

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞU KARADENİZ'DEKİ KARA MİDYE VE DENİZ
SALYANGOZUNDAN İZOLE EDİLEN *Escherichia coli*'LERDE
AĞIR METAL DİRENÇ SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

FATİH CİVELEK

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ ERTUĞRUL TERZİ
TEZ JÜRİLERİ
PROF. DR. ŞEVKİ KAYIŞ
DOÇ. DR. SERKAN KORAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

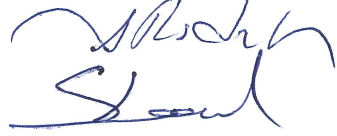


RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU KARADENİZ'DEKİ KARA MİDYE VE DENİZ SALYANGOZUNDAN
İZOLE EDİLEN *Escherichia coli*'LERDE AĞIR METAL DİRENÇ
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul TERZİ danışmanlığında, Fatih CİVELEK tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/03/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Şevki KAYIŞ	
Üye	: Doç. Dr. Serkan KORAL	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul TERZİ	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada; Karadeniz'in Rize, Artvin, Giresun ve Trabzon sahillerinden toplanan kara midye ve deniz salyangozu örneklerinden *Escherichia coli* izole edilme durumu ve izole edilen suşlarda ağır metallere karşı direnç/tolerans durumları araştırılmış ve dirençten sorumlu bazı ağır metal direnç genlerinin varlıkları ortaya konulmuştur.

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların yürütülmesinde ve elde edilen verilerin değerlendirilmesinde öneri ve paylaşımlarıyla desteklerini esirgemeyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul TERZİ'ye şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı hocam Doç. Dr. Serkan KORAL'a, Su Ürünleri Müh. Hasan İŞLER'e; tez yazım aşamasındaki katkılarından dolayı Su Ürünleri Yüksek Müh. Büşra TAŞTAN, Arş. Gör. Osman Nezih KENANOĞLU ve Arş. Gör. Yiğit TAŞTAN'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve becerilerini benden esirgemeyen Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi akademik personeline ayrıca teşekkür ederim. Hayatımın her aşamasında üzerimde desteklerini hissettiğim sevgili ailem, eşim ve çocuklarıma teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015.53006.103.02.04 nolu proje ile desteklenmiştir.

Fatih CİVELEK

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Doğu Karadeniz’deki Kara Midye ve Deniz Salyangozundan İzole Edilen *Escherichia coli*’lerde Ağır Metal Direnç Seviyelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiđi Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemleri kabul ettiğimi beyan ederim. 12/02/2019



Fatih CİVELEK

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğın kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

DOĞU KARADENİZ'DEKİ KARA MİDYE VE DENİZ SALYANGOZUNDAN İZOLE EDİLEN *Escherichia coli*'LERDE AĞIR METAL DİRENÇ SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Fatih CİVELEK

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul TERZİ**

Denizel ortamlar ağır metaller, pestisitler ve antibiyotikler gibi çeşitli kirleticilere maruz kalmaktadır. Bu kirleticilere karşı bakterilerde meydana gelen direnç tüm dünya üzerinde küresel bir problem haline gelmiştir. Bu çalışmada, Doğu Karadeniz'in Artvin, Rize, Trabzon ve Giresun sahillerinden 12 farklı istasyondan kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve deniz salyangozu (*Rapana venosa*) örnekleri mevsimsel olarak toplanmıştır. Örneklerden toplam 54 *Escherichia coli* (35 tanesi kara midye ve 19 tanesi deniz salyangozu) suşu izole edilmiştir. Bakterilerin Cu (Bakır), Cd (Kadmiyum), As (Arsenik) ve Hg (Cıva) metallerini tolere edebilme yetenekleri test edilmiştir. Bu amaçla tüm izolatların Cu, Cd, As ve Hg'ye karşı bakteriyel metal tolerans veya direncini belirlemek için broth dilüsyon tekniği kullanarak Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) testleri yapılmıştır. Cu, Cd, As ve Hg için MİK konsantrasyonları sırasıyla 100-400 µg/ml, 100-200 µg/ml, 25-400 µg/ml ve 3,125-25 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir. Tüm izolatlar Bakır'a karşı dirençli fakat Arsenik'e karşı hassas olarak belirlenmiştir. Cıva'ya karşı direnç % 7,4 olarak belirlenmiştir. Bakterilerde en sık görülen ağır metal direnç geni *nccA* olmuştur ve bunu *chrB* ve *merA* genleri takip etmiştir. Ağır metalleri de içeren toksik kirleticilere karşı bakterilerdeki direnç veya tolerans önemli ekolojik öneme sahiptir. Bu bakteriler çevresel ağır metal kirliliğinin kontrol edilmesinde indikatör olarak kullanılabilirler. Ayrıca direnç geni bulduran bakteriler patojen ve patojen olmayan bakteriler arasında direnç genlerinin yayılmasında önemli rol oynayabilirler.

2019, 25 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karadeniz, Ağır Metal, *Escherichia coli*, Direnç Geni.

ABSTRACT

DETERMINATION OF HEAVY METAL RESISTANCE LEVELS IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM MEDITERRANEAN MUSSEL AND SEA SNAIL IN EASTERN BLACK SEA

Fatih CİVELEK

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ertuğrul TERZİ

Marine environment is exposed to various pollutants such as heavy metals, pesticides and antibiotics. Bacterial resistance to these pollutants is a global problem all over the world. In this study, Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and sea snail (*Rapana venosa*) were seasonally collected from 12 sampling points from Artvin, Rize, Trabzon and Giresun Coasts of Black Sea, Turkey. A total of 54 *Escherichia coli* isolates (35 from Mediterranean mussel and 19 from sea snail) were isolated from *Mytilus galloprovincialis* and *Rapana venosa*. The bacteria were tested for their ability to tolerate Cu (Copper), Cd (Cadmium), As (Arsenic) and Hg (Mercury). For this purpose, minimum inhibitory concentration (MIC) tests for all isolates to the Cu, Cd, As and Hg were done to determine heavy metal tolerance or resistance using broth dilution technique. MIC concentration for Cu, Cd, As and Hg ranged between 100-400 µg/ml, 100-200 µg/ml, 25-400 µg/ml and 3.125-25 µg/ml respectively. All of the strains were resistant to Cu, but sensitive to As. Resistance to Hg was determined as 7.4 %. The most common heavy metal resistance gene in the bacteria was *nccA* and followed by *chrB* and *merA*. Tolerance or resistance of the bacteria to toxic pollutants including heavy metals is of significant ecological importance. These bacteria could be used as an indicator for controlling environmental heavy metal pollution.

2019, 25 pages

Keywords: Black Sea, Heavy Metal, *Escherichia coli*, Resistance Gene.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLOLAR DİZİNİ	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Su Kirliliği ve Ağır Metaller	2
1.3. Bakterilerde Ağır Metal Direnci	3
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Materyal	7
2.2. Örneklerin İşlenmesi	7
2.3. Ağır Metal Tolerans Testi.....	8
2.4. DNA ve Plazmit DNA İzolasyonu	8
2.5. Ağır Metal Direnç Genlerinin PCR ile Tespiti.....	9
3. BULGULAR.....	11
3.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK)Testi Sonuçları	12
3.2. Ağır Metal Direnç Genlerinin Dağılımı	13
3.3. Plazmit Varlığı.....	14
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	15
5. ÖNERİLER.....	18
KAYNAKLAR	19
ÖZGEÇMİŞ	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Kara midye ve deniz salyangozu örneklerinin toplandığı istasyonlar..... 7
- Şekil 2.** İzole edilen *E. coli* izolatlarının mevsimsel sayı ve dağılımı.....11
- Şekil 3.** İllere göre deniz salyangozu ve kara midyeden izole edilen *E. coli* sayıları..... 12



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Ağır metallere karşı direnç gösteren bazı mikroorganizmalar	4
Tablo 2. Ağır metal direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler	9
Tablo 3. Ağır metal direnç genlerinin belirlenmesinde uygulanan PCR protokolü	10
Tablo 4. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi sonuçları	12
Tablo 5. Ağır metallere karşı dirençli izolat sayıları	13
Tablo 6. Ağır metal direnç genlerinin dağılımları	14
Tablo 7. İzole edilen bakterilerde plazmit bulundurma durumları	14



SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece Santigrat
g	Gram
mg	Miligram
L	Litre
D	Dirençli
H	Hassas
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
As	Arsenik
Cu	Bakır
Hg	Cıva
Cd	Kadmiyum
Zn	Çinko
Pb	Kurşun
Co	Kobalt
Se	Selenyum
DNA	Deoksiribonükselik Asit
Gr(-)	Gram Negatif
Gr(+)	Gram Pozitif
LB	Luria Bertani
EMB	Eozin Metilen Blue
TSB	Triptik Soy Broth

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Doğu Karadeniz’de ekonomik olarak ticari öneme sahip olan başlıca kabuklu canlı türleri deniz salyangozu (*Rapana venosa*) ve çift kabuklulardan kara midye (*Mytilus galloprovincialis*)’dir. Deniz salyangozu Japon Denizi, Doğu Çin Denizi ve Bohai Denizi’ne özgü bir kabuklu su canlısıdır (Tsi vd., 1983). Aynı zamanda dünyada en istilacı türlerden biri olarak bilinmektedir. Deniz salyangozlarının Karadeniz’e ilk olarak 1946 yılında girdiği bildirilmiştir (Drapkin, 1963; Sağlam vd., 2015). Bir gastropoda türü olan *R. venosa*’nın Karadeniz’e petrol taşıma tankerleriyle taşındığı tahmin edilmektedir. Ayrıca çift kabuklu stokları üzerinde baskı kurmasıyla birlikte bu bölgeye kısa sürede uyum sağlayarak hızla yayılış gösterdiği bilinmektedir. Ülkemizde ise ilk olarak 1962 yılında Güneydoğu Karadeniz’de rapor edilmiştir (Bilecik, 1990; Knudsen vd., 2010). Biyo-coğrafi aralığı ise Avrupa (Akdeniz, Adriyatik ve Ege Denizi) ve Amerika’ya (Güney ve Kuzey Amerika) doğru genişlemiştir (Bombace vd., 1994; Harding ve Mann, 1999; Pastorio vd., 2000). İşgalci olarak belirtilen bu tür midye gibi kabukluları en aktif tüketen predatör olarak bilinmektedir (Sağlam, 2007).

Karnivor beslenme özelliğine sahip olan deniz salyangozları genellikle midye ve istiridye gibi sesil formdaki su canlıları ile beslenirler (Bat ve Öztekin, 2016; Terzi, 2018). 20 cm’ye kadar büyüebildiği bilinen bu türün Karadeniz’de 13-14 cm’ye kadar ulaşabildiği tespit edilmiştir. Yaşam için daha çok kayalık, kumlu ve çamurlu dip bölgelerini tercih ederler (Ünsal vd., 1989). Türkiye’de 2009 yılında 6085 ton olan deniz salyangozu üretimi 2017’de 9194 tona yükselmiştir. 1995 yılında en düşük üretimin 1198 ton olarak gözlemlendiği bilinirken, en yüksek üretimin ise 2004’te 14034 tona ulaştığı kayıtlara geçmiştir (TÜİK, 2018).

Kabuklu su canlıları arasında önemli yere sahip olan bir diğer tür ise kara midye olarak bilinen *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)’tir. Tüm dünyada yaygın olarak tüketilen kara midye, içerisindeki organik madde zenginliği ile ekonomik değere sahip ve en çok kültürü yapılan canlı türü olarak bilinmektedir. Ülkemizde de ticari önemi çok yüksektir ve sularımızın birçok bölgesinde bol miktarda bulunur. Türkiye’de

kara midye üretimi 2012 yılında 2093 ton iken 2017’de 536 tona kadar gerilemiştir. En düşük üretim 2016 yılında 78 ton iken, 2005’te en yüksek üretim 12362 ton olarak tespit edilmiştir (TÜİK, 2018).

Kara midyeler genellikle grup halinde ve gel-git ortamlarının olduğu bölgelerde (Figueras, 1989; Gouletquer vd., 1994, Lök, 2001) kayalıklara tutunarak yaşamlarını devam ettirirler. *M. galloprovincialis* bireyleri ihtiva ettikleri ağır metaller, patojenler, bakteriler ve radyoaktif maddeler nedeniyle “kirlilik göstergesi” olarak adlandırılırlar (Kristan vd., 2014; Kayhan vd., 2016). Midyeler suyu süzerek beslenen organizmalardır ve sucul ortamlardan aldıkları organik ve inorganik parçacıkları aktif olarak süzüp biriktirirler. Bu özelliklerinden dolayı buldukları ortamdaki mevcut su durumunu bildiren en önemli canlılardır. Aynı zamanda su içerisinde bulunan ağır metal, antibiyotik ve pestisit gibi kimyasalların da vücutlarında birikme potansiyeli olduklarından hem çevresel hem de insan sağlığı açısından oldukça risk faktörü oluşturmaktadırlar. Bu nedenle yaşamlarını sürdürdükleri çevredeki su kalitesinin de önemi yüksektir. Su, evsel ve endüstriyel düzeyde; sulama, taşıma, rekreasyon, sportif ve ticari balıkçılık, enerji üretimi, kanalizasyon, atık bertarafı vb. gibi birçok farklı amaç için kullanılan ve şüphesiz ki doğal kaynakların en önemlilerinden birisini teşkil eden bir unsurdur (Abel, 2002).

1.2. Su Kirliliği ve Ağır Metaller

Su kirliliği, suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde istenmeyen değişikliklerin olması ve bu değişiklik sonucu suyun kullanılmasını engelleyen bozulmalar olarak ifade edilebilir (Sönmez vd., 2008). Su kirliliği kirleticinin özelliklerine veya kaynağına ya da suda meydana getirdiği değişimlere göre fiziksel, kimyasal veya biyolojik kirlenme olarak gruplandırılabilir.

Ağır metaller çoğunlukla endüstriyel atıklar nedeniyle meydana gelmektedir. Her ne kadar bazı metaller biyolojik süreçler ve dolayısıyla yaşam için elzem olsa da birçoğunun biyolojik görevi yoktur. Biyolojik görevi olan metaller dahi belirli düzeylerin üstüne çıktığında toksik etki oluşturabilmektedir. Dahası, ağır metaller vücuttan atılamaz ve başta karaciğer olmak üzere birçok organ ve dokuda birikim

yaparlar (Elbeshti vd., 2018). Bu nedenle doğal sularda belirli bir konsantrasyonun üzerinde bulunan yabancı maddelerin tamamı insan sağlığı üzerinde tehdit oluşturabilmektedir. Bu maddelerden bazılarının sularda çok düşük miktarlarda bulunması dahi birçok ölümcül hastalığa ve zehirlenmeye sebep olduğu bildirilmiştir (Kobyay ve Yeşilkanat, 2017). Hg, Cd, As, Pb gibi ağır metaller bir organizmadan başka bir organizmaya geçerken konsantrasyonları artarak canlı dokusunda birikebilmektedirler (Phillips, 1995; Uluturhan ve Küçüksezgin, 2007; Bilgin ve Uluturhan Suzer, 2015).

1.3. Bakterilerde Ağır Metal Direnci

Tüm mikroorganizmalar toksik etken oluşturan metallere karşı direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu mekanizmalar sayesinde yüksek konsantrasyonlu metallere karşı direnç göstererek çoğalabilme özelliklerine sahiptirler (Ellis vd., 2003). Yapılan çalışmalar incelendiğinde bazı metallere karşı direnç gösteren mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bunlar genellikle aerobik gruba dahil olan *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* ve *Bacillus* sp. Gibi hem Gr(-) hem de Gr(+) bakterilerden oluşmaktadır (Tablo 1). Bu metallere karşı direnç mekanizmalarının gelişmesindeki en büyük etken, mikroorganizmaların var olduğu çevre, toksisiteye neden olan metallerin bulunması ve bu metallerin organizmalar üzerinde oluşturduğu stres faktörleridir (Yang ve Chu, 2011; Şensoy Karaoğlu, 2013).

Tablo 1. Ağır metallere karşı direnç gösteren bazı mikroorganizmalar.

Mikroorganizma Türleri	Direnç Gösterdiği Metaller	Kaynaklar
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Cu, Hg	Hassen vd., 1998
<i>Bacillus sp.</i>	As	Cavalca vd., 2010
<i>Escherichia coli</i>	Cu	Chihomvu vd., 2015
<i>Staphylococcus pasteuiri</i>	Pb, Co, Cd, Se, Hg,Cu, As, Mn	Nithya vd., 2011
<i>Micrococcus luteus</i>	Pb	Cavalca vd., 2010
<i>Bacillus arsenicus</i>	Pb, Co, Cd, Zn, Hg, Se, As, Cu	Nithya vd., 2011
<i>Pseudomonos sp.</i>	Cu	Chihomvu vd., 2015

Mikroorganizmalarda ağır metallerin bakteriyel direncinin fenotipik olarak tespit edilmesinde kültürel yöntemler kullanılırken, genotipik olarak ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), genom sekansı, DNA problemleri, Western blotlama ve protein jel elektroforezi gibi birçok farklı moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Kültürel yöntemler, mikroorganizmaların izolasyonunda ağır metal tuzları ihtiva edip etmediği belirlenerek ve söz konusu mikroorganizmaların farklı metallerle büyüme koşullarının araştırılması yoluyla gerçekleştirilmektedir. Katı veya sıvı besiyerinde her bir metal için ayrı ayrı testler uygulanabildiği gibi birden fazla metalin aynı ortamda olduğu çoklu direnç çalışmaları da yapılabilmektedir. Ağır metal direncinin tayin edilmesinin yanında Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu (MİK) da belirlemek gerekir (Yavuz ve Sarıgül, 2016). MİK yöntemi, genellikle patojen bakterilerin antibiyotik veya diğer ajanlara karşı hassasiyetini belirlemek üzere kullanılmakla birlikte patojen olmasına bakılmaksızın herhangi bir mikroorganizmanın herhangi bir maddeye karşı direncini ortaya koymak için de tercih edilebilen bir yöntemdir.

Moleküler yöntemlerde ise en yaygın olarak kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemidir. Bu yöntem, incelenmek istenen herhangi bir gen bölgesinin; bu bölgeye özgü tasarlanmış primerler yardımıyla, nükleotidler ve DNA polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Persing, 1991; Arlı, 2017).

Bu iki yöntemin birlikte yürütülmesi sonucunda ilgili direncin varlığı, derecesi ve bu dirence ait genin belirtilmesi hakkında sonuçlar elde edilebilmektedir. Ağır metal

direncinin tespit edilmesinde farklı gen bölgelerinin varlığından yararlanılmaktadır Ağır metal direnç genleri literatürde genel olarak *merA*, *merB*, *merC*, *merD*, *chrA*, *chrB*, *czcB*, *czcD*, *nccA* ve *copA* şeklinde bildirilmiştir ve bu genlerin çoğunun plazmit üzerinde bulunduğu ve transfer edilebildikleri bildirilmiştir.(Trajanovska vd., 1997; Abou-Shanab vd., 2007).

Mikroorganizmaların toksik ağır metallere karşı direnç gelişimi göstermelerindeki en önemli neden buldukları çevre ve metallerin varlığından kaynaklıdır. Bunun için mikroorganizmalar vücutlarından metalleri uzaklaştırmak amacıyla aktif taşıma mekanizmalarını kullanmaktadırlar. Ağır metallere karşı direnç gösteren bakteriler üzerine birçok çalışmanın yapıldığı bilinmektedir. *E. coli* de sucul ortamlarda çevresel ve bakteriyolojik kirlenmeyi tespit etmek için fekal indikatör olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber *E. coli*'nin patojenik suşları su ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilmektedir (Avşar ve Berber, 2014; Terzi, 2018).

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *E. coli* birçok omurgalı canlının normal bağırsak florasında bulunan bir mikroorganizma türüdür. Basil şeklinde ve boyutları 1-2 µm uzunluğunda, çapı ise 0,1 µm ile 0,5 µm aralığında değişiklik göstermektedir. Gr(-) bakteri olan *E. coli*'nin uygun vücut sıcaklığında çoğaldığı ve endospor oluşturmadığı bilinmektedir (Nataro ve Kaper, 1998; Sipahi, 2012).

M. galloprovincialis ve *R. venosa* gibi kabuklu su canlıları suyu filtre ederek beslendikleri için bu bakterileri vücutlarına doğal olarak almakta ve toksik ağır metallere de yoğun bir şekilde maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle bu türler ağır metallerin biyoindikatörü olarak bilinmektedir. Biyoindikatör, çevresel kirlilik faktörlerine karşı yaşamsal fonksiyonlarını değiştirerek ya da toksik maddeleri vücutlarında depolayarak cevap veren canlılar olarak tanımlanır (Kazancı ve Girgin, 1998). Dokularında biriktirdikleri toksik maddelerin analiz edilip incelenmesiyle bu canlılar, buldukları çevrede kirliliğin mevcudiyeti hakkında bize bilgi vermektedir. Genellikle biyoindikatör olarak kullanılan türlerin büyük bir bölümü dipte yaşayan ve yavaş hareket eden bentik canlılardan oluşmaktadır (Başçınar, 2009).

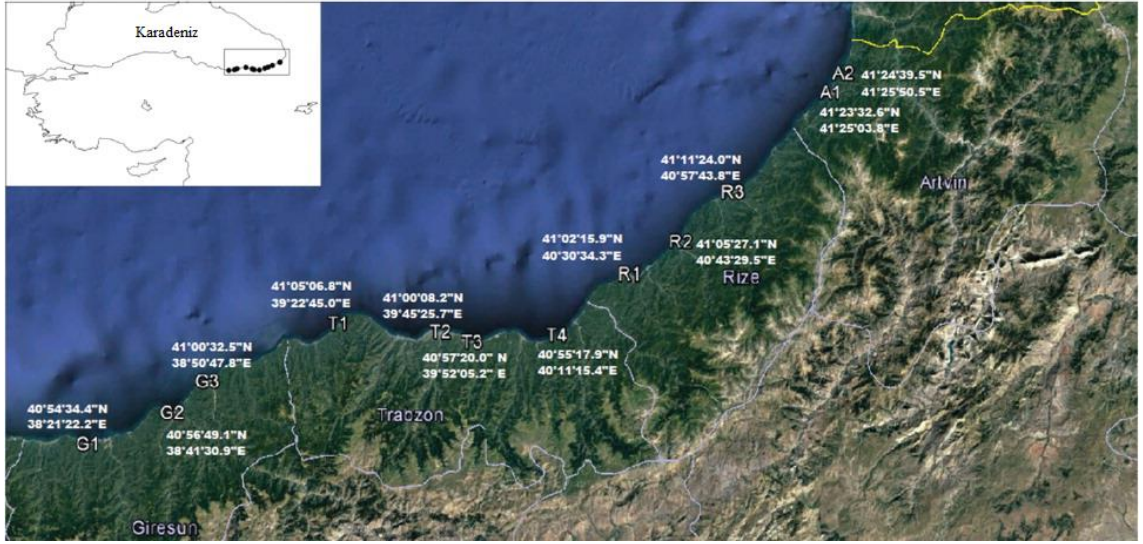
Bu alışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki kabuklu türlerinden deniz salyangozu (*Rapana venosa*) ve kara midyeden (*Mytilus galloprovincialis*) izole edilen *E. coli* bakterilerinde ağır metal direnç durumu, bakterilerde ağır metal direnç geni bulundurma durumları, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ve moleküler yöntemlerle analiz edilmiştir. Direncin istasyonlar arası değişimi izole edilen bakterilerde direnç geni farklılıkları belirlenmiştir. İzolatların MİK değerleri belirlenerek izole edildikleri ortamın kontaminasyon durumu ortaya konulmuştur.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

Araştırma alanı olan Doğu Karadeniz Bölgesi'nin tamamının örneklenebilmesi için bu bölge içerisinde bulunan bütün iller istasyon olarak seçilmiş olup çalışmada kullanılmak üzere kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve deniz salyangozu (*Rapana venosa*) örnekleme mevsimsel olarak Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin ili kıyılarında yapılmıştır. İstasyonların dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kara midye ve deniz salyangozu örneklerinin toplandığı istasyonlar.

2.2. Örneklerin İşlenmesi

İstasyonlardan toplanan kara midye ve deniz salyangozunun iç organları aseptik koşullar altında çıkartılmıştır. Her bir istasyondan 25 g canlı yumuşak dokusu hassas terazide tartılmış ve steril poşetlere koyularak üzerine % 0,85 tuzlulukta steril tuzlu su ilave edilmiştir. Ardından stomaker cihazında 10 dk süre ile ezme işlemi gerçekleştirilmiş ve Luria Bertani (LB) broth besiyerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreme gerçekleşen örneklerden Eosin Metilen Blue (EMB) Agar besiyerine ekimler gerçekleştirilmiş ve tekrar aynı inkübasyon şartlarında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası merkezleri koyu renkli ve metalik yeşil renkli koloniler saflaştırılmıştır. Bakterilerin biyokimyasal özelliklerini

tespit etmek için API 20E Strips (Biomerieux, Fransa) testleriyle ve aşağıdaki biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır. Bu testler; Gram boyama, sitokrom oksidaz, oksidasyon/fermentasyon, katalaz, sitrat kullanımı, H₂S üretimi, indol üretimi, voges proskauer, laktoz ve metil kırmızısı testleri şeklindedir (Holt vd., 1994). Bütün izolatlar içerisinde %15 gliserol bulunan sıvı besi yerinde -70°C'de saklanmıştır.

2.3. Ağır Metal Tolerans Testi

İzole edilen tüm bakterilerin ağır metallere karşı tolerans testleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) kitapçığında belirtilen broth dilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Ağır metal direnç/hassasiyet testlerinde bakır, kadmiyum, arsenik ve cıva için sırasıyla analitik saflıkta olan CuCl₂.2H₂O, CdCl₂.6H₂O, NaAsO₂ ve HgCl₂ metal tuzları kullanılmıştır. Bu tuzlar kullanılarak stok çözeltiler hazırlanmış ve stok çözeltiler 0,25 µm göz açıklığına sahip steril filtrelerden geçirilmiştir. Luria Bertani (LB) Broth besiyerinde bakır kadmiyum ve arsenik için son konsantrasyon 0 (Kontrol); 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 ve 800 µg/ml olacak şekilde hazırlanırken cıva için 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir izolat farklı oranlarda metal içeren besi ortamlarına ekimleri yapıldıktan sonra 35 °C'de 24-36 saat inkübasyona bırakılarak ve inkübasyondan sonra bakterilerin üreyip üreyemediği kayıt altına alınmıştır ve inhibe olduğu en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak kaydedilmiştir. Direnç durumları belirlemek amacıyla arsenik için 10 mM (750 µg/ml), kadmiyum için 1 mM (112 µg/ml), bakır için 1 mM (63,5 µg/ml) ve cıva için ise 0,1 mM (20 µg/ml) konsantrasyonlarda üreyebilen izolatlar dirençli olarak kaydedilmiştir (Nieto vd., 1987).

2.4. DNA ve Plazmit DNA İzolasyonu

Triptik Soy Broth (TSB) veya Luria Bertani (LB) Broth besiyerlerinde üretilen izolatların DNA izolasyonları için kaynatma yöntemi kullanılarak PCR işlemlerinde örneğe ait kalıp DNA hazır hale getirilmiştir (Boran vd., 2013). Plazmit DNA izolasyonunda Plazmit DNA izolasyon kiti kullanılmış ve üretici firmanın direktiflerine göre izolasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmit elektroforez işlemine kadar -

20°C’de saklanmıştır. Daha sonra %1 lik agaroz jelde yürütülüp ve Lambda DNA HindIII Marker kullanarak plazmitlerin büyüklükleri belirlenmiştir.

2.5. Ağır Metal Direnç Genlerinin PCR ile Tespiti

İzole edilen bakteri suşlarıyla birlikte konjugasyon deneyleri sonucunda elde edilen transkonjugant bakterilerdeki ağır metal direnç genlerinin (*merA*, *nccA* ve *chrB*) varlığı Tablo 2’de gösterilen primerler kullanılarak PCR ile belirlenmiştir. PCR işlemlerinde genomik DNA kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Buz içerisinde hazırlanan PCR karışımları 25 µl’lik hacimlerde içerisine 100 ng kalıp DNA, 12,5 µl 2X Master Mix PCR karışımı (NEB Master PCR Kit), 100 ng her bir primer ve steril saf su koyulmuştur. Daha soran tüpler Thermal Cycler’a yerleştirilerek rutin PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bakterilerin ağır metal direnç genlerinin belirlenmesinde Biorad Marka T100 model Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. PCR işleminde örnek DNA’sı içermeyen reaktif negatif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR işleminden sonra, örnekler ethidium bromit ile 0,5 x TAE buffer içeririnde ve %1’lik agaroz jel üzerinde 100-110 V şiddetinde 45-60 dk süre ile yürütülmüştür. Daha soran jel görüntüleri görüntüleme sisteminde kayıt altına alınmıştır. Ağır metal direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerlere ait tutunma sıcaklıkları ve ürün boyutları Tablo 2’de ve PCR için uygulanan protokol Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 2. Ağır metal direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.

Gen	Sekans (5' - 3')	PCR Ürünü Boyut	Tutunma Sıcaklığı (°C)	Kaynaklar
<i>merA</i>	FW”GAGATCTAAAGCACGCTAAGGC” R”GGAATCTTGACTGTGATCGGG”	1011	58	Misra vd., 1984
<i>nccA</i>	FW”ACGCCGGACATCACGAACAAG” R”CCAGCGCACCGAGACTCATCA”	450	59	Nies vd., 1990
<i>chrB</i>	FW”GTCGTTAGCTTGCCAACATC” R”CGGAAAGCAAGATGTCGATCG”	1141	55	Abou-Shanab vd., 2007

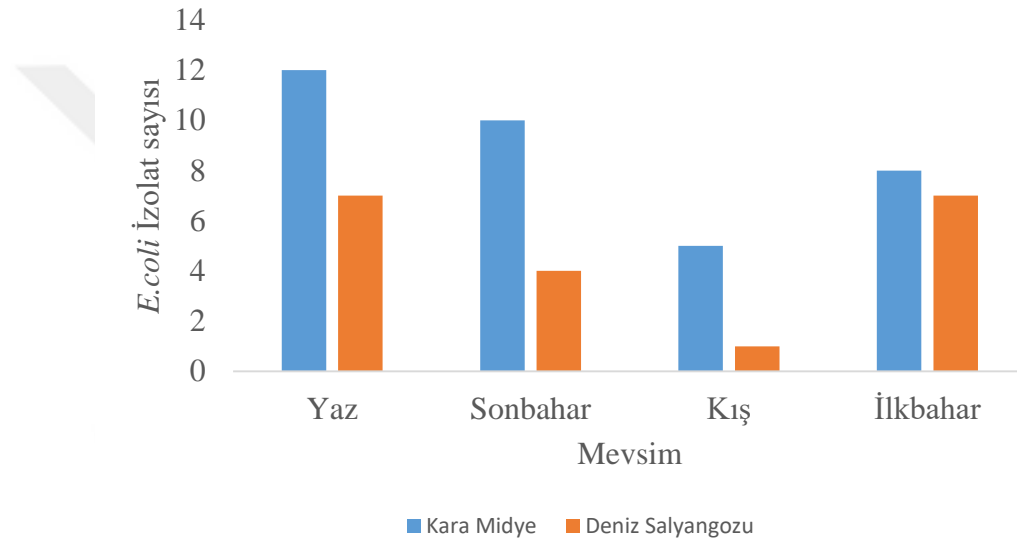
Tablo 3. Ağır metal direnç genlerinin belirlenmesinde uygulanan PCR protokolü.

PCR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Birinci denaturasyon	95	30	1
Denaturasyon	95	30	35
Tutunma	Tablo 2	45	35
Uzama	68	45	35
Son uzama	68	90	1



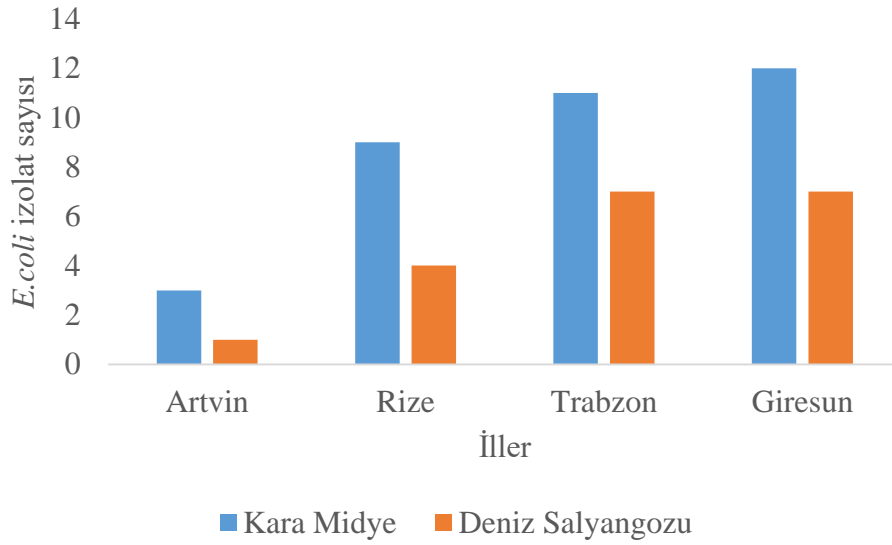
3. BULGULAR

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Artvin, Rize, Trabzon ve Giresun illerinden toplam 12 istasyondan yapılan mevsimlik örnekleme sonucu toplamda 54 adet *E. coli* izolatu elde edilmiştir. Bu 54 adet izolatuın 35 tanesi kara midyeden izole edilirken 19 tanesi de deniz salyangozundan izole edilmiştir. Elde edilen izolatların mevsimsel dağılımlarına bakıldığında, en yüksek izolasyon yaz mevsiminde iken bunu ilkbahar ve sonbahar takip etmiştir. En düşük izolasyon ise kış mevsiminde olmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. İzole edilen *E. coli* izolatlarının mevsimsel dağılımı.

İzolatların illere göre dağılımları incelendiğinde en yüksek izolasyon Giresun ve Trabzon illerinden olmuştur. Daha sonra ise Rize ilinden en yüksek sayıda *E. coli* izole edilmiştir (Şekil 3). Kara midye (n:12+11) ve deniz salyangozlarından (n:7+7) Trabzon ve Giresun'da sırasıyla 18 ve 19 izolat izole edilmiştir.



Şekil 3. İllere göre deniz salyangozu ve kara midyeden izole edilen *E. coli* sayıları.

3.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Testi Sonuçları

İzole edilen *E. coli* izolatlarının ağır metallere karşı sergilemiş oldukları direnç/hassasiyet seviyelerinin belirlendiği MİK testi sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. Bu test sonuçlarına göre bakterilerin bakır, kadmiyum, arsenik ve cıva metallerine karşı MİK değerleri sırasıyla 100-400 µg/ml, 100-200 µg/ml, 25-400 µg/ml ve 3,125-25 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir.

Tablo 4. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi sonuçları (µg/ml).

		Cu	Cd	As	Hg
Artvin	Max	400	200	200	12,5
	Min	200	100	100	3,125
Rize	Max	400	200	400	12,5
	Min	200	100	25	3,125
Trabzon	Max	400	200	400	25
	Min	100	100	50	3,125
Giresun	Max	400	200	400	25
	Min	100	100	50	3,125

Bakterilerin ağır metallere karşı direnç seviyelerine bakıldığında ise tüm izolatların bakır metaline karşı dirençli olduğu belirlenirken bunu kadmiyum takip

etmiştir. Bakterilerin hiçbir tanesinde arsenike karşı direnç durumu tespit edilememiştir. Cıvaya direnç ise sadece yaklaşık % 10 luk oranlarla Trabzon ve Giresun'daki istasyonlardan izole edilen bakterilerde belirlenmiştir. Rize ve Artvindeki istasyonlardan izole edilen bakterilerin cıvaya karşı hassas oldukları belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Ağır metallerle karşı dirençli izolat sayıları (D: Dirençli; H: Hassas).

Ağır Metal	Artvin		Rize		Trabzon		Giresun	
	D	H	D	H	D	H	D	H
Bakır	4	0	13	0	18	0	19	0
Kadmiyum	1	3	5	8	8	10	11	8
Arsenik	0	4	0	13	0	18	0	19
Cıva	0	4	0	13	2	16	2	19

3.2. Ağır Metal Direnç Genlerinin Dağılımı

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Rize, Giresun, Artvin ve Trabzon illerinin sahillerinden toplanan deniz salyangozu ve kara midye örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında *merA*, *nccA* ve *chrB* ağır metal direnç genlerinin varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Bakterilere ait direnç geni bulundurma durumu Tablo 6'da gösterilmiştir.

Araştırma neticesinde kara midye ve salyangozlarından izole edilen bakterilerde %33'lük oranla *nccA* geni en fazla rastlanan direnç geni olmuştur. *nccA* geni Artvindeki istasyonlardan izole edilen bakterilerin % 75'inde tespit edilirken bunu % 36,8 lik oranla Giresun takip etmiştir. *nccA* geni Rize'deki istasyonlardan izole edilen bakterilerde % 30,8 iken bu oran Trabzon'da % 22,2 olarak tespit edilmiştir. Cıva metaline karşı direnci sağlayan *merA* geni Artvin istasyonunda tespit edilemezken Giresun, Rize ve Trabzondaki istasyonlarda sırasıyla %31,6, %23,1 ve %11,1 olarak tespit edilmiştir. *chrB* geni ise yine Artvin istasyonunda tespit edilemezken %38,9 luk oranla en fazla Trabzondaki istasyonlardan izole edilen *E. coli* izolatlarında tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Ağır metal direnç genlerinin dağılımları.

	Toplam (%)	Artvin (%)	Rize (%)	Trabzon (%)	Giresun (%)
N	54	4	13	18	19
<i>merA</i>	20,4	-	23,1	11,1	31,6
<i>nccA</i>	33,3	75	30,8	22,2	36,8
<i>chrB</i>	20,4	-	7,7	38,9	15,8

3.3. Plazmit Varlığı

Çalışma kapsamında kara midye ve deniz salyangozu örneklerinden izole edilen toplam 54 adet bakterinin plazmit içerip içermedikleri araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan plazmit izolasyonu sonucunda bakterilerin 24 (%44,4) tanesinde plazmit tespit edilmiştir. İzole edilen bakterilerden plazmit tespit edilenlerin bakterilerin izole edildiği yere göre sayısı ve yüzdeleri Tablo 7’de gösterilmiştir. Tespit edilen plazmitlerin molekül büyüklüklerinin 2-10 kb arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Tablo 7. İzole edilen bakterilerde plazmit bulundurma durumları.

İstasyon	n	Plazmit varlığı (n)	Plazmit varlığı (%)
Artvin	4	3	75,0
Rize	13	4	30,8
Trabzon	18	9	50,0
Giresun	19	8	42,1
Toplam	54	24	44,4

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Sucul ortamlardan izole edilen bakterilerle yapılan çalışmaların bakterilerin sucul ortamlardaki kirleticilere karşı geliştirmiş oldukları direnç seviyelerinde farklılıkları gözlemlenmektedir. Sipahi (2012) izole ettikleri *Enterobacteriaceae* üyelerinin tamamının bakıra karşı dirençli olduğunu, buna ek olarak manganeze karşı neredeyse tamamının (% 99,9) ve kurşuna karşı % 87,2 gibi bir direnç olduğunu bildirmiştir. Akkan (2009) ise İskenderun Körfezi'nin üç farklı istasyonundan izole ettiği toplam 356 adet bakterinin hepsinin bakır ve kadmiyum metallerine karşı direnç gösterdiklerini bildirmiştir. Bu çalışmalara benzer şekilde, yapılan bu çalışmada da kara midye ve deniz salyangozlarından izole edilen *E. coli* izolatlarının bakır, kadmiyum, arsenik ve civa metallerine karşı MİK değerleri sırasıyla 100-400 µg/ml, 100-200 µg/ml, 25-400 µg/ml ve 3,125-25 µg/ml arasında değişiklik gösterdiği, tüm izolatların bakır metaline karşı dirençli olduğu ve bunun kadmiyumun takip ettiği tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada bakterilerin hiçbir tanesinde arsenike karşı direnç durumu tespit edilememiştir. Cıvaya direnç ise sadece yaklaşık % 10 luk oranlarla Trabzon ve Giresun'daki istasyonlardan izole edilen bakterilerde belirlenmiştir. Rize ve Artvin'deki istasyonlardan izole edilen bakterilerin cıvaya karşı hassas oldukları belirlenmiştir. Gedik (2018a), Artvin, Giresun, Rize ve Trabzon bölgelerinden toplanan kara midye (*M. galloprovincialis*) örneklerinin yumuşak dokularında biriken en yüksek metal konsantrasyonlarına (Cr, Cu, Mn, Pb, Zn) Trabzon'daki istasyonlarda belirlediğini bildirmiştir. Bu çalışmada da Trabzon istasyonlarından izole edilen bakterilerin direnç seviyelerinin diğer istasyonlardan fazla olması Trabzon sahillerinin kirliliğe daha fazla maruz kaldığını gösterebilir. Ayrıca Akçay ve Moon (2004) Trabzon'un kıyıdağın maden yatağları ve kıyıya yakın tarımsal faaliyetler nedeniyle kıyı bölgelerinde yerel kirliliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Gedik (2018b), Artvin, Giresun, Rize ve Trabzon bölgelerindeki deniz salyangozlarında yaptığı örneğlemeler neticesinde ağır metal içeriğinin midyede olduğu gibi deniz sayangozlarında da Trabzon bölgesinde daha yoğun olduğunu rapor etmiştir. Baltaş vd. (2017), Artvin, Giresun, Rize ve Trabzon bölgelerindeki midye ve deniz salyangozu yumuşak dokularında yaptıkları ağır metal konsantrasyonları ölçümleri neticesinde; tüm örneğleme istasyonlarından toplanan deniz salyangozlarının yumuşak dokusunun, genellikle midye yumuşak dokusundan daha yüksek Cu ve Pb ve daha düşük Zn konsantrasyonuna sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar kara midye

ve deniz salyangozu için Cu, Zn ve Pb ortalama konsantrasyon değerlerinin tolere edilebilir seviyelerin üzerinde olmasına rağmen, midye için tahmini günlük alım değerlerinin beklenenin altında olduğunu tespit etmişlerdir.

Matyar vd. (2009) balıkların solungaçlarından izole edilen bakterilerde ağır metallere karşı olan toleransın $Cd > Cu > Mn > Cr = Pb$ şeklinde olduğunu ama bağırsaklardan izole edilen bakterilerde ise bunun $Cd > Cu > Cr > Mn = Pb$ olarak sıralandığını tespit etmişlerdir. Akinbowale vd. (2007), *Oncorhynchus mykiss*'ten izole ettikleri bakterilerde 7 farklı ağır metalin etkisini araştırdıkları çalışmalarında bu sıralamanın $Cu = Pb > Mn > Cr > Zn > Co > Cd$ şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Abou-Shanab vd. (2007), çalışmalarında kullandıkları bakteri izolatlarının çeşitli ağır metallere göre direnç frekanslarını Pb, Zn, Ni, Cu, Co, Cr, Cd, Hg ve As için sırasıyla %100, %100, %100, %98, %93, %53, %42, %29 ve %18 olarak belirtmişlerdir. Abskharon vd. (2008), *E.coli* bakterisi için bakır, kobalt, nikel, çinko, krom, kadmiyum ve kurşun metallerine karşı MİK değerlerini sırasıyla 1.57, 2.55, 1.7, 9.17, 0.48, 4.4 ve 3.1 mM olarak tespit etmişlerdir. Toroğlu (2003), Aksu Nehri'ndeki *Enterobacteriaceae* grubuna ait bakterilerin ağır metal dirençliliğini ele aldığı çalışmada söz konusu gruba ait 67 adet suş izole etmiş olup bundan %67,2'sinin *E. coli* olduğunu bildirmiştir. Bu izolatların Ni, Cd, Cu ve Cr'ye farklı düzeylerde dirençlilik gösterdiğini özellikle kadmiyumun yüksek konsantrasyonlarına daha dirençli olduğunu tespit etmiştir.

Sipahi (2012), izole ettikleri bakterilerde ağır metallere karşı direnç seviyelerinin belirlenmesinde kontrol suşu olarak *E. coli* K12 suşunu kullanmışlar ve bu suşun MİK değerlerini Bakır, Manganez ve Kurşun için sırasıyla 200, 1600 ve 1600 µg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Gül Şeker (2009), Marmara Denizi'nden izole ettiği bakteri suşlarının %100, %100 ve %72 oranlarında sırası ile 3 ağır metale (Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Cr^{+3}) maksimum direnç gösterdiği ve aynı izolatların (%27,3) Pb^{+2} 'ye oldukça duyarlı olduğunu; Karadeniz izolatlarının ise benzer bir şekilde %100, %92,3 ve %92,3 oranlarında sırası ile Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Cr^{+3} 'a oldukça dayanıklı ve göreceli olarak Pb^{+2} 'a az dayanıklı (%53,8), Mn^{+2} 'a ise dayanıksız olduğunu belirtmiştir. Gül Şeker (2009), çalışmasında çoklu ağır metal ve antibiyotik dirençliliği arasındaki etkileşime de dikkat çekmiştir.

Akkan (2009), İskenderun körfezindeki Gram(-) bakterilerin ağır metale dirençlilik düzeylerini araştırdığı çalışmasında, izolatların tamamının bakıra ve kadmiyuma karşı dirençli olduğunu, en düşük dirençlilik düzeyinin ise kurşunda (%67,7) saptandığını belirtmiştir. Akkan (2009), bakterilerin dirençlilik seviyelerinin organize sanayi bölgelerine kıyasla diğer bölgelerde daha fazla olmasını; körfezdeki su akıntılarına ve sanayi bölgelerine yük taşıyan gemilerin körfeze giriş ve çıkışını sağlayan seyir yolları üzerinden gerçekleşmesinden dolayı kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Bakterilerde tespit edilen direnç seviyelerinin değişiklik göstermesi bakterinin izole edildiği yerin, canlının, çevrenin ve zamanın farklı olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Bakterilerde ağır metal gibi kirleticilere karşı dirençten sorumlu genetik eleman olan direnç genlerinin varlıkları çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Abou-Shanab vd. (2007), çalışmalarında PCR ile tespit ettikleri *mer* ve *ncc* ağır metal direnç genleri ile cıva ve nikel karşı bakterilerin dirençli olduklarını tespit etmişler. Bu çalışmada kara midye ve salyangozlardan izole edilen bakterilerde %33'lük oranla *nccA* geni en fazla rastlanan direnç geni olmuştur.

Abskharon vd. (2008), çalışmalarında, *E. coli* suşunun metal direncinden sorumlu olup moleküler ağırlıkları 27 ve 65 kb olan iki plazmit içerdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar ile plazmidin *E. coli* DH5 α 'da çoğalabildiğini ve heksa veya üç değerlikli kromun direncinin ifadesi için gerekli genetik bilgiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. 54 adet bakterinin plazmit içeriği hakkında bilgi sahibi olmak için plazmit izolasyonu yapılan bu çalışmada, bakterilerin %44 'ünün plazmit içerdiği sonucuna varılmış olup, plazmitlerin molekül büyüklüklerinin 2-10 kb arasında değiştiği tespit edilmiştir. Aktan vd. (2012), birçok ağır metale karşı dirençli olan *E. faecalis* türü bakterinin, 1.58, 3.06, 22.76 ve 28.95 kb moleküler boyutlara sahip dört plazmit barındırdığını ve söz konusu bakteri suşunun kurşun ağır metaline direncinin tüm plazmidlerin yok edilmesine rağmen hala mevcut olduğunu ortaya koymuşlardır.

5. ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında Doğu Karadeniz'den toplanan kara midye ve deniz salyangozu örneklerinde *E. coli*'nin varlığı bu örneklerin toplandığı bölgelerin insani veya hayvansal orjinli fekal kirliliğe maruz kaldıklarının göstergesidir. Kanalizasyon atıklarının arıtıldıktan sonra denizel ortama verilmesi veya derin deşarj yapılan yerlerde denizel ortamdaki akıntıların dikkate alınarak tekrar gözden geçirilmesi gerekmektedir.

Ülkemizde özellikle kara midye insanlar tarafından tüketilen bir canlı olduğu için bu canlılarda gıda güvenliği açısından *E. coli*'nin hiç olmaması gerekmektedir. Kontamine midyelerin tüketimi esnasında insan sağlığını tehlikeye atabilir.

Doğu Karadeniz sahillerinden toplanan kara midye ve deniz salyangozu örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında ağır metal dirençliliğinin tespit edilmesi bu bölgelerin kirliliğe maruz kaldıklarının göstergesidir. Kıyıya yakın yerlerde maden yataklarının bulunması bu kirliliği arttırıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Hem aktif maden sahalarından alıcı ortamlara karışan maden atıklarının sucul ortamlara karışmasının engellenmesi hem de terkedilmiş maden sahalarının rehabilite edilerek bulaşmanın engellenmesi gerekmektedir.

Denizel ortamlardan izole edilen bakterilerde plazmit varlığı ve ağır metal direnç genlerinin tespit edilmesi o ortamların riskli olduğunu gösterebilir. Bakteriler arasında plazmit transferleriyle birlikte verici bakterinin plazmitinde bulunan ağır metal direnç genleri de diğer bakterilere aktarılabilir. Özellikle denizel ortamlarda su ürünleri yetiştiriciliği tesisi kurmak isteyen işletmecilerin bölgenin bakterilerinin direnç geni bulundurma durumlarının tespit ettirmesi ileride olası bakteriyel hastalıkların önüne geçmede yardımcı olacaktır.

Dünyada tatlı su kaynaklarının azalması ile deniz suyundan içme suyu elde edilme ihtimaline karşı Karadeniz ülkemiz açısından çok büyük bir öneme sahiptir. Özellikle sahil kesimlerinde evsel ve endüstriyel atıkların arıtılmadan Karadeniz'e verilmemesi geleceğimiz açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abel, P.D., 2002.** Water Pollution Biology. Taylor & Francis e-Library, Sunderland, UK. 2. Baskı, ISBN 0-203-79198-3.
- Abou-Shanab, R.A.I., Van Berkum, P. and Angle, J.S., 2007.** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. Chemosphere, 68, 360-367. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.051.
- Abskharon, R.N.N., Hassan, S.H.A., El-Rab, S.G. and Shoreit, A.A.M., 2008.** Heavy metal resistant of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 81, 309-315. DOI: 10.1007/s00128-008-9494-6.
- Akçay, M. and Moon C.J., 2004.** The environmental impact of mining in the Pontides, Turkey: Reconnaissance sampling and GIS-based analysis. Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis, 4, 317-328. DOI: 10.1144/14677873/03052.
- Akinbowale, O.L., Peng, H., Grant, P. and Barton, M.D., 2007.** Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. International Journal of Antimicrobial Agents, 30, 177-182. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012.
- Akkan, T., 2009.** İskenderun Körfezi'ndeki Gr (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmid Profillerinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 86 s., 49.
- Aktan, Y., Tan, S. and Içgen, B., 2013.** Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. Environmental Monitoring and Assessment, 185, 5285-5293. DOI: 10.1007/s10661-012-2945-x.
- Arlı, B., 2018.** Tatlısu İstakozunda (*Astacus leptodactylus*) Yanık Leke Hastalığı Etkeni *Fusarium avenaceum*'un PCR Yöntemi İle Teşhisi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Türkiye. 73s.
- Avşar, C. and Berber, İ., 2014.** Plasmid profiling and antibiotics resistance of *Escherichia coli* strains isolated from *Mytilus galloprovincialis* and seawater. Journal of Coastal Life Medicine, 2, 689-693. DOI: 10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2014-0069.
- Baltas, H., Sirin, M., Dalgic, G., Yılmaz Bayrak, E. and Akdeniz, A., 2017.** Assessment of metal concentrations (Cu, Zn, and Pb) in seawater, sediment and biota samples in the coastal area of Eastern Black Sea, Turkey. Marine Pollution Bulletin, 122, 475-482. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.059.

- Başçınar, S., 2009.** Bentik canlılar ve biyoindikatör tür. Yunus Araştırma Bülteni, 5-8.
- Bat, L. and Öztekin, H.C., 2016.** Heavy metals in *Mytilus galloprovincialis*, *Rapana venosa* and *Eriphia verrucosa* from the Black Sea coasts of Turkey as bioindicators of pollution. *Walailak Journal of Science and Technology*, 13, 715-728.
- Bilecik, N., 1990.** Distribution of Sea Snail *Rapana venosa* (V.) in the Turkish Coast of Black Sea and its impact on Black Sea fisheries. *Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Yayınları*. No: 1. Seri B. Bodrum, Turkey.
- Bilgin, M. ve Uluturhan Suzer, E., 2015.** Homa Dalyanı'nda (İzmir Körfezi) dağılım gösteren *Mytilus galloprovincialis* ve *Tapes decussatus* (Bivalvia) türlerinde ağır metal birikimlerinin incelenmesi. *Su Ürünleri Dergisi*, 32, 1-8. DOI: 10.12714/egejfas.2015.32.1.01.
- Bombace, G., Fabi, G., Fiorentini, L. and Speranza, S., 1994.** Analysis of the efficacy of artificial reefs located in five different areas of the Adriatic Sea. Fifth International Conference on Aquatic Habitat Enhancement. *Bulletin of Marine Science*, 55, 559-580.
- Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E. and Andreoni, V., 2010.** Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Systematic and Applied Microbiology*, 33, 154-164. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.02.004.
- Chihomvu, P., Stegmann, P. and Pillay, M., 2015.** Characterization and structure prediction of partial length protein sequences of *pcoA*, *pcoR* and *chrB* genes from heavy metal resistant bacteria from the Klip River, South Africa. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 7352-7374. DOI: 10.3390/ijms16047352.
- CLSI, 2018.** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11. Baskı, Standard M07, Wayne, PA, USA, 112 p.
- Drapkin, E., 1963.** Effect of *Rapana bezoar* Linné (Mollusca, Muricidae) on the Black Sea fauna. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 151, 700-703.
- Elbeshti, R.T.A., Elderwish, N.M., Abdelali, K.M.K. and Taştan, Y., 2018.** Effects of heavy metals on fish. *Menba Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 4, 36-47.
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J. and Fry, J.C., 2003.** Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3223-3230. DOI: 10.1128/AEM.69.6.3223-3230.2003.
- Figueras, A.J., 1989.** Mussel culture in Spain and France. *World Aquaculture*, 20, 8-17.

- Gedik, K., 2018a.** Bioaccessibility of Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, and Zn in Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) along the southeastern Black Sea coast. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 24, 754-766. DOI: 10.1080/10807039.2017.1398632.
- Gedik, K., 2018b.** Bioaccessibility of heavy metals in rapa whelk *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846): Assessing human health risk using an in vitro digestion model. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 24, 202-213. DOI: 10.1080/10807039.2017.1373329.
- Gouletquer, P.T., Joly, J.P., LeGagneur, E. and Ruelle, F., 1994.** Mussel (*Mytilus edulis*) culture along the Normandy coastline (France): Stock assessment and growth monitoring. ICES Statutory Meeting, Shellfish Committee, K:10, 1-11.
- Gül Şeker, M., 2009.** Marmara Denizi ve Karadeniz 'den İzole Edilen Bakterilerin Saflaştırılması ve Tanımlanması. Doktora Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye, 304 s. 111.
- Boran, H., Terzi, E., Altinok, I., Capkin, E. and Bascinar, N., 2013.** Bacterial diseases of cultured Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages. Aquaculture, 396, 8-13. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.025.
- Harding, J.M. and Mann, R., 1999.** Observations on the biology of the veined rapa whelk, *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) in the Chesapeake Bay. Journal of Shellfish Research, 18, 9-17.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. and Boudabous, A., 1998.** Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Bioresource Technology, 64, 7-15. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00161-2.
- Kayhan, F.E., Sesal, N.C. ve Güldür, S., 2016.** Kara midye'lerin (*Mytilus galloprovincialis*) Gram-negatif bakteri florasının tespiti. Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 2, 66-69. DOI: 10.7240/mufbed.79713.
- Kazancı, N. ve Girgin, S., 1998.** Sucul ekosistemlerin çevre kalitesi yönünden değerlendirilmesi ve izlenmesinde üç temel biyolojik yaklaşım. Doğu Anadolu Bölgesi 3. Su Ürünleri Sempozyumu, Erzurum, 10-12 Haziran, 51-64.
- Knudsen, S., Zengin, M. and Koçak, M.H., 2010.** Identifying drivers for fishing pressure. A multidisciplinary study of trawl and sea snail fisheries in Samsun, Black Sea coast of Turkey. Ocean and Coastal Management, 53, 252-269. DOI: 10.1016/j.ocecoaman.2010.04.008.
- Kobyay, Y. ve Yeşilkanat, C.M., 2017.** Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki bazı doğal kaynak sularının elemental analizi ve haritalandırılması ile çevre ve insan sağlığına etkilerinin araştırılması. Doğal Afetler ve Çevre Dergisi, 3, 28-38. DOI: 10.21324/dacd.279037.

- Kristan, U., Kanduc, T., Osterc, O., Slejkovec, Z., Ramsak, A. and Stibilj, V., 2014.** Assessment of pollution level using *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species: The case of the Gulf of Trieste. *Marine Pollution Bulletin*, 89, 455-463. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.09.046.
- Lök, A., 2001.** İskele-Urla'da (İzmir Körfezi) kültüre alınan farklı boy gruplarındaki midyelerin (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) büyüme oranları. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 18, 141-147.
- Matyar, F., Eraslan, B., Akkan, T., Kaya, A. ve Dinçer, S., 2009.** İskenderun Körfezi balıklarından izole edilen bakterilerde antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin araştırılması. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2, 1-5.
- Misra, T.K., Brown, N.L., Fritzinger, D.C., Pridmore, R.D., Barnes, W.M., Haberstroh, L. and Silver, S., 1984.** Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 5975-5979.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B., 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 142-201. DOI: 10.1128/CMR.11.1.142.
- Nies, A., Nies, D.H. and Silver, S., 1990.** Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 5648-5653.
- Nieto, J.J., Ventosa, A. and Ruiz-Berraquero, F., 1987.** Susceptibility of halobacteria to heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1199-1202.
- Nithya, C., Gnanalakshmi, B. And Karutha Pandian, S.K., 2011.** Assessment and characterization of heavy metal resistance in Palk Bay sediment bacteria, *Marine Environmental Research*, 71, 283-294. DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.02.003.
- Pastorio, G., Penchaszadeh, P.E., Schejter, L. and Bremec, C., 2000.** *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Mollusca: Muricidae): A new gastropod in South Atlantic waters. *Journal of Shellfish Research*, 19, 897-899.
- Persing, D.H., 1991.** Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1281-1285.
- Phillips, D.J.H., 1995.** The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 31, 193-200. DOI: 10.1016/0025-326X(95)00194-R.
- Sağlam, H., 2007.** Son 20 yılda salyangoz avcılığı. *Yunus Araştırma Bülteni*, 7, 8-9.

- Sağlam, H., Kutlu, S., Dağtekin, M., Başçınar, S., Şahin, A., Selen, H. and Düzgüneş, E., 2015.** Population biology of *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda: Neogastropoda) in the South-Eastern Black Sea of Turkey. *Cahiers de Biologie Marine*, 56, 363-368.
- Sipahi, N., 2012.** Giresun İli'nde Tüketime Sunulan Balıklardan İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Antibiyotik Ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi. Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun, Türkiye, 55 s., 11.
- Sönmez, A.Y., Hisar, O., Karataş, M., Arslan, G. ve Aras, M.S., 2008.** Sular Bilgisi. Nobel Yayın Dağıtım, 1. Baskı, ISBN: 978-605-395-054-7, 201 s.
- Şensoy Karaoğlu, Ş., 2013.** Rize İli Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Bakteriyosin İçeriklerinin, Aktarılabılır Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 102 s., 11.
- Terzi, E., 2018.** Antimicrobial resistance profiles and tetracycline resistance genes of *Escherichia coli* in Mediterranean mussel and sea snails collected from the Eastern Black Sea (Turkey). *Alinteri Journal of Agriculture Sciences*. 33, 43-49. DOI: 10.28955/alinterizbd.355019.
- Toroğlu, S., 2003.** Aksu (Kahramanmaraş) Nehri'nin Bakteriyolojik Kirlilik Düzeyinin Belirlenmesi ve *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençliliği. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 183 s., 108.
- Trajanovska, S., Britz, M.L. and Bhave, M., 1997.** Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation*, 8, 113-124.
- Tsi, C.Y., Ma, X.T., Lou, Z.K. and Zhang, F.S., 1983.** Illustrations of the fauna of China (Mollusca). Science Press, 2, 1-150.
- TÜİK, 2018.** Türkiye İstatistik Kurumu. Su Ürünleri İstatistikleri. Ankara.
- Uluturhan, E. and Kucuksezgin, F., 2007.** Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Water Research*, 41, 1185-1192. DOI: 10.1016/j.watres.2006.11.044.
- Ünsal, S., Çelikkale, M.S., Demirel, O., Karaçam, H. ve Candeğer, A.F., 1989.** Doğu Karadeniz'de *Rapana thomasi* Crosse'un biyolojik özellikleri, besin değerleri ve işleme değerlendirmeleri üzerine araştırmalar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilim ve Teknolojisi Yüksekokulu, 86. 101. 010. 2 nolu proje raporu, Trabzon, 47 s.

Yavuz, O. Ve Sarigül, N., 2016. Toprak ve Sucul Ortamlardaki Ağır Metal Kirliliği ve Ağır Metal Dirençli Mikroorganizmalar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7, 44-51. DOI: 10.29048/makufebed.206609.

Yang, Z. and Chu, C., 2011. Towards understanding plant response to heavy metal stress. In Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. InTech. ISBN: 978-953-307-394-1, 428 s., Shanker, A., (Ed.), 59-78.



ÖZGEÇMİŞ

Fatih CİVELEK, 04/01/1983 tarihinde Rize’de doğdu. İlköğretimini 1997 yılında Rize’de Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu’nda ve Ortaöğretimini 2000 yılında Rize’de Mimar Sinan Endüstri Meslek Lisesi’nde tamamladı. 2002 tarihinde başladığı lisans eğitimini 2007 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü’nde tamamladı. 2016 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. Rize Belediyesi’nde Su Ürünleri Mühendisi olarak 2008 yılı itibarıyla görev yapmaktadır. Orta seviyede İngilizce bilen Fatih Civelek, evli ve 2 çocuk babasıdır.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;

Terzi, E. and Civelek, F., 2018. Cu, Cd, As and Hg resistance in *Escherichia coli* in coastal marine environment of Eastern Black Sea, Turkey, International Congress on Engineering and Life Science, Kastamonu, 26-29 April, 327.