

169256

T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELAZIĞ ŞEHİR KANALİZASYONUNUN KEBAN BARAJ GÖLÜNE
DÖKÜLDÜĞÜ BÖLGEDEN YAKALANAN TATLI SU KAPLUMBAĞASI
(*MAUREMYS CASPICA CASPICA*, GMELIN, 1774)'NDA
SALMONELLA'LARIN ARAŞTIRILMASI**

Mikail ÖZCAN

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELAZIĞ-2005

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELAZIĞ ŞEHİR KANALİZASYONUNUN KEBAN BARAJ GÖLÜNE
DÖKÜLDÜĞÜ BÖLGEDEN YAKALANAN TATLI SU KAPLUMBAĞASI
(*MAUREMYS CASPICA CASPICA*, GMELIN, 1774)'NDA
SALMONELLA'LARIN ARAŞTIRILMASI**

Mikail ÖZCAN

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Bu tez, 26.01.2025. tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile başarılı/başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU

Üye: Doç. Dr. Hasan Basri ERTAŞ

Üye: Doç. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ

Üye:

Bu tezin kabulü, Fen bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/01.2025 tarih ve3/10..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her safhasında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesi ile aydınlatan, yardım ve ilgisini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU'na, laboratuvar imkanı sağlayan Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma, özellikle PCR çalışmalarında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Murat KARAHAN ve Mehmet Nuri AÇIK'a izole ve identifikasyonda yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Engin ŞEKER ile Veteriner hekim Ayşe KILIÇ'a, materyal temininde yardımcı olan Kaya BAYKAL beyefendiye, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı Doktora öğrencisi, Ünal İSPİR ve Yüksek Lisans öğrencilerinden, Hacı Bayram GÖKHAN, Necdet İlker KAN, Selami GÖLBAŞI, Hande GÜNDOĞDU, Serpil MİŞE ve çalışmada gereken olanakları sağlayan Su Ürünleri Fakültesi akademik ve idari personeline en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı 990 nolu proje olarak destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) koordinatörlüğüne, maddi imkanlar sağladığı için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
ŞEKİLLER LİSTESİ	I
TABLolar LİSTESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	2
2.1. Tatlı Su Kaplumbağası (<i>Mauremys caspica</i>)'nın Genel Özellikleri	2
2.1.1. <i>Mauremys caspica</i> 'nın Coğrafik Dağılımı	2
2.1.2. <i>Mauremys caspica caspica</i> 'nın Morfolojik Özellikleri	3
2.1.3. <i>Mauremys caspica caspica</i> 'nın Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri	4
2.2. <i>Salmonella</i> 'ların Genel Özellikleri	5
2.3. <i>Salmonella</i> 'ların Su Ürünlerindeki Önemi	8
2.4. <i>Salmonella</i> 'ların Bulaşma Yolları	9
2.5. <i>Salmonella</i> 'ların İnsan Sağlığı Açısından Önemi	10
2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Çalışma Alanı	15
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	15
3.1.3. Referans Kültürler	15
3.1.4. Kullanılan Malzeme	17
3.2. Metot	18
3.2.1. Tatlı Su Kaplumbağası (<i>Mauremys caspica caspica</i>)'nın Temini ve Bazı Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	18
3.2.2. Tatlı Su Kaplumbağası (<i>Mauremys caspica caspica</i>)'nın Tespiti, Anestezisi ve Diseksiyonu	19
3.2.3. Besiyerlerine Ekimlerinin Yapılması için Karaciğer ve Bağırsakların Hazırlanması	19
3.2.4. <i>Salmonella</i> 'ların Kültür Yöntemi ile İzolasyonu ve İdentifikasyonu	20
3.2.4.1. <i>Salmonella</i> 'ların Lassen'in Üçlü Tüp Yöntemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	20
3.2.4.1.1. Tüp 1	20
a. Glikoz Fermantasyonu	20

b. Laktoz Fermantasyonu	20
c. H ₂ S Oluşumu.....	20
d. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D- Galactose (ONPG) Testi.....	20
e. Fenilalanin Deaminaz Testi	21
f. Lizin Dekarboksilaz Oluşumu	21
3.2.4.1.2. Tüp 2.....	21
a. Mannitol Fermantasyonu	21
b. Nitrat Redüksiyonu.....	21
c. Hareket.....	21
3.2.4.1.3. Tüp 3.....	21
a. Üreaz Oluşumu	21
b. İndol Oluşumu	21
c. Triptofan Deaminaz Deneyi.....	21
3.2.4.2. <i>Salmonella</i> 'ların Diğer Biyokimyasal Özellikleri	22
3.2.4.2.1. Metil Red (MR)- Voges Preskauer Testi (VP)	22
3.2.4.2.2. Sitrat.....	22
3.2.4.2.3. Oksidaz	22
3.2.4.2.4. Katalaz	22
3.2.5. <i>Salmonella</i> 'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle İdentifikasyonu	22
3.2.5.1. DNA İzolasyonu	22
3.2.5.2. PCR Karışımının Hazırlanarak Uygulanması.....	23
3.2.6. Suyun <i>Salmonella</i> Yönünden İncelenmesi	24
4. BULGULAR.....	24
4.1. Çalışma Alanı	24
4.2. Tatlı Su Kaplumbağaları (<i>Mauremys caspica caspica</i>)'nın Temini ve Bazı Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	25
4.3. Tatlı Su Kaplumbağası (<i>Mauremys caspica caspica</i>)'nın Tespiti, Anestezisi ve Diseksiyonu	29
4.4. Karaciğer ve Bağırsaklardan Besiyelerine Yapılan Ekimler	32
4.5. <i>Salmonella</i> 'ların İzolasyon ve İdentifikasyonları.....	33
4.5.1. <i>Salmonella</i> 'ların Lassen'in Üçlü Tüp Yöntemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi.....	35
4.5.1.1. Tüp 1.....	35
a. Glikoz Fermantasyonu	35
b. Laktoz Fermantasyonu	35

c. H ₂ S Oluşumu	35
d. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactose (ONPG) Testi.....	35
e. Fenilalanin Deaminaz Testi	35
f. Lizin Dekarboksilaz Oluşumu.....	35
4.5.1.2. Tüp 2.....	35
a. Mannitol Fermantasyonu	35
b. Nitrat Redüksiyonu.....	35
c. Hareket.....	36
4.5.1.3. Tüp 3.....	36
a. Üreaz Oluşumu	36
b. İndol Oluşumu	36
c. Triptofan Deaminaz Deneyi.....	36
4.5.2. <i>Salmonella</i> 'ların Diğer Biyokimyasal Özellikleri	36
4.5.2.1. Metil Red (MR)- Voges Preskauer Testi (VP)	36
4.5.2.2. Sitrat.....	36
4.5.2.3. Oksidaz	36
4.5.2.4. Katalaz	36
4.6. <i>Salmonella</i> 'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile İdentifikasyonunun Yapılması.....	39
4.1. Suyun <i>Salmonella</i> Yönünden İncelenmesi	40
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 2.1. Tatlı su kaplumbağası (<i>Mauremys caspica caspica</i>)	4
Şekil 2.2. Lassen'in üçlü tüp sistemi	6
Şekil 2.3. <i>Salmonella</i> 'ların bulaşma yolları.....	9
Şekil 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) safhaları	14
Şekil 2.5. Bir PCR döngüsü.....	14
Şekil 2.6. Sıcaklık ile bir PCR döngüsünün oluşumu	14
Şekil 3.1. Keban baraj gölü'nde tatlı su kaplumbağalarının avlandığı alan	16
Şekil 3.2. Thermocycler (termal çevirici-PCR- cihazı)	17
Şekil 3.3. Elektroforez ve güç kaynağı.....	17
Şekil 3.4. Ultraviyole transillüminatör	18
Şekil 3.5. Mini çalkalayıcı.....	18
Şekil 4.1. Kaplumbağa'nın boyunun ölçülmesi.....	25
Şekil 4.2. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların ağırlık ortalamaları.....	27
Şekil 4.3. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların boyu ortalamaları	27
Şekil 4.4. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk uzunluk ortalamaları.....	28
Şekil 4.5. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk genişliği ortalamaları.....	28
Şekil 4.6. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk yüksekliği ortalamaları.....	29
Şekil 4.7. Kaplumbağa'nın diseksiyon tahtasına sabitlenmesi	30
Şekil 4.8. Kaplumbağa'da eter enjeksiyonu	30
Şekil 4.9. Kaplumbağa'nın spiralle kesilmesi	31
Şekil 4.10. Kaplumbağa'nın spiralle kesildikten sonraki hali	31
Şekil 4.11. Kaplumbağa'nın bağırsak ve karaciğerleri.....	32
Şekil 4.12. MacConkey agar da gri-beyaz renkte <i>Salmonella</i> kolonileri.....	33
Şekil 4.13. <i>Salmonella</i> -shigella agar da renksiz mat <i>Salmonella</i> kolonileri.....	34
Şekil 4.14. Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar da agarın normal yeşilimsi sarı rengini, açık kırmızıya dönüştüren ve opak üreme gösteren <i>Salmonella</i> kolonileri	34
Şekil 4.15. Xylose Lysine Terğitol 4 agarda merkezi siyah kırmızı <i>Salmonella</i> koloniler.....	35
Şekil 4.16. Haringet çayında avlanan kaplumbağalar'dan infekte olmayanların infekte olanlara oranı.....	38
Şekil 4.17. Keban Barajında avlanan kaplumbağalar'dan infekte olmayanların infekte olanlara oranı.....	38
Şekil 4.18. İnfekte olmayan kaplumbağaların infekte olanlara oranı	38
Şekil 4.19. İnfekte olmayan kaplumbağaların infekte karaciğerlerin ve bağırsağa olana oranı.....	38
Şekil 4.20. Tatlı Su Kaplumbağasında izole edilen <i>Salmonella spp.</i> 'lerden elde edilen DNA'ların, PCR'de analizi sonucu oluşan 572 bp'lik bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış % 1.5'luk bir agaroz jel.....	39

TABLÖLAR LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 2.1. <i>Salmonella</i> 'ların biyokimyasal karakterleri.....	7
Tablo 2.2. Kaplumbağa'nın bakteriyel florası	8
Tablo 4.1. Tatlı su kaplumbağaları (<i>Mauremys caspica caspica</i>)'nın yaş, cinsiyet ve bazı morfolojik özellikleri.....	26
Tablo 4.2. Tatlı su kaplumbağasından izole edilen 6 şüpheli <i>Salmonella spp</i> 'nin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	37
Tablo 4.3. Su örneklerinin biyokimyasal özellikleri.....	40

ÖZET

ELAZIĞ ŞEHİR KANALİZASYONUNUN KEBAN BARAJ GÖLÜNE DÖKÜLDÜĞÜ BÖLGEDEDEN YAKALANAN TATLI SU KAPLUMBAĞASI (*MAUREMYS CASPICA* *CASPICA*, GMELIN, 1774)'NDA *SALMONELLA*'LARIN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tez

Mikail ÖZCAN

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

2004, Sayfa: 52

Bu çalışmada, Elazığ şehir kanalizasyonunun boşaldığı Haringet çayı ve bu çayın Keban Baraj Gölü'ne döküldüğü Koçkale bölgesinden elde edilen 25 adet canlı tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'ndan kültür yöntemi ile *Salmonella*'ların izole ve identifikasyonu yapıldı. İzole edilen *Salmonella*'lar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile de teyit edildi. Bunun için; Tatlı su kaplumbağası'nın karaciğer ve bağırsaklarının tamponlanmış peptonlu suda hazırlanan homojenizatlarından, Rappaport Vassiliadis Pepton Broth ön zenginleştirmeden sonra Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Xylose Lysine Tergitol 4 agar, MacConcey agar ve *Salmonella*-*Shigella* agar selektif besiyerlerine ekimler yapıldı. Üreyen *Salmonella* şüpheli suşlara biyokimyasal testler ve DNA ekstraksiyon basamakları uygulandı. Ekstrakte edilen DNA'lar, *Salmonella*'ların 16S rRNA geninden türetilen bir çift primer kullanılarak PCR'da amplifikasyona tabi tutuldu. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde değerlendirilmesi sonucunda ise 6 şüpheli suşun hepsinde 16S rRNA geninin mevcut olduğu saptandı. Buna göre baraj gölünün Koçkale bölgesinden avlanan 25 kaplumbağa'nın 6'sında *Salmonella* spp.'nin izolasyon ve identifikasyonu yapıldı.

Çalışma sahasından alınan 10 su örneğinde kültür metodu ile *Salmonella* spp. izolasyonu yapılamadı.

İzole edilen *Salmonella*'ların insanlarda tifo ve paratifo başta olmak üzere sepsis ve gastroenteritis gibi hastalıklara neden olduğu dikkate alındığında; elde edilen verilerin ışığında baraj gölünün Koçkale yöresinde yaşayan tatlı su kaplumbağası *Salmonella*'yı dışkı yoluyla dışarı verdiği için bu suda yaşayan balık ve diğer su canlıları ile çevre ve insan sağlığı açısından büyük tehdit oluşturduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelime: Tatlı Su Kaplumbağası, *Salmonella*, PCR.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *SALMONELLA* IN FRESH WATER TURTLE (*Mauremys caspica caspica*, Gmelin, 1774) CAUGHT FROM REGION OF ELAZIG CITY SEWAGE DISCHARGE INTO KEBAN DAM LAKE

Masters Thesis

Mikail ÖZCAN

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Aquaculture

2004, Page: 52

In this study, *Salmonella* was isolated and identified by culture method in 25 alive freshwater turtle (*Mauremys caspica caspica*) caught from Koçkale Region of Keban Dam Lake. Where Elazığ City sewage discharged *Salmonella* isolates was also confirmed by means of Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. For this, freshwater turtle liver and intestine prepared from homogenized stock pepton water after pre-enrichment Rappaport Vassiliadis Pepton Broth smear made on Birilliant Green Phenol Red Lactose agar, Xylose Lysine Tergitol 4 agar, MacConcey and Salmonella-Shigella agar selective mediums. Biochemical analysis and DNA extraction steps were applied to isolated *Salmonella* suspected agent. DNA extracted from the isolate were amplified at PCR by using a pair of primer produced from 16S rRNA gene of *Salmonella*. According to this result, 6 out of 25 turtle were found efective with *Salmonella* from Koçkale region of Keban Dam Lake

Salmonella spp. could not be isolated from 10 water samples from study area.

The fact that, *Salmonella* causes important diseases in humans such as septicemia gastroenteritis, thyphoid and paratyphoid should be taken into consideration, in the light of the data obtained in this study, alive fresh water turtle in Koçkale Region was put middle became threat for human health with other water living and fish for give out feces *Salmonella*.

Key Words: Fresh Water Turtle, *Salmonella*, PCR.

1. GİRİŞ

Kaplumbağalar eski jeolojik zamandan beri yaşayan hayvanlar olup, 200-300 milyon yıl öncesinden günümüze kadar nesillerini devam ettirmeyi başarmıştır (Ugurlu, 2000). Bu canlılar omurgalı hayvanlar olup karada ve sulara yaşamaktadır. Suda yaşayanlar tatlı su ve deniz kaplumbağası olmak üzere ikiye ayrılır. Tatlı suda yaşayan *Emys orbicularis* (Benekli kaplumbağa), *Mauremys caspica* (Çizgili kaplumbağa), *Trionyx euphraticus* (Fırat kaplumbağası) ve *Trionyx triunguis* (Nil kaplumbağası) gibi dört türü bulunur. *Mauremys caspica*'nın Türkiye'de *Mauremys caspica caspica* ve *Mauremys caspica rivulata* olmak üzere iki alt türü bulunmaktadır (Başoğlu ve Baran, 1977; Baran ve Atatür, 1997).

Kaplumbağalar genel olarak karnivor ve omnivor olarak beslenir. Karada yaşayan kaplumbağalar omnivor, suda yaşayanlar ise karnivor olarak beslenmektedir. Ortamda bulunan besinleri koku yardımıyla bulurlar (Ugurlu, 2000).

Kaplumbağalar diğer sürüngenler gibi akciğer solunumu yaparlar. Ancak suda yaşayanlar akciğer solunumu yanı sıra deri ve kloak solunumu yapar. Ayrıca su yüzeyinde yüzerken havayı akciğerlerine depo ederek uzun zaman su içinde kalabilir. Metabolizması yavaş olduğundan oksijeni az harcar (Başoğlu ve Baran, 1977; Baran ve Atatür, 1997; Ugurlu, 2000).

Kaplumbağa'dan insanlara direk veya indirek yolla bulaşan bakterilerin başında *Salmonella* gelmektedir. İnsanlarda tifo ve paratifo gibi hastalıkları meydana getiren *Salmonella*'nın dünyada 2200'ün üzerinde serotipi bulunmaktadır. Bu serotiplerin 36 tanesi kaplumbağadan izole edilmiştir (Miller, 1998; URL1).

Salmonella, Enterobacteriaceae familyasında yer alan gram negatif, çomak şeklinde aerob ve fakültatif anaerob olan, insan ve diğer canlılara fekal veya oral yollarla bulaşan bir bakteridir (URL2).

Su Ürünleri içerisinde önemli bir yere sahip tatlı su kaplumbağalarının mikrobiyolojileri hakkında kapsamlı araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada; Elazığ Şehir kanalizasyonu'nun boşaldığı Haringet çayı ve bu çayın Keban baraj gölüne döküldüğü Koçkale bölgesinden toplanan tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'ndan kültür yöntemi ile *Salmonella*'ların izolasyonu ve identifikasyonu yapılarak bulunan şüpheli *Salmonella*'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile teyit edilmesi amaçlanmıştır.

Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Hastalıklar Anabilim Dalı ile Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından yararlanılarak gerçekleştirilen bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) (Proje No:990) tarafından desteklenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Bu çalışmada; tatlı su kaplumbağası'nın tanınması, bu canlılarda aranması planlanan *Salmonella*'ların genel özelliklerinin incelenmesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin ilk defa tatlı su kaplumbağasına uyarlanması amaçlandığından, bu konular hakkında bilgi edinilmesi uygun bulunmuştur.

2.1.Tatlı Su Kaplumbağası (*Mauremys caspica*)'nın Genel Özellikleri

Kaplumbağalar omurgalı hayvanların sürüngenler sınıfına dahil edilen canlılardır. Reptilia (sürüngenler) sınıfının günümüzde yaşayan formları kaplumbağa, yılan, kertenkele ve timsahlar olmak üzere 4 takım halinde sınıflandırılmıştır. Kaplumbağalar yaşadığı ortama göre tatlı su kaplumbağası, kara kaplumbağası ve deniz kaplumbağası olmak üzere 3'e ayrılır (Başoğlu ve Baran, 1977; Kuru 2001; Demirsoy, 1992; Ateş,1994; URL3).

Tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica*), baş ve boyun altında sarımsı çizgilere üst ve alt kısımlarında da birer kabuk tabakalarına sahiptir. Üst kabuk (karapaks) oldukça basık gri, kahverengi ya da zeytin yeşili renktedir. Bu zemin üzerinde ağ ya da göz şeklinde desenler bulunur. Alt kabukta (plastron) ise siyah renkli benekler mevcuttur. Parmak arasındaki yüzme perdesi tırnak ucuna kadar uzanır (Başoğlu ve Baran, 1977).

Tatlı su kaplumbağasının kuyruğu oldukça uzun olup, erkeklerde kabuğun yarısı, dişilerde ise 2/5 – 1/3'ü kadardır. Boyun ise 20–25 cm kadar olabilir (Kuru 2001; Başoğlu ve Baran, 1977; Demirsoy, 1992; Baran ve Atatür, 1997; URL4).

2.1.1. *Mauremys caspica*'nın Coğrafi Dağılımı

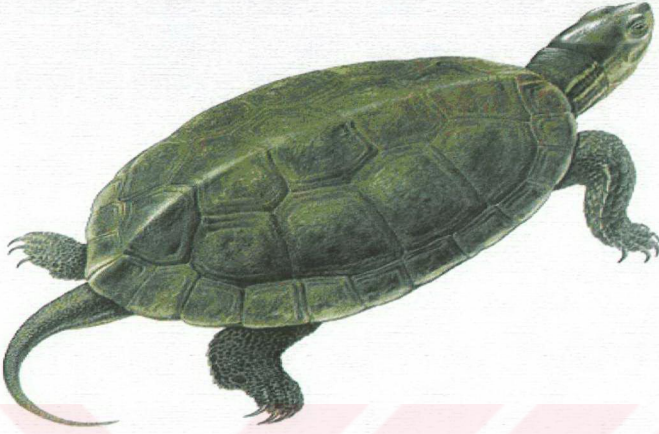
Mauremys caspica türü kaplumbağalar; Kuzeybatı Afrika, Güney Avrupa, Anadolu, Kafkasya, İran, Suriye, İsrail ve bazı Ege Denizi adaları ile Kıbrıs ve Girit'te yaşar (Demirsoy 1992). Türkiye'de iki alt türü bulunmaktadır. Bunlardan *Mauremys caspica caspica* Doğu ve Güneydoğu Anadolu (Bitlis, Elazığ, Diyarbakır, Siirt, Urfa vb.)'da, *Mauremys caspica rivulata* ise Trakya ile Batı ve Güney Anadolu (İstanbul, Bursa, İzmir, Antalya, Adana, Antakya vb.) ile İç Anadolu (bilhassa Eskişehir ve Anakara civarında)'da yayılım göstermektedir (Başoğlu ve Baran, 1977; Baran ve Atatür, 1997; URL4).

Bu çalışmaya konu edilen tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'nın sistematikteki yeri aşağıdaki şekilde (Başoğlu ve Baran, 1977; Kuru, 2001; Uğurlu, 2002; URL3) belirtilmiştir.

Alem	:	Animalia
Alt alem	:	Metazoa
Şube	:	Chordata
Alt şube	:	Gnathostomata
Sınıf	:	Terapoda
Alt sınıf	:	Anaspida
Takım	:	Testudinata
Aile	:	Emydidae
Cins	:	Mauremys
Tür	:	<i>Mauremys caspica</i>
Alt tür	:	<i>Mauremys caspica caspica</i>

2.1.2. *Mauremys caspica caspica*'nın Morfolojik Özellikleri

Tatlı su kaplumbağaları baş, kuyruk, ön ve arka ayakları, deri ile kaplı olup vücutları üstten ve alttan kabukla örtülmüştür. Kabuk, iskelet ve deri ile ilişkilidir. Kabuk derinin keratinize olmasıyla meydana gelmiştir (Uğurlu, 2000). Karapaks oldukça basıktır. Karapaks ile plastron birbirine kaynaştığı noktada, axillare ve inguinale adı verilen plaklar mevcuttur (Şekil 2.1). Karapaksın tam ortasında baş ve kuyruk boyunca uzanan vertebral plaklar bulunur. Bu plakların genişliği uzunluğundan fazladır. Genç kaplumbağalarda vertebralar çok az belli olur. Vertebral plakların her iki yanında ise costal karinalar mevcuttur. Yaşlı olanlarda costal plaklar belirgin değildir. Plastronda anal ve femoral plaklar mevcuttur. Anal plaklar arasındaki birleşme çizgisi femoral plaklarınkinden daha kısadır (Baran ve Atatür, 1997).



Şekil 2.1. Tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*) (URL3).

Gözleri; sarı, gri ya da kahverengi bir zemin üzerinde siyah bir bant şeklinde göz merceğine sahiptir (Başoğlu ve Baran, 1997).

Tatlı su kaplumbağasında dişler yoktur. Kuşların gaga yapısına benzerlik göstermektedir. Dillerini fazla dışarı çıkaramazlar. Gözler parlak, göz kapakları gelişmemiştir. Kulak kepçeleri bulunmamaktadır. İki burun deliğine sahiptir. İstedikleri zaman başlarını vücudun içine doğru çekebilir. Boyun ve kuyruk omurları hareketlidir (Öktay, 1988; Uğurlu, 2000; URL3).

2.1.3. *Mauremys caspica caspica*'nın Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri

Tatlı su kaplumbağası karadan su yaşamına geçen hayvanlardır. Tropik veya subtropik iklim bölgelerinde yaşar (Uğurlu, 2000). Karnivor olarak beslenir. Göl, nehir, dere gibi tatlı sularda ve acı sularda yaşar. Hatta lağım kanalında bulunabilir. Esas besinini sucul hayvanlar (balık, kurbağa, böcek vb.) teşkil eder. Soğuk havalarda su dibinde kış uykusuna yatarlar. Kış uykuları derin değildir. Nisan, Mayıs aylarında suyun içerisinde çiftleşirler (Aliyev, 1997). Üreme mevsimlerinde dişiler yaklaşık olarak 9-12 adet beyaz renkli uzunca yumurtayı kıyılarda açtıkları çukurlara bırakırlar. Yumurtaların yarıçapı 25-30 mm kadardır. Yumurtalardan yeni çıkmış yavruların boyu genel olarak 23-27 mm arasında değişir (Başoğlu ve Baran, 1977; Kuru, 2001; Demirsoy, 1992; Baran ve Atatür, 1997).

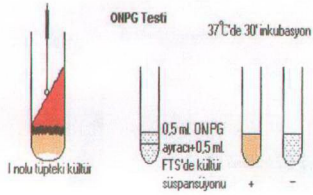
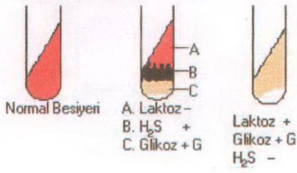
2.2. *Salmonella*'ların Genel Özellikleri

Doğada çok yaygın olarak bulunan *Salmonella* cinsi içinde yalnız insanlarda veya hayvanlarda ve hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık meydana getiren bir çok türü bulunmaktadır (Arda ve diğ., 1992; Bilgehan, 1995; URL2). Bunlardan ilk kez *Salmonella cholerae suis* 1886 yılında Salmon tarafından izole edildiği için bu cinse *Salmonella* adı verilmiştir (Bekar, 1997; URL2).

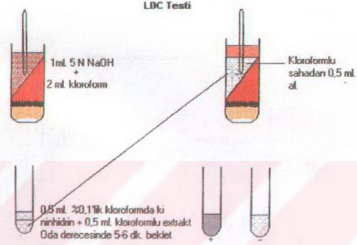
Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini gösteren *Salmonella*'lar 0,7-1,5x2,0 µm boyutlarında, gram negatif, çomak şeklinde, aerob ve fakültatif anaerob, fekal veya oral yollarla yayılan bakterilerdir. Çoğunlukla boyalı preparatlarda tek tek görülen *Salmonella*'lar sporsuz, kapsülsüz olup, *S. pullorum* ve *S. gallinarum* hariç hemen hepsi hareketlidir. Genel besiyerlerinde kolaylıkla ürer. Optimal üreme sıcaklığı 37 °C olup, 20 ile 42 °C arasında küçük, yuvarlak, S tipi koloniler meydana getirir. Koloniler genellikle 2-4 mm çapında olmakla birlikte 1 mm çapta küçük koloniler de gelişebilir. Buyyonda homojen, hafif bulanıklık oluştururlar. Biyokimyasal aktivitesi oldukça yüksektir. Bu nedenle, *Salmonella* izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin birleşimi önemli iki özelliği ortaya çıkarması esasına dayanmaktadır. Bu özellikler; H₂S oluşturmaları (*S. cholerae suis*'in bazı suçları ve *S. paratyphi A*'nın bir çok suşu hariç) ve laktozu fermente edememeleridir. Bunlar da *Salmonella*'yı *Escherichia coli*'den ayıran en önemli özelliktir. *Salmonella*'ların tümü üre enzimine sahip değildir (Merchant ve Packer, 1967; Özsan, 1968; Ünat, 1983; Arda ve diğ., 1994; Quinn ve diğ., 1994; Bilgehan, 1995; Bekar, 1997; Neziha, 1999; Bilgehan, 2000; URL2).

Enterobacteriaceae familyasına bağlı mikroorganizmaların identifikasyonunda çabuk sonuca giden sistemler geliştirilmiştir. Bu metotlardan biri de Lassen'in üçlü tüp sistemidir (Şekil 2.2). Bu sistemde, birinci tüpte; glukoz, laktoz fermentasyonu ve H₂S oluşumu incelenir. Ayrıca lizin dekarboksilaz, Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase ve fenilalanin deaminaz testleri de yapılır. İkinci tüpte; mannitol, hareket, nitrat redüksiyonu, üçüncü tüpte ise; üreaz, indol ve triptofan deaminaz testleri uygulanmaktadır (Bekar, 1997).

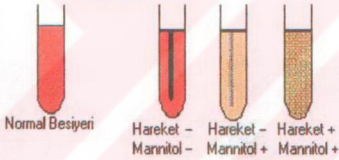
**I. Tüp (Glikoz-Laktoz-H₂S Besiyeri)
-Besiyeri Katı-**



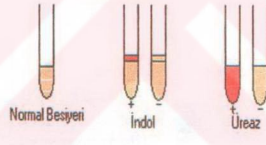
Fenilalanin deaminaz testi



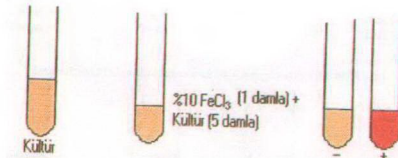
**II. Tüp (Mannitol-Mobilite Besiyeri)
-Besiyeri Yarıkatı-**



**III. Tüp (Üre-İndol Besiyeri)
-Besiyeri sıvı-**



Triptofan deaminaz testi



Şekil 2.2. Lassen'in üçlü tüp sistemi (Bekar, 1997).

Salmonella'ların kesin identifikasyonunda; bu etkenlerin biyokimyasal özelliklerinin (Tablo 2.1) ve antijenik yapılarının incelenmesiyle yapılmaktadır. Biyokimyasal özelliklerine göre *Salmonella* olduğu anlaşılan suşlar önce polivalan O antiserumu ile lam üzerinde aglütinasyona tabi tutulur. Daha sonra aglütinasyonun görüldüğü polivalan serumun grup antiserumları ile suşun serogrubu tayin edilir. Serolojik grubu tespit edilen suşun H antiserumlarıyla aglütinasyonu sonucu serotipi saptanır (Merchant ve Packer, 1967; Carter, 1984; Quinn ve diğ., 1994; Bilgehan, 1995; Anonim, 1991; Arda, 1997; Bekar, 1997).

Gıda maddelerinde *Salmonella* belirlenmesinde; bakterinin kültürünün ve biyokimyasal analizlerin yapılması yaklaşık 7 günlük bir süreyi getirdiğinden hızlı yöntemlerin geliştirilmesine olan gereksinim geçmişte olduğu gibi günümüzde de devam etmektedir. Bugün kültür yöntemi dışında; kültür-enzimatik testler, lateks aglütinasyon testleri, enzim linked immunosorbent assay (ELISA), PCR ve impedanz yöntemleri kullanılarak da *Salmonella* belirlenmektedir (Fluit, 1985; Bailey, 1998).

Tablo 2.1. *Salmonella*'ların biyokimyasal karakterleri (Bekar, 1997).

Hareket	+
Glukoz	÷
Laktoz	-
Beta Galaktosidaz	-
Hareket	+
Glukoz	÷
Laktoz	-
Beta Galaktosidaz	-
H ₂ S	+
Üreaz	-
Fenilalanin	-
İndol	-
Lizin Dekarboksilaz	÷
Sitrat	÷
Jelatin	-
Mannitol	+
Adenitol	-
Metil red	÷
Voges Preskauer	-

÷ : Değişkenliği ifade eder.

2.3. *Salmonella*'ların Su Ürünlerindeki Önemi

Su ürünlerinde ilk olarak 1934 yılında Doğu Kanada kıyılarında yakalanan bir balıktan *Salmonella* izole edilmiştir. Daha sonraları ise tatlı ve tuzlu sulardan yakalanan bir çok balıktan farklı *Salmonella* türleri izole edilmiştir (Souther ve diğ., 1972; Morse ve diğ., 1978b; Wyatt ve diğ., 1979; Van Den Heever ve Frey, 1994; Twiddy, 1995). Aynı zamanda *Salmonella*'lar midye, kerevit, istridye gibi deniz ve tatlı sularda ve buralarda yaşayan canlılarda (Morse ve diğ., 1978a; Morse ve diğ., 1978b; Bernoth, 1990; Bocek ve diğ., 1992; Meçgel, 1992; Şeker ve Sarıeyyüpoğlu, 1998), tatlı su balıklarında (Ertaş ve diğ., 1999; Muz ve diğ., 1999), akvaryum balık yemlerinde (Sarıeyyüpoğlu, 1987), kurbağa, kertenkele, kaplumbağa, salyangoz ve solucanlarda (Özek ve diğ., 1965; Özek ve diğ., 1970; Töreci ve Anđ, 1991) tespit edilmiştir.

Kaplumbağalar gram pozitif ve gram negatif zengin bir bakteriyel floraya (Tablo 2.2) sahiptir. Kaplumbağa'dan insanlara geçen bakterilerin başında *Salmonella* gelmektedir (URL1; Demirsoy, 1992; Miller, 1998; Ugurlu, 2000).

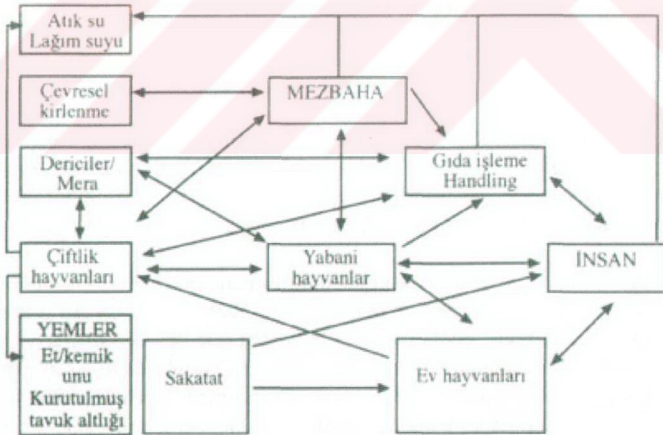
Tablo 2.2. Kaplumbağa'nın bakteriyel florası (Ugurlu, 2000).

Gram Pozitif Bakteriler	Gram Negatif Bakteriler
<i>Streptococcus</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>Arizona</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Listeria</i>	<i>Bakteroides</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Salmonella</i>
	<i>Serratia</i>
	<i>Escherichia</i>
	<i>Sphaerophorus</i>
	<i>Pasteurella</i>

Kaplumbağa'da ilk defa 1944 yılında *Salmonella* bulunmuş ve de 36 *Salmonella* serotipi izole edilmiştir. Yine 1970-1975 yılları arasında evcil sürüngenler (yılan ve kaplumbağalar) ile *Salmonella* enfeksiyonu arasında direk bir ilişki olduğu saptanmıştır. Özellikle de çocukların sürüngenlere direk temasından dolayı 250000 kişiden *Salmonella* bakterisi izole edilmiştir (URL1).

2.4. *Salmonella*'ların Bulaşma Yolları

Doğada çok yaygın bir bakteri olan *Salmonella*'lar, insan ve hayvanlara çeşitli yollarla bulaşır (Şekil 2.3). Bulaşmada en önemli enfeksiyon kaynakları, insanlar için hayvansal kökenli gıdalar, hayvanlar için yemler, insan ve hayvan gaitası ile kirlenmiş sular, portör canlılar ve yabancı hayvanlardır. *Salmonella* serotipleri insanda olduğu gibi; balık, sığır, keçi, koyun, domuz, kümes hayvanları ve kemirgenlerde çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu hayvanların pek çoğu çeşitli *Salmonella* türleri için asıl konakçıdır (Anonim, 1984; Arda ve diğ., 1992; Bocek ve diğ., 1992; Guthrie, 1992; Barrow, 1993; URL2). Bu canlılar *Salmonella*'ların insanlara bulaşmasında direk veya besin maddelerinin kontaminasyonu suretiyle de indirekt olarak rol oynarlar (Taylor, 1968; Love ve Minkler, 1972; Sarıeyüpoğlu, 1987). İnsan ve hayvanların *Salmonella* enfeksiyonuna yakalanmalarında, enfeksiyon kaynağı olarak suyun rolü büyüktür. *Salmonella* bakterileri, prensip olarak temiz sularda çoğalamazlar. Fakat evlerden ve sanayi tesislerinden gelen *Salmonella* ihtiva eden kirli suların dere, ırmak ve göl sularına karışmasıyla bu sular kontamine olmaktadır. Hastalık etkenlerini taşıması ve organik maddelerce zengin bu kirli sular, mikroorganizmaların çoğalmasında elverişli bir besiyeri olarak rol oynarlar. Bu nedenle de kirli sular büyük bir tehlike oluştururlar (Anonim, 1988; Martinez ve diğ., 1991; Guthrie, 1992; Sarımehtemoğlu ve diğ., 1995).



Şekil 2.3. *Salmonella*'ların bulaşma yolları (URL2).

Kaplumbağa'dan insanlara *Salmonella*'lar direk temas veya dışkı ile geçebilmektedir. Kaplumbağa'da bulunabilecek *Salmonella*'ların bulaşmasından sakınmak için de iki önlemin alınması gerektiği bildirilmiştir (Miller, 1998; URL1; URL5).

- a) Kaplumbağa'nın kabuk ve diğer dış organlarına direk temastan kaçınılmalıdır,
- b) Evde beslenen kaplumbağa ve diğer sürüngenler sık sık yıkanarak *Salmonella* yönünden denetimi sağlanmalıdır.

2.5. *Salmonella*'ların İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Salmonella farklı klinik tablolar gösteren ve dünyanın her bölgesinde görülebilen enfeksiyonlara yol açar. Bunlar; Tifoid *Salmonella* enfeksiyonları, Enterik *Salmonella* enfeksiyonları, Septisemik *Salmonella* enfeksiyonları ve Lokal enfeksiyonlar gibi gruplar oluşturmaktadır (May, 1980; Töreci ve Ang, 1989; Karagül ve diğ., 1992; Meçgel, 1992; Kılıçturgay, 1993; Bilgehan, 1995; Kalender ve Muz, 1999; Bilgehan, 2000; URL2).

Salmonella typhi; *S. paratyphi A*; *S. paratyphi B*; *S. paratyphi C* ve *S. typhimurium* gibi serotipler insanlarda tifo ve paratifo adı verilen enfeksiyonlara neden olur. Oral yolla alınan *Salmonella*'lar ince bağırsak mukozası yoluyla insan vücuduna girer, çoğalır ve epitelden ona bir zarar vermeden mukozaya geçip, bölgesel lenf bezlerine veya kan dolaşımına karışırlar. Çoğunlukla asemptomatik olan bu yayılma, etkenle temastan 24–72 saat içinde oluşur. Retiküloendotelial (dalak, karaciğer ve kemik iliği) sistemin fagosite edici hücreleri, *Salmonella*'ları içine alır. Bunlardan bazıları, belirgin bir direnç göstererek retiküloendotelial hücreler içinde ürerler ve yukarıda açıklanan enfeksiyona oranla daha uzun süren yeni bir bakteriyemiye neden olurlar. Klinik semptomlar hastalığın bu döneminde ortaya çıkar. İnce bağırsak peyer plaklarında, lenfojen tutulma sonrasında nekroz, ülserasyon, bağırsak perforasyonları ve intestinal kanamalar görülebilir. İkinci bakteriyemi sırasında, metastatik enfeksiyon odaklarına bağlı olarak apse oluşumu görülebilir. Safra kesesinde kolesistit oluşmaksızın bakteri ürür ve safra ile birlikte bağırsak kanalına dökülür. Bu dönemde; temastan üç hafta sonra dışkıda *Salmonella* bulunur (May, 1980; Töreci ve Ang, 1989; Karagül ve diğ., 1992; Meçgel, 1992; Kılıçturgay, 1993; Bilgehan, 1995; Kalender ve Muz, 1999; Bilgehan, 2000; URL2).

S. montevideo; *S. anatum* ve *S. newport* gibi serotipler insanlarda enterit ve enterokolit neden olurlar. Buda *Salmonella* enfeksiyonlarının en sık görülen şeklidir. Asemptomatik bağırsak enfeksiyonları, şiddetli gastroenterit, enterokolit hastalık tabloları ve bakteriyemiye bağlı apse oluşumları şeklinde görülebilir. Bu tür *Salmonella*'lar insan dışında birçok hayvanın

Bağırsakların dan izole edilebilir. En sık bulunan taşıyıcılar; tavuk, ördek, domuz, inek, kedi, fare, köpek, papağan cinsi kuşlar, soğuk kanlı hayvanlar ve böceklerdir. Bu hayvanlar; et ve yumurtaları ile veya kontamine besin maddelerini insanlara taşımaları ile ya da su ve besin maddelerini kontamine etmeleri ile hastalığı yayarlar. *Salmonella*'lar besin maddelerinin düşük ısılarda ısıtılması sırasında canlı kalabildikleri için kontamine besinlerde daha uzun süre canlı kalabilir. Dışkı; sulu, çok miktarda ve kanlı olabilir (May, 1980; Töreci ve Ang, 1989; Karagül ve diğ., 1992; Meçgel, 1992; Kılıçturgay, 1993; Bilgehan, 1995; Bilgehan, 2000; URL2).

S. cholerae suis; *S. enteritidis* gibi serotipler insanda septisemik ve lokal *Salmonella* enfeksiyonlarına neden olurlar. İnsanda genel enfeksiyon ve besin zehirlenmesi yapar. Hastalarda üşüme, titreme, ateş, baş ağrısı, bulantı, kusma, kemik ve eklem ağrıları görülür (May, 1980; Töreci ve Ang, 1989; Karagül ve diğ., 1992; Meçgel, 1992; Kılıçturgay, 1993; Bilgehan, 1995; Bilgehan, 2000; URL2).

Salmonella'dan korunmak için, dışkının insan besinine bulaşma yollarını önlemekle olur. Bunun için öncelikle içme suyu ve kanalizasyon sistemlerinin düzenli olması, suların klorlanması, portörlerin tedavi edilmesi, salgın dönemlerinde aşı uygulamaları korunma yollarıdır (URL2).

Bakteri, antibiyotiklere karşı gittikçe artan oranda direnç geliştirdiği için antibiyogram testi sonrasında uygun antibiyotik kullanılmalıdır. Hastaların su ve elektrolit kaybı varsa antibiyotik tedavisi ile birlikte bu kayıp yerine konulmalıdır (URL2).

2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Salmonella'ların teşhisinde kullanılan bakteriyolojik ve serolojik testler, rutin olarak uzun zaman almaktadır. Bu nedenle son yıllarda pek çok mikroorganizmada olduğu gibi *Salmonella*'ların teşhisinde de PCR tekniği uygulanmaktadır (Bailey, 1998).

PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniği, 1983 yılında geliştirilmiştir. Bu teknik ilk olarak Saiki ve diğ., (1988)'ları tarafından insan hemoglobin genlerinin ortak hücrelerinin ortaya konulması amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra bu teknik diğer araştırmacılar tarafından da kullanılmaya devam etmiştir (Coote, 1990; Erlich ve diğ., 1991; Watson ve diğ., 1992). Yapılan bu araştırmalardan sonra, çabuk, güvenilir, selektif ve spesifik olması nedeniyle PCR tekniğinin uygulama alanları her geçen gün hızla artmıştır. PCR; başta mikrobiyolojide olmak üzere enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde, genetik hastalıkların doğum öncesi saptanmasında, in vitro olarak fertilize edilen insan embriyolarının cinsiyet tayininde, tüy, kıl veya bir miktar kandan DNA amplifiye edilerek suç araştırmaları gibi adli tıpla ilgili konularda, ekoloji ve gıda kontrolü gibi pek çok alanda uygulanmaktadır. Bu teknik, hastalıkların ve genetik bozuklukların

klirik teŖhisinin yanı sıra su ve gıda maddeleri numunelerinde DNA sekanslarının araŖtırılmasında da kullanılmaktadır (Steffan ve Atlas, 1991; İzgür, 1996; Virella, 1997; Çetinkaya, 1998). PCR son yıllarda; saf ve karışık kültürlerde (Widjoatmodjo ve diğ., 1992), yumurta (Woodward ve Kirwan, 1996), et (Aabo ve diğ., 1995) ve gaita (Mahon ve Lax, 1993; Cohen ve diğ., 1994) gibi materyallerde *Salmonella* 'ların teŖhisi gerçekteŖtirilmiŖtir.

PCR; kısa bir zaman içinde aranan etkenlerin genetik materyalini saptamak amacıyla hedeflenen nükleik asitin (DNA) biyokimyasal olarak çoğaltmasını sağılayan bir yöntemdir (Saiki ve diğ., 1988; Mullis, 1990; Bej ve diğ., 1991; Taylor, 1993).

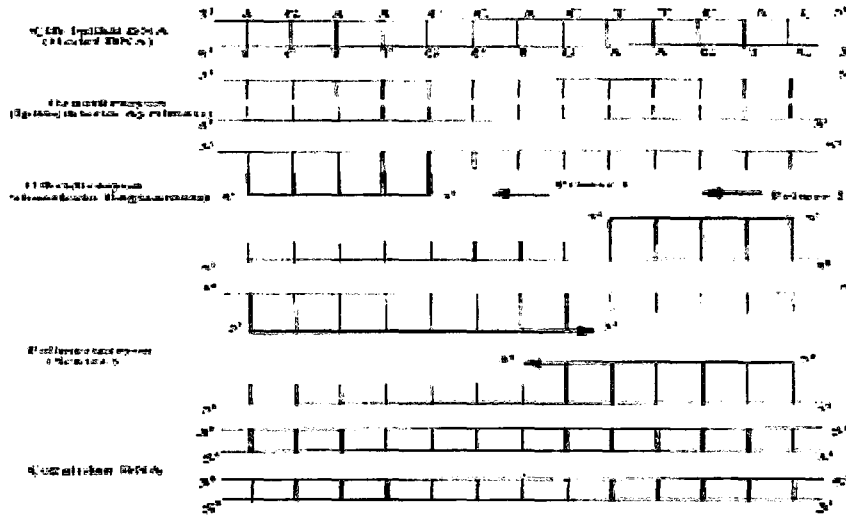
PCR tekniğı'nin geleneksel metotlara göre pek çok avantajları vardır. Bu yöntemde; hedef organizmadan elde edilen genin bir parçası milyonlarca çoğaltılarak kolayca tespit edilebilecek seviyeye getirilmektedir. PCR, halen mevcut kültür tekniklerinden daha duyarlı olup, teŖhiste 12-48 saat gibi kısa sürede sonuç vermektedir. Bu yöntem; özellikle mikobakteriler gibi çok yavaş üreyen bakteriler araŖtırıldığı zaman daha elverişli bir şekilde kullanılmaktadır. Önceleri PCR spesifik tek bir organizma için uygulandığından, fazla masraflı olmakta ve de uzman kişilere ihtiyaç duyulmaktaydı. Şimdi ise basit bir PCR laboratuvarı daha düşük maliyetle oluŖturulmaktadır. Bu teknik hastalık teŖhisinde doğrudan uygulamaya sahip olduğu gibi aynı zamanda nedeni bilinmeyen hastalıklarda, epidemiyoloji sahasında patojen etkenin teŖhisinde ve mikroorganizmaların sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır (Marx, 1988; Coote, 1990; Quirke, 1992; Arda, 1995; Arı, 1999).

PCR'nun bu avantajları olmakla birlikte bazı dezavantajları da vardır. Aşırı duyarlı olması nedeniyle tekniğı kontaminasyona karşı hassas kılmakta ve deneyin sonucunun değıerlendirilmesinde problem oluŖturmaktadır. PCR'nun kullanımındaki önemli bir sorun da gaita analizidir. Materyal olarak direk gaitanın kullanımı yanlış negatif sonuçların elde edilmesine neden olur. PCR'nun, canlı mikroorganizmaların DNA'ları gibi residüel DNA'ları da tespit etmesi önemli bir dezavantajdır. Örneğın; bir etkenin DNA'sının pastörize edilmiş süttten identifikasyonu, o etkenin pastörizasyona dayanıklı olduğunun kanıtı değıildir. Bu gibi durumlarda numunelerden besiyerlerine ekim yapılması da zorunlu hale gelir. Yani bireyden elde edilen numunelerden bir organizmanın DNA'sının elde edilmesi, bireyin o canlı organizmayı taşıdığıının delili olamaz (Sarkar ve Sommer, 1990; Allard ve diğ., 1990; Quirke, 1992; Cohen ve diğ., 1994; Woodward ve Kirwan, 1996; Arda, 1997; Çetinkaya, 1998).

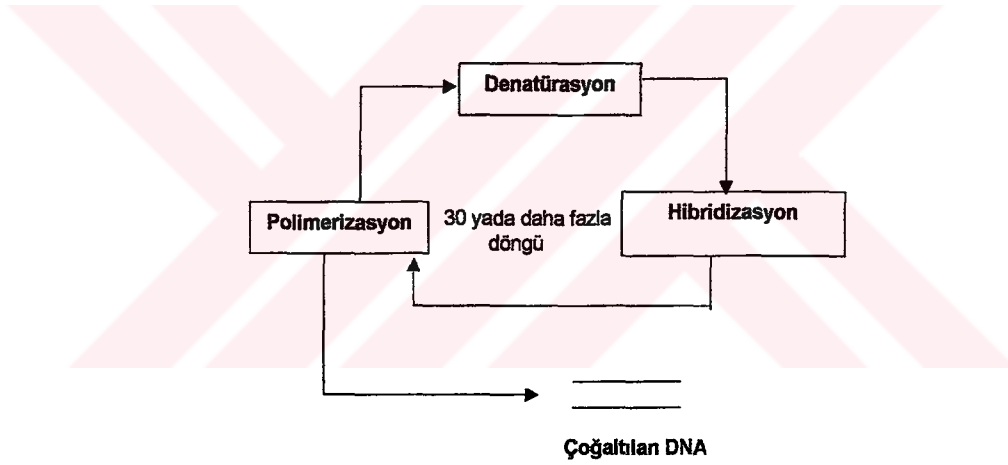
PCR'da kullanılan önemli reaksiyon bileşenleri; hedef DNA, termostabil DNA polimeraz (Taq Polimeraz), primerler, deoksınükleotidler (adenin, timin, guanin, sitozin) ve Mg iyonlarıdır. PCR karışımında bulunan materyaller arasında; 1. hedef DNA, 2. Bulunmak istenen DNA'ya ait iki tür spesifik oligonükleotid primerleri (15-30 bazlık, tek iplikcikli), 3.

Termostabil DNA polimeraz, 4. PCR buffer (KCl, MgCl₂, TritonX-100, Tris-HCl) ve 5. Dört tür dNTP (nükleotid) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) vardır (White ve diğ., 1989; Arda, 1997). PCR’unda işlem gören primer konsantrasyonu çok önemlidir. Çok düşük primer konsantrasyonu PCR ürününün çok az ya da hiç olmamasına neden olurken, çok yüksek konsantrasyonu da hedef olmayan DNA dizininin çoğalmasına veya primerlerin birbirine bağlanarak “Primer Dimer” adı verilen spesifik olmayan bantların oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle primer konsantrasyonunun 0.1-1 µl arasında olması önerilmiştir (White ve diğ., 1989; Coote, 1990; Sanderson ve Hermon-Taylor, 1992; Arda, 1995). *Salmonella*’ların 16S ve 23S rRNA genlerinden türetilen primerler *Salmonella*’ya spesifiktir ve sadece *Salmonella* izolatlarını saptamaktadır. Böylece *Citrobacter*, *Klebsiella* ve *Serratia* türlerinden kaynaklanabilecek kros-reaksiyon ihtimali söz konusu değildir. *Salmonella* ile yakından ilişkili olan enterobacteriaceae familyasının suşlarını içeren *Salmonella* dışındaki diğer izolatların hiçbirisi yanlış pozitif reaksiyon meydana getirmemektedir (Lagatolla ve diğ., 1996; Lin ve Tsen, 1996; Nielsen ve diğ., 1997).

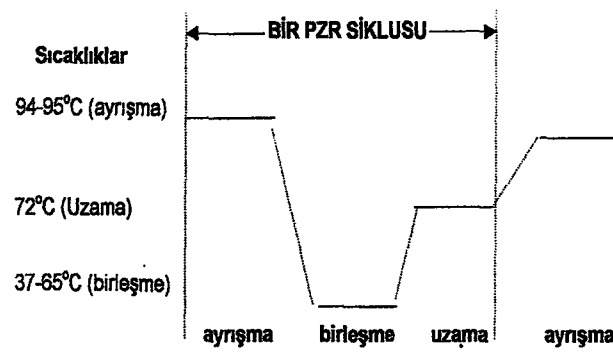
PCR, denaturasyon (nükleik asitin iki iplikçiğinin birbirinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi), hibridizasyon (primerlerin bağlanması) ve polimerizasyon (sentez) olarak adlandırılan aşamaların (Şekil 2.4) farklı ve kontrollü sıcaklık koşullarında tekrarlanmasından ibaret olup, bu üç basamak bir siklusu oluşturur. Bu işlem 25-30 kez tekrar edilerek üzerinde çalışılan hedef DNA’nın milyonlarca sayıda çoğalmasını sağlar (Şekil 2.5-2.6). PCR reaksiyonu sonucunda belirli uzunlukta bir veya birden fazla DNA parçaları elde edilir. PCR ile amplifiye edilmiş ürünlerin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan metot, bu ürünlerin Ethidium bromide ile boyalı agaroz jel üzerine yükleyerek elektroforez işlemine tabi tutmak ve sonuçta ayrılan bantları ultraviyole transillüminatör ile gözle görülür bir hale getirmektedir (Saiki ve diğ., 1988; Bej ve diğ., 1991; Çağlayan, 1991; Perssing, 1991; Arda, 1995; Çetinkaya, 1998).



Şekil 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) safhaları (Saiki ve diğ., 1988).



Şekil 2.5. Bir PCR döngüsü (Saiki ve diğ., 1988).



Şekil 2.6. Sıcaklık ile bir PCR döngüsü oluşumu (Saiki ve diğ., 1988).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Alanı

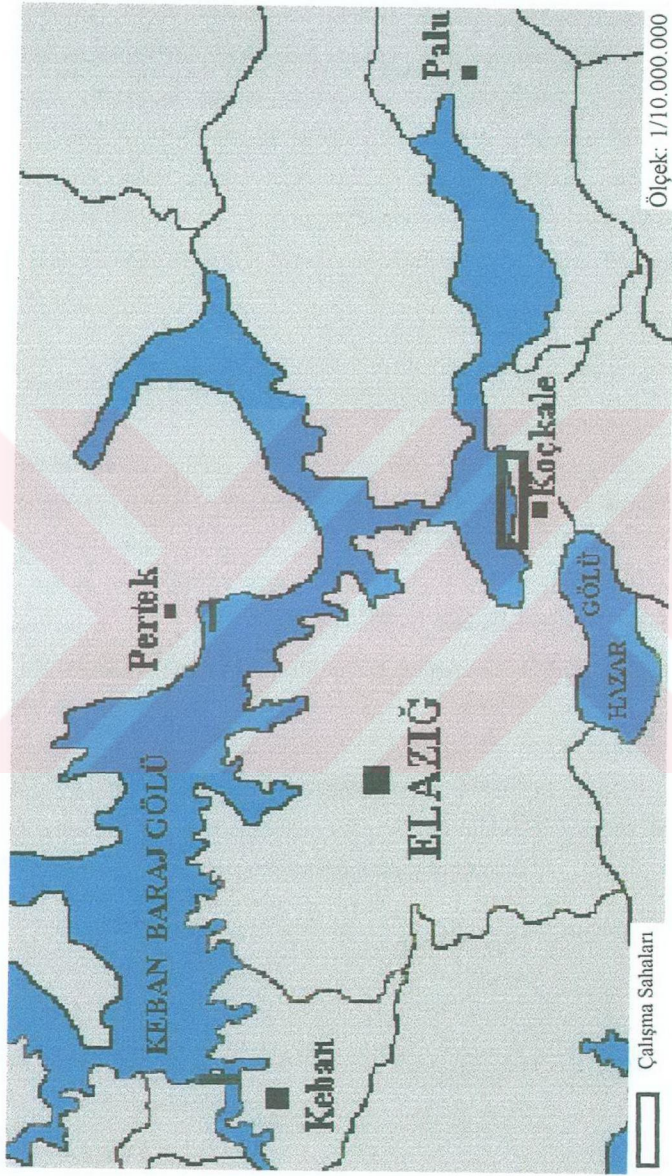
Keban Barajı; Elazığ ilinin 45 km kuzey batısında Keban ilçesi yakınında, Fırat Nehri üzerinde inşa edilmiştir. Göl sahası; Elazığ, Tunceli, Erzincan, Sivas ve Malatya sınırları içerisinde olup, 67.500 hektarlık rezervuar alanına sahiptir. Elektrik üretimi, sulama ve balıkçılık amaçlarıyla kullanılan bir göldür (Anonim, 1994). Koçkale yerleşim yeri (Şekil 3.1), Elazığ ilinin güneydoğusunda olup, merkeze 22 km uzaklıkta olan şehir atık suları arıtma istasyonu bu bölgede yer almaktadır. Bu istasyonda yalnızca fiziksel arıtma yapılmaktadır. Arıtma istasyonundan çıkan atık sular 2 km uzunluğunda olan Haringet çayı ile Keban baraj gölüne dökülmektedir. Tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*) Haringet çayı ve bu çayın Keban barajına döküldüğü bölgedeki 1 km²'lik alanda avlandı.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Salmonella izolasyonu için; zenginleştirme besiyeri olarak Tamponlanmış peptonlu su, Rappaport Vassiliadis Pepton broth (merck), ayırt edici besiyeri olarak MacConkey agar (Difco), *Salmonella*-*Shigella* agar (Difco), Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar (Merck) ve Xylose Lysine Tergitol 4 izole edilen *Salmonella* suşlarının saf kültürlerini elde etmek için ise Tryptic soy agar ve Nutrient broth besiyerleri kullanıldı (Fricker ve diğ., 1985; Arda, 1995; Anonim, 1998). *Salmonella* identifikasyonunda; Lassen'in Norveç Üçlü Tüp Yöntemi (Bilgehan, 1995; Bekar, 1997), Simmon's citrate agar ve Glikoz fosfat buyyonundan yararlanıldı (Arda, 1995).

3.1.3. Referans Kültürler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek ve uygun DNA ekstraksiyon yöntemini belirleyebilmek için *Salmonella enteritidis* bakterisi, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Mikrobiyoloji laboratuvarı ile Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda ve Besin hijyeni Anabilim dalı, *Escherichia coli* ise Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edildi.



Şekil 3.1. Keban baraj gölü'nde tatlı su kaplumbağalarının avlandığı alan.

3.1.4. Kullanılan Malzeme

Tatlı su kaplumbağası, (*Mauremys caspica caspica*)'nın yakalanmasında 20-30 cm yarıçaplı kepçeler, kasıklı çizme ve balıkçı teknesi, kaplumbağaların makroskobik incelenmesinde pens, bistüri, makas, demir ve tahta kesiminde kullanılan elektrikli bir spiral cihazı, plastik enjektör, operasyon eldiveni, pamuk, ip, plastik kova, akvaryum, diseksiyon tahtası, anestezide kullanılan eter, dijital terazi, ölçüm tahtası ve mikro marka fotoğraf makinesi kullanıldı.

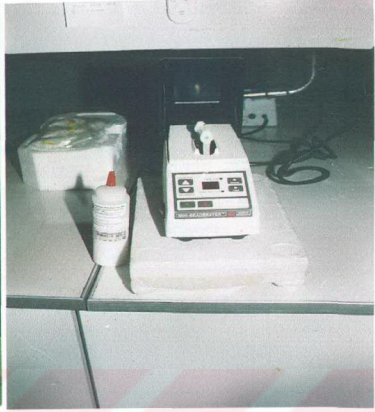
Laboratuvarda; tüp, petri kutusu, pipet, beher glass, erlenmayer, balon, mezür, lam ve lamel gibi cam malzeme ile PCR sikluları için gerekli sıcaklık ve zamanın programlanabildiği ısıtma bloklarına sahip DNA Thermocycler (termal çevirici-PCR- cihazı) (Şekil 3.2), elektroforez ve güç kaynağı (Şekil 3.3), ultraviyole transillüminatör (Şekil 3.4), derin dondurucu, otoklav, etüv, kuru hava sterilizatörü, mikrosantrifüj, mini çalkalayıcı (Şekil 3.5), zirkonyum boncukları, homojenizatör, eppendorf pipetleri, benmari, pH metre, hassas terazi, binoküler mikroskop, spor, bek alevi ve öze kullanıldı.



Şekil 3.2. Thermocycler (termal çevirici-PCR- cihazı). Şekil 3.3. Elektroforez ve güç kaynağı.



Şekil 3.4. Ultraviyole transillüminatör.



Şekil 3.5. Mini çalkalayıcı.

3.2. Metot

3.2.1. Tatlı Su Kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'nın Temini ve Bazı Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Araştırmada incelenecek tatlı su kaplumbağalarının temini için; Elazığ şehir kanalizasyonunun karıştığı Haringet çayı ve bu çayın döküldüğü Keban Baraj gölünün Koçkale bölgesine belli periyotlarla gidildi. Kaplumbağalar günün 10:00 ile 16:00 saatleri arasında su kıyısına yakın yerlerden, bu çalışma için özel olarak geliştirilmiş, 20 cm yarıçaplı kepçelerle yakalandılar. Gölün sığ veya bataklık kısımlarında, kaplumbağaların yakalanmasında uzun bir sopanın ucuna bağlanmış 30 cm yarıçapta olan kepçe kullanıldı. Balık avlanma sezonu bittikten sonra ise balıkçı teknesiyle gidilen, Haringet çayının baraja döküldüğü bölgeden, kaplumbağalar kepçeler yardımıyla yakalandılar. Bu örnekler, içinde baraj gölü suyu bulunan bir bidonla Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları laboratuvarına getirildi. Bu canlı kaplumbağalara numara verilerek onların cinsiyet, yaş, ağırlık, boy, genişlik ve yükseklik ölçümleri yapıldı. Bilgisayarda Microsoft Excel programında yaş gruplarına göre ağırlık, boy, kabuk uzunluğu, kabuk genişliği ve kabuk yüksekliklerinin grafikleri çıkarıldı. Araziden çok sayıda toplanan kaplumbağaların uzun zaman akvaryumda bekletilme zorunluluğu

doğuracağından ve *Salmonella* yönünden muayenenin de yanlış sonuçlar verebileceği düşüncesiyle, her hafta 5 kaplumbağa ve su örneği getirilerek 24 saat içerisinde *Salmonella* yönünden incelendiler. Toplam 25 adet kaplumbağada bulunabilecek *Salmonella*'ların izole ve identifikasyonu kültür yöntemiyle yapıp, PCR tekniği ile teyidine çalışıldı.

3.2.2. Tatlı Su Kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'nın Tespiti, Anestezisi ve Diseksiyonu

Çalışma alanından canlı olarak getirilen tatlı su kaplumbağaları 60x40x30 cm boyutunda bir akvaryuma stok edildi. Otopsi yapılacak tezgah formol ile silindi. Bu tezgah üzerine formol ile temizlenmiş diseksiyon tahtası yerleştirildi. Tatlı su kaplumbağası'nın karapaksı diseksiyon tahtasının ortasına gelecek şekilde yerleştirilip dört ayağı iple bağlanarak tahtaya sabitlendi. Kaplumbağaların *Salmonella* yönünden incelenmeleri için otopsilerinin yapılmasında Atatür (1979)'ün bildirdiği gibi anestezi maddesi olarak eter kullanıldı. Eter; her bir kaplumbağa'nın 4 bacak kaidesine 2'şer ml olacak şekilde toplam 8 ml enjekte edildi. Daha sonra ilk defa bu çalışmada kullanılan elektrikli bir spiral cihazı ile kaplumbağaların plastronları kesildi. Steril bir bistüri yardımıyla plastron deriden ayrıldı ve steril bir makas ile de deri kesilip, karaciğer ve bağırsaklar açığa çıkarılarak bakteriyolojik incelemeye hazır hale getirildi.

3.2.3. Besiyerlerine Ekimlerinin Yapılması için Karaciğer ve Bağırsakların Hazırlanması

Kaplumbağaların kesilen plastronlarını vücuttan ayırarak iç organlar ortaya konuldu. Karaciğerler önce homojenizatörde küçük parçalara ayrılarak peptonlu suyla homojen hale getirildi. Bağırsaklar ise steril bir makasla 1-1,5 gram büyüklüğünde parçalara ayrıldı. Yine bu bağırsak parçaları da % 20'lik peptonlu suyla homojenize edildi. Daha sonra her iki organ numunesi de 37 °C'lik etüvde, 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılarak ön zenginleştirme yapıldı. Bu besiyerinden 1 ml alınarak selektif ön zenginleştirme besiyeri olan Rappaport Vassilladis Pepton broth besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. *Salmonella*'ların izolasyonu için; zenginleştirme besiyeri olarak Rappaport Vassiliadis Pepton broth, ayırt edici besiyeri olarak MacConkey agar, *Salmonella*-*Shigella* agar, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Xylose Lysine Tergitol 4 ve Tamponlanmış peptonlu su, izole edilen *Salmonella* suşlarının saf kültürlerini elde etmek için ise Tryptic soy agar ve Nutrient broth besiyerleri kullanıldı.

3.2.4. *Salmonella*'ların Kültür Yöntemi ile İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Selektif ön zenginleştirmeden sonra aseptik koşullar altında Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Xylose Lysine Terğitol 4 agar, MacConcey ve Salmonella-Shigella agar selektif besiyerlerine ekimler yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı (Güven ve diğ., 1983; Bilgehan, 1995; Bekar, 1997).

MacConkey agar, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Salmonella-Shigella agar ve Xylose Lysine Tergitol 4 agarda üreme gösteren *Salmonella* şüpheli kolonilerden preparatlar hazırlanarak gram boyama yapıldı. Gram negatif çomak şeklinde görülen suşların Nutrient broth ve Tryptic soy agarda saf kültürleri hazırlandı. Daha sonra bu bakterilerin biyokimyasal özellikleri incelendi (Güven ve diğ., 1983; Bilgehan, 1995; Bekar, 1997). İdentifikasyon amacıyla; oksidaz, hareket muayenesi, H₂S, metil red (MR), voges proskauer (VP), sitrat, katalaz, üreaz, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, triptofan deaminaz, nitrat redüksiyonu, indol, ortho-nitrophenyl-beta-d-galactose (ONPG), laktoz, glikoz, maltoz, mannitol ve fermentasyon testleri yapıldı (Le Minör, 1984; Bekar, 1997).

3.2.4.1. *Salmonella*'ların Lassen'in Üçlü Tüp Yöntemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Nutrient broth ve Tryptic soy agardaki saf kültürlerden 1. tüp, 2. tüp ve 3. tüpteki besiyerlerine ekimler yapılarak 37 °C'de 18-24 saat inkubasyona bırakıldı. Daha sonra glikoz fermentasyonu, laktoz fermentasyonu, H₂S, ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase, fenilalanin deaminaz, lizin dekarboksilaz, mannitol, nitrat redüksiyonu, hareket, üreaz, indol ve triptofan deaminaz testleri uygulandı (Bekar, 1997)

3.2.4.1.1. Tüp 1: Tüp 1'de glikoz fermentasyonu, laktoz fermentasyonu, H₂S, ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase, fenilalanin deaminaz ve lizin dekarboksilaz testleri uygulandı (Bekar, 1997).

a. Glikoz Fermentasyonu: Besiyerinin normal portakal kırmızısı renginin tüpün dip kısmından başlayarak sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

b. Laktoz Fermentasyonu: Besiyerinin eğik yüzeyinin kırmızından sarıya dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

c. H₂S Oluşumu: Besiyerinde yüzeyden başlayıp derine doğru ilerleyen siyahlaşma ile tanımlandı.

d. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactose (ONPG) Testi: Besiyerinin yüzeyinden alınan bir öze dolusu kültür 0,25 ml fizyolojik tuzlu su ile süspanse edildi. Bunun üzerine 0,25 ml ONPG

solüsyonu ilave edilir ve 37 °C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda sabit sarı rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

e. Fenilalanin Deaminaz Testi: Fenilalaninin asit fenil pruvik'e dönüştürülmesinin araştırılmasıdır. Bir hemoliz tüpüne 4 damla L-fenilalaninin % 0,5'lik sudaki eriyiğinden bırakıldı. Bunun üzerine 4 damla fizyolojik tuzlu su veya daha iyisi fosfat tampon (pH 6,8) ilave edildi. Bu karışımdan 18 saatlik jeloz kültüründen koyu bir emülsiyon elde edildi ve 10 dakika oda derecesinde iyice çalkalandı. Üzerine 1 damla 1/3 oranında sulandırılmış perklorürde fer offisinalden damlatıldı. Hemen oluşan yeşil renk pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

f. Lizin Dekarboksilaz Oluşumu: Besiyerindeki kültür üzerine 1 ml 5/N NaOH ve 2 ml kloroform katıldı. Yavaşça çalkalanır ve çökmeye bırakıldı. Bir müddet geçtikten sonra tüpün dibindeki berrak bölgeden 0,5 ml alındı ve ufak bir tüpe aktarıldı. Bu sıvının üzerine eşit miktarda ninhidrin (kloroformda %1 oranında eritilmiş) ilave edilip ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Menekşe renginin şekillenmesi pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4.1.2. Tüp 2: Mannitol, nitrat redüksiyonu ve hareket testleri yapılır (Bekar, 1997).

a. Mannitol Fermantasyonu: Besiyerinin normal kırmızı renginin sarıya dönüşmesiyle belirlendi.

b. Nitrat Redüksiyonu: Besiyerindeki kültür üzerine A ve B indikatörlerinden (A indikatörü 1 gr sülfanilik asit + 100 ml N asetik asit, B indikatörü 0,6 ml alfanafitilamin + 100 ml N asetik asit) 4'er damla damlatıldı. Nitratın nitrite indirgenmesi ile besiyerinin kırmızıdan kahverengiye dönüşmesine neden oldu.

c. Hareket: Hareketsiz suşlar besiyerinin tam ortasında inokülasyon hattı boyunca sınırlı bir üreme gösterdikleri halde, hareketli suşlar besiyerinde homojen bir bulanıklığın oluşmasına neden oldu.

3.2.4.1.3. Tüp 3: Üreaz, indol ve triptofan deaminaz testleri uygulandı (Bekar, 1997).

a. Üreaz Oluşumu: Besiyeri renginin inkubasyon periyodu sonunda sarıdan kırmızıya dönüşmesiyle üreazın pozitif olup olmadığı tayin edildi.

b. İndol Oluşumu: İnkubasyon süresi sonunda besiyerinin üzerine 0,5 ml Kovacs ayırıcı ilave edildi. İndol pozitif suşlar besiyerinin üzerinde kırmızı, negatif suşlar sarı bir halkanın teşekkülüne neden oldu.

c. Triptofan Deaminaz Deneyi: İndol deneyi yapılmadan önce 5 damla besiyeri bir pipet yardımıyla steril bir aglutinasyon tüpüne aktarılır ve üzerine bir damla % 10 FeCl₃ ilave edildi. Enzim teşekkülü besiyerinin normal sarı renginin kısa bir zaman içinde (3-5 dakika) kiremit kırmızısı rengine dönüşmesine ile belirlendi.

3.2.4.2. *Salmonella*'ların Diğer Biyokimyasal Özellikleri

Salmonella'ların; Lassen'e göre belirlenen özelliklerden başka metil red (MR)- voges preskauer (VP), sitrat, oksidaz ve katalaz testleri de (Arda, 1995) yapıldı.

3.2.4.2.1. Metil Red (MR)- Voges Preskauer Testi (VP)

Glikoz fosfat buyyona taze kültürden bir öze dolusu ekim yapıldı ve 37 °C'de 2-7 gün inkubasyona bırakıldı. Üretilen kültürden bir kısım alınarak üzerine 4-5 damla metil red solüsyonundan damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Kültürün kalan kısmına 3 ml % 5'lik alfa-naftol solüsyonundan ilave edilerek karıştırıldı. Bunun üzerine % 40'lık KOH çözeltisinden 1 ml ilave edilerek 2-5 dakika içerisinde pembe renk oluşumu Voges Preskauer (VP) pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4.2.2. Sitrat

Tryptic soy agarda üreyen taze kültürde Simmon's citrate agara ekim yapıldı. Besiyerinin yeşil renginin maviye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4.2.3. Oksidaz

Tryptic soy agarda üreyen saf kolonilerin üzerine oksidaz ayıracında bir öze dolusu bırakıldı. Koyu mor renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4.2.4. Katalaz

Tryptic soy agarda üreyen saf kolonilerden bir öze dolusu alıp lam üzerine konuldu. Bu koloni üzerine bir öze dolusu H₂O₂ damlatıldı. Koloni üzerinde kabarcık oluşması pozitif sonuç kabul edildi.

3.2.5. *Salmonella*'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile İdentifikasyonu

3.2.5.1. DNA İzolasyonu

PCR tekniğini optimize etmek amacıyla referans *Salmonella enteritidis* suşuyla PCR'da denemeler yapıldı. Bunun için referans suştan Tryptic Soy agara yapılan ekimlerde uygun

kolonilerden öze ile örnek alınarak steril edilmiş eppendorf tüp içerisinde 300 µl distile suda iyice süspanse edildi. Tüpe aynı miktarda K- tamponu (300 µl) ve 5 µl proteinaz K ilave edildi. Tüpler 37 °C'de 2 saat su banyosunda tutulduktan sonra 15 dakika kaynatmaya bırakıldı. Kaynatma işleminden sonra süspansiyona aynı volümde (600 µl) Tris-HCl ile satüre edilmiş fenol ilave edildi, süspansiyon elle 5 dakika süreyle iyice çalkalanıp ve yüksek devirde (13.000 rpm) 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu işlemden sonra eppendorfların üst kısmındaki solüsyon fenol karışımından ibaret olan ve gözle görülebilen bir çizgiyle ayrılmış olan alt kısma dokunmadan bir mikropipet vasıtasıyla başka bir eppendorfa aktarıldı. Daha sonra DNA'nın presipitasyonu işlemine geçirildi.

Süspansiyona 0.1 volüm 3 M sodyum asetat ve 2.5 volüm saf alkol ilave edildi. Süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra -20 °C de bir saat bekletildi. Daha sonra süspansiyon 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Sonra pelet, önce 300 mikrolitre miktarındaki % 90'lık ve daha sonra da % 70'lik alkol ile muamele edildi. Bu basamaklar arasında süspansiyon 13.000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilip ve son olarak elde edilen pelet bir saat süreyle kurumaya bırakıldı. Pelet kurutulduktan sonra 50–100 µl'lik distile su ile süspanse edildi ve PCR için bu süspansiyondan 5 µl kullanıldı.

3.2.5.2. PCR Karışımının Hazırlanarak Uygulanması

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PCR karışımına 5 µl 10x PCR buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Tween - 20) , 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksitrikleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas), *Salmonella*'ların 16S rRNA geninden üretilen 16SF1 (5'^I–TGTTGTGGTTAATAACCGCA-3'^I) ve 16SIII (5'^I – CACAAATCCATCTCTGGA-3'^I) primer çiftinin (Promega) (Lin and Tsen, 1996) her birinden 50 pmol ve 5 µl template DNA ilave edildi. PCR reaksiyonları PCR-Sprint thermalcycler (Thermo Hybaid, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda 94 °C'de 2 dakika ön denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PCR siklüsü 94 °C 'de 45 saniye denaturasyon, 64 °C'de 1 dakika hibridizasyon ve 72 °C'de 2 dakika sentez olarak gerçekleştirildi. Son siklüsü müteakip 72 °C 'de 10 dakikalık ekstra sentez işlemi yapıldı.

PCR'de amplifiye edilen DNA ürünlerinden, 7 µl alınıp, 3 µl blue orange yükleme solüsyonu ile karıştırılarak daha önce hazırlanan %1,5'luk agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirildi. Son kuyucuğa da PCR markeri bırakıldı. Jel, Tris-borik asit-EDTA (TBE) buffer'ı kullanılarak % 1,5 'luk agaroz jelde 80 V 'da 1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı. Bu süre sonunda jel,

ethidium bromide (0.5 µg / ml) ile oda sıcaklığında 30 dakika süre ile boyandı. Karanlık odada ultraviyole transillüminatörde *Salmonella*'lara özgül DNA bant uzunluklarına (bp-base pair) bakılarak polaroid kamera sistemi ile fotoğrafı çekildi. Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla; gerek DNA ekstraksiyonu aşamasında gerekse PCR'da pozitif *Salmonella enteritidis* ve negatif kontrol olarak da *Escherichia coli* bakterileri kullanıldı.

3.2.6. Suyun *Salmonella* Yönünden İncelenmesi

Tatlı su kaplumbağasının avlandığı Haringet çayı 5 adet ve bu çayın Keban baraj gölüne döküldüğü bölgelerden 5 adet olmak üzere 10 adet su örneği alındı. Bu örnekler steril 2 litrelik kapaklı plastik şişelerle Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları laboratuvarına getirildi. Su örnekleri, önceden hazırlanmış 10 ml'lik steril peptonlu suya karıştırılıp aseptik koşullar altında 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak ön zenginleştirilmesi yapıldı. Bu kültürlerden 1 ml alınarak selektif ön zenginleştirme besiyeri olan Rappoport Vassilladis Pepton broth besiyerine ekimler yapıldı, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Xylose Lysine Terçitol 4 agar, *Salmonella*-*Shigella* agar ve MacConkey agar gibi ayırt edici besiyerlerine ekimler yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Alanı

Elazığ Şehir atık suları arıtım istasyonunda yalnızca fiziksel yolla arıtım yapıldığından dolayı Haringet çayı ve bu çayın Keban Baraj Gölüne döküldüğü bölgesinde pet şişeleri, plastik enjektör, kağıt parçası naylon poşet ve organik madde artıkları gözlemlendi. Bu bölgede koku, bulanıklık ve kirliliğin diğer bölgelere göre daha çok olduğu görüldü. Çalışma alanında organik madde artığından dolayı tabanda bol miktarda sedimentin olduğu, bunun da bataklığa yol açtığı ve ayrıca yüksek su bitkilernin bulunduğu tespit edildi.

4.2. Tatlı Su Kaplumbağaları (*Mauremys caspica caspica*)'nın Temini ve Bazı Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışma bölgesinden toplam 25 adet tatlı su kaplumbağası 20-30 cm yarı çaplı kepçelerle yakalandı. Toplanan kaplumbağalar baraj suyu bulunan plastik bidonlara bırakıldı. Plastik bidon içerisindeki kaplumbağaların çok hareketli olduğu ve baraj suyunu çabuk kirlettiği gözlemlendi.

Tatlı su kaplumbağasının cinsiyetinin belirlenmesinde Ugurlu (2000)'nin bildirdiği gibi kuyruk uzunluğuna bakıldı. Erkek kaplumbağaların kuyruk uzunluğunun dişilere göre daha uzun olduğu ve dişilerin erkeklerle göre daha fazla yakalandığı görüldü. Yakalanan 25 adet kaplumbağanın 15'inin dişi, 10'unun ise erkek olduğu belirlendi. Dişilerin 1'inin 7 yaş grubu; 3'ünün 6 yaş grubu; 5'inin 5 yaş grubu; 4'ünün 4 yaş grubu ve 2'sinin ise 3 yaş grubunda olduğu tespit edildi. Erkek kaplumbağalar ise 1'inin 7 yaş grubu; 2'sinin 6 yaş grubu; 2'sinin 5 yaş grubu; 1'sinin 4 yaş grubu; 3'ünün 3 yaş grubu ve 1'inin 2 yaş grubunda olduğu belirlendi.

Tatlı su kaplumbağasının yaşı Öktay (1988)'in bildirdiği gibi plak üzerindeki halkalar sayılarak belirlendi. İncelenen 25 adet kaplumbağanın yaşları 2-7 arasında olduğu tespit edildi (Tablo 4.1). Yaş gruplarına göre; 2 yaşında 1 adet; 3 yaşında 5; 4 yaşında 5; 5 yaşında 7; 6 yaşında 5 ve 7 yaşında olan dan ise 2 adet kaplumbağanın avlandığı görüldü. Bu kaplumbağaların dijital terazide ağırlığı, ölçüm tahtasında (Şekil 4.1) ise boy, kabuk uzunluğu, kabuk genişliği ve kabuk yüksekliği gibi bazı morfolojik ölçümleri (Tablo 4.1) yapıldı. Buna göre; erkek ve dişi kaplumbağalarının ağırlığının 144-1980 gr; boylarının, 21-35 cm; kabuk uzunluğunun 11-28 cm; kabuk genişliğinin 7,5-18 cm; kabuk yüksekliğinin 3,5-10 cm arasında değişim gösterdiği belirlendi.

İncelenen kaplumbağa örneklerinin Başoğlu ve Baran (1977)' in belirttiği gibi *Mauremys caspica caspica*'nın özelliklerini gösterdiği görüldü.



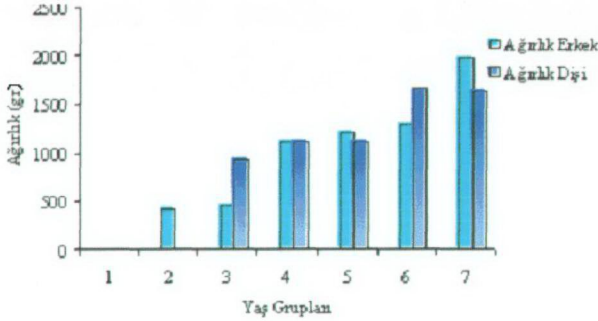
Şekil 4.1. Kaplumbağa'nın boyunun ölçülmesi.

Tablo 4.1. Tatlı su kaplumbağaları (*Mauremys caspica caspica*)'nın yaş, cinsiyet ve bazı morfolojik özellikleri.

NO	CINSİYET	YAŞ	AĞIRLIK (gr)	BOY (cm)	K.UZUNLUĞU (cm)	K.GENİŞLİK (cm)	K.YÜKSEKLİK. (cm)
1	ERKEK	7	1980	35	25	18	8
2	DIŞI	6	1898	34	24	15.5	7.5
3	DIŞI	5	1330	33	23	14	6.5
4	DIŞI	4	1026	30	20	13.5	6
5	DIŞI	5	1400	31	21	15	8
6	DIŞI	4	1124	31	21	14	7.5
7	DIŞI	5	1322	31.5	21.5	15	8
8	ERKEK	4	1104	31.5	21.5	14	7.5
9	ERKEK	3	890	28.5	18.5	13.5	7.9
10	DIŞI	3	948	29.5	19.5	13.5	6
11	DIŞI	4	1096	29	19	13.5	6.5
12	ERKEK	2	416	25	15	10.5	5
13	ERKEK	6	1212	31.5	21.5	14	7
14	ERKEK	5	1234	31.5	21.5	15	7
15	ERKEK	3	144	21	11	7.5	3.5
16	DIŞI	7	1628	38	28	16.5	8
17	DIŞI	4	1100	29.5	19.5	14	5.5
18	DIŞI	3	902	29	19	13	6
19	DIŞI	6	1546	32	22	15	10
20	DIŞI	6	1544	32.5	22.5	14.5	8.5
21	ERKEK	6	1356	32.5	22.5	15	6
22	DIŞI	5	1488	31.2	21.2	14.8	7.5
23	ERKEK	5	1180	31.5	21.5	14.5	5
24	ERKEK	3	328	24	14	9.5	3.5
25	DIŞI	5	1476	32	22	14	8

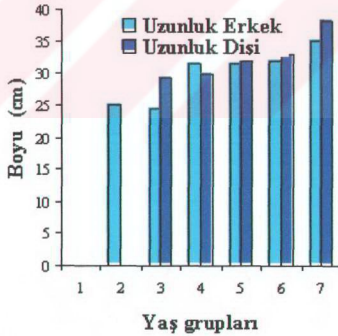
K : Kabuk

Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların ağırlık ortalamaları belirlendi (Şekil 4.2). Buna göre 3 ve 6 yaş grubundaki kaplumbağalardan, dişilerin erkeklerden daha ağır, 4 yaş grubundaki dişi ve erkek kaplumbağaların ağırlıklarının eşit, 5 ve 7 yaş grubundaki kaplumbağalarda ise erkeklerin daha ağır olduğu tespit edildi.



Şekil 4.2. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların ağırlık ortalamaları.

Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların boylarının ortalamaları belirlendi (Şekil 4.3). Bu incelemede 3; 6 ve 7 yaş grubundaki kaplumbağalardan dişilerin erkeklerden daha uzun olduğu, 5 yaş grubundaki dişi ve erkeklerin boylarının eşit ve 4 yaş grubunda ise erkeklerin dişilerden daha uzun olduğu bulundu.



Şekil 4.3. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların boy ortalamaları.

Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk uzunluğu ortalamaları belirlendi (Şekil 4.4). Buna göre 3; 6 ve 7 yaş grubundaki kaplumbağalardan dişilerin

erkeklerden daha uzun olduğu, 5 yaş grubundaki dişi ve erkeklerin kabuk uzunluklarının eşit ve 4 yaş grubunda ise erkeklerin dişilerden daha uzun olduğu saptandı.



Şekil 4.4. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk uzunluk ortalamaları.

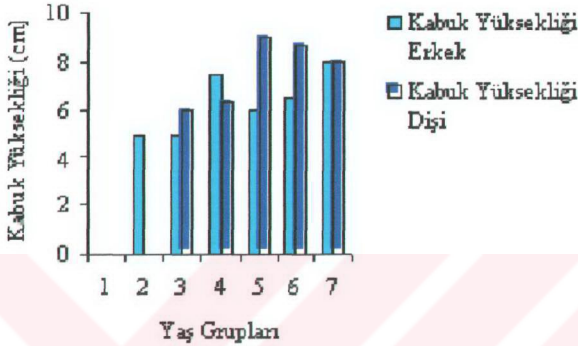
Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk genişliği ortalamaları belirlendi (Şekil 4.5). Bu bulguya göre 3 ve 6 yaş grubundaki kaplumbağalardan dişilerin erkeklerden daha geniş, 4 ve 5 yaş grubundaki dişi ve erkeklerin kabuk genişliğinin eşit ve 7 yaş grubundaki erkeklerin ise dişilerden daha geniş olduğu belirlendi.



Şekil 4.5. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk genişliği ortalamaları.

Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk yüksekliği ortalamaları belirlendi (Şekil 4.6). Bu incelemede de 3; 5 ve 6 yaş grubundaki kaplumbağalardan dişilerin

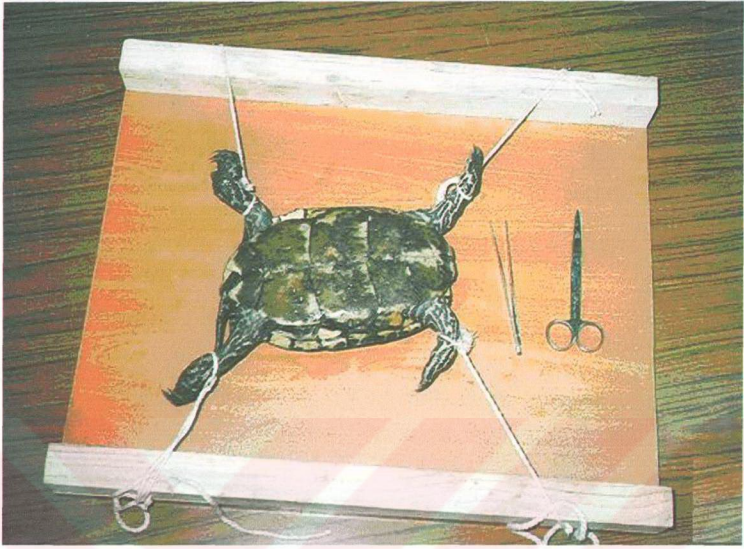
erkeklerden daha yüksek, 7 yaş grubundaki kaplumbağalardan dişilerin ve erkeklerin eşit olduğu ve 4 yaş grubunda ise erkeklerin dişilerden daha yüksek olduğu tespit edildi.



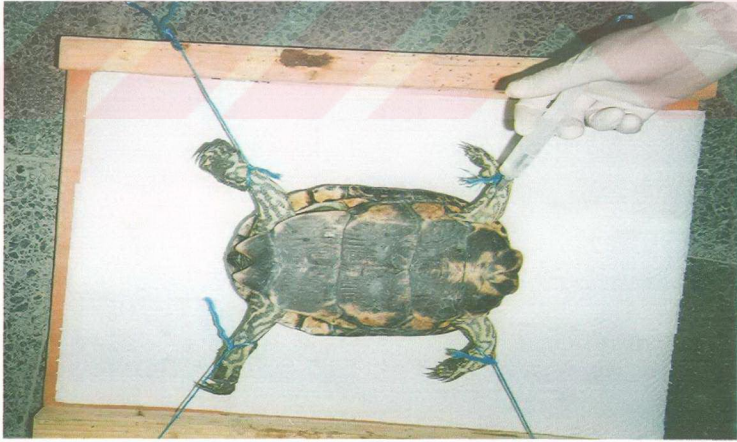
Şekil 4.6. Yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların kabuk yüksekliği ortalamaları.

4.3. Tatlı Su Kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)*nın Tespiti, Anestezisi ve Diseksiyonu

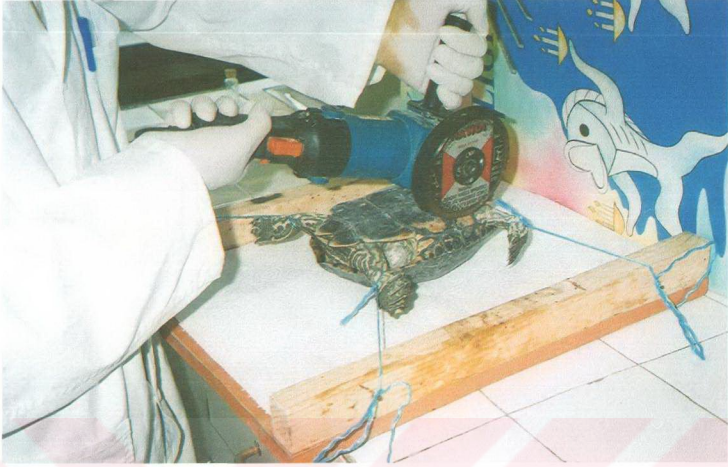
Tatlı su kaplumbağaları'nın; akvaryuma stoklandıktan sonra hareketli olduğu ve akvaryumdan çıkmaya çalıştığı gözlemlendi. Kaplumbağaların diseksiyon tahtasına sabitlenmesi sırasında bacaklarını devamlı kabuk içine çekip çıkardığı gözlemlendi. Kaplumbağalar diseksiyon tahtasına sabitlendikten (Şekil 4.7) sonra eter enjekte edilerek anestezileri sağlandı (Şekil 4.8). Bu işlemden sonra kaplumbağaların baş ve kuyruklarını hareket ettirerek 15 dakika içinde bayıldığı görüldü. Uyutulan her bir kaplumbağanın sağ ve sol plastronu, elektrikli bir spiral cihazı yardımıyla kesildi (Şekil 4.9-4.10). Diseksiyon sırasında kaplumbağaların yaşı ile kabuk kalınlıkları arasında bir bağlantının olduğu saptandı. Yaş arttıkça kabuk kalınlığının arttığı belirlendi. Plastron steril bir pens ile tutularak bistüri yardımıyla deriden ayrıldı. Deri elastiki bir yapıda olduğu için pens ile tutulup sivri uçlu steril bir makasla kesilerek karaciğer ve bağırsaklar açığa çıkarıldı (Şekil 4.11). Karaciğer ve bağırsaklar kesilirken kalbinin kasılıp, gevşediği görüldü.



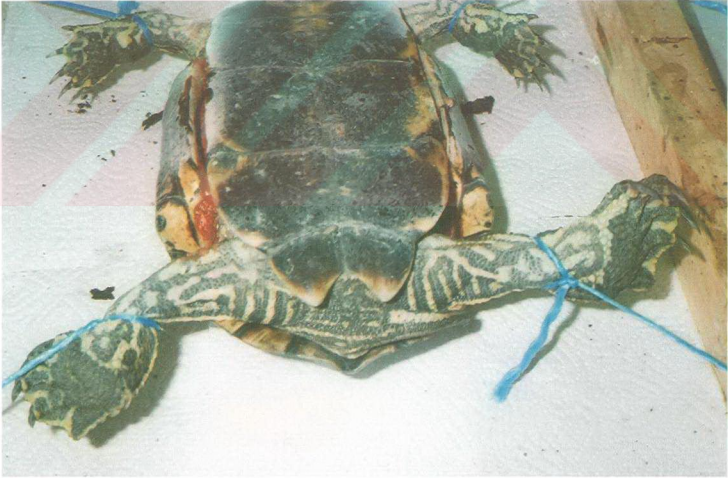
Şekil 4.7. Kaplumbaga'nın diseksiyon tahtasına sabitlenmesi.



Şekil 4.8. Kaplumbaga'ya eter enjeksiyonu.



Şekil 4.9. Kaplumbağa'nın spiralle kesilmesi.



Şekil 4.10. Kaplumbağa'nın spiralle kesildikten sonraki hali.



Şekil 4.11. Kaplumbağa'nın bağırsak ve karaciğerleri.

Tatlı su kaplumbağalar'ının dış muayenesinde herhangi bir bozukluğa rastlanmadı. Diseke edilen kaplumbağaların plastron kalınlığının yaş büyüklüklerine göre arttığı görüldü.

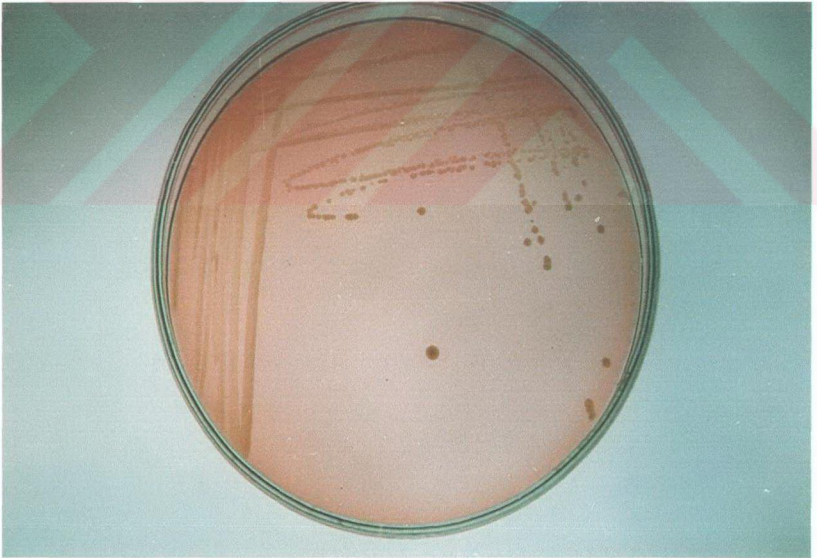
Kaplumbağa'nın iç organlarında da genel bir bozukluk görülmedi. Dişi kaplumbağalar da sarımsı renkte yumurtaların olduğu belirlendi.

4.4. Karaciğer ve Bağırsaklardan Besiyelerine Yapılan Ekimler

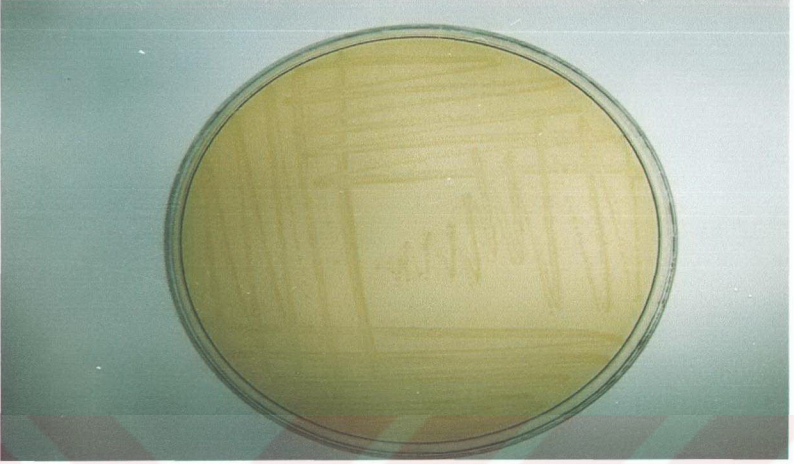
Karaciğerin steril homojenizatta ezilmesi sırasında bol miktarda kan sıvısının toplandığı görüldü. Bu küçük parçalar peptonlu suda homojen edildiğinde tüpte açık kırmızı renk oluştuğu gözlemlendi. Bağırsaklar aseptik koşullarda küçük parçalara ayrılıp peptonlu suda homojen edildiğinde beyazımsı bulanıklık tespit edildi. Rappaport Vassiliadis Pepton broth'da karaciğer ve bağırsaklar 24 saat bekletildiğinde tüplerde çirlik kokusu oluştu, MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar ve Xylose Lysine Tergitol 4 besiyelerine yapılan ekimlerde değişik renklerde koloniler ürettiği saptandı. Bu farklı kolonilerden ayrı ayrı Tryptic soy agar ekimler yapılarak saf kültürler oluşturuldu.

4.5. *Salmonella*'ların İzolasyon ve İdentifikasyonları

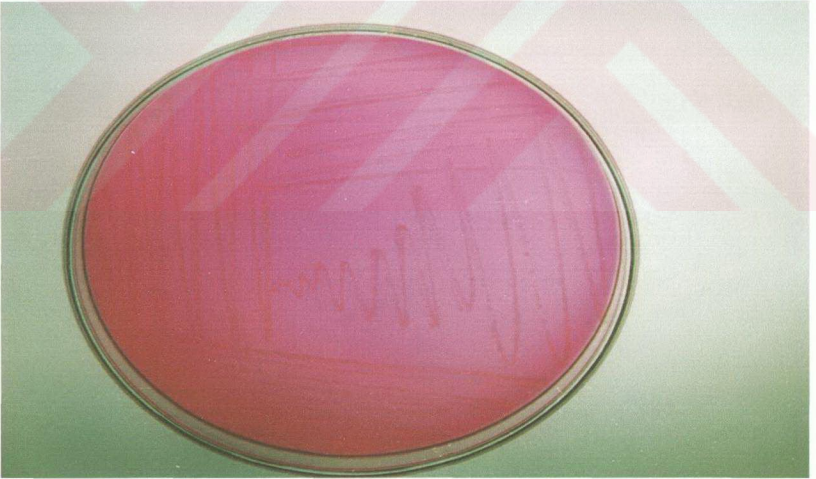
Elazığ şehir kanalizasyonunun aktığı Haringet çayında 10 adet kaplumbağa; bu çayın Keban barajına döküldüğü bölgeden 15 adet kaplumbağa olmak üzere toplam 25 adet avlandı. Haringet çayında avlanan kaplumbağanın 1'inde (%10); Keban barajında ise 5'inde (%33,3) ve toplam olarak 6 adet kaplumbağada (% 24) *Salmonella* izolasyonu yapıldı. MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar ve Xylose Lysine Terğitol 4 besiyerlerine yapılan ekimlerde *Salmonella*'ların bulunabileceğini gösteren şüpheli koloniler tespit edildi. Bunların; MacConkey agarda gri-beyaz renkte koloniler (Şekil 4.12), Salmonella-shigella agarda renksiz mat koloniler (Şekil 4.13), Brilliant Green Phenol Red Laktoz agarda, agarın normal yeşilimsi sarı rengini, açık kırmızıya dönüştüren opak bir üreme (Şekil 4.14) ve Xylose Lysine Terğitol 4 agarda merkezi siyah kırmızı koloniler (Şekil 4.15) meydana getirdiği görüldü. Bu kolonilerden hazırlanan preparatların gram boyanmasında, bakterilerin gram negatif çomak şeklinde olduğu tespit edildi. İzole edilen gram negatif çomak şekilli 6 suşun Nutrient broth ve Tryptic soy agarda elde edilen saf kültürlerinde biyokimyasal özellikleri belirlendi (Tablo 4).



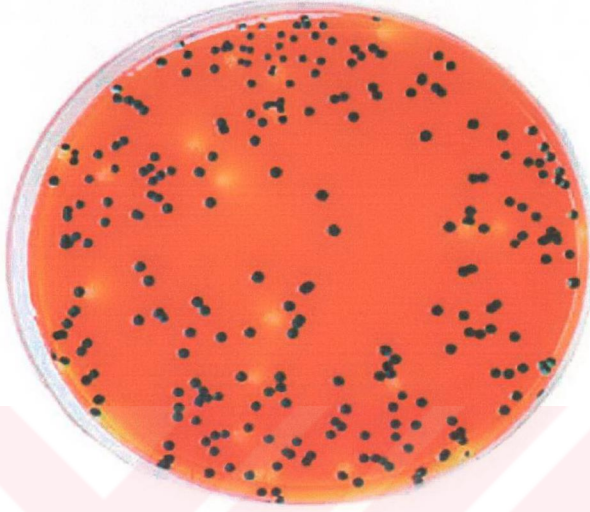
Şekil 4.12. MacConkey agarda gri-beyaz renkte *Salmonella* kolonileri.



Şekil 4.13. *Salmonella-shigella* agarda renksiz mat *Salmonella* kolonileri.



Şekil 4.14. Brilliant Green Phenol Red Laktoz agarda, agarın normal yeşilimsi sarı rengini, açık kırmızıya dönüştüren ve opak türeme gösteren *Salmonella* kolonileri.



Şekil 4.15. Xylose Lysine Terğitol 4 agarda merkezi siyah kırmızı *Salmonella* kolonileri.

4.5.1. *Salmonella*'ların Lassen'in Üçlü Tüp Yöntemiyle Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Kaplumbağalar da izole edilen şüpheli *Salmonella*'ların Lassen üçlü tüp sistemine göre biyokimyasal değerleri belirlendi (Tablo 4.2.).

4.5.1.1. Tüp 1: Tüp 1'de glikoz fermentasyonu, laktoz fermentasyonu, H_2S , ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase, fenilalanin deaminaz ve lizin dekarboksilaz testleri uygulandı (Tablo 4.2).

a. Glikoz Fermentasyonu: Besiyerinin normal portakal kırmızısı rengin sarıya dönüştüğü görüldü.

b. Laktoz Fermentasyonu: Besiyerinin eğik yüzeyinin kırmızı renkte olduğu tespit edildi.

c. H_2S Oluşumu: Besiyerinde yüzeyden başlayıp derine doğru ilerleyen siyahlaşma görüldü.

d. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactose (ONPG) Testi: Tüpte sabit sarı renk oluştu.

e. Fenilalanin Deaminaz Testi: Tüpte yeşil renk oluşmadı.

f. Lizin Dekarboksilaz Oluşumu: Tüpte menekşe rengi belirlendi.

4.5.1..2. Tüp 2: Mannitol, nitrat redüksiyonu ve hareket testleri yapıldı (Tablo 4.2).

a. Mannitol Fermantasyonu: Besiyerinin normal kırmızı rengi sarıya döndü.

b. Nitrat Redüksiyonu: Besiyerinin kırmızıdan kahverengiye döndü.

c. Hareket: Besiyerinde homojen bir bulanıklık görüldü.

4.5.1.3. Tüp 3: Üreaz, indol ve triptofan deaminaz testleri yapıldı (Tablo 4.2).

a. Üreaz Oluşumu: Tüpte sarı renk oluştu.

b. İndol Oluşumu: Besiyerinin üzeri sarı bir halka teşekkül etti.

c. Triptofan Deaminaz Deneyi: Besiyeri normal sarı renkte görüldü.

4.5.2. *Salmonella*'ların Diğer Biyokimyasal Özellikleri

Kaplumbağalar da izole edilen *Salmonella*'ların; Lassen'e göre belirlenen özelliklerden başka metil red (MR)- voges preskauer (VP), sitrat, oksidaz ve katalaz testleri de yapıldı (Tablo 4.2).

4.5.2.1. Metil Red (MR)- Voges Preskauer Testi (VP)

Metil Red Besiyerinde kırmızı renk oluşmadı. Voges Preskauer'da pembe renk tespit edilmedi.

4.5.2.2. Sitrat

Besiyerinin normal yeşil rengi maviye döndü.

4.5.2.3. Oksidaz

Tryptic soy agarda üreyen saf kolonilerin üzerine oksidaz ayırıcından bir öze dolusu bırakıldı. Koyu mor renk oluşmadı.

4.5.2.4. Katalaz

Tryptic soy agarda üreyen saf kolonilerden bir öze dolusu alıp lam üzerine konuldu. Bunun üzerine bir öze dolusu H₂O₂ damlatıldı. Koloni üzerinde kabarcık oluştu.

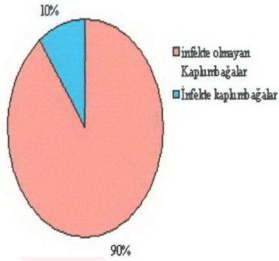
Tablo 4.2. Tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)’ndan izole edilen 6 şüpheli *Salmonella* spp’nin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

	İZOLE EDİLEN 6 SALMONELLA SUŞ					
	1	2	3	4	5	6
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	-	-	+	+
H ₂ S	+	-	+	+	-	+
İndol	-	-	-	-	-	-
Metil Red	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-
Sitrat	+	+	+	+	+	+
Üreaz Oluşumu	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+
Gaz Oluşumu	+	-	-	+	-	-
Fenilalanin Deaminaz	-	-	-	-	-	-
Lizin Dekarboksilaz	+	+	+	+	+	+
Triptofan Deaminaz	-	-	-	-	-	-
Nitrat Redüksiyonu	+	+	+	+	+	+
Laktoz Fermantasyonu	-	-	-	-	-	-
Glikoz	+	+	-	+	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+

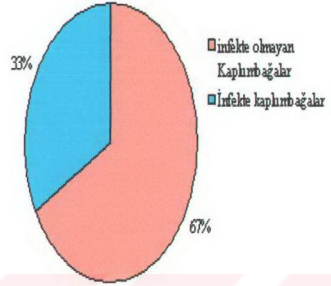
- : Negatif Reaksiyon, +: Pozitif Reaksiyon, ONPG : Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase

Bu suşların 6 (%100)’sında katalaz, sitrat, ONPG, lizin dekarboksilaz, nitrat redüksiyonu; 4 (%66.6)’ünde hareket, H₂S; 3 (%50)’ünde glikoz ve 2 (%33.3)’sinde gaz oluşum testleri pozitif bulundu. Buna karşın suşların 6 (%100)’sında oksidaz, indol, metil red, voges proskauer, üreaz, fenilalanin, triptofan deaminaz, laktoz; 4 (%66.6)’ünde gaz oluşum; 3 (%50)’ünde glikoz ve 2 (%33.3)’sinde ise hareket ile H₂S negatif olarak belirlendi. Bu özelliklere göre 6 suş (%100) *Salmonella* spp. olarak tanımlandı. Haringet çayında avlanan 10 adet kaplumbağanın 1’inde (%10) (Şekil 4.16); Keban barajında ise 15 adet kaplumbağanın 5’sinde (%33,3) (Şekil 4.17) *Salmonella* spp. izolasyonu yapıldı. Bu durumda da 25 adet kaplumbağadan 6 adedinin *Salmonella* spp. ile (%24) infekte olduğu ve 19’unun ise (%76) infekte olmadığı tespit edildi (Şekil 4.18). İnfekte kaplumbağalardan 2 adedinin (%8)

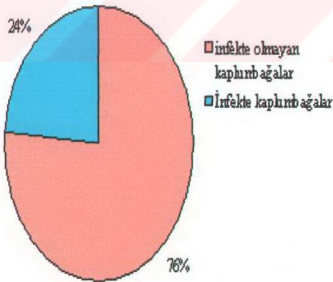
karaciğerinden, 4 adedinin (%16) de bağırsağından *Salmonella* spp'nin izole ve identifikasyonu yapıldı (Şekil 4.19). Enfeksiyon yönünden yaş grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık görülmedi ($X^2=4,6$; $P>0,05$).



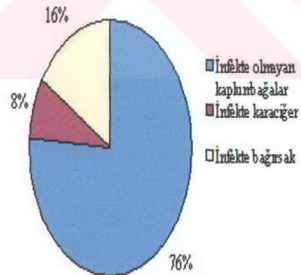
Şekil 4.16. Haringet çayında avlanan kaplumbağalar'dan enfekte olmayanların enfekte olanlara oranı.



Şekil 4.17. Keban Barajında avlanan kaplumbağalar'dan enfekte olmayanların enfekte olanlara oranı.



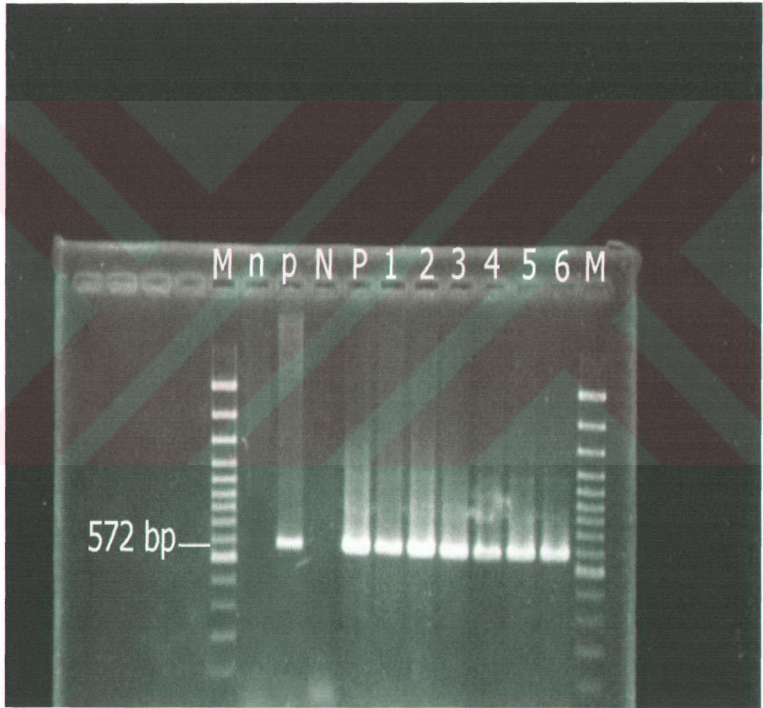
Şekil 4.18. Enfekte olmayan kaplumbağaların enfekte olanlara oranı.



Şekil 4.19. Enfekte karaciğer ve bağırsakların enfekte olmayanlara oranı.

4.6. *Salmonella*'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile İdentifikasyonunun Yapılması

İncelenen 25 adet kaplumbağa (*Mauremys caspica caspica*)'dan 6 *Salmonella* suşu izole edildi. Bu *Salmonella* izolatlarından alınan DNA'ların PCR ile amplifikasyonu yapıldı. Daha sonra bu PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde elektroforezden geçirildi. Bu agaroz jele de ultraviyole transilluminatörde bakıldığında; 6 numunenin hepsinde 572 bp uzunluğunda bantlar görüldü ve bunların da pozitif kontrolle aynı uzunluktaki bantları oluşturduğu tespit edildi. Dolayısıyla izole edilen 6 şüpheli suşun *Salmonella* spp. olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.20)



Şekil 4.20. Tatlı Su Kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'ndan izole edilen *Salmonella* spp. DNA'larının, PCR'nda analizi sonucu oluşan 572 bp'lik bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış % 1.5'luk bir agaroz jel. : Tatlı su kaplumbağasından elde edilen *Salmonella* şüpheli örnekler; M : 100 bp'lik moleküler marker; n : Ekstraksiyon negatif kontrol (*E. coli*) (MBI, Fermantas); p : Ekstraksiyon pozitif kontrol (*S. enteritidis*); N : PCR negatif kontrol (Steril distile su); P : PCR pozitif kontrol (*S. enteritidis*'in DNA'sı).

4.1. Suyun *Salmonella* Yönünden İncelenmesi

Haringet çayında 5 adet ve Keban barajında ise 5 adet ayrı ayrı zamanlarda alınan su örnekleri laboratuvarda aseptik şartlar altında peptonlu suyla homojen edildiğinde tüplerde bir bulanıklık görüldü. Selektif zengileştirme besiyerinde koku oluşumu belirlendi. MacConkey agar, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Xylose Lysine Tergitol 4 agar ve *Salmonella*-*Shigella* agarda üreyen renkli koloniler Tryptic Soy agarada saflaştırıldı. Sonra gram boyama yapıldı. Gram negatif çomak şeklinde görülen suşların biyokimyasal özellikleri incelendi (Tablo 4.3). Bu sonuçlardan şüpheli *Samonella* suşlarına rastlanmadı. Ancak izolatların *Escherichia coli*'ye ait olduğu saptandı.

Tablo 4.3. Su örneklerinin biyokimyasal özellikleri.

	İncelenen 10 su örneğinin biyokimyasal özellikleri									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Oksidaz	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Katalaz	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Hareket	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üreaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz Oluşumu	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
FenilalaninDeaminaz	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Lizin Dekarboksilaz	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Triptofan Deaminaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat Redüksiyonu	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
Laktoz Fermantasyonu	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; kültür yöntemi ile Elazığ şehir kanalizasyonunun boşaldığı Haringet çayı ve bu çayın Keban Baraj Gölü'ne döküldüğü Koçkale bölgesinden avlanan tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'ndan *Salmonella*'ların izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Bulunan şüpheli *Salmonella* örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği ile teyidi başarılı bir şekilde yapıldı. Tatlı su kaplumbağası'nda *Salmonella*'larla ilgili yeterince araştırma kaynağı bulunmadığından, çalışma bulguları zaman zaman balık ve midyede yapılmış olan *Salmonella* ve PCR araştırmaları ile karşılaştırılmıştır.

Evsel ve sanayi artıklarının özellikle kanalizasyonun deşarj edildiği doğal ortamların kirlendiği ve bol miktarda mikroorganizma taşıdığı *Salmonella*'ların da bu etkenler arasında hastalık yapıcı olması bakımından en önemli mikrop olduğu pek çok araştırmacılar (Ünlütürk, 1984; Anonim, 1988; Martinez ve diğ., 1991; Guthrie, 1992; Sarımehtetoğlu ve diğ., 1995) tarafından bildirilmiştir. Elazığ şehir kanalizasyonunun döküldüğü Keban Baraj Gölü'nün Koçkale yöresinde, daha önce yapılan bir araştırmada (Şeker ve Sarıeyyüpoğlu, 1998) hem suda hem de midyelerde koliform bakterilerinin özellikle de *Escherichia coli*'nin bol miktarda olduğu ve dolayısıyla bu bölgede aşırı bir kirlenmenin olduğuna işaret edilmiştir. Aynı bölgede gerçekleştirilen bu çalışmada da Keban Baraj Gölü'nün Koçkale yöresinde alınan su örneklerinden çok sayıda *Escherichia coli* izolasyonunun yapılmış olmasıyla bu yöre sularının aşırı kirli olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır.

Kaplumbağaların yakalanmasına ilişkin özel herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak kirliliğin ve bulanıklığın yoğun olduğu, Keban Baraj Gölüne dökülen Haringet çayından kaplumbağaların özel olarak geliştirilen kepçelerle daha kolay yakalandığı ve bu esnada kaplumbağaların da zarar görmediği tespit edilmiştir.

Genelde tatlı su kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*)'nda cinsiyet tayini, onların kuyruk uzunluklarına göre yapılmış (Başoğlu ve Baran, 1977; Baran ve Atatür, 1997; Ugurlu, 2000). Baraj gölü ve Haringet çayından yakalanan kaplumbağaların da kuyruk uzunluklarına göre yapılan cinsiyet ayırımında, 15 adet kaplumbağanın dişi ve 10 adet kaplumbağanın ise erkek olduğu saptanmıştır. Ayrıca cinsiyetin belirlenmesinde, diseke edilen dişi kaplumbağaların sahip olduğu yumurtalarında yardımı olmuştur. Dikkat edileceği üzere; dişi kaplumbağaların erkeklerden daha fazla yakalanmış olması, dişilerin yumurta bırakmak için kıyıya yakın yüzmelerine ve dolayısıyla yakalama kepçesine daha kolay gelmelerine bağlanmıştır.

Tatlı su kaplumbağaları'nın karapaksları üzerindeki plakların sahip olduğu halkalar sayılarak yaş tayininin yapıldığı bildirilmiştir (Başoğlu ve Baran, 1977; Baran ve Atatür, 1997;

Öktay, 1988). Bu çalışmada da 25 adet tatlı su kaplumbağasının, araştırmacıların bildirdikleri yöntemle yapılan yaş tayinlerinde kaplumbağaların 2-7 yaşlar arasında oldukları ve kıydan daha fazla yakalanma durumuna göre en çok 4-5 yaşlarındaki kaplumbağaların elde edildiği görülmüştür.

Yaş gruplarına göre; 3 yaşındaki 3 adet kaplumbağadan (114, 328, 948 gr) 3 adet *Salmonella*; 4 yaşındaki 1 adet kaplumbağada (1100 gr) 1 adet *Salmonella* ve 6 yaşındaki 2 adet kaplumbağada (1356 ve 1546 gr) ise 2 adet *Salmonella* izole edilmiştir. Bu sonuçlara göre yaş ve ağırlığın *Salmonella* bulaşmasında bir rolünün olmadığı görülmüştür. Yine yaş gruplarına göre erkek ve dişi kaplumbağaların boyu, kabuk uzunluğu, kabuk genişliği ve kabuk yükseklikleri arasında bir ilişkinin olduğu görülmüştür. Buna göre yaş arttıkça kaplumbağalarda boy, kabuk uzunluğu, kabuk genişliği ve kabuk yüksekliklerinin de arttığı belirlenmiştir.

Kuru (2001); Başoğlu ve Baran (1977); Demirsoy (1992); Baran ve Atatür (1997) ve URL4'ye göre tatlı su kaplumbağasının boyunun genelde 20-25 cm kadar olduğunu belirtilmiştir. Halbuki bu çalışmada avlanan kaplumbağaların boyunun 21-35 cm kadar olduğu tespit edilmiştir. Kaplumbağaların alt tür olması ve yaşadıkları ortamdan daha iyi yararlanarak beslenmiş olmasıyla açıklanmıştır.

Lumb ve Jones (1984); *Chelonia mydas* kaplumbağalarının anesteziinde sodium pentobarbital, ketamine hydrochloride ve sodium thiopental'i kullanmıştır. Atatür (1979) ise kaplumbağaların uyutulmasında eter tercih etmiş ve daha iyi sonuç aldığını bildirmiştir. Bu çalışmada da tatlı su kaplumbağalarının narkozunda eter başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Atatür ve Özeti (1975), anestezi ettikleri kaplumbağaların diseksiyonunda el testeresi kullandıklarını bildirmişlerdir. *Mauremys caspica caspica*'nın plastronunu karapakstan ayırmak için ise; ilk kez bu çalışmada elektrikli spiral cihazı kullanılmış, bununlada kısa sürede kesim gerçekleştirilerek operasyon sırasında kaplumbağaların uzun süre narkozda kalmalarını sağlanmıştır.

Tatlı su kapumbağası'ndan *Salmonella*'ların izolasyonunda; Fricker ve diğ (1985); Arda (1995) ve Anonim (1998) de belirtildiği gibi zenginleştirme besiyeri olarak Rappaport Vassiliadis Pepton broth, ayırt edici besiyeri olarak MacConkey agar, *Salmonella*-Shigella agar, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar, Xylose Lysine Tergitol 4 agar ve Tamponlanmış peptonlu su besiyerleri kullanılmıştır.

Salmonella'ların geleneksel metotlarla identifikasyonunda biyokimyasal ve serolojik testlerin yaygın olarak kullanıldığı, ancak klasik testlerle özellikle de kültürler saf olmadığında hatalı sonuçlar alındığı *Salmonella*'ların çabuk çoğalan mikroorganizmalar olsada izole ve identifikasyonunun oldukça zor olduğu ve 5-7 gün gibi bir zaman dilimine ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Mizuno ve diğ., 1983). Oysa bir çok araştırmacının klasik yöntem olan Lassen üçlü

tüp sistemini kullanarak (Bekar, 1997; Bilgehan, 1995; İstanbulluoğlu, 1978; Kalender ve Muz, 1999; Şeker ve Sarıyyüpoğlu, 1998) Enterobacteriaceae familyasındaki bakterileri kolayca izole etmişlerdir. Tatlı su kaplumbağasının da gerçekleştirilen bu çalışmada da yukardaki araştırmacıların kullandıkları Lassen üçlü tüp yönteminde biyokimyasal özelliklerinin diğer biyokimyasal özelliklere göre 3 gün gibi daha kısa sürede belirlenmesinden dolayı başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Keban baraj gölünün koçkale bölgesinde önceki yıllarda balıklar üzerinde yapılan bir çalışmada (Ertaş ve diğ., 1999; Muz ve diğ., 1995) bağırsakta *Salmonella* izole edilmiştir. Ayrıca yine aynı yörede Şeker ve diğ. (2003)'nın tatlı su midyesi (*Unio elongatulus eucirrus*)'ndeki incelemelerinde *Salmonella* spp izole ettiklerini bildirmişlerdir. Farklı zaman dilimlerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda farklı canlılardan *Salmonella* izole edilmesi bu bölgede yaşayan su ürünlerinin bu etkenle kontaminasyonunun devan ettiğini kanıtlamıştır.

Pasman ve diğ. (2002)'nin 10 *Trachemys scripta scripta* kaplumbağası üzerinde yaptıkları bir çalışmada; kaplumbağaların 5'ine, 5×10^5 oranında *Salmonella* oral yolla verilmiş, diğer 5'ine ise intraperitoneal yolla 5×10^5 *Salmonella* enjekte edilmiştir. Bu kaplumbağaların 5'i 26 °C'de, diğer 5'i ise 37 °C bırakılmış ve 35 günden sonra ölen kaplumbağaların kan, karaciğer, dalak ve bağırsak örnekleri ELISA'da bakılmıştır. *Salmonella* kan, karaciğer, dalak ve bağırsakta tespit edilmiştir. Ayrıca Pasman (2003)'nin yaptığı diğer bir araştırmada ise, *Salmonella* enjekte ettiği kaplumbağaların bağırsaklarına elektron mikroskopunda baktığında bu etkenin bağırsak mukozasına ve epiteline yerleştiğini görmüştür. Bu çalışmada incelenen 25 tatlı su kaplumbağasından 2 (%8)'sinin karaciğer ve 4 (%16)'nin de bağırsağından olmak üzere toplam 6 adet *Salmonella* izole edilmesiyle yukardaki araştırmacıların belirttiği gibi iç organlarda bu etkenin bulunabileceği tespit edilmiştir.

Hastalık etkenlerinin izole ve identifikasyonunda Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) tekniğinin kısa sürede ve doğru olarak yapıldığı, saf yada karışık kültürlerde bulunan az sayıdaki mikroorganizmaların bir gün gibi kısa sürede identifiye edildiği, bu nedenle de kültür ve serolojik testlere göre daha avantajlı olduğu ifade edilmiştir (Lin ve Tsen, 1996). PCR tekniği direkt identifikasyon yöntemi değil ise de, amplifikasyondan sonra spesifik primerlerin kullanılması bakteriyi tanımayı kolay hale getirmiştir. Tatlı su kaplumbağasının da yapılan bu araştırmada da *Salmonella*'ların 16S rRNA geninde üretilen cins spesifik 16S FI ve 16S FII primerinin kullanılması ile farklı bakterilerin yanlış pozitif reaksiyon vermesini önlemiştir. Bu tekniğin bütün basamaklarında negatif kontrolle birlikte yürütülmesi ve sonuçta kontaminasyonun meydana gelmemesi, PCR tekniğinin doğru şekilde yürütüldüğünü göstermiştir.

Keban Baraj Gölünün Koçkale yöresinden toplanan midyeler (*Unio elongatulus eucirrus*) kültür yöntemi ile izole edilen 19 adet *Salmonella* suşu, PCR tekniği ile teyit edilmiştir (Şeker ve diğ., 2003). Aynı bölgede gerçekleştirilen bakteriyolojik incelemede de tatlı su kaplumbağalarından izole edilen *Salmonella*'lar PCR tekniği ile de teyit edilerek, yukardaki araştırmaya paralel bir bulgu elde edilmiştir.

Yine daha önce Keban Baraj Gölünün Koçkale bölgesinde yapılan bir çalışmada (Şeker ve diğ., 2003) suda şüpheli *Salmonella*'ya rastlanmamıştır. Aynı bölgede yapılan bu çalışmada da baraj gölü ve Haringet çayından *Salmonella*'ların izole ve identifikasyonu yapılmıştır. Bununla da aynı bölge sularında şüpheli *Salmonella* olmadığı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak; Haringet çayı ve bu çayın döküldüğü Keban Baraj Gölü'nden avlanan tatlı su kaplumbağaları'nın, insan ve diğer canlılar için patojen olan, çevresel kontaminasyonlarla ciddi enfeksiyonlara yol açan *Salmonella*'ları taşıdığı kanıtlanmıştır. Ancak *Salmonella*'lı olan bu 6 tatlı su kaplumbağasının da her hangi bir semptomla rastlanmamış olması da bu canlıların etkeni yalnızca taşıdığını göstermiştir. Bu nedenle bu bölgede balıkçılık yapan insanların ağlara takılan tatlı su kaplumbağalarına ve süs kaplumbağası satan akvaryumcular, kaplumbağaların *Salmonella*'yı taşıyabileceğinden dolayı bu canlıya dokunurken daha dikkatli olunması, eldiven kullanmaları ve steril çalışması önerilir.

KAYNAKLAR

- Aabo, S., Andersen, J.K., Olsen, J.E., 1995. Research Note: Detection of *Salmonella* in Minced Meat by the Polymerase Chain Reaction Method, Letters in Applied Microbiology, 21, 180 – 182.
- Aliyev, T., 1997. Azerbaycan'da Hazar Kaplumbağası (*Mauremys caspica caspica*) ve Nehir Kaplumbağası (*Emys orbicularis*) Dağılışı ve Ekolojisi. Azerbaycan Respublukası İlimler Akademisinin Zooloji Enstitüsü, Bakü, 830-832.
- Allard, A., Girones, R., Juto, P., Wadell, G., 1990. Polymerase Chain Reaction for Detection of Adenoviruses in Stool Samples, Journal of Clinical Microbiology, 28, 2659 - 2667.
- Anonim., 1984. Salmonellosis Control. The Role of Animal and Product Hygiene. WHO Expert Committee Technical Report Series World Health Organization, Geneva. 774p.
- Anonim., 1988. Su Kirliliği ve Kontrolü Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete, Sayı: 19919.
- Anonim., 1991. Manuel of Recommended Diagnostic Techniques and Requirements for Biological Products. Vol. III. Office International Des Epizooties, Rue de Prony, Paris.
- Anonim., 1994. Keban Baraj Gölü Limnolojik Raporu. Bayındırlık ve İskan Bakanlığı Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü. IX. Bölge Müdürlüğü. Su Ürünleri Başmühendisliği. Elazığ.
- Anonim., 1998. Gıda Mikrobiyolojisi, MERCK. 1. Baskı, Orkim Ltd.Şti., Ankara, 69s.
- Arda, M., 1995. Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar Ankara, No:3.
- Arda, M., 1997. Özel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Medisan Yayın Serisi Ankara, No: 26.
- Arda, M., Mimbay, A., Aydın, N., 1992. Özel Mikrobiyoloji. Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik enfeksiyonlar. Atatürk Üniversitesi Erzurum. Yayınları No: 741, 95-260s.
- Arda, M., Mimbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., 1994. Kanatlı Hayvan Hastalıkları. Medisan Yayın Serisi Ankara, No: 14.
- Arı, Ş., 1999. DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, ed.: Temizkan, G, Arda, M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM); Yayın No: 1, İstanbul, 57-68s.
- Atatürk, M., 1979. Omurgalılar. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Monografiler Serisi, İzmir, 75s.
- Atatürk, M., Özeti, N., 1975. Omurgalıların Disseksiyon Kılavuzu. Ege Üniversitesin Fen Fakültesi, kitaplar serisi. No: 70. İzmir. 129s.

- Ateş, A., 1994. Uluova, Baskil, Sivrice ve Harput Yörelerinde Yaşayan Kara Kaplumbağasının (*Testudo graeca*) Bazı Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 24s.
- Bailey, J.S., 1998. Detection of *Salmonella* Cells within 24 to 26 Hours in Poultry Samples with the Polymerase Chain Reaction BAX System. Journal of Food Protection, 61, 792–795.
- Baran, İ., Atatür, M., 1997. Türkiye Herpatofaunası. Çevre Bakanlığı Yayınları İzmir, 214s.
- Barrow, P.A., 1993. *Salmonella* Control, Past, Present and Future . Avian Pathology, 22, 651–99.
- Başoğlu, M., Baran, İ., 1977. Türkiye Sürüngeleleri Kısım I. Kaplumbağa ve Kertenkeleler. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kitaplar Serisi, No: 76, İzmir 272s.
- Bej, A.K., Mahbubani M.H., Atlas, R.M., 1991. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Method and Their Applications. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 26, 301-334.
- Bekar, M., 1997. *Salmonella*'ların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri Etlik Vet. Kont. ve Araşt. Enst., Ankara, 61s.
- Bernoth, E.M., 1990. Risiken Beim Umgang mit Fischen Durch Bewegliche Aeromonaden. Ärztlich Laboratorium, 36, 213-217.
- Bilgehan, H., 1995. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, Şafak Matbaacılık , II. Baskı, Ankara, 364-451s.
- Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları (Uygulama Konuları İle) Barış Yayınları Fakülte Kitabevi 10. baskı İzmir, 706s.
- Bocek, A.J., Brady Y.J., Rogers W.A., 1992. Exposure of Silver Carp, *Hypophthalmichthys*, to *Salmonella typhimurium*. Aquaculture; 103, 9-16.
- Carter, G.R., 1984. Enterobacteriaceae, Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, U.S.A., pp: 93-103.
- Cohen, N.D., McGruder, E.D., Neigbergs, H.L., Behle, R.W., Wallis, D.E., Hargis, B.M., 1994. Detection of *Salmonella enteritidis* in Faeces from Poultry using Booster Polymerase Chain Reaction and Oligonucleotide Primers Specific for all Members of the Genus *Salmonella*. Poultry Science; 73, 354-357.
- Coote, U.G., 1990. Amplification of Nucleic Acids by the Polymerase Chain Reaction. Article, 57-59.

- Çağlayan, S.H., 1991. Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Nükleik Asitleri Çoğaltma Tekniği ve Uygulama Alanları. *Turkish Journal of Biology*, 15, 9-21.
- Çetinkaya, B., 1998. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temel Prensipler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 12, 149-156.
- Demirsoy, A., 1992. Yaşamın Temel Kuralları Omurgalı Hayvanlar / Amniyota (Sürüngenler, Kuşlar ve Memeliler) Cilt-3/Kısım-2. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ankara, 942s.
- Erlich, H.A., Gelfand D., Sninsky J.J., 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252, 1643-1651.
- Ertaş, H.B., Çetinkaya, B., Şeker E., Muz, A., Sarıeyyüpoğlu, M., 1999. Elazığ ve Çevresindeki Çeşitli Su Kaynaklarından Temin Edilen Balıklardan *Salmonella* İzolasyonu ve PZR ile Teyit Edilmesi. Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Dergisi, 13, 15-20.
- Fluit, A. C., Widjoatmodjo, M.N., Box, A.T., Torensma, R., Verhoef, J., 1985. Rapid Detection of Salmonella in Poutry with the Magnetic Immunopolymerase Chain Reaction Assay, *Applied Environmental Microbiology*, 29, 1342-1346.
- Fricker, C.R., Quail, E., McGibbon, L., Girdwood, R.W.A., 1985. An Evaluation of Commercially Available Dehydrated Rappaport Vassiliadis Medium For the Isolation of *Salmonella* from Poultry, *J. Hyg. Camb.*, 95: 337-344.
- Guthrie, R.K., 1992. *Salmonella* CRC Press Inc. London.
- Güven, S., Sarısayın, F., Nadas, Ü.G., Demirözül, K., 1983. Kanatlı Hayvanların İnfeksiyon Hastalıkları ve Laboratuvar Teşhis Yöntemleri. Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü. Milli Eğitim Basımevi İstanbul, Yayın no: 7.
- İstanbuluoğlu, E., 1978. Septicaemia Neonatorumlu Buzağılardan İzole Edilen *Escherichia coli* Suslarının Biyokimyasal, Serolojik, Enterotoksijenik, Antibiyotiklerle Duyarlılık Bulaşıcı Tip Plasmid (R-Faktör) Taşıma Özellikleri ile Enfekte ve Normal Buzağılardan Elde Edilen Serum Örneklerinin Immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) Miktarları Üzerinde İncelemeler. Ankara Üniversitesi Doçentlik Tezi.
- İzgür, M., 1996. İmmunoloji. Antijen ve Antikor Reaksiyonları, Bölüm 41, 386-388.
- Jehl-Pietri, C., Hugues, B., Celoince, R., 1990. Viral and Bacterial Contamination of Mussels (*Mytilus edulis*) Exposed in an Unpolluted Marine Environment. *Lett.- Appl.- Microbiol.*, Vol. 11, No: 3, 126-129.
- Kalender, H., Muz, A., 1999. Elazığ Bölgesindeki Tavuklardan İzole Edilen *Salmonella* Türlerinin Tiplendirilmesi. *Tr. J.of Veterinary and Animal Sciences TÜBİTAK*. Sayı, 2, 297-303.

- Karagül, E., Dündar, V., Özyürek, S., Akgül, A., Selçuk, S., 1992. Haydarpaşa Numune Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine Başvuran Hastalarda *Salmonella enteritidis*'in Neden Olduğu Gastroenterit Olguları. *İnfeksiyon Dergisi*, 6,3, 197-198.
- Kırıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Gedikoğlu, S., Göral, G., Helvac, S., 1993. Klinik Mikrobiyoloji. Onur Yayınları, Bursa, 436s.
- Kuru, M., 2001. Omurgalı Hayvanlar, Atatürk Üniversitesi Yayınları Erzurum. 841s.
- Lagatolla, C., Dolzani, L., Tonin, E., Lavenia, A., Michele, M.D., Tommasini, T., Monti – Bragadin, C., 1996. PZR Ribotyping for Characterizing *Salmonella* Isolates of Different Serotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 34 (10) : 2440 – 2443.
- Le Minör, L. 1984. Genus III *Salmonella* Ed. N:R: Kring and J:G: Holt in “Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology” Vol.I Williams and Wilkins Batimore, 427-458.
- Lin, C.K., and Tsen H.Y., 1996. Use of two 16S DNA Targeted Oligonucleotides as PZR Primers for the Specific Detection of *Salmonella* in Foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 80 : 659-666.
- Love, T.D. and Minkler, B.H., 1972. Studies of *Salmonella* Potential in Catfish Feeds. *Commercial Fisheries review*, 34: 5-7.
- Lumb, W.V and Jones., E.W., 1984. Veterinary Anesthesia, Lea & Febiger. Philadelphia. 693p.
- Mahon, J. And Lax, A.J., 1993. A Quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Detection in Avian Faeces of Salmonellas Carrying the spvR Gene. *Epidemiol. Infect*, 445-464.
- Martinez, E., Morinigo, M.A., Cornax, R., Egea, A.F., Borrego, J., 1991. Relationship between Classical Indicators and Several Pathogenic Microorganism Involved in Shellfish-Borne Diseases. *J. Food, Protec*, 54: 711-717.
- Marx, J.L., 1988. Multiplying Genes by Leaps and Bounds, *Science*, Vol. 240, 1408-1410.
- May, C.W., 1980. Mikrobial Diseases Notes Reports, Summaries, Trends, William Kaufmann, Inc. Los. Altos, California. 322s.
- Meçgel, E., 1992. Balık ve Midyelerde *Salmonella*, *Vibrio* ve *Aeromonas* Cinsi Bakteriler (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Merchant, I.A., Packer, R.A., 1967. The Genus *Salmonella*, *Veterinary Bacteriology and Virology*, The Iowa State university Press, U.S.A., 286-307.
- Miller, R.E., 1998. AZA Policy For Animal Contanct With The General Public Adopted By The AZA Board Of Director 8/97.

- Mizuno, T., Chou, M.Y., Inouye, M., 1983, A Comparative Study on Genes of Three Porins of the Escherichia coli Outer Membrane: DNA Sequence of the Osmoregulated Gene. J. Biol. Chem. , 258, 6932-6940.
- Morse, E.V., Duncan, M.A. and Myhrom, E.P., 1978a. *Salmonella* Serotypes Isolated From the Aquatic Environment (Wabash river, Indiana, 1973-1976). Am. J. Vet. Res.; 39: 717-719.
- Morse, E.V., Greenwood, D.E., Meyers, E.P., Anderson, V.L. and Duncan, M.A., 1978b. Experimental *Salmonella* Infections in *Carassius auratus* (Goldfish). J. Environ. Sci. Health; 13: 325-335.
- Mullis, K. B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Sci. Am. 262 (4) : 56 – 65.
- Muz, A., Sarıeyyüpoğlu, M., Ertaş, H.B., 1995. Keban Baraj Gölünden Yakalanan Bazı Balıkların Çeşitli Organların Aerobik ve Mikroaerofilik Bakter Yönünde İncelenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 9,212-220.
- Neziha, T., 1999. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. Armoni Matbaacılık Ltd.Şti. Ankara, 59-91s.
- Nielsen, T., Holmstrom, K. And Molin, S., 1997. Visualization of Specific Gene Expression in Individual *Salmonella typhimurium* Cells by In Situ PZR. Appl.- and Environ. Microbiol, 63 (11), 4196 – 4203.
- Öktay, M., 1988. Omurgalı Hayvanların Karşılaştırmalı Anatomisi. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi. İstanbul, 382s.
- Özek, Ö., Çetin, E.T., Anđ, Ö., Güvener, Z., 1970. İstanbul’ da Balık ve Midyelerde *Salmonella* Araştırması. Haseki Tıp Bül. 8:229.
- Özek, Ö., Çetin, E.T., Anđ, Ö., Töreci, K., 1965. Kaplumbağaların *Salmonella* Epidemiyolojisindeki Önemi. İstanbul Üniv. Tıp fak. Mec. 28:1.
- Özsan, K., Aksoycan, N., Ekmen, H., Akman, M., 1968. Sağlık Hizmetinde Mikrobiyoloji II Özel Mikrobiyoloji Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları Sayı 18, Ankara, 1044s.
- Pasmans, F., De Herdt, P., Dewult, J. and Haesebrouck, F., 2002. Pathogenesis of Infections With *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Muenchen* in the *Trachemys scripta scripta*. Developmental and Comparative İmmulogy, 26, 295-304s.
- Pasmans, F., Van Immerseel, F., Van Den Broeck, W., Bottreau, E., Velge, P., Ducatelle, R., and Haesebrouck, F., 2003. interaction of *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar muenchen* with intestinal explants of the turtle *Trachemys scripta scripta*. J. Comp. Path. Vol. 128, 119 – 126.

- Perssing, D.H., 1991. Polymerase Chain Reaction : Trenches to Benches. J, Clin. Microbiol. 29, 1281-1285.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter, G.R., 1994. Enterobacteriaceae, Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe Publ., Spain, 209-218.
- Quirke, P., 1992. Molecular Biology and Infections of the Gut. Gut, 33: 1441-1443.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science; 239, 487-491.
- Sanderson, J.D., Hermon-Taylor, J., 1992, Mycobacterial Diseases of Gut: Some Impact from Molecular Biology Gut, 33, 145-147.
- Sarıeyüpoğlu, M., 1987. *Salmonella* Potential in Aquarium Fish Feeds. Fırat Üniversitesi Dergisi; 2(2): 59-62.
- Sarımehmetoğlu, B., Pamukçu, T., Küplülü, O., 1995. Kızılırmak Havzası Yüzey Sularında Koliform ve Fekal Koliform Grubu Mikroorganizmalar. Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences. Cilt. 20, Sayı, 4, 257-260.
- Sarkar, G. and Sommer, S., 1990. Shedding Light on PZR Contamination, Nature 343, 27.
- Southey, B.W., Sonstegard, R.A. and McDermott, L.A., 1972, Enteric Bacteria in Carp (*Cyprinus carpio*) and white Suckers (*Catostoma commersoni*). J. Fish. Res. Board Can.; 33: 1401-1403.
- Steffan, R.J., Atlas, R.M., 1991. Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology. Annu. Rev. Microbiol, 45, 137-161.
- Şeker, E., Sarıeyüpoğlu, M., 1998. Keban Baraj Gölünün Koçkale Bölgesinden Toplanan Tatl Su Midyesinde (*Unio elongatulus eucirrus*, Bourguignat, 1860) Mide ve Bağırsakların Fekal Koliformlar Yönünden İncelenmesi. Fırat Üniversitesi Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi, 10(1), 45-53.
- Şeker, E., Sarıeyüpoğlu, M., Çetinkaya., 2003. Tatl Su Midyesinden (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) İzole Edilen *Salmonella*'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile İdentifikasyonu. Turk. J. Vet. Sci. 27, 201-206
- Taylor, G.R., 1993. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Automation. In PZR: A Practical Approach, Eds: McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R. Oxford University Press, Oxford, 1-14.
- Taylor, J., 1968. *Salmonella* in Wild Animals., Symp. Zool. Soc. London; 24: 51-73.
- Töreci, K., Anç, Ö., 1989. Ülkemizde Yeterince İncelenmeyen Enterik Patojenler. Anadolu Üniversitesi Yayını, Eskişehir.

- Töreci, K., Anđ, Ö., 1991. Türkiye’de saptanmış olan *Salmonella* Serovarları ve *Salmonelloz*’ların Genel Deđerlendirmesi. Türk Mikrobiolođisi Cem. Dergisi, 21, 1-18.
- Twiddy, D.R., 1995. Antibiotic- Resistant Human Pathogens in Integrated Fish Farms. Asean Food Journal. 10,1: 22-29.
- Uğurlu, S., 2000. A’dan Z’ye Su ve Kara Kaplumbağaları. Erim Ofset Yayını. İstanbul 60s.
- URL1. http://www.hsus.org/wildlife/a_closer_look_at_wildlife/turtles_and_tortoises/
- URL2. <http://www.mikrobiyoloji.org/>
- URL3. http://www.oneocean.org/ambassadors/track_a_turtle/biology/
- URL4. http://bornova.ege.edu.tr/~bgocmen/hc_kaplumbagalar.html
- URL5. <http://www.exoticpetvet.net/reptile/turtle.html>
- Ünat, E.K., 1983. Genel Tıp Mikrobiyolođisi ve İnfeksiyon Hastalıkları Bilimi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi Yayınları3. Baskı. İstanbul, 555s.
- Ünlüttürk, A., 1984. İzmir Balık Halinde Parekende Satılan Midyelerin Bakteriyolojik Niteliđi Üzerinde Bir Araştırma. E.Ü. Mühendislik Fak. Dergisi, Cilt: 2, Sayı: 2, 45-51.
- Vanden Heever, D.J. and Frey, B.J., 1994. Microbiological Quality of the Catfish (*Clarias gariepinus*) Kept in Treated Waste Water and Natural Dam Water, Water S.A.; 20,2: 113-118.
- Virella, G., 1997. Microbiology Infectious Disease. Çeviri Yazarları; Serter, D., Dereli, D. Ve Ertem, E. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri. Tayf Ofset, Savaş Ciltevi, İstanbul, 93, 275.
- Watson, J.D., Witkowski, J., Gilman, M., Zoller, M., 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books. W.H. Freeman and Co. New. York., 79-98.
- White, J.T., Arnheim, N. and Erlich, H.A., 1989. The Polymerase Chain Reaction.. Technical Focus, Vol. 5, No: 6, 185-189.
- Widjoatmodjo, M.N. , Fluit, A.C. Torensma, R. Geert P.H.T., 1992. Verdonk and Verhoef, J. The Magnetic Immuno Polymerase Chain Reaction Assay for direct detection of *Sallionellae* in fecal samples J. Clin. Microbiol., 1342 -1346.
- Woodward, M.J. and Kirwan, S. E., 1996. Detection of *Salmonella enteritidis* in Eggs, by the Polymerase Chain Reaction Vet. Rec., 138 : 411-413.
- Wyatt, L.E., Nickolson, R. and Vanderzant, C., 1979. Occurrence and Control of *Salmonella* in Fresh Water Catfish. J. Food Sci.; 44: 1067-1073.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya ili Doğanşehir ilçesine bağlı Kurucaova kasabası'nda 06.11.1979 tarihinde doğdum. İlköğrenimimi burada, orta öğrenimimi ise Sürğü kasabasında tamamladım. Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ne 1998 yılında kayıt yaptırdım ve 2002 yılında mezun oldum. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su ürünleri yetiştiriciliği Anabilim Dalı'nda 2003 yılında Yüksek Lisans yapmaya başladım.

Yüksek Lisans öğrencisi

Mikail ÖZCAN

