T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİLTRASYON YÖNTEMİ İLE SULARDAKİ KOLİFORM BAKTERİLERİN TESPİTİ İÇİN BİYOSENSÖR TASARIMI

ABDURRAHİM BULUT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİLTRASYON YÖNTEMİ İLE SULARDAKİ KOLİFORM BAKTERİLERİN TESPİTİ İÇİN BİYOSENSÖR TASARIMI

ABDURRAHİM BULUT
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. BÜNYEMİN ÇOŞUT

GEBZE
2021

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

A BIOSENSOR DESIGN FOR DETERMINATION OF COLIFORM BACTERIA USING FILTRATION METHOD IN WATER

ABDURRAHİM BULUT

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. BÜNYEMİN ÇOŞUT

GEBZE

2021

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 22/01/2021 tarih ve 2021/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/02/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Abdurrahim BULUT'un tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : PROF. DR. BÜNYEMİN ÇOŞUT

ÜYE : PROF. DR. MAHİR İNCE

ÜYE : DOÇ. DR. ESRA TANRIVERDİ EÇİK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

..…/……/…… tarih ve ……/…..... sayılı kararı.

ÖZET

Günümüzde kaynağı suya bağlı birçok hastalık görülmektedir. Suların dışkı ve lağım yoluyla kirlenmesi halk sağlığını tehdit etmektedir. Koliform bakteri analizleri su kalitesini göstermek için indikatör testler olarak kullanılırlar. Bu nedenle su kalitesinin belirlenmesinde genellikle sudaki koliform miktarının analizi yapılırken, bu analizler 24 saat gibi çok uzun bir sürede gerçekleştirilebilmektedir.

Tezin amacı; sudaki koliform miktarını yüksek maliyetli laboratuvarlarlara ihtiyaç duymaksızın, kısa sürede sonuç veren ve yüksek hassasiyete sahip bir biyosensör sistemi geliştirmektir. Bunun için enzim-substrat yöntemine dayalı 4 farklı yöntem denenmiştir. Bunlar; manyetik nanopartikül (MNp) yöntemi, hidrojel yöntemi, plunger tüp yöntemi ve şırınga ucu filtre yöntemleridir.

Tez kapsamında manyetik nanopartikül yöntemi ile 3 saat içerisinde belirlenen en düşük bakteri miktarı 10^5 Cfu olmuştur. Hidrojel yöneminde 10^5 ve 10^4 Cfu ile yapılan denemede ilk 30 dk içinde renk oluşmaya başlamış, 1 saat sonunda tam tesbitin olduğuna dair mavi renk net olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte, 10^3 ve 10^2 Cfu miktarlarında 24 saat içinde sonuç verirken, 10 ve 1 Cfu değerlerinde herhangi bir sonuç vermediği gözlenmiştir. Plunger tüp yöntemiyle yapılan çalışmalarda 30 dakika içerisinde en düşük 10^4 Cfu konsantrasyonu belirlenebilmiştir. Ancak daha düşük miktarlarda herhangi bir sonuç alınamamıştır.

Şırınga ucu filtre yöntemiyle, inkübasyon yapılan yöntem ile en kısa sürede en düşük bakteri miktarı belirlenmiştir. İnkübasyonlu yöntemde 10^4 ve 10^3 Cfu ilk 10 dakikada sonuç verirken, 10^2 Cfu 1 saat içinde sonuç vermeye başlamıştır. 20 saat sonunda 10 Cfu'da da renk gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri Tayini, Koliform, E.Coli, Analiz, Manyetik Nanopartikül, Plunger Tüp, Şırınga Ucu Filtre, Hidrojel.

SUMMARY

At the present time, many diseases related to water source are seen. Pollution of water by faeces and sewage threatens public health. Coliform bacteria analyzes are used as indicator tests to show water quality. For this reason, while the amount of coliform in the water is generally analyzed in determining the water quality, these analyzes can be performed in a very long period of 24 hours.

The aim of the thesis; to develop a highly sensitive biosensor that determines the amount of coliform in the water without the need for high-cost laboratories, giving results in a short time. For this purpose, 4 different methods based on enzyme-substrate method have been tried. These methods; magnetic nanoparticle (MNp) method, hydrogel method, plunger tube method and syringe filter methods.

A minimum of 10^5 Cfu bacteria was determined within 3 hours with the Magnetic Nanoparticle Method. In the experiment performed with 10^5 and 10^4 Cfu in the hydrogel method, the color started to form within the first 30 minutes, and the blue color was clearly observed after 1 hour. 10^3 and 10^2 Cfu gave results within 24 hours, while 10 and 1 Cfu did not give any results. With the Plunger tube method, the lowest 10^4 Cfu could be determined within 30 minutes. With lower amounts, no results were obtained.

With the syringe filter method, the lowest amount of bacteria was determined in the shortest time with the incubation method. While 10^4 and 10^3 Cfu yielded results in the first 10 minutes in the incubation method, 10^2 Cfu started to give results within 1 hour. Color was observed at 10 Cfu after 20 hours.

Keywords: Bacteria Determination, Coliform, E.Coli, Analysis, Magnetic Nanoparticle, Plunger Tube, Syringe Filter, Hydrogel.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde, gerekli bütün yardım, tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, karşılaştığım problemlerin çözümünde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sabırlı tez danışmanım sayın Prof. Dr. Bünyemin ÇOŞUT'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Yasin Abdullah USLU'ya ve çalışma arkadaşım Pelin ALTAN'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, ilgisini, anlayışını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübesiyle hayatıma yön veren rahmetli dedem Hacı İmdat BULUT'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLOLAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Suyun Önemi	5
2.1.1 Suyun Temizliğinin Önemi	5
2.1.2 Suyun Mikrobiyel Kontaminasyonu	6
2.1.3 Mikroorganizmaların Suda Yaşaması	7
2.1.4 Sulardaki Mikrobiyolojik Kirliliğin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi	7
2.2 Bakteriler	9
2.2.1 Enterobacteriaceae Genel Özellikleri	10
2.2.2 Koliform Grubu Bakterilerin Genel Özellikleri	11
2.2.3 Escherichia Coli	13
2.2.3.1 E. coli’nin Hücre Yapısı	15
2.2.3.1.3 Makroskobik Morfoloji	16
2.2.3.1.4 Mikroskobik Morfoloji	16
2.2.3.2 Antijenik Yapısı	17
2.2.3.3 Biyolojik Özellikleri	17
2.2.3.4 Kimyasal Yapısı	18
2.2.3.5 Biyokimyasal Özellikleri	18
2.2.3.6 Patojenik Özellikleri	19
2.2.3.7 Üreme Özellikleri	20
2.2.3.8 Escherichia Coli Türleri	21
2.2.3.9 Escherichia Coli'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar	22

2.3 Mikroorganizma Tayininde Kullanılan Yöntemler 24
2.3.1 Klasik Yöntemler 26
2.3.1.1 Kuru Madde Tayinine Dayalı Yöntem 26
2.3.1.2 Mikroskobik Sayım Yöntemi 26
2.3.1.3 En Muhtemel Sayı Yöntemi 26
2.3.1.4 Besiyeri Yöntemi 28
2.3.1.4.1 Besiyeri Çeşitleri 28
2.3.1.4.2 Sularda Koliform Grubu Bakterilerin Analizinde Kullanılan Besiyerleri 29
2.3.1.5 Membran Filtrasyon Yöntemi 33
2.3.1.6 Hızlı Sayım Yöntemleri 39
2.3.1.6.1 MUG Yöntemi 39
2.3.1.6.2 Doğrudan Epifloresant Filtreleme Tekniği (DEFT) 39
2.3.1.6.3 Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay (ELISA) 40
2.3.1.6.4 Akış Sitometrisi 40
2.3.1.6.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 41
2.3.1.6.6 İmmunomanyetik Ayırmaya Dayalı Yöntemler 41
2.3.1.6.7 Raman Spektroskopisi 42
2.4 Nanopartiküller ve Biyolojik Uygulama Alanları 44
2.4.1 Altın Nanopartiküller 44
2.4.2 Manyetik Nanopartiküller 44
2.4.3 Kuantum Noktalar 45
2.4.4 Karbon Nanopartiküller 46
2.5 Biyosensörler 47
2.5.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu 47
2.5.2 İdeal Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler 48
2.5.3 Biyomoleküller (Biyoreseptörler) 49
2.5.4 Dönüştürücüler (Transistörler) 50
2.5.5 Biyosensörlerin Sınıflandırılması 50
2.6 Hidrojeller 51
2.6.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması 51
2.6.2 Hidrojellerin Kullanım Alanları 53
2.7 Enzimler 53
2.7.1 Enzimlerin Özellikleri 54

2.7.2 β-Glukozidaz Enzimi 56
3. DENEYSEL BÖLÜM 57
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 57
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler 58
3.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 58
3.3.1 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 58
3.3.1.1 10x TBE (Tris-Borate-EDTA) Tampon Çözeltisi Hazırlanması 58
3.3.1.2 Serum Fizyolojik Çözeltinin Hazırlanması 58
3.3.2 Besiyerlerinin Hazırlanması 59
3.3.2.1 EMB (Eosin Methylene Blue Lactose Sucrose) Agarlı Besiyeri Hazırlanması 59
3.3.2.2 LTB (Lauryl Tryptose Broth) Broth Hazırlanması 59
3.3.3 Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması 59
3.4 Yöntemler 61
3.4.1 Manyetik Nanopartikül (MNp) Yöntemi 61
3.4.1.1 Manyetik Nanopartikül (MNp) sentezi 61
3.4.1.2 Arjinin Kaplı Manyetik Nanopartikül sentezi (Arg-MNp) 62
3.4.1.3 Test Striplerinin Hazırlanması 62
3.4.1.4 Arg-MNp ile Yapılan Çalışmalar 62
3.4.2 Hidrojel Yöntemi 63
3.4.2.1 Hidrojel Sentezi 63
3.4.3 Plunger Tüp Yöntemi 63
3.4.4 Şırınga Ucu Filtre Yöntemi 64
3.4.4.1 Substrat İçeren Jelin Hazırlanması 64
3.4.4.2 Şırınga Ucu Filtre Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar 65
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 66
4.1 Arg-MNp ile yapılan çalışmalar 66
4.2 Hidrojel Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar 67
4.3 Plunger Tüp Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar 67
4.4 Şırınga Ucu Filtre Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar 69
4.4.1 İnkübasyonlu Yöntem 70
4.4.2 İnkübasyon İçermeyen Yöntem 72
4.5 Tartışma 73

KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ 86

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	**Açıklamalar**
β - GUR	: B – D – Glukuronidaz
AOAC	: Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği
Apha	: Amerikan Halk Sağlığı Derneği
Arg-MNp	: Arjinin Kaplı Manyetil Nanopartikül
aw	: Minimum Su Aktivitesi Değeri
BGBB	: Brillant Green Bile Broth
CFU	: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
DAPI	: 4′,6-Diamidino-2-phenylindole
DEFT	: Doğrudan Epifloresant Filtreleme Tekniği
E.coli	: Escherichia coli (Koli Basili)
EAggEc	: Enteroagregativ E.coli
ECB	: Escherichia Coli Broth
EHEC	: Enterohemorajik E. Coli
EIEC	: Enteroinvasif E. Coli
Elisa	: Enzim bağlı immünosorbent deneyi
EMB	: Eozin Metilen Mavisi Agar
EMS	: En Muhtemel Sayı Yöntemi
EPEC	: Enteropatojenik E. Coli
ETEC	: Enterotoksijenik E. Coli
g	: Gram
IgG	: Immune Globuline G
IMA	: İmmunomanyetik Ayırmaya
IMVEC	: İndol, Metil red, Voges - Proskauer, Eijkman ve Sitrat, (Citrat) testleri
IR	: Kızılötesi
IS	: Insertron Serisi
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
L	: Litre
LB	: Laktoz Broth
LST	: Lauril Sülfat Triptoz Broth

LT	: Labil Toksin
Maldı-MS	: Matris Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Kütle Spektrometresi
m-FC Agar	: m- Fekal Koliform Agar
mL	: Mililitre
MNp	: Manyetik Nanopartikül
MUG	: 4-Metilenumbelliferil - B- D - Glukuronidaz
NA	: Nutrient Agar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	: Darbeli Alan Jel Elektroforezi – (Pulsed- Field Gel Electroforesis)
PTFE	: Politetra Floroetilen
ST	: Stabil Toksin
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
TW	: Tripton Su
UV	: Ultraviyole
VRB	: Violet Red Bile
VRBL	: Violet Red Bile Lactose
VTEC	: Verotoksijenic E.Coli
X - Gal	: 5- Bromo - 4 Kloro-3- İndolil - B-D- Galaktopiranosid (5- Bromo - 4 Chloro-3- İndolyl – B-D- Galactopyranoside)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	Protista Alemine Dahil Olan Mikroorganizmaların Sınıflandırılması.	9
2.2:	En Yaygın Bakteri Şekilleri.	10
2.3:	E. Coli Ve E. Coli Hücre Bileşenlerinin Şematik Gösterimi.	15
2.4:	Bakterilerin Koloni Morfolojileri.	16
2.5:	Vrb Agar'da Koliform Bakteriler.	30
2.6:	Chromocult Coliform Agar' da Koliform Bakteriler.	31
2.7:	M-Fc Agar'da Koliform Bakteriler.	32
2.8:	Endo Agar'da Koliform Bakteriler.	33
2.9:	Selüloz Asetat Filtre Gözenek Yapısı.	35
2.10:	Membran Filtre Kesiti.	35
2.11:	Membran Filtrasyon.	
2.12:	Stokes ve Anti-Stokes Türü Raman Saçılması Olaylarının Molekül Enerji Diyagramı ile Açıklanması.	43
2.13:	Stokes ve Anti-Stokes Hatları.	43
2.14:	Biyosensör Çalışma Mekanizması Genel Gösterimi.	48
2.15:	Enzim - Substrat Mekanizması.	54
3.1:	Bakteri Dilüsyon Serisi.	60
3.2:	Bakteri Dilüsyonlarının Petriye Ekimi.	60
3.3:	24 Saat 37°C'de İnkübe Edilen Bakteri Ekimi Yapılmış Emb Agarlı Petriler.	61
3.4:	Plunger Tüp.	64
4.1:	Arg – Mnp'e Bağlanmamış Bakterilerin Emb Agarda Çoğalması.	66
4.2:	Strip Üzerine Damlatıldıktan 3 Saat Sonra Sonuçlar; A) 10^5 B) 10^4 C) 10^3 Cfu.	66
4.3:	10^5 Cfu İle 30 Dakika İçinde Mavi Renk Oluşmaya Başlaması.	67
4.4:	10^4 Cfuluk Bakteri Çözletisi Plunger Tüpten Tüpten Geçirildikten Sonra Üstte Kalan Kısmın Emb Agarda Kontrolü.	67
4.5:	Strip Üzerine İlk Koyulduğunda.	68
4.6:	30. Dakikada Striplerdeki Renk Oluşumu.	68
4.7:	1. Saat Sonunda Striplerdeki Renk Oluşumu.	68

4.8: Bakteri Çözeltileri Şırınga Ucu Filtreden Geçtikten Sonra – 1 (10^2 Cfu, 10 Cfu, 1 Cfu). 69
4.9: Bakteri Çözeltileri Şırınga Ucu Filtreden Geçtikten Sonra –2 (10^4 Cfu, 10^3 Cfu). 69
4.10: 10^4 Cfu Bakteri İçeren Standart – 1 Saat İnkübasyondan Sonra. 70
4.11: 10^3 Cfu Bakteri İçeren Standart – 2 Saat İnkübasyondan Sonra. 70
4.12: 10^2 Cfu Bakteri İçeren Standart – 2.5 Saat İnkübasyondan Sonra. 71
4.13: Bakteri İçeren Standartlar – A) Başlangıçta B) 24 Saat İnkübasyondan Sonra. 71
4.14: 10^4 Cfu Bakteri İçeren Standart – 1 Saat Bekledikten Sonra. 72
4.15: 10^3 Cfu Bakteri İçeren Standart – 2 Saat Bekledikten Sonra. 72
4.16: 10^2 Cfu Bakteri İçeren Standart – 2.5 Saat Bekledikten Sonra. 72

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
2.1:	E. Coli'nin Üreme Koşulları.	21
2.2:	Bazı Patojenik E. Coli Alt Gruplarının Virulens Faktörleri, Klinik Tablo Ve Diare Tipleri.	22
3.1:	Tez Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler.	57
3.2:	Tez Kapsamında Kullanılan Cihazlar.	58
4.1:	Sonuçların Karşılaştırılması.	75

1. GİRİŞ

Yaşam için gerekli ve en önemli vazgeçilmez olan su ihtiyacı gün geçtikçe önemini daha da arttırmaktadır. İçilebilir su kaynaklarının hızla tüketilmesi varolan su kaynaklarının doğru ve hijyenik kullanıması ihtiyacını beraberinde getirmiştir. Bugün sularla ilişkili olarak birçok hastalık görünmektedir. Suyun içinde bulunan fekal kirleticiler dışkı ve lağım sularıyla kirletilmesi toplum sağlığına ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Dışkı ve lağım suyu ile kontamine olmuş sularda su miktarının fazla olması sebebiyle patojen mikropların izole edilmesini ve teşhisini güç hale getirmektedir. Dolayısıyla dışkı ve lağım sularıyla kontamine olup olmadığının belirlenmesi için gösterge olarak bilinen bakteriler Enterococcus faecalis, Escherichia coli ve Clostridium perfingens'tır [1].

Koliform grup olarak adlandırılan bakteriler doğada yaygın bir şekilde bulunurlar ve buna bağlı olarak pek çok çevresel örnek ile işlenmemiş gıdaların hammaddelerinde doğal flora olarak görülmektedirler. Dolayısı ile minimum düzeyde işlem görmüş gıdaların bir kısmında koliform grup bakterilere rastlanması kabul edilir ve pek çok ülkenin kodeksinde bazı gıdalarda düşük sayılarda bulunmalarına izin verilmektedir [2].

İnsan sağlığı açısından, patajonik kirlenme bulaşmış gıda ürünlerin tüketilmesinin ciddi olumsuz etkileri bulunmaktadır. Campylobacter jenuni, Listeria monocytogenes, Salmonella, Escherichia coli O157:H7 ve Bacillus cereus gibi patojenik bakterileriler besin kaynaklı olup, hızlı ve hassas olarak tespit edilmesinin büyük önemi vardır. Patojen bakterilerin tespitinde kullanılan bazı yöntemler; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ATP biyolüminesans, mikroskobik yöntemler, immünomanyetik ayırma yöntemleri, nükleik asit prob yöntemi, elektronik gürültü teknikleri, matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF-MS) ve geleneksel sayım yöntemleri sayılabilir [3], [4]. Bu yöntemlerin birçoğunun bakteri tayininde, harcanan sürenin uzunluğu, karışık işlem basamaklarının olması, pahalı cihaz ve sarf malzeme kullanılması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle immünomanyetik ayırmada daha fazla işlem basamağı gerektirmesi ve daha fazla yıkama işlemi gerektimesinden dolayı, hızlı ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi önem kazanmışıtır [3].

Koliform grup bakteriler ve E. coli analizi konusunda numunedeki hedef/ beklenen bakteri sayısına göre dökme plak, yayma plak, membran filtrasyon ve en muhtemel sayı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu analizlerde kullanılan besiyerleri standart yöntemlerde belirtilmiş olmakla birlikte kullanıcılar başka besiyeri çeşitlerini de tercih etmektedirler. Bununla birlikte aynı besiyeri çeşidi üzerinde farklı ticari markalar küçük modifikasyonlar yapmaktadırlar [2].

Türkiye'de içme ve kullanma suyunda koliform grup bakteri analizinde; membran filtrasyon yöntemi ve ISO 9308-1:2000 numaralı standartta geçen ismi ile "Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate" besiyeri kullanılmaktadır [2].

Günümüzde en fazla önem arzeden E. Coli türü O157:H7 serotipidir. E. Coli O157:H7 serotipi ilk defa Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da 1982 yılında meydana gelen salgın neticesinde tanımlanmıştır. Bu olaydan sonra bazı ülkelerde de benzer salgınlar ortaya çıkmıştır. Günümüzde O157:H7 serotipinin en önemli kaynağı süt ineklerinin bağırsakları olarak kabul görmüştür. İnek dışkısı sayesinde sütüne, etine, ayrıca toprağa ve suya bununla birlikte her yere bulaşabilen bu serotip Japonya'da 1996-1997 yılları boyunca tespit edilen ve etkisini günümüzde de devam ettiren ayrıca salgın hastalıkla olduğu gibi bitkisel ürünler sayesinde insanlara da bulaşabilmektedir [1].

Bazı çalışmalar da aşırı yağan yağmurlar sebebiyle içme suyu şebekesinde yağmur suyu ve hayvan dışkısının birbirine karıştığı ve klorlamanın da az ve yetersiz kalması sonucu bu tip salgılların ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Ülkemizde ise henüz O157:H7 serotipine bağlı bir salgın ortaya çıkmamıştır. Fakat bu durum, O157:H7 serotipinin ülkemizde olmadığının ya da hastalıklara sebep olmayacağının bir göstergesi değildir. İçme sularında bulunan O:157 serotipi basit bir şekilde klorlama ile baskı altına alınabilmektedir [5].

Günümüzde geleneksel bakteri analiz yöntemlerine alternatif oluşturacak, maliyet olarak daha ucuz, kolaylıkla her yere taşınabilir, kolay ve herkes tarafından uygulanabilir, işlem basamaklarını en aza indirebilecek ve hızlı yanıt veren metodlar araştırılmaktadır [6], [7]. Kullanılan analiz metodlarına alternatif oluşturan, maliyeti düşüren, kolay erişilebilir ve yeni tasarımlar çalışmamıza yol gösterecektir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bütün canlılar için yaşamsal bir değeri olan su, doğal döngüsü çerçevesinde atmosfere buhar olarak karışmakta ve buhar halindeyken temiz olduğu kabul edilemektedir. Ancak su buhar halinden yoğunlaşarak yağmur ya da kara dönüşerek dünya yüzeyine ulaşana kadar değişik sebeplerden (havada bulunan gazlar, tozlar, duman, vb) ötürü kirlenmektedir. Günümüzde kimyasal ve biyolojik olarak temiz içme suyuna ulaşmanın güç olması, özellikle insanların temiz suya zor ulaşma endişesiyle birlikte talebin artmasını dünya genelinde milyar dolarla ifade edilebilecek bir sektörün doğmasına sebebiyet vermiştir. Koliform grubu bakterilerin analizleri suyun kalitesini gösteren belirteçler olarak kullanılırlar. Bundan dolayı su kalitesinin tespiti için çoğunlukla sudaki koliform miktarının tayini yapılmaktadır.

Tezin amacı; sudaki koliform miktarını yüksek maliyetli laboratuvarlarlara ihtiyaç duymaksızın belirleyen, kısa sürede sonuç veren, hassasiyeti yüksek bir biyosensör platformu geliştirmektir. Bunu başarabilmek amacıyla tez kapsamında dört farklı yaklaşımla çalışmalar yapılmıştır. Bakteriler parçalandıktan sonra açığa çıkan enzimin bir substrat ile bağlanmasıyla oluşan rengin gözlenmesi prensibine dayalı kolorimetrik bir yöntem ile bakteri miktar tayini amaçlanmıştır.

Tez kapsamında denenen ilk yöntemde manyetik ayırma ile zenginleştirme yapılmıştır. Bu amaçla manyetik nanopartikül (Arg-MNp) sentezi yapılmıştır. Sentezlenen bu MNp'ler suyun içine konduktan sonra, bakterilerin bağlanması için yeterince beklenmiş ve MNp'ler mıknatıs yardımıyla tutularak fazla su dökülmüştür. Bu şekilde zenginleştirme işleminden sonra, lizing çözeltisi ile parçalanma yapılmış, ardından substrat emdirilmiş strip üzerine damlatılmıştır. Test stribi üzerinde oluşan renk değişimine bağlı olarak bakteri miktarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Tez kapsamında denenen ikinci yöntemde ise substrat ve lizing çözeltisini bir arada içeren jeller hazırlanmış ve tüplerin içine koyularak kurutulmuştur. Kurutulan jeller üzerine örnek su numuneleri konarak, oluşan rengin yoğunluğuna ve oluşma zamanına bakılmıştır.

Üçüncü yöntem olarak Plunger tüp kullanılarak zenginleştirme yapılmış ve lizing çözeltisi ile parçalanma işlemi tamamlandıktan sonra substrat emdirilmiş test stribi ile renk değişiminden yararlanarak bakteri varlığı belirlenmesi hedeflenmiştir.

Tez kapsamında denenen son yöntem hidrojel yöntemi ile benzer prosedüre sahip olup, substrat ve lizing çözeltisi içeren jeller şırınga ucu filtre içine emdirilmiş ve kurutulmuştur. Örnek su numunesi şırınga ucu filtrelerden geçirilerek, renk oluşumu ve süresi belirlenmiştir. Bu yöntemin hidrojel yönteminden en önemli farkı, analiz edilen su numunesi şırınga ucu filtreden geçirilerek zenginleştirme yapılmış olmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Suyun Önemi

Dünyada bulunan suyun %97'si tuzlu su, %2'si buz ve %1'i insanların tüketiminde bulunmaktadır [8]. Su hayat için vazgeçilmez bir bileşendir. Canlıları oluşturan hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri yalnızca su ile mümkün olmaktadır. Su fiziksel, kimyasal ve biyolojik vazifeleriyle canlıların olmazsa olmaz gıda maddesidir. Su insanların %62-67'si, hayvanların %60-70'i, bitkilerin %70-90'ını oluşturmaktadır. Bir insan hiç besin madddesi yemeden yalnızca su içerek 60-80 gün arasında hayatta kalabildiği halde, susuz olarak ancak 7-12 gün arasında yaşayabilmektedir [9]. Yeryüzünde sürekli döngü şeklinde olan su tüketim noktasına gelinceye kadar bazı kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik kirleticilerler ile kirletilmektedir [10]. Gelişme aşamasında olan bitki ve hayvanların yeteri kadar su alamadıklarında iyi gelişemedikleri ayrıca gelişimlerinin durduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber iyi kalitede ve bol su verilen hayvan ve bitkilerin iyi geliştikleri ve verim yüzdelerinin arttığı belirlenmiştir [9].

Su, canlı yaşamı üzerine önemli etkilerinden ötürü canlı vücudunun ve uygarlıkların esas maddesi olarak bilinir. Yaşam su ile varolduğu gibi, uygarlıklar da suya yakın yerlerde doğup ve gelişirler. Örneğin; eski şehirler ve eski uygarlıklar hep su kenarlarının yakınına kurulmuşlardır. Şehirlerin büyümesi gelişmesi ve suya olan ihtiyacın artmasına, suyun halka ulaştırılması zorunluluğunu doğurmuştur. Eski Türk, Roma eserlerinde bunlar görülmektedir. Şehirleri yönetenler tarafından yapılmış olan su kanalları, su sarnıçları, su havuzları, hamamlar ve çeşmeler bunun en iyi örneklerindendir [9].

2.1.1. Suyun Temizliğinin Önemi

Suyun temiz olmasının önemli iyi bilinmediği zamanlarda, suyun temizliğine yeteri kadar önem verilmemiştir. Bir yerden başka bir yere akan suyun temiz olduğuna, suyun renksiz, kokusuz, ferah ve içimi hoş olan bir suyun temizliğine ve iyiliğine inanılmıştır. Bunun sonucunda birçok hastalığa ve salgınların çıkmasına neden olmuştur. Günümüzde içme suyu ve kullanma suyu şehirlerin ve endüstrinin artması

nedeniyle, bazı kimyasal maddelerleden, radyoaktif maddelerden, çeşitli mikroorganizmalardan, parazitlerden ve mantarlardan oluşan biyolojik kirleticilerle gün geçtikçe daha da fazla kontamine olma tehdidiyle karşı karşıyadır [9], [11].

2.1.2. Suyun Mikrobiyel Kontaminasyonu

Bir su kaynağının içilebilirliği veya kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için fiziksel ve kimyasal özellikleri ile birlikte mikrobiyolojik olarak kalitesinin de belirlenmesi şarttır. Temiz su, mikroorganizmaların üremesine ve uzun süre yaşamsal faaliyetlerde bulunmasına çok elverişli değildir. Bununla birlikte suyun içinde bulunan besleyici maddeler ve organik maddeleri fazla miktarda içeren sularda mikroorganizmalar kolayca çoğalabilirler. Kentler su ihtiyacını genel olarak göl, dere ırmak ve baraj gibi yüzey kaynak sularından karşılamaktadır. Bu suların mikroorganizmalar ile kirlemesine birçok bulaşma kaynağı neden olmaktadır. İnsanlar ve hayvanlar için olan kullanım sularında ve özellikle dışkı ve lağım suyundan kaynaklı kirlenme büyük öneme sahiptir. Böyle kontamine olan suların içeriğinde çok fazla mikroorganizma vardır ve bu mikroorganizmaların önemli bir bölümü Vibrio Cholera, Shigella dysanteriae, Salmonella paratyphi, E. Coli ve Salmonella typhi gibi hastalık yapıcı bakterilerdir. Böyle sularda aynı zamanda enfeksiyöz hepatit virusu, norwalk virüs, enteroviruslar, rota virüs, reo virus, ve adeno virus gibi tehlikeli viral bulaşıcılarda bulunur [12].

İçme ve kullanım sularıyla alakalı varolan en yaygın sağlık problemi, suların hayvanların veya insanların artıklarıyla kirlenmesidir. Suyun içine bulaşan dışkı, patojen mikroorganizmalar içeriyorsa hastalık riskine sebep olabilirler. İçme suyu ya da kullanma suyu olarak veya gıdaların hazırlık aşamasında kullanılan kontamine olmuş sular, yeni hastalıkların oluşmasına sebep olmaktadır. Suların içinde bulunan patojen virüsler, bakteriler ve protozoonlar bazı zamanlarda hafif, bazı zamanlarda ciddi, bazı zamanlarda ise hastanın ölümüne sebebiyet veren diare, hepatitis dizanteri veya tifo gibi hastalıklara yol açmaktadırlar. Kontamine sularda bulunan ve toksin üreten Cyanobacterler kendileri suda bulunmadığı halde üretmiş oldukları toksinler ile sağlık sorunlarına sebep olurlar [12]. Şehirlerin ihtiyacı olan sular, yapay göl ve barajlardan çeşitli arıtmalardan geçiriliyorsa da tüketiciye ulaşana kadar çeşitli kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminasyonlara uğrarlar. Bu yüzden günümüzde içme

suyu olarak şişeleme işlemi yapılmış olan sulara ilginin fazlalaştığını söyleyebiliriz. Toprağın en alt bölümlerinden süzülerek yeryüzene ulaşan doğal kaynak suları mikrobiyel bakımdan güvenli ve sağlıklı olduğu kabul edilebilir. Fakat bu suların elde edildiği bölgelerin kanalizasyon atıkları ihtiva etmesi veya dolum tesislerinde hijyen kurallarına yeteri kadar riayet edilmemesi halinde, bu sularda da patojenlerin bulunma olasılığı söz konusu olmaktadır. Şişeleme fabrikalarında en ciddi mikrobiyel bulaşma kaynakları dolum ekipmanları, dolum araçları, su depoları, boru hatları ve iyi temizlenmemiş olan dönüşümlü şişeler olarak gösterilmektedir [9].

Türk Standartları Enstitüsü'ne göre içme ve kaynak suyunun 100 ml'sinde Pseudomonas aeruginosa, fekal koliform, E. coli, koliform, fekal streptokok, salmonella, hastalık yapan patojen yosunları, parazitleri, ve diğer mikroskobik canlıları ihtiva etmemesi gerekir. Buna ek olarak, örneklerin 50 ml'sinde aerob sporlu sülfat redükte eden bakterileri ihtiva etmemesi gerekir [12].

2.1.3. Mikroorganizmaların Suda Yaşaması

Sulara çeşitli yollarla bulaşmış olan patojenenik mikroorganizmaların, su içinde kısa veya uzun bir süre yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri, suyun ihtiva ettiği maddelerin cinslerine ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Besleyici maddeler ve organik maddeleri çok fazla ihtiva eden sularda mikroorganizmalar kolaylıkla yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmektedirler. Patojen mikroorganizmaların sularda çoğalması ve yayılması, salgın hastalıklara sebebiyet vermektedir. Bu açıdan patojen mikroorganizmalarla kontamine sular toplum sağlığına değişik tehlikeler doğurabilirler [9], [11].

2.1.4. Sulardaki Mikrobiyolojik Kirliliğin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

İnsan sağlığı açısından içilebilir kalitede olmayan suların, içerdiği ve taşıdığı canlı veya cansız maddeler çok çeşitli hastalıklara neden olabilirler. Suyun içinde taşıdığı çözünmüş veya çözünmemiş olan inorganik maddeler, canlı mikroorganizmalar ve bitkisel materyallerle birçok hastalığın ortaya çıkmasında etkili olur. Halk sağlığı için tehlike oluşturan tifo, dizanteri ve kolera gibi salgın hastalıklarda, hayvanları tehdit eden anthraks, şap ve sığır vebası gibi büyük

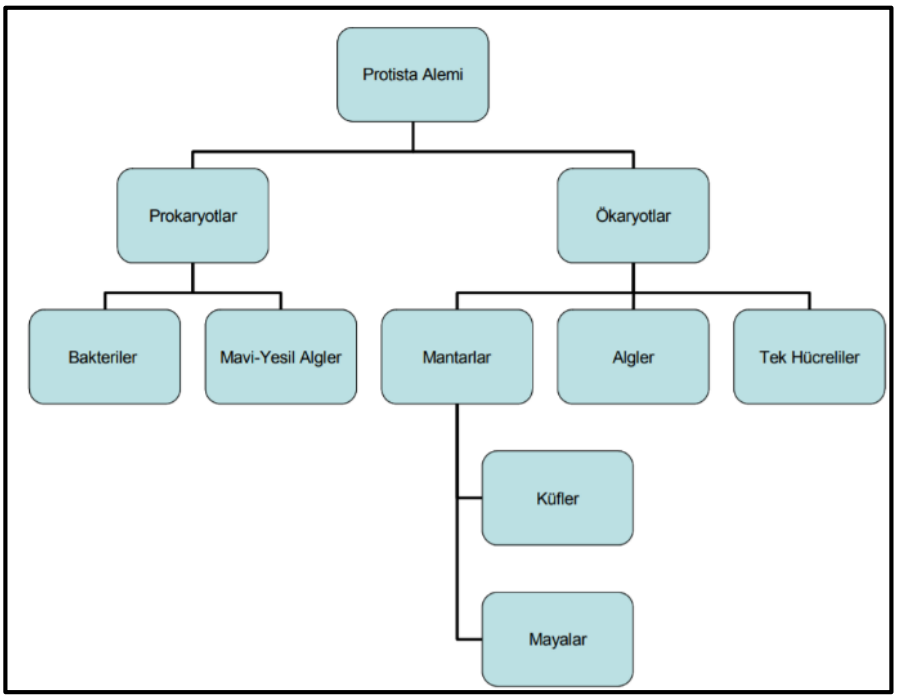
epidemilerde suyun etkisini ve rolünün ne kadar önem oluşturduğu artık toplum tarafından kabul edilmektedir. İçme, kullanma ve havuz suları epidemik hepatit, polymiyelit ve bruselloz hastalığının bulaşmasına ve yayılmasına etki ederler [9], [13].

Çeşitli yollarla kirlemeler sonucunda, inorganik tuzları içeren içme ve kullanma suları, insan ve hayvanlar açısından önemli hastalıklar oluşturabilirler. Sulara değişik yollarla bulaşabilen kimyasal kirleticilerden olan kurşun, kadmiyum, civa gibi ağır metaller düşük miktarlarda tehlike oluştururken, vücutta metabolize olmazlar ve doku ve organlarda birikebilirler. Sularda bulunan küçük yosunların neden olduğu zehirlenmeler ve ishaller oldukça sık görülen rahatsızlıklardandır [9]. Halk sağlığı açısından temiz ve hijyenik içme sularının hem kalite hem de miktar açısından güvenli bir biçimde sağlanması gerekir. Suyun azlığı nedeniyle yeteri kadar hijyenin yapılamadığı durumlarda, kontamine olmuş besinler yolu ile hastalıklar kolayca kişiden kişiye geçebilmektedir. Tifo, gastroenteritis ve kolera gibi birçok önemli hastalık, mikrobiyel olarak kontamine olan su yoluyla bulaşmaktadır. Bununla birlikte kimyasal kirleticilerde halk sağlığını ciddi derecede etkilemektedir [14]. Ancak fazla tespit edilen ve su ile bulaşan hastalıklar patojen mikroorganizmalar ve parazitler temellidir. Bunlardan önemlileri dizanteri (Shigella dizanteriae), tifo, kolera, paratifo, turist ishali (E. coli), polimiyelit, giardiasis (Giardia intestinalis), viral gastroenteritis (enteroviruslar), hepatit A, ameobiasis ve cryptosporidiosis'dir. UV ışınına duyarlı, kurutulmaya ve kimyasal dezenfektanlara dayanıklı olan Cryptosporidium parvum tarafından sebebiyet verilen gastroenteritis hastalarında son zamanlarda ciddi bir artış olmuştur. Bu bakteri, içme sularının normal şekilde arıtma işlemine tabi tutulduğu sahalarda potansiyel bir tehdit olarak algılanmaktadır [9].

Buna ek olarak; doğadan ve endüstriyel bölgelerden ya da farklı nedenlerle suya karışan kurşun, arsenik, deterjanlar, pestisitler, herbisitler, radyoaktif maddeler, yapay gübreler gibi kimyasal kirleticilerin, suda kabul edilebilir değerlerin üzerinde olması durumunda, bu sular içme ve kullanma suyu olarak kullanılamazlar [11], [12].

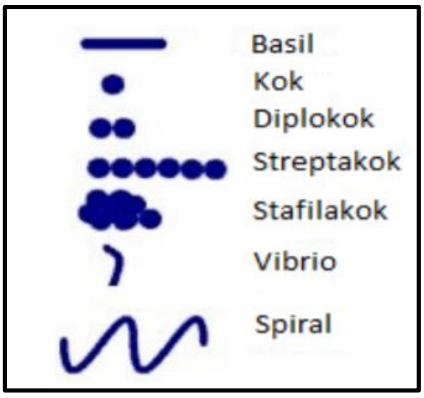
2.2. Bakteriler

Mikroorganizmalar tek hücreli canlılar olarak kabul edilip genel olarak protista alemi içerisinde yer almaktadırlar. Bazı mikroorganizmalar farklı hücresel özelliklere sahip oldukları için birbirlerinden yapısal olarak ayrılmışlar ve protista aleminde ökaryot ve prokaryot canlılar olarak alt gruplara ayrılıp incelenmeye başlanmışlardır. Bakteriler, hücresel organizasyonlarına bakıldığında çekirdek zarı içermedikleri için prokaryotların bir türü olarak gösterilmiştir [11]. Mikroorganizmaların sınıflandırılması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Protista alemine dahil olan mikroorganizmaların sınıflandırılması.

Protista alemi içerisinde bakteriler tek hücreli canlıların büyük bir kısmını oluştururlar ve ışık mikroskobunda gözlenebilirler. Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan en önemli kriterler bakterilerin şekil ve büyüklükleridir. Büyüklükleri 1-10 µm arasında değişir ve değişik şekiller gösterebilirler. En yaygın olan bakteri şekilleri kok ve basildir. Bunların dışında ince, uzun iplik şeklinde hife oluşturan bakterilerle, spiral veya sarmal şekilli bakteriler de mevcuttur [15].



Şekil 2.2: En yaygın bakteri şekilleri.

Bakterilerin şekil ve büyüklüklerine göre ışık mikroskobu altında incelenmesi, boyama yöntemleri ve bunun gibi farklı birçok yöntem kullanılarak bakteri alemi içerisinde birçok bilimsel sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırma içerisinde, deneysel çalışmalarda kullanılan koliform bakteriler grubunda yer alan fekal orijinli Escherichia coli (E. coli); Eubacteria aleminin, Proteobacteria şubesine, Enterobacteriaceae (koliform grup) familyasına aittir. Genel olarak koliform bakteriler Enterobacteriaceae ailesi içinde olan ve laktozdan 35°C'de 48 saat içinde gaz çıkarma yetkinliğine sahip bakterilerdir. Bunlar gram negatif, sporu olmayan, çubuk şeklinde olup aerobik veya fakültatif anaerobik bakterilerdir [15]. E. coli'nin temel habitatı insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemidir. E. coli'nin gıdada ya da su kaynaklarında bulunması, genel olarak gıdaya ve su kaynağına doğrudan ya da dolaylı yolla bir dışkı bulaşısının bulunduğuna işaret eder. Buna bağlı olarak da E. coli varlığı, gıdalarda ve su kaynaklarında enterik hastalığa sebep olan patojen bakterilerin bulunabileceğinin klasik bir belirteci olarak kabul edilmektedir [15].

2.2.1. Enterobacteriaceae Genel Özellikleri

"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" adlı kitabın 1994 yılı baskısında Enterobacteriaceae, Grup 5, Fakültatif Anaerob Çubuklar bölümünün 1. alt grubunda yer almaktadır. Bu familyanın üyeleri genellikle 0.3-1.8 µm boyunda Gram negatif, spor oluşturmayan düz çubuklardır. Fakültatif anaerob ve kemoorganotorofik olup hem aerob solunum hem de fermantatif metabolizmaya sahiptirler. Çoğu 37°C'da optimum gelişme gösterirken, Yersinia ve Erwinia türleri 25-30 ^{o}C'da daha aktif metabolizmaya sahiptirler. Glukoz ve diğer pek çok karbohidratı asit ve çoğu tür gaz

oluşturarak fermente edebilirler. Shigella dysenteriae O Grup 1 dışındakiler oksidaz negatif ve katalaz pozitiftirler. Bu familya üyelerinin çoğu nitratı indirger. Toprak, su, meyve ve sebzeler, tahıllar, çiçekli bitkiler, ağaçlar ile böcekler de dâhil olmak üzere pek çok hayvan türünde doğal olarak bulunurlar. Ekolojik olarak önemli ölçüde heterojenite gösterirler ve insanlarda, hayvanlarda, böceklerde ve bitkilerde potansiyel patojendirler. Bazı türleri tifo ve basilli dizanteri de dâhil olmak üzere ishale neden olurlar. Normal olarak ishale neden olmayan pek çok tür fırsatçı patojen olarak davranır. 30 cins altında 115'ten fazla tür ve alttür bulunur [16].

Bu aile içinde önemli bağırsak patojenleri Salmonella, Shigella ve Yersinia ve diyarejenik E. coli serotipleridir. Bazı üyeleri de gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Bunlar Escherichia, Enterobacter, Klebsiella gibi bakteriler olup, bunlar "Enterik bakteri" olarak da adlandırılırlar. Enterobacteriaceae içindeki bakterilerin çoğu pepton veya et özlü besiyerlerinde, NaCl veya başka madde ilave etmeden üreme özelliğinde olmaları, MacConkey Agarda iyi gelişmeleri, DNA'da G+C oranları %39-59 arasında olmaları, Erwinia cinsi dışındaki tüm enterik bakteri türlerinde ortak Enterobacteria antijeni bulundurmaları gibi ortak özellikleri de paylaşırlar [17], [18].

Enterobacteriaceae üyeleri gıda mikrobiyolojisini en çok ilgi duyduğu bakterilerdir. Bu grupta yer alan fekal koliformlar, koliform bakteriler, E. coli Biyotip 1, diyarejenik E. coli serotipleri, Shigella, Salmonella, ve Yersinia enterocolitica birçok gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında rutin tayinlerle belirlenir ya da sayılır. Bununla birlikte toplam Enterobacteriaceae sayımı da hijyen indeksi olarak ciddi önem kazanmıştır [15].

2.2.2. Koliform Grubu Bakterilerin Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae içinde bulunan, ailenin genel özelliklerine sahip olan ve 35-37 °C'de 48 saat süre içerisinde laktozdan gaz ve asit oluşturan bakteriler koliform grubu bakteriler olarak tanımlanır. Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes ve Citrobacter freundii bu grupta olan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli bir yeri olan bakterilerdir [19], [20].

Bu bakteriler, birçok gıda maddesinde kalite göstergesi olarak değerlendirilirler. Grubun E. coli dışındaki türleri genellikle bitki ve toprak kaynaklıdır. Gıdalarda toprak ve bitki kaynaklı olan koliform bakterilere düşük sayılarda izin verilir ya da hiç izin

verilmez [20], [21]. Örneğin, 2011 tarihli Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyoloji Kriterleri Tebliği; tahıl unları, soya unu patates unları dâhil diğer unlarda 104 KOB/g sayıda koliform bakteriye izin verirken, yufka ve kadayıfta bu sayı 103 KOB/g ve sade krakerler, sade kek, sade bisküvi, kaplamalı, dolgulu veya çeşnili bisküviler, krakerler, kekler ve gofrette ise 102 KOB /g şeklindedir [22].

Bazı gıdalarda bulunmasına müsaade edilen koliform grubu bakterilere içme-kullanma suları, içme suları ve kaynak sularında bulunmasına izin verilmez. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğin 2011 yılı baskısında [23] ve 2013 yılında değiştirilen yeni yönetmelikte içme-kullanma sularının 100 ml'sinde, içme suları ve kaynak sularının 250 ml'sinde koliform grubu bakteri sayısı 0 olarak ifade edilmiştir [24].

Koliform grup olarak tanımlanan 5 tür bakteri, çoğunlukla insan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaz. Fakat fırsatçı patojen şeklinde davrandıkları gibi özellikle bazı E. coli serotipleri ölüme yol açan enfeksiyonlara sebebiyet verebilmektedirler [25], [26].

Grubun en iyi bilinen üyesi olan E. coli, 1885 yılında Alman çocuk doktoru olan Theodor Escherich tarafından izole edilmiş ve Bacterium coli commune olarak adlandırılmıştır. Verilen bu isim, bakterinin bağırsakta normal flora halinde bulunduğunu gösterir. E. coli, bağırsakta vitamin sentezine katıldığı ve zararlı bakterileri baskıladığı için yararlı bir bakteri olarak da tanımlanabilmekle birlikte 1950'li yıllardan itibaren insanlarda enfeksiyonlara neden olan serotiplerinin bulunması ile birlikte bu bakteriye olan yaklaşım değişmiştir [17], [26].

Bireysel hastalanmalar dışında ilk kez 1982 yılında ABD'de Oregon ve Michigan'da 2 salgın ile görülen E. coli O157:H7 serotipi daha sonraki yıllarda da pek çok kişinin hastalanmasına ve ölmesine neden olmuştur. 2011 yılında Almanya'dan başlayıp tüm Avrupa'ya yayılan E. coli O104:H4 serotipi ise toplam 50 kişinin ölümüne yol açmıştır [27].

Koliform grup bakteriler içinde sadece E. coli, sıcakkanlı hayvanların (memeliler ve kanatlılar) bağırsak florasının doğal üyesidir. Dolayısı ile gıda ya da çevresel bir örnekte bu bakteriye rastlanması doğrudan ya da kanalizasyon vb. yollarla dışkı bulaştığının kanıtıdır. Dışkının bulaşması ile bağırsak kökenli Salmonella, Shigella, parazitler vb. gibi primer patojenlerin bulunma potansiyelini gösterir. Buna bağlı olarak E. coli'nin, fekal bulaşma göstergesi olması nedeni ile gıda, yem ve çevre örneklerinde bulunması istenmez [28], [29]. Ancak koliform grup bakterilerin diğer 4

üyesi içinde de bağırsak kökenli olanlar bulunur. Bir diğer deyiş ile Klebsiella pneumoniae, Citrobacter freundii Enterobacter aerogenes, ve Enterobacter cloacae bitki-toprak ya da dışkı kaynaklı olabilir ve dolayısı ile dışkı kaynaklı olanlar, E. coli gibi fekal bulaşma göstergesi olarak kabul edilirler. Eijkman tarafından 1904 açıklanan yöntem ile koliform grup bakterilerin bitki-toprak ya da dışkı kaynaklı oldukları yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı ile ayırt edilebilir. Fekal koliformlar olarak tanımlanan bu grup, 45.5 °C'da laktozu fermente edebilir. Gıda analizlerinde bu sıcaklık derecesi kullanılmasına karşın su, kabuklular ve kabukluların üretildiği suların analizinde 44.5°C inkübasyon sıcaklığı uygulanır. Fekal koliformlar kimi kaynaklarda termotolerant/ ısıya dayanıklı koliformlar olarak da anılır [27,29- 31].

Fekal koliform grup içinde asıl olarak E. coli yer almakla birlikte özellikle bitkisel gıdaların analizinde E. coli olmayan örneklerde diğer fekal koliform bakterilere rastlanılabilmektedir. Dolayısı ile gıda, su ve çevresel örneklerin analizinde E. coli yerine fekal koliformların analizi, fekal bulaşmanın daha kesin göstergesi olacaktır. Ancak, inkübasyon sıcaklığının kritik olması ve buna bağlı olarak analizde sahte negatif ya da sahte pozitif sonuç alınma olasılığı, E. coli analizinin çok kolay bir şekilde yapılabilmesi gibi nedenlerle çoğu ulusal ve uluslararası standartta fekal bulaşma göstergesi olarak E. coli analizi yapılır [15, 27, 29 - 31].

2.2.3. Escherichia Coli

Su ve gıdalarda dışkı kaynaklı olası bir kontaminasyondan kaynaklanan patojen tehdidi için indikatör olarak önemli görev üstlenen E. coli ilk olarak Theodor Escherich tarafından hasta olan bir çocuğun dışkı örneğinden izole edilerek önce Bacterium coli commune adıyla, daha sonra ise Escherichia coli şeklinde adlandırılıp literatüre geçmiştir [32].

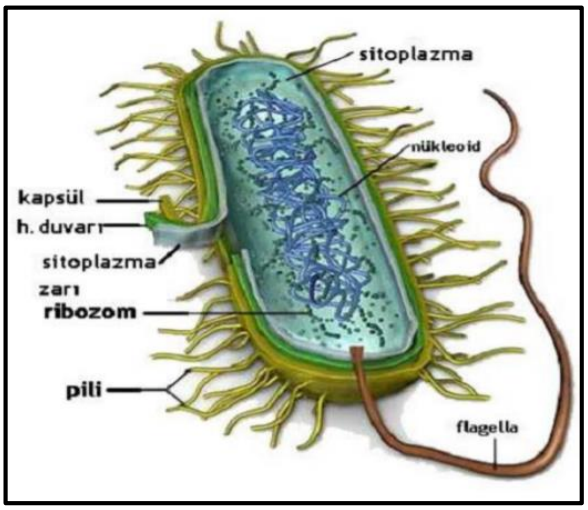
E. coli, Enterobacteriaceae familyasının Escherichia cinsi içinde olan, katalaz pozitif, oksidaz negatif, fermentatif niteliklere sahip sporu olmayan, kısa, çubuk biçiminde gram-negatif bakterilerdir [33]. E. coli, en uygun 37°C sıcaklıkta olmak üzere, 10 - 50°C sıcaklıklar arasında yaşayıp gelişebilen tipik mesofil bir bakteridir. Gelişimi için pH 7.0'ler uygun olsa da, uygun şartlarda pH 4.4'e kadar gelişimi mümkündür. E. Coli'nin gelişimesi için minimum su aktivitesi değeri (aw) 0.95'tir [34].

E. coli insanlarda ve sıcakkanlı hayvanların bağırsağında yaşayan fakültatif anaerob bakteridir. Suda canlı kalması ve dışkıda bulunması genel olarak patojen olmayan karaktere sahip olması sebebiyle E. coli fekal kontaminasyonun belirteci olarak kabul görmektedir [28]. Ancak bir takım koliformların yalnızca fekal tabanlı olmaması, gıda maddelerinin güvenliğinin bir belirteci olarak fekal koliformların öne çıkmasına sebep olmaktadırlar [29]. Fekal koliformlar 44 - 46°C aralığında Escherichia coli broth (ECB) besiyerinde laktozu fermente ederek gaz oluşturan koliformlar olarak adlandırılmaktadır. Fekal koliform terimi, fekal tabanlı koliform bakterilerin 46°C'de inkübasyon sıcaklığında glukozdan gaz oluşturmalarını, yalnızca fekal orijinli olmayanların ise aynı ortam şartlarında gelişmediklerinin tespit edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bir takım Citrobacter ve Klebsiella suşları fekal koliform bakteri tanımına uymakla beraber fekal koliformlar çok büyük oranlarda E. coli'den oluşmaktadır [35].

Fekal tabanlı olduğundan dolayı bazı araştırmacılar gıda maddelerinde ve sularda fekal kontaminasyon belirteci olarak sadece E. coli'yi baz alırlar [33]. Sularda daha uzun süre canlılığını koruyabildiğinden dolayı E.coli, fekal kontaminasyon belirteci olarak kabul görmektedir. [33]. Bazı patojen bakterilerin suda E. coli'den daha fazla süre yaşamlarını sürdürdüğüne dair araştırmalar olmasına karşılık, çoğunlukla E. Coli'nin suda canlılığını sürdürmesi, sularda çok yaygın olan bazı enterik patojenlerin suda canlılığını devam ettirme süresiyle hemen hemen aynıdır. Fakat başka birçok patojen, E. Coli'nin yaşamı son bulduktan sonra bile yaşamını devam ettirmektedir. Örneğin, bazı virüsler sularda E. coli'ye kıyasla daha uzun süre yaşamsal faaliyetlerini koruyabilmektedirler. [28]. E. coli'nin patojenik suşları, menenjit, idrar yolları enfeksiyonu, ishale sebep olan enfeksiyonlar, septisemi gibi bazı hastalıklara sebep olurlar. E. coli'nin ishale sebep olan suşları ilk kez 1940'lı yılların başında çocuklarda yaz ishali üzerine araştırma yapan İngiliz bilim adamları tarafından tesbit edilmiştir [33]. Bu suşlar sebep oldukları hastalık ve serolojik farklılıkları göz önüne alınarak dört farklı gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar; enteropatojenik E. coli (EPEC), enterotoksijenik E. coli (ETEC), enteroinvasif E. coli (EIEC) ve enterohemorajik E. coli'dir (EHEC) [33]. Patojenik olan bu grupların biyokimyasal özellikleri, genellikle diğer E. coli suşlarına benzemekle beraber, bazı özellikleri değişiklik göstermektedir. Örneğin, EIEC suşları hareket etmezler ve birçok suşu glikozdan gaz oluşturmamaktadır. EHEC ise atipik olarak β-D-glukronidaz aktivitesi yoktur ve 48 saat süre içinde 44.5 - 45.5°C'de gelişememektedirler [35].

2.2.3.1. E. coli'nin Hücre Yapısı

Genel olarak, çoğu canlı hücre oldukça küçüktür ve katı ya da esnek hücre membranına sahiptir. Hücrenin iç kısmı proteinlerin, karbonhidratların ve diğer kompleks organizma bileşiklerinin bulunduğu sitoplazma olarak adlandırılan koloidal bir karışımı içerir.



Şekil 2.3: E. coli ve E. coli hücre bileşenlerinin şematik gösterimi.

2.2.3.1.1. Mikrobiyolojik Özellikleri

E.coli insanların ve bütün sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında doğası gereği olan, ayrıca bağırsağın haricinde bazı hastalıklara sebep oluşturan bir bakteridir. E.coli, sağlık açısından önemli bir bakteri çeşidi olmakla birlikte, bunun haricinde gıdalarda, suda, doğada, fekal bulaşmanın belirteci olarak araştırılan ve genetik çalışmalarda en çok kullanılan bakteridir. Bakteri genetiğinin birçok sonucu E.coli ile yapılan araştırmalar sayesinde olmuştur [34].

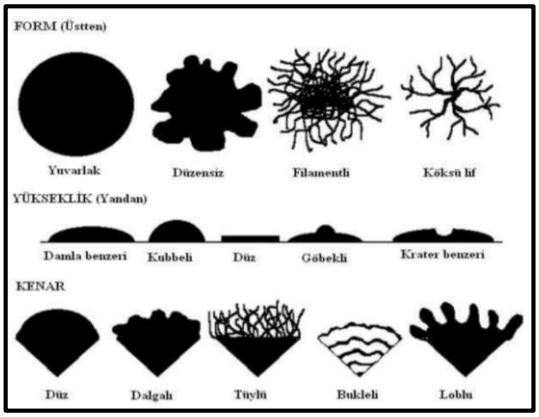
2.2.3.1.2. Morfolojik Özellikleri

Bakteri morfolojisi; mikroskobik ve makroskobik morfoloji olarak iki bölüm şeklindedir. Makroskobik morfoloji daha çok bakterilerin koloni morfolojisi olarak bilinmektedir. Fakat makroskobik morfolojide, bakterilerin katı ve sıvı

besiyerlerindeki çoğalma şekilleri, oluşturdukları şekiller ve ortaya çıkardıkları değişiklikler de incelenebilmektedir.

2.2.3.1.3. Makroskobik Morfoloji

Koloni; bakteri hücresinin katı bir besiyerinde değdiği herhangi bir noktada bölünerek ve doğrudan gözle görülen hücre topluluğu şeklinde bir yapı olarak adlandırılabilir. Bu durumda bir kolonide yalnızca besiyerine ekilen bakteri türüne ait hücreler bulunur. Koloni sayımlarında da bu tanımdan hareketle, bir koloninin bir hücreye eşdeğer olduğu varsayılmaktadır. Her bakteri belli bir besiyerinde, şartlar değiştirilmediği takdirde kendine özgü karakterde koloniler oluşturmaktadır. Aynı bakteri değişik bir besiyerine ekildiğinde ise farklı bir koloni morfolojisi gösterirler [37].



Şekil 2.4. Bakterilerin koloni morfolojileri.

2.2.3.1.4. Mikroskobik Morfoloji

Bakteriler genellikle şeffaftır ve bu sebeple mikroskop altında direkt olarak incelenebilmeleri zordur. Bakterileri tanımlama yollarından biri olan boyama yöntemi yapılarak incelenebilirler. Bakteriler boyanarak, mikroskobik morfolojileri (büyüklükleri, diziliş şekilleri, şekilleri, belli hücre organellerinin varlığı ve yapısı) ve çeşitli boyalara karşı gösterdikleri davranışlar hakkında bilgi edinilebilmektedir. Çeşitli boya ve bu boyalara olan davranışlarına göre bakteriler Gram pozitif, Gram negatif bakteriler olarak ayrılabilirler.

Hem makroskobik hem de mikroskobik morfoloji özelliklerine bakıldığında E. coli, yaklaşık 2-6 µm uzunluğunda ve 1.0-1.5 µm eninde düz, uçları yuvarlak çomak biçiminde bir bakteridir. Bazı besiyerlerinde kısa, bazılarında da normalden uzun Y harfi şeklinde olabilir. Peritrik kirpikleri sayesinde hareket yetisi kazanmışlardır. Fakat bu hareketleri oldukça yavaştır.

Hareketli suşlarının yanı sıra hareketsiz suşları da saptanmıştır. Bazı suşları ise kapsüllüdür. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanan koliform grubu E. coli gram negatiftir [36], [38].

2.2.3.2. Antijenik Yapısı

E.coli'nin somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenleri vardır. Somatik (O) antijenleri bakteri duvarı ile ilgilidir. Alkole ve ısıya dayanıklıdır, formole ise duyarlıdır. 150'den fazla varyasyon gösterebilir ve bazen bir bakteride birden fazla (O) antijeni bulunabilir. Oluşan antikorlar (Immune Globuline M) IgM yapısındadırlar.

Kirpik (H) antijeni flagele yerleşmiştir. Alkole ve ısıya duyarlı, formole dirençlidir. 50'den fazla türü vardır. Buna karşı organizmada oluşan antikorlar (Immune Globuline G) IgG yapısındadır. Flagellin adlı proteinden oluşmaktadır. Bakteriler (H) antijenini kaybedip, uygun şartlarda yeniden oluşturabilirler.

Kapsül (K) antijeni kapsüllü bakterilerde bulunur. Klebsiella, E. coli ve diğer bazı enterik bakteriler bu antijeni içerirler. 100 civarında tipi vardır. Polisakkarit yapısında, ısıya dayanıklı ve bakteri yüzeyinde yer alan bir antijendir. 100-120 ^{o}C'de 1-2 saatte kaybolmaktadır. (K) antijeni bakterinin virulansını sağlar.

2.2.3.3. Biyolojik Özellikleri

E. coli gram negatif, fakültatif anaerobik ve spor oluşturmayan bir bakteridir. E. coli, tipik olarak çubuk şeklinde olup yaklaşık 2 µm uzunluğunda, 0.5 µm çapında, 0.6-0.7 μm^3 hücre hacmine sahip bir canlıdır.

Geniş alana yayılmış çeşitli substratların üzerinde yaşayabilirler. Bu substratlar da anaerobik koşullar altında asit fermantasyonu sonucu laktat, süksinat, etanol, asetat ve karbondioksit üretir. E. coli için optimum gelişme 37 °C'de gerçekleşir. Fakat bazı türleri en iyi gelişimi 49 °C'de gösterirler. Büyüme, trimetilamin N-oksit, oksijen,

nitrat, dimetil sülfoksit gibi substratların indirgenmesi ve pürivik asit, formik asit, hidrojen ve aminoasitlerin yükseltgenmesini içeren redoks çiftlerinin aerobik veya anaerobik solunumda kullanılması ile gerçekleşir [39].

Flagella'ya sahip olan türleri bulundukları ortam itibari ile yüzebilir ve kendiliğinden hareket edebilirler [40]. Hareketlerini sağlayan flagella tüylü bir düzenlemeye sahiptir.

E. coli ve E. coli'ye benzer bakteriler, bakteriyel konjügasyon, transdüksiyon veya transformasyon ile DNA transferi yaparak genetik materyallerini kendilerinden sonraki popülasyona aktarabilirler. Bu proses ile shiga toksinlerini bakteriyofajların taşıması sonucu, gen kodlarını Shigella'dan E. coli O157:H7'ye aktarmışlardır [41].

2.2.3.4. Kimyasal Yapısı

Canlı hücrelerin yapısındaki gibi E. coli hücresinde de organik maddeler, inorganik maddeler ve su bulunmaktadır. E. coli'nin %70-90'lık kısmı sudan oluşurken, bakteri sporlarının %40-50'si sudur.

Bakterilerin ağırlığının %50-90'ı organik kuru maddeler oluşturur. Bunlar lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir.

Genel olarak bakterilerde en çok karbon, azot, kükürt, hidrojen, oksijen, fosfor gibi elementler bulunmaktadır. Bunlarla birlikte sodyum, potasyum, demir, klor, magnezyum, bakır ve çinko az oranda bulunmaktadır. E. coli'nin yapısında bulunan karbonhidratlar, polisakkarit olarak ve/veya glikoprotein şeklinde olabilir. Tür ya da şekle ait özellikleri sebebiyle bu karbonhidratlar serolojik tanılarda kullanılmaktadırlar. Bakterilerin bazı çeşitlerinde çok miktarda lipidler bulunur. Bunlar proteinlerle birleşmiş şekiller oluşturabilirler. Organik olmayan maddeler, bakteri kuru ağırlığının %2-30'unu teşkil eder. Bunlar, en sık tuz yapısında görülürler [42].

2.2.3.5. Biyokimyasal Özellikleri

E.coli kendisine özgü her türlü besiyerinde rahatlıkla çoğalabilir. Fakültatif anaerop olup en iyi çoğalma sıcaklığı 37°C olurken, 15-45 ^{o}C sıcaklık aralığında da çoğalabilirler. Özellikle 44°C sıcaklıkta çoğalabilmeleri bazı benzer bakterilerden

(Serratia ve Enterobacter) ayırt edici özelliktir. En iyi bakteri çoğalması pH: 7.2'de görülür. Sıvı besiyerinde homojen olarak bulanıklık oluştururlar. Katı besiyerinde hafif kabarık, yuvarlak 1.2 mm çapında, parlak, S tipinde koloni oluştururlar. Bazı E.Coli türleri kanlı besiyerinde hemoliz oluşturabilirler. Koliform bakterileri, şekerleri asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. Bu özellikleri sayesinde farklı bağırsak bakterilerinden, özellikle Salmonella ve Shigella'dan ayrılabilirler. Bundan dolayı, E.coli ile dışkıda birlikte yer alan laktoz ile reaksiyona girmeyen bakterilerden ayırt edilmesinde içinde laktoz ve bir ayıraç bulunan bakteri kültürleri kullanılır. Bu bakteriye yapılan İMVC (İndol – Metil Kırmızısı - Voges-Proskauer – Sitrat) testleri sırasıyla +,+,-,- 'dir. Üreyi parçalayamazlar ve KCN besiyerinde üreyemezler [43], [44].

2.2.3.6. Patojenik Özellikleri

E.coli memelilerin ve kuşların bağırsak floralarında doğal olarak bulunup, farklı flora bakterileri ve organizmalar ile düzenli bir şekilde bulundukları sürece herhangi bir hastalığa sebep olmazlar. Ancak bazı koşullarda E.coli insanlar ve hayvanlar için patojen olup, kanlı ve kansız diyare şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına yol açar [45].

Bağırsak yolu dışındaki diğer dokulara geçmeleri durumunda başka türlü hastalıklara da sebep oldukları gözlenmiştir. Bilhassa idrar yolu, safra kesesi ve safra yolu, akciğer, periton ve meninkslere ulaşan E.coli bakterileri önemli hastalıklara yol açarlar [46].

Bağırsak bakterisi E.coli; patogenez, klinik ve epidemiyolojik özellikleri farklı 6 farklı gruba ayrılır:

- Enterotoksijenik E.coli (ETEC): Birçok ülkede, yenidoğan ve turist diarelerinin ana sebepleri arasındadır. Bakteri, bakteri bulaşmış su ve gıdalarla insana bulaşır. Bakteri önce vücutta çoğalmaya başlar ve daha sonra vücuda zararlı toksinlerini salgılar. Vücuda bulaştığındaki bulguları; hafif halsizlik biçiminde olabileceği gibi, bol sulu, kolera benzeri diyare ile de seyredebilir [47].
- Enteropatojenik E.coli (EPEC): Sıklıkla küçük bebeklerde görülür ve salgına neden olur. Birçok antibiyotiğe karşı birden fazla direnç gösteren türleri vardır [36].

- Enteroinvazif E.coli (EIEC): Bağırsakta distal ileum ve kolonda epitel hücrelerine nüfuz ederek Shigella'ya benzer hastalık bulgularına neden olur. Hastalık etkeni olarak organizmaya girerek dokulara yayılma yeteneği plazmid kontrolündedir.
- Enterohemorajik E.coli (EHEC): E.coli O157:H7 türü Shigella ve EIEC'e benzer diareye sebep olmaktadır. En belirgin özelliği böbreklere yapmış olduğu toksik etki sayesinde hemolitik üremik sendromlara yol açmasıdır. Hastalık faktörü olarak organizmaya girerek dokulara yayılma yeteneği ve toksinleri yoktur. Sitotoksinleri bulunur ve bunlara vero hücrelerine olan sitotoksik etki sebebiyle verotoksin 1 ve 2 ismi verilmiştir. Bu toksinlerin oluşturduğu klinik tabloda hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura bulunmaktadır [47].
- EnteroAggregatif E.coli (EAEC): Bağırsak florasına tutunup tuğla şeklinde dizilmiş bakteriler olarak görünürler. EAEC bakteri grubuna özgü bakterilerin açığa çıkardığı toksinler mukozaya zarar verip kronik diareye sebep olurlar.
- Diffuz Agregatif Escherichia Coli (DAEC): Süt çocuklarında diyareye sebep olur. Özelleşmiş fimbiralar ile epitele bağlanırlar ve hücre içi işaret mekanizmasını etkinleştirirler. Bu grup ile ilgili çok fazla bilgi yoktur [48].

2.2.3.7. Üreme Özellikleri

İki çeşit üreme gözlenebilir: Aerob veya fakültatif anaerob üreme. Üreme için en iyi sıcaklık 37°C' dir. Logaritmik çoğalma aşamasında E.coli bakterisi 20 dakika içinde yarıya ayrılabilir. Farklı koşullarda, örneğin 20–44° C sıcaklıkta, pH 5–8 arasında iken normalden yavaş da olsa çoğalma gerçekleşir. Kendi grubundaki diğer bakterilerden ayırt edilmesi için en önemli özelliği; 44° C'de laktozu fermente etmesi ve indol oluşturmasıdır. Üremenin hızlanması için besiyerine bakterinin kullanabildiği karbonhidrat ilave edilir. Kanlı agarlı besiyerinde beta hemolitik bakteri kolonileri oluştururlar. E.coli bakterisi dış şartlara, bilhassa soğuk havaya karsı oldukça dayanıklıdır. 60°C' de 30 dakika bekletildiğinde canlı kalabilir. Diğer bağırsak bakterileri Salmonella ve Shigella türü bakterilere göre Malasit yeşili, brillant yeşili, bazik fuksin gibi boyalarla boyandığında daha iyi sonuç verir. Böylece bu boyaların belli miktarlarda ilave edildiği besiyerine ekilmiş olan dışkı numunelerinde Salmonella ve Shigella türü bakterilerin ayrılması oldukça kolaydır. Sıvı

besiyerlerinde homojen bulanıklık oluştururlarken, katı besiyerlerinde 18 saat sürede düzgün kenarlı, 3–4 mm çaplı, ortası kalkık koloni oluşturabilirler [49], [50].

E.coli bakterisinin üremesi için en iyi besiyeri Mac Conkey ve Eozin Metilen Mavisi (EMB) agardır. Mac Conkey agarda laktoz fermente olduğundan kırmızımsı-pembe renkli ve safra çökelti oluşturduğundan etrafında kısım kısım koloniler oluşur. Mac Conkey agarda laktoz ile sonuç vermeyen koloniler şeffaf olarak görünmektedir. EMB agar üzerinde E.coli suşları sıklıkla özgün olarak floresanlı görüntü veren yeşil siyah koloni oluşturur [51].

Serolojik sınıflara ayırmada kapsüler (K), somatik (O) ve flagellar (H) antijenlerine bakılır. E. coli DNA şekliyle Shigella DNA'sı birbirine çokça benzerlik göstermektedir. E. Coli bulaşması yetişkinlerde ve çocuklarda Shigella bakterisinin klinik tablosuna benzeyen enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bununla birlikte, E. coli'nin Salmonella bakterisinden ayrılması için en temel özelliklerden bir tanesi, laktoz ve sakkaroz'u fermente ederek asit ve gaz meydana getirmesidir [52], [53]. E. coli'nin üreme koşullarına Tablo 2.1'de yer verilmiştir [52].

Tablo 2.1: E. coli'nin üreme koşulları.

	En Düşük – En Yüksek	**En Uygun**
Sıcaklık (ºC)	7.0-45.0	37
pH	4.4-9.0	6.0-7.0
a_w	0.95	0.99

2.2.3.8. Escherichia Coli Türleri

E.coli bakterisinin enterovirulent tiplerinin tayin edilmesi için biyolojik, immünolojik ve moleküler yöntemler vardır. Ancak bu yöntemlerin geleneksel tanı laboratuvarında uygulanması oldukça zahmetli olduğundan kullanımı azdır. E.coli suşları, antimikrobik etkisi olan kolisini meydana getirir. Tip belirlenmeleri, belirli kolisinler ve ürüne özel bakteriyofajlar ile yapılmaktadır. E.coli suşları, meydana getirdikleri hastalık ve serolojik özelliklerinde ki farklılıklar göz önünde bulundurularak beş grupta incelenmektedir [49].

Tablo 2.2: Bazı patojenik E. coli alt gruplarının virulens faktörleri, klinik tablo ve diare tipleri.

E. coli	Virulens Faktörleri	Klinik Tablo	Diare Tipi
ETEC	Enterotoksinler: LT1a, LT1b, LT2a, LT2b, ST1a, ST2b, ST2, Spesifik adhezyon fimbria	Sulu diare (kolera benzeri), yolcu diaresi	Pirinç suyu görünümünde
EIEC	Bağırsak epitelyum hücreleri üzerine nüfuz	Shigellosis benzeri diare	Kanlı, mukuslu
EPEC	Bağırsak epitel hücrelerine lokalize bazı suşlarında SLTI ve/veya SLTII	1 yaşın altındaki çocuklarda akut ya da kronik sulu diare	Pirinç suyu görünümünde, mukuslu
EHEC	Shiga-benzeri toksinler: SLTI ve/veya SLT II (VTI ve/veya VT II) Kolonizasyon faktörleri	Hemorajik kolitis (HC), hemolitik üremik sendrom (HUS)	Ağrılı diare, HUS (kanlı diare veya yalnızca kan şeklinde)
DAEC	Yaygın aderenz	Sulu diare	Pirinç suyu görünümünde

2.2.3.9. Escherichia Coli'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

E.coli, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında hem en fazla izole edilmiş olan hem de doku ve organlarda enfeksiyon oluşmasını sağlayan bir patojen bakteridir [54].

E.coli, insanların ve hayvanların bağırsak florasında yaşamakla beraber, birçok hastalığın oluşmasında primer veya sekonder etken biçiminde izole edilmektedir. E.coli'de varolan fimbria, flagella, hücre duvarı, kapsül, antijenleri, sentezlemiş olduğu kolisinler, sitotoksinler, enterotoksinler, hemolizinler ve aerobaktin gibi virulans etkileriyle hastalıkların oluşmasına sebebiyet vermektedirler [16], [55].

E.coli'nin belirli patojen türleri insanlar ve hayvanlarda ölüme kadar ulaşan diareye, artheriosklerosis, yara enfeksiyonlarına, septisemi, solunum yolları enfeksiyonlarına, menenjit, hemolitik üremik sendrom, safra yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, çeşitli immünolojik rahatsızlıklar ve karaciğer apsesi gibi hastalıklara sebebiyet verir [56], [57].

En fazla görülen bağırsak dışı E.coli enfeksiyonu idrar yolları enfeksiyonudur. E.coli hastane ve halk tabanlı idrar yolu enfeksiyonlarından en fazla izole edilen

patojenik bakteri olup bulguların hemen hemen %80-95'inin etkeni olduğu gözlenmiştir [58], [59].

İdrar yolu enfeksiyonları bütün dünya da ciddi bir morbidite sebebidir. Enfeksiyonun etkisini artırmasında, üropatojen bakterinin virülansı ile birlikte cinsiyet, sonda kullanmak, diyabet hastalığı, gebelik ve yaşlılık gibi konağa ait olan etmenlerde etki eder [60].

Çocuklarda idrar yolu enfeksiyonları solunum sistemi enfeksiyonlarından sonra en fazla rastlanan enfeksiyonlardır [61]. E.coli'nin özellikle O:4, O:6, O:75 gibi serotipleri, çok fazla idrar yolları enfeksiyonlarına sebebiyet vermektedir [62], [63].

20 ile 40 yaş arasında olan kadınların hemen hemen %25-35'i idrar yolu enfeksiyonuna maruz kaldığı tespit edilmiştir. Ülkemizde her sene ortalama 5 milyon sistit atağı tespit edilmiş ve bu enfeksiyonun etkeninin de %50–90 E.coli olduğu gözlenmiştir [64], [65].

E.coli, prematürelerde ve neonatal (doğum yaptıktan sonra ki ilk dört hafta) evredeki bebeklerde menenjit hastalığına sebep olur. Etken E.coli suşları genellikle K1 antijeni ihtiva eder ve serumun bakterisidal etkiye oldukça dayanıklıdır. Enfeksiyon olmuş kişilerde bas ağrısı, yüksek ateş, ensenin sertleşmesi, sürekli uyku hali ve BOS bulguları ile rahatsızlıklara neden olur. Yüksek oranda ölüme neden olur [66].

E.coli'den kaynaklanan bakteriyemi daha sık hastane enfeksiyonlarında olur. E.coli'nin kana kadar ulaşması; solunum yollarında kolonize olması, idrar yolu enfeksiyonları ya da bağırsaktan kaynaklanabilmektedir. Nozokomiyal tabanlı olduğundan kana karışmış olan suşlar birçok antibiyotiğe dirençlidir ve tedavisi zordur. Bu yüzden ölüm riski ciddi oranda mevcuttur [66].

E.coli'nin sebep olduğu solunum yolu enfeksiyonları da çoğunlukla hastane yolu ile bulaşmaktadır. Ancak kronikleşmiş akciğerlerinden rahatsız olanlarda, yaşlılarda ve diyabet hastalığı olanlarda toplum tabanlı olarak da görülebilir. Çünkü bu tip hastaların vücut dirençleri çok zayıftır [66].

Enteropatojenik E.coli (EPEC), en fazla çocuklarda enfeksiyona sebep olur. 1940 ile 1960 yıllarında ishal salgınlarına neden olmuş, 1970'lerden sonra gelişmiş olan ülkelerde daha az rastlanmış olsa da henüz gelişmekte olan ülkelerde ise ciddi oranlarda çocuk ishali etkenidir. Erkek çocuklarda, kız çocuklarına göre daha fazla görülmektedir. Henüz 6 aylık olmamış aynı zamanda anne sütü alamayan çocuklarda bu enfeksiyon daha etkindir. Çoğunlukla 1 hafta içinde kendi kendine iyileşilebilir.

Nadir olarak kanlı biçime dönüşür. O111 serotipi yeni doğanlarda ölüme neden olurlar [66].

Enterotoksijenik E.coli (ETEC), gelişmemiş olan ülkelerde yaşayan çocuklarda ve ayrıca turistlerde (%11–72) ishal nedenidir. Gelişmiş olan ülkelerde bazen salgın yapabilmektedirler. Bu tip enfeksiyonlar çoğunlukla 4–5 gün arasında sürebilir ve günde 8–12 defa dışkılama gözlemlenebilir. Hafif olarak geçirilen kolera hastalığına benzer bir enfeksiyon olarak bilinmektedir [66], [56].

Enteroinvazif E.coli (EIEC), dizanterik biçimde ishal nedenidir. Kanlı dışkılama, karın ağrısı, mukuslu dışkılama ve yüksek ateşe neden olmaktadır. Ölüm oranı oldukça azdır. Sporadik belirtiler ve bazen de salgın şeklinde olabilir [66], [56].

Enterohemorojik E.coli (EHEC) suşu ile olan enfeksiyonlar çoğunlukla kansız ishal ve şiddetli karın ağrıları biçiminde başlar ve 2–3 gün sürede dışkı aşırı kanlı duruma gelmektedir. Bundan dolayı bu hastalık hemorojik kolit şeklinde adlandırılır. Yüksek ateş yoktur veya hafif şekildedir. Özellikle E. coli 0157:H7 her sene dünyada 20.000 gıdadan kaynaklanan enfeksiyona ve 250 kişinin ölümüne sebebiyet vermektedir. E. coli 0157:H7 hemorojik ishale ve böbrek yetmezliğine neden oluşturan kuvvetli ekzotoksin üretmektedir [66], [56].

Etken, vücut içine girdikten sonra inkübasyon süresi 3–8 gün olarak değişir ve çoğunlukla krampla beraber mide bulantısı, karın ağrısı, kusma, ishal, kanlı ishal ve hemorojik kolit benzeri klinik semptomlara sebep olur [66].

Bu tip enfeksiyonlarda hemorajik kolit, yaklaşık 5–10 gün süre sonunda ilerleyerek hemorajik üremik sendroma dönüşebilir, bunun sonucunda çok şiddetli anemi ve böbrek yetmezliği ile birleşebilir [66].

2.3. Mikroorganizma Tayininde Kullanılan Yöntemler

Gıda, yem, su ve çevresel örneklerde var/ yok ya da sayım şeklinde yapılan mikrobiyolojik analizlerde doğru sonuçların alınması için çeşitli kurallar vardır. Bunların başında analiz edilen numuneye dışarıdan bir bulaşma olmamasının sağlanması gelir. Materyaldeki mikroorganizmaların çalışanlara ve çevreye bulaşmaması da önemlidir. Genel laboratuvar kurallarına uyulması konusunda çeşitli ulusal ve uluslararası standartlar bulunmaktadır [67], [68], [69].

Koliformlar fakültatif anaerob bakterilerdir; yani oksijenli ortamda çoğalabilmeleriyle beraber farklı olarak solunum mekanizmasıyla oksijen olmayan ortamlarda çoğalabilmektedirler. Hem fermentatif hem de nonfermentatif metabolizması mevcuttur. Laktoz ve mannitolü fermente edip asit ve gaz meydana çıkarmakta, triptofandan indol sentezleyebilmektedir. Ayrıca bu bakteriler spor oluşturmayan, gram-negatif ve çubuk biçimindedir. Koliform bakterilerin Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacteriaceae ve Citrobacter freundii üyelerindendir. Çocuk dışkısından 1885 yılında izole edilmiş olan Esherichia coli; günümüzde yapısı en fazla bilinen ve çok çalışılan bir koliform grubu bakteridir. 37°C sıcaklıkta gelişebilen E.coli için optimum pH değeri 7.2 iken, minimum değer pH 5'tir. E.coli'nin patojenik olmayan suşları insanların ve hayvanların bağırsak florasında mevcuttur. Hayvanların bağırsağında ve dışkısında yaşamını sürdüren E.coli'nin içme sularında veya gıda maddelerinde belirlenmesi durumunda o maddeye doğrudan veya lağım suyu ile dışkı bulaştığının kanıtıdır. Bununla beraber toprak ve bitki yoluyla da insan vücuduna giren koliform grubu bakteriler önemli sağlık sorunlarına neden olurlar. Koliform bakteri sayımında kullanılan geleneksel yöntemler; membran filtrasyon yöntemi, EMS yöntemi, katı besiyerinde kullanılan yöntemler ve hızlı sayım yöntemleri şeklinde dört gruba ayrılırlar.

Var/ yok testleri genellikle patojenler için uygulanırken, sayım testleri genellikle çürükçüller için kullanılır. Sayım, hedef alınan mikroorganizmanın numunedeki muhtemel sayısı ya da hedeflenen sayısı dikkate alınarak yayma plak kültür sayım, dökme plak kültürel sayım, en muhtemel sayı yöntemi ile sayım ve membran filtrasyon yöntemi ile yapılır. Bunların dışında mikroskobik sayım, metabolizmaya dayalı sayım vb. başka sayım yöntemleri de vardır. Suların mikrobiyolojik tayininde 1 mL örnekte 22°C sıcaklıkta koloni sayımı ile 37°C sıcaklıkta koloni sayımının dökme kültür sayım yöntemi ile ancak, 250 mL örneğin E. coli, enterokoklar, koliform bakteri, Pseudomonas aeruginosa, oksijensiz sporlu sülfat indirgeyebilen bakteriler ve patojen stafilokokların membran filtrasyon yöntemi tayini ile hükme bağlanmıştır [24], [67].

2.3.1. Klasik Yöntemler

2.3.1.1. Kuru Madde Tayinine Dayalı Yöntem

Kuru madde miktarı biyokütlenin tahmini için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, belirli bir hacme sahip belirli bir mikroorganizma kültüründeki (saf kültür) hücreler damıtık su ile yıkandıktan sonra kuru madde tayinleri yapılmaktadır. Bu prosedür substrat olarak çözünmeyen katılar kullanıldığında, gerçek biyokütleyi vermeyeceği gibi düşük mikroorganizma miktarlarında da tayini zorlaştırmaktadır.

2.3.1.2. Mikroskobik Sayım Yöntemi

Bu yöntem dahilinde hücreler, özel üretilen lamların (Thomalamı, Howard lamı vb.), kullanım için belli bir hazırlık gerektiren normal lamların (Breed yöntemi) veya membran filtrelerin üzerine yayılarak ya doğrudan ya da boyama işlemi sonrasında mikroskopta sayılmaktadır [70]. Sayım sonucu mikroskobik sayı/mLveya mikroskobik sayı/gram olarak verilmektedir [29]. Çoğu geleneksel yönteme göre oldukça hızlı olsa da, bu yöntemde canlı ve ölü hücreler ayırt edilemediğinden ve hücreler ile örnek içerisindeki partiküller karıştırılabilmektedir.

2.3.1.3. En Muhtemel Sayı Yöntemi

Bu yöntem bakteri sayımında sıklıkla tercih edilmekte ve üç basamakta uygulanmaktadır.

Bu basamaklar sırasıyla:

- Koliformların muhtemel sayısını tespit etmek,
- Koliform bakterilerin kesin sayısını belirlemek, bununla birlikte aynı olmayan bir besiyerinde fekal koliform bakterilerinin sayısını tespit etmek,
- Bakteri sayısını tespit etmek.

Koliform grubu bakterilerin numune içerisinde aranmasına yönelik çalışmalar Uluslararası Standartlar Örgütü (ISO) ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından

yapılmıştır. Bu çalışmalar; standart analiz yöntemlerine göre hazırlanan örneğin, dilisyonları içerisinden ardışık beş dilüsyondan üçer adet Lauril Sülfat Triptoz Broth (LST) her bir kültüre 1 mL ekim yapılması ve 37°C'de 24 - 48 saat inkübe edilmesi sonucu pozitif olan tüpler olası koliform olarak değerlendirilmesine dayanır. Bu yöntemde, olası koliform bakterilerin sayısını belirlemek için Brilliant Green Bile Broth (BGBB) kültürüne ekim yapılır ve 37 ^{o}C sıcaklıkta 24 - 48 saat arasında inkübe edildikten sonra pozitif sonuç veren tüplerin koliform grubu bakteriler içerdiği söylenebilmektedir [71].

TS 6063/ISO 7251 yönteminde E. coli aranması, ardışık beş dilüsyondan üçer adet LST besiyerine 1'er mLekim yapılır, 37°C'de 24 (gerekirse 48) saat süre boyunca inkübasyona bırakılarak başlatılır. Bu noktada pozitif olan tüplerden su banyosu içinde 44,5^{o}C'de yakalanan E. coli (EC) Broth besiyerlerine ekim yapılır ve gaz oluşması için yine 44,5^{o}C'de 24 (gerekirse 48) saat inkübasyon yapılır. Bu süre sonucunda gaz gözlenen tüplerin fekal koliform içerdiği varsayılmaktadır. Deneyin bir sonraki aşamasında EC Broth besiyerinde pozitif olan örneklerden 44,5^{o}C'deki Tripton Water (TW) besiyerine ekim yapılarak yine aynı sıcaklıkta 48 saat boyunca inkübe edilir ve bu süre sonunda indol testi gerçekleştirilir. Eğer indol testi pozitif sonuçlanırsa pozitif sonuçlar içeren tüplerde E. coli, pozitif sonuç vermeyen diğer tüplerde ise E. coli dışındaki diğer fekal koliformların olduğu sonucu çıkarılır.

Bu yönteme uygun olarak hazırlanmış olan örnek dilüsyonlarından ardışık üç dilüsyondan 3'er tane LST besiyerine 1'er mLekim yapılır, 35°C sıcaklıkta 48 saat süre boyunca inkübe edilir, daha sonra pozitif olan tüpler muhtemel koliformlar olarak değerlendirilir. Bu değerlendirme aşamasında pozitif olan tüplerden BGBB ve EC Broth besiyerlerine ekim yapılırak 35°C'de 48 saat inkübasyon yapıldıktan sonra, BGBB tüplerinden alınan pozitif sonuçlar koliform grubu bakteriler olarak doğrulanmakta, 44,5^{o}C'de 48 saat süre boyunca inkübasyon yapılan EC Broth tüplerinden alınan pozitif sonuçlar ise fekal koliform grubu bakteriler olarak kabul edilir ve sayılırlar. Bu aşamanın ardından ayrıca Eosin Metilen Blue Agar (EMB) besiyeri üzerine pozitif sonuçlu tüplerden alınan örnekler ile sürme yapılarak gram boyama ve IMVEC testlerinin uygulanması ile de E. coli'nin varlığı doğrulanmaktadır [72].

2.3.1.4. Besiyeri Yöntemi

Birçok kuruluş tarafından koliform grubu bakteri ve E. Coli belirlenmesinde standart metod olarak EMS yöntemi kullanılırken, bilhassa izolasyon amacıyla sayım deneylerinde katı besiyeri kullanılır. Bu amaca uygun olarak Violet Bile Red (VRB) Agar besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerin de çift tabaka dökme plak yöntemleri yayma ve dökme yöntemleri sayım yapılırken kullanılmaktadır [19].

Petrifilm VRB yöntemi, VRB Agar besiyerine alternatif olarak da kullanılmaktadır. Besiyerinin içeriğinde katılaştırıcı madde olan agarın yerine soğuk suda çözünmesi daha fazla olan başka bir madde kullanılmaktadır. Besiyeri içeriği kurutulduktan sonra üzeri plastik bir film tabakası ile kaplanmış olarak kullanıma hazır bir şekilde satılabilmektedir. Bu metoda göre numuneden 1 mLalınıp besiyeri üstüne eklenir. Plastik filmin üzerine basınç uygulayarak numune 20cm^2 bir alana yayılmasına olanak sağlanır. 32±1°C'de 24±2 saat süre boyunca inkübe edildikten sonra, çevresinde bir ya da birden çok gaz kabarcığı görülen koloniler koliform bakteri olarak sayılabilir [20].

2.3.1.4.1. Besiyeri Çeşitleri

Ampül (Sıvı) - Kullanıma Hazır Besiyeri: Bu besiyeri, laboratuvarlarda çoğunlukla harcanan süre, eğitimli personel ve ekipman problemlerini çözmektedir.

- Tek kullanımlık besiyeri 2 mL'lik plastik ampuller biçimindedir ve kullanmak oldukça kolaydır.
- Besiyerinin stabilitesi ve performansına etki eden bütün faktörler üretim aşaması boyunca özenle analiz edilerek, kalite bakımından test edilmekte ve buna bağlı olarak optimum koloni gelişimi ve en yüksek raf ömrü sağlanabilmektedir [73].

Petri Kabında Kullanıma Hazır Besiyeri: Kullanıma hazır petri kabında besiyeri, mikrobiyoloji laboratuvarında çoğunlukla harcanan süre, eğitimli personel ve ekipman problemlerini çözmektedir. 60 ve 90 mm çapında olan çeşitleri ile kullananların değişik isteklerine çözüm sunar.

- Rahatlıkla depolanabilir. Sıcaklık seçenekleri ile besiyerinin kararlılığını ve performansını değiştirmeden çok yerde kolaylıkla saklanma sağlanır.
- Maksimum raf ömrü ile stok ve tedarik problemlerini ortadan kaldırır [74].

Dehidre Besiyeri: Besiyeri içeriği, formülasyonunda vurgulanan miktarlarda bir araya getirilerek kurutulur. Toz ya da granül biçiminde ambalajlanarak kullanıma hazır karışım şeklinde ki besiyerine, dehidre besiyeri denilir.

- Dehidre besiyerlerinde kullanan kişilerin güvenliği öne çıkarılmıştır.
- Diğer besiyerlerine göre daha uzun depolamaya olanak verirken, yoğun şekilde analiz yapılan laboratuvarlarda maksimum analiz kazancıda sağlamaktadır [73].

2.3.1.4.2. Sularda Koliform Grubu Bakterilerin Analizinde Kullanılan Besiyerleri

Çeşitli ulusal ve uluslararası standartlarda gerek genel olarak gıdalarda gerek içme ve kullanma sularının toplam koliformlar, fekal koliformlar ve E. coli analizi için önerilen farklı besiyerleri olduğu gibi, besiyeri üreticisi ticari kuruluşlar tarafından pazarlanan başka bileşimli çok sayıda besiyeri de vardır. Bunlar içinde Violet Red Bile (VRB) Agar, Lauryl Sulfate (LST) Broth ve Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate, uluslararası standartlarda en çok değinilen besiyerleridir. Bu besiyerleri bileşimleri aynı olmakla birlikte farklı ticari kuruluşlar tarafından farklı isimlerle de pazarlanabilmektedir. Aşağıda bu amaçla en yaygın kullanılan besiyerleri hakkında kısa bilgiler verilmiştir [75], [78].

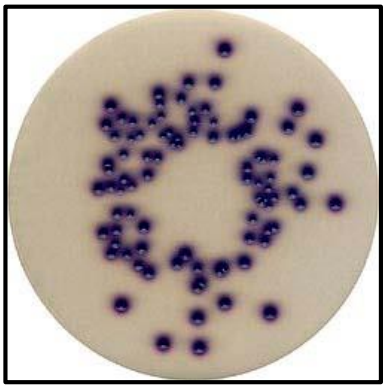
- VRB Agar: Bileşimi, Agar, Peptone from meat, Yeast Extract, Lactose, Crystal Violet, Ox Bile (Bile Salt Mixture), Neutral Red şeklindedir. Birçok uluslararası standarda (FDA Form 2400a 3/01, ISO 4832 gibi) kabul edilen koliform grup tayininde kullanılmaktadır. VRBL (Violet Red Bile Lactose) Agar olarakta bilinir. Besiyeri içeriğinde olan safra tuzu ve kristal moru ilk önce Gram pozitifler olmak üzere eşlik eden floranın gelişimisini durdurur ve laktoz pozitif bakterilerin var olduğu pH belirteciyle koloninin kırmızı renge dönmesi ve safra asitlerinin koloni çevresinde çökelti şeklinde olması ile bulunur.

Şekil 2.5: VRB Agar'da koliform bakteriler.

- LST Broth: ISO 4831 ve birçok uluslararası standartlarda koliform grubu bakterilerin EMS yöntemi ile sayılmasında kullanılan bir besiyeridir. Bileşimi, sodyum lauril sülfat, triptoz, laktoz, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum klorür ve dipotasyum hidrojen fosfat biçimindedir. Besiyeri içeriğinde ihtiva olan lauryl sulfate eşlik eden floranın gelişimesini yavaşlatırken çok miktarda bulunan gıda maddeleri ve fosfat tampon koliform grubu bakterilerin de hızlı gelişmesini ve çok fazla gaz çıkışına sebep olur.
- Brilliant Green Bile (BGB) Broth: Bileşimi, Pepton, Brilliant Yeşil, Laktoz, Ox Bile şeklindedir. Birçok uluslararası standartlarda koliform bakteri doğrulama besiyeri olarak kullanılır. Ayrıca bazı standartlarda koliform bakterilerin var/yok testinde zenginleştirme besiyeri şeklinde kullanılır. Besiyeri içeriğinde yer alan safra tuzu ve brilliant green eşlikçi floranın gelişmesini yavaşlatırken, laktozdan gaz çıkararak koliform grup bakteriler gelişebilirler.
- Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate: ISO 9308-1:2004 numaralı standarttaki bu olmakla birlikte farklı ticari markalar tarafından Lactose TTC Agar with Tergitol® 7, Tergitol TTC, Tergitol-7 Agar gibi isimlerle de bilinir. Bileşimi, Peptone Yeast extract, Bromotimol Mavisi, Tergitol, Lactose, Meat extract, Agar şeklindedir. TTC, otoklavlanmış besiyerine sonradan eklenir. ISO 9308-1 sayılı standarda uygun şekilde özellikle su tayinlerinde koliform grubu bakterilerin membran filtrasyon yöntemi ile sayılmasında kullanılır. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkındaki Yönetmelik, sularda koliform grup bakteri analizinin membran filtrasyon yöntemiyle yapılması gerektiğini ve bu amaçla Tergitol TTC kullanılmasını hükme bağlamıştır (ISO 9308-1). Tergitol TTC, koliform grup

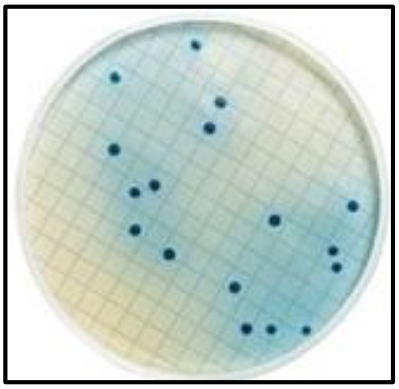
bakteriler için kullanılanlar arasında zayıf selektiviteye sahip bir besiyeridir. Buna bağlı olarak yakın akraba türler, bu besiyerinde yeterince baskılanmaz. Ancak besiyerinin zayıf selektiviteye sahip olması, stres altındaki koliformların da gelişmesine izin verir. Koliform grup bakteriler laktozdan asit oluşturur. Bu asitlik filtre altındaki sarı benek ile belirlenir. Filtrenin üzerindeki kolonilerde görülen sarı/ turuncu renk, oluşan asitlikten değil, TTC'nin zayıf olarak indirgenmesinden kaynaklanır. Koliformlar TTC'yi zayıf olarak indirgerler ve buna bağlı olarak sarı/ turuncu renkli koloni yaparlar. Koliform grup bakterilerin dışında da bu besiyerinde gelişebilen ve zayıf bir şekilde TTC'yi indirgeyerek sarı/ turuncu renkli koloni yapabilen bakteriler bulunabilir. Dolayısı ile koliform grup bakteriler için tipik reaksiyon olan laktozdan asit oluşumu, filtre üzerindeki sarı/turuncu renkli kolonilerin, filtre altında sarı benek vermesi ile kontrol edilir. Sarı benek kontrolü, emdirilmiş besiyeri olan pedin altından değil, filtrenin altından yapılmalıdır. Sarı benek kontrolü, emdirilmiş besiyeri olan pedin altından değil, filtrenin altından yapılmalıdır.

- Chromocult Coliform Agar: Bileşimi, Agar, Pepton, Sodyum dihidrojen fosfat, Sodyum Piruvat, Tergitol 7, Triptofan, Sodyum klorür, Disodyum hidrojen fosfat, Sorbitol, Kromojenik karışım şeklindedir. Ayrıca tergitol–7, Gram pozitiflerin ve bazı Gram negatiflerin gelişmesini baskı halinde tutar. Koliform bakterilerine özgü olan ß-D-galaktosidaz enzimi kromojenik substrat olan Salmon–GAL'ı parçalar ve pembe-kırmızı renkte koloni oluşmasına sebep olur. E. coli bakterisine özgü olan ß-D-Glukuronidaz enzimi içerikte yer alan X–Glukuronide substratı ile parçalanır. Böylelikle Salmon–GAL'in E. coli bakterisi olarak parçalaması ile birlikte X-Glucuronide substratı da parçalanarak farklı koyu mavi – mor renkli koloni oluşturarak ayırt edilir.



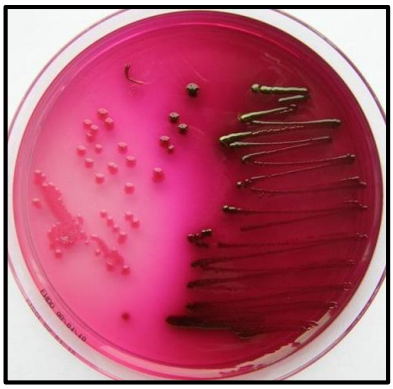
Şekil 2.6: Chromocult Coliform Agar' da koliform bakteriler.

- m-FC Agar: AOAC, APHA ve EPA yönergelerine uygun olarak membran filtrasyon metodu ile sularda fekal koliformların bulunması ve sayılması için seçici katı besiyeri olarak kullanılmaktadır. İçeriği Agar-agar, Proteose peptone, Yeast extract, Safra tuzu, Sodyum Klorür, Laktoz, Triptoz, Metilen mavisi şeklindedir. İçeriğinde, önceden kullanılan Anilin mavisi yerine şimdi metilen mavisi kullanılmaktadır. Pepton ve maya ekstraktı besin kaynağı iken, safra tuzları Gram negatif refakatçi florayı baskılar. Laktoz, yüksek sıcaklıkta fekal koliformlar tarafından fermente edilir ve mavi renkli koloni oluşturur. Besiyerinde gelişebilen diğer koloniler gri renkli koloni yapar. Yüksek inkübasyon sıcaklığı, dışkı kökenli olmayan (non-fecal) koliformları baskılar. İnkübasyon 36 ^{o}C'da yapılırsa, fekal olan ve olmayan tüm koliformlar aynı renk ve büyüklükte koloni oluştururlar. Bu nedenle, fekal koliform analizinde 44.5 ± 0.5 °C inkübasyon sıcaklığı kullanılmalıdır.



Şekil 2.7: m-FC Agar'da koliform bakteriler.

- ENDO Agar: SMWW yönergelerine uygundur. ENDO NKS adı ile ticari marka olarak da pazarlanmaktadır. Bileşimi Agar-agar, Dipotasyum hidrojen fosfat, Laktoz, Pararosanilin (Fuksin), Sodyum sülfit (susuz), Pepton şeklindedir. İçeriğinde yer alan fuksin ve sodyum sülfit Gram pozitif bakterilerin gelişmesini baskı halinde tutar. E. coli ve koliform grubu bakteriler laktozdan asit ve aldehit ortaya çıkararak metabolize eder. Oluşan aldehit, fuksini serbest hale getirir ve bu şekilde kırmızı renkli koloni meydana gelir. Bu reaksiyon E. Coli bakterisinde çok güçlü gerçekleşir ve kolonideki fuksin parçacıkları ile koloni rengi metalik parlak yeşil (fuksin parlaklığı) olarak görünür.



Şekil 2.8: Endo Agar'da koliform bakteriler.

2.3.1.5. Membran Filtrasyon Yöntemi

20. yüzyılın en önemli icatlarından biri olan membran filtre, Göttingen Üniversitesi'nden Prof. Richard Zsigmondy tarafından bulunmuştur. Prof. Zsigmondy, "inorganik ve kolloid kimya" alanında yapmış olduğu çalışmalar sebebiyle 1925'te Nobel ödülünü almıştır. 1927 yılında Sartorius desteği ile kurduğu Membranfiltergesellschaft m.b.H. şirketi ile membran filtrenin teknik gelişimi ile birlikte, ticari alanda daha fazla fırsatlar oluşmasını sağlamıştır. İkinci Dünya Savaşından sonra, kullanılamaz hale gelen alt yapının oluşturduğu içme suyunda kontaminasyona bağlı olarak kolera riski sebebi ile membran filtrenin mikrobiyolojik tayinlerde kullanılma olanağını doğurmuş ve bu olanak membran filtreyi bugünde işlevini sürdüren ilk amacına ulaştırmıştır [79]. Günümüzde su dolumu yapan fabrikaların birçoğu, kaynak sularını mikroorganizmalardan ayrıştırmak için membran filtrasyon sistemlerini kullanmaktadırlar.

Membran filtrasyon yöntemi, içme ve kullanma sularına veya diğer sıvılara mikrobiyolojik analiz uygulanması amacıyla yapılmaktadır. Membran filtrasyon yöntemiyle sulardaki veya sıvılardaki mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Membran filtrasyon yöntemi yüksek hacimli sıvılarla çalışmaya, koliform grubu bakterileri ve sayılarını tespit etmeye elverişli bir yöntemdir. Ayrıca membran filtrasyon yöntemi klasik tayin yöntemlerine göre daha hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiğinden daha fazla kullanıldığı görülmektedir. Membran filtrasyon yönteminde sıvı numune, mikroorganizmaların geçmesine izin vermeyecek por büyüklüğüne sahip membran filtreden vakum vasıtasıyla süzülmektedir. Temiz bir emici ped üzerine emdirilmiş mikroorganizmanın türünü belirleyici ayrıca seçici bir

besiyeri üstüne ekim yapılmaktadır. Bekleme süresi sonucunda membran filtre üzerinde bulunan kareler sayesinde sayım kolaylıkla yapılır [15].

Kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik tayin için su numunelerini alırken; cam şişe veya plastik şişe, temiz bir kap (Hidroklorik asit ve numune alınan su ile birkaç kez çalkalanmış) kullanılmaktadır. Mikrobiyolojik tayin için; steril olan koyu renkli cam şişe, kapak veya plastik tıpa kullanılmaktadır. Bu yöntem analizi yapılacak numunelerin içerdiği mikroorganizmalardan daha küçük boyutlu por genişliğine sahip olan membran filtre üzerinden numunenin vakumla filtre edilmesi, filtrasyon bittikten sonra filtreden geçememiş mikroorganizmaların türüne özgü olan besiyeri üzerinde ve uygun sıcaklıkta inkübasyon yapılması sonucunda meydana gelen kolonilerin sayılması prensibine dayanmaktadır [50], [76]. Membran filtre tipleri ve çapları ile alakalı olarak yapılan eş güdümlü analizlerde 0.45µm ± 0.02 µm por çapı büyüklüğünde filtrelerin mikrobiyolojik tayinlerde çok daha fazla başarılı olduğu görülmüştür.

Çalışma yöntemi olarak bir süzgecin gördüğü işlevi görür. Bakteriler 0.45 µm porlu (gözenekli) membran filtreden geçemez ve filtre yüzeyinde kalır. Maya ve küf analizlerinde daha büyük por çaplı (0.65; 0.8; 1.2 µm) filtreler kullanılmaktadır. Membran filtrasyon sisteminden geçen sıvı ve gazlardaki mikroorganizmalar filtrenin yüzeyine tutunur. Daha sonra bu filtre, uygun bir besiyeri üzerine yerleştirilirek hedef mikroorganizma için uygun sıcaklık, süre ve basınçta inkübe edilir.

Besiyeri olarak;

- Besiyeri emdirilmiş ve kurutulmuş pedin ıslatılarak aktive edilmesi ile hazırlanan hazır ticari preparat,
- Boş pede sıvı besiyeri ilavesi ile hazırlanan ticari olan ya da olmayan preparat,
- Laboratuvarda hazırlanan besiyeri olmak üzere farklı besiyerleri kullanılabilir.

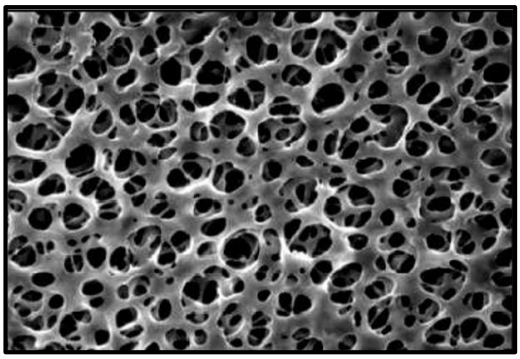
Yerli ve yabancı ticari kuruluşlar hazır pedlere ilgili besiyerini emdirip, kurutmakta ve bu pedleri steril plastik Petri kutuları içine yerleştirerek kullanıcılara sunmaktadırlar. Bu kitler kullanım aşamasında steril saf su ile ıslatılarak aktive edilmektedir.

Yine yerli ve yabancı ticari kuruluşlar tarafından hazırlanıp piyasaya sunulan diğer besiyeri seçeneğinde boş steril pedler, steril Petri kutusuna yerleştirilerek sunulmaktadır. Yaygın pazarlama şekli ile bu kitlerin yanında sıvı besiyeri de

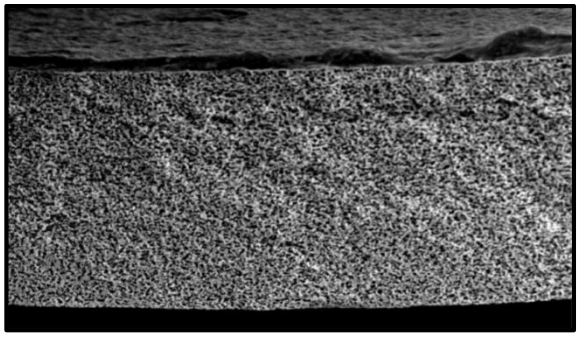
verilmekte, kullanıcı steril pede steril sıvı besiyerini ilave ederek besiyerini hazırlamaktadır. Sıvı besiyeri, kit ile birlikte pazarlanabildiği gibi kullanıcı tarafından laboratuvarda da hazırlanabilir.

Doğrudan agarlı besiyerleri de bu amaçla kullanılabilir. Bu amaçla kullanıcı, besiyerini laboratuvarda hazırlayabileceği gibi hazır olarak pazarlanan agarlı besiyeri de kullanabilir. Her 3 seçeneğin de bilimsel olarak bir farkı yoktur [75], [77].

Membran filtreler selüloz nitrat, selüloz ester, karışık ester vb. bileşimlerde olabilmektedir. Şekil 2.10'da selüloz asetat filtre gözenek yapısı, Şekil 2.11'de membran filtre kesiti görülmektedir [75].

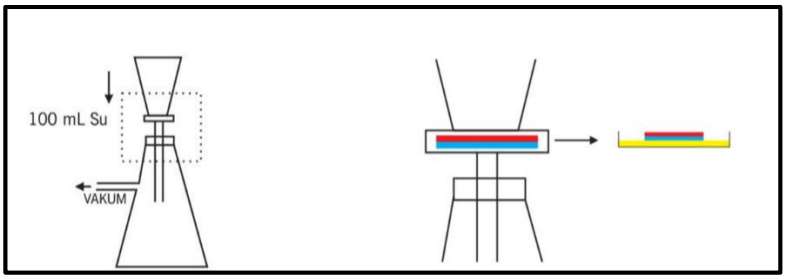


Şekil 2.9: Selüloz asetat filtre gözenek yapısı.



Şekil 2.10: Membran filtre kesiti.

Suların membran filtrasyonunda hedef hacimde (100; 250 mL) su, vakum desteği ile filtreden geçirilir ve mikroorganizmaların tutunmuş olduğu yüzey üstte kalacak şekilde uygun bir besiyerine yerleştirilir (Şekil 2.12) [20].



Şekil 2.11: Membran filtrasyon.

2.3.1.5.1. Membran Filtrasyon Yönteminin Uygulanışı

Öncelikle işleme başlamadan sistemin tamamen temizlenmesi gerekmektedir. Temizleme işlemi, ekipman özelliğinden dolayı otoklav ile yapılabildiği gibi, kimyasallarla da kolaylıkla yapılabilmektedir. Kimyasal dezenfektanlar uygulanması sonrasında bu dezenfaktanların kolaylıkla uzaklaştırılması gerekmektedir. Kimyasal dezenfektanların sistemde kalması analizi yapılan mikroorganizmanın olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte, alkol yüzeyden uzaklaştırıldıktan sonra kalan kısmının yakılarak yok edilmesine ilaveten, analizden önce 50 mLcivarı steril distile suyun filtre edilmesi, sistem içerisinde kalan dezenfektanın yıkanarak uzaklaştırılması için etkin bir yöntemdir [78].

Geleneksel yöntemde aseptik şartlara uyularak filtrenin koyulacağı taban steril edilmiş su ile ıslatılır ve filtre buraya koyulur. Koruyucu plastik katman otomatik olarak kalkar, bu bölüm filtreden ayrılır. Daha sonra süzme haznesi yerine yerleştirilir. Hedeflenmiş miktara uygun miktarda sıvı numune huniye koyulur, pompa çalıştırılarak ve numune sıvı membran filtreden geçirilir. Filtre;

- Steril sıvı besiyeri ile ıslatılmış absorban pet üzerine,
- Steril su ile ıslatılmış besiyeri ihtiva eden absorban pet üzerine,
- Agarlı besiyeri üzerine mikroorganizmaların tutunduğu yüzey üstte kalacak biçimde yerleştirilerek, hedeflenen bakteriye uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir [79].

2.3.1.5.2. Membran Filtrasyon İçin Kullanılan Malzemeler

Filtrasyon Manifoltları: Değişik filtrasyon başlıklarına sahip olduğundan hem paslanmaz çelik ve cam filtre tutucular ile hem de tek kullanımlık Microfil filtrasyon hunileri ile kullanma imkanı mevcutur.

- Tekli, 3'lü ve 6'lı çeşitleri vardır. Tüm parçalar kolaylıkla sökülebilir.
- Kompakt tasarıma sahip olduğundan dolayı aşılama kabininde kullanılır.
- Her iki taraftan vakum bağlantısına olanak sağlar.
- Vana ve kulplar alüminyum, bağlantı parçaları ve vananın gövdesi paslanmaz çeliktendir. Otoklavlanarak tekrar kullanılabilir [73].

Analitik Huniler: Membran filtrasyon yönteminde kullanılan analitik huniler aşağıdaki başlıklar ile gösterilebilir:

- Microfil Tek Kullanımlık Huni: Steril Microfil huniler, polipropilen hammaddeden üretilmiş olup tek kullanımlık ve hafif yapıdadır [80].
- 55-Plus Monitor Tek Kullanımlık Huni: 55-Plus Monitor sistemi, içeceklerin ve diğer sıvı numunelerin çok daha çabuk ve kolay tayin edilmesine imkan sağlar [73].
- Paslanmaz Çelik Filtre Tutucu Huni: Mikrobiyolojik veya partikül kontaminasyonu tayini için sıvıların vakumla filtrasyonunda kullanılabilir.
- Cam Filtre Tutucu Huni: Mikrobiyolojik, askıda katı madde tayini, partikül kirliliği tayini ve sitoloji uygulamalarında kullanılabilir [80].

Membran Filtreler: İki çeşit membran filtre kullanılır:

- Membran Filtre, Steril, Tek Tek Ambalajlı: Bu tip membran filtreler steril ve ayrı ayrı paketlenmiş, membran filtrelerdir.
- EZ-Pak Şerit Membran Filtre, Steril: Bu membran filtreler steril, şerit şeklinde formlu, kareli membran filtrelerdir [81].

Membran Filtre Dispenseri: EZ-Pa Curve membran filtre dispenseri, EZ-Pak membran filtreler ile kullanılabilmektedirler.

- Dispenser oldukça hafiftir ve bu sayede kolaylıkla taşınabilir.
- İnfrared sensörle el ile temasa ihtiyaç olmadan membran filtre kullanıma hazır hale getirilir.
- Kablolu veya kablosuz kullanılabilmesinden dolayı laboratuvarlarda istenilen yerde rahatlıkla kullanılabilir [79].

EZ-Stream Vakum Pompası: Deney süresini kısalmak ve konforu fazlalaştırmak için tasarlanmıştır.

- Bütün manifolt çeşitleriyle kullanmak mümkündür.
- Atık olarak çıkan sıvıyı depolamak amacıyla ek bir kaba gerek yoktur. Bu yüzden çalışma alanında önemli bir yer kazandırır.
- EZ-Stream pompası, laboratuvar analizlerinde sıvıların ve gazların filtreden geçirilmesinde kullanılır.
- Pompanın pürüzsüz olması, yüzeylerin dekontaminasyonun işlemleri rahat ve verimli kılar.
- Sessiz çalışma; gürültü seviyesi 60 dB'nin altında olacak biçimde optimize edilmiştir.
- Diyafram, kimyasallara dirençli politetrafloroetilenden (PTFE) imal edilmiştir ve bakım istemez [80].

Millivac Vakum Pompası: Millivac; su ve sulu numunelerin filtre edilmesi ve diğer laboratuvar deneyleri için devamlı vakum sağlayan, kompakt ve bakım istemeyen vakum pompalarıdır.

- Patentli diyafram tasarımı ile pompaların kapladığı hacim azaltılmıştır.
- İki çeşidi bulunmaktadır.
- Millivac Mini Vakum Pompası su ve sulu numunelerin filtrasyonunda; Millivac Maxi Vakum Pompası çok daha büyük hacimli numunelerin ve viskoz numunelerin filtrasyonunda kullanılır [74].

Vakum / Basınç Pompası: Yüksek Verim Pompası daha fazla kuvvet sağlamak için piston ile çalışan bir tasarıma sahiptir ve maksimum akış hızı 34 L/dk'dır [79].

2.3.1.6. Hızlı Sayım Yöntemleri

2.3.1.6.1. MUG Yöntemi

AOAC tarafından E. coli için hızlı tayin yöntemi olarak belirtilen bu yöntemde, numuneden dilüsyonlar hazırlandıktan sonra ardışık üç dilüsyondan üç tane LST Broth besiyerine ilave edilerek, tüplerin ağzı kapatılıp su banyosu içerinde 44.0 ± 0.2 ºC sıcaklıkta 24 saat süre boyunca inkübe edilmekte ve pozitif olan tüpler büyük olasılıkla E. coli olarak değerlendirilmektedir. Bundan sonra kültürlerden alınan örnek EMB Agar besiyeri üzerine sürülerek E. coli' olup olmadığı doğrulanmaktadır. Bu yöntemde toplam tayin süresi 48 saattir [74].

Bu yöntemin çalışma prensibi; direkt olarak besiyerine eklenen ya da seçici katkı maddesi olarak eklenen 4-methyleumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) adlı bileşiğin E. coli 'ye özgü bir enzim olarak bulunan β-D-glucuronidase (MUGase, β-GUR) enzimi vasıtasıyla 4- methyleumbelliferone adlı florojenik bir bileşiğe döndürülmesi ve bu ürünün 366 nm dalga boylu ultraviyole ışık altında floresan ışıma yapması prensibine dayanır. MUG, her çeşit katı ya da sıvı besiyeri bileşimine kolayca eklenebildiğinden dolayı EMS yöntemi, katı besiyerleri yöntemi ve membran filtrasyon yöntemi ile yapılan E. coli tayinlerinde kullanılabilmektedir [19].

β-D-glucuronidase pozitif olan bakteriler içerisinde indol pozitif sonuç veren yalnızca E. coli 'dir. Bu nedenle E. coli haricinde bazı β-D glucuronidase pozitif sonuç veren Enterobacter, Citrobacter, Salmonella, Shigella suşlarının sebep olduğu yanlış pozitif sonuçlar indol testi yspılarak belirlenmektedir. Ayrıca bazı E. coli suşları yoğun çoğalma ile birlikte çok miktarda asit ortaya çıkarmakta ve bunun sonucunda floresan ışımayı maskelemektedir. Bu durumda besiyerine 1 ml, 1 N NaOH eklenerek floresan ışıma kesinleştirilebilmektedir [19].

2.3.1.6.2. Doğrudan Epifloresant Filtreleme Tekniği (DEFT)

DEFT teknoloji ile uyumlu pratik bir teknik olarak görülmektedir. Analizi gerçekleştirilecek örnekler filtrelenir ve floresan özelliğe sahip uygun bir indikatör ile işaretlenir. Bu yöntemde kullanılan “akridin oranj” yöntem için orijinal bir indikatör olarak kullanılmasına rağmen son zamanlarda gerçekleştirilen uygulamalarda 4′,6-

diamidino-2-phenylindole (DAPI) ön plana taşınmıştır. Epifloresans mikroskopi, floresans özellik taşıyan/taşıması sağlanan mikroorganizmalar için kullanılmaktadır. Tekniğin duyarlılığı filtrelenen hacime ve mikroskop altında görüntülenen alan sayısına bağlıdır. Mikrokoloni oluşumu, tekniğin doğruluğunu ve hücrenin tayinini kuvvetlendirir. Bu teknikte filtreleme sırasında mikroorganizmaların membran üzerinde yayılması önem kazandığı için kullanılması olası çözeltiler bir ön filtrelemede kullanılarak uygun çözelti seçimi yapılabilir [82], [83].

2.3.1.6.3. Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay (ELISA)

ELISA hücresel bileşime dayalı bir tekniktir. Bu teknikte antijen-anti body reaksiyonu belirli mikroorganizmaların veya hücresel bileşimin tayini için kullanılır. ELISA geçmişten bu yana klinik uygulamalarda oldukça tercih edilen bir teknik olmuştur [88]. Analiz süresi bakteriler için 24-52 saat arasında değişirken mikrobiyal toksinler için bu süre 4-24 saat arasında değişmektedir. Çoğu immünolojik testlerde 104 hücre/mLkadar bakteri sayısı tayinin gerçekleştirilmesi için gereklidir. Bu yüzden bu durumlarda ön zenginleştirme yapılabilir [84].

2.3.1.6.4. Akış Sitometrisi

Flow sitometri, akmakta olan numune içindeki hücre veya partiküllerin özelliklerinin tanımlanmasıdır. Akış sitometrisi ile süspansiyon şeklinde olan hücreler veya partiküller, lazer ışığı sayesinde aydınlatılmakta olan bir kısımdan geçirilir; hücrelerin ve partiküllerin ışığın önünden geçtiklerinde verdikleri sinyalleri hemen ardından toplanarak tayin edilir. Meydana gelen sinyallerin kaynağı, hücrenin ya da partikülün büyüklük, granülarite gibi fiziksel yapısı olabileceği gibi; hücreye bağlı olan çeşitli florofor da olabilir. Bu şekilde hücrelerin ya da partiküllerin immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli gibi değişik özellikleriyle ilgili bilgi sahibi olunabilir [85].

2.3.1.6.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, nükleik asit tabanlı, genotipik teknoloji içeren bir tekniktir. Sistem basit bir örnekle fotokopi makinası gibi çalışır, nükleik asitfragmentleri kopyalanır. Nükleik asit fragmentleri hücre içi kullanımı için polimerizasyon teknikleri kullanılarak kuvvetlendirilir. Örneğin ayna-imaj kopyalama tekniği bu işi yapabilir. Daha sonra orijinal hedefin bir sonraki kopyaları bu ve buna benzer farklı teknikler kullanılarak yapılır. Çeşitli PCR metotları kullanılabilir: reverse transcripterase PCR (PCR-RT), nucleic acid sequence based amplification (NASBA), veya transcriptionmediated amplification (TMA) [83].

PCR, DNA sentez başlangıcında spesifik primeri sağlamak için DNA sentez gereksinimi üzerinden yürütülür. Primerin sağlanması ile teknisyen sentez başlangıcında bakteriyel kromozomun yerini kontrol eder. Tespit işleminden sonra bakteriye ait DNA dizilimi elde edilir [83].

2.3.1.6.6. İmmunomanyetik Ayırmaya Dayalı Yöntemler

İmmunomanyetik ayrım (İMA) yönteminin temeli, manyetik alan varlığında yüzeyi antikorlu kürelerin ortamda diğer türlerden mıknatıslanma ile ayrılması ve ayrılan türlerin tayin edilmesine dayanır [86]. İMA, hedeflenen bir maddenin karışık bir ortam içinden spesifik olarak ayrılmasını sağlamaktadır. Bu amaçla paramanyetik veya süpermanyetik partiküller, manyetize olabilme niteliklerini sadece dışardan sağlanan manyetik bir alan olduğunda göstermektedirler [87]. Bu alan uzaklaştırıldığında, mıknatısa doğru bir araya gelme özelliklerini yitiren partiküller birbirlerine yapışmadan homojen bir karışım oluşturmaktadırlar [86].

Manyetik partiküller farklı fiziksel özelliklerde olmakla birlikte, immunolojik sistemler için aglütinasyon ve özgül olmayan bağlanmayı da en aza indirebilme imkanını sunduğundan dolayı küresel partiküller olarak (çoğunlukla 2.8 μm ve 4.5 μm çapında) kullanılmaktadır [86]. Manyetik partiküllerin homojen büyüklük ve şekilde olmaları, fiziksel ve kimyasal açıdan, kararlı bir sistemin oluşmasını sağlamaktadır.

İMA'da kullanılan kürelerin sentezi çoğunlukla demir bir merkez içeren polistiren küreler ile gerçekleştirilmektedir. Bu kürelerin içerisinde bulunan demir merkez, küreye paramanyetik özelliğini kazandırmaktadır [83].

Imünolojik sistemlerde manyetik kürelerin yüzeyleri üzerine kovalent bağlanma ile oluşturulan ve hedefe özgü monoklonal veya poliklonal antikorlar ile modifiye edilen küreler kullanılmaktadırlar. Bunun için son zamanlarda streptavidin-biotin konjügasyonu manyetik küreler yüzeyinde kullanılmaktadır. Suda çözünen, küçük bir vitamin olan biotinin, yumurta beyazı proteini avidine karşı yüksek affinitesi bulunmaktadır [89].

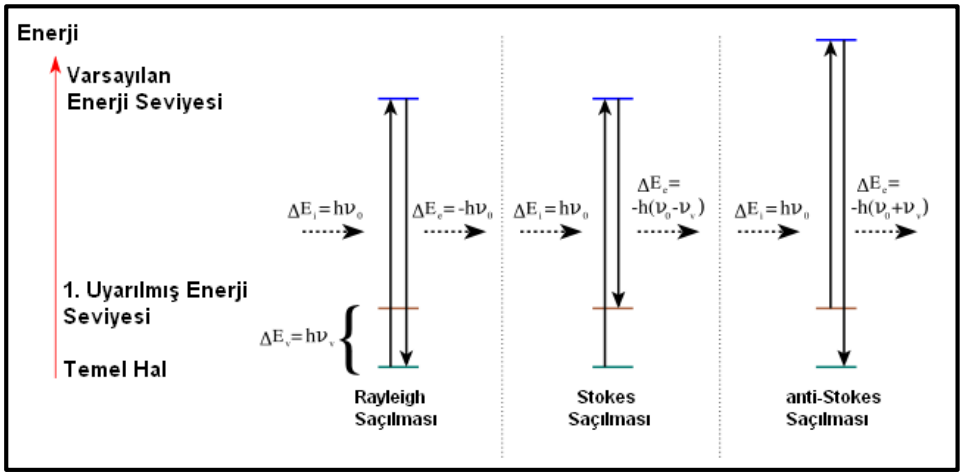
Avidin ve biotin arasındaki bağlanmanın hızlı ve güçlü olması, bu sistemin paramanyetik kürelerin antikorlarla kaplanmasında da kullanılmasını sağlamıştır. Bakteriyel kaynaklı bir protein olan streptavidin, nötral birizoelektrik noktası olması ve karbonhidrat içermemesi nedeniyle uygulamalarda avidine tercih edilmektedir [89]. Streptavidin biotin sisteminin en önemli avantajı, bağlanma sisteminin hızlı ve basit olmasıdır.

İMA yönteminde, antikor kaplı küreler hazırlanan örnek ile karıştırılmakta ve uygun bir inkübasyon süresi sonucunda manyetik partiküllere bağlanmış olan antijen, manyetik bir ayırıcı ile bu karışımdan ayrılmaktadır. İzole edilen bu manyetik partikül-antijen kompleksi ölçüm sistemine aktarılmadan önce uygun bir tampon çözelti ile yıkanmaktadır.

2.3.1.6.7. Raman Spektroskopisi

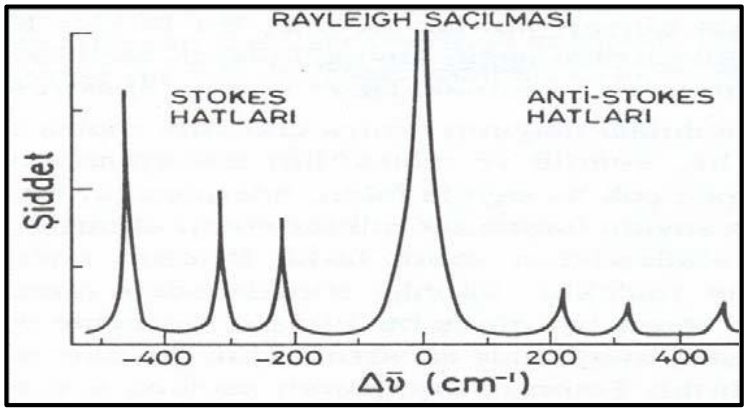
Moleküllerin kuvvetli bir monokromatik ışın demeti ile bir araya gelmesi esnasındameydana gelen saçılmanın dedektör aracılığıyla takibi easına dayalı bir yöntemdir. Rayleigh saçılması olayı; bir çeşit esnek saçılma olayıdır. Bu ışık saçılması esnasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur. Raman saçılması; elastik olmayan saçılma olayıdır. Elastik saçılma olayıyla birlikte saçılan ışığın çok azı molekül ile etkileşen ışığın enerjisinden değişik enerjiler ile yayılır. Raman saçılması esansında saçılan ışığın enerjisinde, molekül ile tesir eden ışığınkine göre oluşan fazlalık veya azlık, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkları kadardır. Raman saçılmasının spektroskopik tayin edilmesi ile moleküllerin titreşim enerji seviyeleri hakkında fikir alınabilir. Bu spektroskopik metot Raman spektroskopisi adını alır [90].

Şekil. 2.12 ’de Raman saçılması esasnında meydana gelen molekülün titreşim enerji düzeyleri ile bağlantısı gösterilmiştir.



Şekil 2.12: Stokes ve anti-Stokes tipi Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile gösterilmesi.

Enerjisi hvo olan bir foton, molekül ile karşılaştığında saçılma işlemi olmadan çok az sayıda foton, enerjilerinin bir miktarını moleküllere geçirir veya moleküllerde çok az sayıda fotona bir miktar enerji geçirilir. Enerji aktarma olayı sonucu moleküller fotonla etkileştikten sonra farklı titreşim enerji seviyelerinde bulunurlar. Enerjisini aktaran molekül, fotonla bir araya gelmeden önce önce temel titreşim enerji düzeyinde iken, bir araya geldikten sonra sonra uyarılmış bir titreşim düzeyine geçiyorsa fotonun enerjisi azalır ve molekülün titreşim enerjisi artar. Böylece saçılan ışınlara Stokes hatları denir [90].



Şekil 2.13: Stokes ve anti-Stokes hatları.

Raman tayfları bir molekül için kızılötesi tayfları ile beraber ele alındığında o moleküle ait neredeyse bütün titreşimlerin görülmesini sağlayarak, molekülün

kimyasal yapısının veya özelliklerinin belirlenmesinin daha doğru yapılmasını sağlar. Ancak biyolojik çalışmalarda, ortamda su olması kuvvetli absorplama özelliği gösterir. Bu durumda IR yöntemi için sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle, biyolojik çalışmalar için IR spektroskopi çok kullanışlı olmamış, Raman spektroskopiyi oldukça ön plana çıkarmıştır. Su bulununan numunelerde analizin çok daha kolay yapılabilmesi Raman spektroskopinin en önemli avantajlarından biridir. Bu yöntem ile biyolojik olarak çeşitlilik gösteren canlıların parmak izi bölgeleri çalışılarak belirleme yapılabişlmektedir [83].

2.4. Nanopartiküller ve Biyolojik Uygulama Alanları

Nanopartiküllerin büyüklükleri 150 nm'nin altındadır. Küçük boyutları sayesinde yüksek kuantum mekaniksel özellikler gösterirler. Bu nedenle fizikokimyasal özelliklerinin bilinmesi ve geliştirilmesi günümüzde birçok endüstriyel alanda önem kazanmıştır. Nanopartiküllerin; antiobiyotik direnci, kontrolli ilaç salımı, gen taşınımı çalışmaları ve biyosensör uygulamaları gibi alanlarda kullanılabilmesi için biyouyumlu olması çok önemlidir [91 -93].

2.4.1. Altın Nanopartiküller

Kolayca sentezlenebilen altın nanopartiküller, fonksiyonelleştirme yeteneği ile sık sık çalışılan nanopartiküllerdir. Bununla beraber kuvvetli plazmonik özellikleri, biyouyumlu olma, toksik olmama ve hücrenin ölmesine sebep olma gibi özellikleri ile biyomedikal uygulamalarda; hedefe odaklı ilaç taşıyıcıların geliştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Altın nanopartiküller 15-45 nm çaplarında sentezlenebilmektedir. Büyüklüklerindeki farklılıklar ile değişen hidrodinamik ve fiziko-kimyasal hareketler göstermektedir [94], [95].

2.4.2. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküllerin (MNp) manyetik işaretleyici olarak biyolojik maddelerin tanınmasında kullanılmasının sebebi boyutlarının küçük olması ve büyük yüzey alanı/hacim oranına sahip olmalarıdır. Bununla beraber immünomanyetik

ayrım, ilaç taşınımı, hipertermi gibi biyomedikal uygulamalarda MNp'ler tercih edilmektedir. Geçiş metalleri ve metal oksitlerden oluşan MNp'ler 1-100 nm çaplarında sentezlenmektedir. Ancak geçiş metalleri çok kolay oksitlenir ve toksik özellik göstermektedir. Bundan dolayı, oksidatif olarak kararlı olan ferrimanyetik demir oksitler, mıknatıslanma özellikleri yüksek olmamasına rağmen kullanılmaktadırlar. Manyetik çekirdek nanopartiküller çoğunlukla kümeleşme meyillerinin yüksek olması nedeniyle kullanıma uygun değillerdir. Öte yandan biyolojik moleküller ortamda metal bulunduğunda kararlı halde kalamayarak, bozunma tepkimeleri verebilmektedir. Bundan dolayı manyetik çekirdekler organik olmayan maddeler ile kaplanarak biyolojik moleküller ile çalışmaya uygun hale dönüştürülmektedirler. Boyutları oldukça küçük olduğundan süper paramanyetik özellik gösteren nanopartiküller, kuvvetli manyetik yetenekleri ile birlikte kolloidal özellikleri sebebiyle de biyolojik çalışmalarda tercih edilebilmektedir [96]. Antikor bağlanmış MNp'ler karışımdaki hedeflenen antijene hedefe özgü olarak bağlanmaktadır. Mikroorganizmaların miktarlarının belirlenmesinde kullanılmasının en önemli sebebi MNp'lerin hücrelere bağlanması antijen sayısıyla orantılı olmasıdır. Örneğin, El-Boubbou ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada mannoz kaplı MNp'ler ile denemeler yapılmış ve sonucunda 200 kat monomerik mannozdan daha yüksek çekim gücü gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte manyetik glikol Np'lerin E. coli'nin tayininde kullanılıp bununla beraber hedef bakterilerin bulundukları matrisden taşındığını söylenmiştir [97]. Kan örnekleri ile çalışma yapıldığında analiz süresi 2 saat, tespit limiti 10 kob/mLolarak belirlenmiştir.

2.4.3. Kuantum Noktalar

Çapları 3-11 nanometre civarında olan, yarı iletken nanokristal yapılardır. Periyodik cetveldeki II-VI ve III-V grubu bileşiklerden kuantum nokta elde edilebilmektedir. Birçok yarı iletken bileşik için, Bohr yarıçapı 1-11 nm aralığında olmalıdır.

Elektron-boşluk çifti birleşince ortaya çıkan ışın daha fazla enerjiye sahip kısa dalga boyunda meydana gelmektedir. Bu sebeple, yarı iletken nanokristalin boyutu küçüldükçe absorbe edilen ve yayınlanan ışının renginin maviye dönmesi görülmektedir. Büyüklüklerinin ayarlanması ile bant boşluğunda değişiklik meydana

geldiği için kuantum noktalara görülebilir bütün dalga boylarında ve kızıl ötesi dalga boylarında ışıma yaptırılabilmektedir [45]. Mikrobiyoloji alanındaki kuantum noktaları ile ilk çalışmayı Kloepfer ve arkadaşları 2003'te yapmıştır. Daha sonra Zhu ve arkadaşları, su kaynaklı bakterilerden olan Cryptosporidium ve Giardia için immunofloresan antikor prob için denemeler yapmışlardır. Zhao ve arkadaşları 2009 yılında gıdalarda bulunan patojenlerin kuantum nokta ve MNp bağlanmaları ile belirlenmesi üzerine çalışma yapmışlardır. Kitosan biyouyumlu bileşiklerden biridir. Qdot yüzeyine kitosan bağlanmasıyla kuantum noktalar pek çok vücut içi ve vücut dışı biyolojik görüntüleme çalışmalarında kullanılmaktadır [97]. Kitosan; kitine deasetilasyon yapılması ile elde edilir. Deasetilasyon yapıldığında kitin üzerinde yer alan asetilamino yapısı, amino yapısına dönüşür ve bu yapıya kitosan adı verilir [96]. Kuantum noktalar; çok fonksiyonlu yüzeyleri nedeniyle biyolojik moleküller ile çok çeşitli kovalent bağ oluşturabilir, gösterdikleri optik stabilite sebebiyle uzun uygulama sürelerinde çalışma yapılabilir, sahip oldukları üstün parlaklık ve uyarlanabilir optik özellikleri sayesinde birden fazla ürünün çoklu analizine fırsat sunmaktadır. Bütün bu yararları neticesinde biyosensör çalışmalarında organik floresans boyalar yerine kuantum noktaların kullanılmasına öncelik verilmektedir.

2.4.4. Karbon Nanopartiküller

Karbon amorf ve kristalin allotroplara sahiptir. Karbon nanoparçacıkların da farklı atomsal dizilişleri bulunmaktadır. Farklı karbon dizilimleri ve küçük boyutları sayesinde parçacıklar yüksek olmayan toksisite, büyük yüzey alanı ve iyi emilim kapasitesi gibi yüksek fizikokimyasal özellikler göstermektedirler. Bu fizikokimyasal özellikler ile karbon nanoparçacıklar vücut dışı ve vücut içi ilaç taşıma aygıtlarında moleküler taşıyıcı, emici ve katalizör olarak tercih edilmektedirler. Ayrıca nanopartiküllerin yeni türü denilebilecek karbon nanopartiküller; yüksek olmayan maliyeti ve yüksek biyolojik uyumluluğu sayesinde biyomedikal uygulamalar için alan sağlamaktadır [96].

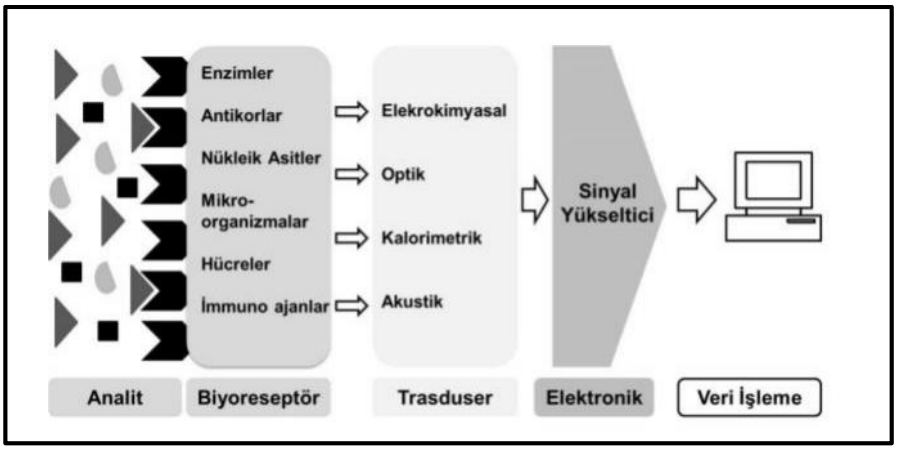
2.5. Biyosensörler

Biyolojik tayinler için seçici olarak kullanılan sensörler “Biyosensörler” olarak adlandırılır. Bu sensörler biyolojik kaynaklı bir tanıma yüzeyi (reseptör) ve dönüştürücü (transistör) sistemden oluşan analiz ürünleridir. Reseptörler, analiz edilecek ürün ile etkileştikten sonra analitleri tanırlar. Bu tanıma sonrasında oluşan kimyasal farklılıklar dönüştürüvü tarafından elektrik sinyaline dönüşürler. Biyolojik moleküllerin (nükleik asitler, antikorlar, hücre, enzim, organeller, bitki ve hayvan dokuları vs.) analitin ile etkileşmesi, tanımaları ile çevirici sistem tanıma işlemini ölçülebilen bir elektrik sinyaline çevirmekte ve elektriksel sinyallerin görüntülenmesini sağlamaktadır.

Günümüzdeki teknoloji gelişimi ile paralel olarak biyosensör tasarımlarını hızlanarak ilerlemiştir [98]. Bir biyosensörün amacı, analizi yapılan ürün hakkında hızlı, doğru ve güvenilir bilgi sağlamaktır. Gelişen teknoloji ile birlikte bu amaçla sağlık sektöründe, tarımda, gıda güvenliğinde, çevresel ve endüstriyel takip faaliyetlerinde önemli bir göreve sahiptirler [99].

2.5.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensörler kısaca iki temel bölümden meydana gelmektedir. Biyosensörün ilk bölümü; biyoreseptör (ligand) olarak adlandırılır. Biyolojik tanıma elemanı yani biyoreseptör, belirli hedef analiti tanıyabilen, biyosensöre sabitlenmiş biyolojik yapıdır [100]. Biyosensörün ikinci bölümü, bağlanarak biyokimyasal /fizikokimyasal titreşimleri ölçümle belirlenebilen elektronik sinyallere çeviren transistördür. Biyoreseptör ve transistörün tipi biyosensörün sınıfını göstermektedir. Şekil 2.15 ‘de biyosensörün çalışma mekanizması gösterilmiştir [101].



Şekil 2.14: Biyosensör çalışma mekanizması genel gösterimi.

Nükleik asitler, antikorlar, hücre ve enzimler biyolojik yapıların başlıcalarını oluşturur. Analiz ürünü ile biyomolekül arasında meydana gelen reaksiyon sonucunda yeni kimyasal ürün meydana gelmesi, sıcaklık artışı, akım, pH veya toplam ağırlığın değişmesi gibi değişimler oluşur. Bu değişimler ile oluşan biyokimyasal işaret, dönüştürücü ile bir elektrik sinyali haline getirilir. Meydana gelen elektrik sinyali yükseltilip bir veri işlemcisine iletilerek ölçülebilir bir sinyal elde edilir [102].

2.5.2. İdeal Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler

İyi bir biyosensör tasarımı için önemli özellik tekrarlanabilirliktir. Tekrarlanabilirlik; aynı koşullarda arka arka alınan sonuçların kesinliğdir. Ölçüm sonuçları birbirine çok yakın sonuçlar olmalıdır.

Bir biyosensör için en önemli özellik seçiciliktir. Örnekte varlığı belirlenmiş analiti diğer maddelerden seçip ölçmesidir.

İdeal bir biyosensörde en az kalibrasyona gereksinimi beklenir. Ancak bu pek mümkün olmamıştır. Biyosensörler çalıştıkları sürece kalibre edilmelidir.

Transistörün etkinliğinin azalması bir biyosensörün kullanım ömrünü belirleyen en önemli etkendir. Bu durum biyosensörün kararlılığını, kalibrasyon sıklığını, tekrarlanabilirliğini ve bunun gibi diğer özellikleri de etkiler.

İdeal bir biyosensörde elektrotlar kararlı (stabil) olmalıdır. Elektrotların stabilitesi biyolojik ürünün sağlamlığına, ortamın sıcaklığı, pH, oksijen derişimi, nem gibi etkilere bağlıdır.

Biyosensörün geniş aralıkta ölçüm yapabilmesi istenmektedir. Analiz ürünü belli bir konsantrasyondan az ya da fazla olursa sonuç alınmayabilir.

Biyosensör, yüksek duyarlılığa sahip olmalıdır ve immobilize edilmiş biyolojik madde sadece belirli maddelere karşı duyarlı olmalıdır.

Bir biyosensörde oluşturulan akım-zaman eğrilerinden elektrodun cevap zamanı öğrenilebilir. Cevap zamanının hızlı olması beklenmektedir. Örneğin; elde edilen eğride basamakların şekli dar ise cevap zamanının kısa (hızlı), geniş ise cevap zamanının uzun (yavaş) olduğu anlaşılır.

İdeal bir biyosensör uygun tayin sınırına sahip olmalıdır. Elektrodun yüzey alanı, immobilize edilen materyalin miktarı ve analite duyarlılığı ile analit miktarı tayin sınırını etkileyen etkenlerdir. Tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması biyosensör kalitesini yakından etkiler.

Geriye dönme zamanı ilk ölçümden ne kadar sonra ikinci ölçüme geçileceğini belirtir. Bu sürenin mümkün olduğunca kısa olması istenir. İlk örnek maddenin eklenmesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa eğer ikinci örnek maddenin de aynı süre sonra ilave edilebileceğini gösterir.

Biyosensör tasarımında elektrot boyutlarının küçük hale getirilmesi ve sterilize edilebilmesi çok önemlidir.

Bir biyosensör tasarımında en önemli önceliklerden biri hedef kullanımının basit ve düşük maliyetli olmasıdır [103].

2.5.3. Biyomoleküller (Biyoreseptörler)

Biyomoleküller, biyosensör teknolojilerinin geliştirilmesinde ve çeşitlerinin arttırılmasında önemli görevleri olan, analiz edilecek analit ile seçici olarak etkileşmede olan yapılardır. Fazlaca hassas olan biyomoleküller olarak doku kesitleri, nükleik asitler, organeller, antikorlar, mikroorganizmalar, enzimler ve biyolojik membranlar içine sabitlenmiş kimyasal sensörler kullanılmaktadırlar. Bazı moleküllerin veya sistemlerin biyomolekül olabilmesi için, reaksiyone girecek moleküle özgü ve yüksek bağlanma kapasitesi gibi belirgin özellikleri içermelidirler [101].

Biyoreseptörler belirlenecek hedef ürünü dönüştürürler ve bu dönüşümden sonra oluşan değişiklikler transistör ile belirlenir. Hedeflenen moleküle karşı yüksek seçici

özellikleri sayesinde enzimler en sık tercih edilen biyoreseptörlerdir. Ancak enzimin düşük stabilitesi ve/veya uygun bir enzimin olmaması ve 2 ve ya daha fazla maddenin tayini yapıldığında mikroorganizmalar ve hücre sistemleri tercih edilir [104].

2.5.4. Dönüştürücüler (Transistörler)

Aynı zamanda transistör de denilen dönüştürücüler, biyoreseptörlerin meydana getirdiği reaksiyonu ölçülebilen bir sinyal haline getiren bölümdür. Meydana gelen reaksiyona bakılarak transistör belirlenir. Elektrotlar, transistörler ve termistörler transistör olarak tercih edilmektedir.

2.5.5. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

DNA Kaynaklı Biyosensörler: Biyomolekül olarak tercih edilen DNA probları 20-30 bağlık kısa, tek zincirli DNA oligomerlerinin kullanıldığı biyosensör sistemleridir. Elektrokimyasal sinyal bir DNA bağıyla oluşur ve elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik bir transistör sayesinde sinyal ölçülebilir.

Doku Kaynaklı Biyosensörler: Enzim saflaştırma işlemlerinin uzun zaman alması ve maliyetli olması ve hedef ürünün farklı enzimlerin birlikte kullanılması yerine bu enzimlerin bulunduğu dokunun kullanımı veya enzim yoksa doku parçalarının biyoreseptör gibi kullanımı bir avantajdır. Dokular kullanıldığında her bir çeşit elektrot için sonuç değişik olduğu için her bir doku için en uygun şekle getirilmesi gereklidir [104].

Enzim kaynaklı biyosensörler: Biyosensörler ile yapılan ilk denemeler enzim sensörleriyle harekete geçmiştir. Enzim kaynaklı biyosensörlerin diğer biyosensörlerle arasındaki fark; biyoaktif kısımda enzimlerin olmasıdır. [105-107].

Antikor/Antijen Kaynaklı Biyosensörler: İmmünosensörler olarak bilinirler. Antikor; yabancı mikroorganizmaların vücuda girmiş olanları veya bu organizmalara karşı bağışıklık sisteminin üretmiş olduğu birimler olarak adlandırılır. Antijen; vücutta bağışıklık sistemini antikor üretimi için teşvik eden vücut içerisindeki yabancı birimler olarak isimlendirilirler. Antijenler ve antikorlar özgü bağlanmışken immünosensörlerle özgül, hassas tayinler oluşturulabilmektedir. Antikorlar uygun transistörler ile uygun hale getirildiğinde virüs, hormon, pestisitlerin bakteri, ilaç ve

çevresel kirletmeye sebep olan moleküllerin tayini için immünosensör olarak üretilip, yükseltilebilir.

Mikrobiyal Biyosensörler: Bu biyosensörler bir transistör ile vücut içi veya vücut dışı mikrobiyal hücrelerin birleşmeleri ile oluşmaktadır. Ayrıca mikroorganizmalar ortam şartlarının olumsuz etkilerine uyum sağlayıp ve bu olumsuzluktan kendilerini ayırıp, geliştirip yeni tür moleküller oluşturabilmektedirler [111]- [113].

2.6. Hidrojeller

Hidrojeller yani su ihtiva eden jeller, hidrofilik ve suda çözünmezlikle karakterize edilen, hidrofilik homopolimerler veya kopolimerlerden oluşan polimerlerdir. Hidrojeller suda çözünmez ve suyun büyük bölümünü yapıları içine alan, üç boyutlu polimerik ağlar olup, hem doğal hem de sentetik polimerlerden hazırlanabilirler. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri vasıyasıyla olur [108].

Hidrojellerin çapraz bağlanmaları ve suda çözünmemeyi sağlarken, hidrojellere gerekli mekanik dayanımı ve fiziksel bütünlüğü de sağlamaktadır. Bu şekilde hidrojeller çözünmeden kütlelerinin %20'sinden çok suyu adsorplayabilmektedirler [109].

Hidrojeller dış ortama bağlı olarak şişme-büzülme gibi davranışlar gösterebilirler. Dış ortamda meydana gelen pH, sıcaklık, iyonik güç, çözücü bileşimi ve elektromanyetik radyasyon değişimlerine karşı şişme oranlarında büyük değişimler gösteren bu hidrojeller uyarı-cevap hidrojelleri olarak adlandırılırlar. Hidrojellerin su adsorplama hızı suyun difüzyonu ile sınırlandığından, hidrojelin küçük boyutlu olması daha hızlı şişmesine neden olmaktadır [110].

2.6.1. Hidrojellerin Sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller, bazı kriterler göz önüne alınarak sınıflandırılmışlardır. Hidrojeller aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir [110]:

Hazırlama yöntemine göre sınıflandırıldığında;

- Homopolimer hidrojeller
- Kopolimer hidrojeller
- Çoklu polimer hidrojeller
- IPN (interpenetrating networks, iç içe geçmiş ağ yapılar) hidrojeller

İçerdikleri yan gruplara göre sınıflandırıldığında;

- Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller
- İyonik hidrojeller

Fiziksel yapılarına göre sınıflandırıldığında;

- Amorf hidrojeller
- Yarı-kristalin hidrojeller
- Hidrojen bağlı hidrojeller

Çapraz bağlanma durumlarına göre sınıflandırıldığında;

- Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller
- Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller

Kaynaklarına göre sınıflandırıldığında;

- Doğal hidrojeller
- Sentetik hidrojeller

Su içeriklerine göre sınıflandırıldığında;

- Düşük şişme dereceli (% 20-50) hidrojeller
- Orta şişme dereceli (% 50-90) hidrojeller
- Yüksek şişme dereceli (%90-99.5) hidrojeller

- Süper-absorban (>% 99.5) hidrojeller

Kimyasal kararlılıklarına göre sınıflandırıldığında;

- Biyolojik olarak bozunabilen hidrojeller
- Biyolojik olarak bozunamayan hidrojeller

2.6.2. Hidrojellerin Kullanım Alanları

Günümüzde hidrojeller en çok süper absorban polimer (SAP) olarak çocuk bezi ve hijyenik ped yapımında kullanılmaktadır. Diğer yandan tarımda toprakta su tutucu olarak, oral ve kontrollü salınım sistemlerinde, kontakt lenslerde, yara örtülerinde, harekete geçiricilerde (actuator), biyosensörlerde, yapay organların yapımında kullanılmaktadır. [111].

Ayrıca hidrojeller; bulundukları ortamın iyonik şiddet, sıcaklık, elektromanyetik ışıma ve pH gibi dış çevre koşullarındaki değişimlere, hacimlerini yüzlerce kat artırıp azaltarak kontrollü bir biçimde cevap verebilmeleri sayesinde biyomedikal, biyolojik algılamalarda, ilaç salınımında, doku dejenerasyonunda, farmasötik, teknoloji ve tarımsal uygulamalarda geniş kullanım alanlarna sahiptir.

2.7. Enzimler

Enzimler; canlıya zarar vermeyecek şekilde, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların uygun şartlarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokatalizörlerdir. Katalizör, kimyasal reaksiyona girdikten sonra reaksiyonu hızlandıran ve reaksiyon sonunda herhangi bir değişime uğramadan çıkan maddedir [112].

Bazı araştırmalarda enzimler, protein yapısında komplike bileşikler olarak tanımlanmışlardır. Enzimlerin görevi, ya büyük moleküllerin parçalanmasında ya da büyük moleküllerin meydana geldiği biyokimyasal reaksiyon basamaklarında substratlardan kimyasal grubu koparma ya da substratlara kimyasal bir grubu eklemektir. Enzimler spesifik bir yapı kazanmış ve genellikle büyük protein

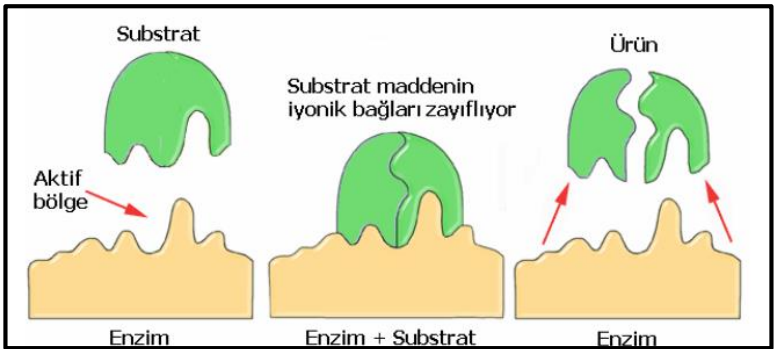
molekülleridir ve protein yapısında oldukları için bu yapıyı amino asitler oluşturmaktadır, yani amino asitlerin birer polimeridir [113].

2.7.1. Enzimlerin Özellikleri

Enzimlerin etkinlik göstermeleri için hücre içinde bulunmalarına gerek yoktur. Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentezlenmektedir ve oldukça özel yapı kazanmış ve çoğunlukla büyük protein molekülleridir. Proteinlerdeki amino asitlerin primer dizilişi genler tarafından belirlenen düzende gerçekleşmektedir. Enzim yapısında bulunan amino asitlerin özel dizilişi, enzimin belirli bir özellik ve kuarterner yapı kazanmasında rolü büyüktür. Enzimler bir ya da daha çok substratı etkilerken aktivite göstermek için bazen koenzime, bazen de kofaktöre gereksinim duymaktadır. Bir enzimin ürünü, diğer bir enzimin substratı olmakta ve bu karşılıklı etkileşimler hücre metabolizmasının düzenlenmesinde etkin rol oynamaktadır [114-116].

Enzimlerin genel özellikleri ve çalışma mekanizmaları sekiz temel madde içinde tanımlanabilir:

- Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat adı verilmektedir. Enzim-substrat ilişkisi o enzimin spesifitesini oluşturur ve E. Fisher tarafından anahtar-kilit mekanizması esas alınarak tanımlanmıştır. Yalnız belirli bir anahtarın kilide uyduğu gibi substrat ta sadece belirli bir enzimin aktif merkezine uymaktadır. Enzim molekülünde aktif bölge adı verilen özel bir bölüm yani reaksiyon merkezi bulunur. Enzim, ilgili substratına geçici olarak bu aktif bölgeden bağlanır ve enzim-substrat (ES) bileşiği meydana gelir. Enzimler substrata dış yüzeyinden etki eder ve bunun ardından substrat parçalanarak bir ya da iki ürüne dönüşür. Şekil 2.15' de Substrat-Enzim mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.15: Enzim - Substrat Mekanizması.

Bu çalışmada enzim substrat ilişkisinden yararlanarak bakteri tayini yapılmıştır. E. coli bakterisi parçalandığında açığa çıkan β-Glukozidaz enzimi 5- Bromo - 4 Chloro-3- indolyl – β-D- Galactopyranoside (X-GAL) substratı ile birleşerek mavi renkli kompleks oluşturmuş, böylece E. Coli tayini yapılabilmiştir.

- Organizmada yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesi için gerçekleşen reaksiyon sayısı kadar enzim çeşidi bulunmakta ve her enzim belirli bir reaksiyon katalizlemektedir.
- Enzimler genellikle tersinir reaksiyonlara katılır yani reaksiyonlar çift yönlü çalışmaktadır. Ancak sindirim enzimleri bu kuralın dışında kalmaktadır. Çünkü oluşan ürünün hemen organizma tarafından enerji olarak kullanılmak üzere değerlendirilmesi ve çoğunlulukla sindirim enzimlerinin inaktif şekilde sentezlendikten sonra başka bir tepkime ile aktif hale geçmesi bu kuralı bozmaktadır.
- Belirli bir apoenzim çeşidi belirli bir koenzim ya da kofaktör ile birlikte çalışmaktadır. Ancak bir koenzim ve kofaktör, birden fazla enzimle çalışabilmektedir. Bu nedenle var olan enzim sayısı ve çeşidi, kofaktör ve koenzim sayısından daha fazladır.
- Enzimler düşük enerji ve ısı kullanarak çok hızlı çalışırlar. Örneğin karbonik anhidraz C enzimi bir dakika içinde 36.000.000, amilaz enzimi 1.100.000 ve kimotripsin enzimi ise 6.000 molekülü ürüne çevirmektedir.
- Enzimler biyolojik katalizör oldukları için girdikleri tepkimelerden değişmeden çıkmakta ve aynı reaksiyonu tekrar tekrar katalizlemektedir. Sürekli kullanıma bağlı olarak bozulan enzimler parçalanmakta ve ilgili hücre tarafından yeniden sentezlenmektedir.
- Enzimatik reaksiyonlar belirli bir düzen içinde gerçekleşmektedir. Herhangi bir reaksiyon sonucu oluşan ürün, bir sonraki reaksiyonun substratı olabilmektedir. Örneğin amilaz enzimi ile parçalana nişastadan ürün olarak maltoz oluşmakta ve maltaz enziminin substratını oluşturmaktadır.
- Enzimler aktif ya da inaktif olarak bulunabilirler. İnaktif konumdaki enzim adlandırılırken katalizlediği reaksiyonun sonuna –jen ekini alır. Tripsinojen, kimotripsinojen ve pepsinojen örnek olarak verilebilir. Enzim aktif konumda ise

katalizlediği reaksiyonun sonuna –az eki alır. Lipaz, amilaz, proteaz, aminopeptidaz örnek olarak verilebilir [114-116].

2.7.2. β-Glukozidaz Enzimi

Beta glukozidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan altı sınıflandırma biriminden Hidrolazların bulunduğu sınıfta yer alırlar [117]. Sistematik adı β-D-glukozid glukohidrolaz (EC 3.2.1.21) olan β-glukozidazlar oligosakkaritlerdeki veya diğer glukoz bileşiklerindeki β-glukozid bağlarını hidroliz edebilen enzimlerdir. β-Glukozidazların mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak bulundukları ve biyolojik yollarda önemli görevlerinin olduğu bilinmektedir [118].

β-Glukozidazlar tarafından katalizlenen β-glukozidik bağlarının hidrolizi sonucu disakkarit, oligosakkarit ya da konjuge olmuş glukozidler oluşur. Bu yüzden doğada farklı rollere sahip β-glukozidazlar bulunur. Enzimatik sistemdeki mevcudiyetleri bitkinin biyokütlesinin yıkımın ve insanlarda Guacher's hastalığı gibi moleküler patolojilerin açığa çıkmasını sağlar. β-Glukozidazların başka bir önemli özelliği de şekerlerin ve şeker türevlerinin spesifik enzimatik sentezi için önemli olan transglikozidasyon (glukozidik birimlerin transferi gibi) aktivitesine sahip olmasıdır [119].

Bunlara ek olarak gıda, kozmetik, ilaç ve deterjan endüstrisinde kullanılan ticari öneme sahip çeşitli glikozitlerin sentezinde kullanılabilmektedir. Ayrıca β-glukozidazın antioksidan olma, kan glukoz düzeyini düşürme, zarları donma-çözülme hasarlarından koruma, tirozinazı inhibe etme gibi çeşitli ve önemli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır.

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Adı	**Markası**
5- Bromo – 4- Kloro -3- indolil – β-D-Galaktopiranosid (X-GAL)	Chem-Impex
Agar Agar	Sigma -Aldrich
Agaroz	GeneOn
Amonyak	Merck
Borik Asit	Merck
Dimetil Formamid	Merck
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	Merck
Disodyum Hidrojen Fosfat	Sigma - Aldrich
EDTA.Na (Titriplex III)	Merck
Eozin Y	Carlo Erba
Escherichia coli – Bakteri Diski	Selectrol - ATCC® 10536
Demir II Klorür Dört Sulu	Carlo Erba
Demir III Klorür Altı Sulu	Carlo Erba
L- Arjinin	Merck
Laktoz	Biolife
Lauril Triptoz Ortamı – LTB	Condalab
Liziz Tamponu	ChemBio
Metilen Mavisi	Merck
Pepton	Biolife
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Sigma – Aldrich
Sodyum Klorür	Merck
Sodyum Lauril Sülfat	Merck
Sükroz	Merck
Triptoz	Biolife
Tris (Hydroxylmethyl Aminomethane)	Fischer Sci

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Tablo 3.2: Tez kapsamında kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	**Markası**
Etüv	Nüve
Hassas Terazi	Sartorious Analytc
Manyetik Karıştırıcı	Velp
Mikropipet	Eppendorf
Otoklav	Nüve
pH Metre	Hach Lange HQD40
Vorteks Karıştırıcı	Isolab
Plunger Tüp	Whatman Uniprep - UN113EAQU
Şırınga Ucu Filtre	Filtrosphere – Selüloz Asetat
Chromogenic UTI agarlı petri	Spesera

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1.1.10x TBE (Tris-Borate-EDTA) Tampon Çözeltisi Hazırlanması

Hidrojel yönteminde ve şırınga ucu filtre yönteminde agaros çözücüsü olarak 10x TBE tampon çözeltisi kullanılmıştır. 10x TBE tampon çözeltisi hazırlanırken; 108 g Tris bazı, 55 g borik asit ve 7.5 g EDTA bir miktar saf su ile çözündükten sonra, balon joje içerisinde 1 Litreye saf su ile tamamlanmıştır.

3.3.1.2. Serum Fizyolojik Çözeltinin Hazırlanması

9 gr Sodyum klorür 500 mL saf su içinde çözündü ve balon joje ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edildikten sonra stok bakteri çözeltisinin, seyreltilmesinde kullanıldı.

3.3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

3.3.2.1.EMB (Eosin Methylene Blue Lactose Sucrose) Agarlı Besiyeri Hazırlanması

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde, Enterobacteriaceae familyasının patojen üyeleri ve koliform grup bakteriler için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. EMB Agar hazır karışımından 36.2 g tartılarak 1 litre distile suda çözünmüştür. EMB'nin bileşiminde: pepton 10.0 g/l; dipotasyum hidrojen fosfat 2.0 g/l; laktoz 5.0 g/l; sükroz 5.0 g/l; eozin y 0.4 g/l; metilen mavisi 0.07 g/l; agar agar 13.5 g/l bulunmaktadır.

Hazırlanan besiyeri, otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edilir ve 45-50 ^{o}C'ye soğuduğunda steril petri kutularına 12.5'er mLdökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızımsı-kahverenginde olup, 25 °C'da pH'sı 7.1±0.2'dir.

3.3.2.2. LTB (Lauryl Tryptose Broth) Broth Hazırlanması

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakterilerin EMS yolu ile sayılması için önerilen selektif sıvı besiyeridir. Dehidre besiyeri, 35.6 g/L olacak şekilde destile su içinde çözünür. LTB Broth bileşiminde; triptoz 20.0 g/L; laktoz 5.0 g/L; sodyum klorür 5.0 g/L; sodyum lauril sülfat 0.1 g/L; dipotasyum hidrojen fosfat 2.75 g/L; potasyum dihidrojen fosfat 2.75 g/L bulunmaktadır.

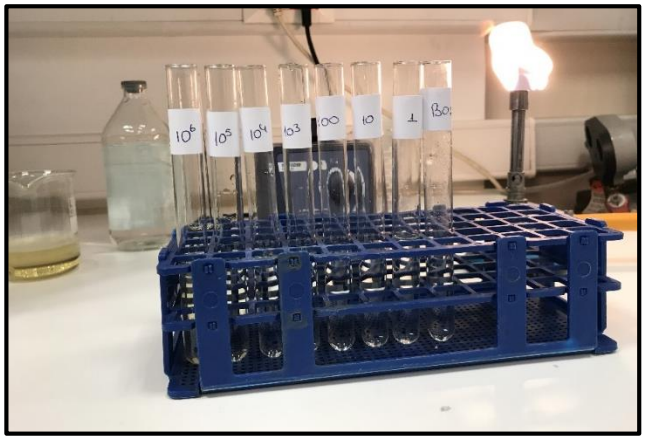
Besiyeri çözülüp, otoklavda 121 ^{o}C'de 15 dakika sterilize edildilten sonra 25 ^{o}C'da pH 6.8±0.2'dir ve hazırlanmış besiyeri berraktır ve sarımsı renktedir.

Bu çalışmada bakteri süspansiyonu hazırlanmasında, bakterilerin çoğalması için kullanılmıştır.

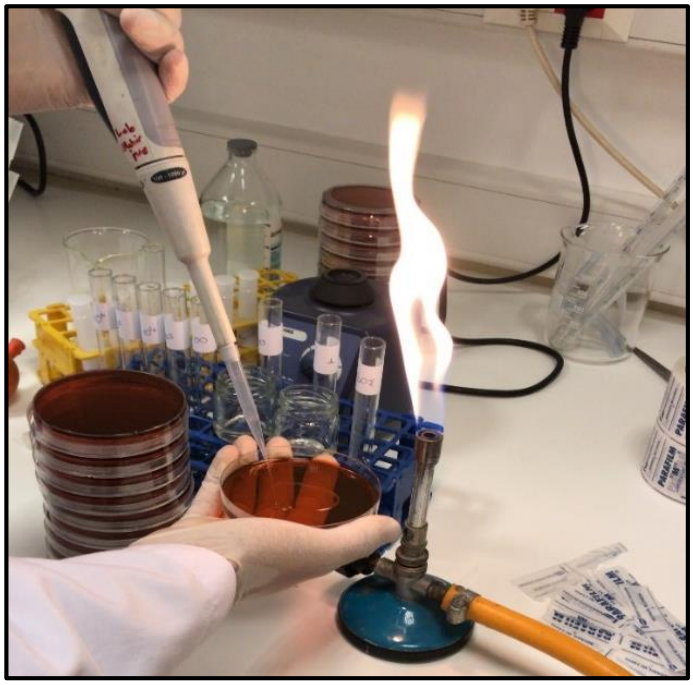
3.3.3. Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması

Bek alevi eşliğinde sağlanan steril ortamda kullanılan tüpler, beherler ve diğer bütün malzemeler steril edildikten sonra kullanıldı. 100 mL saf suda 3.56 gr LTB Broth çözülerek, 1 mL broth içine 1 adet bakteri diski atıldı ve vorteks ile karıştırılarak çözülmesi sağlandı ve 37°C'de 24 saat bekletildi. 24 saat sonra seyreltme serisi

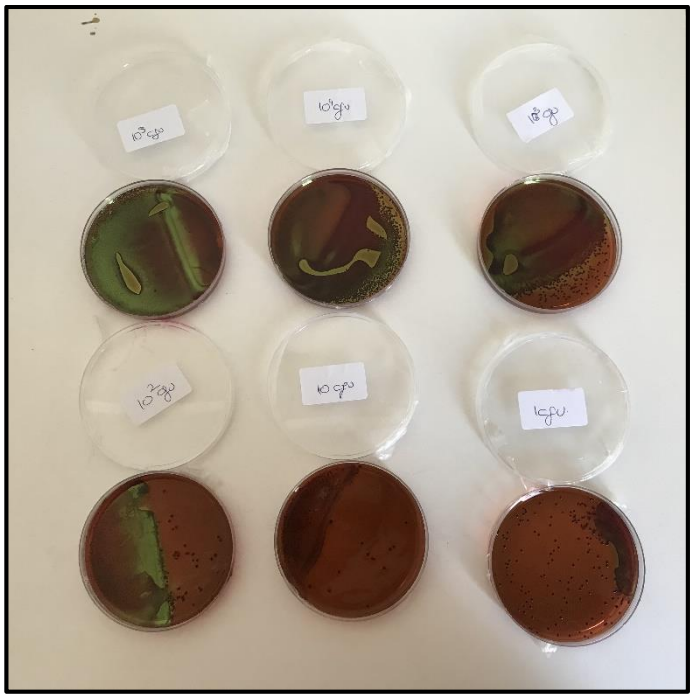
hazırlandı (Şekil 3.1). Hazırlanan serum fizyolojik sıvısı bakteri süspansiyonu hazırlanması için kullanıldı. Stok bakteri miktarı olan 10^6 Cfu üzerinden 10^5, 10^4, 10^3,10^2, 10 ve 1 Cfu'luk süspansiyonlar hazırlandı. Her çalışma için taze süspansiyon hazırlandı ve dilüsyonların her biri EMB agarlı petriye ekilerek (Şekil 3.2) 24 saat 37ºC'de bekletildikten sonra oluşan bakteriler fotoğraflandı.



Şekil 3.1: Bakteri Dilüsyon Serisi.



Şekil 3.2: Bakteri dilüsyonlarının petriye ekimi.



Şekil 3.3: 24 saat 37ºC'de inkübe edilen bakteri ekimi yapılmış EMB agarlı petriler.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Manyetik Nanopartikül (MNp) Yöntemi

Bu yöntemde demirli bileşikler kullanılarak manyetik nanopartiküller sentezlendi. Sentezlenmiş manyetik nanopartiküllere Arjinin bağlanarak arjinin kaplı manyetik nanopartiküller (Arg-MNp) sentezlendi. Bakteriler ile nanopartiküllerin bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilip, bağlanan bakterilerin kontrolü hazırlanmış stripler ile yapıldı.

3.4.1.1. Manyetik Nanopartikül (MNp) sentezi

Yinjia Jin ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada belirtilen yöntem ile MNp sentezi yapıldı [120]. Bu yöntemde belirtildiği üzere, 30 mL 0.1 M demir (II) klorür ($FeCl_2$ – Mw: 198.81 g/mol) çözeltisi ve 60 mL 0.1 M demir (III) klorür ($FeCl_3$ – Mw: 162.20 g/mol) çözletisi yavaşça birbirine karıştırıldıktan sonra çözeltinin pH'ı 10.2 olana kadar damla damla amonyak ilave edildi. Siyah manyetik çökeltiler

oluşmaya başladı. Mıknatıs yardımıyla dekantasyon işlemi yapılarak üstte kalan su uzaklaştırıldı.

3.4.1.2. Arjinin Kaplı Manyetik Nanopartikül sentezi (Arg-MNp)

Arjinin kaplı manyetik nanopartikül sentezi için W.Trujillo ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışmadan yararlanıldı [121]. Bu yöntemde belirtildiği üzere, 10 mL suda L- Arjinin (1 g) çözündü ve ardından içine daha önce sentezlediğimiz manyetik nanopartikül (2 g) koyuldu, karıştırılmıştır. Mıknatıs yardımıyla dekantasyon işlemi yapılarak üstte kalan su uzaklaştırılmıştır.

3.4.1.3. Test Striplerinin Hazırlanması

Strip formülasyonu Gunda ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış oldukları çalışma ile belirlendi [122]. Bu çalışmada enzim-substrat ilişkisinden yararlanılarak test stribi üzerinde oluşan renk ile bakteri varlığı belirlenmiştir. E. Coli bakterisi lizing çözeltisi ile parçalandıktan sonra açığa çıkan β- Glukuronidaz ezimi, stripteki X-Gal ile reaksiyona girerek mavi renkli kompleks oluşturmaktadır. Böylece oluşan mavi renk ile bakteri varlığı belirlenmiştir. Çalışmada belirtildiği üzere, toz kimyasallar ayrı bir yerde, sıvılar ayrı bir yerde karıştırıldıktan sonra bir araya getirildi. Bu yöntemde; önce 50 mg X-Gal ve 50 mg LTB karıştırılırken, ayrı bir yerde Dimetil Formamid : Lizing Çözeltisi: Su - 1:2:5 oranında karıştırıldı. Sıvı ve toz karışımı bir araya getirildikten sonra, test kağıtları bu çözelti ile ıslatılarak, 1 gece oda koşullarında kurutuldu. Kuruyan test kağıtları yuvarlak kesilerek, pvc strip plastikleri üzerine yapıştırıldı.

3.4.1.4. Arg-MNp ile Yapılan Çalışmalar

İlk olarak 10^5 Cfu, 10^4 Cfu ve 10^3 Cfu bakteri içeren standart solüsyondan deney tüpüne 5 mL alındı. Üzerine 40 µl Arg-MNp ilave edildi. Çalkalandıktan sonra 15 dakika sabit beklendi. Tüpün yan kısmına mıknatıs koyularak manyetik nanopartiküllerin bir araya toplanması sağlandı. Üstte kalan sıvı ayrıldı. Üstte kalan

sıvıda bakteri kontrolü yapmak için, EMB agarlı petriye ekim yapılıp, 24 saat 37 ºC'de bekletildikten sonra sonuçlar kontrol edildi.

Altta kalan manyetik nanopartiküllere 40 µl lizing çözeltisi ilave edildikten sonra 15 dk bekletildi. Manyetik nanopartiküller mıknatıs ile sabit tutularak, ayrılan sıvı strip üzerine damlatıldıktan sonra sonuç gözlendi.

3.4.2. Hidrojel Yöntemi

Bu yöntemde 20 mL su numunesi ile herhangi bir zenginleştirme yöntemi kullanmadan sonuç almak hedeflenmiştir. Tüplere jel ilave edilip, kurutulduktan sonra 20 mL su numunesi ilave edildikten sonra sonuçlar 24 saat takip edilmiş, sonuç veren konsantrasyonlar ve sonuç verme süreleri belirlenmiştir.

3.4.2.1. Hidrojel Sentezi

Kumar Gunda ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları çalışmadan yararlanılarak hidrojel formülasyonu belirlendi [122]. Çözeltiler ayrı yerlerde hazırlanarak en son belirtilen oranlarda karıştırıldı. 3 beher alındı; birinci beherde 50 mLsuda 1.78 g LTB Broth, ikinci beherde DMF:su (1:1) karışımı içinde 0,15 g X-Gal ve üçüncü beherde 10 mL10x TBE tampon çözeltisi içinde 0,2 g agaros çözüldü. 5 mL LTB Broth, 1.25 mLlizing Çözeltisi, 2 mL substrat (X-Gal) çözeltisi, 5mL agaros çözeltisi ile karıştırıldı. Her bir tüpe 0.5 mL jel koyulduktan sonra 24 saat oda koşullarında kurutuldu.

3.4.3. Plunger Tüp Yöntemi

Bu yöntemde bakteri zenginleştirmek amacıyla plunger tüpten yararlanıldı. Su numunesi plunger tüpün iç kısmına konuldu. Piston kapatılıp, piston ucundaki filtreden üste geçen su döküldü. Piston ucundaki filtreden geçemeyen bakteriler lizing ile parçalanarak substrat emdirilmiş test stribi ile analiz edildi. Kullanılan test stribi Bölüm 3.4.1.3'de anlatıldığı şekilde hazırlandı.

Şekil 3.4: Plunger Tüp.

Konsantrasyonu bilinen bakteri çözeltilerinden plunger tüp içine 5'er mL koyuldu. Tüpe ait piston kapatılarak içine geçen fazla su, kapak açılarak döküldü. Piston tüpten ayrıldıktan sonra, dipte kalan bakteri çözeltisine 40 µl lizing çözeltisi ilave edilerek 15 dk beklendi. Bekleme süresi sonunda numune test stribi üzerine dökülerek sonuç gözlendi.

Plunger tüpten geçirilen su numunesinin üstte kalan kısmı EMB agarlı petriye ekilerek, 37°C'de 24 saat bekletildi. Bakterinin tamamının altta kalıp kalmadığı gözlenip, fotoğraflandı.

3.4.4. Şırınga Ucu Filtre Yöntemi

Bu yöntemde bakterilerin şırınga ucu filtreden geçmediği kabul edilerek, bakteri varlığı filtreye emdirilmiş substrat içeren jel ile belirlenmiştir. Zenginleştirme aracı olarak şırınga ucu filtre kullanılmıştır. Herhangi bir ek işleme gerek duymadan kısa sürede bakteri tayini amaçlanmıştır. Şırınga ucu filtreden geçirilen bakteri içeren su numuneleri, geçirildikten sonra Chromogenic UTI agarlı petriye ekilmiş, bakterinin filtrede kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir.

3.4.4.1. Substrat İçeren Jelin Hazırlanması

Hidrojel yöntemi ile aynı çalışma referans alınmıştır [122]. Çözeltiler ayrı yerlerde hazırlanarak en son belirtilen oranlarda karıştırıldı. 3 beher alındı; birinci beherde 50 mL suda 1.78 g LTB Broth, ikinci beherde DMF:su (1:1) karışımı içinde 0.25 g X-Gal ve üçüncü beherde 10 mL 10x TBE tampon çözeltisi içinde 0.4 g agaros

çözüldü. 5 mL LTB Broth, 1.25 mLlizing Çözeltisi, 2 mL substrat (X-Gal) çözeltisi, 5mL agaroz çözeltisi ile karıştırıldı. Her bir şırınga ucu filtreye 0.3 mL jel koyulduktan sonra 24 saat oda koşullarında kurutuldu.

3.4.4.2. Şırınga Ucu Filtre Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

Şırınga ile 10 mL su numunesi çekildikten sonra ucuna substrat emdirilmiş filtre yerleştirildi. Su numunesi yavaşça filtreden geçirildi. Su numunesindeki bakteri konsantrasyonuna bağlı olan renk oluşumu gözlemlendi.

3.4.4.2.1. İnkübasyonlu Yöntem

Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde bakteri serisi hazırlandı. Her birinden 10'ar mL alınarak substrat emdirilmiş şırınga ucu filtreden geçirildi. 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyon yapıldı. Sonuçlar ilk 6 saat 15 dk'da bir, daha sonra saatte 1 olacak şekilde takip edilerek sonuç veren konsantrasyonlar belirlendi.

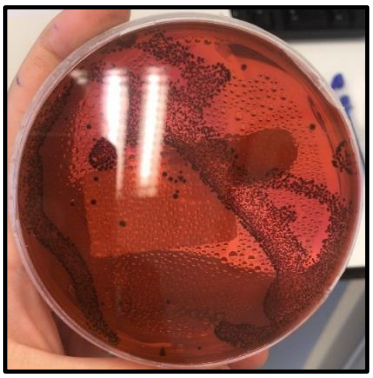
3.4.4.2.2. İnkübasyon İçermeyen Yöntem

Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde bakteri serisi hazırlandı. Her birinden 10'ar mL alınarak substrat emdirilmiş şırınga ucu filtreden geçirildi. Oda koşullarında 24 saat bekletildi. Sonuçlar ilk 6 saat 15 dk'da bir, daha sonra saatte 1 olacak şekilde takip edilerek sonuç veren konsantrasyonlar belirlendi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

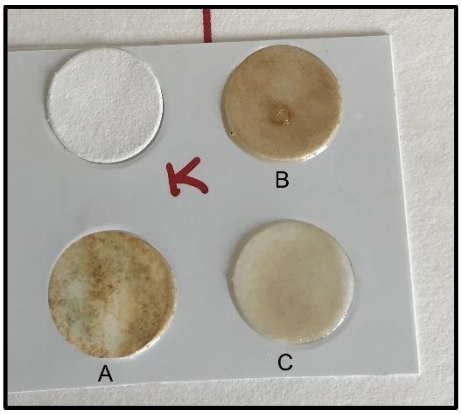
4.1. Arg-MNp ile yapılan çalışmalar

EMB agarlı petriye yapılan ekimlerde Arg-MNp'lerin bakteriyi tamamen bağlamadığı gözlenmiştir. 24 saat 37ºC'de bekletilen petrilerde bakterilerin oluşumu gözlendi.



Şekil 4.1: Arg – MNp'e bağlanmamış bakterilerin EMB Agarda çoğalması.

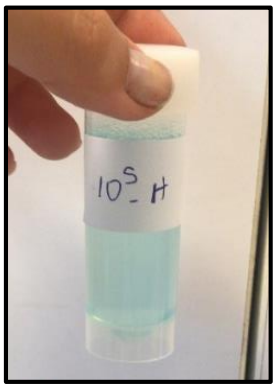
Lizing ile parçalanan numune strip üzerine damlatıldıktan sonra, strip üzerine gelen manyetik parçacıklar renk oluşumunun net gözlenmesini zorlaştı. Dolayısıyla bu yöntem bu şartlarda başarılı olamadığı için üzerinde çalışılması gerekmektedir.



Şekil 4.2: Strip üzerine damlatıldıktan 3 saat sonra sonuçlar; A)10^5 B) 10^4 C) 10^3 CFU.

4.2. Hidrojel Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

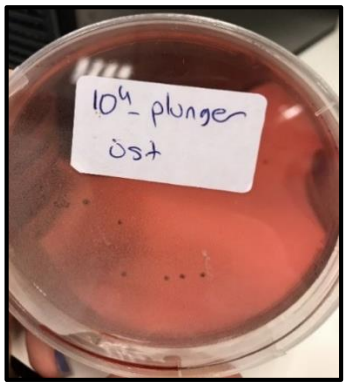
10^5 ve 10^4 Cfu ile yapılan denemede ilk 30 dk içinde renk oluşmaya başlamış, 1 saat sonunda E.coli varlığını gösteren mavi renk net olarak gözlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 10^3 ve 10^2 Cfu 24 saat içinde sonuç verirken, 10 ve 1 Cfu herhangi bir sonuç vermemiştir. Bu yöntem 10^2 Cfu ve daha fazla bakteri içeren sularda kolayca bakteri tayini için tercih edilebilecek ve daha düşük miktarlardaki tayin için çalışmalar yapılabilecektir.



Şekil 4.3: 10^5 Cfu ile 30 dakika içinde mavi renk oluşmaya başlması.

4.3. Plunger Tüp Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

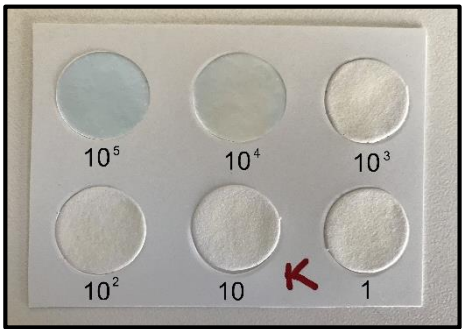
Plunger tüpten geçirilen su numunesinin üstte kalan kısmı EMB agarlı petriye ekilerek, 37ºC'de 24 saat beklendi. Bekleme süresi sonunda petrilerde bakteri oluşmadığı gözlenmiş, bakterinin tamamının alt kısımda kaldığı belirlenmiştir.



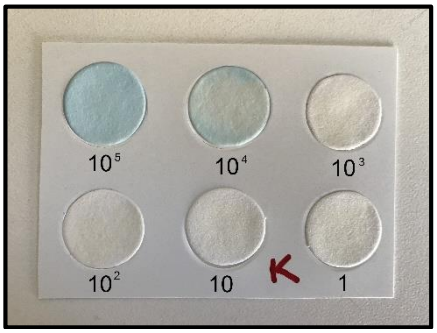
Şekil 4.4: 10^4 Cfu bakteri çözletisi plunger tüpten tüpten geçirildikten sonra üstte kalan kısmın EMB agarda kontrolü.

Serideki her bakteri konsantrasyonu ile deneme yapılmış, strip ile sonuç verme süresi belirlenmiştir. Görsellerde de görüldüğü gibi 10^5 Cfu 10.dk'da renk vermeye başlamış 30. dakika sonra renk tamamen belirgin hale gelmiştir. Fakat 10^3 Cfu'da her hangi bir renk değişimi gözlenmemiştir. Bu yöntem 10^4 Cfu ve üzeri miktarlarda sonuç vermektedir.

Şekil 4.5: Strip üzerine ilk koyulduğunda.



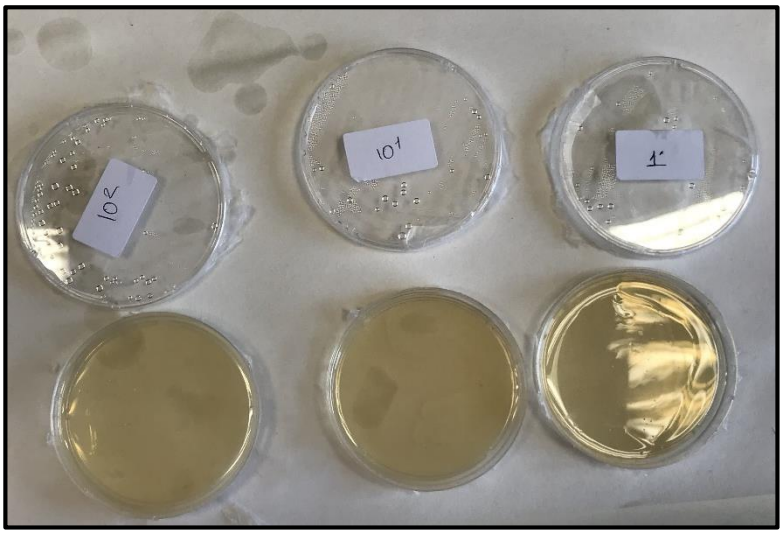
Şekil 4.6: 30. Dakikada striplerdeki renk oluşumu.



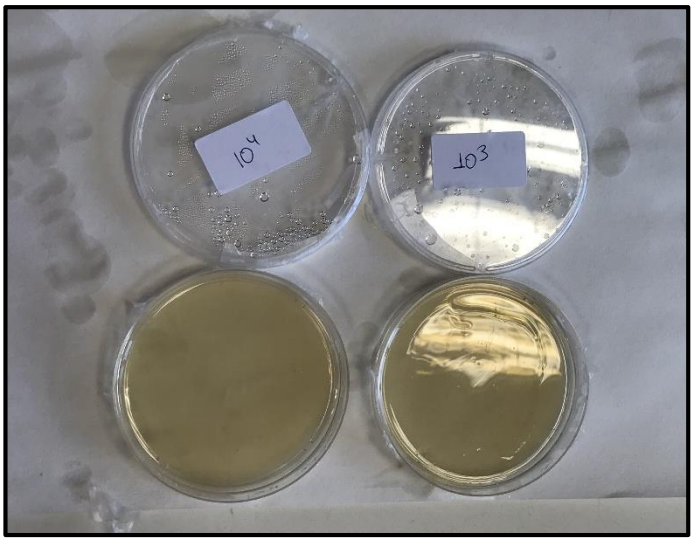
Şekil 4.7: 1. Saat sonunda striplerdeki renk oluşumu.

4.4. Şırınga Ucu Filtre Yöntemi ile Yapılan Çalışmalar

Bakteri içerdiği bilinen su numuneleri, substrat içeren jel emdirilmiş şırınga ucu filtreden geçirildikten sonra Chromogenic UTI agarlı petriye ekim yapıldı. 24 saat 37°C'de bekletildikten sonra, petrilerde herhangi bir bakteri üremesi gözlenmedi. Bakterinin tamamının şırınga ucu filtre üzerinde kaldığı belirlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9).



Şekil 4.8: Bakteri çözeltileri şırınga ucu filtreden geçtikten sonra – 1 (10^2 Cfu, 10 Cfu, 1 Cfu).

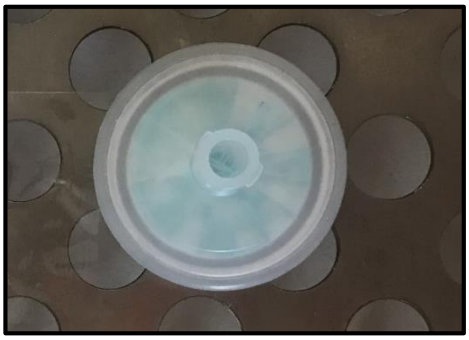


Şekil 4.9: Bakteri çözeltileri şırınga ucu filtreden geçtikten sonra – 2 (10^4 Cfu, 10^3 Cfu).

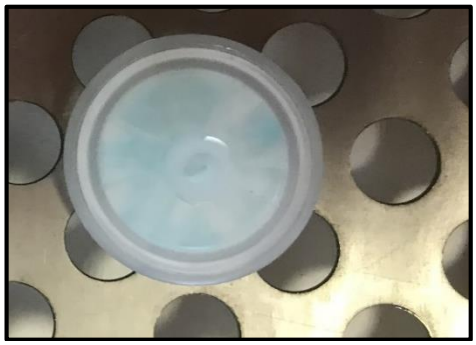
Bu yöntem ile 2 farklı çalışma yapılmıştır. İlkinde su numunesi geçirilmiş şırınga ucu filtre 37ºC'de inkübe edilerek sonuçlar takip edilmiştir. İkinci yöntemde su numunesi geçirilmiş şırınga ucu filtre oda sıcaklığında bekletilerek sonuçlar takip edilmiştir. İnkübasyon yapılan yöntemde diğerine göre daha hızlı sonuç alınmıştır. Ayrıca inkübasyonlu yöntemde daha düşük miktardaki bakteri tayinlerinin mümkün olduğu görülmüştür.

4.4.1. İnkübasyonlu Yöntem

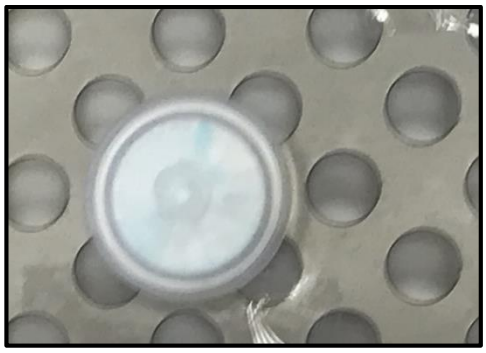
Bu yöntemde 10^4 ve 10^3 Cfu'da 10. dakikada renk oluşmaya başlamıştır. 10^2 Cfu 1 saat sonra renk vermeye başlamıştır. 10 Cfu yaklaşık 20 saat sonra hafif renk vermeye başlamışken 1 Cfu'dan herhangi bir sonuç alınmamıştır. İnkübasyon yapılmayan yönteme göre daha hızlı sonuç vermiştir. Ayrıca 20 saat sonunda az da olsa renk veren 10 Cfu, inkübasyon yapılmayan yöntemde herhangi bir renk vermemiştir.



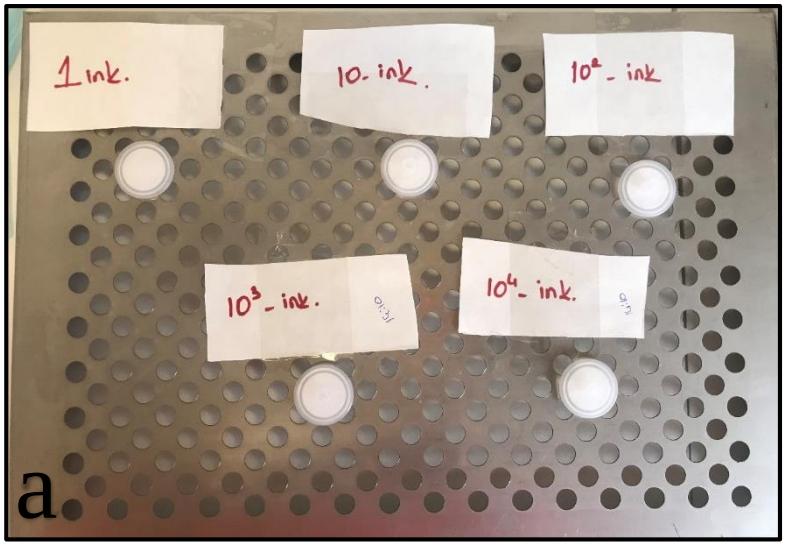
Şekil 4.10: 10^4 Cfu bakteri içeren standart – 1 saat inkübasyondan sonra.

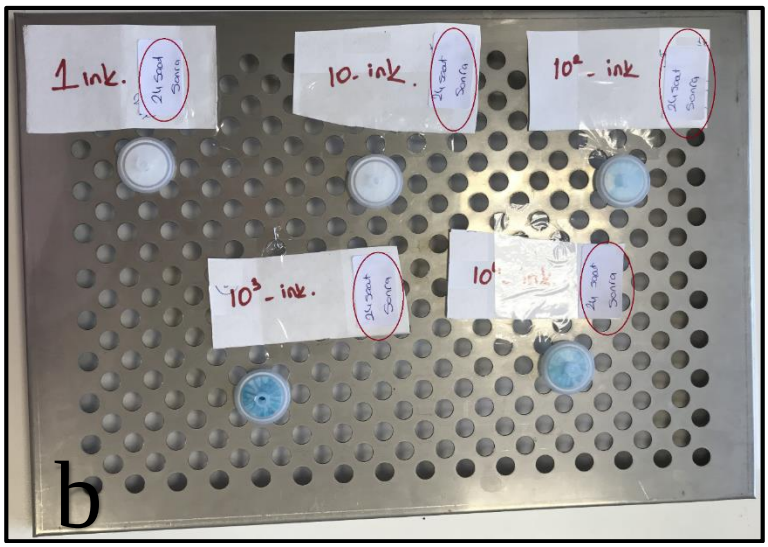


Şekil 4.11: 10^3 Cfu bakteri içeren standart – 2 saat inkübasyondan sonra.



Şekil 4.12: 10^2 Cfu bakteri içeren standart – 2,5 saat inkübasyondan sonra.



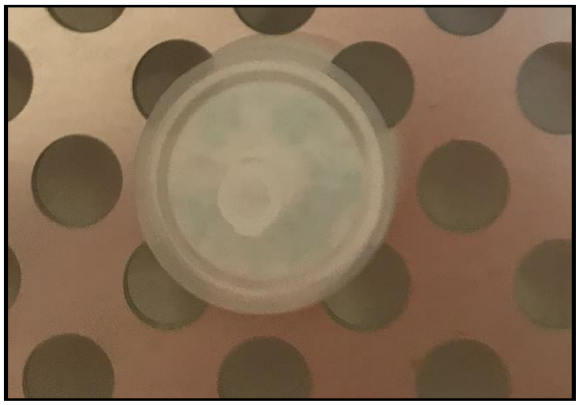


Şekil 4.13: Bakteri içeren standartlar– a) Başlangıçta
b) 24 saat inkübasyondan sonra.

4.4.2. İnkübasyon İçermeyen Yöntem

Bu yöntemde 10^4 ve 10^3 Cfu'da 15. dakikada renk oluşmaya başlamıştır. 10^2 Cfu 90 dakika sonra renk vermeye başlamıştır. 10 Cfu ve 1 Cfu'dan herhangi bir sonuç alınmamıştır. İnkübasyonlu yönteme göre renk yoğunlaşması ve oluşumu daha yavaş olmuştur.

Şekil 4.14: 10^4 Cfu bakteri içeren standart – 1 saat bekledikten sonra.



Şekil 4.15: 10^3 Cfu bakteri içeren standart – 2 saat bekledikten sonra.

Şekil 4.16: 10^2 Cfu bakteri içeren standart – 2,5 saat bekledikten sonra.

4.5. Tartışma

Su hayat için vazgeçilmez bir bileşendir. Canlıları oluşturan hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri yalnızca su ile mümkün olmaktadır. Su fiziksel, kimyasal ve biyolojik vazifeleriyle canlıların olmazsa olmaz gıda maddesidir [9]. Yeryüzünde sürekli döngü şeklinde olan su tüketim noktasına gelinceye kadar bazı kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik kirleticilerler ile kirletilmektedir [10].

Eskiden, suyun hijyen ve temizliğine yeteri kadar önem verilmemiştir. Bir yerden başka bir yere akan suyun temiz olduğuna, suyun renksiz, kokusuz, ferah ve içimi hoş olan bir suyun temizliğine ve iyiliğine inanılmıştır. Bunun sonucunda birçok hastalığa ve salgınların çıkmasına neden olmuştur.

İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğin 2011 yılı baskısında [23] ve 2013 yılında değiştirilen yeni yönetmelikte içme-kullanma sularının 100 mL'sinde, içme suları ve kaynak sularının 250 mL'sinde da koliform grubu bakteri sayısı 0 olarak verilmiştir [24]. E.coli hastane ve halk kökenli idrar yolu enfeksiyonlarından en fazla izole edilen patojenik bakteri olup, bulguların hemen hemen %80-95'inin etkeni olduğu gözlenmiştir [58,59].

Bakteri tayininde; Kuru madde tayinine dayalı yöntem, mikroskobik sayım yöntemi, en muhtemel sayı yöntemi, besiyeri yöntemi, membran filtrasyon yöntemi ve cihaz kullanımı gerektiren hızlı sayım yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemleri uygulamak için güçlü altypıya sahip laboratuvar ortamına sahip olma zorunluluğu ile birlikte uzun analiz süresi ve yüksek bütçelere ihtiyaç vardır.

Tez kapsamında planlanan ve gerçekleştirilen bu çalışmada herhangi bir pahalı laboratuvar cihazına gerek duymadan, kısa sürede bakteri tayini yapılması amaçlanmıştır. Bunun için enzim-substrat yöntemine dayalı 4 farklı yöntem denenmiştir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

i) MNp yönteminde; nanopartiküllere arjinin bağlanarak deneme yapılmış ancak bakterilerin tamamen bağlanmadığı gözlenmiştir. Bakteri içeriği bilinen seri ile yapılan denemelerde 10^5 Cfu ve 10^4 Cfu'da sonuç alınmıştır. Bakterilerin tamamı bağlanmadığı için sonuç yaklaşık 3 saat sonunda ortaya çıkmıştır. Ayrıca siyah nanopartiküllerin yoğunluğundan dolayı renk gözlenmesi zorlaşmıştır. Bu yöntem ile tez kapsamında amaçlanan sonuca ulaşılmamıştır.

ii) Hidrojel yönteminde; yüksek konsantrasyonda bakteri içeren numunelerde hızlı ve belirgin sonuç vermiştir. Bakteri miktarı azaldıkça oluşan renk miktarı azalmış, sonuç verme süresi uzamıştır. Şırınga ucu filtre ve Plunger Tüp yöntemleri ile kıyaslandığında daha uzun sürede sonuç verdiği gözlenmiştir. 10^5 ve 10^4 Cfu konsantrasyonlarında net sonuç verirken, 10^3 Cfu'da renk oluşumu oldukça az olduğu gözlenmiştir. Ancak 10^2 ve daha düşük Cfu'larda sonuç alınmamıştır.

iii) Plunger Tüp yönteminde; bakterilerin tamamen tutulduğu görülmüştür. Bu yöntemde strip ile ölçülemeyecek miktarda, enzim açığa çıktığından yalnızca yüksek konsantrasyonlarda kullanımı uygundur. Konsatrasyonu bilinen bakteri serisi ile yapılan denemelerde 10^5 ve 10^4 Cfu konsantrasyonlarında net ve hızlı sonuç alınmış olmakla birlikte 10^3 Cfu ve altında olan miktarlarda sonuç alınmamıştır.

iv) Şırınga ucu filtre yöntemi, 37°'de inkübasyonlu ve inkübasyonsuz olarak 2 şekilde deneme yapılmıştır. İnkübasyonlu olan yöntem diğerine göre daha hızlı sonuç vermiş ve aynı zamanda daha düşük konstantrasyonlarda sonuç alınmıştır. İnkübasyonlu yöntemde 10^4 ve 10^3 Cfu ilk 15 dakikada sonuç verirken, 10^2 Cfu 1 saat içinde sonuç vermeye başlamıştır. 20 saat sonunda 10 Cfu'da da renk gözlenmiştir. İnkübasyon içermeyen yöntemde 10^4 ve 10^3 Cfu ilk 20 dakikada sonuç verirken, 10^2 Cfu; 2 saat içinde sonuç vermeye başlamıştır. 10 ve 1 Cfu da 24 saat içinde herhangi bir renk gözlenmemiştir.

v) Yukarda bahsi geçen 4 yöntem kıyaslandığında, sonuç verme süresi ve düşük LOD açısından şırınga ucu filtre yönteminin diğerlerine göre daha başarılı olduğu söylenebilir. Ayrıca kullanım kolaylığı açısından da şırınga ucu filtre yöntemini diğerlerinden ayıran en önemli olumlu özelliğidir.

vi) Hali hazırda piyasada varolan test kitleri kullanım kolaylığı açısından kıyaslandığında, en kolay yöntem olan Swislab markalı E.coli test stribi 10 dakika içerisinde 1370 Cfu bakteri miktarını tayin edebilmektedir [124]. Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz sonuçlara göre 10 dakika içerisinde 1000 Cfu tespit edilirken, 60 dakika içerisinde 100 Cfu bakteri miktarı tayin edilebilmektedir. Tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre test kiti üretilerek piyasaya sürülebilme potansiyeline sahiptir.

Tablo 4.1: Tez kapsamında denenen yöntemlerden elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

Yöntem		**1.Saat**	**3.Saat**	**24. Saat**
Manyetik Nanopartikül		-	10^5 Cfu	-
Hidrojel		10^5 - 10^4 Cfu	-	10^3 – 10^2 Cfu
Plunger Tüp		10^5 - 10^4 Cfu	-	-
Şırınga Ucu Filtre	**İnkübasyonlu**	10^4 - 10^3 Cfu	10^2 Cfu	10 Cfu
	İnkübasyonsuz	10^4 - 10^3 Cfu	10^2 Cfu	-

KAYNAKLAR

[1] Öztelli Y., (2004), "Bayburt İli Merkez İlçede İçme Sularında Enterohemorajik Escherichia Coli (O157:H7)'nin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.

[2] Taştemur S., (2013), "Membran Filtrasyon Tekniği ile Koliform Analizinde Kullanılan Besiyerlerinin Kıyaslanması", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.

[3] Nicolaou N., Xu Y., Goodacre R., (2012), "Detection and Quantification of Bacterial Spoilage in Milk and Pork Meat Using MALDI-TOF-MS and Multivariate Analysis." Analytical Chemistry, 84 (14), 5951-5958.

[4] Mao X., Yang L., Su X.L., Li Y., (2006), "A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7." Biosens Bioelectron, 21 (7), 1178-1185.

[5] Kankur F., (2016), "İstanbul Anadolu Yakasında İçme-Kullanma Sularından Membran Filtrasyon Yöntemi İle İzole Edilen Escherichia Coli Suşlarında O157 Varlığının Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi.

[6] Chang H.K., Ishikawa, F.N., Zhang, R., Datar, R., Cote, R.J., Thompson, M.E., Zhou, C.,(2011), "Rapid, Label-Free, Electrical Whole Blood Bioassay Based on Nanobiosensor Systems." ACS Nano, 5 (12), 9883-9891.

[7] Yokota K., Tsutsui, M., Taniguchi M., (2014), "Electrode-embedded nanopores for label-free single-molecule sequencing by electric currents." RSC Advances, 4 (31), 15886-15899.

[8] Van Rooy T.B., (2003), "Bottling up our natural resources: the fight over bottled water extraction in the United States." Journal of Land Use, 18 (2), 267–298.

[9] Demirer M.A., (1988). Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Ders Notları, Besin Hijyeni Özel Bölüm Kısım I Su Hijyeni.

[10] Günşen U., Anar Ş., Gündüz H,. (2000), "Uludağ'daki su kaynaklarının fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik yönden incelenmesi." Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi, 7(2), 21–24.

[11] Golas I., Filipkowska Z., Lewandowska, D., Zmyslowska I., (2002), "Potentially pathogenic bacteria from the family Enterobacteriaceae, Pseudomonas spp and Aeromonas spp. In waters designated for drinking and household puposes.", Polish Journal of Environmental Studies, 11 (4), 325–330.

[12] WHO, (1996), World Health Organization, 1. Guidelines For Drinking-Water Quality - Second Edition - Volume 2.

[13] Tekinşen O.C., Yalçın S., (1990), “Su hijyeni ve muayenesi.” Aksaray, Selçuk Üniversitesi Ders Notları.

[14] WHO, (2002), World Health Organization, Water and Health in Europe, WHO Regional Publications European Series, No. 93, World Health Organization.

[15] Ünlütürk A., Turantaş F., (1988), “Sularda toplam koliform sayımında kullanılan membran filtrasyon ve kuvvetle muhtemel sayı yöntemlerinin karşılaştırılması.” Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Müh. Dergisi, 6 (2), 137-145.

[16] Holt G.H., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams, S.T., (1994), “Bergey’s of Manual of Determinative Bacteriology”, Nineth Edition, Maryland, USA.

[17] Halkman AK, Doğan HB, Noveir M., (1994), “Gıda Maddelerinde Salmonella ile E. coli Arama ve Sayma Yöntemlerinin Karşılaştırılması.”, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisleri Bölümü, Gıda Teknolojisi Derneği. Yayın No: 21

[18] Tunail N., (2009). Mikrobiyoloji. Ankara: Pelin Ofset; 2009. 434s.

[19] Çakır İ., (2000), “ Koliform Grup Bakteriler ve E coli. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları.”Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.

[20] Halkman A.K., (2005), Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Ankara.

[21] Aldsworth T, Dodd CER, Waites W., (2009), “Food Microbiology. In, Food Science and Technology.”, Ed Geoffrey Campbell-PlattWiley-Blackwell. Singapure, p 115-173.

[22] Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. 29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete

[23] İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik, 2005. https://www.ttb.org.tr/mevzuat/index.php?option=com_content&view=article&id=250:santet-amai-sular-hakkinda-yetmel&catid=2:ymelik&Itemid=49 (Erişim Tarihi: 12.03.2016)

[24] İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik 07.03.2013 tarih ve 28580 sayılı Resmî Gazete (Erişim Tarihi: 12.03.2016)

[25] Davidson P., Roth L., Gambrel-Lenarz L., (2004), “Coliform and Other Indicator Bacteria”, 17th ed. Eds: Wehr H, Frank J, Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Washington DC: American Public Health Association; 570 p.

[26] Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W., (2002), “Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria”, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4. (Erişim tarihi; 10 Ekim 2013).

[27] Efrima S., Zeiri L., (2009), “Understanding SERS of Bacteria”, J. Raman Spectrosc, 40 (3), 277-288.

[28] Bitton G., (1999), “Waste Water Microbiology”, Wiley-Liss Inc., New York, 578p.

[29] Ray B., (1996), “Fundamental Food Microbiology”, CRC, Boca Raton, 516p.

[30] Prior J.L., Titball R.W., (2002), “Monoclonal antibodies against Yersinia pestis lipopolysaccharide detect bacteria cultured at 28 ^{o}C or 37 ^{o}C” Mol. Cell. Probes, 16 (4), 251-256.

[31] Sapsford K.E, Rasooly A, Taitt C.R, Ligler F.S., (2004), “Detection of campylobacter and Shigella species in food samples using an array biosensor”, Anal. Chem, 76 (2), 433-440.

[32] Noveir M.R., (1998), “Gıda Kaynaklı Escherichia coli O157:H7 Üzerine Bir Araştırma”, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi.

[33] Adams M.R., Moss M.O., (1999), “Food Microbiology”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

[34] Chapelle F.H., (2001), “Ground-Water Microbiology And Geochemistry”, John Wiley And Sons, New York.

[35] Temiz A., (1999), “Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar”, Gıda Mikrobiyolojis,. Mengi Tan Basımevi, İzmir, 107s.

[36] Bilgehan H., (2000), “Klinik Mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları”, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, Onuncu baskı, İzmir.

[37] Töreci K., (2002), Escherichia Türleri, İnfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

[38] Ustaçelebi Ş., (l999), “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji”, Güneş Yayınları Ankara.

[39] Ingledew W.J., Poole R.K., (1984), “The Respiratory Chains of Escherichia coli.” Microbiol Rev, 48 (3), 222-271.

[40] Darnton N.C, Turner L., Rojevsky S., Berg H.C., (2007), “On Torque and Tumbling in Swimming Escherichia coli”, Journal of Bacteriology, 189 (5), 1756-1764.

[41] Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D., (2004), "Phages and The Evolution of Bacterial Pathogens: From Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion", Microbiol. Mol. Biol. Rev, 68 (3), 560-602.

[42] Akşit F., (1996), "Bakterilerin Yapı ve Fizyolojileri. Serter N. Mikrobiyoloji", Eskişehir: T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 490.

[43] Erensoy S., (1990), "İzmir ve Çevresindeki Sürgün Olgularında Enteropatojen Escherichia coli ve Enterohemorajik E.coli Kökenlerinin Araştırılması", Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi.

[44] Baron E.J., Finegold S.M., (1990), "Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology", Mosby Company.

[45] Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M., (2002), "Tıbbi Mikrobiyoloji. Gözden geçirilmiş genişletimiş 9. Baskı", İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.

[46] Akça M.Ö., (1994), "Gastroenteritli Olgularda Etken Olarak E.coli O157:H7 Araştırılması", Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi.

[47] Kılıçturgay K., Gökırmak F., Töre O., Gedikoğlu S., (1993), "Klinik mikrobiyoloji", Bursa, Onur Yayıncılık.

[48] Kolter R., (1998), "Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili", Mol Microbiol, 2(30), 85-93.

[49] Bozkaya E., (2005), "Tıbbi Mikrobiyoloji 2, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları", Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

[50] Erdem U.C., (1995), "Membran filtrasyon tekniği ve gıdalarda kullanım alanları", Ankara Üniversitesi, Ankara.

[51] Temiz A., (2000), "Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri", Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.

[52] Erol İ., (2007), "Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Ankara üniversitesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilimdalı", Ankara.

[53] Vieria N., Bates S., Solberg D., Ponce K., Howsmon R., Cevallos W., Trueba G., Riley L., Eisenberg N., (2007), "High prevalence of emteroinvasive escherichia coli isolated in a remote region of northern coastal ecuadar", American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, 76 (3), 528-533.

[54] Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn J.R., (1997), "Enterobacteriaceae Color Atlas And Tekxbook Of Diagnostic Microbiology", 5, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 2(6), 145- 149.

[55] Emery D.A., Nagaraja K.V., Shaw D.P., Newman J.A., Eells, D.G., (1992), "Virulence Factors Of Escherichia Coli Associated With Colisepticemic Chickens", Avian Dis, 36 (3), 504-511.

[56] Günaydın M., (2004), "Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonlarında Mikrobiyolojik Tanı", Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi.

[57] Strohl A.W., Rouse H., Fisher B.D., (2006), "Microbiology", Ang, Ö. (Çeviri Editörü), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

[58] Kaygusuz S., Apan T.Z., ve Kılıç D., (2001), "Toplum Kökenli Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni Gram Negatif Bakterilerde Çesitli Antibiyotiklere Diren.", Aknem Dergisi, 2(15), 101-103

[59] Kaya D., Öksüz S., ve Kaya E., (2001), "Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni Olan Escherichia Coli Suşlarının Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması", A.İ.B.Ü. Düzce Tıp Fak. Dergisi, 50(3), 172-7

[60] Hooton T.M., ve Stamm W.E., (1997), "Diagnosis and Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infection", Infect Dis Clin Nort, 84 (7), 771-776.

[61] Mc Millan J., De Angelis, C.D., Feigin, R.D. Ve Warshaw, J.B., (1999). "Oski's Pediatrics Principle And Practice", 3, Philadelphia.

[62] Wilson W.R. and Henry N.K., (2001), "Urinary Tract Infections", Current Diagnosis & Treatment İn Infectious Diseases, New York.

[63] Procop G.N. ve Cockerill, F., (2001), "Enterititis Caused by Escherichia coli and Shigella and Salmonella Species", Current Diagnosis & Treatment in Infectious Diseases , New York.

[64] Eraksoy H., ve Özsüt H., (1994), "Hastane Dışı Üriner Sistem İnfeksiyonlarında Empirik Antibiyotik Tedavisi", Enfeksiyon Hastalıkları Yayınları Derneği.

[65] Stamm W.E., ve Stapleton A.E., (1998), "Approach to the Patient with Urinary Tract Infection", Infectious Diseases Philadelphia.

[66] Chapman P.A., (2000), "Sources of E.coli O 157 and Experience Over the Post 15 Years in Sheffield", J App. Microbiol. Symp. Suppl., 88 (1), 51-60.

[67] Anonim, (2005), "Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları", Ed: Halkman AK. Ankara: Başak Matbaacılık Ltd.Şti.

[68] Halkman A.K., Doğan H.B., (2000), "Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Bilgiler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları", Ankara: Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası.

[69] Andrews W.H., Hammack T.S., (2003), “Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate”, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 1. [Erişim tarihi; 10 Ekim 2013].

[70] Şahin İ., (1999), “Genel Mikrobiyoloji”, 1. basım. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi.

[71] TSE, (1996), Mikrobiyoloji-Muhtemel Escherichia coli Sayımı İçin Genel Kurallar En Muhtemel Sayı Tekniği, TS 6063 ISO 7251.

[72] Andrews W.H., (1995), “Official methods of analysis of AOAC international. Microbiology methods”, Food and Drug Administration. 16th edition. Virginia-USA, p.1-111.

[73] Büyükerkek-Tor T., (2004), “Sudaki Kromun Membranlar Kullanılarak Uzaklaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi.

[74] Eykamp W., (1995), “Microfiltration and ultrafiltration, in Membrane Separations Technology: Principles and Applications”, Eds. Noble, R.D. and Stern, S.A., Elsevier Science, B.V., USA.

[75] Gıda, İçecek ve İlaçlarda Mikrobiyolojik Analizlerin Kolay ve Güvenilir Yolu. (2012), İstanbul: Membran Filtrasyon. Sartonet Seperasyon Teknolojileri Ltd. Şti.

[76] Akman M., (1975), “Zar süzgeç (Membran Filtre) yöntemi ile sularda E. coli sayımı”, Mikrobiyoloji Bülteni, 9 (3), 257-267.

[77] Johnson T, Case C., (2010), “Bacteriologic Water Quality: Membrane–Filtration”, Laboratory Experiments in Microbiology. San Francisco: 2010 [Erişim tarihi; 10 Ekim 2013].

[78] Web 1, (2012), http://www.smccd.edu/accounts/case/biol675_water/doc/membr_filtr.pdf [Erişim Tarihi: 07/06/2020].

[79] Crespo G. J., Böddeker W. K., (1994), “Membrane Processes in Separation and Purification”, 3 (5), 229-262.

[80] Salt Y., ve Dinçer S., (2006), “Özel Ayırma İşlemlerinde Bir Seçenek: Membran Prosesleri”, Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, Sigma 2006/4, İstanbul.

[81] Çakır İ., ve Doğan H.B., (2000), “ Membran Filitrasyon Uygulamaları. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları”, Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Ankara, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası.

[82] XU T., (2005), "Ion Exchange Membranes: State of Their Development and Perpective", Journal of Membrane Science, 2 (63), 1-29.

[83] Pharmeuropa, (2006), "Alternative Methods for Controlling of Microbiological Quality", Pharmeuropa, 16 (5), 555-565.

[84] Moldenhauer J., Yvon P., (2005), "Environmental Monitoring Using Scan RDI Polym'air", Moldenhauer J. Environmental Monitoring: A Comprehensive Handbook. River Grove: IL and Bethesda, MD,.

[85] Newby P.J, Johnson B., (2003), "Overview of Alternative Rapid Microbiological Technologies", Washington: Interpharm/CRC.

[86] Karaboz İ, Kayar E, Akar S., (2008), "Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR", 2 (1), 1-18.

[87] Cudjoe K.S. Robinson R.K, Batt C.A, Patel P.D., (2000), " Immunomagnetic Particle-Based Techniques", Encyclopedia of Food Microbiology, San Diego: Academic Pres.

[88] Safarik I, Safarikova M, Forsythe S.J., (1995), "A Review: the Application of Magnetic Separations in Applied Microbiology", Journal of Applied Bacteriology, 78 (6), 575-585.

[89] Bange A, Halsal H.B, Heineman W.R., (2005), "Microfluidic Immunosensor Systems", Biosensors and Bioelectronics, 20 (5), 2488-2503.

[90] Wild D, Davies C. Components. Wild D., (1994), "The Immunoassay Handbook", New York: Stockton Pres.

[91] Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S. (1997), "Enstrümental Analiz Yöntemleri", 2. Baskı. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

[92] Joshi V.G., Chindera K., Singh A.K., Sahoo A.P., Dighe V.D., Thakuria D., Tiwari, A.K. and Kumar S., (2013), " Rapid label-free visual assay for the detection and quantification of viral RNA using peptide nucleic acid (PNA) and gold nanoparticles (AuNPs)", Analytica Chimica Acta, 795: p. 1-7.

[93] Olbrich C., Gessner A., Schroder W., Kayser O. and Muller R.H., (2004), "Lipid drug conjugate nanoparticles of the hydrophilic drug diminazene-cytotoxicity testing and mouse serum adsorption", J Control Release, 96 (3), 425-430.

[94] Rodoplu D., Boyaci I.H., Bozkurt A.G., Eksi H., Zengin A., Tamer U., Aydogan, N., Ozcan, S. and Tugcu-Demiroz, F., (2015), "Quantitative Characterization of Magnetic Mobility of Nanoparticle in Solution-Based Condition", Curr Pharm Des, 21 (37), 5389-400.

[95] Sharma V., Park K. and Srinivasarao M., (2009), "Shape separation of goldnanorods using centrifugation", Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (13), 4981-5.

[96] Mace C.R., Akbulut O., Kumar A.A., Shapiro N.D., Derda R., Patton M.R., Whitesides G.M., (2012), "Aqueous multiphase systems of polymers andsurfactants provide self-assembling step-gradients in density", Journal of theAmerican Chemical Society, 134 (22), 9094-7.

[97] Lee J., Deininger R.A., (2004), "Detection of E. coli in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence.", Luminescence, 19 (1), 31-36.

[98] Tüylek Z., (2017), Biyosensörler Ve Nanoteknolojik Etkileşim, Elektronik Ve Otomasyon Bölümü, Biyomedikal Cihaz Teknolojisi Programı, Journal Of Science.

[99] Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D., (2008), "Biosensor Technology: Technology Push Versus Market Pull." Biotechnol Adv., 26 (5): 492-500.

[100] Zourob M., (2010), Recognition Receptors in Biosensors.

[101] Otlu B., (2011), "Biyosensörler: Biyoreseptör Moleküller", In: 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11).

[102] Malhotra B.D., Turner A.P.F., (2003), Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensor, 1-36.

[103] Karataş B., (2019), "Sefdinir-Dna Etkileşiminin İmpedimetrik Biyosensör İle İncelenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Sivas Üniversitesi.

[104] Telefoncu A., (1999), "Biyosensörlere genel bakış." Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, 1-9.

[105] Kökbaş U., Kayrın L., Tuli A., (2013)," Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları." Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.

[106] Karaboğa M. N. S., Sayıklı Şimşek Ç., Sezgintürk M. K., (2016), "AuNPs Modified, Disposable, ITO Based Biosensor: Early Diagnosis of Heat Shock Protein 70." Biosensors and Bioelectronics, 84(15), 22-29.

[107] Duan H. Y., Rong K., Lawrence C. C., (2005), "Investigation on The Mechanism of H2S Removal by Biological Activated Carbon in A Horizontal Biotrickling Filter." Applied Microbiology and Biotechnology, 69(3), 350-357.

[108] Banu H., (2013), "Karragenan Katkılı yeni polimer/kil kompozit hidrojellerinin sentezi, karakterizasyonu ve potansiyel soğurum kapasitelerinin araştırılması.", Yüksel Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi.

[109] Üzüm Ö.B., Kundakcı S., Armağan A., Karadağ E.. (2005), "Kimyasal Çapraz Bağlanmış Aam/AMPS Kopolimerlerinde Şişme Karakterizasyonu.", XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası.

[110] Sop E. S., (2013), "Doku genişletme amaçlı hidrojel sentezi, karakterizasyonu ve şişme kinetiği." Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi.

[111] Çakmak H., (2013), "Fiziksel ve Kimyasal Çapraz Bağlı DNA Hidrojellerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi,

[112] Dinçkaya E., (1997), "Enzimolojiye genel bakış.", Enzimoloji lisansüstü yaz okulu (editör azmi telefoncu), s:1-15.

[113] Özata A., Kutlu M., (2000), "Enzimoloji ders notları. "Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.

[114] Trevor Palmer B.A., (1985), "Understanding Enzymes.", Second Edition. Ellis Horwood Limited.

[115] Karlson P., (1992), "Biyokimya." Arkada Tıp Kitapları. Seri No: 7, Çeviren: Prof. Dr.Azmi Telefoncu, İstanbul, 327s.

[116] Gözükara E.M., (1997), "Biyokimya 2", Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.

[117] Henrissat B. A., (1991), "Classification Of Glycosyl Hydrolases Based On Amino Acid Sequence Similarities.", The Biochemical Journal, 280(2), 309-16.

[118] Ergöçen G., (2013)., "B-Glukozidaz Enziminin Kayısı (Prunus Armeniaca) Çekirdeklerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.

[119] Çelik A., (2015) "B-Glukozidaz Enziminin Farklı Taşıyıcılar Üzerine İmmobilizasyonu ve Farklı Çay Örnekleri Üzerine Aroma Artırıcı Özelliklerinin İncelenmesi.", Yüksek Lisans Tezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi.

[120] Yinjia J., Fei L., Chao S., Meiping T., (2013)., "Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles", Water Research,Volume 50 (1), 124-134.

[121] Trujillo W., Zarria J., Pino J., Menacho L., (2018), "Adherence of amino acids functionalized iron oxide nanoparticles on bacterial models E. Coli and B. subtilis.", Journal of Physics, 1-9.

[122] Gunda N.S.K., Chavali R., Mitra S.K., (2016), " DipTest: A litmus test for E. coli detection in water", Royal Society of Chemistry, PLoS ONE 12(9): 101-3

[123] Gunda N.S.K., Chavali R., Mitra S.K., (2016), "A hydrogel based rapid test method for detection of Escherichia coli (E. coli) in contaminated water samples.", Royal Society of Chemistry, Published on 21 April 2016. Downloaded by University of Wollongong.

[124] Web 2, (2021), https://swiss-labs.org/wp/product/swiss-labs-bacteria-e-coli-test-kit-for-water-2-pack/ [Erişim Tarihi 10/02/2021].

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Gümüşhane'de doğan Abdurrahim BULUT, lise eğitimini İstanbul'da tamamlamıştır. 2004 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümün'den mezun olup, 2005 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. 2008 yılında yüksek lisans eğitimi devam ederken Bilge Kimya isimli firma kuruluşunu gerçekleştirmiştir. Günümüzde aynı firmada çalışma hayatına devam etmektedir.