



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JENERİK *Escherichia coli* POPÜLASYONUNUN
TARIMSAL SULARDA HIZLI TESPİTİ İÇİN
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ

Rabia ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Ocak-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JENERİK *Escherichia coli* POPÜLASYONUNUN
TARIMSAL SULARDA HIZLI TESPİTİ İÇİN
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ

Rabia ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ

Ocak-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

RABİA ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “Jenerik *Escherichia coli* Popülasyonunun Tarımsal Sularda Hızlı Tespiti İçin Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 26/12/22 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Güvenliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeler

İmza

Başkan

Doç. Dr. Sedat BOZARI
Muş Alparslan Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik

.....

Danışman

Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ
Muş Alparslan Üniversitesi,
Mühendislik-Mimarlık Fakültesi,
Gıda Mühendisliği

.....

Üye

Doç. Dr. İlker AVAN
Eskişehir Teknik Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Kimya Bölümü

.....

Yukarıdaki sonuç;
Enstitü Yönetim Kurulu/...../..... Tarih ve/..... nolu kararı
ile onaylanmıştır.

Sedat BOZARI
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimini tarafından BAP-21-MMF-4902-03 nolu proje ile desteklenmiştir

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Rabia ÖZTÜRK

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

JENERİK *Escherichia coli* POPÜLASYONUNUN TARIMSAL SULARDA HIZLI TESPİTİ İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Rabia ÖZTÜRK

Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ

Bu çalışmanın amacı, tarımsal suların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem geliştirilmesidir. Dört farklı kaynaktan alınan tarımsal su numunelerinde jenerik *Escherichia coli* popülasyonuna bakıldı. Geliştirilen spektrofotometrik model üzerinden belirlenmiş jenerik *E. coli* popülasyonlarının sonuçları ile geleneksel kültür tabanlı yöntemlerin [en muhtemel sayı (log MPN/100 mL), membran filtrasyon (log CFU/100 mL)] sonuçları arasındaki korelasyon karşılaştırıldı. Araştırma sonucunda inkübasyon zamanına bağlı (saat) kromajenik boya (DMSO) ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik (632 nm) okuma bazlı referans jenerik *E. coli* modelleri için hesaplanan R^2 değerleri ATCC 25922 suşunda 12 saat sonunda ($R^2=0.9195$), ATCC 35128 suşunda ise 10 saat sonunda ($R^2=0.8647$) bulundu. Ayrıca ekstraksiyon sonrası, OD_{632} okuma bazlı jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşlarından elde edilen modellerle, hesaplanan popülasyonları arasında yüksek lineer korelasyon ($R^2=1.00$) tespit edildi. Elde edilen sonuçlarda tarımsal su numunelerinde jenerik *E. coli* popülasyonlarının belirlenmesinde kullanılan membran filtrasyon yöntemi ile geliştirilen spektrofotometrik yöntem arasındaki korelasyon orta yüksek bulundu ($R^2=0.684$). Tarımsal sularda jenerik *E. coli*'nin tespitinde kullanılan membran filtrasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar, geliştirilen spektrofotometrik okuma bazlı yöntemle yakın değerler göstermiştir. Geliştirilen spektrofotometrik yöntem, tarımsal sularda jenerik *E. coli* popülasyonunun hızlı tespitinde kullanılabilir.

2023, 73 Sayfa

Anahtar Kelimeler: İndikatör mikroorganizmalar, Jenerik *Escherichia coli*, Kromajenik besi yeri, Membran filtrasyon, Spektrofotometrik yöntem, Tarımsal sular

ABSTRACT

MASTER THESIS

DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR RAPID DETERMINATION OF GENERIC *Escherichia coli* POPULATION IN AGRICULTURAL WATERS

Rabia ÖZTÜRK

Muş Alparslan University
Natural and Applied Science
Department of Food Safety

Advisor: Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ

This study aims to develop a spectrophotometric method for determining the microbiological quality of agricultural waters. Generic *Escherichia coli* populations in four different agricultural water sources. Results of generic *E. coli* populations determined through the developed spectrophotometric model and traditional culture-based methods [most probable number (log MPN/100 mL), membrane filtration (log CFU/100 mL)] results were compared. After (DMSO) extraction, a high linear correlation between populations calculated by models derived from generic *E. coli* strains ATCC 25922 and ATCC 35218 based on OD₆₃₂ reads at 12 hours ($R^2=0.9195$) and ATCC 35218 at 10 hours ($R^2=0.8647$). The correlation between the membrane filtration method used in the determination of the scattering and the developed spectrophotometric method was found to be moderately high ($R^2=0.684$). The results obtained with the membrane filtration method used in the detection of generic *E. coli* in agricultural waters showed close values to the results obtained with the developed spectrophotometric reading-based method. The developed spectrophotometric method can be used for rapid detection of the generic *E. coli* population in agricultural waters.

2023, 73 Pages

Keywords: Agricultural waters, Chromagenic medium, Generic *Escherichia coli*, Indicator microorganisms, Membrane filtration, Spectrophotometric method

TEŞEKKÜR

“Jenerik *Escherichia coli* popülasyonunun tarımsal sularda hızlı tespiti için spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi” adlı bu çalışma Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Güvenliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışma, Muş Alparslan Üniversitesi-Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından BAP-21-MMF-4902-03 numaralı proje kapsamında finanse edilmiştir.

Tez konumun belirlenmesinden, yazımına kadar ki süreçte, tecrübesiyle bana yol gösteren, her konuda engin hoşgörüsüyle bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Zeynal TOPALCENGİZ’e teşekkürlerimi sunarım. Tezimin yazımında ve düzenlemesinde ayrıca laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Sedat BOZARI ve Dr. Öğretim Üyesi Harun ÖNLÜ ve Öğr. Gör. Sefa IŞIK’a teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini esirgemeyen, beni yetiştiren babam Mehmet ARSLAN ve annem Lütfiye ARSLAN’a, her daim yanımda olan eşim Fatih ÖZTÜRK ve oğlum Ömer Asaf ÖZTÜRK’e teşekkürlerimi borç bilirim.

Rabia ÖZTÜRK
MUŞ-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ ya da TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1 Tarımsal Sular.....	6
2.2 Tarımsal Sularda Görülen Mikroorganizmalar	12
2.3 Tarımsal Sularda Mikroorganizmaların Mekânsal ve Zamansal Değişimi	14
2.4 Tarımsal Sularda Patojen-İndikatör Mikroorganizmaların Akıbeti ve Taşınması	15
2.5 Tarımsal Sularda Patojen ve İndikatör Mikroorganizmaların Sağ Kalımı	17
2.6 Patojen ve İndikatör Mikroorganizma Arasındaki İlişki	19
2.7 İndikatör Mikroorganizmalar İçin İdeal Kriterler.....	20
2.8 İndikatör Mikroorganizmalar.....	22
2.8.1 Koliformlar	23
2.8.2. <i>Escherichia coli</i>	25
2.8.3 Fekal Streptokok ve Enterokoklar	26
2.8.4 Bakteriofajlar	27
2.9 Tarımsal Sularda Patojen ve İndikatör Mikroorganizmaların Aranmasında Kullanılan Yöntemler	28
2.9.1 Geleneksel Yöntemler.....	28
2.9.1.1 En Muhtemel Sayı Yöntemi	29
2.9.1.2 Membran Filtrasyon Yöntemi.....	30
2.9.2 Alternatif Mikrobiyolojik Yöntemler	32
2.9.2.1 İmmünolojik Yöntemler	32
2.9.2.1.1 İmmünomanyetik Ayırma (IMS) Yöntemi	32
2.9.2.1.2 Enzim Bağlı İmmünosorbent (ELISA) Yöntemi	33
2.9.2.1.3 İmmünofloresan (IF) Yöntemi.....	34
2.9.2.2 Nükleik Asit Temelli Yöntemler	34
2.9.2.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) Yöntemi.....	35
2.9.2.2.2 FISH (Floresan Yerde Hibridizasyon) Yöntemi.....	36
2.9.2.3 Patojen Tespitinde Biyosensörler	36
2.9.2.4 Spektrofotometrik Yöntemler	37
2.9.2.4.1 Mikrodizilim ve Kütle Spektrometrisi.....	38
2.9.2.4.2 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Raman Spektroskopisi.....	38
2.9.2.5 Biyoluminesans Yöntemi ve Mikroplaka Okuyucular	39

3. MATERYAL ve YÖNTEM	41
3.1 Suşlar ve İnokulum Hazırlanması	41
3.2 Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi	41
3.3 Dalga Boyunun Maksimum Absorbans İçin Belirlenmesi	42
3.4 Spektrofotometrik Yöntem Zaman Konsantrasyon Ölçümlerinin Alınması	42
3.5 Spektrofotometrik Yöntemin Tarımsal Su Örnekleri için Performansının Değerlendirilmesi.....	42
3.6 İndikatör Mikroorganizma Olarak Jenerik <i>Escherichia coli</i> Sayımı	43
3.7 Membran Sayımı Yöntemiyle Jenerik <i>Escherichia coli</i> Popülasyonlarının Belirlenmesi	44
3.8 En Muhtemel Sayı Yöntemiyle Jenerik <i>Escherichia coli</i> Popülasyonlarının Belirlenmesi	44
3.9 İstatistiksel Analiz.....	44
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	45
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	58

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

L	: Litre
Mg ⁺²	: Magnezyum iyonu
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
µm	: Mikrometre
R ²	: Korelasyon Katsayısı
°C	: Santigrat Derece

Kısaltmalar

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
a _w	: Su Aktivitesi
ASM	: Amerikan Mikrobiyoloji Derneği
ATP	: Adenozin Trifosfat
BGLB	: Brilliant Green Lactose Bile
CDC	: Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
DAEC	: Dağınık Yapışan <i>E. coli</i>
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
ECA	: Enterobakteriyel Yaygın Antijen
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
FRNA	: Somatik kolifaj, erkeğe özgü RNA kolifajları
FC	: Fekal Koliform
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FIB	: Fekal İndikatör Bakterileri
FS	: Fekal Streptokok
FISH	: Floresan Yerde Hibridizasyon
FSMA	: Gıda Güvenliği Modernizasyon Yasası
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GY	: Göl Yurt
GB	: Göl Balık
HUS	: Hemolitik Üremik Sendrom
IF	: İmmünofloresan
IMS	: İmmünomanyetik Ayırma
K	: Karasu Çayı
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
LST	: Lauril Sülfat Triptoz
M	: Murat Nehri
MF	: Membran Filtrasyon

MPN	: En Muhtemel Sayı
MSC	: Erkeğe Özgü (F+) Kolifaj
MST	: Mikrobiyal Kaynak Takibi
NACNCF	: Gıdalar için Mikrobiyolojik Kriterler Ulusal Danışma Komitesi
NPS	: Noktasal Olmayan Kaynak Kirliliği
OD	: Optik Yoğunluk
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Asitlik- Bazlık Derecesi
RNA	: Ribonükleik Asit
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SRC	: Sülfite Azaltıcı Clostridia
STEC	: Shiga toksin üreten <i>Escherichia coli</i>
TSE	: Türkiye Standartları Enstitüsü
Q-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QMRA	: Nicel (Kantitatif) Mikrobiyal Risk Değerlendirilmesi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
VRBA	: Violet Red Bile Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Meyve ve sebzelerin sahada insan enterik patojenleri ile kontaminasyonuna katkıda bulunabilecek faktörler .	10
Şekil 2. Sulama sularının mikrobiyal kalitesini etkileyen proseslerin düzeni	16
Şekil 3. Bir indikatör organizma ile ilgili patojen(ler) arasındaki idealleştirilmiş ilişki.	21
Şekil 4. Su numunelerinde koliformlar için bir MPN testi gerçekleştirme prosedürü: (A) varsayımsal test ve (B) doğrulanmış test	29
Şekil 5. Vakum filtrasyonu kullanarak bir su numunesindeki koliform sayısını belirlemek için membran filtrasyon yöntemi	31
Şekil 6. Microplate üzerindeki kromajenik boyanın ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik yöntem- zaman konsantrasyon ölçümler için hazırlık aşamasının son adımı	43
Şekil 7. Kromajenik boyanın hücre dokularından ekstraksiyonundan sonra spektrofotometre ile alınan bölgesel (400-800) ve tam (190-1100) dalga boyu taramalarının sonuçları.	48
Şekil 8. Microplate üzerindeki kromajenik boyanın ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorbands (632 nm) ölçümleri için hazırlanan popülasyon – inkübasyon zaman (saat) düzenlemesinin örnek resmi.	49
Şekil 9. Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşlarının popülasyonlarının ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorbands (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümleri.	50
Şekil 10. Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşları için ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı inkübasyon zamanına (saat) bağlı absorbands (632 nm) – popülasyon (log CFU/mL) kromajenik boya lineer korelasyon modeller	51
Şekil 11. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı ölçülen absorbands değerleri (632 nm) ile Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 modelleri ile hesaplanan Jenerik <i>E. coli</i> popülasyonları arasındaki lineer korelasyon	52
Şekil 12. Farklı kaynaklardan elde edilen tarımsal su örneklerindeki jenerik <i>E. coli</i> popülasyonlarının laboratuvar bazlı en muhtemel sayı (MPN/100 mL) ve membran filtrasyon (CFU/100 mL) ve spektrofotometrik okuma (632 nm) bazlı referans jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 suş modelleri üzerinden belirlenmiş değerleri arasındaki lineer korelasyonlar	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Sulamada kullanılan farklı su kaynakları arasındaki karşılaştırma	8
Çizelge 2. Arıtılmamış atık suda potansiyel olarak bulunan bulaşıcı ajanlar.....	12
Çizelge 3. İndikatör ve indeks mikroorganizmalar	22
Çizelge 4. Enterobacteriaceae ailesindeki koliform bakteriler	24
Çizelge 5. Mikroplate üzerindeki ölçüm için hazırlanan popülasyon – inkübasyon zaman (saat) düzenlemesi.	49
Çizelge 6. Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşları için inkübasyon zamanına (saat) bağlı ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorban (632 nm) – popülasyon modelleri için hesaplanan R^2 ve elde edilen lineer denklemler.	52
Çizelge 7. Farklı kaynaklardan elde edilen tarımsal su örneklerindeki jenerik <i>E. coli</i> popülasyonlarının laboratuvar bazlı en muhtemel sayısı (log MPN/100 mL) ve membran filtrasyon (log CFU/100 mL) ve 10 saat inkübasyon ve kromajenik boya ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı referans jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 suş modelleri üzerinden belirlenmiş değerleri.	53
Çizelge 8. Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşları için 10 saat inkübasyon ve kromajenik boya ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorban (632 nm) – popülasyon kromajenik boya modelleri için hesaplanan lineer R^2 korelasyonları.....	55
Çizelge 9. Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 25922 suşu ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı için absorban (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümlerinin ortalama ve standart sapmaları.	56
Çizelge 10. Jenerik <i>E. coli</i> ATCC 35218 suşu ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı için absorban (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümlerinin ortalama ve standart sapmaları.	56

1. GİRİŞ

Mikrobiyal su kalitesinin yönetimi; rekreasyon, su ürünleri yetiştiriciliği, tarım amaçlı sulamalar ve içme suyu kaynaklarında insan sağlığının korunması için uzun süredir devam eden bir geçmişe sahiptir. Nüfustaki artış, toplumların sosyal, ekonomik, kültürel yapılarındaki değişim ve tarım teknolojisindeki ilerlemeler, tarım endüstrisindeki ekim talebini ve tarımsal su ihtiyacını arttırmıştır. Tarımsal üretimdeki bu büyüme, toprak ve su yollarını kirleten kirleticilerin de artışına neden olmuştur (Armağan ve Özdoğan, 2005; CDC, 2016c; Partyka ve ark., 2018a).

Resmî Gazete'nin 31.12.2004 tarihli ve 25687 sayılı "Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği"nde su kalitesi kriterleri: *"Kullanım amaçlarının belirlenmiş olup olmadığına bakılmaksızın bütün su kaynaklarının dengeli ve sağlıklı ortamlar olarak muhafazası esasına göre, su kaynaklarının korunmasına ve kullanım planlanmasına temel teşkil etmek üzere, yapılmış veya yapılacak kullanım sınıflarına uygunluk açısından su kaynaklarından beklenen fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler"* şeklinde; su kirliliği ise: *"Su kaynağının kimyasal, fiziksel, bakteriyolojik, radyoaktif ve ekolojik özelliklerinin olumsuz yönde değişmesi şeklinde gözlenen ve doğrudan veya dolaylı yoldan biyolojik kaynaklarda, insan sağlığında, balıkçılıkta, su kalitesinde ve suyun diğer amaçlarla kullanılmasında engelleyici bozulmalar yaratacak madde veya enerji atıklarının boşaltılmasını..."* şeklinde tanımlanmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'na göre, noktasal olmayan kaynak (NPS) kirliliği: *"Endüstriyel ve kanalizasyon arıtma tesislerinden kaynaklanan kirliliğin aksine, birçok yaygın kaynaktan gelir. NPS kirliliği, yağmurun veya kar erimesinin zeminde hareket etmesinden kaynaklanır. Akış hareket ettikçe, doğal ve insan yapımı kirleticileri alıp götürür ve sonunda onları göllere, nehirlere, sulak alanlara, kıyı sularına ve yer altı sularına bırakır."* Şeklinde ifade edilmiştir. NPS kirliliği, genellikle arazi akışı, yağış, atmosferik birikim, drenaj, sızıntı veya hidrolojik modifikasyondan kaynaklanır (EPA, 2022).

Kirlenmiş su; ishal, kolera, dizanteri, tifo ve Gine kurdu gibi enfeksiyonların bulaşması için taşıyıcı bir mekanizma görevi görür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), insan sağlığını korumak ve geliştirmek amacıyla 2013-2020 yıllarını kapsayan "Su Kalitesi ve Sağlık Stratejisi" başlıklı rapora göre 2011 yılında tüm kıtalardan toplam 58 ülke de 589.854 kolera vakası olduğunu bildirmiştir (WHO, 2013).

Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC), gıda kaynaklı hastalık salgınına “aynı kontamine yiyecek veya içecekten, iki veya daha fazla kişinin aynı hastalığa yakalanması” olarak ifade etmektedir (CDC, 2019). 1995 yılında Gıdalar için Mikrobiyolojik Kriterler Ulusal Danışma Komitesi (NACNCF) gıda kaynaklı hastalık ve taze ürün vakaları arasındaki ilişkinin araştırılmasını ve karakterize edilmesini ayrıca gıda kaynaklı salgın riskini azalmak için önerilerin sunulmasını istemiştir. Komite mevcut epidemiyolojik verileri, salgınla ilişkili organizmaların mikrobiyal ekolojisini gözden geçirmiş ve büyüme, hasat, paketlenme ve dağıtım için kullanılan mevcut endüstri uygulamalarını dikkate almıştır. *Salmonella* salgınları epidemiyolojik olarak kavun, karpuz, domates, marul, kereviz, yonca filizi, maydanoz, pastörize edilmemiş portakal suyu ve diğer çiğ salata sebzeleri tüketimi ile ilişkili bulunmuştur (De Roever 1998; Duffy ve ark., 2005).

CDC, 2006’dan günümüze sebze ve meyve tüketiminden kaynaklı salgınlara neden olan başlıca mikroorganizmaları; Shiga toksin üreten *Escherichia coli* (STEC) (yonca filizi, taze ıspanak vd.), *Listeria monocytogenes* (enoki mantarı, fasulye filizi vd.), *Salmonella* (domates, fıstık ezmesi vd.), *Cyclospora* (taze fesleğen vd.), Hepatit A virüsü (dondurulmuş çilek, narçiçeği) olarak listelemiştir. 2006 Ağustos-Eylül aylarında Kaliforniya’da *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 salgını meydana gelmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve CDC salgının, sulama sırasında kontamine olmuş taze ıspanak tüketimi ile ilişkili olduğu bildirmiştir (Gelting ve ark., 2011; CDC, 2022b). Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD), 2006 yılından bu yana *E. coli* O157:H7 salgınlarını marul, ıspanak, yemeğe hazır salata, ham yonca filizi ve yapraklı yeşilliklerin tüketimiyle ilişkilendirmiştir. 2018 yılında roman marulu tüketimiyle ilişkili iki farklı *E. coli* O157:H7 salgınının geri izleme soruşturmalarında, *E. coli* O157:H7 salgın suşu, bir çiftlikteki tarımsal su rezervuarındaki tortuda ve kanaldan alınan su örneklerinde tespit edilmiştir (CDC, 2022a).

Taze ürünlerde patojenlerin hayatta kalmasını ve büyümesini içsel, dışsal ve örtük faktörler gibi belirli faktörlerin yanı sıra bu faktörler arasındaki karmaşık etkileşimler etkileyebilir. İçsel faktörler, ürünün türünü ve antimikrobiyal maddelerin varlığını içerirken dış faktörler; yetiştirme veya hasat sırasında tarladaki sıcaklık veya koşullar gibi çevresel faktörleri içerir. Örtük faktörler ise; mikroorganizmalar, besin kaynakları, stres toleransı ve üründe içselleştirme yeteneği arasındaki rekabet veya etkileşimi içerebilmektedir (Banach ve Van Der Fels-Klerx, 2020).

FDA, Gıda Güvenliği Modernizasyon Yasası (FSMA) kapsamına tarımsal suyun, taze ürünlerin beş ana mikrobiyal kontaminasyon kaynağından birisi olarak açıklamıştır. Tarımsal su, taze ürünlerin yetiştiriciliğinde ve hayvancılığın sürdürülebilmesi için kullanılan su olarak tanımlanır (FDA, 2015; CDC, 2016a). Genellikle sulama için kullanılan tarımsal suyun (arıtılmış ya da arıtılmamış atık su, yüzey suları, yeraltı suları, yağmur suyu vb.) kalitesi suyun kaynağına, ülkenin gelişmişlik düzeyine ve iklimine bağlıdır (Iwu ve Okoh, 2019). Tarımsal su yoluyla organik ve konvansiyonel ürün üretim sistemlerinde enterik patojen prevalansını araştıran birçok çalışma olmasına rağmen, akuaponik ve hidroponik sistemlerdeki prevalansı araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Tarımsal suda patojen mikroorganizmaların varlığı ve konsantrasyonu; su kaynağının konumu ve türünden, sulama ve hasat arasındaki süreden, sulama suyunun dağıtım yönteminden ve suyunun etrafındaki tarımsal faaliyetlerden, vahşi hayvanlardan, hava olaylarından, akıştan, yağıştan ve dipteki su ile temasta bulunan doğal mikrobiyal rezervuarlardan etkilenecek şekilde değişmektedir. Tarımsal suyun mikrobiyolojik güvenliği, belirli patojenlerin varlığı açısından analiz edilerek değerlendirilmelidir (Tyagi ve ark., 2006; Leifert ve ark., 2008; Topalcengiz, 2016; Weller ve ark., 2020). Yeraltı suyu kuyuları, göletler, nehirler, akarsular, belediye suyu ve geri kazanılmış su (arıtılmış atık su) gibi çeşitli tarımsal su kaynakları, potansiyel atık su girdilerinin çeşitliliği ile birleştiğinde, hem fekal indikatör bakterilerinin (FIB) hem de patojenlerin kaderini ve taşınmasını anlamaya ve ele almaya çalışırken karmaşık bir sorunla karşılaşmaktadır. Bu karmaşıklık içerisinde tarımsal suda bulunan tüm potansiyel patojenler için tek bir indikatör organizma olan *E. coli*'nin seçilmesi statüko olmuştur (Baker ve ark., 2021).

Tarımsal su kaynaklarında *Salmonella* spp. ve STEC patojenlerinin varlığı farklı bölgeler için bildirilmiştir. Tarımsal sularda jenerik *E. coli* popülasyon değişikliklerinin izlenmesi, tarımsal sudaki STEC sağkalımının bir göstergesidir. Tarımsal sularının STEC kontaminasyonunun, son zamanlardaki gıda kaynaklı hastalıklar ve yapraklı yeşillikleri içeren salgınlar için önemli bir faktör olabileceği ifade edilmiştir (Topalcengiz ve ark., 2017; Topalcengiz ve Danyluk, 2019; Maguire ve ark., 2021). Yapraklı yeşilliklerle ilişkili salgınların tekrarlayan doğası nedeniyle FDA ve kamu ve özel sektördeki ortakları, üç yönlü (Önleme, Müdahale ve Bilgi Boşluklarının Ele Alınması) yaklaşımla “2020 Yapraklı Yeşiller STEC Eylem Planı” geliştirerek yapraklı yeşillerin güvenliğini artırmayı ve yeşil yapraklı sebzelerin tüketimine bağlı gıda kaynaklı hastalıkların azaltılmasına yardımcı olmayı amaçlamıştır (FDA, 2022).

Tarımsal sürdürülebilirlik derecesini artırmak için model olarak indikatör mikroorganizmalar yol göstermektedir. Bu nedenle agro-ekosistem yönetimi için karar verme perspektifinde seçilen indikatör mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Tarımsal suların izlenmesinde *E. coli*, enterokok, kolifaj ve *Clostridium perfringens* önerilen dört indikatör mikroorganizmadır (Tyagi ve ark., 2006; Ghosh ve Chakma, 2019).

Elal Muş ve Çetinkaya (2017), Bursa ili ve ilçelerinde toplanan şebeke ve artezyen kuyu suyu numunelerinde membran filtrasyon tekniği ile enterokok, koliform, *E. coli*, *Salmonella* ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bakterilerinin varlığını araştırmıştır. Sonuç olarak, artezyen kuyu suyu örneklerinde koliform, *E. coli* ve enterokok kontaminasyon oranları %40'ın üzerinde tespit edilmiştir. Şebeke sularında kontaminasyon oranları *E. coli* ve enterokok % 2.5, koliform ise %12.6 olarak tespit edilmiştir. Bir adet artezyen kuyu suyu örneğinde *S. aureus* bulunurken, örneklerin hiç birinde *Salmonella* tespit edilmemiştir. Özgür (2013) yılında yapmış olduğu çalışmada fekal kirlilik indikatörü olarak koliform bakterilerin yanı sıra *Clostridium perfringens* bakterisinin de su numunelerinde fekal kirliliği etkin olarak gösterdiğini ve fekal indikatör bakteri ile patojen bakterilerin varlığının konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle saptanması arasında pozitif korelasyon olduğunu ifade etmiştir.

Tarımsal suyun mikrobiyal kalite analizi, geleneksel tanı yöntemlerinde mikroorganizmaların kültürde üretilmesine dayanmaktadır. Geleneksel yöntemlerinin dezavantajları yeni ve hızlı tanı yöntemlerini gerekli kılmıştır (Rodrigues ve Cunha, 2017). İçme ve kullanma sularında özellikle fekal koliform ve *E. coli* varlığının konvansiyonel yöntemler dışında farklı yöntemler kullanılarak hızlı tespiti birçok araştırma konusu olmuştur (Rıfaat, 2014; Savaş, 2018; Tanış, 2019). Minyatürize biyokimyasal tanımlama yöntemleri, immünolojiye bağlı yöntemler, moleküler ve enzimatik yöntemler, biyosensörler, spektrometrik yöntemler, mikropalak okuyucular ve diğer mikrobiyolojik hızlı tanı yöntemleri olmak üzere bir dizi alternatif mikrobiyolojik yöntem önerilmiştir.

Bu tezin amacı; son dönemlerde tarımda kullanılan su kaynakları, suyun mevzuata uygunluğu, mikrobiyal kalitesinin belirlenmesinde fekal kirliliğin göstergesi mikroorganizmaların varlığını ve tespitini yapılan çalışmalara dayanarak kapsamlı bir yaklaşım sunmaktır. Tarımsal suların mikrobiyal kalitesinin belirlenmesi için indikatör jenerik *Escherichia coli* popülasyonunun ölçülmesi referans olarak kabul edilmiştir. Jenerik *E. coli* popülasyonunun tespitinde birçok yöntem mevcut olup kullanılan

referans testler için incelemeler yapılmıştır. Kullanılan yöntemler en az 18 saatlik bir inkübasyon süreci gerektirmektedir. Geliştirilen yeni yöntemlerin daha hızlı, maliyetinin daha düşük ve çalışma şekillerinin basit bilgi ve birikimine dayanarak yapılmaması gibi spesifik özellikleri üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmada, kolay ve anlaşılır spektrofotometrik bir yöntem geliştirilerek *E. coli* popülasyonunun tarımsal sularda hızlı bir şekilde tespit edilmesi ve maliyetinin düşük bütçe ile yapılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Tarımsal Sular

Tarımsal su, tarımsal nedenlerle büyüyen ortamda (tarla, bağ veya meyve bahçesi) kullanılan suyu ifade eder. "Sulama suyu" olarak da adlandırılmaktadır. Sulama, terleme kontrolü (soğutma), dona karşı koruma veya gübre ve böcek ilaçları için bir taşıyıcı olarak kullanılan suyu ifade etmektedir. Tarımsal su; agronomi biliminde yetiştirmede kullanılan suyu temsil eder. Tipik tarımsal su kaynakları arasında nehirler, akarsular, sulama kanalları, açık kanallar, su birikintileri (havuzlar, rezervuarlar ve göller gibi) akan yüzey suları, kuyular ve belediye kaynakları bulunmaktadır (FDA, 1998b). Ayrıca sulama, meyve veya sebzenin kök bölgelerine ihtiyaç duyulan miktarda verilen suyu ifade etmektedir (Dorak ve ark., 2019).

Tarımsal sular; taze ürünlerin temas edebilir kısmına sulama veya mahsul koruma spreyleri (örneğin, güneş yanıklarından önleme, donmaya karşı koruma) şeklinde uygulanabilmektedir (Harris ve ark., 2012). Tarımsal suların hasat sonrası kullanım alanları; durulama, soğutma, yıkama, cilalama ve taşımadır. Çiftçiler için sulama suyu kaynağı, kaynakların mevcudiyetine ve su dağıtım kanallarının, göletlerin ve hendeklerin varlığına bağlı olarak değişmektedir. Suyun tedarik alanları bir veya birden fazla kaynaktan elde edilebilmektedir (Uyttendaele ve ark., 2015; Topalcengiz ve Danyluk, 2019). Çiftçiler, mahsul yetiştirmek için tarımsal suyu iki ana yolla kullanırlar. (I) Yağmurla beslenen tarım suyunun, doğrudan yağış yoluyla toprağa doğal olarak uygulanmasıdır. (II) Sulama suyunun, çeşitli tüpler, pompalar ve spreylere aracılığıyla toprağa yapay olarak uygulanmasıdır.

Sulama suyu; yeraltı suyundan, kaynak veya kuyulardan, yüzey suyundan hatta arıtılmış atık su veya tuzdan arındırılmış su gibi diğer su kaynaklardan gelmektedir (CDC, 2016b). Yeraltı suları; kuyuları, kaynakları, akarsu, göl ve deniz gibi su kütlelerini besleyen sudur. Kuyulardan ve nehirlerden çekilen yeraltı sularının (veya sondaj suyu) üçte ikisi, sulu tarımda kullanılmaktadır. Sondaj suyu mikrobiyal yük açısından yağmur suyuna göre daha az değişkenlik göstermektedir. Patojenler; septik deşarjlardan, kanalizasyon hatlarından veya göllerden, nehirlerden ve oksidasyon havuzlarından sızarak, yeraltı sularını kirletmektedir (Güler ve Çobanoğlu, 1997; Yeşilnacar ve ark., 2007; Özsoy, 2009; Gerba ve Rock, 2014; Uyttendaele ve ark., 2015). Yüzey suları, atık suların boşaltılması ve yağış olaylarından kaynaklanan akışın etkisi nedeniyle yeraltı sularına göre mikrobiyal kirliliğe daha yatkındır. Yüzey suyu;

dere, nehir, göl, rezervuar veya okyanusta biriken sudur. Yüzey suyu; yağış yoluyla sürekli olarak yenilenir, buharlaşma ve yeraltı suyu kaynaklarına sızma yoluyla kaybolur (Steele ve Odumeru, 2004; CDC, 2022c). Gelişmekte olan ülkelerde veya su kaynaklarının sınırlı olduğu ülkelerde atık su, sulama için kullanılmaktadır. Arıtılmamış atık su kaynağını kullanan çiftçiler ve aileleri parazitik solucanlar, virüsler ve bakterilerden kaynaklanan sağlık risklerine maruz kalmaktadır (Okafo ve ark., 2003; Pedrero ve ark., 2010). Sulama amaçlı kullanılan kanalizasyon ile kirlenmiş arıtılmamış atık su kaynaklarının içerisinde barındırdıkları patojen mikroorganizmalar ham ve taze ürünleri kirletmektedir. Bu nedenle atık su kaynaklarının kullanılmadan önce arıtılması gerekmektedir (Ensink ve ark., 2007; Castro-Rosas ve ark., 2012; Drechsel ve ark., 2015; Woldetsadik ve ark., 2018).

Yağmur suyu hasadı, sulamada alternatif su kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bilimsel anlamda yağmur suyu hasadı, yağmur suyunun toplanması ve depolanmasını ifade eder. Yağmur suyunun mikrobiyal kalitesi, toplanma veya taşınma yöntemine bağlıdır. Çatıdan toplanan yağmur suyunda, patojenik mikroorganizmaların varlığı bildirilmiştir. Olası kontaminasyon kaynakları arasında kuşlar, memeliler, sürüngenler ve vahşi hayvanlar bulunmaktadır. Yağmur suyunun kalitesini artırmak için filtreleme ve dezenfeksiyon ekipmanı gibi basit arıtma yöntemleri kullanılabilir (Che-Ani ve ark., 2009; Ahmed ve ark., 2012; Lee ve ark., 2016; Morgado ve ark., 2022). Yarı kurak bölgelerde sulama suyu ve yağmur suyu hasadının birlikte kullanılması, gerekli sulama suyu miktarlarını azaltmıştır. Bazı dönemlerde yağmur suyu hasadının ürünlerde kuraklık stresini azalttığı da bildirilmiştir (Wu ve ark., 2015; Wei ve ark., 2018). Bir ilk yıkama sistemi ile toplanan ve yüzey altı sulama yoluyla üretime uygulanan hasat edilen yağmur suyunun mevcut gıda güvenliği standartlarını karşıladığını ifade edilmiştir (Morgado ve ark., 2022). Nehirler, akarsular ve dereler öngörülemez su kalitesine sahiptir. Seyreltilmiş deniz suyunun, bazı ürünler için alternatif sulama kaynağı olarak kullanılabilirliği ifade edilmiştir (Ghadiri ve ark., 2006; Uyttendaele ve ark., 2015).

Su kaynağının kalite durumu göz önünde bulundurulduğunda en iyi sulama suyu belediye suyudur ardından yağmur suyu, yeraltı suyu, yüzey suyu ve arıtılmış atık su gelmektedir. Sulama için kullanılan farklı su kaynakları arasındaki karşılaştırmayı çizelge 1’ de belirtmiştir (Uyttendaele ve ark., 2015)

Çizelge 1. Sulamada kullanılan farklı su kaynakları arasındaki karşılaştırma (Uyttendaele ve ark., 2015)

	Şebeke Suyu	Yeraltı Suyu	Toplanan Yağış Suyu	Yüzeysel Suyu
Tanım	Su şirketleri tarafından sunulan içilebilir kalitede su	Yüzeydeki gözenekli yapılardan sızan sudur. Mevcut yüzeyin altındaki, sığ kuyular veya derin akiferler	Toplanan yağış suları (yağmur, kar...)	Çevreyle maruz kalan kaynaktan gelen sular, nehirler/kanallar/göller/açık kuyu
Kontaminasyon Kaynakları	Boru hatları, biyofilm	Septik sistemlerin bozulması, kanalizasyon hatlarının sızdırması, topraklardan ve çatlak arazi deşarjından geçerek yüzeysel suyunun etkilenmesi	Havza alanları toz, organik madde, yapraklar, kuş ve hayvan dışkısı	Aritilmiş atık su, ham kanalizasyon deşarjı, Belediye atık su, yağmur suyu akıntısı, kentsel akıntı ve tarımsal alanlar. Kuşlar, çiftlik hayvanları ve hatta insanlar, kirlenmeye hem dolaylı hem de doğrudan katkıda bulunur
Havanın Durum Etkisi	-----	Yoğun yağış, su akış sistemleri yönünde değişikliklere yol açabilir ve normalde oluşmayacak olan kanallardan akabilir ve bu da kontaminasyona neden olabilir.	Yağmur suyu sistemlerinde bulunan mikrobiyal profil, yerel çevre koşullarına ve rüzgarın yönüne/hızına bağlıdır. Daha uzun süren yağışlar, rezervuarlarda artan bakteri varlığına neden olur. Yağmur suyunun ilk yıkaması çoğu kirlenici maddeyi depolara taşır.	Fırtınalar, gelgitler veya kuvvetli rüzgarlar, tortu süspansiyonuna neden olur. Bakteriler askıya alınmasından dolayı, yüksek bakteri seviyeleri gözlenir. Şiddetli yağış veya fırtına nedeniyle kanalizasyon taşması yoluyla yüzeysel suyundeki organizmaların sayılarında artış gözlenir.

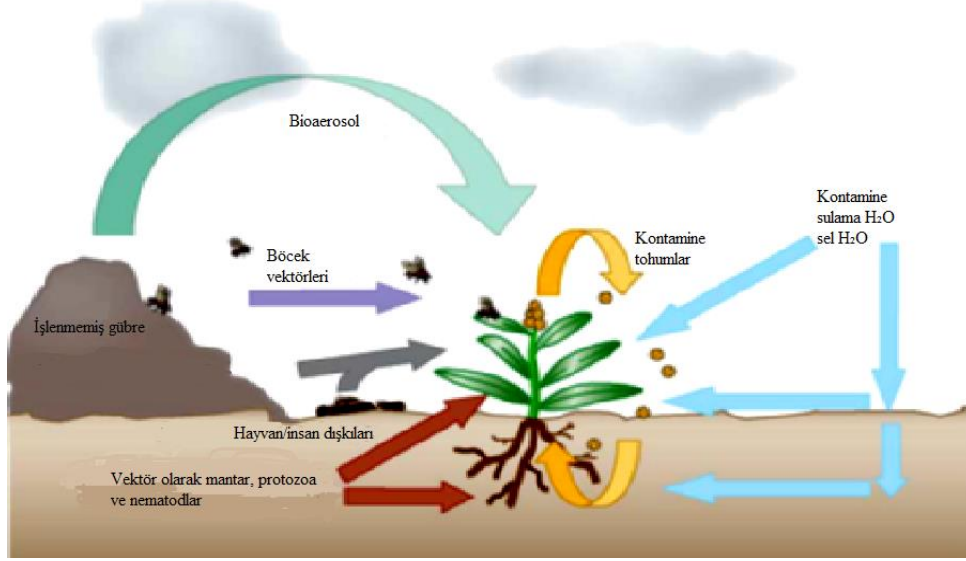
Sulama yöntemi ve ürün türü, mikroorganizmaların sulama yoluyla, sudan üretim yüzeylerine transferini etkilemiştir (Stine ve diğerleri 2005). Sulama yöntemleri, gelişmekte olan dünyadaki çok basit manuel uygulamalardan, gelişmiş dünyadaki daha sofistike mekanik uygulamalara kadar uzanmaktadır. Yaygın olarak kullanılan sulama yöntemleri arasında sulama kapları ve kovaları, yağmurlama sulama sistemleri, kanallarla sulama, damla sulama, hidroponik yetiştirme ve benzeri yöntemler gelişmiş dünyada kullanılmaya eğilimindedir (Uyttendaele ve ark., 2015).

Taze ürünlerin mikrobiyolojik kalitesi, büyük ölçüde kullanılan sulama türü ve su kaynağına bağlıdır. Uyttendaele ve ark., (2015) taze ürünlerin güvenliğinde su kalitesinin rolünü;

- (i) Patojen kontaminasyonu ve ardından gıda kaynaklı hastalık salgınlarında birincil üretimde veya hasatta suyun rolünü destekleyen epidemiyolojik kanıtlara,
- (ii) Mahsul üretimi sırasında sulama için kullanılan su kaynaklarına, yöntemlerine ve bunların mikrobiyolojik kalite üzerindeki etkilerine veya taze ürünlerin mikrobiyal kontaminasyonuna katkıda bulunma potansiyeline,
- (iii) Patojenlerin; suda, sulanan toprakta veya taze ürünlerde hayatta kalmasını etkileyen faktörlere,
- (iv) Taze ürünlerin güvenliğini sağlamak için mikrobiyolojik kriterler de dahil olmak üzere su kaynaklarının yönetimi ve su arıtımı için kontrol önlemleri ve yönergelerine,
- (v) Uygun su kalitesini sağlamak için test etme ve numune almanın önemine, dayanarak açıklanmıştır.

Çok sayıda hastalık salgını, kontamine taze ürünlerle ilişkilendirilmiştir (Holvoet ve ark., 2012; Goodburn ve Wallace, 2013; Karp ve ark., 2015). Yetiştiricilerin, ürün ve tarımsal yüzey suları ile teması en aza indiren sulama yöntemlerini kullanmaları önerilmiştir (Topalcengiz, 2016). Damlama veya yeraltı dip sulama yöntemleri, yenilebilir bitki dokusu ve sulama suyu (sıçramalar) arasında doğrudan teması sınırlar. Bu durum, daha az patojen mikroorganizma kontaminasyonuna neden olur. Damlama veya yeraltı dip sulama yöntemleri, daha az patojen teması nedeniyle yağmurlama veya karık sulama yöntemlerine göre daha güvenilir yöntemlerdir (Oron ve ark., 2001; Enriquez ve ark., 2003; Uyttendaele ve ark., 2015).

Patojen mikroorganizmaların çeşitli taze ürünlerin yüzeyine bağlanma, hayatta kalma ve büyüme yeteneği; patojenlerin metabolik faaliyetlerine, belirli bir ürün ögesinin sahip olduğu benzersiz içsel faktörler kümesine ve üretim, işleme, dağıtım veya hazırlamanın çeşitli aşamalarındaki dışsal ekolojik faktörlere bağlıdır. Mikroorganizmaların büyümesi için optimal bir su aktivitesi (a_w) ve pH değeri gerekmektedir. Çoğu bakteri, minimum a_w 0.90 ile 0.91 (*S. aureus* ve halotolerant bakteriler hariç) ve pH 7.0 civarında optimum büyüme gösterir. Ayrıca taze ürünlerde protein, yağ, mineral ve vitamin gibi farklı besin türlerinin varlığı patojen mikroorganizmaların gelişimini etkilemektedir (Banwart, 1989; Wadamori ve ark., 2017).



Şekil 1. Meyve ve sebzelerin sahada insan enterik patojenleri ile kontaminasyonuna katkıda bulunabilecek faktörler (Brandl, 2006).

Meyve ve sebzelerin hasat öncesi mikrobiyal kontaminasyon kaynakları sulama dışında; bioaerosoller¹, toprak, hayvan veya insan dışkısı, böcekler, fungusit ve böcek öldürücüler, toz, vahşi ve evcil hayvanlar, yetersiz kompost uygulanan gübre veya yüzey mikro tabakasından çıkan aerosoller gibi iletim yollarından etkilenebilir (Şekil 1). Doğrudan ekinlere püskürtülen sulama sularının, böcek öldürücüler ve fungusitleri karıştırmak için kullanılması, patojenik mikroorganizmalar tarafından yüzey kontaminasyon riskini artırabileceği bildirilmiştir (McAllister ve ark., 1996; Iwasa ve ark., 1999; Thurston- Enriquez ve ark. 2002; Beuchat, 2002; Buck ve ark., 2003; Aller ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda çiftlikte kullanılan kompostlanmamış veya uygunsuz şekilde kompostlanmış gübrenin mikrobiyal kalitesi gıda ve su kaynağını önemli derecede etkilemektedir (Islam ve ark., 2005; Oliveira ve ark., 2012). Talley ve ark. (2009) yeşil yapraklı ürünlerin kontaminasyonunda böceklerin rolünü araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kontamine ıspanakla ilişkili *E. coli* O157:H7 enfeksiyon kaynağının sinekler olabileceği gösterilmiştir. Taze ürünlerin mikrobiyal patojen kontaminasyonu göz önünde bulundurulduğunda, patojen (enterik) mikroorganizmalar; suya, toprağı veya bitkiye (sulama ve yağmur suyu, çiyden kaynaklanan serbest su) su yoluyla temas ettikten sonra belirli iklim ve çevresel koşullar altında bitkinin yüzeyine bağlanabilir, biyofilm oluşturabilir veya içselleşebilirler (Brandl, 2006; Uyttendaele ve ark., 2015; Topalcengiz, 2016).

¹ **Bioaerosoller;** submikron, < 0,02 µm (virüsler, endotoksin ve mikotoksin) veya çok mikronlu, 0,2-50 µm (bakteri, mantarlar, parazitler ve algler) canlı, ölü veya bileşenleri/parçaları bozulmamış mikroorganizmaların havada asılı olan biyolojik partiküllerini içerir. Böcek parçaları, polen, tahıl ve mikrobiyal proteinleri de içerebilir (Millner, 2009).

Bitkilerin yenilebilir kısımlarında, patojen mikroorganizmaların içselleştirilmesi endişe vericidir çünkü bu mikroorganizmaların yıkama veya yüzey dezenfekte etme yöntemleri ile çıkarılması mümkün değildir (Gomes ve ark 2009). Çoğu patojenik mikroorganizma, yaprak veya kök yüzeyine doğrudan nüfuz ederek, yaralardan veya stoma gibi doğal açıklıklardan girerek bitkinin iç kısmına erişebilmektedir. Patojen mikroorganizmaların tarlada veya hasat zamanında fiziksel hasara uğramış bitkileri daha kolay enfekte ettiği (Guo ve ark., 2001) bunun yanı sıra gübreyle kirlenmiş toprak veya sulama suyu aracılığıyla bitkiye kök sistemi yoluyla da girebileceği ve yenilebilir kısmı boyunca göç edebileceği (Solomon ve ark. 2002) vurgulanmıştır. Patojenlerin enfeksiyondan sonra birikme yerlerinin ise daha çok yenilebilir kısımlar olduğu vurgulanmıştır. Yapılan bir çalışmada *Escherichia coli* O157:H7'nin kesilmiş marul yapraklarının yüzeyine, trikomlara, stomaya ve kesik kenarlara bağlandığını göstermiştir (Kroupitski ve ark., 2009; Mitra ve ark., 2009). Benzer şekilde Gomes ve ark. (2009) da taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanarak görüntüledikleri patojenlerin, yapraklı sebzelerdeki kontaminasyon bölgelerinin yarıklarda ve stomalarda lokalize olduğunu bildirmişlerdir.

Bakteriler, doğada genellikle serbest yaşayan hücreler olarak değil, biyofilm şeklinde bulunan yapışık hücreler olarak bulunurlar. Olgun biyofilmler, bir yüzeye bağlı (genellikle inert) ve kendi ürettiği glikokaliz (öncelikle ekzopolisakkaritler) içerisindeki mikroorganizmaların yapılandırılmış topluluklarıdır (Fett, 2000). Yaprak yüzeyinde biyofilm oluşumu ıspanak, marul, kereviz, pırasa, fesleğen, maydanoz ve geniş yapraklı hindiba da gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar biyofilmlerdeki bakterilerin geniş yapraklı hindiba ve maydanoz yapraklarındaki toplam bakteri popülasyonunun yaklaşık %10 ila 40'ını oluşturduğu ifade edilmiştir (Morris ve ark., 1997; Morris ve ark., 1998).

Bitkilerin kontamine olma eğilimleri farklılık göstermektedir. Yenilebilir kısmı toprak yüzeyinde gelişen taze ürünlerin (marul ve maydanoz gibi), yenilebilir kısmı toprak yüzeyinin üzerinde gelişen (domates, kırmızıbiber) taze ürünlere göre kontaminasyon riski daha yüksektir. Dezenfekte edilmemiş ikincil arıtılmış su ile üstten sulanan çiğ sebzelerin tüketilmesiyle ilişkili yıllık enterik virüs enfeksiyonu riskini tahmin etmek için nicel mikrobiyal risk değerlendirme modelleri oluşturulmuş, yıllık ortalama enfeksiyon riski brokoli, lahana veya marula göre salatalıkta daha az bulunmuştur (Melloul ve ark., 2001; Hamilton ve ark., 2006).

2.2 Tarımsal Sularda Görülen Mikroorganizmalar

Dünya Sağlık Örgütü'nün su kalitesi yönergeleri, mikrobiyal tehlikelerin yönetimi için önleyici ve riske dayalı bir yaklaşım önermektedir. Sıhhi denetimlerde ve risk matrislerinde risk puanlamasından, Nicel (kantitatif) Mikrobiyal Risk Değerlendirmesine (QMRA) kadar çeşitli risk değerlendirme yaklaşımları mevcuttur. Halk sağlığında risk oluşturacak su kaynaklı yaygın mikroorganizmalar; *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholera*, *Shigella* spp., *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*'dir. Su kaynaklı virüsler, insanlarda aseptik menenjit, felç, konjunktivit (pembe göz), miyokardit, hepatit ve ishal gibi çok çeşitli hastalığa neden olmaktadır. Başlıca enterik virüsler; enterovirüs, rotavirüs, norwalk virüs ve hepatit A virüsüdür. Patogen mikroorganizmalar; intoksikasyon ve hastalık etmeni enfeksiyon meydana getiren mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Dışkı kontaminasyonunda patojen mikroorganizmaları ele alma açısından belirli bir arıtma sisteminin arıtma performansını ölçmek için kullanılan gerçek patojenler ile indikatör mikroorganizmalar arasında ayırım yapmak önemlidir (FDA, 1998a; EPA, 2012; WHO, 2016; Jia ve Zhang, 2020). Arıtılmamış atık suda potansiyel olarak bulunan patojenlerin bir listesi çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Arıtılmamış atık suda potansiyel olarak bulunan bulaşıcı ajanlar (EPA, 2012).

Bakteri	Protozoa	Helmint	Virüs
<i>Shigella</i>	<i>Entamoeba</i>	<i>Ascaris</i>	Enterovirüs (Polio, Eko, Koksaki.)
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Giardia</i>	<i>Ancylostoma</i>	Hepatit A
<i>Vibrio cholera</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Necator</i>	Hepatit E
<i>Escherichia coli</i>	<i>Microsporidia</i>	<i>Ancylostoma</i>	Adenovirüs
<i>Yersinia</i>	<i>Cyclospora</i>	<i>Strongyloides</i>	Rotavirüs
<i>Leptospira</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Trichuris</i>	Norovirus
<i>Campylobacter</i>		<i>Taenia</i>	Astrovirus
<i>Helicobacter</i>		<i>Enterobius</i>	Parvovirus
<i>Legionella</i>		<i>Echinococcus</i>	
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Pseudomonas</i>			

Thurston- Enriquez ve ark. (2002) Amerika Birleşik Devletleri'nde geleneksel olarak çiğ tüketilen gıdalarda kullanılan sulama sularında insan patojenik parazitlerin varlığını araştırmışlardır. Alınan sulama suyu numunelerinde yapılan testler sonucunda %28'i *Microsporidia* için, %60'ı *Giardia* kistleri için, %36'sı *Cryptosporidium* oositleri için pozitif çıkmıştır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada 35 eyaletteki 448 bölgeden yeraltı suyu örnekleri toplamış, mikroorganizmalar ve kimyasal kirleticiler için test edilmiştir. Enfektif virüsler, viral nükleik asit, bakteriyofajlar ve bakteriler örneklerin sırasıyla %4,8, %31,5, %20,7 ve %15,1'inde mevcut olduğu belirtilmiştir (Abbaszadegan ve ark., 2003). ABD'de yapılan başka bir araştırmada da yeraltı sularının %8 virüs içerebileceğini göstermiştir (Borchardt ve ark., 2003). Güney Kore'deki araştırmalarda yeraltı suyunun %17'sinde enterik virüslerin varlığı belirtilmiştir (Cheong ve ark., 2009). Izumi ve ark. (2008), Japonya'da yetiştirme ve hasat sırasında hurma meyvesinin (Trabzon hurması) potansiyel mikrobiyal kontaminasyon kaynaklarını araştırmışlardır. Tarımsal suyun, en önemli potansiyel hasat öncesi kaynaklardan biri olduğu ifade edilmiştir. Tanaro ve ark. (2014), Arjantin'de sığır besi yerlerinin yakınındaki yüzey sularında *E. coli* O157:H7 prevalansı incelemelerinde yoğun hayvancılık kaynaklı sıvı deşarjlara maruz kalan çevresel yüzey sularının, maruz kalmayan çevresel yüzey sularına göre STEC O157:H7 ile daha fazla kontamine olma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Wilkes ve ark. (2009) Kanada'daki Güney Ulus Nehri havzasından 24 farklı su örnekleri alma noktasından topladıkları su numunelerinde, indikatör bakterilerin yoğunluklarını (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, enterokoklar, total ve fekal koliformlar), patojenik bakterilerin varlığını (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*), parazit *Giardia* kistlerinin ve *Cryptosporidium* ookistlerinin yoğunluklarını incelemişlerdir. İndikatör bakterilerin, patojenler ve parazit ookistleri/kistleri arasındaki ilişkileri genel olarak zayıf, mevsime bağlı, bölgeye özgü ancak indikatörler öncelikle pozitif olarak ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, *L. monocytogenes*, indikatör bakteri yoğunlukları ile ters orantılı olduğunu, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Giardia* kistleri ve *Cryptosporidium* ookistlerinin ise en sık sonbaharda tespit edildiğini ifade etmişlerdir.

İspanya'daki Ebro Nehri (Mosteo ve ark., 2013), Nijerya'daki Oluwa Nehri (Ayandiran ve ark., 2014), Hindistan'daki Gola Nehri (Chandra ve ark., 2006), Gana'daki Densu Nehri (Karikari ve Ansa-Asare 2006), Avusturya'daki Enns Nehri (Brugger ve ark., 2001), Tuna Nehri (Kirschner ve ark., 2017), Yunanistan'ın kuzeybatısındaki nehirler (Economou ve ark., 2013) ve diğer farklı ülkelerdeki nehirlerden alınan su örneklerinin mikrobiyal değerlendirilmesi üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Sonuç olarak su ortamındaki mikroorganizmaların varlığı, mekânsal ve zamansal değişimi, diğer mikroorganizmalarla olan ilişkileri ve kontaminasyon kaynakları birçok alanda araştırma konusu olmuştur.

2.3 Tarımsal Sularda Mikroorganizmaların Mekânsal ve Zamansal Değişimi

Mikrobiyal su kalitesi araştırmalarında mekânsal ölçekler çoğunlukla akış esnasında, akış veya drenajın meydana geldiği alana ve arsa-alan-havza hiyerarşik dizisine göre tanımlanır. Zamansal ölçekler ise, su numunesi toplama süresi veya su numuneleri arasındaki zaman aralığının süresi ile tanımlanır. Mevsimsellik, arazi kullanımı, su yönetimi, hava durumu ve belirli organizma özellikleri ve kaynakları arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak görünmektedir (Pachepsky ve ark., 2011; Pachepsky ve ark., 2018b). Mikrobiyal su kalitesi bölgeye özgün, mekansal-zamansal ölçeklere göre değişkenlik göstermektedir. Bakteriyel göstergelerin hem de enterik patojenlerin sürekli izlenmesi ve modellenmesi, yüzey sulama suyunun mikrobiyal kalitesini tahmin etmede ve uygun yönetim kararlarını almada kritik bir öneme sahiptir (Pachepsky ve ark., 2018a; Partyka ve ark., 2018a; Partyka ve ark., 2018b). Körfez, yüzey rezervuarlarında ve sulama kanallarında yürütülen araştırmalarda, mikroorganizma konsantrasyonlarının zamansal ve uzamsal ölçeklerde değiştiği ifade edilmiştir (Verhougstraete ve Rose, 2014; Rafi ve ark., 2018). Bakteri konsantrasyonları akış uzunluğu boyunca, dikey su sütunu boyunca veya akış genişliği boyunca hızlı bir değişime uğramaktadır. Bu nedenle de tek bir örnek, bir sulama suyu kanalında gerçek mikrobiyal su kalitesinin yeterli bir temsilini sağlayamayabilir (Lothrop ve ark., 2018). Mikrobiyal su kalitesinin mekânsal ve zamansal değişkenliğini etkileyen birden fazla faktör mevcuttur. Aşırı yağış olayları, mevsimsel farklılıklar, ortam sıcaklığı, su kaynağının fizyolojik özellikleri bu faktörlere örnek verilebilir.

Havza yüzey sularından toplanan örneklerde *Salmonella* konsantrasyonlarının ve serotiplerinin zamansal olarak değiştiğini ve mevsimsel yağış ve su sıcaklığından güçlü bir şekilde etkilendiği bildirilmiştir (Haley ve ark. 2009). Mikrobiyal kirleticilerin karadan yüzey sularına transferi aşırı yağış olaylarıyla mikroorganizma konsantrasyonlarını önemli ölçüde artmaktadır. Bunun tersi olarak yağış girişleri, yüzey sularını seyrelterek indikatör konsantrasyonlarını etkili bir şekilde de azaltabilir (Pachepsky ve ark., 2011; Teague, 2012). Fekal koliformlar ve *E. coli* O157 dahil olmak üzere bakteri sayısı ve çeşitliliği, nispeten yüksek sıcaklıkların olduğu dönemlerde yağıştan sonra artmıştır (Gu ve ark., 2013). *E. coli* konsantrasyonları, yağış toplamlarının az olduğu aylarda (sonbahar, kış) yağışın kaydedildiği yaz aylarına göre azaldığını ve *E. coli* konsantrasyonlarındaki değişimde mevsimsel farklılıkların belirginliği önem kazanmıştır. Ham yüzey suyundan izole edilen *E. coli* O157:H7 ve

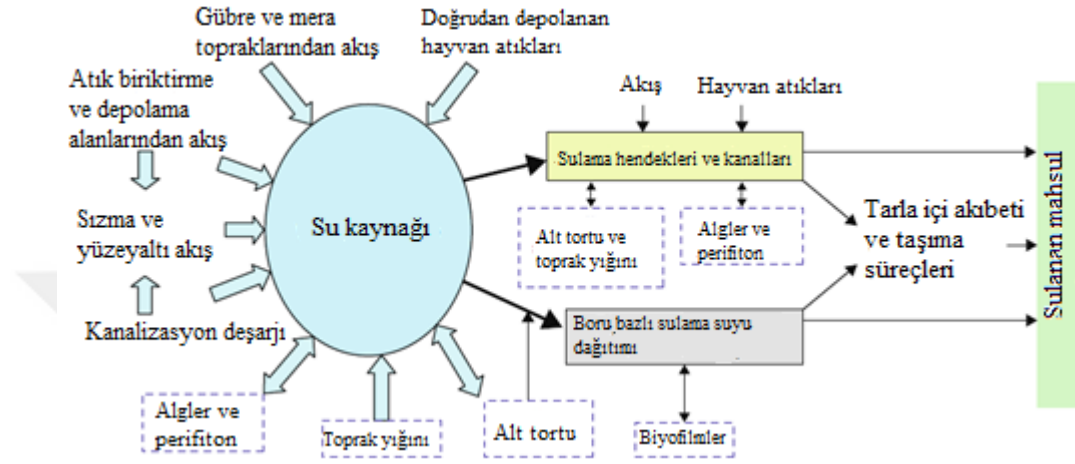
Salmonella spp. konsantrasyonlarının yaz aylarında zirve yaptığı belirtilmiştir (Gannon ve ark., 2004; McLain ve Williams, 2008). Muirhead ve Meenken (2018), temel akışlardaki *E. coli* konsantrasyonlarının değişkenliğini (dakika, saat ve gün) zaman ölçeklerinde araştırmış ve bunu ölçüm yöntemlerinin laboratuvar tekrarından elde edilen değişkenlikle karşılaştırmıştır. Üç farklı akarsudan bir gün içinde ölçülen *E. coli* konsantrasyonunun 24 saat boyunca değiştiği (Meays ve ark., 2006), göl örneklerinde, *E. coli* konsantrasyonunun güneşli günlerde gün uzunluğu ve güneş ışığına maruz kalma ile üssel olarak azaldığı, (Whitman ve ark., 2004), havza örneklerinde *E. coli* konsantrasyonlarının sabahın erken saatlerinde yüksek olduğu (Traister ve Anisfeld 2006) belirtilmiştir. *E. coli* inaktivasyon oranları, sıcaklığa bağımlı ve su kaynakları arasında değişkenlik göstermektedir (Blaustein ve ark 2013).

Sonuç olarak, tek bir su numunesinin, sulama periyodu boyunca suyun kalitesini kesin olmayan bir şekilde yansıtılabileceğini, sınırlı sayıda su kalitesi ölçümüne dayalı olarak, sulama amaçlı kullanılan suyun mikrobiyal kabul edilebilirliği hakkında sonuçlar çıkarırken dikkatli olunmasını ve su kalitesindeki uzaysal-zamansal değişimi etkileyen çevresel faktörler, test ile hasat zamanı arasındaki beklenen süre ve sulama suyu test sıklığı, tarımsal su sorunları için oluşturulan kılavuzlarının geliştirilmesinde dikkate alınması gerektiğini ayrıca mikroorganizma konsantrasyonlarının, numune alma derinliğine ve günün saatine bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterebileceğini ve bu faktörlerin izleme tasarımında dikkate alınması gerektiğini göstermiştir (Won ve ark., 2013; Stocker ve ark., 2022).

2.4 Tarımsal Sularda Patojen-İndikatör Mikroorganizmaların Akıbeti ve Taşınması

Tarımsal ortamlarda patojen akıbetini tanımlamak için genellikle bir dizi taşıma yolu, süreç, faktör ve matematiksel modele ihtiyaç duyulur. Patojen mikroorganizmaların akıbeti ve taşınması fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerle ilişkilendirilmiştir. Yoğun yağış olayları, patojenleri hızla taşıyabilen akış oluşturabilmektedir. Uzun süreler boyunca hayatta kalan patojenlerin, bu tür hızlı taşıma olaylarına maruz kaldıklarında canlı kalma olasılığı büyük ölçüde artmaktadır. Kurak mevsimlerde, patojen mikroorganizmaların taşınması, çok sayıda birleştirilmiş faktörler tarafından kontrol edilen, çeşitli çevresel yüzeylerde daha fazla tutulmaya bağlıdır (Bradford ve ark., 2013).

Patojen ve indikatör mikroorganizmaların akıbeti ve taşınması hakkındaki bilgiler, tarımsal suların mikrobiyolojik kalitesiyle ilgilenen mühendislik ve araştırma alanlarında kullanılmaktadır. Tarımsal suların mikrobiyal kalitesine ilişkin mikroorganizmaların akıbeti ve taşınması konularının genel düzenini şekil 2’de gösterilmiştir (Pachepsky ve ark., 2011).



Şekil 2. Sulama sularının mikrobiyal kalitesini etkileyen proseslerin düzeni (Pachepsky ve ark., 2011).

Sulama suyu, yüzey veya yeraltı kaynaklarından boru bazlı veya kanal bazlı dağıtım sistemleri ile tarlalara iletilmektedir. Sulama suyu sistemlerinin ekolojisi oldukça karmaşıktır. Suyun mikrobiyal kalitesi; çevresel faktörler (örn. sıcaklık, pH ve mevsimsel değişim), besinlerin varlığı, mikrobiyal etkileşimler, boru malzemesi, dezenfektan türü ve artıkları ve tortu birikimi gibi faktörlerden etkilenerek ortamdaki patojen mikroorganizma popülasyonunun değişebileceği ifade edilmiştir. Sulama suyu kalite parametrelerinde patojenler ve indikatör mikroorganizmalar için; su biyotası, sedimentler, alt tortular, perifiton ve/veya alglar, boru bazlı sulama suyu dağıtım sistemlerinde biyofilmler ve toprak yığınları önemli rezervuarlardır (Pachepsky ve ark., 2011; Pachepsky ve ark., 2012). Örnek olarak, dışkı koliformu ve *E. coli*'nin tatlı su alt tortularında barındığı, *Cladophora*'nın (alg), göl sahillerinde *Salmonella* ve diğer enterik bakteriyel patojenler için önemli bir rezervuar olduğu, *Cryptosporidium parvum* oostistlerinin biyofilm toplulukları tarafından yakalanıp tutulduğu bildirilmiştir (Searcy ve ark., 2006; Byappanahalli ve ark., 2009; Pachepsky ve Shelton 2011). Sonuç olarak, patojenler ve çevresel yüzeyler arasındaki tutma, serbest bırakma, kümelenme ve hayatta kalma gibi birçok etkileşim, çevresel taşıma ve akıbeti sürecinde kritik bir rol oynamaktadır (Bradford ve ark., 2013).

2.5 Tarımsal Sularda Patojen ve İndikatör Mikroorganizmaların Sağ Kalımı

Su kaynaklı patojen organizmalar, birçok su habitatında ve nemli topraklarda bulunabilirler. Çeşitli substratlarda veya su sistemlerinde, özellikle tercih ettikleri habitatlarda, biyofilmlerde biyosenozun önemli bir parçasıdır. Mikrobiyal kontaminasyon yükleri, mikrobiyal türlere ve formlara [vejetatif hücreler, endosporlar, virüsler, protozoan ookistler], çevresel koşullara (UV ışınları, sıcaklık, substrat mevcudiyeti, oksijen konsantrasyonu, taşıma özellikleri, pH, tuzluluk) ve diğer mikroorganizmaların (bakteriler ve predasyon organizmalar) ve virüslerin varlığına bağlı olarak bozulabilir, kalıcı olabilir veya büyüyebilir. Biyotik ve abiyotik faktörler, özellikle iklim faktörleri arasındaki etkileşim, mevsimsel oluşum modellerinin oluşmasına katkıda bulunabilmektedir. Bölgesel sıcaklık ve yağış, su kaynaklı patojenlerin kalıcılığını, transferini ve çoğalmasını etkiler (Rodrigues ve Cunha, 2017).

Patojen ve indikatör mikroorganizmaların hayatta kalımıyla ilgili mevcut verilerin çoğu, sulama için potansiyel olarak uygun su kaynaklarından elde edilmiştir. Genel olarak, sıcaklık, pH, besinlerin mevcudiyeti, radyasyon ve predasyon² geleneksel olarak sucul ortamlarda ve diğer ortamlarda hem indikatör hem de patojenik mikroorganizmalar için hayatta kalma öncü faktörleri olarak ifade edilmiştir. Besinler, suda bakteri sağlığının belirlenmesinde önemli bir faktördür. Örneğin, besin içeriğindeki farklılıklar, *E. coli* inaktivasyon oranlarındaki ve nehir suyu içindeki atık su çıkışının altında ve üstünde bulunan değişimi açıklayabilir (Pachepsky ve ark., 2011).

Tarımsal su kaynaklarında yerli biyotaların (amip, alg vb.), mikroorganizmaların hayatta kalması üzerinde birçok etkiye sahiptir. Bazı su kaynaklı patojenlerin amip veya nematodlar içinde canlılığını koruduğu belirtilmiştir (Bichai ve ark., 2008). Su kaynaklarında bulunan *Legionella pneumophila*'nın amip içerisinde çoğalabilme yeteneği gösterdiği ayrıca amip içerisinde fizyolojik değişikliklere uğrayarak daha dirençli bir yapı oluşturması ve bu durumun da olumsuz koşullardan ve dezenfektanlardan koruyabildiği ifade edilmiştir (Dupuy ve ark 2011).

Algler ve sucul bitki örtüsünün karbon sağladığı, besinler için *E. coli* ile rekabet ettiği, su kimyasını değiştirdiği, *E. coli*'yi güneş radyasyonundan koruduğu ve toksinler ve uyarıcılar saldırdığı ifade edilmiştir (Cho ve ark., 2022). *Acanthamoeba* cinsine ait protozoaların *Campylobacter jejuni*'nin hücre içi sağkalımını ve replikasyonunu kolaylaştırdığı ifade edilmiştir (Axelsson-Olsson ve ark., 2010).

²Predasyon: Bir organizmanın diğer organizmayı tüketim ve devamlılığı için öldürülmesidir (Avcı).

Bulanıklık ve partikül seviyeleri ile ilişkili olarak alglerin, (bakterilerin klorlamanın etkilerine karşı fiziksel korunması da dahil olmak üzere) bakteriyel aktiviteyi artırabileceğini veya destekleyebileceğini ifade edilmiştir (Silverman ve ark., 1983). Alg biyokütlesi ve klorofil konsantrasyonunun *E. coli* sağkalımı üzerindeki olumlu etkisinin bir başka olası nedeni olarak belirtilmiştir (Pachepsky ve ark., 2018b). Michigan Gölü sahil şeridinde *Cladophora*'nın (su yosunu), *Salmonella* ve diğer enterik bakteriyel patojenler için önemli bir rezervuar olduğunu ve bunun da kıyıya yakın su kalitesini etkileyebileceğini göstermiştir (Byappanahalli ve ark., 2009).

E. coli O157:H7'nin ortak bir çevresel protozoan olan *Acanthamoeba polyphaga*'da hayatta kaldığı ve çoğaldığı ifade edilmiştir. Protozoa, çoğu mikrobiyal konsorsiyumun ayrılmaz bir parçasıdır ve doğada, özellikle de suyun bulunduğu ortamlarda her yerde bulunur. Birçok protozoa türü, fagositoz yoluyla aldıkları ve besin vakuelleri içinde sekestre ettikleri bakterilerle beslenir. Bakteriyel protozoa, içselleştirdikleri patojenik bakterileri insan konakçılarının erken savunma tepkilerinden koruyabildikleri için mikrobiyal dünyanın “Truva atları” olarak adlandırılmıştır. Bakteriyel patojenlerin protozoal içi büyümesi, çevresel sağkalım, virülans, biyositlere ve antibiyotiklere karşı direnç artışı ile ilişkilendirilmiştir (Barker ve ark 1999; Brandl ve ark., 2005).

Patojenik mikroorganizmalar otokton³ topluluklar (örneğin, siyanobakteriler, protozoa, vibrios) arasında bulunur ve çeşitli şekillerde sulara karışır. Bu patojenler deniz hayvanları, fitoplankton, zooplankton, tortullar ve döküntülerle birlikte bulunabilir (Cabral, 2010; Rodrigues ve Cunha, 2017). Yerli mikroorganizmaların rekabeti ve protozoan predasyonu *E. coli*'nin hayatta kalması üzerinde olumsuz etkilere sahipken, daha yüksek besin seviyeleri *E. coli*'nin hayatta kalmasını arttırmıştır (Wanjugi ve ark., 2016). Nehir ve kıyı bölgesindeki fekal ve otokton bakterilerin genel ölüm oranının %90'ından fazlası protozooplanktonlarla ilişkilendirilmiştir (Menon ve ark., 2003). İndikatör ve patojenler arasındaki korelasyonların gücünü etkileyen faktörler arasında çevresel stresörler ve büyümeye karşı direnç, konakçı popülasyonlar arasında taşıma özellikleri ve taşıma oranları, arıtma sırasında konakçı popülasyonların varlığı ve yıl boyunca inaktivasyonu etkileyen atık yönetim uygulamaları yer almaktadır (Wu ve ark., 2011).

³ Otokton mikroorganizma: Yerli flora

2.6 Patojen ve İndikatör Mikroorganizma Arasındaki İlişki

Sulama suyunun mikrobiyal kalite standartlarını değerlendirmek için uzun yıllar patojenler ve indikatör mikroorganizmalar arasındaki korelasyonlar incelenmiştir. Korelasyonların mevcut, zayıf veya zamansal olduğu bildirilmiştir (Topalcengiz, 2016). İndikatör mikroorganizmalar ve patojenler arasında doğru korelasyonlar varsa, bu organizmaların ne ölçüde ve hangi koşullar altında dışkı kirliliğinin güvenilir göstergeleri olarak kullanılabileceğini bulmak gerekir. Geleneksel ve alternatif dışkı göstergelerinin uygulanması, yüzey sularının kullanımıyla ilişkili sağlık riskini tahmin etme ve azaltma yeteneklerimizi büyük ölçüde geliştirmiştir. Yeni moleküler tabanlı teknikler, dışkı kirliliği için geleneksel ve alternatif göstergelerin birlikte kullanımının dışkı kirliliğinin ve ilişkili patojenlerin hem saptama hassasiyetini hem de özgüllüğünü arttırdığını göstermiştir (Savichtcheva ve Okabe 2006).

Yağışlı hava olayları ve fekal kontaminasyonun olası durumlarında tarımsal sularda indikatör ve patojen mikroorganizmaların birlikte tespit edilmesi istatistiksel olarak mümkün kılınmıştır (Wilkes ve ark., 2009; Korajkic ve ark., 2018). Harvey Kasırgasının neden olduğu sel olayı Galveston Körfezine karadan fekal indikatör bakterilerini ve patojenik bakterileri taşımış, aynı zamanda yerli deniz bakterilerini de etkilemiştir. Fekal bakterilerinin ve patojenlerinin konsantrasyonları, Körfez'deki yüksek akışlı ve düşük akışlı mevsimlere göre değişmiştir (Yang ve ark., 2021).

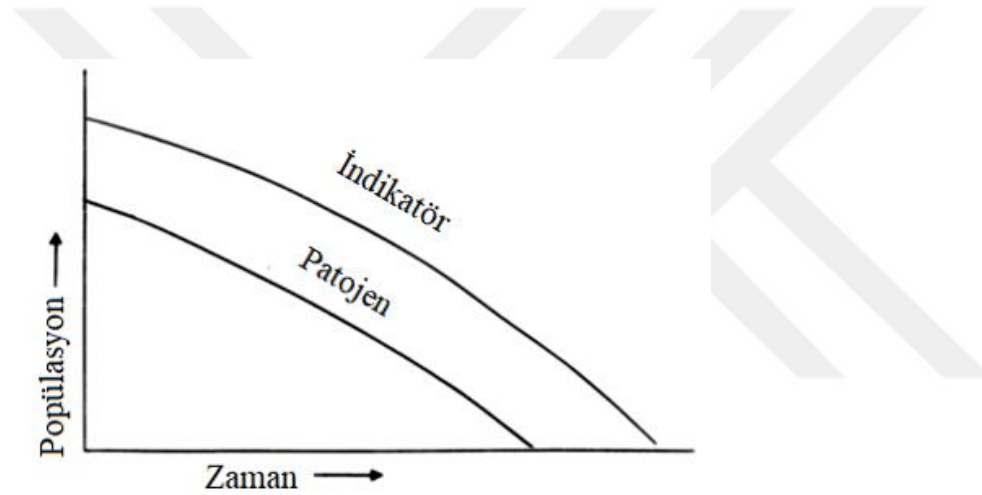
E. coli ve dışkı koliform yoğunlukları, bir patojenin ne zaman mevcut olduğunu veya yüzey suyunda bulunmadığını tanımlamak açısından daha faydacı göstergeler olarak kabul edilmiştir. Çeşitli nedenlerden dolayı, *E. coli* ve diğer dışkı indikatör bakterileri, bakteriyel, viral veya paraziter patojenlerin varlığı için her zaman etkili vekil olmayabilir. Bu organizmalar, mikroorganizmanın büyüklüğü, dışkıdaki bolluk, çevresel uygunluk ve organizmaları su ortamına taşıyan hidrolojik süreçlerin doğası gibi ortamdaki kaderlerini ve taşınımalarını etkileyecek, çeşitli faktörlere göre önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Wilkes ve ark., 2009). Fekal indikatör bakteriler, bakteriyel ve protozoan patojenlerle (viral patojenlere kıyasla) istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler kurma eğilimindedir (Korajkic ve ark., 2018). Yapılan çalışmada patojenler ve indikatör mikroorganizma arasındaki ilişkinin karmaşık olduğu ve lojistik regresyon yoluyla yüzey suyundaki *Salmonella* seviyelerini tahmin etmek için *E. coli*'nin makul bir gösterge olduğu bildirilmiştir (McEgan ve ark., 2013).

2.7 İndikatör Mikroorganizmalar İçin İdeal Kriterler

“Temel Gıda Mikrobiyolojisi” ve “Modern Gıda Mikrobiyolojisi” adlı kitaplarda bir bakteri grubu veya türünün enterik gıda kaynaklı patojenlerin bir indikatörü olarak seçilmesi için pek çok kriter önerilmiştir (Ray, 2004; Jay ve ark., 2008). Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir:

1. İndikatörün gıdada bulunabilecek diğer pek çok mikroorganizma türünden ayırt edilmesini sağlayan, ayırt edilebilir bir ya da birkaç biyokimyasal ve diğer özelliklere sahip olması gerekir.
2. İndikatörün enterik orijine sahip olması; bir başka ifadeyle, indikatörün patojenlerin muhtemelen buldukları yer ve zamanlarda mevcut bulunması gerekir.
3. İndikatör patojenik olmamalıdır, böylece laboratuvarında kullanımı patojenler için gerekli olan güvenlik önlemlerini gerektirmez.
4. Bir gıda, az miktarda fekal madde ile kontamine olduğunda bile kolaylıkla tespit edilmesi amacıyla indikatörün dışkıda enterik patojenlerden çok daha fazla sayıda bulunması gerekir (Şekil 3).
5. İndikatör kısa sürede, kolay ve ekonomik bir şekilde saptanmalı (numaralandırılmalı veya izole edilmeli) ve tanımlanmalıdır. Çünkü ürün işlemden sonra hızlı bir şekilde dağıtılmakta ve bir seriden birkaç numune test edilmektedir.
6. İndikatörün hızlı tanımlanması için bir veya daha fazla yeni geliştirilmiş moleküler biyoloji tekniği kullanılarak saptanmalıdır.
7. İndikatör, çok sayıda ilişkili mikroorganizmanın varlığında bile saptanmalıdır. Bu amaçla indikatör mikroorganizmaların gelişimini engellemeyen ancak, ilişkili olduğu mikroorganizmaların gelişimini engelleyen inhibitör maddeler kullanılır.
8. İndikatör, bir gıdada enterik patojenlerde olduğu gibi aynı büyüme ve hayatta kalma oranına sahip olmalıdır. Bir gıdadaki patojenlerden daha yavaş büyümemeli veya daha hızlı ölmemelidir. Patojenden daha hızlı ölmesi durumunda, teorik olarak depolama sırasında gıdada indikatör tespit edilmezken patojenler hala bulunabilir.
9. İndikatör, fiziksel ve kimyasal streslere maruz kaldığında patojenlerden daha fazla hasar (ölümcüle yakın ağır hasar) görmemelidir. İndikatör, ağır hasara daha duyarlıysa, sayımda kullanılan seçici yöntemlerle tespit edilmeyecektir. Bu durumda, patojen daha yüksek seviyelerde mevcut olsa bile, indikatör ya hiç bulunmaz ya da çok düşük seviyelerde bulunmaktadır.

10. Tercihen gıdada patojen mevcutken indikatörün bulunması; tersine olarak, enterik patojenler mevcut değilken, indikatörün bulunmaması gerekir. Bu tür korelasyonlar olmadıkça, bir gıdada olası bir patojen varlığını gösteren bir indikatörün önemi büyük ölçüde azalır.
11. Tercihen gıda da mevcut indikatör seviyesi ile enterik patojenin bulunma olasılığı arasında doğrudan bir ilişki olmalıdır. Bu ilişki, gıdanın tüketim açısından kabul edilme veya reddedilmesine yönelik indikatör limitlerini belirleyen düzenleyici standartların oluşturulmasını sağlar. Bu kriterlere göre indikatörün gıdada yüksek olan sayısının patojenin bulaşma düzeyinin yüksek olmasından mı kaynaklandığını yoksa patojen bulaşması çok düşük olsa bile indikatörün sayısının zamanla arttığından mı kaynaklandığını ayırt etmek çok önemlidir.



Şekil 3. Bir indikatör organizma ile ilgili patojen(ler) arasındaki idealleştirilmiş ilişki. İndikatör, patojenin varlığı sırasında patojenden daha yüksek sayılarda bulunmalıdır (Jay ve ark., .2008)

Dışkı indikatörleri kavramı gıda güvenliğine uygulandığında, bazı ek kriterler vurgulanmıştır. 1961'de Buttiaux ve Mossel tarafından önerilen kriterler hala geçerlidir.

1. İdeal olarak seçilen bakteriler, yalnızca bağırsak ortamlarında özgünlük göstermelidir.
2. Yüksek seyreltmelerde karşılaşılabilmesi için dışkıda çok yüksek sayılarda bulunmalıdırlar.
3. Kirliliği değerlendirilecek olan ekstraenteral çevreye karşı yüksek bir dirence sahip olmalıdırlar.
4. Çok düşük sayılarda mevcut olsalar bile, nispeten kolay ve tamamen güvenilir algılamaya izin vermelidirler. Tek başına hiçbir bakteri grubu veya türünün ideal bir indikatör olmak için tüm kriterleri karşılayamayacağı ifade edilmiştir.

2.8 İndikatör Mikroorganizmalar

Çok çeşitli mikroorganizmalar suya bulaşabilir patojenler olduğundan ve kirli suda aralıklı ve/veya düşük konsantrasyonlarda bulunma eğiliminde olduklarından, tespit ve numaralandırma yöntemleri genellikle karmaşık ve pahalıdır. Dışkı malzemesinde sürekli olarak bulunan, patojenlere kıyasla suda oldukça iyi hayatta kalan ve tespit edilmesi daha kolay olan alternatif organizmalar, bu nedenle dışkı kirliliği göstergeleri olarak yaygın kullanılmaktadır (Sinton ve ark., 1993a).

Birçok çalışma, kontaminasyon kaynağı spesifik patojenlerden ziyade dışkı göstergeleri hakkındaki bilgeleri içermektedir (Pachepsky ve ark., 2011). Fekal indikatör mikroorganizmalar; koliformlar, termotolerant koliformlar, *Escherichia coli* (*E. coli*), fekal streptokok (FS), enterokok, sülfid azaltıcı clostridia (SRC), *Clostridium perfringens*, bifidobakter, bakteriyofajlar (*Bacteroides*, *E. coli* 'ye özgü fajlar) ve kolifajlar olarak önerilmektedir. İndikatör mikroorganizmaların tanım çizelge 3'te verilmiştir (Ashbolt ve ark., 2001; Scott ve ark., 2002).

Çizelge 3. İndikatör ve indeks mikroorganizmalar (Ashbolt ve ark., 2001)

Grup	Tanım
Proses İndikatörleri	Klor dezenfeksiyonu gibi bir prosesin etkinliğini gösteren bir grup organizma. Örneğin; heterotrofik bakteriler veya toplam koliformlar
Fekal İndikatörler	Termotolerant koliform bakteri türleri veya <i>E. coli</i> gibi dışkı kontaminasyonunun varlığını gösteren bir grup organizma. Böylelikle, sadece patojenlerin mevcut olabileceği sonucuna varılır.
Dizin ve model Organizmalar	Patojen varlığı ve davranışını gösteren bir grup veya tür. Örneğin; Salmonella için indikatör olarak <i>E. coli</i> ve insan enterik virüs için F-RNA modeli olarak kolifajlar.

Fekal kontaminasyona maruz kalmış sulardan alınan numunelerde *E. coli* saptanamamış olması, başka indikatör mikroorganizmalara aranmasını gerekli kılmıştır. Çevresel sularda en çok aranan fekal indikatör mikroorganizmalar; toplam koliformlar, fekal koliformlar, *E. coli* ve enterokoklardır. Fekal indikatör mikroorganizmalar; yaban hayvanlarının, çiftlik hayvanlarının (örneğin domuz, sığır, kümes hayvanları), çok sayıda kuşların ve kemirgenlerin, evcil hayvanlarının ve insanların dışkılarında bulunmaktadır (Thurston ve ark., 2001; EPA, 2006; Cabral, 2010).

2.8.1 Koliformlar

Koliform grubu bakteriler, bir asıra yakın süredir, su kaynaklarının biyolojik kalite (çoğunluklu fekal kirliliğin) göstergeleri olarak önerilmektedir. Sıhhi kirliliğin göstergeleri için; koliformlar, kolon grup, *Escherichia-aerobacter* grup veya *coli-aerogenes* grup gibi adlandırmalar söz konusu olmuştur (leclerc ve ark., 2001). Schardinger, 1892' de Bakteri coli'nin dışkı florasının karakteristik bir bileşeni olduğunu ve sudaki varlığının "dışkı kirliliğinin varlığının ve dolayısıyla enterik patojenlerin potansiyel varlığının bir göstergesi " olarak alınabileceğini öne sürmüştür. Bakteri coli'nin tanımlanmasından kısa bir süre sonra, diğer gram negatif, laktoz fermente edici bakteriler dışkı ve sudan izole edilmiş ve 1901'den beri bu bakteriler koliform adı altında gruplandırılmıştır (Medema ve ark., 2003). Leclerc ve ark., (2001) yayınladıkları makalede bu grubu 32 cins ve 110'dan fazla adlandırılmış tür ile tanımlamışlardır (Çizelge 4). Koliformların tanımı ve genel özellikleri ise; safra tuzları veya benzer büyümeyi inhibe edici özelliklere sahip diğer yüzey aktif ajanların mevcudiyetinde üreyebilen ve (1) fakültatif anaerobik, (2) gram-negatif, (3) basil şekilli bakteriler şeklinde ifade edilmektedir. 24-48 saat 35-37° C'de (4) laktozu fermente ederek asit ve gaz veya aldehit açığa çıkarırlar. (5) Oksidaz negatiftirler, (6) spor oluşturmazlar ve (7) galaktosidaz aktivitesi gösterirler. Toplam koliformlar tüm grubu temsil eder ve 37° C'de çoğalan bakterilerdir. Termotolerant koliformlar ise daha yüksek sıcaklıkta (44.2° C) gelişebilen bakterilerdir. Koliformlar, Enterobacteriaceae ailesinin bir grubudur. Toplam koliformların, termotolerant koliformların ve *E. coli*'nin bir arıtma prosesinden çıkan sudaki önemi açısından hiçbir fark yoktur, çünkü hepsi yetersiz arıtmayı işaret eder ve hangi tip koliform tespit edildiğine karar verilinceye kadar eylem ertelenmemelidir (Payment ve ark., 2003; Cabral, 2010).

Çevre suları koliform testi ile gerçekleştirildiğinde, dört tür koliform cinsi bakteri (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Citrobacter*) olumlu sonuçlar verir (Leclerc ve ark., 2001; Cabral, 2010). Yaz aylarında en sık rastlanan koliformlar ise *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ve *Citrobacter freundii*'dir (Özşavlı ve ark., 2018). Koliform grubunun en eski üyelerinden Friedlander'in basili olarak adlandırılan *Klebsiella pneumoniae* 1882'de Carl Friedlander tarafından tanımlanmıştır (Ashurst ve Dawson, 2022). *E. coli* 'den sonra en çok rastlanan *Klebsiella pneumoniae*'nin alt türü olan *K. rhinoscleromatis* Von Frisch (1882) tarafından tanımlanmıştır (Sathyavathy ve Madhusudhan, 2020).

Çizelge 4. Enterobacteriaceae ailesindeki koliform bakteriler (Leclerc ve ark., 2001)

	ONPG ^a	Dışkı Kökenli	Suda Bulunma
<i>Arsenophonus</i>	+	-	-
<i>Budvicia</i>	+	-	+
<i>Buttiauxella</i>	+	-	+
<i>Cedecea</i>	+	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	+	+
<i>Edwardsiella</i>	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	+	+	+
<i>Erwinia</i>	+	-	+
<i>Escherichia</i>	+	+	+
<i>Ewingella</i>	+	-	-
<i>Hafnia</i>	+	-	+
<i>Klebsiella</i>	+	+	+
<i>Kluyvera</i>	+	-	+
<i>Leclercia</i>	+	-	+
<i>Leminorella</i>	-	-	-
<i>Moellerella</i>	+	+	+
<i>Morganella</i>	-	+	+
<i>Obesumbacterium</i>	-	-	-
<i>Pantoea</i>	+	-	+
<i>Photorhabdus</i>	-	-	-
<i>Pragia</i>	-	-	+
<i>Proteus</i>	-	-	+
<i>Providencia</i>	-	+	+
<i>Rahnella</i>	+	-	+
<i>Salmonella</i> ^b	-	+	+
<i>Serratia</i>	+	-	+
<i>Shigella</i> ^c	-	+	+
<i>Tatumella</i>	-	-	-
<i>Trabulsiella</i>	+	-	-
<i>Xenorhabdus</i>	-	-	-
<i>Yersinia</i> ^d	+	+	+
<i>Yokenella</i>	+	-	-

^a ONPG, o-Nitrophenyl-β-galactopyranoside

^b *Salmonella* alt grup 3a, 3b (*Arizona*) ve 5 (*S. bongorae*) ONPG pozitif

^c Bazı *S. sonnei* biovars, ONPG pozitif

^d Çoğu tür (*Y. aldovae* hariç) genellikle ONPG pozitif

Koliformlar için çeşitli sınıflandırma şemaları ortaya çıkmıştır (Ashbolt ve ark., 2001). MacConkey (1909) yılında sınıflandırmalar üzerine çalışmış, laktozu fermente eden basilleri sakkaroz ve dulcitol üzerindeki fermentatif etkiye göre 4 gruba ayırmıştır. Daha fazla test ekleyerek (adonit, inulin, indol, Vosges ve Proskauer'in reaksiyon varlığı veya yokluğu gibi) 128 farklı koliform tipini, Bergey ve Deehan (1908) yılında 8 özellik kombinasyonu ile 256 tip tanımlamıştır. 1920'lerin başında koliformların farklılaşmasına karşı önerilen bir dizi korelasyon gelişmiştir. İndol üretimi, jelatin sınıvlaştırma, sükröz fermantasyonu ve Voges-Proskauer reaksiyonu, dışkı kirliliğinin tayini için en önemli testler arasındadır (Odonkor ve Ampofo, 2013). 1936 yılında Parr tasarladıkları "IMVEC" (I: İndol testi, M: Metil red testi, V: Voges-Proskauer testi, E: Eijkman testi veya 44,5±0,2° C 'de gelişme testi, C: Sitrat testi) testi ile organizmaların kullanıldığı yere göre formül yazmayı mümkün kılmıştır (Parr, 1938).

2.8.2. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesinin bir grubu olan *Escherich coli*; ilk olarak 1885'te pediatrist ve bakteriyolog Theodor von Escherich tarafından yeni doğan bebeğin dışkı florasından izole edilerek "Bacterium coli commune" ismiyle tanımlandı (Deborah Chen ve Frankel, 2005). 1919 yılına kadar Bacterium coli terimi yaygın olarak kullanılıyordu. Daha sonra Peschiera cinsinin oluşumundan sonra Castellani ve Chalmers, tip türlerini *E. coli* olarak adlandırdılar (Jaybhaye ve Deb, 2021). *Escherichia* cinsi içerisinde yedi tür vardır. Bunlar: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. blattae* ve *E. albertii* (Omerovic ve ark., 2017)'dir. Yarım yüzyıldan fazla bir süredir, *E. coli*, dışkıda avirülan⁴ olarak kommensal⁵ kabul edildi. Bu görüş, *E. coli*'nin insanlarda hastalığa neden olabileceğini gösteren kanıtların birikmesiyle yıllar içinde aşamalı olarak değişti. Patojenik *E. coli*'ye bağlı enfeksiyonlar, bir mukozal yüzeyin kolonizasyonu ile sınırlı olabilir veya tüm vücuda yayılabilir. İdrar yolu enfeksiyonu, sepsis/menenjit ve gastrointestinal enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, bazı patojenik *E. coli* suşları virülandır ve ishal, peritonit, yenidoğan menenjit, hemolitik üremik sendrom (HUS), gram-negatif bakteri pnömonisi ve solunum yolu hastalığı gibi hastalıklara neden olabilir (Deborah Chen ve Frankel, 2005; Huang ve ark., 2016a). Tüm Enterobacteriaceae türlerinin hücre duvarında yer alan lipopolisakkarid tabakanın derin kısımlarında enterobakteriyel yaygın antijen (ECA) bulunur. Enterobacteriaceae türlerinde ECA dışında 3 temel antijen bulunmaktadır (Kılıç, 2013). Bunlar; O, H ve K antijenleridir.

İlk olarak Kaufman tarafından, somatik (O), flagellar (H) ve kapsüller (K) yüzey antijenlerine göre serotip şeması tanımlanmıştır (Uçar ve ark., 2015; Omerovic ve ark., 2017). Serotiplendirme, üç immünojenik yapının kombinasyonuna dayanır. Çok az laboratuvar K tiplmesi yapabilmektedir. İki ana yüzey antijenlerinin (O:H) serotiplendirmesi patojenik *E. coli*'nin karakterizasyonu için bir standart haline gelmiştir. Mevcut serotiplendirme şeması, O1 ile O188 olarak adlandırılan 188 O grubunu içerir (O182 ile O188'in yayınlanması beklenmektedir), O grupları O31, O47, O67, O72, O94 ve O122 şemadan çıkarılmıştır. Geri çekilen H13, H22 ve H50 hariç olmak üzere, H1 ile H56 olarak adlandırılan 53 H antijeni şemaya dahil edilmiştir (Joensen ve ark., 2015; Cheng ve ark., 2016). *E. coli*'nin patojenik mekanizmalarının araştırılmasıyla patojen suşların toksin üretme, epitel hücreye yapışma ve bu hücreleri

⁴ Avirulan: Hastalık yapma yeteneği bulunmayan, öldürücü olmayan organizma

⁵ Kommensal: Bir organizmanın üzerinde veya içerisinde yaşayan ancak zarar vermeyen organizma

istila etme yeteneklerine göre: enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC) enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve dağınmık yapışan *E. coli* (DAEC) olmak üzere altı gruba ayrıldılar (Ray ve Bhunia, 2013).

2.8.3 Fekal Streptokok ve Enterokoklar

Koliformlar üzerindeki çalışmaya paralel olarak, fekal streptokok (FS) olarak bilinen bir grup bakteri kirlilik göstergesi olarak araştırılmıştır (Geldreich ve Litsky, 1976; Winslow ve Hunnewell 1902; Sinton ve ark., 1993b). Fekal streptokok türleri *Streptococcus* cinsinin alt grubu olup *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus* ve *Streptococcus avium*'dan oluşmaktadır. İnsan ve diğer sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında bulunurlar. Fekal streptokok türleri su ve diğer çevresel sistemlerde büyümmez ve çoğalmaz ancak uzun süre hayatta kalabilirler bu nedenle indikatör mikroorganizma olarak kullanılabilirler (Motlagh ve Yang, 2019). Fekal koliform (FC)/ fekal streptokok (FS) oranı 4'ten büyük ise su genellikle evsel atık sudan kaynaklanan fekal kirliliği gösterir ve FC / FS oranı 0,7'den az olduğunda, insan olmayan hayvan atıklarından kaynaklanan fekal kirlenmeyi ifade etmektedir (Doran ve Linn, 1979).

Enterokoklar fekal indikatör bakteri (FIB) veya fekal kontaminasyonun genel indikatörleri olarak kullanılırlar. *Enterococcus* cinsleri %6,5 sodyum klorür, pH 9.6 ve 45°C'de büyüme yetenekleri ile diğer streptokoklardan farklılaşırlar. Cins; *Enterococcus avium*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus gallinarum* bakterilerini içerir. 1984 yılında, DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyonu *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* (şimdi *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*) gibi türlerin ortaya çıktığı *Streptococcus*'tan ayrı olarak benzersiz bir cins olarak önerilmiştir. “Fekal streptokoklar” veya önceki tür isimleri gibi tanımlamaların kullanıldığı eski yayınlarda, bu terminolojiyi, özellikle fekal streptokokların, terimlerin büyük ölçüde enterokoklarla eş anlamlı olduğu anlayışıyla kullanılmaktadır. *Streptococcus* cinsinden sadece *Streptococcus bovis* ve *Streptococcus equinus* gerçek dışkı streptokoku olarak kabul edilir. Bu iki streptokok türü ağırlıklı olarak hayvanlarda bulunur; *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* insan bağırsağına daha spesifiktir (Schleifer ve Kılpper-Balz, 1984; Gerba, 2009; Byappanahalli ve ark., 2012).

2.8.4 Bakteriofajlar

Mikrobiyal kaynak takibi (MST), dışkı kirliliğinin insan veya hayvan kaynaklarından ayırt etmek için konakçıya özgü bağırsak mikroorganizmalarını kullanan bir araştırma alanıdır. İzole edilmiş ve çeşitli coğrafi bölgelerde kültür ve kütüphaneden bağımsız MST belirteçleri olarak bakteriofajlar gösterilmektedir (Chyerochana ve ark., 2020). Bakteriofajlar, biyosferde en yaygın şekilde dağılmış ve bol bulunan organizmalardır ve bakteriyel konukçuları spesifik enfekte etme kapasiteleri nedeniyle, son zamanlarda su kirliliği kontrolünde yeni göstergeler olarak kullanılmaktadırlar (Ji ve ark., 2021). Fajların patojenik enterik bakterilerin olası varlığını gösteren modeller olarak kullanılması ilk olarak 1930'larda ortaya çıkmış ve belirli bakteriofajların varlığı ile dışkı kontaminasyonunun yoğunluğu arasında doğrudan ilişkili bulunduğu ifade edilmiştir (Ashbolt, 2001).

Yeraltı suyu için uygun enterik viral göstergeler olabilmek için, bakteriofajların şu özelliklere sahip olması gerekir: Özgüllük, yani sürekli ve sadece insan dışkısında ve kanalizasyon suyunda meydana gelirler, çevrede çoğalmazlar ve dışkının çevresel kaynağı yoktur. Duyarlılık, yani enterik virüslerden daha fazla sayıda bulunurlar, en azından çevrede ve su arıtma süreçlerinde bulunan enterik virüsler kadar uzun ömürlüdürler. Basit ve ucuz yöntemlerle algılanmaları kolay olmalıdır. Enterik virüsler için üç temel bakteriofaj grubu önerilmiştir. Somatik kolifaj, erkeğe özgü RNA kolifajları (FRNA fajları) ve *Bacteroides fragilis*'i enfekte eden fajlar. *E. coli* ve diğer koliformları enfekte eden bakteriofajlara kolifajlar denir (Leclerc ve ark., 2000).

Enterik bakteriofajlar, özellikle *Escherichia coli*'yi enfekte eden F-RNA bakteriofajları, fiziksel yapılarında, kompozisyonlarında ve morfolojilerinde insan enterik virüslerine benzedikleri için insan viral patojenlerinin göstergeleri olarak önerilmiştir. Göl ve nehir suyu için litre başına 10^5 'e kadar somatik ve F-RNA fajları kaydedilmiş ve *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella* türlerini enfekte eden fajlar tatlı sudan geri kazanıldığı ifade edilmiştir (Grabow, 2001; Nappier ve ark., 2006). Kang ve ark. (2017) yılında Kore'deki norovirüs salgınlarının kaynağını norovirüsle ilişkili olduğu tahmin edilen tarım ürünleri ve çevresel örnekleri incelemişlerdir. İncelenen örneklerde erkeğe özgü (F+) kolifaj (MSC) ve fekal indikatör bakteri (Koliform, *E. coli*) kontaminasyon durumunu araştırmış, araştırma sonucunda koliform, *E. coli* ve MSC sonuçlarının pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

2.9 Tarımsal Sularda Patojen ve İndikatör Mikroorganizmaların Aranmasında Kullanılan Yöntemler

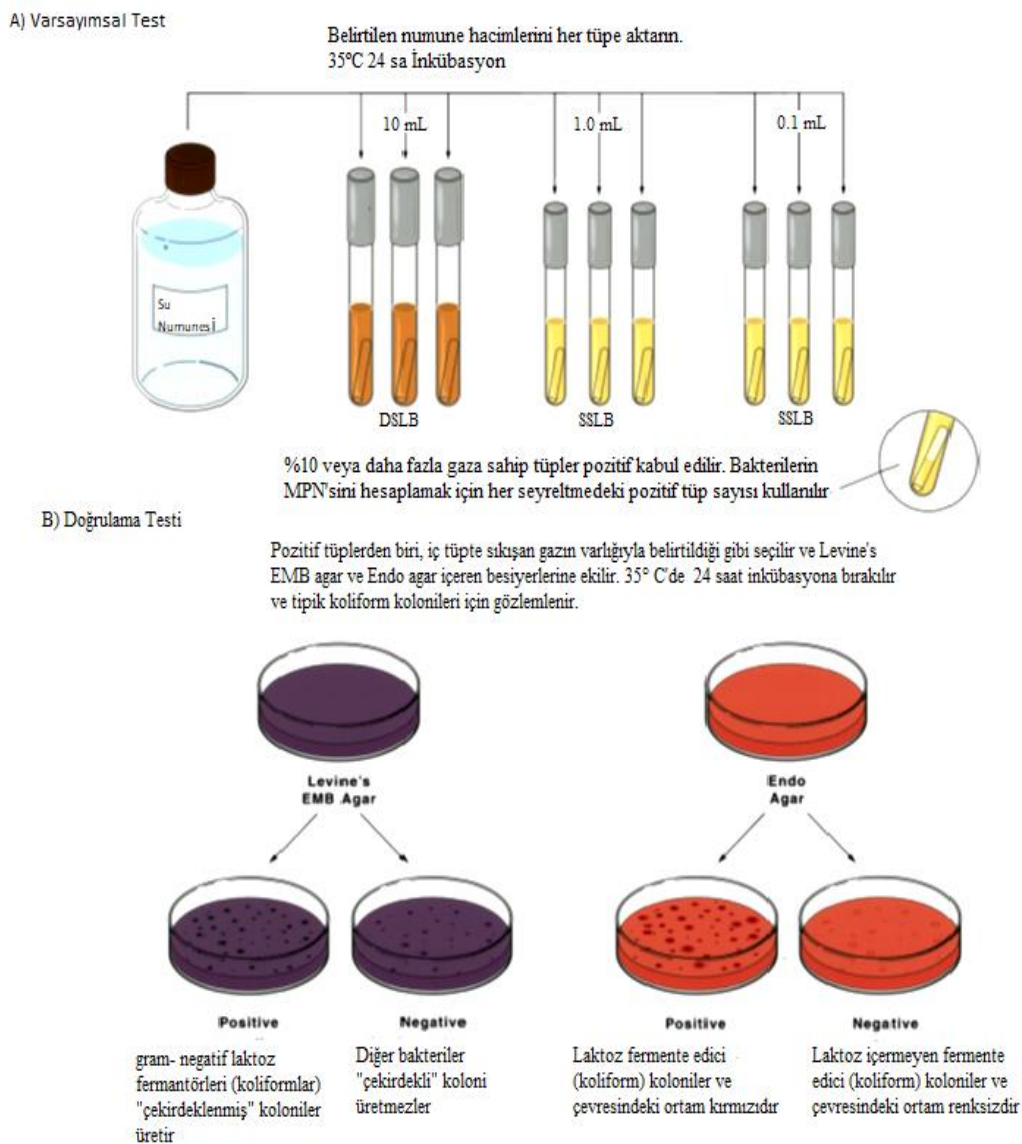
Tarımsal suyun mikrobiyal kalite analizi, geleneksel tanı yöntemlerinde mikroorganizmaların kültürde üretilmesine dayanmaktadır. Geleneksel mikrobiyolojik yöntemler güvenilir ve doğru, ancak zaman alıcı ve yoğun emek gerektiren altın standart yöntem olarak kabul edilir. Bu yöntemler arasında, hedef organizmaların popülasyonunu artırmak için numunelerde seçici bir ön zenginleştirme ve saf kültürleri izole etmek için de uygun bir besi yerine ekimi ve ardından kültürlerin fenotipik analiz veya morfolojik veya metabolik incelenmesi (karbon veya azot kullanımını izlemek) gerekmektedir. Bu işlemin sonuç alması 2-3 gün ve onaylanması için sonraki birkaç gün sürmektedir. Geleneksel yöntemlerin kontaminasyon kaynağını gösterememesi, önemli dezavantajlarından biridir. Ayrıca bazı mikroorganizmaların (bakteri) gözleme dayanan özelliklerin incelenmesi ve çeşitli biyokimyasal testlerin yapılması sırasında, her zaman bir kontaminasyon riski olasılığı vardır. Geleneksel yöntemlerinin dezavantajları yeni ve hızlı tanı yöntemlerini gerekli kılmıştır. Minyatürize biyokimyasal identifikasyon yöntemleri, immünolojiye bağlı yöntemler, moleküler ve enzimatik yöntemler, biyosensörler, spektrometrik yöntemler, mikropalak okuyucular ve diğer mikrobiyolojik hızlı tanı yöntemleri olmak üzere bir dizi alternatif mikrobiyolojik yöntemler önerilmiştir (Aras, 2011; Umesha ve Manukumar, 2018; Rodrigues ve Cunha, 2017; Tekintaş ve Hoşgör-Limoncu, 2018).

2.9.1 Geleneksel Yöntemler

Koliformların tespiti, tarımsal su örneklerinde fekal kirliliğin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. *E. coli*, toplam koliformlar veya fekal koliformları tespit etmek için kullanılan hemen hemen tüm yöntemler, laktoz fermentasyonuna dayanan yöntemlerdir (FDA, 2020). Geleneksel tanı yöntemleri, canlı hücre dışında (*in vitro*) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakteriler için önerilen katı (örn. VRBA) ve sıvı (örn. LST) selektif besiyerlerinin kullanımı ve inkübasyon süresinden sonra metabolik reaksiyonlara veya büyüme tepkisine dayanmaktadır. Bu yöntemler; en muhtemel sayı yöntemi (MPN) ve membran filtrasyon yöntemi içeren yöntemlerdir (Anonim, 2014; Rodrigues ve Cunha, 2017).

2.9.1.1 En Muhtemel Sayı Yöntemi

En muhtemel sayı (MPN) yöntemi çoklu tüp yöntemi olarak da bilinmektedir. MPN testi, bir su numunesinde koliformların varlığının tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Bu test üç adımdan oluşur; varsayımsal bir test, onaylanmış bir test ve tamamlanmış bir test (Şekil 4). Türkiye Standartları Enstitüsü (TSE), TS EN ISO 9308-2 numaralı "Su kalitesi- *Escherichia coli* ve koliform bakterilerin tespiti ve sayımı - Bölüm 2: En muhtemel sayı yöntemi" uluslararası standardı kullanmaktadır (TSE, 2012).



Şekil 4. Su numunelerinde koliformlar için bir MPN testi gerçekleştirme prosedürü: (A) varsayımsal test ve (B) doğrulanmış test (Gerba, 2009).

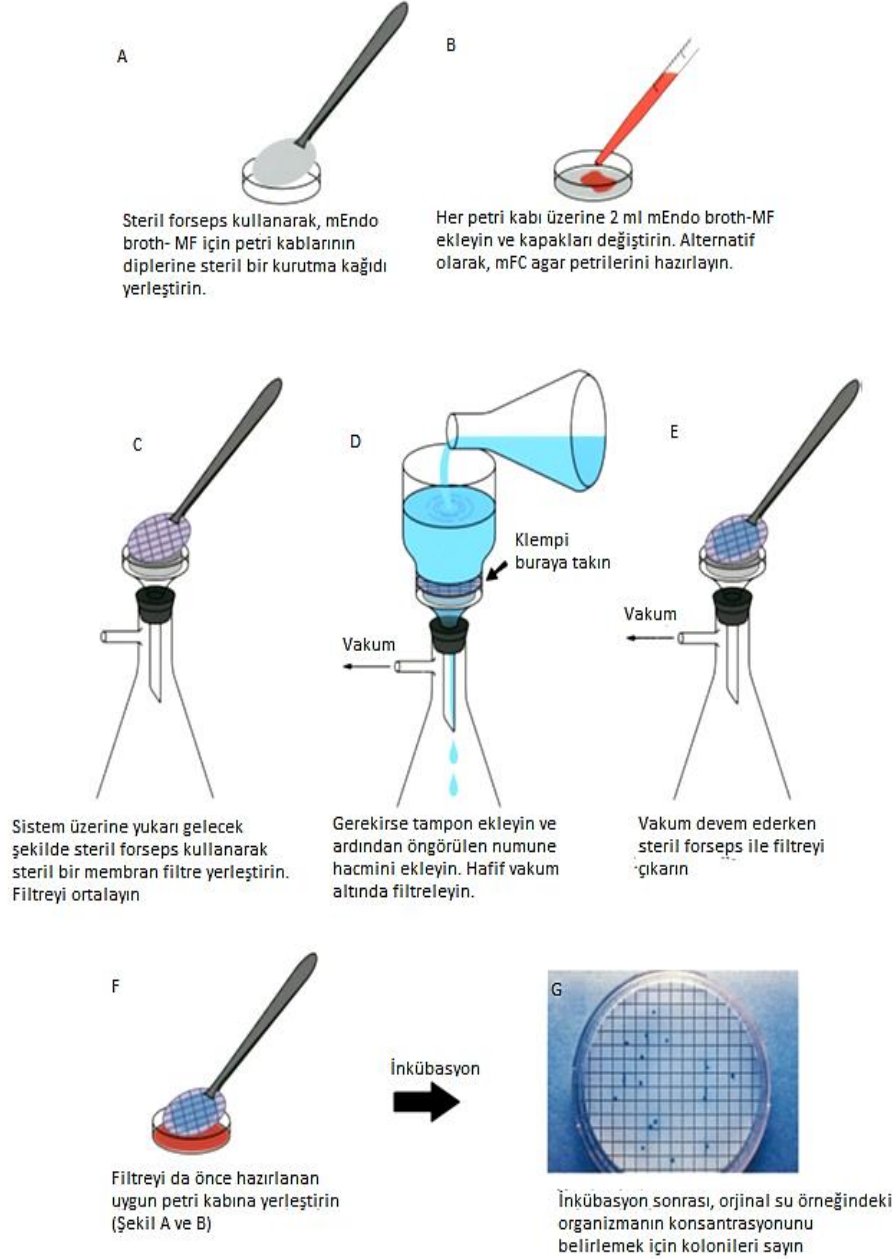
Varsayımsal testte, lauril sülfat-triptoz-laktoz broth, test edilecek suyun farklı seyreltmelerine sahip bir dizi test tüpüne yerleştirilir. Genellikle seyreltme başına üç ila beş test tüpü hazırlanır. Bu test tüpleri 35° C'de 24 ila 48 saat inkübe edilir, daha sonra gaz ve asit üretimi ile gösterilen koliformların varlığı açısından incelenir. Pozitif tüpler tanımlandıktan ve kaydedildikten sonra, 100 ml başına koliform sayısı veren bir MPN tablosu kullanarak orijinal numunedeki toplam koliform sayısını tahmin edilir. Doğrulama testinde koliformların varlığı, Levine's eozin–metilen mavisi (EMB) agar veya Endo agar gibi seçici bakteriyolojik agarların pozitif tüplerden az miktarda kültürle aşılmasıyla doğrulanır. Laktoz fermente eden bakteriler, ortamda yeşil parlaklığa sahip kolonilerin veya karanlık bir merkeze sahip kolonilerin üretilmesiyle gösterilir. Bazı durumlarda tamamlanmış bir test, asit ve gaz üretimini göstermek için agardan gelen kolonilerin lauril sülfat–triptoz–laktoz broth'a geri inoküle edilmesiyle gerçekleştirilir (Gerba, 2009).

2.9.1.2 Membran Filtrasyon Yöntemi

Membran filtrasyon tekniği, özellikle su ve diğer sıvı numunelerin analizinde kullanılmaktadır. MF tekniğinin çalışma prensibi, su numuneleri ve bu numunelerden hazırlanmış seyreltileri, steril 0,45 µm ve daha küçük gözenek çaplı mikroorganizma hücrelerinin ve sporlarının geçmesine izin vermeyen selüloz veya polikarbonattan yapılmış özel membran filtrelerden basınç ve vakum yardımıyla geçirilerek numunelerin içerisindeki mikroorganizmalar filtre üzerinde tutulması hedeflenmiştir. Su numuneleri membran filtreden geçirildikten sonra filtreler uygun bir besi yeri (M- Endo Agar, LES Endo Agar) üzerine aktarılarak 35°C-37°C' de 24 inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonucunda filtre içerisinde bulunan kapiler gözenekler yardımıyla besi yeri filtre üzerindeki mikroorganizmalara ulaşır. Filtre üzerinde gelişen mikroorganizmalar yüzeyde metalik yeşil bir rengin eşlik ettiği pembeden koyu kırmızıya doğru renkteki koloniler sayılarak mikroorganizma sayısı hesaplanır (Şekil 5).

Doğrulama için her bir koloni bir öze yardımıyla LST Broth besi yerine aşılansak 35°C-37°C' de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonucunda tüplerdeki mikroorganizma gelişimi ve gaz oluşumu gözlemlenir. Pozitif tüpler BGLB broth besi yerine ekilerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonucunda mikroorganizma gelişimi ve gaz oluşumu gözlemlenir. Sonuç pozitif ise mikroorganizma (koliform) doğrulanmış olur (Cemeroğlu, 2013).

Su kalitesinin belirlenmesinde TSE'nin yürürlükte olan standartlarında [TS EN ISO 7899-2, TS 8020 EN 26461-2 ve TS EN ISO 14189 (İngilizce Metin)] membran filtrasyon yöntemi kullanılmaktadır (TSE, 1997; TSE, 2002; TSE, 2017).



Şekil 5. Vakum filtrasyonu kullanarak bir su numunesindeki koliform sayısını belirlemek için membran filtrasyon yöntemi (Gerba, 2009).

2.9.2 Alternatif Mikrobiyolojik Yöntemler

2.9.2.1 İmmünolojik Yöntemler

İmmünolojik yöntemler, antijen-antikor kompleksinin özgüllüğüne ve bu tanıma reaksiyonunun bir özelliği olan yüksek afiniteye dayanmaktadır. Antijen-antikor bağlama reaksiyonlarının yaygın kullanımı, enzime bağlı immünomanyetik ayırma (IMS) Enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA), veya immünofloresan (IF) testi yoluyla hedeflenen hücre tespiti ile hücre yakalamayı içerir. Enzim bağlantılı floresan immünolojik test; bir antikor, bir enzimle etiketleyen hücresel bileşen tabanlı bir teknolojidir. Antikorlar, kromajenik veya florojenik substratların parçalanmasını katalize eden enzimlere yükseltilebilir ve konjuge edilebilir. İnkübasyondan sonra, bir enzim substratı eklenir. Pigmentli bir ürünün oluşumu, numunede bulunan enzim miktarının göstergesidir ve elde edilen mikroorganizma miktarıdır (Rodrigues ve Cunha, 2017).

2.9.2.1.1 İmmünomanyetik Ayırma (IMS) Yöntemi

İmmünomanyetik ayırma (IMS), bilinen bir süreç ile bir karışımdan hedef patojenlerin yakalanması ve yoğunlaştırılması için antikor molekülleri ile kaplı küçük manyetik parçacıklar (süperparamanyetik) kullanılır. En yaygın manyetik taşıyıcılar 1-2,8 mm arasında değişen çapa sahip DynabeadsR'dir. Bunlar polistiren kaplı demir oksittir. Biyotilenmiş bir antikorun tutuklanması için streptavidin kaplı boncuklar kullanılmaktadır. Bunlar bir manyetik ayırıcı ile kolayca bir süspansiyondan uzaklaştırılabilir. Hiçbir manyetik kalıntı olmadığı için parçacıklar birbirlerini çekemez ve bu nedenle herhangi bir harici manyetik alanın bulunmaması durumunda homojen bir karışım içerisinde kolaylıkla süspense edilir. IMS iki aşamaya sahiptir. İlk olarak ilgili mikroorganizmaları içeren süspansiyon 30-60 dk boyunca manyetik parçacıklar ile karıştırılır. Daha sonra manyetik kompleksi içeren tüp, bir manyetik ayırıcıya yerleştiril ve sıvı atılır. İkinci aşamada manyetik kompleks istenmeyen kirletici maddelerinin uzaklaştırılması için birkaç kez tampon ile yıkanır. Daha sonra hücreler nükleik asit bazlı PCR, immünolojik test veya biyosensör temelli yöntemler kullanılarak daha sonra test edilmek üzere toplanır (Ray ve Bhunia, 2013).

Doğrudan ve dolaylı yaklaşımla IMS yöntemleri kullanılarak çevre örneklerinden ve gıdalardan çeşitli mikroorganizmaların yoğunlaştırılması ve ayrılması için immünomanyetik boncuklar kullanılmıştır. Doğrudan yaklaşımda organizmaya

özgü antikorlar ile kaplı olan manyetik parçacıklar ile hedef organizma karıştırılır. Parçacıklar bakteri hücreleri ile temas ettiğinde, birincil antikorlarla tutulur. Dolaylı yaklaşımda birincil antikor süspansiyona eklenir ve hedef organizmaya tutunması için beklenir. Daha sonra birincil antikor için özgül olan, ikincil bir antikor ile kaplı manyetik parçacıklar eklenir ve birincil antikora tutulması için beklenir. Manyetik parçacık kompleksleri daha sonra manyetik yoğunlaştırıcı kullanılarak ayrılır. Büyük hacimli örneklerden yakalama verimliliğini arttırmak için tekrar sirküle eden sıvıdan hedef patojenleri yakalamak için cam boncukların bölme içinde tutulduğu bir akış yoluyla PathatrixR sistemi ticari olarak mevcuttur. IMS seçici besi yerie ekim, immüno Floresan testi, PCR, akış sitometrisi ve patojenite temelli testler ile bağlantılı olarak kullanılmıştır (Ray ve Bhunia, 2013).

2.9.2.1.2 Enzim Bağlı İmmünosorbent (ELISA) Yöntemi

Enzim-bağlı immünosorbent testi (ELISA), *E. coli O157:H7*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni* gibi patojenlerin veya bunlara ait toksinlerin saptanması için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Spesifik antikorun önce ticari üreticinin talimatlarına göre katı bir yüzeye (bir mikrotitrasyon plakasının bir duvarına) bağlanmasına izin verilir. Daha sonra yüzeydeki ek protein bağlanma bölgelerini bloke etmek için bloke edici ajanlar (sığır serum albümini) eklenir. Antijen (patojenler veya toksinleri) içeriğinden şüphelenilen numune, ihtiyaca göre hazırlanır ve ardından kuyuya eklenir ve antikor-antijen reaksiyonu için inkübe edilir. Bağlanmamış antijeni çıkardıktan sonra, spesifik bir enzimle (peroksidaz gibi) etiketlenmiş başka bir antikor eklenir ve bir sandviç (antikor-antijen-antikor-enzim) oluşturmak üzere antijene bağlanması için inkübe edilir. Bağlanmamış enzime bağlı antikor daha sonra çıkarılır. Sandviç kompleksi son olarak, enzime özgü bir kromajenik substrat (peroksidaz için 4 kloro-1-naftol gibi) belirli bir süre inkübe edilerek ve reaksiyonu durdurmak için bir enzim inaktivatörü eklenerek tespit edilir. Renk gelişiminin yoğunluğu daha sonra belirli bir patojen veya toksinin varlığını tanımlamak için ölçülebilir. Kromajenik bir substrat yerine, spesifik bir florojenik substrat (peroksidaz için 3-p-hidroksifenil propiyonik asit gibi) kullanılabilir ve reaksiyon bir florimetre ile ölçülebilir (Ray, 2004).

2.9.2.1.3 İmmünofloresan (IF) Yöntemi

Temel olarak, bir immünofloresan (IF) yöntemi, ELISA yöntemine benzer. IF'de, bir antijen ile bir cam lam yüzeyinde veya 96 kuyucuklu bir mikrotiter plaka içerisinde kompleks oluşturduktan sonra, bir floresan mikroskopu, bir spektrofotometre veya bir dijital kamera ile tespit edilen floresan yayan, floresan etiketli bir tespit antikoru (bir patojenin somatik veya flagella antijenlerine karşı) kullanılır. Kullanılan floresan işaretçiler rodamin B, floressen izosiyanat ve floressen izotiyosiyanat (FITC) (Ray ve Bhunia, 2013). Floresan antikor tekniği iki temel yöntem kullanılarak gerçekleştirilebilir: Doğrudan yöntem, antijenlerin floresan etiketli spesifik bir antikorla bağlanmasını kullanır. Dolaylı yöntemde, birincil antikor floresan ile bağlanmaz, bunun yerine türlere özgü bir ikincil antikor spesifik floresan ile etiketlenir. Dolaylı yöntemde, etiketli antikor, birincil antikor ve antijen kompleksinin varlığını tespit eder. Dolaylı yöntemin kullanılması, ilgilenilen her organizma için floresan etiketli bir antikor hazırlama ihtiyacını ortadan kaldırır (Ray ve Bhunia, 2013).

IF yönteminde, antikorlar UV ışığı altında floresan bir boya ile etiketlenir. Numaralandırma, su örneğinin filtrasyonundan sonra epifloresan mikroskopi veya katı faz sitometrisi veya akış sitometrisi ile gerçekleştirilebilir (Rodrigues ve Cunha, 2017). Yapılan bir araştırmada ürün yıkama suyuna aşıl原因an *E. coli* O157:H7'nin tespitinin ELISA ve doğrudan immünofloresan filtre tekniği kullanılarak 8 saatten daha kısa bir sürede gerçekleştirilebileceği ifade edilmiştir (Fratamico ve Strobaugh, 1998). Deniz suyu örneklerinde *E. coli* tespiti ve sayımı için dolaylı immünofloresan yöntemi, m-FC agar ortamında konvansiyonel sayımla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Caruso ve ark., 2000).

2.9.2.2 Nükleik Asit Temelli Yöntemler

Nükleik asit yöntemleri, DNA veya RNA gibi nükleik asitleri bir prob sokarak tespit etme ve bakterilerin fenotip yerine genotip ile karakterizasyonuna izin verme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bireysel veya mikroorganizma suşu grupları için benzersiz bir genetik imzanın tanımlanmasını gerektirir. Problar bir radyoizotop, bir enzim, bir flüoresan veya bir kromajen ile etiketlenebilir. En yaygın kullanılan hibridizasyon stratejileri floresan yerinde hibridizasyon (FISH) ve polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR) (Rodrigues ve Cunha, 2017).

2.9.2.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction) Yöntemi

En yaygın kullanılan DNA bazlı yöntem PCR'dır. Bir patojene özgü bir gen segmenti, bir çift spesifik primer (yaklaşık 20 baz çifti uzunluğunda küçük bir DNA parçası) kullanılarak birkaç kat büyütülür. PCR tekniği, temelde üç döngüden oluşur;

1. Çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözülerek tek sarmal haline gelmesi "**Denatürasyon**"
2. Primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya "**Bağlanma (Annealing)**"
3. Mg^{+2} iyonlarını varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin "**Uzaması (Extension-Elongation)**"

30-35 döngü amplifikasyondan sonra tek bir gen görsel tanımlama için bir agaroz jelde ayrılabilen milyonlarca kopya çoğaltılabilir. Multipleks PCR, yöntemin özgülüğünü artırmak için tek bir reaksiyon tüpü içerisinde birden fazla geni hedefleyerek geliştirilmiştir. Yöntem *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* ve *Vibrio vulnificus* gibi patojenlerin saptanması için geliştirilmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Q-PCR) sisteminde, primerin uzaması gerçekleşirken, floresan boya etiketli bir probun hedef DNA ile hibridize olmasına izin verilir, Taq DNA polimerazın endonükleaz etkinliği probu ayırır ve raportör boya serbest bırakılır, çoğaltılan PCR ürünlerinin miktarı yerleşik bir lazer detektörü ile ölçülür. Prob (~ 100 bp), raportör (R) ve bir sönüm (quencher, Q) floresan boyanın her ikisinde etkilenir ve yakın ilişki nedeniyle normal şartlarda floresan boya söndürülür (Ray ve Bhunia, 2013).

Raportör molekül, primer uzaması (endonükleaz aktivitesinden kaynaklanan) sırasında olduğu gibi sönüm molekülden fiziksel olarak uzaklaştırıldığında, kuyucukta da floresan bir sinyal olur. Bu PCR tabanlı yöntemlerin en büyük dezavantajlarından biri, ölü hücreleri canlı hücrelerden ayırt edememeleridir. Bu sorunun üstesinden gelmek için sadece canlı hücrelerde bulunan mesajcı RNA'nın (mRNA) çoğaltım için kullanıldığı bir ters transkriptaz (RT)-PCR yöntemi geliştirilmiştir. Tamamlayıcı DNA (cDNA), bir ters transkriptaz enzimi kullanılarak mRNA'dan sentezlenir ve daha sonra standart bir PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılır. RT-PCR, gıda zehirlenmesinde sorumlu Norovirüs, rotavirüs ve diğer bazı enterik virüsler gibi RNA virüslerini tespit etmek için de kullanılır (Ray ve Bhunia, 2013).

2.9.2.2.2 FISH (Floresan Yerinde Hibridizasyon) Yöntemi

Floresan yerinde hibridizasyonu (FISH), rRNA ya yönelik oligonükleotid problemlerin kullanıldığı moleküler teknikler arasında kullanılan en yaygın yöntemdir. FISH'te kullanılan problemler 15-25 nükleotid uzunluğundadır ve 5' ucunda floresan etiketleriyle kovalent olarak etiketlenmiştir. Sıkı yıkamadan sonra, özellikle lekeli hücreler epifloresan mikroskopisi veya akış sitometrisi ile tespit edilir (Wagner ve ark., 2003). Bununla birlikte, yöntemin özgüllüğü, oligonükleotid probleminin özgüllüğüne ve kullanılan hibridizasyon koşullarının sıklığına bağlıdır. Bu nedenle, belirli bir problem için aşırı sayıda hedef olmayan bakteri yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Fekal indikatör mikroorganizmaların tespiti için bir dizi FISH yöntemi geliştirilmiş ve kullanılmıştır, ancak bu tekniğin temel eksikliği, istenen bakteri taksonunu veya grubunu hedefleyen problemlerin ticari olarak bulunamamasıdır (Rodrigues ve Cunha, 2017). FISH, nehir suyundaki canlı *E. coli*'yi saptamak için, alg gruplarının ve çok çeşitli bakterilerin tespitinde kullanılmıştır (Garcia-Armisen ve Servais 2004; Medlin ve Orozco, 2017). FISH, PCR bazlı olmayan moleküler teknikler arasında en sık uygulanan tekniktir (Lopez-Roldan ve ark., 2013).

2.9.2.3 Patojen Tespitinde Biyosensörler

Biyosensör tabanlı teknolojiler, geleneksel yöntemlere alternatif olarak gıda kaynaklı patojenleri tespit etme yöntemlerinde giderek daha fazla kullanılmaktadır. Biyosensörler, elektriksel, optik veya kütle değişim sinyali üreten bir dönüştürücünün yakınına yerleştirilen antijen—antikor, enzim—substrat veya reseptör—ligand formundaki biyolojik veya kimyasal kompleksleri tespit eden cihazlardır. Biyosensör araçlarla patojen tespiti, mikroorganizmaların dört temel fizyolojik veya genetik özelliğine odaklanır. Bunlar; (1)substrat kullanımı, (2)antikorların, virülens veya fizyolojik veya yapısal belirteçlerin fenotipik ifade analizi, (3)patojenlerin ökaryotik hücrelerle etkileşimi (sitopatojenik etkiler) ve (4)genetik analizidir. Piyasada satılan birçok ticari hızlı yöntem, 24-72 saat içinde sonuç elde etmek için nükleik asit bazlı, antikor veya substrat kullanımına dayalı otomatik veya yarı otomatikleştirilmiş yöntemlerle birleştirilmiş geleneksel kültür bazlı yöntemleri kullanır. Günümüz biyosensör tabanlı yöntemlerin çoğu, yukarıdaki dört ilkedeki biri veya bunların kombinasyonları kullanılarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte, antikor bazlı

immünoensör yöntemleri çok yaygın ve çok yönlü olup kullanım kolaylığı sağlar (Ray ve Bhunia, 2013).

Biyosensör, biyolojik yanıtı / sinyalleri bir elektrik sinyaline dönüştüren analitik bir cihazdır. Bunun iki ana önemli bileşeni vardır; biri tanınması gereken biyoreseptör ve tanıma olayını ölçülebilir hassas elektrik sinyaline dönüştüren bir dönüştürücüdür. Bir biyoreseptör doku, organel, mikroorganizma, enzim, hücre, antikor, nükleik asit vb. olabilir. Antikorlar, ilgili özelliklere dayanarak monoklonal, poliklonal veya rekombinant olabilen ve sentezlenme biçimlerinde farklılık gösteren yaygın biyoreseptörlerdir. Biyosensörler, kullandıkları transdüksiyon yöntemlerine göre de sınıflandırılabilir. Gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için son on yılda çok çeşitli transdüksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Biyosensörlerde kullanılmak üzere geliştirilen yeni transdüser türleri olmasına rağmen, optik, elektrokimyasal ve kütle tabanlı transdüksiyon yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Umesha ve Manukumar, 2018).

Biyosensör sistemleri, lipozom-immünoassayler, mikrodiziler, floro-immünoassayler ve bakterilere yönelik biyokonjuge nanopartikül problemleri dahil olmak üzere bir dizi farklı platforma dayanmaktadır (Bridle ve ark. 2014).

2.9.2.4 Spektrofotometrik Yöntemler

Spektroskopi; ışığın, numune ile etkileşimi (yansıma, kırılma, elastik saçılma, absorpsiyon, elastik olmayan saçılma ve emisyon yoluyla) gözlemlenerek, atomlar ve moleküller ile etkileşime giren ışığın dalga boylarının belirlenmesi ve belirli bir dalga boyunda emilen, yansıyan, saçılan veya yayılan ışık miktarının ölçülmesidir. Kısaca, bir madde veya materyaldeki molekül, atom, iyonların, bir enerji düzeyinden diğer enerji düzeyine geçişi sırasında, absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımaların ölçülmesi ve yorumlanmasıdır (Morris, 2015; Tekintaş ve Hoşgör-Limoncu, 2018).

Spektrofotometreler tek ışın ve çift ışın olmak üzere iki tiptir. Tek ışın spektrofotometrelerinde, ışık kaynağında tek ışın vardır. Boş numune olarak da adlandırılan referans numune önce numune tutucuya yerleştirilir ve dalga boyu absorpsiyonu ölçülür. Daha sonra çıkarılan örnek numune, numune tutucuya yerleştirilir ve ışığın emilimi tekrar ölçülür. Referans numunenin absorpsiyon değeri, incelenen örnek numunelerin absorpsiyon değerinden çıkarılır (Kumar ve Gill, 2018).

Spektroskopik yöntemler, maddelerin kantitatif ve kalitatif analizleri, stereokimyasal özelliklerin incelenmesi gibi birçok alanda uygulanmaktadır. Bazı spektroskopik yöntemlere fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, raman

spektroskopisi, morötesi-görünür ışık spektrofotometresi, floresans spektrofotometresi, matrisle desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) örnek verilebilir.

2.9.2.4.1 Mikrodizilim ve Kütle Spektrometrisi

Tek bir analizle birden fazla patojenin saptanması, numune analiz maliyetini düşürme ve bir ürünün toplam mikrobiyolojik güvenliğini / kalitesini sağlama potansiyeli nedeniyle oldukça arzu edilir. DNA mikrodiziliminde (microarray), spesifik genleri hedefleyen DNA problemleri önce mikrodizilim çip üzerine basılır ve ardından DNA içeren örneklerle testte maruz bırakılır. Numunede bulunan tamamlayıcı bir spot içerisindeki problemler DNA hibridize olur bağlanmamış veya zayıf bağlanmış DNA yıkanarak uzaklaştırılır. Hibridize ürünler daha sonra floresan ile tespit edilir ve sayılır (Ray ve Bhunia, 2013). DNA mikro dizilimi, gıda numunesinde bazı patojenlerin (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *E. coli* O157:H7 ve *Campylobacter jejuni*) tek tek veya kombine halde saptanması için kullanılır.

Matris destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon (MALDI) uçuş zamanlı kütle spektrometresi (TOF MS) gibi kütle spektrometresi, patojenlerin her biri için protein profillerine dayalı spektral bir imza oluşturur ve birden fazla patojeni tespit etmek için uygulanabilir. Bu sistem aynı zamanda analiz için gıda örneklerinden izole edilmiş saf kültürler gerektirir (Ray ve Bhunia, 2013).

2.9.2.4.2 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Raman Spektroskopisi

Hem FTIR hem de Raman spektroskopisi, bakterilerin hücre duvarı ve sitoplazmanın moleküler bileşimine dayalı taramalar yaparak spektrum üretir. Temel olarak, kızılötesi spektroskopisi; kızılötesi kaynak, numune ve dedektörden oluşur. Kızılötesi radyasyon emilirken veya numune üzerinden dedektöre iletilirken, bir "tarama" veya "parmak izi" profili oluşturur. Gelecekteki karşılaştırma için kullanılacak farklı bakteri türleri ve suşları için bir spektral tarama kütüphanesi oluşturulabilir. Bu yöntem, spektral koleksiyon için hücrelerin (biyokütle) büyüme ortamından IR yansıtıcı yüzeye aktarılmasını gerektirir. Tahribatsız etiketsiz hızlı bir yöntemdir ve gelecekteki tanımlama mevcut spektral kütüphaneye bağlıdır. FTIR, çeşitli gıda kaynaklı patojenlerin sınıflandırılması veya tanımlanması için kullanılmıştır:

Yersinia, Staphylococcus, Salmonella, Listeria, Klebsiella, Escherichia, Enterobacter, Citrobacter vb. (Ray ve Bhunia, 2013).

Raman spektroskopisi aynı zamanda etiketsiz bir algılama sistemidir ve mikrobiyal hücrelerle etkileşimi üzerine elastik olmayan saçılma olarak bilinen Raman dağılımı üreten bir diode lazer kullanır (785 nm). Tipik olarak, Raman sinyali çok zayıftır ve sinyali yükseltmek için, yüzeyle geliştirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), hedef mikroorganizmalara veya toksin moleküllerine spesifik olarak bağlanmak için altın veya gümüş nanopartiküllere bağlanmış biyotanıma molekülleri kullanılarak yapılandırılmıştır. Raman, *Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Burkholderia mallei, Francisella tularensis, Brucella abortus, L. monocytogenes, E. coli* O157:H7 ve *Salmonella*'nın tespiti için kullanılır (Ray ve Bhunia, 2013).

2.9.2.5 Biyoluminesans Yöntemi ve Mikroplaka Okuyucular

Bir biyoluminesans yöntemi, mikrobiyal yükün dolaylı bir ölçümü olarak, bir numunedeki ATP içeriğini ölçer. Sadece canlı hücreler ATP içerdiği için, ATP miktarı numunedeki mikrobiyal yük ile doğrudan ilişkili olarak kabul edilir. Bir numunedeki bulunan lize hücrelerdeki ATP konsantrasyonu Mg^{2+} varlığında lusiferin-lusiferaz (ateş böceğinden) sistemi kullanılarak ölçülür. Bu yöntem, bir gıdanın gramı veya mililitresi başına 10^{2-3} kadar canlı bakteri hücrelerini ve yaklaşık 10 maya hücresi tespit edebilir. Ekipman yüzeylerindeki mikrobiyal popülasyonu belirlemek için de kullanılabilir. Yöntem çok hızlıdır ve bunları kullanma yöntemlerine sahip birkaç otomatik sistem artık ticari olarak mevcuttur (Ray ve Bhunia, 2013).

Başka bir yöntemde, ışık saçan bakterilerden (örneğin, *Vibrio fischeri*) bakteriyel biyoluminesan kodlayan genler (lux geni), gıdada önemli olan bazı patojen, indikatör ve bozulma bakterilerinde klonlanmıştır. Bakteriyel lüsiferaz, moleküler O_2 ile indirgenmiş flavin mononükleotidinin (FMNH₂) ve uzun zincirli bir alifatik aldehitin oksidasyonunu katalize eder ve ışık yayar. Sadece canlı hücreler ışık üretebildiğinden, bakteri suşları içeren klonlanmış lux geni, gıda ve gıda ortamlarından hücreleri öldürmek ya da onları uzaklaştırmak için kullanılan yöntemlerin etkinliğini belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca, ışık üretme kabiliyeti olmayan fakat yaralanmanın onarımından sonra ışık üretmeleri mümkün olan yaralı bakterileri tespit etmek için de kullanılmaktadır. Reaksiyondan gelen ışığı ölçmek için otomatik sistemler ticari olarak mevcuttur (Ray ve Bhunia, 2013).

Mikroorganizmalarla çalışırken, örneğin bir bileşiğin antimikrobiyal etkilerini araştırırken, büyümenin değerlendirilmesi genellikle önemlidir. Mikrobiyal büyüme/büyümenin inhibisyonu; plaka sayıları (canlı sayımlar), doğrudan mikroskopik sayımlar, kuru ağırlık, bulanıklık ölçümü, absorban, biyoluminesans gibi birkaç yolla ölçülebilmektedir (Gabrielson ve ark., 2002). Birkaç suş paralel olarak ölçüleceği zaman, bunları 96 kuyulu mikropalakalar içinde muhafaza etmek, geliştirmek ve ölçmek pratik olabilir. Mikropalakalardaki mikrobiyal büyüme genellikle absorbanstan veya biyoluminesanstan ölçülür.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Suşlar ve İnokulum Hazırlanması

Bu çalışmada toplam iki adet jenerik *Escherichia coli* suşu aynı prosedürler uygulanarak ayrı ayrı test edildi. Suşlar American Type Culture Collection'a kayıtlı referans suşlardır (ATCC 25922 ve ATCC 35218). İnokulum hazırlanması sırasında donmuş kültürler (-20°C), Tryptic Soy Agar üzerine ekilmiş 36 ± 2°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktive edilmiştir. Aktif kültürlerden birer koloni 10 mL Tryptic Soy Broth'a inoküle edilmiştir. İnoküle edilen mikroorganizmalar 36 ± 2°C'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, gelişen kültürlerin 100 µl'si 15 mL'lik santrifüj tüplerine doldurulmuş 10 mL TSB'ye transfer edilerek tekrardan 36 ± 2°C'de 18 ± 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 5,300 RPM'de 10 dakika santrifüj edilerek (10 mL) peptonlu su ile iki defa yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra, supernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 5 mL peptonlu su eklenerek vortekslenmiştir. Sonuç olarak 10⁹-10¹⁰ CFU/mL jenerik *E. coli* yoğunluğuna sahip peptonlu su dilüsyonu sonraki aşamalarda kullanılmak üzere elde edilmiştir. Aşağıda şemazite edilmiştir.

3.2 Ekstraksiyon Koşullarının Belirlenmesi

Kromajenik boyanın hücre dokularından ekstraksiyonu için birçok çözelti ve çözücü (neler olduğu yazılabilir) denenmiştir. Uzun uğraşlar sonucu uygun çözelti dimetil sülfoksit (DMSO) olarak belirlenmiştir. Belirlenen temel ekstraksiyon prosedürü kısaca su şeklindedir. Kromajenik sıvı besi yerinde geliştirilen hücrelerin yıkanması gerekmektedir. İlk olarak inkübasyon sonrası 1 mL vortekslenmiş kromajenik besi yeri 2ml'lik tüpe aktarılmıştır. Daha sonra tüpler 22,000 RMP'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant, pellet kaldırılmadan dikkatlice alınmış ve yerine 1 mL saf su ilave edilmiştir. Vortekslenen saf su sediment karışımı tekrardan 22,000 RMP'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar alındıktan sonra pellet üzerine 1 mL DMSO eklenmiştir ve 4 dakika Qiagen Tissuelyser LT ile doku parçalama işlemine tabi tutulmuştur. DMSO ile ekstrakte edilen kromajenik boyanın ölü hücrelerden arındırılması için süpernatant 0.22µm'lik gözenekli filtreden geçirilmiş ve spektrofotometrik ölçüm için ayrılmıştır. Aşağıda şemazite edilmiştir.

3.3 Dalga Boyunun Maksimum Absorbans İçin Belirlenmesi

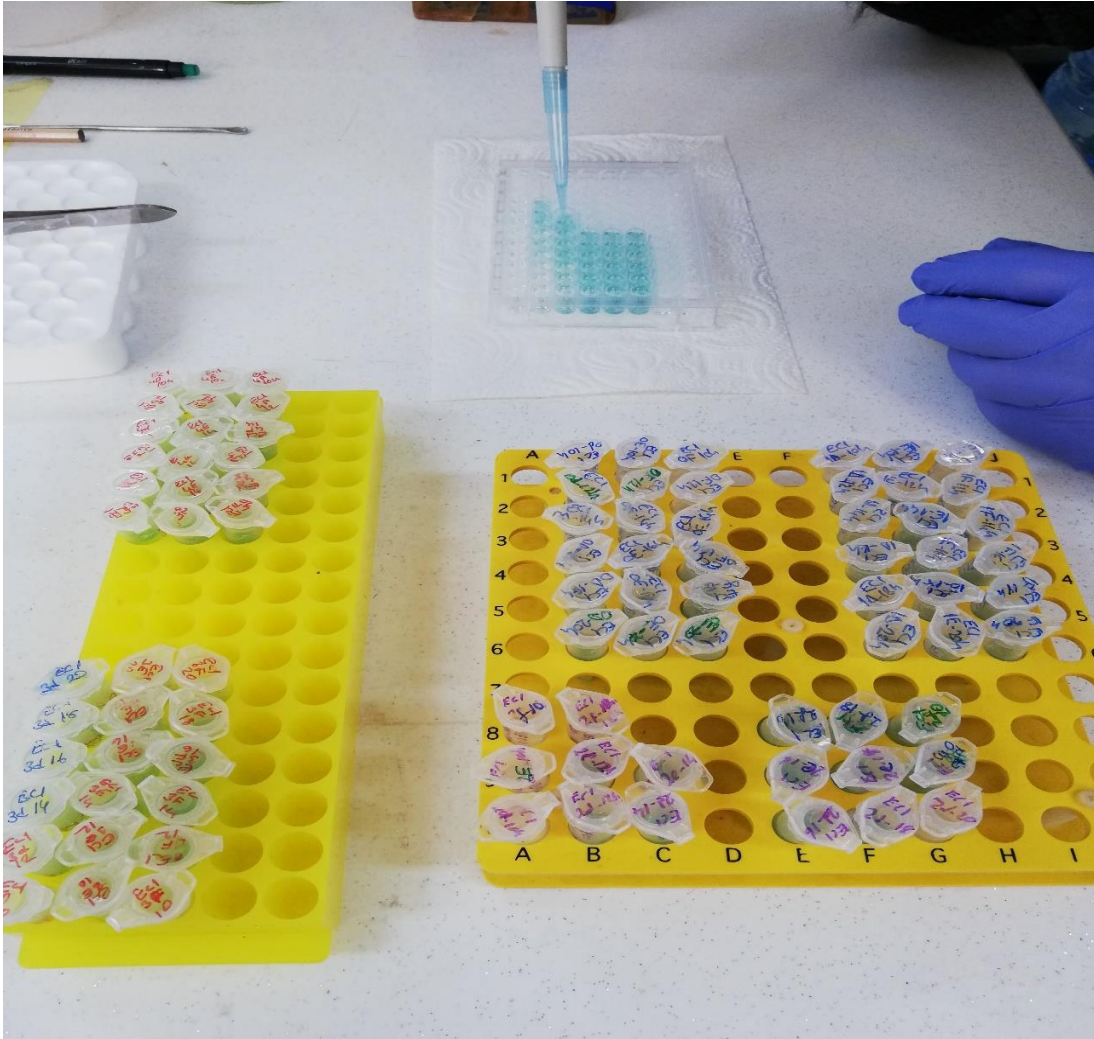
Kromajenik boyanın hücre dokularından başarılı bir şekilde ekstraksiyonu sağlandıktan sonra ikinci aşama olarak spektrofotometre ölçümlerinde kullanılacak olan dalga boyu belirlenmiştir. Bu amaçla hücreler jenerik *E. coli* (ATCC 25922) 24 saat $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 10 mL kromajenik sıvı besi yerinde inkübe edildikten sonra yukarıda belirtilen ekstraksiyon basamakları takip edilerek boyar madde DMSO çözeltisi ile elde edilmiştir. Muş Alparslan Üniversitesi ve Eskişehir Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında hizmet alımı yolu ile dalga boyu spektrum analizi yapılmıştır.

3.4 Spektrofotometrik Yöntem Zaman Konsantrasyon Ölçümlerinin Alınması

Hazırlanan inokulum 9 mL'lik peptonlu suya transfer edilerek seri seyreltmeleri (10^0 - 10^4 CFU/mL) yapılmıştır. Her bir dilüsyondan alınan 1 mL'lik örnekler, içerisinde 9 mL kromajenik besi yeri içeren tüplere eklenmiştir. Her bir konsantrasyon ölçümü en az 3 tekrar olarak yapılmıştır. Daha sonra inoküle edilmiş kromajenik besi yerleri $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 10, 12, 14, 16, 18 ve 20 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, yukarıda bahsedilen ekstraksiyon aşamaları takip edilerek daha önce belirlenen dalga boyundaki absorbans değerlerinin belirlenmesi için spektrofotometrik analize tabi tutulmuştur. Spektrofotometrik analizler Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi araştırma laboratuvarından hizmet alımı yapılarak microplate reader (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Paisley, UK) ile ölçülmüştür. Microplate reader ile ölçümün seçilmesi örnekler arasında standart sapmanın minimize edilmesini sağlamıştır (Şekil 6).

3.5 Spektrofotometrik Yöntemin Tarımsal Su Örnekleri için Performansının Değerlendirilmesi

Spektrofotometrik yöntemin tarımsal su örneklerindeki performansını karşılaştırılması için otoriteler tarafından kabul edilen membran filtrasyon ve En Muhtemel Sayı (Most Probable Number) ile Jenerik *E. coli* popülasyonu belirlenmiştir. Tarımsal sulardaki Jenerik *E. coli* popülasyonu 100 mL için raporlanmaktadır (MPN/100 mL veya CFU/100 mL).



Şekil 6. Microplate üzerindeki kromajenik boyanın ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik yöntem-zaman konsantrasyon ölçümler için hazırlık aşamasının son adımı

3.6 İndikatör Mikroorganizma Olarak Jenerik *Escherichia coli* Sayımı

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem Muş ili merkez sınırlarında daha önceden Karakoyun (2021) tarafından Murat Nehri (M), Karasu (K), Gölet Balık (GB) ve Gölet Yurt (Y) tanımlanan dört tarımsal yüzey su kaynaklarından steril cam şişelerde (1000 mL) olacak şekilde kasım ayı içerisinde alınan su örnekleri üzerine uygulanmıştır. Spektrofotometrik zaman konsantrasyon ölçümleri için alınan örneklerden aynı zamanda hedef mikroorganizma sayısını belirlemek için membran filtrasyon ve en muhtemel sayı yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Farklı dört su kaynağından 5'er örnek alınmıştır. Laboratuvara transfer buz üzerinde iki saat içinde yapılmıştır.

3.7 Membran Sayımı Yöntemiyle Jenerik *Escherichia coli* Popülasyonlarının Belirlenmesi

Su örneklerinden 100 mL alınarak vakum altında 0.45 µm geçirgenlik çapına sahip selülozik (Millipore, Billerica, MA, USA) filtrelerden süzölmüştür. Daha sonra bu filtreler CHROMagar™ (ECC, Paris, France) üzerine steril bir pens ile yerleştirilerek 35-37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Seçici besi yerleri üzerinde tipik kolonilerin sayımı yapılarak su örneklerindeki jenerik *E. coli* popülasyonları belirlenmiştir. Su örneklerindeki yüksek jenerik *E. coli* popülasyonu ihtimaline karşı seyreltme yapılarak (1:10) filtre süzölmeleri yapılmıştır.

3.8 En Muhtemel Sayı Yöntemiyle Jenerik *Escherichia coli* Popülasyonlarının Belirlenmesi

Gösterge mikroorganizma olarak jenerik *E. coli* popülasyonları tarımsal su örneklerinde Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından önerilen 5 x 3 En Muhtemel Sayı (Most Probable Number) yöntemiyle belirlenmiştir. 5'er adet 10 mL, 1 mL, ve 0,1 mL su örnekleri sırsıyla 10 mL Double Strength Lauryl Tryptose (lactose) broth (LTB: Biolife; Milan, Italy), 1 mL Single Strength LTB'ye ve içine eklenerek 35-37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda durham tüplerinde gaz oluşumu gözlenen bir başka deyişle pozitif sonuç veren örneklerden 0,1 mL alınarak *Escherichia coli* medium (EC Medium: Biolife; Milan, Italy) besi yerine eklenmiş ve 44°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası durham tüplerinde gaz oluşumu gözlenen pozitif EC Medium örneklerinden öze ile Sorbitol MacConkey (SMAC: Biolife; Milan, Italy), CHROMagar™ (ECC, Paris, France) ve Eosin Methylene Blue (EMB: Biolife; Milan, Italy) agar üzerine çizim ekim yapılarak jenerik *E. coli* için çapraz onaylama testi yapılmıştır. Seçici besi yerleri üzerinde tipik koloniler kontrol edilerek su örneklerinin transfer edildiği pozitif tüp sayıları belirlenerek jenerik *E. coli* popülasyonları MPN tablosundan bakılarak belirlenmiştir.

3.9 İstatistiksel Analiz

Spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen veriler ile tarımsal su örneklerinde bulunan gerçek jenerik *E. coli* popülasyonları arasındaki korelasyon ve başarı performansı hesaplanmıştır. Korelasyon hesaplamaları için lineer regresyon analizi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

Gıda üretim ortamlarında kullanılan tarımsal su, geçmişteki ürün salgınlarında olası bir kontaminasyon yolu olarak tanımlanmıştır (Murphy ve ark., 2022). Tarımsal amaçlı kullanılan sular, çeşitli bakteriler, virüsler, protozoalar ve helmintler tarafından kirletilebilmektedir. WHO'ya göre, gelişmekte olan ülkelerdeki tüm hastalıkların %80'i kirli sulardan kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal kontaminasyonunun ana kaynakları; arıtılmamış ve uygun olmayan şekilde arıtılmış atık sular, su yollarının yanındaki tarlalarda ve besi alanlarındaki hayvan atıkları, işlenmemiş hayvan atıklarını suya salınan tesisler ve bazı vahşi yaşam türleridir. Tarımsal sularda patojenlerin sağ kalımı suyun mevcut kalitesine, çevre koşullarına ve iklim olayları gibi birçok faktöre bağlıdır (Sasakova ve ark., 2018). *Escherichia coli* dahil olmak üzere koliformlar, su ve gıda endüstrilerinde dışkı kontaminasyonunun birincil indikatör mikroorganizmaları olarak kullanılır ve enterik patojenlerin olası varlığının göstergeleridir (Browne ve ark., 2010).

Amerikan Mikrobiyoloji Derneği (ASM) jenerik *E. coli*'yi birincil mikrobiyolojik gösterge olarak izlemeyi önermektedir (ASM, 2001). Tarımsal sularda jenerik *E. coli* popülasyonunun belirlenmesi için birçok biyokimyasal reaksiyon ve moleküler bazlı sayım metodu geliştirilmiştir. Gıda Güvenliği Modernizasyonu Yasası Ürün Güvenliği Kuralı, kapalı ürün yetiştiricilerinin, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından tanınan ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) onaylı bazı yöntemlerle tarımsal sularının mikrobiyal kalitesini düzenli olarak izlemelerini gerekli kılmıştır (Adhikari ve ark., 2020). Sularda gösterge mikroorganizmaların belirlenmesi için uygulanan en önemli analitik yöntemler bakteriyel kültür yöntemleri, ELISA, PCR gibi geleneksel yöntemler ve spektrofotometri, kromatografi, elektroforez, yüzey gelişmiş Raman saçılması gibi gelişmiş alternatif yöntemlerdir (Canciu ve ark.,2021). Genellikle dışkı kirliliği ve patojen varlığının göstergeleri olarak tarımsal sularda koliform bakteriler, fekal enterokoklar ve *Escherichia coli* indikatör mikroorganizmalar olarak kullanılmaktadır (Wilkes ve ark., 2009).

E. coli popülasyonunun varlığının saptanmasında genellikle laboratuvar tabanlı yaklaşım kullanıldığından, sonucun elde edilmesi için uzun bir süre gerektirir. *E. coli*'nin saptanmasına yönelik geleneksel yöntemler arasında em muhtemel sayı, membran filtrasyon ve plaka sayımı yer alır. Bu kültür tabanlı yöntemler doğru, güvenilir ve düşük tespit limitlerine sahip olsalar da ilk sonuçları vermeleri için 2-3 gün ve doğrulama için 7-10 güne kadar ihtiyaç duyduklarından tipik olarak emek yoğun ve

zaman alıcıdır. ELISA ve PCR gibi diğer saptama yöntemleri daha az zaman alır ancak pahalı ekipman ve bu yöntemlerin uygulamasını yalnızca laboratuvar ortamıyla sınırlı kılan ilk örnek ön işleme gerektirir. Bu nedenle, endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere geleneksel yöntemlere alternatif yeni hızlı tanı yöntemlerinin araştırılması birçok çalışmaya konu olmuştur (Jongman ve Korsten 2018; Nurliyana ve ark., 2018; Cimafronte ve ark., 2020).

Tarımsal suların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenebilmesi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA, 2018) tarafından Metot 1603 bazlı toplam dokuz adet eşit test metodoloji önerilmektedir. Metot 1603, jenerik *E. coli* popülasyonunun membran filtrasyon ile Modified membrane-Thermotolerant *Escherichia coli* Agar (Modified mTEC) üzerinde sayımına dayanmaktadır. Bu metotların içinde uygulaması en kolay ve birçok otorite tarafından kabul edilen ve uygulanan yöntem IDEXX laboratuvarları tarafından geliştirilen ve enzim aktivitesini temel alan Quanti-Tray® sistemleridir. Bu yöntem klasik En Muhtemel Sayı (MPN) yönteminin enzim aktivitesi prensibine göre modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur. Hedef mikroorganizma popülasyonları (jenerik *E. coli*), IDEXX Quanti-Tray® 2000 / Colilert® (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) sistemi ile belirlenebilmektedir. Jenerik *E. coli* popülasyonu β -glukuronidaz aktivitesi hedef UV ışık altında 100 mL tarımsal su örneğinin proses edildiği tepsi üzerindeki floresan ışık veren kuyucukların sayısına bağlı olarak en muhtemel sayı yöntemi ile hesaplanmaktadır. Bu yöntem uluslararası kuruluşlarca (AOAC, IBWA, ve EBWA) onaylanmıştır. Ayrıca aynı sistem üzerinden β -galaktosidaz aktivitesine bakarak toplam koliform popülasyonu da belirlenebilmektedir.

Tarımsal sulardaki fekal indikatör bakterilerin hızlı tespiti gıda güvenliğinin sağlanması açısından önemlidir. Hızlı, basit ve düşük maliyetli tanı yöntemleri geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Kromajenik besi yeri bu yöntemlerden birisidir. Kromajenik besi yeri, hedeflenen mikroorganizmaların rengine göre tanımlanmasında kullanılır. Wu ve ark., (2018) çalışmalarında suda *E. coli*'yi daha hızlı saptamak için kromajenik ortam prosedürü geliştirmiştir. Filtre tabanlı yaklaşımda, 4 mm filtre kullanımında *E. coli* ~10 CFU/mL konsantrasyonu 6–7 saatte saptanmıştır.

Petri üzerindeki bakteri koloni sayımı önemli ve zaman alan bir işlemdir. Tok, (2009) geliştirdikleri petri görüntüleme metodla kısa sürede petri üzerinde *E. coli* sayımı yapmıştır. Geliştirilen metod yeni petri görüntüleri üzerinde denenmiş ve başarılı sonuçlar elde etmiştir. Kamma ve ark. (2008), göl suyu örneklerinde bakteri topluluğunu filtrelemek için kullanılan nitroselüloz filtre içeren bir filtre nokta tahlili

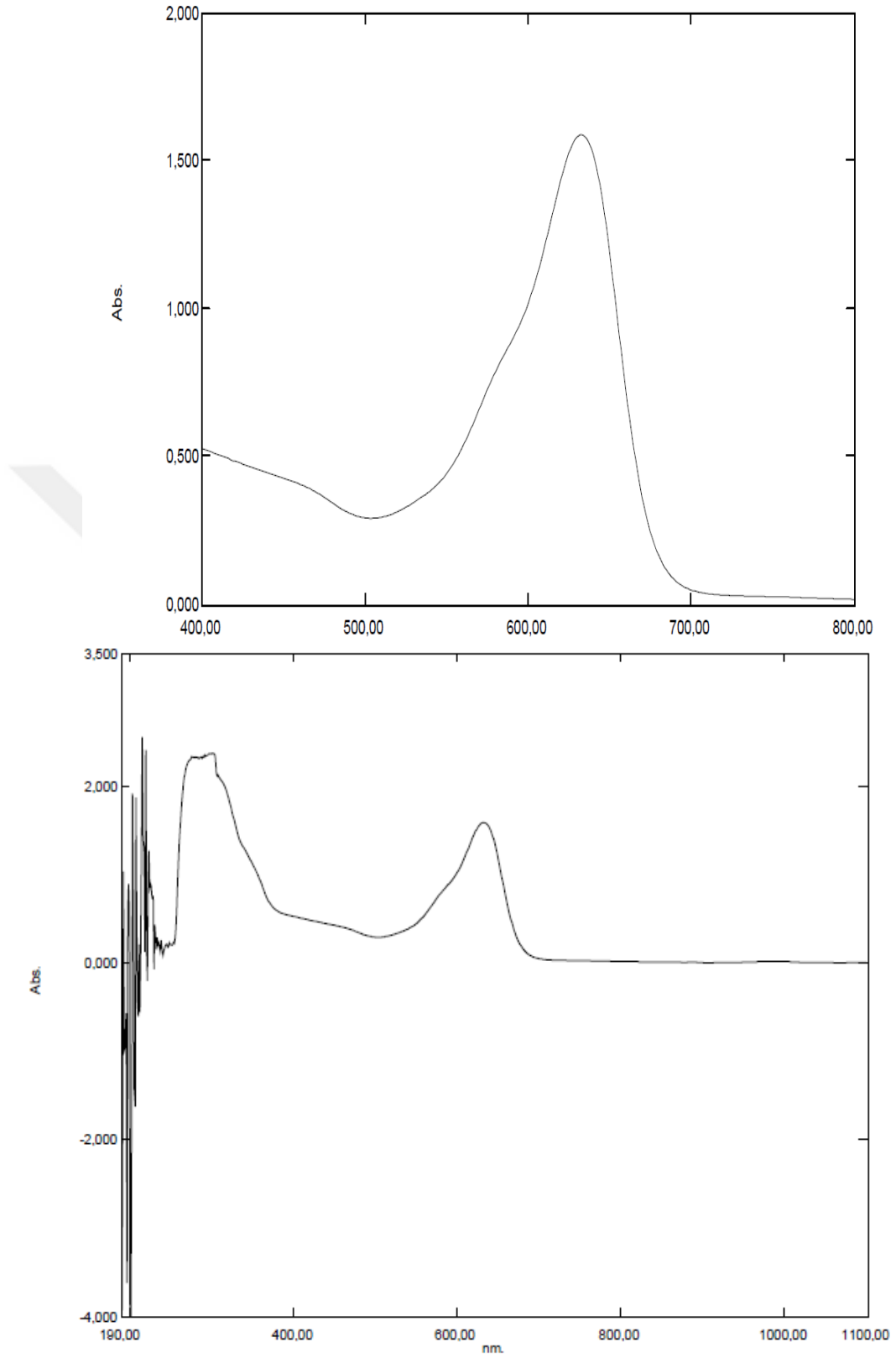
geliştirmiştir. Sonuç olarak 6 saatten kısa sürede su kaynaklı patojenlerin düşük seviyelerini tespit etmek için geliştirilen yöntemin kullanılabilirliği ifade edilmiştir.

Suda *Escherichia coli*'nin hızlı tespiti için ekran baskılı altın elektroda dayalı basit ve düşük maliyetli bir elektrokimyasal empedans immün sensörünün geliştirilmesi rapor edilmiştir. Sonuç olarak "Var/Yok" yanıtı vermek için yalnızca 1 saat gerektiği ifade edilmiştir (Cimafonte ve ark., 2020). Geleneksel standart analitik yöntemler pahalıdır, zaman alıcıdır ve özel laboratuvar koşulları ve ekipmanı gerektirir. Ultraviyole/görsel spektrometri (UV/Vis), geniş kullanılabilirliği ve düşük uygulama maliyetleri nedeniyle diğer yerinde yöntemlere göre önemli avantajlara sahip olabilmektedir. Sonuç olarak spektrofotometri, endüstriyel atık su mikrobiyal kalitesinin izlenmesinde önerilmiştir (Radzevičius ve ark., 2020).

Spektrofotometrik optik yoğunluk (OD), sıvı kültürde hücre konsantrasyonunu tahmin etmek için en yaygın kullanılan tekniktir. Bir spektrofotometrede ölçülen numunenin emiliminin kuru ağırlık veya hacim başına hücre sayısı ile ilişkili olduğun açıklanmıştır (Myers ve ark., 2013). OD ölçümleri, Beer-Lambert yasasına göre bakteri sayısı (N) veya konsantrasyonu (C) ölçümleriyle eşanlı hale gelmiştir. Bununla birlikte, OD ölçümleri bulanıklık ölçümleridir bu nedenle Beer-Lambert yasası, bazı hususlarla birlikte, yalnızca düşük yoğunluklu mikrobiyal kültürler için uygulanabilir. Mikrobiyal büyümenin yüksek verimli tahminleri için giderek daha fazla kullanılan plaka okuyuculardaki OD ölçümleri, yüksek kültür yoğunluklarında çalışabilir (Stevenson ve ark., 2016). UV-görünür spektrofotometre emilim ölçümü *E. coli*'nin varlığını tespit etmek için kullanılabilirliği ifade edilmiştir (md Salih ve ark., 2016).

Bir bakteri hücre kültürünün büyüme durumunu belirlemek için uygun ve en çok uygulanan yöntem, optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrik olarak belirlemektir (Meyers ve ark., 2018). *E. coli* kültürü hücre konsantrasyonları literatürde 420, 460, 590, 600, 650 ve 660 nm dahil olmak üzere çeşitli dalga boylarında rapor edilmiştir. *E. coli* pigmentli olmadığı için dalga boyu seçiminin önemli olmadığı varsayılabilir (md Salih ve ark., 2016).

Çalışmada kullanılan kromajenik boyanın hücre dokularına ekstraksiyonu sağlandıktan sonra sıvı besi yerinde inkübe edilen jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 referans suşları içeren DSMO çözeltisi kullanılarak spektrofotometrik okuma absorbansı 632 nm dalga boyu olarak belirlenmiştir (Şekil 7).

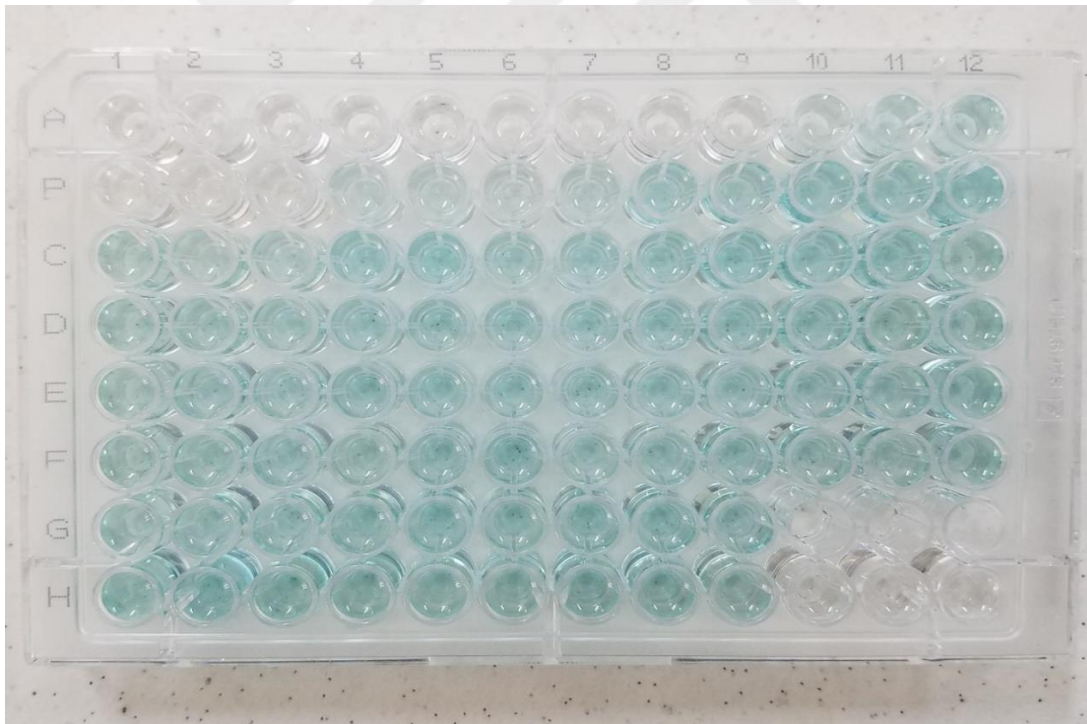


Şekil 7. Kromajenik boyanın hücre dokularından ekstraksiyonundan sonra spektrofotometre ile alınan bölgesel (400-800) ve tam (190-1100) dalga boyu taramalarının sonuçları.

Jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşlu inokulum içeren örnekler kromajenik besi yerinde 10, 12, 14, 16, 18 ve 20 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası ekstraksiyon aşaması takip edilerek absorbans değerlerinin belirlenmesi için spektrofotometrik analize tabi tutulmuştur (Çizelge 5 ve Şekil 8).

Çizelge 5. Mikroplate üzerindeki ölçüm için hazırlanan popülasyon – inkübasyon zaman (saat) düzenlemesi.

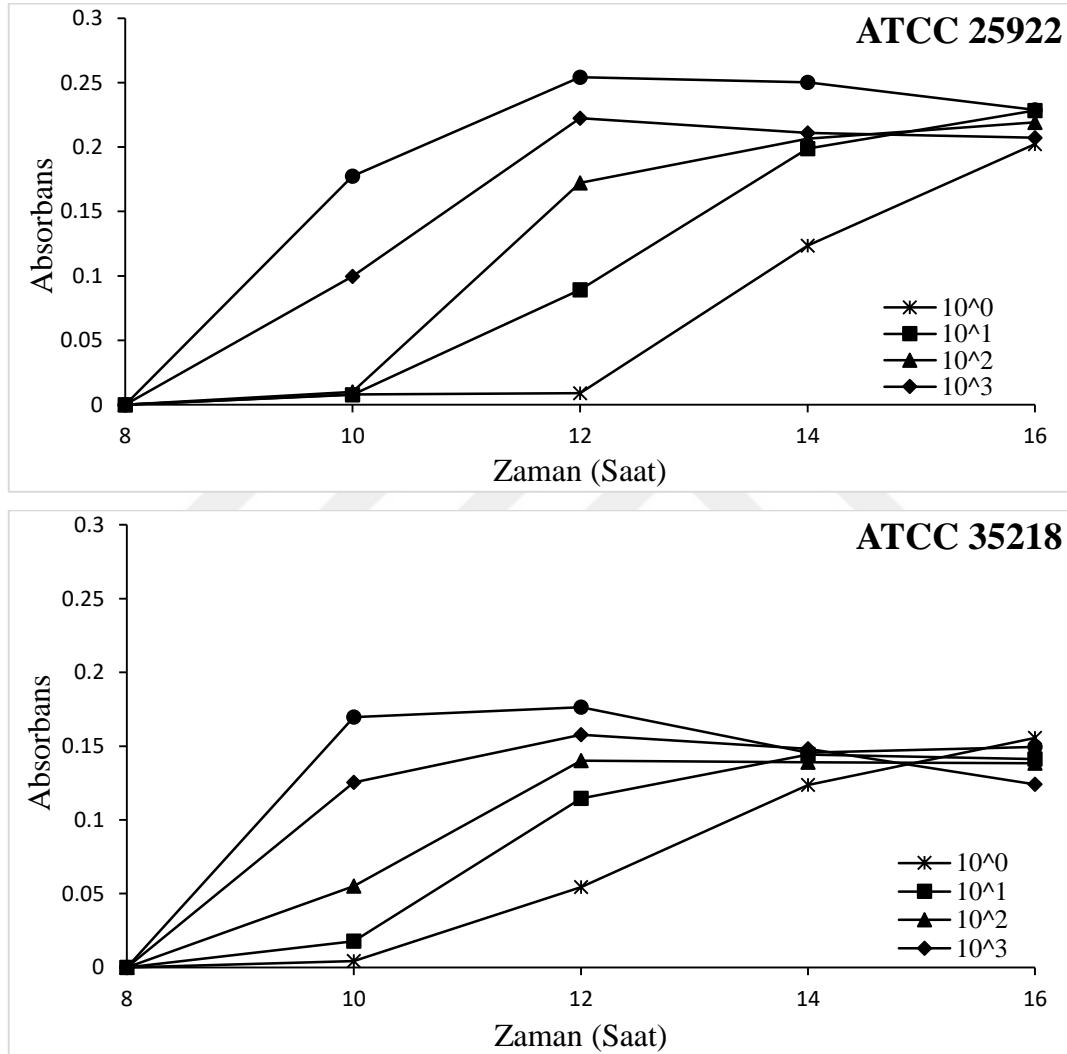
	Popülasyon – İnkübasyon Zamanı (Saat)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^0-10	10^0-10	10^0-10	10^1-10	10^1-10	10^1-10	10^2-10	10^2-10	10^2-10	10^3-10	10^3-10	10^3-10
B	10^0-12	10^0-12	10^0-12	10^1-12	10^1-12	10^1-12	10^2-12	10^2-12	10^2-12	10^3-12	10^3-12	10^3-12
C	10^0-14	10^0-14	10^0-14	10^1-14	10^1-14	10^1-14	10^2-14	10^2-14	10^2-14	10^3-14	10^3-14	10^3-14
D	10^0-16	10^0-16	10^0-16	10^1-16	10^1-16	10^1-16	10^2-16	10^2-16	10^2-16	10^3-16	10^3-16	10^3-16
E	10^0-18	10^0-18	10^0-18	10^1-18	10^1-18	10^1-18	10^2-18	10^2-18	10^2-18	10^3-18	10^3-18	10^3-18
F	10^0-20	10^0-20	10^0-20	10^1-20	10^1-20	10^1-20	10^2-20	10^2-20	10^2-20	10^3-20	10^3-20	10^3-20
G	10^4-10	10^4-10	10^4-10	10^4-14	10^4-14	10^4-14	10^4-18	10^4-18	10^4-18	Boş	Boş	Boş
H	10^4-12	10^4-12	10^4-12	10^4-16	10^4-16	10^4-16	10^4-20	10^4-20	10^4-20	Kör	Kör	Kör



Şekil 8. Mikroplate üzerindeki kromajenik boyanın ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorbans (632 nm) ölçümleri için hazırlanan popülasyon – inkübasyon zaman (saat) düzenlemesinin örnek resmi.

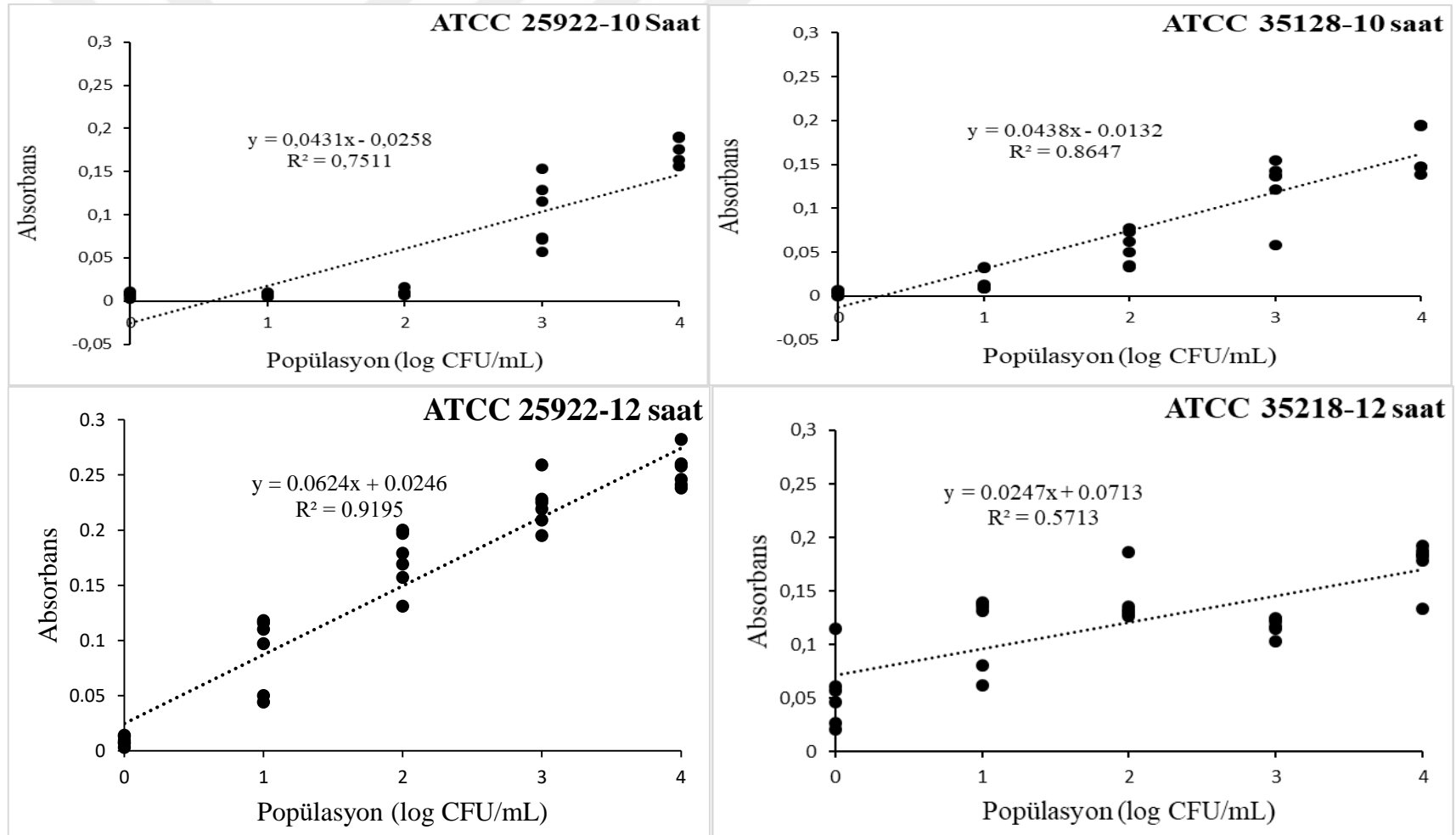
Luria-Bertani et suyundaki *E. coli* hücrelerinin fizyolojik durumu, 0,3 ila 1,0 OD₆₀₀ dalga boyu aralığında açıkça önemli ölçüde değiştiği ifade edilmiştir (Sezonov ve ark., 2007).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda 0,0 ile 0,3 OD₆₃₂ dalga boyunda ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşlarının 10⁰-10⁴ dilüsyonuna ait inkübasyon sonrası popülasyondaki değişim Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşlarının popülasyonlarının ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorbans (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümleri.

OD₆₃₂ okuma bazlı *E. coli* ATCC 25922 suşunun 12 saat sonunda inkübasyon-popülasyon arasındaki korelasyon ($R^2=0.9195$), ATCC 35218 suşunun 10 saat sonundaki inkübasyon-popülasyon arasındaki korelasyon ($R^2=0.8647$) yüksek bulunmuştur. Şekil 10 ve çizelge 6' da *E. coli* sularına ait R^2 değerleri ve lineer denklemleri verilmiştir

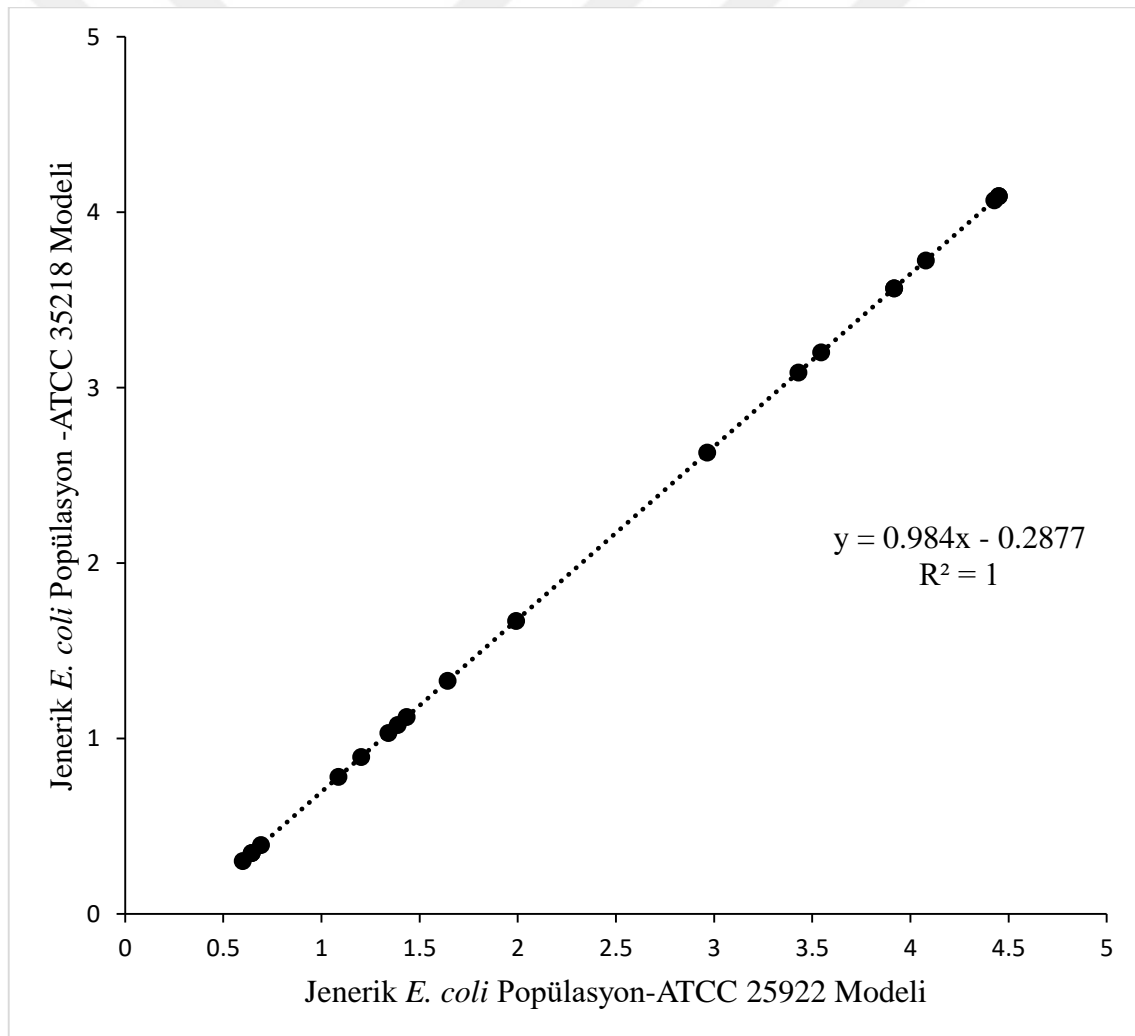


Şekil 10. Jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 şuşları için ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı inkübasyon zamanına (saat) bağlı absorbans (632 nm) – popülasyon (log CFU/mL) kromajenik boya lineer korelasyon modeller

Çizelge 6. Jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşları için inkübasyon zamanına (saat) bağlı ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorbans (632 nm) – popülasyon modelleri için hesaplanan R^2 ve elde edilen lineer denklemler.

Jenerik <i>E. coli</i> Suşu	İnkübasyon Zamanı	R^2	Lineer Denklemler
ATCC 25922	10 Saat	0.7511	$y = 0.0431x - 0.0258$
	12 Saat	0.9195	$y = 0.0624x + 0.0246$
ATCC 35218	10 Saat	0.8647	$y = 0.0438x - 0.0132$
	12 Saat	0.5713	$y = 0.0247x + 0.0713$

Çalışmamızda ise ekstraksiyon sonrası, OD_{632} jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşlarının popülasyonları arasında lineer korelasyon ($R^2=1.00$) tespit edildi (Şekil 11).



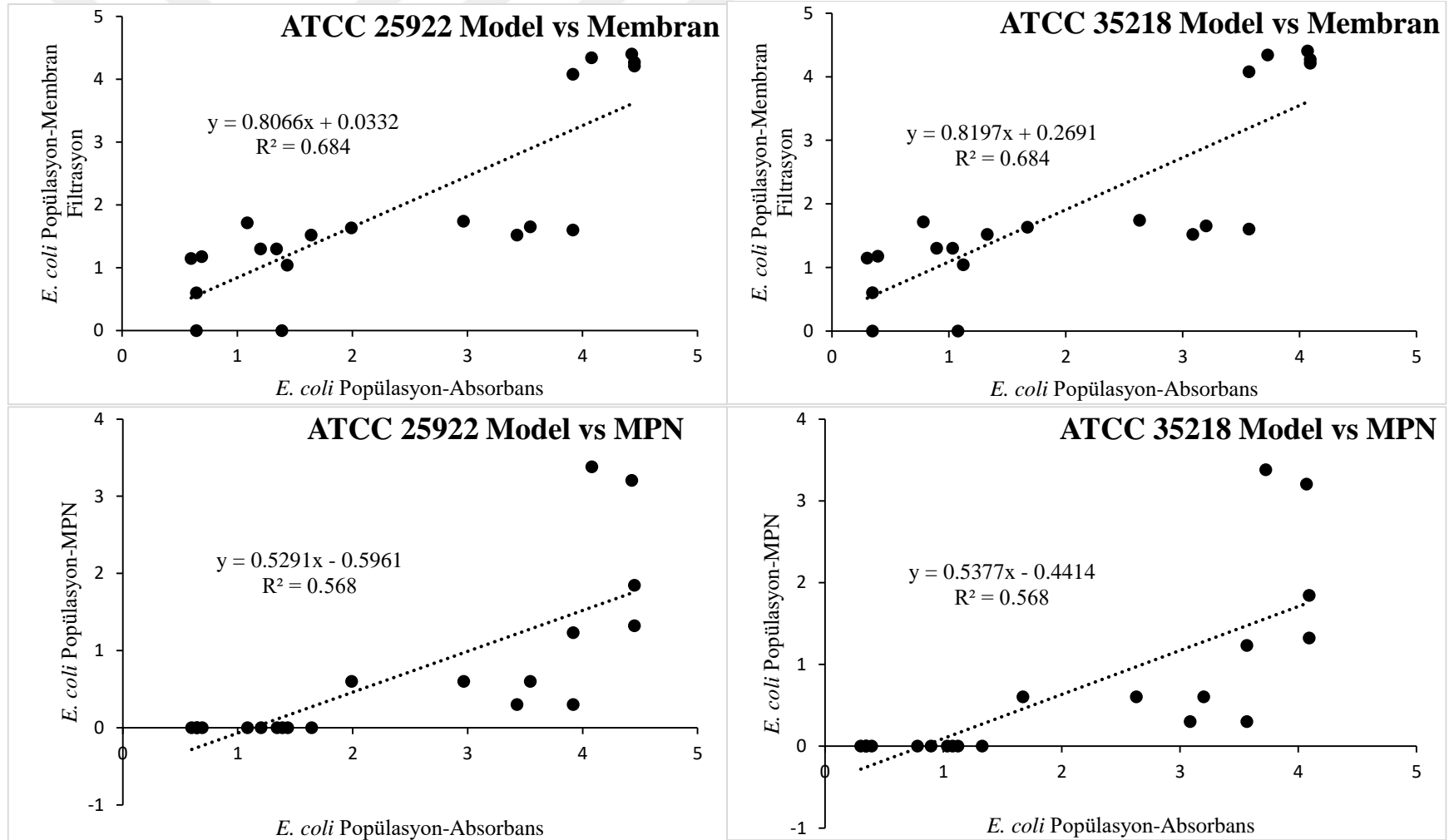
Şekil 11. Ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı ölçülen absorbans değerleri (632 nm) ile Jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 modelleri ile hesaplanan Jenerik *E. coli* popülasyonları arasındaki lineer korelasyon

Muş ovası içerisinde alınan, Murat Nehri (M), Karasu (K), Gölet Balık (GB) ve Gölet Yurt (Y) tarımsal su numunelerinin membran filtrasyon ve en muhtemel sayı (MPN) geleneksel yöntemleri ile 10 saat inkübasyon ve kromajenik boya ekstrasyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı referans jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suş modelleri üzerinden popülasyon değerleri çizelge 7’de gösterilmiştir.

Çizelge 7. Farklı kaynaklardan elde edilen tarımsal su örneklerindeki jenerik *E. coli* popülasyonlarının laboratuvar bazlı en muhtemel sayı (log MPN/100 mL) ve membran filtrasyon (log CFU/100 mL) ve 10 saat inkübasyon ve kromajenik boya ekstrasyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı referans jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suş modelleri üzerinden belirlenmiş değerleri.

Su Örneği	En Muhtemel Sayı* (log MPN/100 mL)	Jenerik <i>Escherichia coli</i> Popülasyonu		
		Membran Filtrasyon* (log CFU/100 mL)	25922 Modeli (log CFU/100 mL)	35218 Modeli (log CFU/100 mL)
M1	0	1.176091259	0.691415313	0.392694064
M2	0	1.716003344	1.085846868	0.780821918
M3	0	1.51851394	1.642691415	1.328767123
M4	0	1.301029996	1.201856148	0.894977169
M5	0	1.041392685	1.43387471	1.123287671
K1	1.230448921	4.079181246	3.916473318	3.566210046
K2	1.84509804	4.269512944	4.450116009	4.091324201
K3	1.322219295	4.212187604	4.450116009	4.091324201
K4	3.204119983	4.403120521	4.426914153	4.068493151
K5	3.380211242	4.342422681	4.078886311	3.726027397
GB1	0	0	0.645011601	0.347031963
GB2	0	1.146128036	0.598607889	0.301369863
GB3	0	0.602059991	0.645011601	0.347031963
GB4	0	0	1.387470998	1.077625571
GB5	0	1.301029996	1.341067285	1.03196347
GY1	0.301029996	1.602059991	3.916473318	3.566210046
GY2	0.301029996	1.51851394	3.429234339	3.086757991
GY3	0.602059991	1.740362689	2.965197216	2.630136986
GY4	0.602059991	1.633468456	1.990719258	1.671232877
GY5	0.602059991	1.653212514	3.545243619	3.200913242

Elde edilen sonuçlarda tarımsal su numunelerinde membran filtrasyon yöntemi ve OD₆₃₂ spektrofotometre okuma bazlı referans jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suş modelleri üzerinden belirlenen jenerik *E. coli* popülasyonları arasındaki korelasyon önemli bulunmuştur ($R^2=0.684$). Bakteri kültür yöntemlerinde elde edilen sonuçlar en muhtemel sayı (MPN) veya koloni oluşturan birimler (CFU) olarak ifade edilir ve her ikisi de bir numunedeki mikroorganizma konsantrasyonunun istatistiksel bir tahminini sağlar (Canciu ve ark., 2021). Şekil 12 ve Çizelge 8’de geleneksel yöntemlere ait R^2 değerleri ve lineer denklemler verilmiştir.



Şekil 12. Farklı kaynaklardan elde edilen tarımsal su örneklerindeki jenerik *E. coli* popülasyonlarının laboratuvar bazlı en muhtemel sayı (MPN/100 mL) ve membran filtrasyon (CFU/100 mL) ve spektrofotometrik okuma (632 nm) bazlı referans jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suş modelleri üzerinden belirlenmiş değerleri arasındaki lineer korelasyonlar

Çizelge 8. Jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşları için 10 saat inkübasyon ve kromajenik boya ekstraksiyonu sonrası spektrofotometrik okuma bazlı absorbands (632 nm) – popülasyon kromajenik boya modelleri için hesaplanan lineer R² korelasyonları.

Jenerik <i>E. coli</i> Absorbans Model	Laboratuvar sayımı	Popülasyon	R ²
ATCC 25922	Membran Filtrasyon	CFU/100 mL	0.684
	MPN	MPN/100 mL	0.568
ATCC 35218	Membran Filtrasyon	CFU/100 mL	0.684
	MPN	MPN/100 mL	0.568

Yapılan bir çalışmada farklı konumlardan alınan işlenmemiş atık su numunelerinde *E. coli* ve enterokok popülasyonlarına bakılmıştır. Geliştirilmiş IMS/ATP yöntemi sonuçları ile *E. coli* ve enterokok sayımına yönelik geleneksel kültür tabanlı yöntemlerin sonuçları arasında önemli doğrusal korelasyonlar bulunduğu ifade edilmiştir (R değerleri 0,87 ile 0,97 arasında). IMS/ATP, atık sudaki dışkı-gösterge organizmaların miktarının belirlenmesi için hızlı bir yöntem olarak umut vaat ettiği belirtilmiştir (Bushon ve ark., 2009).

Yapılan başka bir araştırmada trifeniltetrazolyum klorür (TTC) ortamının spektrofotometrik 420 nm okuma bazlı geliştirilen yöntemde numunelerdeki toplam koliform popülasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen yöntemin sonuçları, bakterilerin gerçek içeriğiyle ilişkilendirilmiştir (R²= 0.982). Numuneler, yeni yöntemle ve geleneksel en muhtemel sayı (MPN) yöntemiyle test edilmiş ve iki yöntemin sonuçları karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntem, MPN yönteminin %95 güven aralığında güvenilir ve doğru olduğu ifade edilmiştir (Huang ve ark 2016b).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda geliştirilen spektrofotometrik model üzerinden belirlenmiş jenerik *E. coli* popülasyonlarının sonuçları ile geleneksel kültür tabanlı yöntemlerin sonuçları arasındaki korelasyon karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlarda tarımsal su numunelerinde jenerik *E. coli* popülasyonların belirlenmesinde kullanılan membran filtrasyon yöntemi ile geliştirilen spektrofotometrik yöntem arasındaki korelasyon umut verici bulundu (R²=0.684). Tarımsal sularda jenerik *E. coli*'nin tespitinde kullanılan membran filtrasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar, geliştirilen spektrofotometrik okuma bazlı yöntemle elde edilen sonuçlarla yakın değerler gösterdi.

Çizelge 9 ve 10'da jenerik *E. coli* ATCC 25922 ve ATCC 35218 suşu ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı için absorbands (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümlerinin ortalama ve standart sapmaları verilmiştir.

Çizelge 9. Jenerik *E. coli* ATCC 25922 suşu ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı için absorbands (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümlerinin ortalama ve standart sapmaları.

Popülasyona Bağlı Absorbans Ölçümleri (\pm Standard Sapma)					
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
10. Saat	0.007833333 \pm 0.00271416	0.007666667 \pm 0.00175119	0.009833333 \pm 0.003188521	0.099666667 \pm 0.038192495	0.1775 \pm 0.014774979
12. Saat	0.008833333 \pm 0.004119061	0.089166667 \pm 0.033528595	0.172166667 \pm 0.025972421	0.2225 \pm 0.021538338	0.254166667 \pm 0.016277797
14. Saat	0.1235 \pm 0.032266081	0.198833333 \pm 0.033665512	0.2065 \pm 0.017638027	0.211 \pm 0.01808867	0.250333333 \pm 0.014854853
16. Saat	0.202333333 \pm 0.03353605	0.228333333 \pm 0.023449236	0.219166667 \pm 0.006823977	0.207166667 \pm 0.010722251	0.228833333 \pm 0.014232592
18. Saat	0.218666667 \pm 0.031481211	0.232 \pm 0.018373895	0.210833333 \pm 0.016497475	0.197333333 \pm 0.018629725	0.225166667 \pm 0.010740888

Çizelge 10. Jenerik *E. coli* ATCC 35218 suşu ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik okuma bazlı için absorbands (632 nm) – inkübasyon zamanı (saat) ölçümlerinin ortalama ve standart sapmaları.

Popülasyona Bağlı Absorbans Ölçümleri (\pm Standard Sapma)					
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
10. Saat	0.004333333 \pm 0.00242212	0.017833333 \pm 0.01146153	0.055 \pm 0.018793616	0.1255 \pm 0.034737588	0.169666667 \pm 0.027565679
12. Saat	0.0545 \pm 0.033643722	0.1145 \pm 0.033933759	0.140166667 \pm 0.02262226	0.117666667 \pm 0.021200629	0.176333333 \pm 0.008189424
14. Saat	0.123666667 \pm 0.008066391	0.144333333 \pm 0.019012277	0.139 \pm 0.020861448	0.148166667 \pm 0.021766182	0.145666667 \pm 0.018457158
16. Saat	0.155666667 \pm 0.01846799	0.141166667 \pm 0.022666422	0.138333333 \pm 0.012909944	0.124166667 \pm 0.012416387	0.1495 \pm 0.034909884
18. Saat	0.147333333 \pm 0.015995833	0.141333333 \pm 0.028232369	0.1435 \pm 0.015706686	0.134166667 \pm 0.01238413	0.147333333 \pm 0.025017327

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kültür ortamında b-d-glukuronidaz ve b-d-galaktosidaz aktivitesini ortaya çıkarmak için kromojenik ve / veya florojenik substratlar kullanan çeşitli yöntemlerin, bir suşun koliform gruba ve/veya *E. coli*'ye ait olup olmadığının belirlenmesinde kullanıldığı bildirilmiştir (González, ve ark., 2003). Kromojenik substratlar enzimler tarafından hidrolize edilir ve ortamda belirgin bir renk değişikliği gözlenir. Koliform kolonilerde kırmızımsı bir renk oluşturmak için β - d -galaktosidaz tarafından hidrolize edilen Somon-Gal substratı ve kolonilere mavi bir renk veren β - d -glukuronidaz tarafından hidrolize edilen X-glukuronid substratı kolonilerin tanımlanmasında kullanılmıştır. *E. coli* hem Somon-GAL hem de X-glukuronidi parçalayarak pozitif kolonilerin koyu maviden mor renge dönüşmesini sağlar (Alonso ve ark., 1998; González, ve ark., 2003; Some ve ark., 2021).

Bu çalışmada tarımsal ve kullanılması dahilinde içme sularındaki jenerik *E. coli* popülasyonunu geliştirilen kromajenik boyanın ekstraksiyon sonrası spektrofotometrik ölçümleri (OD_{632}) ile 10 saat gibi bir sürede belirlemektedir. Bu yöntem membran filtrasyon ve IDEXX Quanti-Tray® 2000 yöntemine göre süreden yarı yarıya tasarruf sağlamaktadır. Önerilen *E. coli* popülasyon metot ile örnek başına analizinin sarfları bir doların altına indirilebilmektedir. Bu yöntemle hesaplanan ve membran filtrasyonla elde edilen jenerik *E. coli* popülasyonu arasındaki korelasyon çok yüksek, çok yüksek olmasa da örnek bakteri ve tekrar sayıları arttırılarak geliştirilebilir. Ayrıca bu yöntem uygulaması bakteriyel gelişimi direk durdurduğu için analiz ve ölçümler istenilen gün ve saate ertelenebilir. Önerilen yöntemde örnek içeriğinde yüksek sayıda (>1000 CFU/100 mL) jenerik *E. coli* popülasyonu olması dahilinde kromajenik boya konsantrasyonunun ölçülebilir seviyeyi aşmaktadır. Fakat bu birçok tipik tarımsal su örneklerinde rastlanmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbaszadegan, M., Lechevallier, M., Gerba, C. 2003. Occurrence of viruses in US groundwaters, *Journal-American Water Works Association*, 95(9), 107-120.
- Adhikari, A., Chhetri, V. S., Camas, A. 2020. Evaluation of microbiological quality of agricultural water and effect of water source and holding temperature on the stability of indicator organisms' levels by seven US environmental protection agency-approved methods, *Journal of Food Protection*, 83(2), 249-255.
- Ahmed, W., Hodgers, L., Sidhu, J. P. S., Toze, S. 2012. Fecal indicators and zoonotic pathogens in household drinking water taps fed from rainwater tanks in Southeast Queensland, Australia, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 219-226.
- Aller, J. Y., Kuznetsova, M. R., Jahns, C. J., Kemp, P. F. 2005. The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols, *Journal of Aerosol Science*, 36, 801-812.
- Alonso, J. L., Soriano, A., Amoros, I., Ferrus, M. A. 1998. Quantitative determination of *E. coli*, and fecal coliforms in water using a chromogenic medium, *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 33(6), 1229-1248.
- American Society for Microbiology (ASM), 2001, ASM Comments on total coliform rule, Available at: <http://www.asm.org/index.php/documents/statements-and-testimony?id=2351> [Erişim Tarihi: 28/01/2016].
- Anonim, 2014, Merck Mikrobiyoloji El Kitabı 3. Baskı, Ankara, 250 s.
- Aras, Z. 2011. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 97-104.
- Armağan, G., Özdoğan, M. 2005. Ekolojik yumurta ve tavuk etinin tüketim eğilimleri ve tüketici özelliklerinin belirlenmesi, *Hayvansal Üretim*, 46(2), 14-21.
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., Snozzi, M. 2001. Indicators of microbial water quality. *Water quality: Guidelines, standards and health*, 289-316.
- Ashurst, J. V., Dawson, A. 2022. *Klebsiella Pneumonia*, In *StatPearls* [Internet], StatPearls Publishing LLC.
- Axelsson-Olsson, D., Svensson, L., Olofsson, J., Salomon, P., Waldenström, J., Ellström, P., Olsen, B. 2010. Increase in acid tolerance of *Campylobacter jejuni* through coinoculation with *Amoebae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4194-4200.
- Ayandiran, T. A., Ayandele, A. A., Dahunsi, S. O., Ajala, O. O. 2014. Microbial assessment and prevalence of antibiotic resistance in polluted Oluwa River, Nigeria, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(3), 291-299.
- Baker, C. A., Almeida, G., Lee, J. A., Gibson, K. E. 2021. Pathogen and surrogate survival in relation to fecal indicator bacteria in freshwater mesocosms, *Applied and Environmental Microbiology*, 87(15).
- Banach, J. L., Van Der Fels-Klerx, H. J. 2020. Microbiological reduction strategies of irrigation water for fresh produce, *Journal of Food Protection*, 83(6), 1072-1087.
- Banwart, G. J. 1989. Factors that affect microbial growth in food. In *Basic Food Microbiology*, 101-163, Springer, Boston, MA.

- Bergey, D. H., Deehan, S. J. 1908. The colon-aerogenes group of bacteria, *The Journal of Medical Research*, 19(1), 175-200
- Barker, J., Humphrey, T. J., Brown, M. W. R. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: Implications for disease. *FEMS Microbiology Letters*, 173(2), 291-295.
- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables, *Microbes and Infection*, 4, 413-423.
- Bichai, F., Payment, P., Barbeau, B. 2008. Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: A review, *Canadian Journal of Microbiology*, 54(7), 509-524.
- Blaustein, R. A., Pachepsky, Y., Hill, R. L., Shelton, D. R., Whelan, G. 2013. *Escherichia coli* survival in waters: Temperature dependence, *Water Research*, 47(2), 569-578.
- Borchardt, M. A., Bertz, P. D., Spencer, S. K., Battigelli, D. A. 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1172-1180.
- Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F., Berk, S. G. 2005. Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1562-1569.
- Brandl, M. T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 367-392.
- Bradford, S. A., Morales, V. L., Zhang, W., Harvey, R. W., Packman, A. I., Mohanram, A., Welty, C. 2013. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(8), 775-893.
- Bridle, H., Miller, B., Desmulliez, M. P. Y. 2014. Application of microfluidics in waterborne pathogen monitoring: A review, *Water Research*, 55, 256-271.
- Browne, N. K., Huang, Z., Dockrell, M., Hashmi, P., Price, R. G. 2010. Evaluation of new chromogenic substrates for the detection of coliforms. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), 1828-1838.
- Brugger, A., Reitner, B., Kolar, I., Quéric, N., Herndl, G. J. 2001. Seasonal and spatial distribution of dissolved and particulate organic carbon and bacteria in the bank of an impounding reservoir on the Enns River, Austria. *Freshwater Biology*, 46(8), 997-1016.
- Buck, J. W., Walcott, R. R., Beuchat, L. R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables, *Plant Health Progress*, 4(1), 25.
- Bushon, R. N., Likirdopulos, C. A., Brady, A. M. G. 2009. Comparison of immunomagnetic separation/adenosine triphosphate rapid method to traditional culture-based method for *E. coli* and enterococci enumeration in wastewater, *Water Research*, 43(19), 4940-4946.
- Byappanahalli, M. N., Sawdey, R., Ishii, S., Shively, D. A., Ferguson, J. A., Whitman, R. L., Sadowsky, M. J. 2009. Seasonal stability of *Cladophora*-associated *Salmonella* in Lake Michigan watersheds, *Water Research*, 43(3), 806-814.

- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., Harwood, V. J. 2012. Enterococci in the environment, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685-706.
- Cabral, J. P. 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657-3703.
- Canciu, A., Tertis, M., Hosu, O., Cernat, A., Cristea, C., Graur, F. 2021. Modern analytical techniques for detection of bacteria in surface and wastewaters. *Sustainability*, 13(13), 7229.
- Caruso, G., Zaccone, R., Crisafi, E. 2000. Use of the indirect immunofluorescence method for detection and enumeration of *Escherichia coli* in seawater samples, *Letters in Applied Microbiology*, 31(4), 274-278.
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., Estrada-Garcia, T. 2012. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water, *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 176-180.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016a, Other Uses of Water, Agricultural, <https://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/index.html> [Erişim Tarihi: 19/01/2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016b, Other Uses of Water, Agricultural, Types of Agricultural Water Use, <https://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/types.html> [Erişim Tarih: 19/01/2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016c, Other Uses of Water, Agricultural, Water contamination, <https://www.cdc.gov/healthywater/other/agricultural/contamination.html#one> [Erişim Tarih: 19/01/2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019, Foodborne Disease Outbreak Surveillance System, <https://www.cdc.gov/fdoss/faq.html> [Erişim Tarihi: 10/12/2021].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2022a, Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html> [Erişim Tarihi: 20/9/2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2022b, List of Multistate Foodborne Outbreak Notices, <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/lists/outbreaks-list.html> [Erişim Tarihi: 30/9/2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2022c, Water Sources, https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_sources.html#surface [Erişim Tarihi: 11/11/2022]
- Cemeroğlu, B.S. 2013. Gıda Analizler, 3. Baskı, Ankara, 480 syf.
- Chandra, R., Singh, S., Raj, A. 2006. Seasonal bacteriological analysis of Gola river water contaminated with pulp paper mill waste in Uttaranchal, India, *Environmental Monitoring and Assessment*, 118(1), 393-406.

- Che-Ani, A. I., Shaari, N., Sairi, A., Zain, M. F. M., Tahir, M. M. 2009. Rainwater harvesting as an alternative water supply in the future, *European Journal of Scientific Research*, 34(1), 132-140.
- Cheng, K., Chui, H., Domish, L., Sloan, A., Hernandez, D., McCorrister, S., Robinson, A., Walker M., Peterson, L. A. M., Majcher, M., Ratnam S., Haldane, D. J. M., Bekal, S., Wylie, J., Chui, L., Tyler, S., Xu, B., Reimer, A., Nadon, C., Knox, J. D., Wang, G. 2016. Phenotypic H-antigen typing by mass spectrometry combined with genetic typing of H antigens, O antigens, and toxins by whole-genome sequencing enhances identification of *Escherichia coli* isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 2162-2168.
- Cheong, S., Lee, C., Song, S. W., Choi, W. C., Lee, C. H., Kim, S. J. 2009. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24), 7745-7751.
- Cho, K. H., Wolny, J., Kase, J. A., Unno, T., Pachepsky, Y. 2022. Interactions of *E. coli* with algae and aquatic vegetation in natural waters, *Water Research*, 209, 117952.
- Chyerochana, N., Kongprajug, A., Somnark, P., Kamphaengthong, P. L., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K. 2020. Distributions of enterococci and human-specific bacteriophages of enterococci in a tropical watershed, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 226, 113482.
- Cimafonte, M., Fulgione, A., Gaglione, R., Papaianni, M., Capparelli, R., Arciello, A., S. Bolletti Censi, S., Borriello, G., Velotta, R., Della Ventura, B. 2020. Screen printed based impedimetric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* in drinking water. *Sensors*, 20(1), 274.
- De Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce, *Food Control*, 9 (6), 321-347.
- Deborah Chen, H., Frankel, G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling pathogenesis, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 83-98.
- Drechsel, P., Mahjoub, O., Keraita, B. 2015. Social and cultural dimensions in wastewater use, *In Wastewater* 75-92,
- Dorak, S., Aşık, B. B., Özsoy, G. 2019. Tarımda su kalitesi ve su kirliliğinin önemi : Bursa Nilüfer çayı örneği, *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 33(1), 155–166.
- Doran, J. W., Linn, D. M. 1979. Bacteriological quality of runoff water from pastureland, *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 985-991.
- Duffy, E.A., Lucia, L.M., Kells, J.M., Castillo, A., Pillai, S.D., Acuff, G.R. 2005. Concentrations of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas, *Journal of Food Protection*, 68 (1), 70-79.
- Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Ménard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M., Soreau, S., Wallet, F., Héchar, Y. 2011. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Research*, 45(3), 1087-1094.
- Economou, V., Gousia, P., Kansouzidou, A., Sakkas, H., Karanis, P., Papadopoulou, C. 2013. Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters

- within an agricultural landscape, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(4), 435-444.
- Elal Muş, T., Çetinkaya, F. 2017. Bursa'da içme ve kullanma sularında indikatör ve bazı patojen bakterilerin varlığının araştırılması, *Toprak Su Dergisi*, 6 (1), 1-6
- Ensink, J. H. J., Mahmood, T., Dalsgaard, A. 2007. Wastewater-irrigated vegetables: market handling versus irrigation water quality, *Tropical Medicine and International Health*, 12, 2-7.
- Enriquez, C., Alum, A., Suarez-Rey, E. M., Choi, C. Y., Oron, G., Gerba, C. P. 2003. Bacteriophages MS2 and PRD1 in turfgrass by subsurface drip irrigation, *Journal of Environmental Engineering*, 129(9), 852-857.
- Environmental Protection Agency (EPA), 2006, Volunteer Estuary Monitoring A Methods Manual Second Edition https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/2007_04_09_estuaries_monitorments_manual.pdf [Erişim Tarihi:19/01/2020].
- Environmental Protection Agency (EPA), 2012, Guidelines for Water Reuse <https://www.epa.gov/waterreuse/guidelines-water-reuse> [Erişim Tarihi:02/08/2022].
- Environmental Protection Agency (EPA), 2022, Polluted Runoff: Nonpoint Source (NPS) Pollution <https://www.epa.gov/nps/basic-information-about-nonpoint-source-nps-pollution> [Erişim Tarihi:18/08/2022].
- Fett, W. F. 2000. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts, *Journal of Food Protection*, 63(5), 625-632.
- Food and Drug Administration (FDA), 1998a, Initiative to Ensure the Safety of Imported and Domestic Fruits and Vegetables: Status Report, February 24 <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-fruits-and-vegetables> [Erişim Tarihi: 25/12/19]
- Food and Drug Administration (FDA), 1998b, Initiative to Ensure the Safety of Imported and Domestic Fruits and Vegetables, October <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-guide-minimize-microbial-food-safety-hazards-fresh-fruits-and-vegetables> [Erişim Tarihi: 25/12/2019]
- Food and Drug Administration (FDA), 2015, Federal Register Notice: Standards for the Growing, Harvesting, Packing, and Holding of Produce for Human Consumption, Vol. 80, No. 228, 74353–74568, 27 November 2015, <https://www.federalregister.gov/documents/2015/11/27/2015-28159/standards-for-the-growing-harvesting-packing-and-holding-of-produce-for-human-consumption> [Erişim Tarihi: 20/12/2019].
- Food and Drug Administration (FDA), 2018, Equivalent Testing Methodology for Agricultural Water, Available at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/equivalent-testing-methodology-agricultural-water> [Erişim Tarihi: 04/06/2020].
- Food and Drug Administration (FDA), 2020, BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, <https://www.fda.gov/food/laboratory->

methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria
[Erişim Tarihi: 29/10/2022]

- Food and Drug Administration (FDA), 2022, Leafy Greens STEC Action Plan <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/leafy-greens-stec-action-plan>
[Erişim Tarihi: 30/9/2022]
- Fratamico, P. M., Strobaugh, T. P. 1998. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay, direct immunofluorescent filter technique, and multiplex polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* O157: H7 seeded in beef carcass wash water, *Journal of Food Protection*, 61(8), 934-938.
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., Möllby, R. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates, *Journal of Microbiological Methods*, 50(1), 63-73.
- Gannon, V. P. J., Graham, T. A., Read, S., Ziebell, K., Muckle, A., Mori, J., Thomas, J., Selinger, B., Townshend, I., Byrne, A. J. 2004. Bacterial pathogens in rural water supplies in southern Alberta, Canada, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67(20-22), 1643-1653.
- Garcia-Armisen, T., Servais, P. 2004. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization, *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 269-279.
- Grabow, W. O. K. 2001. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water, *Water Sa*, 27(2), 251-268.
- Geldreich, E. E., Litsky, W. 1976. Fecal coliform and fecal *Streptococcus* density relationships in waste discharges and receiving waters, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 6(4), 349-369.
- Gelting, R.J., Baloch, M.A., Zarate-Bermudez, M.A., Selman, C. 2011. Irrigation water issues potentially related to the 2006 multistate *E. coli* O157:H7 outbreak associated with spinach, *Agricultural Water Management*, 98 (9), 1395-1402.
- Gerba, C. P. 2009. Indicator microorganisms, *Environmental Microbiology*, 485-499.
- Gerba, C. P., Rock, C. 2014. Water quality. In *The Produce Contamination Problem (Second Edition) Causes and Solutions*, Academic Press, 123-138.
- Ghadiri, H., Dordipour, I., Bybordi, M., Malakouti, M. J. 2006. Potential use of Caspian Sea water for supplementary irrigation in Northern Iran, *Agricultural Water Management*, 79(3), 209-224.
- Ghosh, B., Chakma, N. 2019. Composite indicator of land, water and energy for measuring agricultural sustainability at micro level, Barddhaman District, West Bengal, India, *Ecological Indicators*, 102, 21–32.
- Gomes, C., Da Silva, P., Moreira, R. G., Castell-Perez, E., Ellis, E. A., Pendleton, M. 2009. Understanding *E. coli* internalization in lettuce leaves for optimization of irradiation treatment, *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 238-247.
- González, R. D., Tamagnini, L. M., Olmos, P. D., De Sousa, G. B. 2003. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods, *Food Microbiology*, 20(5), 601-604.

- Goodburn, C., Wallace, C. A. 2013. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review, *Food Control*, 32(2), 418-427.
- Gu, G., Luo, Z., Cevallos-Cevallos, J. M., Adams, P., Vellidis, G., Wright, A., van Bruggen, A. H. C. 2013. Factors affecting the occurrence of *Escherichia coli* O157 contamination in irrigation ponds on produce farms in the Suwannee River Watershed, *Canadian Journal of Microbiology*, 59(3), 175-182.
- Guo, X., Chen, J., Brackett, R. E., Beuchat, L. R. 2001. Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4760-4764.
- Güler, Ç., Çobanoğlu, Z. 1997. Su kalitesi, *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*, No:43 Birinci Baskı, Ankara
- Haley, B. J., Cole, D. J., Lipp, E. K. 2009. Distribution, diversity, and seasonality of waterborne *Salmonellae* in a rural watershed, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1248-1255.
- Hamilton, A. J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A. M., Hale, G. 2006. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3284-3290.
- Harris, L. J., Bender, J., Bihn, E. A., Blessington, T., Danyluk, M. D., Delaquis, P., Goodridge, L., Ibekwe, A. M., Ilıc, S., Kniel, K., Lejeune, J. T., Schaffner, D. W., Stoeckel, D., Suslow, T. V. 2012. A framework for developing research protocols for evaluation of microbial hazards and controls during production that pertain to the quality of agricultural water contacting fresh produce that may be consumed raw, *Journal of Food Protection*, 75(12), 2251-2273
- Holvoet, K., Jacxsens, L., Sampers, I., Uyttendaele, M. 2012. Insight into the prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in the fresh produce processing industry, *Journal of Food Protection*, 75(4), 671-681.
- Huang, W. C., Hsu, B. M., Kao, P. M., Tao, C. W., Ho, Y. N., Kuo, C. W., Huang, Y. L. 2016a. Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in Taiwan, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 37-41.
- Huang, L., Zhang, C., Shi, X., Li, M., Liu, S., Cheng, Y., Zhu, H., Li, Z., Liu, Y. 2016b. A rapid spectrophotometric method for the quantitative and qualitative detection of total coliforms, In *Food Hygiene, Agriculture and Animal Science*, 202-212.
- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., Jiang, X. 2005. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water, *Food Microbiology*, 22(1), 63-70.
- Iwasa, M., Makino, S. I., Asakura, H., Kobori, H., Morimoto, Y. 1999. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan, *Journal of Medical Entomology*, 36(1), 108-112.

- Iwu C.D., Okoh A.I. 2019. Preharvest modes of transmission of bacterial pathogens associated with fresh crop with epidemic potential: A review, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16 (22), 4407.
- Izumi, H., Tsukada, Y., Poubol, J., Hisa, K. 2008. On-farm sources of microbial contamination of persimmon fruit in Japan, *Journal of Food Protection*, 71(1), 52-59.
- Jaybhave, A., Deb, M. 2021. Pathogenesis of *Escherichia coli*: A clinical findings, *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(60B), 3185-3191.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2008. Modern food microbiology (7th ed.), Springer Science & Business Media.
- Ji, M., Liu, Z., Sun, K., Li, Z., Fan, X., Li, Q. 2021. Bacteriophages in water pollution control: Advantages and limitations, *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 15(5), 84.
- Jia, S., Zhang, X. 2020. Biological HRP in wastewater, *In High-Risk Pollutants in Wastewater*, 41-78
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., Scheutz, F. 2015. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data, *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2410-2426.
- Jongman, M., Korsten, L. 2018. Irrigation water quality and microbial safety of leafy greens in different vegetable production systems: A review. *Food Reviews International*, 34(4), 308-328.
- Kamma, S., Tang, L., Leung, K., Ashton, E., Newman, N., Suresh, M. R. 2008. A rapid two dot filter assay for the detection of *E. coli O157* in water samples, *Journal of Immunological Methods*, 336(2), 159-165.
- Kang, J. H., Shim, H. M., Kim, K. Y. 2017. Monitoring of norovirus and indicator microorganisms from agricultural products and environmental samples in Korea, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 123-131.
- Karakoyun, T. (2021), "Muş Ovası Tarımsal Yüzey Su Kaynaklarının Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Muş Alparslan Üniversitesi, Muş
- Karikari, A. Y., Ansa-Asare, O. D. 2006. Physico-chemical and microbial water quality assessment of Densu River of Ghana, *West African Journal of Applied Ecology*, 10(1).
- Karp, D. S., Gennet, S., Kilonzo, C., Partyka, M., Chaumont, N., Atwill, E. R., Kremen, C. 2015. Comanaging fresh produce for nature conservation and food safety, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 11126-11131.
- Kılıç, E. (2013), "Enterobacteriaceae Ailesinden Gram Negatif Çomaklarda Aminoglikozid Direncinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul
- Kirschner, A. K. T., Reischer, G. H., Jakwerth, S., Savio, D., Ixenmaier, S., Toth, E., Sommer, R., Mach, R.L., Linke, R., Eiler, A., Kolarevic, S., Farnleitner, A. H. 2017. Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River, *Water Research*, 124, 543-555.

- Korajkic, A., McMinn, B. R., Harwood, V. J. 2018. Relationships between microbial indicators and pathogens in recreational water settings *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(12), 2842.
- Kroupitski, Y., Golberg, D., Belausov, E., Pinto, R., Swartzberg, D., Granot, D., Sela, S. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6076-6086.
- Kumar, V., Gill, K. D. 2018. Photometry: Colorimeter and spectrophotometer, In *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide* (pp. 17-20).
- Lopez-Roldan, R., Tusell, P., Courtois, S., Cortina, J. L. 2013. On-line bacteriological detection in water, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 44, 46-57.
- Lothrop, N., Bright, K. R., Sexton, J., Pearce-Walker, J., Reynolds, K. A., Verhougstraete, M. P. 2018. Optimal strategies for monitoring irrigation water quality, *Agricultural Water Management*, 199, 86-92.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J. M. 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 5-21.
- Leclerc, H., Mossel, D. A. A., Edberg, S. C., Struijk, C. B. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety, *Annual Review of Microbiology*, 55, 201-234
- Lee, K. E., Mokhtar, M., Hanafiah, M. M., Halim, A. A., Badusah, J. 2016. Rainwater harvesting as an alternative water resource in Malaysia: potential, policies and development, *Journal of Cleaner Production*, 126, 218-222.
- Leifert, C., Ball, K., Volakakis, N., Cooper, J. M. 2008. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crops in organic and “low input” production systems: A HACCP-based approach, *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 931–950.
- MacConkey, A. 1909. Further observations on the differentiation of lactose-fermenting bacilli, with special reference to those of intestinal origin, *Epidemiology & Infection*, 9(1), 86-103.
- Maguire, M., Kase, J. A., Roberson, D., Muruvanda, T., Brown, E.W., Allard, M., Musser, S.M., González-Escalona, N. 2021. Precision long-read metagenomics sequencing for food safety by detection and assembly of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in irrigation water, *PLoS One*, 16(1).
- McAllister, J. C., Steelman, C. D., Skeeles, J. K., Newberry, L. A., Gbur, E. E. 1996. Reservoir competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae), *Journal of Medical Entomology*, 33(6), 983-987.
- McEgan, R., Mootian, G., Goodridge, L. D., Schaffner, D. W., Danyluk, M. D. 2013. Predicting *Salmonella* populations from biological, chemical, and physical indicators in Florida surface waters, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 4094-4105.
- McLain, J. E. T., Williams, C. F. 2008. Seasonal variation in accurate identification of *Escherichia coli* within a constructed wetland receiving tertiary-treated municipal effluent, *Water Research*, 42(15), 4041-4048.

- Md Salih, N., Hashim, U. D. A., Nayan, N., Soon, C. F., Sahdan, M. Z. 2016. Absorbance analysis of *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria suspension in polydimethylsiloxane (PDMS)-glass based microfluidic. *Advanced Materials Research* 1133, 65-69.
- Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R., Mazumder, A., Samadpour, M. 2006. Diurnal variability in concentrations and sources of *Escherichia coli* in three streams, *Canadian Journal of Microbiology*, 52(11), 1130-1135.
- Medema, G. J., Payment, P., Dufour, A., Robertson, W., Waite, M., Hunter, P., Kirby, R., Andersson, Y. 2003. Safe drinking water: An ongoing challenge, *Assessing Microbial Safety of Drinking Water*, 11-4.
- Medlin, L. K., Orozco, J. 2017. Molecular techniques for the detection of organisms in aquatic environments, with emphasis on harmful algal bloom species, *Sensors*, 17(5), 1184.
- Melloul, A. A., Hassani, L., Rafouk, L. 2001. *Salmonella* contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 207-209.1
- Menon, P., Billen, G., Servais, P. 2003. Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems, *Water Research*, 37(17), 4151-4158
- Meyers, A., Furtmann, C., Jose, J. 2018. Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications, *Enzyme and Microbial Technology*, 118, 1-5.
- Millner, P. D. 2009. Bioaerosols associated with animal production operations, *Bioresource Technology*, 100, 5379-5385.
- Mitra, R., Cuesta-Alonso, E., Wayadande, A., Talley, J., Gilliland, S., Fletcher, J. 2009. Effect of route of introduction and host cultivar on the colonization, internalization, and movement of the human pathogen *Escherichia coli* O157: H7 in spinach, *Journal of Food Protection*, 72(7), 1521-1530.
- Morgado, M. E., Hudson, C. L., Chattopadhyay, S., Ta, K., East, C., Purser, N., Allard, S., Ferrier, M.D., Sapkota, A.R., Sharma, M., Goldstein, R. R. 2022. The effect of a first flush rainwater harvesting and subsurface irrigation system on *E. coli* and pathogen concentrations in irrigation water, soil, and produce, *Science of The Total Environment*, 843, 156976.
- Morris, C. E., Monier, J. M., Jacques, M. A. 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4), 1570-1576.
- Morris, C. E., Monier, J. M., Jacques, M. A. 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4789-4795.
- Morris, R. 2015. Spectrophotometry, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 11(1), 2-1.
- Mosteo, R., Ormad, M. P., Goñi, P., Rodríguez-Chueca, J., García, A., Clavel, A. 2013. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): Water reuse possibilities, *Water Science and Technology*, 68(3), 575-583.

- Motlagh, A. M., Yang, Z. 2019. Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens, *Water Environment Research*, 91(10), 1402-1408.
- Muirhead, R. W., Meenken, E. D. 2018. Variability of *Escherichia coli* concentrations in rivers during base-flow conditions in New Zealand, *Journal of Environmental Quality*, 47(5), 967-973.
- Murphy, C. M., Strawn, L. K., Chapin, T. K., McEgan, R., Gopidi, S., Friedrich, L., Goodridge, L.D., Weller, D. L., Schneider, K. R., Danyluk, M. D. 2022. Factors associated with *E. coli* levels in and *Salmonella* contamination of agricultural water differed between North and South Florida waterways, *Frontiers in Water*, 3, 750673.
- Myers, J. A., Curtis, B. S., Curtis, W. R. 2013. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density, *BMC Biophysics*, 6(1), 1-16.
- Nappier, S. P., Aitken, M. D., Sobsey, M. D. 2006. Male-specific coliphages as indicators of thermal inactivation of pathogens in biosolids, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2471-2475.
- Nurliyana, M. R., Sahdan, M. Z., Wibowo, K. M., Muslihati, A., Saim, H., Ahmad, S. A., Sari, Y., Mansor, Z. 2018. The detection method of *Escherichia coli* in water resources: A review. In *Journal of Physics: Conference Series*, 995, 012065
- Odonkor, S. T., Ampofo, J. K. 2013. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: An overview, *Microbiology Research*, 4(1), e2.
- Okafo, C. N., Umoh, V. J., Galadima, M. 2003. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams, *Science of The Total Environment*, 311(1-3), 49-56.
- Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Abadias, M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157: H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water, *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 133-140.
- Omerovic, M., Müştak, H. K., Kaya, İ. B. 2017. *Escherichia coli* patotiplerinin virülens faktörleri, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 1-6.
- Oron, G., Armon, R., Mandelbaum, R., Manor, Y., Campos, C., Gillerman, L., Salgot, M., Gerba, C., Klein, I., Enriquez, C. 2001. Secondary wastewater disposal for crop irrigation with minimal risks, *Water Science and Technology*, 43(10), 139-146.
- Özgür, M. (2013), “Edirne İlindeki Çevresel Sularda Kirlilik İndikatörü Mikroorganizmaların ve Yeni Çıkan Bakteriyel Patojenlerin Moleküler Yöntemlerle Saptanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Trakya Üniversitesi, Edirne
- Özsoy, S. (2009), “Su ve Yaşam: Suyun Toplumsal Önemi”, Yüksek Lisans Tezi, *Sosyal Bilimler Enstitüsü*, Ankara Üniversitesi, Ankara
- Özşavlı, A., Şahin, F., Sadak, M., Çaktü Güler, K. 2018. Kilis ili içme sularının koliform bakteri yönünden incelenmesi, *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1), 65-68.

- Pachepsky, Y. A., Shelton, D. R. 2011. *Escherichia coli* and fecal coliforms in freshwater and estuarine sediments, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(12), 1067-1110.
- Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E., Patel, J., Mandrell, R. E. 2011. Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: A review, *Advances in Agronomy*, 113, 75-141.
- Pachepsky, Y., Morrow, J., Guber, A., Shelton, D., Rowland, R., Davies, G. 2012. Effect of biofilm in irrigation pipes on microbial quality of irrigation water, *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 217-224
- Pachepsky, Y., Kierzewski, R., Stocker, M., Sellner, K., Mulbry, W., Lee, H., Kim, M. 2018a. Temporal stability of *Escherichia coli* concentrations in waters of two irrigation ponds in Maryland, *Applied and Environmental Microbiology*, 84(3), e01876-17.
- Pachepsky, Y. A., Allende, A., Boithias, L., Cho, K., Jamieson, R., Hofstra, N., Molina, M. 2018b. Microbial water quality: Monitoring and modeling, *Journal of Environmental Quality*, 47(5), 931-938.
- Parr, L. W. 1938. The occurrence and succession of coliform organisms in human feces, *American Journal of Hygiene*, 27, 67-87.
- Partyka, M. L., Bond, R. F., Chase, J. A., Atwill, E. R. 2018a. Spatial and temporal variability of bacterial indicators and pathogens in six California reservoirs during extreme drought, *Water Research*, 129, 436-446.
- Partyka, M. L., Bond, R. F., Chase, J. A., Atwill, E. R. 2018b. Spatiotemporal variability in microbial quality of western US agricultural water supplies: A multistate study, *Journal of Environmental Quality*, 47(5), 939-948.
- Payment, P., Waite, M., Dufour, A. 2003. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality, *Assessing Microbial Safety of Drinking Water*, 47-77.
- Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J. J., Koukoulakis, P., Asano, T. 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece, *Agricultural Water Management*, 97(9), 1233-1241.
- Rafi, K., Wagner, K. L., Gentry, T., Karthikeyan, R., Dube, A. 2018. *Escherichia coli* concentration as a function of stream order and watershed size, *Journal of Environmental Quality*, 47(5), 949-957.
- Radzevičius, A., Dapkienė, M., Sabienė, N., Dziecioł, J. 2020. A rapid UV/Vis spectrophotometric method for the water quality monitoring at on-farm root vegetable pack houses, *Applied Sciences*, 10(24), 9072.
- Ray, B. 2004, *Fundamental Food Microbiology* (3th ed.), *CRC Press*.
- Ray, B., Bhunia, A. 2013, *Fundamental Food Microbiology* (5th ed.), *CRC Press*.
- Resmî Gazete, 31/12/2004 Tarihli 25687 Sayılı Yönetmelik <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/12/20041231.htm#9> [Erişim Tarihi: 05/01/2020]
- Rıfaat, E. A. (2014), “Halk Sağlığı Açısından İçme ve Kullanma Sularının Koliform ve Fekal Koliform Kontaminasyonunun Klasik ve Mass Spektrometre Yöntemleriyle İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul

- Rodrigues, C., Cunha, M.Â. 2017. Assessment of the microbiological quality of recreational waters: Indicators and methods, *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration* 2, 25
- Sasakova, N., Gregova, G., Takacova, D., Mojzisova, J., Papajova, I., Venglovsky, J., Szaboova, T., Kovacova, S. 2018. Pollution of surface and ground water by sources related to agricultural activities, *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 42.
- Sathyavathy, K., Madhusudhan, B. K. 2020. Review on clinical diseases caused by *Klebsiella*, *Journal of Pharmaceutical Research International* 32(21): 12-19.
- Savaş, S. 2018. Altın nanopartikül işaretli biyosensör ile *E. coli*'nin hızlı ve duyarlı tespiti, *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(2), 101-107.
- Savichtcheva, O., Okabe, S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives, *Water Research*, 40(13), 2463-2476.
- Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 31-34.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., Lukasik, J. 2002. Microbial source tracking: Current methodology and future directions, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5796-5803.
- Searcy, K. E., Packman, A. I., Atwill, E. R., Harter, T. 2006. Capture and retention of *Cryptosporidium parvum* oocysts by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6242-6247.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746-8749.
- Silverman, G. S., Nagy, L. A., Olson, B. H. 1983. Variations in particulate matter, algae, and bacteria in an uncovered, finished-drinking-water reservoir, *Journal-American Water Works Association*, 75(4), 191-196.
- Sinton, L. W., Donnison A. M., Hastie C. M. 1993a. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: A review. Part I: Taxonomy and enumeration, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 27:1, 101-115
- Sinton, L. W., Donnison, A. M., Hastie, C. M. 1993b. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: A review. Part II: Sanitary significance, survival, and use, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 27(1), 117-137.
- Solomon, E. B., Yaron, S., Matthews, K. R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 397-400.
- Some, S., Mondal, R., Mitra, D., Jain, D., Verma, D., Das, S. 2021. Microbial pollution of water with special reference to coliform bacteria and their nexus with environment, *Energy Nexus*, 1, 100008.

- Stocker, M. D., Smith, J. E., Pachepsky, Y. A. 2022. Depth-dependent concentrations of *E. coli* in agricultural irrigation ponds, *Water*, 14(14), 2276.
- Steele, M., Odumeru, J. 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables, *Journal of Food Protection*, 67(12), 2839-2849.
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., Pilizota, T. 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers, *Scientific reports*, 6, 38828
- Stine, S. W., Song, I., Choi, C. Y., Gerba, C. P. 2005. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce, *Journal of Food Protection*, 68(5), 913-918.
- Talley, J. L., Wayadande, A. C., Wasala, L. P., Gerry, A. C., Fletcher, J., DeSilva, U., Gilliland, S. E. 2009. Association of *Escherichia coli* O157: H7 with filth flies (Muscidae and Calliphoridae) captured in leafy greens fields and experimental transmission of *E. coli* O157: H7 to spinach leaves by house flies (Diptera: Muscidae), *Journal of Food Protection*, 72(7), 1547-1552.
- Tanaro, J. D., Piaggio, M. C., Galli, L., Gasparovic, A. M. C., Procura, F., Molina, D. A., M. Vitón, Zolezzi, G., Rivas, M. 2014. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in surface water near cattle feedlots, *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(12), 960-965.
- Taniş, S. N. (2019). “*E. coli* Tayini İçin Altın Selüloz Nanofibril Materyal Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara
- Teague, C. (2012), “Assessing How Rainfall and Other Environmental Factors Affect The Level of *E. coli* Contamination In Two Species Of Bivavle” Master Thesis, *Research in Geography*, University of Exeter, UK
- Tekintaş, Y., Hoşgör-Limoncu, M. 2018. Bakteriyoloji alanında kullanılan modern tanı yöntemleri: Hızlı ve etkili, *Klimik Dergisi*, 31(3), 176-80.
- Thurston, J. A., Foster, K. E., Karpiscak, M. M., Gerba, C. P. 2001. Fate of indicator microorganisms, *Giardia* and *Cryptosporidium* in subsurface flow constructed wetlands, *Water Research*, 35(6), 1547-1551.
- Thurston-Enriquez, J. A., Watt, P., Dowd, S. E., Enriquez, R., Pepper, I. L., Gerba, C. P. 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production, *Journal of Food Protection*, 65(2), 378-382.
- Tok, D. (2009). “*Escherichia coli* Bakterisinin Görüntü İşleme Teknikleriyle Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- Topalcengiz, Z. (2016), “Validation of Agricultural Water and Animal Intrusion Metrics for Produce Safety in Florida”, PhD Thesis, *Graduate School of The University of Florida*, University of Florida, ABD
- Topalcengiz, Z., Strawn, L. K., Danyluk, M. D. 2017. Microbial quality of agricultural water in Central Florida, *PloS One*, 12(4)
- Topalcengiz, Z., Danyluk, M. D. 2019. Fate of generic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Central Florida surface waters and evaluation of EPA Worst Case water as standard medium, *Food Research International*, 120, 322-329.

- Traister, E., Anisfeld, S. C. 2006. Variability of indicator bacteria at different time scales in the upper Hoosic River watershed, *Environmental Science and Technology*, 40(16), 4990-4995.
- Türk Standardları Enstitüsü (TSE), 1997, TS No: TS 8020 EN 26461-2
<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/StandardAra.aspx>
[Erişim Tarihi: 27/10/2022]
- Türk Standardları Enstitüsü (TSE), 2002, TS EN ISO 7899-2
<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx>
[Erişim Tarihi: 27/10/2022]
- Türk Standardları Enstitüsü (TSE), 2012, TS No: TS EN ISO 9308-2
<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx>
[Erişim Tarihi: 27/10/2022]
- Türk Standardları Enstitüsü (TSE), 2017, TS No: TS EN ISO 14189
<https://intweb.tse.org.tr/Standard/Standard/Standard.aspx>
[Erişim Tarihi: 27/10/2022]
- Tyagi, V.K., Chopra, A.K., Kazmi, A.A., Kumar, A. 2006. Alternative microbial indicators of faecal pollution: current perspective, *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 3(3), 205-216
- Uçar, G., Yörük, N. G., Güner, A. 2015. *Escherichia coli* enfeksiyonları, *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*, 1(3), 22-9.
- Umesha, S., Manukumar, H. M. 2018. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens; Current applications and future challenges, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 84-104.
- Uyttendaele, M., Jaykus, L.-A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., Holvoet, K., Korsten, L., Lau, M., McClure, P., Medema, G., Sampers, I., Rao Jasti, P. 2015, Microbial hazards in irrigation water: standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production, *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 14: 336-356
- Verhougstraete, M. P., Rose, J. B. 2014. Microbial investigations of water, sediment, and algal mats in the mixed use watershed of Saginaw Bay, Michigan, *Journal of Great Lakes Research*, 40, 75-82.
- Wadamori, Y., Gooneratne, R., Hussain, M. A. 2017. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 97(5), 1396-1403.
- Wagner, M., Horn, M., Daims, H. 2003. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes, *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 302-309.
- Wanjugi, P., Fox, G. A., Harwood, V. J. 2016. The interplay between predation, competition, and nutrient levels influences the survival of *Escherichia coli* in aquatic environments, *Microbial Ecology*, 72(3), 526-537.
- Wei, T., Dong, Z., Zhang, C., Ali, S., Chen, X., Han, Q., Zhang, F., Jia, Z., Zhang, P., Ren, X. 2018. Effects of rainwater harvesting planting combined with deficiency irrigation on soil water use efficiency and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) yield in a semiarid area, *Field Crops Research*, 218, 231-242.

- Weller, D.L., Saylor, L., Turkon, P. 2020. Total coliform and generic *E. coli* levels, and *Salmonella* presence in eight experimental aquaponics and hydroponics systems: A brief report highlighting exploratory data, *Horticulturae*, 6(3), 42.
- Whitman, R. L., Nevers, M. B., Korinek, G. C., Byappanahalli, M. N. 2004. Solar and temporal effects on *Escherichia coli* concentration at a Lake Michigan swimming beach, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4276-4285.
- Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker N., Topp, E., Lapen, D. R. 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape, *Water Research*, 43, 2209-2223.
- Winslow, C. E. A., Hunnewell, M. P. 1902. Streptococci characteristic of sewage and sewage-polluted waters apparently not hitherto reported in America, *Science*, 15(386), 827-829
- Woldetsadik, D., Drechsel, P., Keraita, B., Itanna, F., Gebrekidan, H. 2018. Farmers' perceptions on irrigation water contamination, health risks and risk management measures in prominent wastewater-irrigated vegetable farming sites of Addis Ababa, Ethiopia, *Environment Systems and Decisions*, 38(1), 52-64.
- Won, G., Kline, T. R., LeJeune, J. T. 2013. Spatial-temporal variations of microbial water quality in surface reservoirs and canals used for irrigation, *Agricultural Water Management*, 116, 73-78.
- World Health Organization (WHO), 2013, Water Quality And Health Strategy 2013-2020 <https://www.who.int/publications/m/item/water-quality-and-health-strategy-2013-2020> [Erişim Tarihi: 09.12.21]
- World Health Organization (WHO), 2016, Quantitative Microbial Risk Assessment: Application For Water Safety Management <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565370> [Erişim Tarihi: 09.12.21]
- Wu, J., Long, S. C., Das, D., Dorner, S. M. 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research, *Journal of Water and Health*, 9(2), 265-278.
- Wu, Y., Jia, Z., Ren, X., Zhang, Y., Chen, X., Bing, H., Zhang, P. 2015. Effects of ridge and furrow rainwater harvesting system combined with irrigation on improving water use efficiency of maize (*Zea mays* L.) in semi-humid area of China, *Agricultural Water Management*, 158, 1-9.
- Wu, J., Stewart, J. R., Sobsey, M. D., Cormency, C., Fisher, M. B., Bartram, J. K. 2018. Rapid detection of *Escherichia coli* in water using sample concentration and optimized enzymatic hydrolysis of chromogenic substrates, *Current Microbiology*, 75(7), 827-834.
- Yang, S. H., Chen, C. H., Chu, K. H. 2021. Fecal indicators, pathogens, antibiotic resistance genes, and ecotoxicity in Galveston Bay after Hurricane Harvey, *Journal of Hazardous Materials*, 411, 124953.
- Yeşilnacar, M. İ., Demir, F., Uyanık, S., Yılmaz, G., Demir, T. 2007. Harran ovası yeraltı suyu kalitesi ve kirlenme potansiyelinin belirlenmesi, *TÜBİTAK Proje*, Kodu: 104Y188, Şanlıurfa