

## ARAŞTIRMALAR

# ANKARA İL MERKEZİNDE BULUNAN ASKERİ BİRLİKLERDEKİ KUYU SULARININ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON SİSTEMİ İLE MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERİNİN YAPILMASI

Dr. Metin HASDE (\*), Dr. Recai OĞUR (\*\*), Dr. Ömer Faruk TEKBAŞ (\*\*)

Gülhane Tıp Dergisi 44 (4) : 373 - 377 (2002)

## ÖZET

Bu çalışmada, son 10 yıldır suların mikrobiyolojik analizinde kullanılmaya başlanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemlerinden yararlanılarak geliştirilen yeni bir Multipleks (çoklu) PZR yöntemiyle Ankara Garnizonu içerisinde bulunan askeri birliklere ait kuyu sularının mikrobiyolojik analizi gerçekleştirilmiştir.

Ankara Garnizonu içerisinde bulunan 4 ayrı birlikten 28 ayrı kuyu suyu örneği alınmış ve su örneklerinde, Multipleks PZR tekniği kullanılarak termotoleran (toplam) koliform, *Escherichia coli*, *Shigella* ve *Salmonella* bakterileri araştırılmıştır.

Analizi gerçekleştirilen kuyu suyu numunelerinin %50'sinde *E.coli* saptanmıştır. Su örneklerinin hiç birinde *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerine rastlanmamıştır. Standart bakteriyolojik su analiz yöntemlerinin 48 saatte sonuçlanmasına ve tek bir mikroorganizma grubunun araştırılmasına karşın, çalışmada kullanılan Multipleks PZR yöntemiyle analiz süresi ortalama dört saate inmiş ve bir analizde 4 mikroorganizma grubu incelenebilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kuyu Suyu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PZR, Su analizi, Su Mikrobiyolojisi.

## SUMMARY

### **Microbiologic Analysis of the Spring Water Sources at the Military Unit in Ankara With Polymerase Chain Reaction Method**

In the present study, well water sources of military troops in Ankara Garrison were analyzed with a new Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) method which is developed by using current PCR methods used in microbiologic analyses of water.

(\*) GATA Halk Sağlığı AD

(\*\*) GATA Çevre Sağlığı BD

Reprint Request: Dr. Metin HASDE, Halk Sağlığı AD  
06018 Etlik /ANKARA

Kabul Tarihi: 4.10.2002

Bu çalışma daha önce herhangi bir yerde yayınlanmamış veya yayınlanmak üzere gönderilmemiştir.

28 spring water samples were collected from four different military units in Ankara Garrison. We used Multiplex PCR method for thermotolerant (total) coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella* analysis in water samples.

We found *E.coli* in samples taken from well waters in the rate of 50%. We did not find *Salmonella* and *Shigella* in water samples. Standard bacteriological methods for the examination of water generally take about 48 hours and generally only one type of bacteria is investigated, but the whole procedure in this study for four bacteria took about 4 hours. For these reasons, the new Multiplex PCR method presented in this study, will be very useful especially in the situations like outbreak, flood and earthquake, which the investigation of the water sources is urgent

**Key Words:** Well Water, Multiplex Polymerase Chain Reaction, PCR, Water Analysis, Water Microbiology.

## GİRİŞ

İçme ve kullanma sularından kaynaklanabilecek en önemli sağlık sorunlarının başında sularda bulunan hastalık yapıcı mikroorganizmalar aracılığı ile geniş halk kitlelerinde salgın hastalıklar meydana gelmesidir (1-4). Bu nedenle içme ve kullanma sularının mikrobiyolojik kontrolü halk sağlığının ve çevre mikrobiyolojisinin en önemli faaliyet alanlarından birisidir.

Özellikle *Escherichia coli* bakterisinin tanımlanmasından sonraki yıllarda sularda bu mikroorganizmanın varlığının saptanması, diğer mikroorganizmaların da olabileceğini gündeme getirmiş ve 1910'lu yıllardan itibaren, günümüzde de bir takım değişikliklerle kullanılmaya devam edilen "Çoklüplü Analiz Yöntemi (veya Most Probable Number)" kullanılmaya başlanmıştır (5, 6). Ancak bu analiz yönteminin birtakım kısıtlılıkları ve yanlış negatif sonuç verebilme olasılığının bulunmasının anlaşılması üzerine, 1950'li yıllarda "Membran Filtrasyon Yöntemi" olarak adlandırılan yeni bir analiz yöntemi geliştirilmiştir (5, 6).

Zaman içerisinde suların mikrobiyolojik kontrolüne yönelik çok sayıda analiz yöntemi geliştirilmiş olmakla birlikte, (a) analiz yöntemlerinde kul-

lanılan cihaz veya malzemelerin hemen her mikroorganizma için farklı olması, (b) mevcut analiz yöntemlerinin genelde mikroorganizmaları kültür ortamında üretmeye yönelik olmalarından dolayı uzun zamanda sonuç vermesi ve (c) 1990'lı yıllardan itibaren indikatör mikroorganizma olarak adlandırılan ve suyun mikrobiyolojik kalitesini ortaya koyduğu düşünülen mikroorganizmalar dışında kalan çok sayıda mikroorganizmanın da içme sularında bulunabileceğinin saptanması; güvenilir ve hızlı analiz yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır (7).

İn vitro nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin en sık kullanılanlarından olan Polimeraz Zincir reaksiyonu (PZR) tekniği 1990'lı yılların başında su ve çevre mikrobiyolojisinin gündemine girmiş ve özellikle kültür ortamında üretilmesi ve izolasyonu zor mikroorganizmaların saptanması için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda mikroorganizmalar için genel olarak farklı prosedürlerin kullanılması, klasik yöntemlerde yaşanan bazı sorunların PZR tekniği kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde de devam etmesine neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda; içme sularında bulunabilecek birden fazla mikroorganizmayı saptamaya yönelik yeni bir Multipleks PZR yöntemi geliştirmeyi amaçladık. Multipleks PZR yöntemi, 1988 yılında geliştirilmesine ve yaygın olarak kullanılmasına rağmen, çalışmamızda incelenen mikroorganizmalar daha önce her hangi bir çalışmada birlikte incelenmemiştir, bu yönüyle çalışmamız; termotoleran koliform (toplam koliform), Escherichia coli, Shigella ve Salmonella mikroorganizmalarının aynı anda incelendiği ilk Multipleks PZR çalışmasıdır.

PZR tekniğinin mikrobiyolojik su analizinde kullanılabilirliği ve güvenilirliği konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu konu çalışmamızın ilgi alanı dışındadır (8 - 18).

## GEREÇ - YÖNTEM

### Mikroorganizma Örnekleri

E. coli ve toplam koliform örnekleri Halk Sağlığı AD Bşk.lığı Su Analiz Laboratuvarından, Salmonella ve Shigella örnekleri Mikrobiyoloji AD Bşk.lığından temin edilmiştir.

### Kullanılan Primerler

Kullanılan primerler, baz dizilimleri, parça büyüklükleri Tablo 1.de gösterilmiştir. Kullanılan primerlerin tümü Tablo 1.de belirtilen kaynaklardan alınarak Operon Technologies Inc. (USA) firmasına sentezletirilmiştir.

### Su Örneklerinin Toplanması ve Hazırlanması

Ankara Garnizonu'nda bulunan Askeri birliklere ait toplam 28 adet kuyu ve artezyen sularından, Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen yöntemlerle (3, 4), ikişer adet 100'er ml su örneği alındı. Alınan örnekler iki saat içerisinde Halk Sağlığı AD PZR Laboratuvarına ulaştırıldı ve önce basit filtreden geçirilerek kaba partiküller uzaklaştırıldı, daha sonra 45 nm naylon mikrofiltrelerden geçirilerek, içerisinde bulunabilecek mikroorganizmalar filtreye aktarıldı. Bu filtreler 10 ml.lik steril tüplere aktarılarak üzerlerine 1 ml distile su (Eczacılık Bilimleri Merkezi, GATA) eklendi. Tüpler 30'ar saniye vorteks cihazı ile çalkalandıktan sonra mikropipet (Genex, İngiltere) aracılığı ile tüplerde bulunan sular 1.5 ml.lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Bu aşamada pozitif kontrol amacıyla kullanılacak bakteri stokları distile su ile sulandırılarak hacimleri 1 mL.ye tamamlandı. Tüpler işlem sıraları gelene kadar soğutucuda (+4°C'de) bekletildi.

### DNA Ekstraksiyonu

Bakterilerin DNA'sını izole etmek için "dondurma - çözündürme" yöntemi kullanıldı (9, 15). Tüm mikrosantrifüj tüpleri beş dakika derin dondurucuda (-20°C'de) bekletildi, hemen arkasından on dakika

**TABLO - I**  
**Multipleks PZR İşleminde Kullanılan Primerler**

Primer	Baz Dizilimi	Parça büyüklüğü	Kaynak
ZL-1675	5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3' (24mer)	326 bp	8, 9, 10
ZR-2025	5'-GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA-3' (24mer)		
ual 754	5'-AAAACGGCAAGAAAAGCAG-3'(20mer)	147 bp	8, 9, 10
ual 900	5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3'(21mer)		
SalA 1144	5'-ACGGTTGTTTAGCCTGATAC-3'(20mer)	526 bp	12
SalB 1650	5'-CTGGATGAGATGGAAGAATG-3'(20mer)		
ShigA	5'-TTGACCGCCTTTCCGATAC-3'(19mer)	408 bp	14
ShigB	5'-ACTCCCGACACGCCATAGA-3'(19mer)		

süreyle sıcak su banyosunda (+60°C) bekletildi, bu sırada tüplerin kapaklarının gevşeyerek su almalarını engellemek için tüpler üstten sıkıştırılabilen özel haznelere konuldu. Bu dondurma - çözündürme işlemi beş kez tekrarlandı. Dondurma - çözündürme işlemi sona erdikten sonra mikrosantrifüj tüpleri 7500 rpm'de ve +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek (Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hermle Labortechnik, Almanya)), nükleik asit dışındaki partiküller ve PZR işlemini inhibe edebilecek maddeler çöktürüldü. Üstte kalan sıvı daha sonraki PZR aşamasında DNA kaynağı olarak kullanıldı (8 - 10).

#### Multipleks PZR İşlemi

PZR işlemine geçmeden hemen önce PZR karışım sıvısı hazırlandı. Bu karışım, içerisinde 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), her bir primerden 0.5 mM ve 2.5 unite Taq DNA polimeraz (Promega Corporation, ABD) olacak şekilde hazırlandı, su örneklerinden hazırlanan DNA kaynağı ile birlikte karışımın son hacmi 50 mL oldu. Bu karışım 0.5 mL'lik PZR tüpleri içerisinde hazırlandı (8 - 10, 12, 13). Kullanılan solüsyonlar Sigma, ABD firmasından temin edildi.

Multipleks PZR işlemi DNA thermal cycler (Corbett Research PC-960, Avustralya) kullanılarak gerçekleştirildi. PZR şartları Tablo 2.de gösterilmiştir.

**TABLO - II**  
**Multipleks PZR Şartları**

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	25 sn	
Bağlanma	55	30 sn	
Uzatma	72	55 sn	
Son uzatma	72	10 dk	1

Son uzatma işleminden sonra tüpler, görüntülenme işlemine kadar +4°C'de bekletildi.

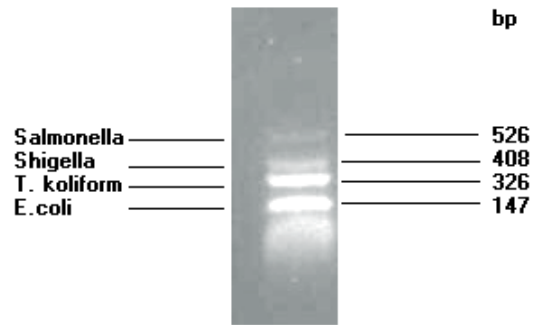
#### PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PZR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla mini jel elektroforez kullanıldı. 20 mL 0.5x TBE solüsyonunun içerisine 0.4 gr agaroz konularak %2'lik agaroz jel hazırlandı. Bu karışım 100°C'ye kadar ısıtılarak içerisine 5 mL ethidium bromid ilave edildi ve jel haznesine dökülerek 15 dakika soğuması ve katılaşması için beklendi. İçerisinde 0.5x TBE bulunan yatay mini jel elektroforeze (Sigma, ABD) yerleştirilen agaroz jeldeki kuyucuklara, jel yükleme tamponu ile karıştırılan PZR ürünleri yüklendi. Sabit voltaj (120 V) altında 30 dakika süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Her analiz grubu için pozitif

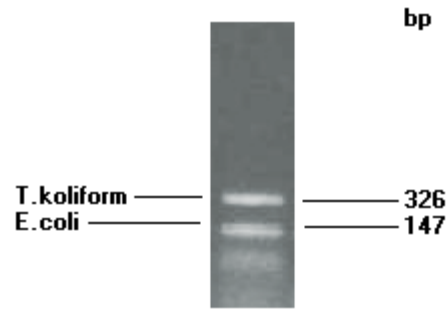
ve negatif kontroller kullanıldı. Elektroforez işlemi sonunda, jel çıkarılarak UV transilüminatör (Alpha Innotech Corporation, TMW-20, ABD) aracılığı ile görüntülendi ve değerlendirildi.

#### BULGULAR

Analiz öncesi gerçekleştirdiğimiz ön çalışmalarında kullandığımız primerler arasında her hangi bir çapraz reaksiyona rastlanmadı ve incelenen mikroorganizmalar kendilerine özgü bir bant oluşturdular (Şekil 1, 2).



Şekil - 1: Dörtlü Multipleks PZR



Şekil - 2: Termotoleran Koliform ve E.coli

Dörtlü Multipleks PZR yönteminin kullanıldığı bakteriyolojik analizlerde, termotoleran koliform için 326, E.coli için 147, Salmonella için 526 ve Shigella için 408 bp'lik bantlar meydana geldi.

Ön çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan bakteri örnekleri teker teker ve birlikte kullanıldıklarında oluşan bantlarda bir değişiklik olmadı ve yine kendilerine özgü bantlar meydana getirdiler.

Analizi gerçekleştirilen 28 su örneğinin 14 tanesinde (%50) termotoleran koliform bakteri saptandı. Termotoleran koliform bakterilerin tamamı E.coli idi.

Çalışmamız sırasında yapılan su analizleri sonucunda her hangi bir su örneğinde Salmonella ve Shigella bakterileri tespit edilmedi.

Analiz yapılan su örneklerinde tespit edilen E.coli'lerin su örneklerine göre dağılımı incelendiğinde;

Zırhlı Tümen K.lığındaki bulunan kuyu sularının %83.4'ünde E. coli saptanmıştır. KHO ve İsth. Okulunda bulunan suların %60'ında E. coli varken MEBS K.lığındaki kuyuların %42.9'unda E. Coli saptanmıştır. Ankara İl Merkezindeki Askeri Birliklerin kullandığı kuyu sularının tamamı değerlendirildiğinde, bunların yarısının (%50.0) içilemez - kullanılamaz özelliğe sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 3 ve Tablo 4).

**TABLO - III**  
**Kuyu Sularının Alındıkları Yerlere Göre Dağılımları**

	Sayı	%
KHO ve İsth. Ok. K.lığı	10	35.7
MEBS Ok. K.lığı	7	25.0
Zırhlı. Tümen. K.lığı	6	21.4
GATA K.lığı	5	17.7
Toplam	28	100

**TABLO - IV**  
**Kuyu Sularının Analiz Sonuçlarına Göre Dağılımı**

	Sayı	Bakteri (E.coli)		TOPLAM
		Tespit edilmedi	Tespit edildi	
KHO ve İsth. Ok. K.lığı	10	4	6	10
	%	%40	%60	%100
MEBS. Ok. K.lığı	7	4	3	7
	%	%57.1	%42.9	%100
Zırhlı. Tümen. K.lığı	6	1	5	6
	%	%16.6	%83.4	%100
GATA K.lığı	5	5	-	5
	%	%100	%0	%100
TOPLAM	28	14	14	28
	%	%50	%50	%100

Tüm analiz işlemi su örnekleri laboratuvara getirildikten sonra 4 saat içerisinde tamamlanmıştır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Analizi gerçekleştirilen kuyu sularından %50'sinde mikroorganizma tespit edilmiş ve ancak dezenfeksiyon işleminden sonra içme suyu olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Yağışların arttığı, kar

ve buzların eridiği Mayıs - Haziran aylarında yer altı ve yer üstü su kaynaklarının yoğun olarak kirlenmekte ve bu dönemlerde su arıtma ve dezenfeksiyon işlemleri daha da önem kazanmaktadır (1, 7, 19). Bu nedenle özellikle arıtma işleminin yetersiz olduğu yerlerde sulara ilave edilen klor düzeyinin artırılması gerekmektedir (3, 4).

Araştırmamızda kullandığımız primerler, başka araştırmacılar tarafından denenmiş ve kullanılabilirliği gösterilmiştir (8 - 18). Ancak bu primerlerin tamamı çoklu (multipleks) olarak aynı çalışmada ilk kez tarafımızdan kullanılmış ve aralarında herhangi bir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir. Ön çalışmalarımızda pozitif kontrol olarak kullandığımız standart bakteriyolojik suşların hepsi kendine özgü bir bant meydana getirmiştir. Meydana gelen bu bantların büyüklükleri daha önceki çalışmalarla uyumludur (8 - 10, 12, 14, 18).

Termotoleran koliform (eski ifadesiyle toplam koliform) grubu bakteriler için kullandığımız primerler 150'ye yakın koliform bakteride denenmiş ve kullanılabilirliği gösterilmiştir (8 - 10). E.coli bakterisi için kullandığımız primerler, patojen olmayan E.coli'lerin yanı sıra 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG (-) negatif olarak adlandırılan ve hastalık meydana getiren enteropatogenik, enterohemorajik ve enterotoksijenik E.coli'leri de saptayabilmektedir (9). Salmonella ve Shigella bakterileri için seçtiğimiz primerler, 26 Salmonella ve 3 Shigella suşunda denenmiştir (14, 18).

Mikroorganizmaların tek tek incelendiği durumlarda PZR yöntemi pahalı bir yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, multipleks PZR yönteminin maliyeti çok daha düşüktür.

Analiz işlemi diğer standart yöntemlerle gerçekleştirilseydi en az 48 saat sürecekti (6). Oysa Multipleks PZR yöntemi ile analiz işleminin tamamı 4 saat içerisinde tamamlanmış ve 4 tip mikroorganizmanın aynı anda analiz edilebilmesi mümkün olmuştur. Bu nedenle; kullanılan yöntemle su analizinin özellikle salgın, sel, deprem gibi su kaynaklarının acil olarak incelenmesinin gerekli olduğu durumlarda son derece faydalı olacağı görülmektedir. Benzer araştırmalar sulara bulunabilecek parazit ve virüsleri de kapsayacak şekilde genişletilerek tekrarlanmalı ve özellikle acil durumlarda kullanılmak üzere Multipleks PZR yöntemiyle mikrobiyolojik su ve gıda analizine ağırlık verilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Franceys, R.: *A Guide To The Development Of On - Site Sanitation*. WHO. Geneva. 1992.

2. WHO and UNEP (Unated Nations Environment Programme).: *Global Pollution And Health. Results Of Health-Related Environmental Monitoring.* London. 1987.
3. WHO.: *Guidelines For Drinking Water Quality Vol: 2. Health Criteria And Other Supporting Information. 2nd Edition.* Geneva. 1996.
4. WHO.: *Guidelines For Drinking Water Quality Vol: 3. Surveillance And Control Of Community Supplies. 2nd Edition.* Geneva. 1997.
5. Phelps, E.B.: *Public Health Engineering: A Textbook Of The Principles Of Environmental Sanitation.* New York. 1949.
6. APHA, AWWA, WEF.: *Standart Methods For The Examination Of Water And Wastewater. 18th Edition.* Washington. 1992.
7. Carnie, J., Taylor, K. (Ed).: *Guidelines For The Control Of Infectious Diseases.* Melbourne. 1996
8. Bej, A.K., Dicesare, J.L., Haff, L., Atlas, R.M.: *Detection Of Escherichia Coli And Shigella Spp. In Water By Using The Polymerase Chain Reaction And Gene Probes For Uid.* *Appl Environ Microbiol.*, 57:1013-7, 1991.
9. Bej, A.K., Mccarty, S.C., Atlas, R.M.: *Detection Of Coliform Bacteria And Escherichia Coli By Multiplex Polymerase Chain Reaction: Comparison With Defined Substrate And Plating Methods For Water Quality Monitoring.* *Appl Environ Microbiol*, 57:2429-32, 1991.
10. Bej, A.K., Steffan, R.J., Dicesare. J., Haff, L., Atlas, R.M.: *Detection Of Coliform Bacteria In Water By Polymerase Chain Reaction And Gene Probes.* *Appl Environ Microbiol*, 56(2):307-14, 1990.
11. Bernhard, A.E., Field, K.G.: *Identification Of Nonpoint Sources Of Fecal Pollution In Coastal Waters By Using Host-Specific 16S Ribosomal DNA Genetic Markers From Fecal Anaerobes.* *Appl Environ Microbiol*, 66:1587-94, 2000.
12. Coquard, D., Exinger, A., Jeltsch, J.M.: *Routine Detection Of Salmonella Species In Water: Comparative Evaluation Of The ISO And PRO-BELIA Polymerase Chain Reaction Methods.* *J AOAC Int*, 82(4):871-6. 1999.
13. Fricker, E.J., Fricker, C.R.: *Application Of The Polymerase Chain Reaction To The Identification Of Escherichia Coli And Coliforms In Water.* *Lett Appl Microbiol*, 19:44-6. 1994.
14. Lang, A.L., Tsai, Y.L., Mayer, C.L., Patton, K.C., Palmer, C.J.: *Multiplex PCR For Detection Of The Heat-Labile Toxin Gene And Shiga-Like Toxin I And II Genes In Escherichia Coli Isolated From Natural Waters.* *Appl Environ Microbiol*, 60:3145-9, 1994.
15. Petit, F., Craquelin, S., Guespin-Michel, J., Buffet-Janvresse, C.: *Nucleic Acid Extraction From Polluted Estuarine Water For Detection Of Viruses And Bacteria By PCR And RT-PCR Analysis.* *Res Microbiol*, 150:143-51, 1999.
16. Tsen, H.Y., Jian, L.Z.: *Development And Use Of A Multiplex PCR System For The Rapid Screening Of Heat Labile Toxin I, Heat Stable Toxin II And Shiga-Like Toxin I And II Genes Of Escherichia Coli In Water.* *J Appl Microbiol*, 84:585-92, 1998.
17. Tsen, H.Y., Lin, C.K., Chi, W.R.: *Development And Use Of 16S Rrna Gene Targeted PCR Primers For The Identification Of Escherichia Coli Cells In Water.* *J Appl Microbiol.*, 85:554-60, 1998.
18. Way, J.S., Josephson, K.L., Pillai, S.D., Abbaszadegan, M., Gerba, C.P., Pepper, I.L.: *Specific Detection Of Salmonella Spp. By Multiplex Polymerase Chain Reaction.* *Appl Environ Microbiol*, 59:1473-9, 1993.
19. Lipton, M., Kadet, E.D.: *Agriculture-Health Linkages.* WHO Offset Publication No: 104. Geneva. 1988.