

Caddebostan (İstanbul) Rekreasyon Alanlarındaki Fekal Kirlilik İndikatörü *Enterococcus* spp. Bakterilerinin Klasik ve Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi

Nüzhet Cenk SESAL^{1*}, İskender KARALTI², Barlas DİNGİLYAN³,
Figen Esin KAYHAN¹ Birkan AÇIKGÖZ¹

¹Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34722 Göztepe, İstanbul-TÜRKİYE

²Yeditepe Üniversitesi- Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı- 34755 Ataşehir, İstanbul - TÜRKİYE

³Marmara Üniversitesi, Doğa Bitkileri ve Su Ürünleri Araştırma Merkezi, Göztepe, 34722 İstanbul-TÜRKİYE

*Corresponding author: csesal@marmara.edu.tr

Özet

İstanbul Anadolu yakasının Caddebostan plajları çok sayıda insanın tercih ettiği önemli rekreasyon alanlarından biri olması nedeniyle halk sağlığı bakımından mikrobiyolojik kirlenmenin incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda; sonbahar (Ekim), kış (Ocak), ve özellikle de yaz (Haziran, Temmuz, Ağustos) aylarında Caddebostan rekreasyon alanında denizdeki fekal kirliliğin indikatörü olarak belirtilen *Enterococcus* spp. nin klasik plak sayım ve moleküler düzeyde Q-PCR yöntemleri ile belirlenmesi ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Literatürde *Enterococcus* spp. bakterisinin dayamlı olması nedeniyle 8 günlük fekal kirliliği ifade ettiği belirtilmiştir. Fekal kirlilik; hava sıcaklığı, yağış (kar, yağmur, vs.), rüzgar gibi parametrelere göre değişkenlik gösterebileceğinden çalışmamızda, örnek numunelerinin alındığı gün dahil olmak üzere 8 gün öncesine kadar gerçekleşen hava durumu raporları ile örneklerden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yaz aylarında yapılan ölçümlerde bakteri sayılarının daha fazla arttığı izlenmiştir. Klasik ve moleküler iki yöntemin sonuçları arasında logaritmik olarak pozitif bir korelasyon görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus* spp., Fekal kirlenme, Plak sayım metodu, Q-PCR.

Enterococcus spp. Indicator of Fecal Pollution is Detected by Classical and Molecular Methods from Recreation Areas in Caddebostan (Istanbul)

Abstract

Caddebostan beaches are one of the most important recreational area in Anatolian side of Istanbul. Microbiologically investigation of fecal contaminants will be most important for public health.

In our study, we aim to investigate *Enterococcus* spp. that marked of the source of fecal pollution in autumn (October), winter (January), and especially summer (June, July, August) by culture-based traditional and molecular methods such as plate count and Q-PCR method respectively.

Enterococcus spp. expressed at last 8 days of fecal pollution because of its resistant in literature. Fecal pollution may be changed with some parameters such as weather, precipitation (snow, raining, vs.), wind. Because of this reason, including the day of the sample collected until the 8 days before the sample collection date reports of the weather was compared with results from the samples. The number of *Enterococcus* spp. was accelerated in summer months. Logarithmic positive correlation was found between classical and molecular methods.

Keywords: *Enterococcus* spp., Fecal pollution, Plate count methods, Q-PCR.

Sesal NC, Karaltı İ, Dingilyan B, Kayhan FE, Açıkgöz B (2011) Caddebostan (İstanbul) Rekreasyon Alanlarındaki Fekal Kirlilik İndikatörü *Enterococcus* spp. Bakterilerinin Klasik ve Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi. Ekoloji 20 (80): 74-80.

GİRİŞ

Çevre kirliliği günümüzde doğayı ve doğal dengeleri etkileyen en önemli faktördür. Çevre

kirliliğinin bir parçası olan deniz kirliliği ise deniz kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi

Geliş: 08.09.2010 / Kabul: 15.03.2011

biçiminde gözlenen ve doğrudan ya da dolaylı olarak biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, balıkçılıkta, deniz suyu kalitesinde ve deniz suyunun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde ya da enerji atıklarının boşaltılması olarak tanımlanmaktadır (Alemdar ve ark. 2009).

Özellikle yaz aylarında havaların ısınması ile birlikte halkın eğlence mekanlarını (rekreasyon alanları) daha fazla tercih etmelerinden dolayı deniz suyu kalitesinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Deniz suyu kalitesini belirleyen parametreler mikrobiyolojik parametreler, fiziko-kimyasal parametreler ve kirlilik indikatörü olan diğer maddeleri içeren başlıklar altında bir bütün olarak tanımlanmıştır (Anonymous 2004).

Çevre ve Orman Bakanlığı'nın 31.12.2004 tarihli su kirliliği yönetmeliğinde fekal koliform ve fekal *Streptococcus* türleri yüzme suyu kalitesini mikrobiyolojik olarak incelemek için kullanılması gereken parametreler olarak belirtilmiştir. *Echerichia coli* (*E. coli*) ve *Enterococcus* spp. sayısının fazla olması durumunda hastalık yapabilen, ortamda patojen bakterilerin varlığını gösteren indikatör türler olarak tercih edilmektedir (Bucak ve Karlık 2011).

Sağlık Bakanlığı Mavi Bayrak Projesi ve Deniz Kirliliği Analiz projesi kapsamında; Tekirdağ, Çanakkale, İstanbul, Kocaeli, Bursa, Balıkesir, İzmir, Muğla, Antalya, Adana ve İçel illerinde belirlenen noktalarda insan kaynaklı mikrobiyolojik kirlilikte indikatör tür olan *E. coli* ve *Enterococcus* spp. türlerinin sürekli izlenmesi gerekmektedir. Ayrıca, Avrupa Birliği (AB) uyum sürecinde ön hazırlık amacıyla 2002 yılından itibaren tüm kıyılarda bu parametrelerin izlenmesine başlanmıştır.

Günümüzde özellikle bakterilerin tanımlanması için rutin olarak kültür-tabanlı tanımlama yöntemleri ve takiben biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Bakterilerin tanımlanmasında bütün yöntemlerin avantajlarının ve dezavantajlarının olduğu bilinmektedir.

Epidemiyolojik çalışmalar standart fekal indikatörler ile insanlarda hastalık yapabilme riski arasındaki ilişki üzerinde durmuşlardır. *Enterococcus faecalis* çevre sularından izole edilerek mikrobiyal kaynak tayininde insan fekal indikatörü olarak tespit edilmiştir (Wheeler ve ark. 2002). Dick ve ark. (2004) fekal indikatörlerin rekreasyon alanlarındaki fekal kirliliğin tespiti için çok önemli olduğunu ve bütün su sistemleri için tek bir bakteriyel indikatörün yeterli olamayacağını belirtmişlerdir.

Ayrıca Amerika Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından içme sularının indikatör bakterisi olarak total koliform grubunun, deniz için *Enterococci* spp., tatlı sular için *E. coli* bakterilerinin kullanılabilceği belirtilmiştir (Anonymous 2000). Ashbolt ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, geleneksel plak sayım metodu ve en muhtemel sayı metodu (most probable number metod) ile bakteri sayımının 24-72 saat arasında zaman gerektirdiği ve Amerika Çevre Koruma Ajansı'ndan onay almış olan kolorimetrik bir yöntemin geliştirilmesi ile bu zamanın 18 saate kadar düşürüldüğü belirtilmiştir.

Noble ve ark. (2006) Los Angeles çevresinde Santa Monica körfezinde yaptıkları çalışmada, fekal kirliliği 6 saat içinde kütle tabanlı ölçüm sistemi ile *E. coli* ve *Enterococcus* spp. gibi fekal indikatör bakteriler ile tespit etmişler.

Yüzme suyu analiz işlemlerinin doğru, çabuk ve ucuz olarak gerçekleştirilmesi bazı hastalık ve etmenlerinin erken teşhis edilmesini sağlayacaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar rekreasyon alanlarındaki kirlenmeyi gösteren indikatör türlerin tespitinin kısa sürede gerçekleştirilmesi ve böylece insan sağlığı açısından daha erken tedbir alınması üzerine kurulmaktadır. Bu nedenle hem zaman hem de güvenilirlik açısından bir çok araştırmacı tarafından yeni teknikler araştırılmaktadır.

Belirtilen sebeplerden dolayı plajlarda bulunan bakterilerin tanımlanması için testlerin çabuk, doğru, güvenilir ve ucuz olarak yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Çalışmada; İstanbul ilinin Kadıköy ilçesinde Caddebostan rekreasyon alanlarının mikrobiyal indikatörlerinden *Enterococcus* spp. türünün kültür tabanlı plak sayım metodu ve moleküler olarak q-PCR yöntemi ile tespit edilmesi, böylelikle deniz suyu kalitesinin belirlenmesi ve en son olarak bu yöntemlerin birbirleri ile kıyaslanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Örneklerin Toplanması

İstanbul'un Kadıköy ilçesinin Caddebostan plajlarından 2008-2009 tarihleri arasında yaz, sonbahar ve kış mevsimlerinde toplam 5 defa su numunesi alınmıştır. Su numuneleri Çevre ve Orman Bakanlığı'nın yüzme suyu yönetmeliği'ne uygun olarak Caddebostan plajlarında belirlenen noktalardan ve su yüzeyinin 50 cm altından özel düzenek yardımı ile toplanmıştır (Şekil 1). Örnek toplama işlemi sırasında denize giren kişi sayısı, rekreasyon alanında gözlenen kuşların sayısı,

denizin üzerinde bulunan tekne sayısı, plajlara veya plajların yakınına kanalizasyon vb. akıntıların varlığı ve denizde alglerin durumu gibi gözlemler kayıt edilmiştir. Bununla birlikte örneklerin pH ve iletkenlik değerleri ölçülmüş, örnek toplanan tarih ve 8 gün önceki hava raporları toplanmıştır. Toplanan deniz suyu numuneleri test işleminin gerçekleştirilmesi için steril renkli nötr cam şişelere alınarak, soğuk zincir içerisinde en kısa zamanda Marmara Üniversitesi Doğa Bitkileri ve Su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne getirilmiştir.

Örneklerin Mikrobiyal Analizi

Örneklerin analizleri için kültür-tabanlı klasik yöntem olarak plak sayım ve moleküler yöntem olarak ise Q-PCR yöntemi tercih edilmiştir.

Plak Sayım Metodu

Laboratuara getirilen su örneklerinin ilk 24 saat içinde membran filtrasyon yöntemi ile ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekim işlemi için şişeler iyice çalkalandıktan sonra 100 mL deniz suyu örneği 0,45 µm filtreden geçirilmiş ve filtreler AZİD (Sartorius) besiyerine aseptik teknikler kullanılarak aktarılmıştır. 48 saat 37°C de inkübasyona tabii tutularak besiyerlerinin üzerinde bakterilerin çoğalması sağlanmış ve ortaya çıkan koloniler koloni oluşturma ünitesi (CFU) olarak sayılmıştır. Petri kabı üzerinde sayılamayacak kadar çok bakteri (>300 adet) olduğunda örnekler %10 oranında seyreltilerek sayılma işlemi gerçekleştirilmiştir (Anonymous 2000).

Q-PCR Yöntemi

Laboratuara getirilen deniz suyu örneklerinden plak sayım yönteminde olduğu gibi elde edilen filtreler steril endorf tüplere aktarılmıştır. Filtreler DNA izolasyonu için kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Siefing ve ark. 2008, Shanks ve ark. 2009).

Bakterilerden DNA İzolasyonu ve Q-PCR Aletinin Kalibrasyonu

Saklanan filtrelerden DNA izolasyonu piyasada ticari olarak satılan ve üretici firmaların talimatlarına uygun olarak Promega, Qiagen ve Invitrogen gibi izolasyon kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların varlığı %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek ve görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat) kullanılarak test edilmiştir. Q-PCR aletinin kalibrasyonu için *Enterococcus* spp. bakterileri Mc Farland standartına göre 10⁷ CFU olacak şekilde çoğaltılmış, DNA izolasyonları

gerçekleştirilmiş ve örnekler 10⁷ -10¹ olacak şekilde dilüsyona tabi tutularak Q-PCR aletinde ölçümleri yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 2) (Ludwig ve ark. 2000, Sivaganesan ve ark. 2008).

Primer ve Propların Seçimi

Bakterilere spesifik primerler ECST748F, ENC854R ve prob olarak da GPL813TQ kullanılarak q-PCR (Roche light cycler 2.0) ile bakteriler tanımlanmıştır (Sivaganesan 2008). Q-PCR aletinde bakteri DNA'larında elde edilmek istenilen hedef bölgenin çoğaltılması sağlanmış ve elde edilen hedef DNA kopya sayısına göre 100 mL'lik su numunesinde ne kadar bakterinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen sonuçların ortalamaları hesaplanmış ve bulunan ortalamalar kullanılarak ki-kare testi (χ^2) ile gruplar arasındaki farklar belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda SPSS 15 versiyonu kullanılmıştır.

BULGULAR

Caddebostan sahilinde Haziran, Temmuz, Ağustos, Ekim ve Ocak aylarında örneklerin toplanması sırasında denize giren kişi sayısı, denizin üzerinde bulunan tekne sayısı ve benzeri gözlemler (Tablo 1) kayıt edilmiş, örneklerin pH ve iletkenlik değerleri ölçülmüş, örnek toplanan tarih ve 8 gün önceki hava raporları ortalamaları belirtilmiştir (Tablo 2).

Örnek toplama işlemi sırasında denize giren kişi sayısı, denizin üzerinde bulunan tekne sayısı, kuşlar, plajlara veya yakınına kanalizasyon gibi akıntının varlığı ve denizde alglerin durumu gibi gözlemler tablo 1 de gösterilmiştir (Tablo1). Örneklerin ölçülen pH, iletkenlik değerleri ile birlikte, örnek toplanan tarih ve 8 gün önceki hava raporları ortalamaları tablo 2 de belirtilmiştir (Tablo2).

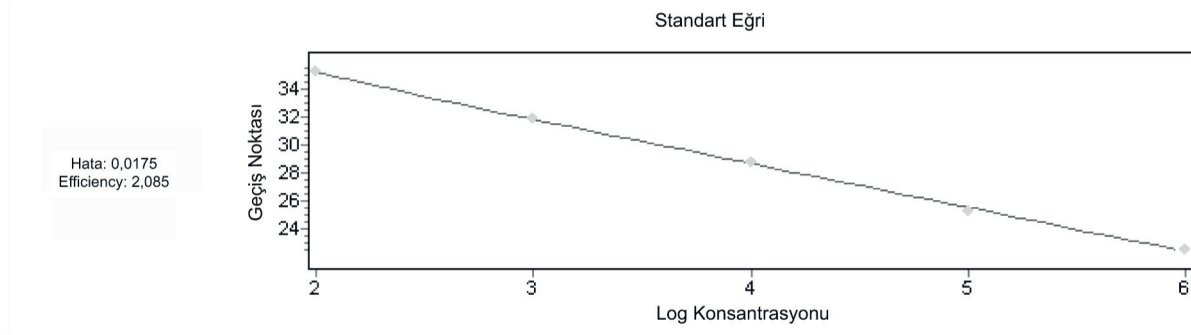
Toplanan su numunelerinin yaz aylarındaki pH ortalamaları 8,59 olarak ölçülmüştür. Rekreasyon alanlarından alınan örneklerde ölçülen pH, TDS ve iletkenlik değerleri Çevre ve Orman Bakanlığının Yönetmeliği'nde belirtilen değerlere göre iyi su kategorisine girmektedir. Sıcaklığın fazla olduğu aylarda da iletkenlik ve TDS değerleri daha yüksek bulunmuştur.

Örneklerden plak sayım yöntemi gibi klasik yöntem ve Q-PCR moleküler yöntemi kullanılarak elde edilen *Enterococcus* spp. ölçüm değerleri aşağıda verilen tablolarda belirtilmiştir (Tablo 3,4).

Yaz ile kış aylarında yalnız canlı bakterilerin incelendiği kültür tabanlı yöntemin ölçüm sonuçları



Şekil 1. Örneklerin toplandığı noktalar. 1: Caddebostan 1 nolu plaj; 2: Caddebostan 2 nolu plaj; 3: Caddebostan 3 nolu plaj.



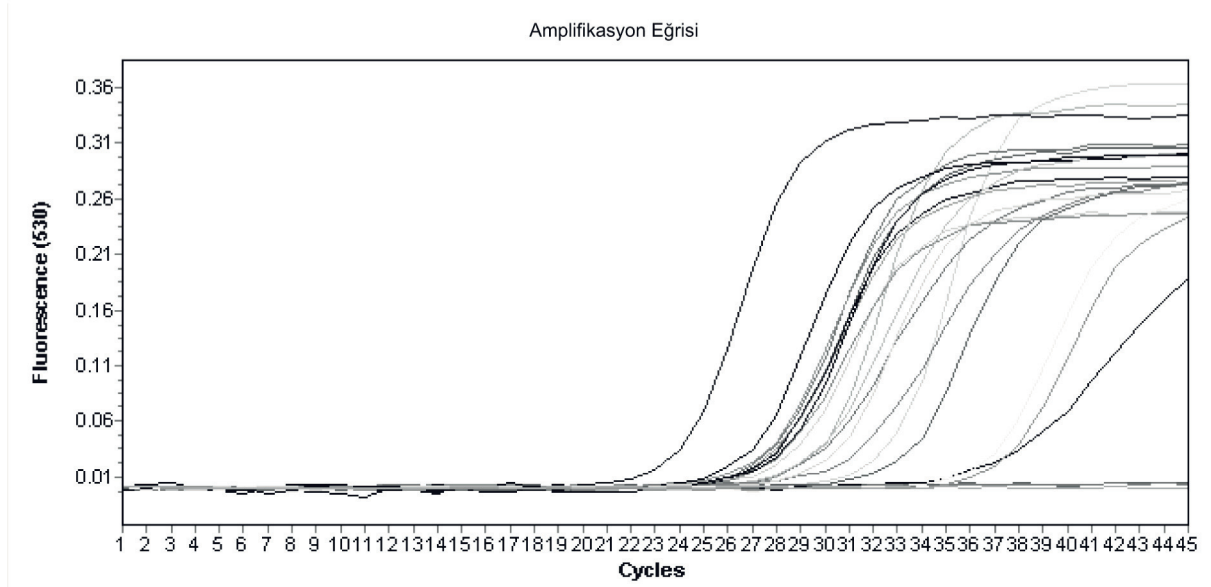
Şekil 2. Q-PCR yönteminde kalibrasyon sırasında elde edilen Standart eğri.

karşılaştırıldığında *Enterococcus* spp. sayısının yaz aylarında arttığı, rüzgar hızının ise düştüğü gözlenmiştir.

Yaz ve kış aylarındaki bakteri sayıları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı ($p < 0,01$) bulunmuştur. Ayrıca klasik yöntem ile q-PCR yönteminin sonuçlarını ayrı ayrı gruplandırarak karşılaştırmak için kullandığımız ki-kare istatistik testine göre iki grup arasında logaritmik olarak pozitif bir korelasyon olduğu ($p > 0,05$) belirlenmiştir.

TARTIŞMA

İstanbul ilinin Kadıköy ilçesinde bulunan rekreasyon alanlarının mikrobiyal kirleticilerinden *Enterococcus* spp. türünü q-PCR ve kültür tabanlı plak sayım metodu ile belirlemeyi, bu yöntemleri kıyaslamayı ve deniz suyu kalitesini tespit etmeyi amaçladığımız çalışmamızda; günümüzde çeşitli kaynaklarda fekal kirleticilerin araştırılmasında bilimsel olarak en yeni tekniklerden biri olarak gösterilen moleküler yöntemlerden q-PCR yöntemi ve klasik plak sayım tekniği kullanılarak bakterilerin tanımlanması sağlanmıştır.



Şekil 3. Q-PCR yönteminde *Enterococcus* spp. türlerinin DNA amplifikasyonlarının görüntüsü.

Tablo 1. Örnek alımı sırasında yapılan gözlemler.

Özellikler	Suyun berraklığı			İnsan Sayısı			Yüzeydeki Canlılar			Yüzeydeki Bot Sayısı			Plajlardaki Akıntı Durumu		
	Plajlar			Plajlar			Plajlar			Plajlar			Plajlar		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Haziran	Berrak	Berrak	Yağ	120	175-200	40-55	-	-	-	1	2	>3	1*	-	-
Temmuz	Berrak	Berrak	Yağ	150	250-300	40-65	Alg	Kuş	Yağ	2	1	>3	1*	-	-
Ağustos	Berrak	Berrak	Yağ	300	350-400	50-75	-	Kuş	Alg	2	3	>3	1*	-	-
Ekim	Berrak	Berrak	Berrak	10	12	2	-	-	-	-	-	-	1*	-	-
Ocak	Berrak	Berrak	Berrak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1*	-	-

Tablo 2. Örneklerin kimyasal analizleri ve 8 gün önceki hava raporlarının ortalaması.

Aylar	Örneklerin Kimyasal Analizleri									Hava Raporları			
	pH			İletkenlik (mS/cm)			TDS(g/l)			Sıcaklık* (°C)	Nem Oranı* (%)	Deniz Seviyesi Basıncı* hPa	Rüzgar Hızı* km/s
	Plajlar			Plajlar			Plajlar						
1	2	3	1	2	3	1	2	3					
Haziran	8,4	8,6	8,6	40,7	41	40,9	20,3	20,3	20,5	29,5	44%	1014,25	27,5
Temmuz	8,56	8,50	8,61	52,4	52,6	54	26,2	26,0	27	27,4	52%	1007,8	20,6
Ağustos	8,53	8,60	8,63	49,9	50,1	52	24,9	25,5	27	28,6	45%	1009,25	20,6
Ekim	8,53	8,60	8,62	45,1	47,4	46,5	21,9	21,5	22	19,44	51,5%	1023,5	24,8
Ocak	8,65	8,64	8,53	32,8	33	34	16,4	16,8	17	9,5	56%	1023	15,5

*Numunelerin toplandığı gün ve numunelerin toplandığı günden önceki 8 güne ait ölçümlerin ortalaması

Tablo 3. Toplanan örneklerden klasik yöntem ile elde edilen sonuçlar.

Aylar	<i>Enterococcus</i> spp.			
	Yönetmelik Değeri (adet/100ml)	Ölçülen Değer (adet/100ml)		
		1 No'lu plaj	2 No'lu plaj	3 No'lu plaj
Haziran	100	156	213	95
Temmuz	100	340	200	380
Ağustos	100	206	140	145
Ekim	100	70	45	77
Ocak	100	45	25	9

Tablo 4. Toplanan örneklerden Q-PCR yönteminden elde edilen sonuçlar.

Aylar	<i>Enterococcus</i> spp.			
	Yönetmelik Değeri (adet/100ml)	Ölçülen Değer (adet/100ml)		
		1 No'lu plaj	2 No'lu plaj	3 No'lu plaj
Haziran	100	175	370	270
Temmuz	100	190	321	240
Ağustos	100	471	362	207
Ekim	100	90	65	36
Ocak	100	230	90	280

Çalışmamızda olduğu gibi birçok çalışmada bakterilerin tanımlanması için geliştirilen yeni tekniklerin avantaj ve dezavantajları geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmaktadır. Örneğin Haugland ve ark. (2005) fekal kirlilik indikatörlerinden *Enterococcus* cinsi bakterileri, Michigan ve Erie göllerindeki rekreasyon alanlarından toplanan 100 mL lik su örneklerinden 3 saatten daha az bir zaman zarfında tanımlanmadıklarını belirtmişler. Metotta yaptıkları ölçümleri, yöntem 1600 olarak adlandırılan ve mEI agar besiyeri üzerindeki *Enterococcus* cinsi koloni oluşturma ünitesinin tanımlanması ile karşılaştırmışlar. İki yöntemin karşılaştırılmasında kullanılan regresyon analizi sonuçlarına göre iki yöntem arasında logaritmik olarak pozitif korrelasyon olduğunu belirtmişler.

Noble ve ark. (2006) rekreasyon alanlarından alınan su örnekleri üzerine EPA onaylı membran-filtrasyon metodu ile q-PCR metodunu karşılaştırmalı olarak uygulamışlar ve her iki metodun uygulanmasından elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapıldığında sonuçların benzer olduğunu ifade etmişler. Çalışmamızda da aynı iki metod uygulanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki kısa sürede, güvenilir ve özgün olarak bakterilerin tanımlanmasında moleküler teknikler önemli bir yer tutmaktadır. Domingo JWS ve ark. (2003) 16S rDNA q-PCR metodu ile tatlı su örneklerinde yaptıkları çalışmada, su örneklerinde *Enterococcus faecalis*' in tanımlanması için nükleik asit ekstrasyonuna gerek kalmadan *E. faecalis* hücrelerini 3 saatten az bir süre içinde tespit edebildiklerini belirtmişler. Shannon ve ark. (2007) belediyenin atık sularındaki *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., ve *Staphylococcus aureus* bakterilerini 13 prob ve primer seti kullanarak TaqMan q-PCR ile analizi gerçekleştirmişler.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre bakteri sayımı için her iki yöntemde kullanılabilmesi gözlenmiştir. Fakat yapılacak olan su numuneleri ölçümlerinde q-PCR testinin değerlendirilmelerde geçerli olabilmesi için gerekli akreditasyon çalışmaları yapıldıktan sonra kullanılabilmesini ve böylece yapılan testin güvenilirliğinin artacağını düşünmekteyiz. Q-PCR testinin en önemli fay-

dalarından biri testin çabuk, doğru ve özgün sonuç vermesidir. Bilindiği gibi günümüzde rutin olarak yapılan plak sayım yönteminde harcanan zaman 24-48 saat arasındadır. Q-PCR testi bu zamanı 3 saat gibi kısa bir sürede gerçekleştirebilmektedir. Böylece q-PCR testi ile yapılacak olan analizlerde zaman kaybı önlenecektir. Bilindiği gibi klasik metotlarda membran filtrasyonundan geçirilen filtreler besiyerleri üzerine konarak etüve inkübasyona bırakılmaktadır. Bu arada etüvün içerisinde birden fazla petri kabı olacağı düşünüldüğünden bulaşma riskinin fazla olabileceği bilinmektedir. Q-PCR yönteminde ise yapılan işlemler steril bir ortamda yapılacağından dolayı bulaşma riski en aza inmektedir. Yine yapılan klasik yöntemde aseptik çalışma koşullarının tam gerçekleştirilmemesi, besiyerinde çeşitli etkenlere bağlı olarak istenmeyen bakterilerin üremesine veya ortam şartlarından kaynaklı bakteri sayısının değişmesi gibi etkenlere bağlı olarak farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu da klasik yöntem ile yapılan bakteri tanımlanmasının güvenilirliğini azaltmaktadır. Q-PCR ile ölçüm yapılmasının en önemli kusuru ise yapılan işlemin pahalı aletler gerektirmesi, kullanılacak kimyasallarının pahalı olması, aletlerin ve kimyasalların yurtdışından getirilmesi nedeniyle yurtdışına bağımlı olunması ve yapılacak testlerin kesinlikle bu konu üzerinde iyi yetişmiş kişi veya kişiler tarafından gerçekleştirilmesi zorunluluğudur. Sonuç olarak çalışmamızda plak sayım metodu gibi q-PCR metodunun da rekreasyon alanlarında bulunan bakterilerin tanımlanmasını için kullanılabilmesini ve iki yöntemin avantaj ve dezavantajlarının olduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma FEN-A-090909-0303 nolu proje kapsamında Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ve İstanbul Büyükşehir Belediyesi tarafından desteklenmiştir. Örnek toplama sırasında yardımcı olan Atmosferik Fizik ve Biyofizik Laboratuvarı çalışanları ile birlikte, membran filtrasyon ve kültür tabanlı yöntemin yapıldığı Marmara Üniversitesi Doğa Bitkileri ve Su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Merkezi başkanı Prof. Dr. Engin ÖZHATAY nezdinde tüm çalışanlara teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Alemdar S, Kahraman T, Agaoglu S, Alisarli M (2009) Bitlis İli İcme Sularinin Bazı Mikrobiyolojik ve Fizikokimyasal Özellikleri. *Ekoloji* 19 (73): 29-38.
- Anonymous (2000) Improved enumeration methods for recreational water quality indicators: *Enterococci* and *Escherichia coli*. Report EPA-821-R-97-004. United States Environmental Protection Agency, Cincinnati.
- Anonymous (2004) Çevre ve Orman Bakanlığı Su Kirliliği Yönetmeliği, Resmi Gazete Sayısı: 25687, Ankara.
- Ashbolt N, Fujioka R, Glymph T, McGee C, Schaub S, Sobsey M, Toranzos G (2007) Pathogen indicators and indicators of fecal contamination. In: Report of the Experts Scientific Workshop on Critical Research Needs for the Development of New or Revised Recreational Water Quality. EPA 823-R-07-006; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Research and Development: Warrenton, VA, Chapter 2, 35-56.
- Bucak IO, Karlik B (2011) Detection of Drinking Water Quality Using CMAC Based Artificial Neural Networks. *Ekoloji* 20 (78): 75-81.
- Dick LK, Field KG (2004) Rapid estimation of numbers of fecal Bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5695-5697.
- Domingo JWS, Siefring SC, Haugland RA (2003) Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. *Biotechnology Letters* 25: 261-265
- Haugland RA, Siefring SC, Wymer LJ, Brenner KP, Dufour AP (2005) Comparison of Enterococcus density measurements by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis at two freshwater recreational beaches. *Water Research* 39: 559-568.
- Dick LK, Field KG (2004) Rapid estimation of numbers of fecal bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5695-5697.
- Ludwig W, Schleifer KH (2000) How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Systematic and Applied Microbiology* 23: 556-562.
- Noble RT, Griffith JF, Blackwood AD, Fuhrman JA, Gregory JB, Ximena H, Liang X, Bera AA, Schiff K (2006) Multitiered approach using quantitative-PCR to track sources of fecal pollution affecting Santa Monica Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1604-1612.
- Shanks OC, Kelty CA, Sivaganesan M, Varma M, Haugland RA (2009) Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (17): 5507-5513.
- Shannon KE, Lee DY, Trevors JT, Beaudette LA (2007) Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 382: 121-129
- Siefring SC, Varma M, Atikovic E, Wymer LJ, Haugland RA (2008) Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *Journal of Water and Health* 6: 225-237.
- Sivaganesan M, Seifring S, Varma M, Haugland RA, Shanks OC (2008) A Bayesian method for calculating real-time quantitative PCR calibration curves using absolute plasmid DNA standards. *BMC Bioinformatics* 120 (9): 1-12.
- Wheeler AL, Hartel PG, Godfrey DG, Hill JL, Segards WI (2002) Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *Journal of Environmental Quality* 31: 1286-1293.