAGTGGCGTCATCGAGC
GCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTGTACGGCTCCGCAGTGGATGCGGCCTGAA
GCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGC
GAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGGAGATTCTCCGC
GCTGTAGAAGTCAACATTGTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGC
GAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGTAGGTATCTTCGAGCCAGCCAC
GATCGACATTGATCTGGCTATCTTGTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAG
GTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAAT
GAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGC
TTACGTTGTCGCGCATTGTTGACAGCGCAGTAAACCGCAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCT
GCCGACTGGCAATGGAGCGCCTGCCGCGCCAGTATCAGCCCCTCATACTTGAAGCTAGGC
AGGCTTATCTTGGACAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTT
CACTACGTGAAAGGCGAGATACCAAGGTAGTCGGCAAATAATGTCTAACAATTCGTTCAA
GCCGACGCCGCTTCGCGGCGCGGCTTAACTCAAGCGTTAGAGAGCTGGGGAAGACTATGCG
CGATCTGTTGAAGGTGGTTCTAAGCCTCGTACTTTCGATGGCATCAATCACGTGAGTGAATT
CGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCCAACGCCGTTGGATGCCATAGC
CCA

M205Y10 kodlu *E.coli* suşu:

GTGTGGGCCGACGTTTCGCATGCTCCCGGGCCGCAATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGATGCC
ATCGCACGCTACGAGGCTTAGAACCACCTTCAACAGATCGCGCATAGTCTTCCCAGCTCTC
TAACGCTTGAGTTAAGCCGCGCCGCGAAGCGGCGTCGGCTTGAACGAATTGTTAGACATTAT
TTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCTTTCACGTAGTGAACAAATTCTTCCAAGTATGATCTGCG
CGCGAGGCCAAGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGCCTAGCTTCAAGTATGACGGGCTG
ATACTGGGCCCGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTTTGC
CGGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTTCGTCATCGCCAGCC
CAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTGTTC
AGGAACCGGATCAAAGAGTTCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTG
CTTTTGTGACGAAGATAGCCAGATCAATGTGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGA
ATGTCATTGCGCTGCCATTCTCAAATGTCAGTTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAAT
GATGTCGTCTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGG

AAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACG
GTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCC
GTACAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCACTACCTCTGAT
AGTTGAGTCGATACTTCGGCGATCACCGCTTCCCTCATGAGGTTAACTCCTGAATTAGCCGC
GCAGCAGAGTCTTCATCAGAGTCATCATCCGAGATGTAATCCTTCCGGTAGGGGCTCACACT
TTTGGTAGATAGTTCAAAGCCTTGGTCGGATAGGTGCACATCGAACACTTCACGAACAATGA
AATGGTTCTCAGCATCCAATGTTTCCGCCACCTGCTCAGGGATCACCGAAATCTTCATATGA
CGCCTAACGCCTGGCACAGCGGATCGCAAACCTGGCGCGGCTTTTGGTACAAAAGGCGTGA
CAGGTTTGCGAATCCGTTGCTGCCACTTGTTAACCTTTTGCCAGATTTGGTAACTATAATTT
ATGTTAGAGGGCAAGTCTTGGGTA AAAA CTGGCCTAAAATTGCTGGGGATTT CAGGAAAGT
AAACATCACCTTCCGGCTCGATGTCTATTGTAGATATATGTAGTGTATCTACTTGATCGATCA
GGCTTTTGTATATCTCCCCACCACCTGAAACAATGACATGATCCGTTATTTCTTTAGGTTGG
TTAAAGCATCTTTAATTGATGGAAGATCAATACGTTCTCATTGTGATGTA AAAA CTGAA
CGTGTACGACCGCATACTTTCCGTTGGGTAATGCTCCATTGATTCAAAGTCTTGCGTCCA
ACCAACAGCCATTGGTTATAGGTAATAGCTTTAAACAGGAGCTGTTACACTTTGGCCTCCA
TGAATATCAGGGCCATCCCGATAACTCCATTCTTCGATATAGCTACCATTAGTGATAGTTT
CACAATTCTTCTCAGAGGTTAACATTTTATTAGTAAGCATGCTCGTTTTGTCACCCGCTGAT
GCTTACCGTTAATTAATATAATCACTTGTATTAAATAGACTTTCTTTAAAAATACAAGACT
CTGTTATTACAAATCGTGCATGCCGTCGGGATCCCGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCC
TGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCCAAACGCCGTTGAAGCCATAGCCTCT

M207Y10 kodlu *E.coli* suşu:

AATGAGGGCCGAACGTTTGAATGCTCCCGGGCCGCAATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGA
TGCCATCGCAAGTACGAGGCTTAGAACCACCTTCAACAGATCGCGCATAGTCTTCCCCAGCT
CTCTAACGTTGAGTTAAGCCGCGCCGCGAAGCGGCGTTCGGCTTGAACGAATTGTTAGACAT
TATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTAGTGAACAAATCTTCCA ACTGATCT
GCGCGCGAGGCCAAGCGATCTTCTTGTTCAAGATAAGCCTGCCTAGCTTCAAGTATGACGGG
CTGATACTGGGCCGCGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTT
TGCCGGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCA
GCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTG
TTCAGGAACCGGATCAAAGAGTTCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTC
TTGCTTTTGTGAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACTGCA
AGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCAAATTGCAGTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGG
AATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAG
GGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTT
ACGGTCCCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGGTGGCTTCAGGCCCATCCACTGCGG
AGCCGTCCAATGTACGGCCAGCAACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCACTACCTC
TGAAAGTTGAGTCGATACTTCGGGGATCACCGCTTCCCCCGGAGGCATCAGAGTCATCATC
CGAGATGTAATCCTTCCGGTAGGGGCTCACACTTCTGGTAGATAGTTCAAAGCCTTGGTCGG
ATAGGTGCACATCGAACACTTCACGAACAATGAAATGGTTCTCAGCATCCAATGTTTCCGCC
ACCTGCTCAGGGATCACCGAAATCTTCATATGACGCCTAACGCCTGGCACAGCGGATTGCAA
ACCCGGGCGCGGCTTTTGGTACAAAAGGCGTGACAGGTTTGCGAATCCGTTGCTGCCACTTG
TTAACCTTTTGGCAGATTTGGTAACTATAATTTATGTTAGAGGGCAAGTCTTGGGTA AAAA
CTGGCCTAAAATTGCTGGGGATTT CAGGAAAGTAAACATCACCTTCCGGCTCGATGTCTATT
GTAGATATATGTAGTGTATCTACTTGATCGATCAGGCTTTTGTATATCTCCCCACCACCTGAA
ACAATGACATGATCCGTTATTTCTTTAGGTTGGTTAAAGCATCTTTAATTGATGGAAGATC
AATACGTTCTCATTGTGATGTA AAAA CTGAACTGTTACGACCGCATACTTTCCGTTGGGT
AATGCTCCCATGATTCAAAGTCTTGCCTCAACCAACAGCCATTGGTTATAGGTAATAGC
TTTAAACAGGAGCTGTTACCTTTGGCACTCCATGGAATATCAGGGCCATTCCCGATAACTC
CATTCTTCGATATAGCTACCATTAGTGATAGTTT CACAATTCTTCTCAGAGGTTAACATTTT
ATTAGTAAGCATGCTCGTTTTGTCACCCGCTGATGCTTACCGTTAATTAATATAATCACTTGT
ATTAAATAGACTTTCTTTAAAAATACAAGACTCTGTTATTACAAATCGTGCATGCCGTC
GGGATCCCGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCC
CAAACGCCGTTGGATGCATAGCCCC

M308Y10 kodlu *E.coli* suşu:

AAGTGGGGCCGACGTTTGAATGCTCCCGGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAT
GCCATCGCACTGCTACGAGGCTTAGAACCACCTTACAGATCGCGCATAGTCTTCCCCAGCT
CTCTAACGCTTGAGTTAAGCCGCGCCGCGAAGCGGGCGTTCGGCTTGAACGAATTGTTAGACAT
TATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTAGTGAACAAATTCTTCCAACCTGATCT
GCGCGCGAGGCCAAGCGATCTTCTTGTCCAAGATAAGCCTGCCTAGCTTCAAGTATGACGGG
CTGATACTGGGCCGCGCAGGCGCTCCATTGCCAGTCGGCAGCGACATCCTTCGGCGCGATTT
TGCCGGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTACATTTGCTCATCGCCA
GCCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTAGCGCCTCAAATAGATCCTG
TTCAGGAACCGGATCAAAGAGTTCCCTCCGCCGCTGGACCTACCAAGGCAACGCTATGTTCTC
TTGCTTTTGTGTCAGCAAGATAGCCAGATCAATGTCGATCGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCA
AGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCCAAATTGCAGTTCGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGG
AATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACTTCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAG
GGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTGCTTGATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTT
ACGGTCACCGTAACCAGCAAATCAATATCACTGTGGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGG
AGCCGTACAATGTACGGCCAGCAACGTGCGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCACTACCTC
TGAAAGTTGAGTCGATACTTCGGGGATAACCGCTTCCCCATGAGGTTATCGTTCATGTGA
GGTGAGTTCAATCTTCCGGACAAGCTCTTGGTCGATGAATGCCCCATAGCAAGCAGAGTCTT
CATCAGAGTCATCATCCGAGAAGTAATCCTTCCGGTAGGGGCTCACACTTTTGGTAGATAGT
TCAAAGCCTTGGTCGGATAGGTGCACATCGAACACTTCACGAACAATGAAATGGTTCTCAGC
ATCCAATGTTCCGCCACCTGCTCAGGGATCACCGAAATCTTCATATGACGCCTAACGCCTG
GCACAGCGGATCGCAAACCTGGCGCGGCTTTTGGTACAAAAGGCGTGACAGGTTTGCGAAT
CCGTTGCTGCCACTTGTTAACCCTTTTGCCAGATTTGGTAACTATAATTTATGTTAGAGGCCA
AGTCTTGGGTAAAACTGGCCTAAAATTGCTGGGGATTTAGGAAAGTAAACATCACCTTCC
GGCTCGATGCTATTGTAGATATATGTAGCGTATCTACTTGATCGATCAGGCTTTTGTATATC
TCCCACCACCTGAAACAATGACATGATCCGTTATTTTCTTTAGGTTGGTTAAAGCATCTTTA
ATTGATGGAAAGATCAATACGTTCTCATTGTCAGATGTAAACTTGAACGTGTTACGACCGC
ATACTTTCCGTTGGGTAATGCTCCCATGATTCAAAGTCTTTCGCTCCAACCAACAGCCATTG
GTTATAGGTAATAGCTTTAAACAGGAGCTGTTACCTTTGGCACTCCATGGAATATCAGGGC
CATTCCCGATAACTCCATTCTTCGATATAGCTACCATTAGTGATAGTTTACAATTTCTCCTC
AGAGGTTAACATTTTATTAGTAAGCATGCTCGTTTTGTACCCGCTGATGCTTACCGTTAATT
AATATAATCACTTGTATTAATAGACTTTCTTTAAAAATACAAGACACTCTGTTATTACAAAT
CGTGCATGCCGTCCGGGATCCCGAATCACAGAGGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCC
ATATGGGAGAGCTCCCCAAACGCCGTTGGATGCATAGGCCCC

9. ÖZGEÇMİŞ

Şeyma UYSAL MANAV 1979'da İstanbul'da doğdu. Lise öğrenimini Fatih Kız Lisesi'nde tamamladı. 1997 yılında lisans eğitimine başladığı İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2001 yılında mezun oldu. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2006 yılında "İribaş Deniz Deniz Kaplumbağalarının (*Caretta caretta*) Mikrosatellit DNA Lokusları Kullanımı ile İdentifikasyonu" başlıklı Yüksek Lisans Tezini tamamlayarak Adli Fen Bilimleri Uzmanı ünvanını aldı. 2006 yılında İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine başladı.

