Turk J Vet Anim Sci
27 (2003) 201-206
© TÜBİTAK

Araştırma Makalesi

Tatlı Su Midyesinden (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) İzole Edilen Salmonella'ların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile İdentifikasyonu*

Engin ŞEKER, Mustafa SARIEYYÜPOĞLU
Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, 23119, Elazığ - TÜRKİYE
Burhan ÇETİNKAYA
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 23119, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.12.2001

Özet: Bu çalışmada, Elazığ Keban Baraj gölünün Koçkale ve Pertek yörelerinden elde edilen 627 adet canlı tatlı su midyesinde (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) Salmonella'ların varlığı araştırıldı. Midyelerin yumuşak dokularından hazırlanan homojenizatlar Rappaport Vasilliadis buyyonunda ön zenginleştirmeden geçirildikten sonra, Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar ve *Salmonella - Shigella* selektif besiyerlerine ekimler yapıldı. Üreyen Salmonella şüpheli suşlara biyokimyasal testler uygulandığında, Koçkale yöresinden toplanan 397 midyenin 19'unda (% 4,8) Salmonella spp.'nin izolasyon ve identifikasyonu yapıldığı halde, Pertek yöresinden temin edilen 230 midyede bu etkene rastlanılmadı. Yine bu suşlardan ekstrakte edilen DNA'lar, Salmonella'ların 16S rRNA geninden türetilen bir çift cins spesifik primer kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'nda amplifikasyona tabi tutuldu. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde değerlendirildiğinde, 19 şüpheli suşun hepsinde Salmonella spesifik gen bölgesinin mevcut olduğu saptandı.

Geniş bir uygulama alanına sahip PZR'nin bu çalışma ile su ürünlerinde de etken identifikasyonu amacıyla başarılı bir şekilde uygulanabileceği kanıtlandı. Ayrıca, baraj gölünün Koçkale yöresindeki tatlı su midyelerinin tüketilmesinin de insan sağlığı açısından tehlikeli olduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Tatlı Su Midyesi, Salmonella, Kültür, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Identification of Salmonella Isolated from Freshwater Mussels (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat, 1860) by Polymerase Chain Reaction

Abstract: In this study, 627 live freshwater mussels collected from the Koçkale and Pertek regions of Keban Dam Lake were examined for the presence of Salmonella spp. Homogenates prepared from the soft tissue of mussels, after pre-enrichment in Rappaport Vasilliadis, were inoculated onto Brilliant Green Phenol Red Lactose agar and Salmonella-*Shigella* selective media. Biochemical tests and DNA extraction were carried out on isolates suspected of containing Salmonella. From 19 (4.8%) out of 397 mussels collected in the Koçkale region, Salmonella spp. were isolated and identified, but the agent could not be detected in mussels obtained from the Pertek region. DNA extracted from these isolates was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a pair of genus-specific primers derived from the 16S rRNA gene of Salmonella. Analysis of PCR products on agarose gel electrophoresis showed that the Salmonella specific gene was present in all 19 isolates.

In conclusion, it was demonstrated that PCR, which has a very wide application field, could also be used in aquaculture for the identification of microbiological agents. Moreover, in the light of the data obtained in this study, the consumption of uncooked freshwater mussels living in the Koçkale region of Keban Dam Lake may threaten public health.

Key Words: Freshwater Mussel, Salmonella, Culture, Polymerase Chain Reaction

Giriş

Diğer gıda maddelerinde olduğu gibi su ürünlerinde de hastalık yapıcı çeşitli mikroorganizmalar gelişebilmektedir. Zoonoz olan Salmonellozis son yıllarda gerek hayvan gerekse insanlarda önemli bir sorun haline gelmiştir (1,2). Her ne kadar midye ve balık gibi su ürünleri Salmonella için doğal kaynak değilseler de, yaşadıkları sulardaki bakterilerle kontamine olabilirler (3-7). Midye tüketimiyle insanlara geçen enfeksiyon etkenlerinin başında Salmonella'lar gelmektedir. Midyeleri

* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1490) ve Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF-344) tarafından desteklenmiştir.

kontamine eden kirli sulardaki patojen bağırsak bakterileri, gerek taze midyelerde gerekse dondurularak saklananlarda uzun süre canlı kalarak insanlara bulaşabilirler. Midyede bulunabilen Salmonella spp yanısıra Shigella spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Yersinia enterecolitica* besin hijyeni açısından önem taşırlar. Söz konusu bu etkenlerin çeşitli ülkelerde kitlesel gıda zehirlenmelerine yol açtığı bildirilmiştir (8-11).

Salmonella serotipleri insanda olduğu gibi; sığır, koyun, keçi, domuz, kümes hayvanları ve kemirgenlerde de çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu hayvanların pek çoğu çeşitli Salmonella türleri için asıl konakçıdır (12-15). Salmonella cinsi bakteriler aynı zamanda midye, kerevit, istiridye ve balık gibi deniz ve tatlı su canlılarında da tespit edilmiştir (3,14,16-19). Bu canlılar Salmonella'ların insanlara bulaşmasında direkt veya besin maddelerinin kontaminasyonu suretiyle de indirekt olarak rol oynarlar. Salmonella'ların yemlerle birlikte alındığı zaman balıklarda enteritise de yol açtığı bilinmektedir (4-6,19). Gastroenteritis etkenleri arasında yer alan başta Salmonella, Shigella, *Escherichia coli* olmak üzere, Yersinia, Campylobacter, Vibrio ve Aeromonas gibi bakteri grupları arasında Salmonella'lar tüm gastroenteritis olgularının % 60-90'nından sorumludur (15).

Şimdiye kadar Salmonella'ların identifikasyonu amacıyla çok az çalışmada PZR tekniği kullanılmakla birlikte, bu tekniğin spesifitesi ve duyarlığı nedeniyle diğer sistemlerden daha avantajlı olduğu belirlenmiştir (20-25).

Su ürünleri içerisinde yer alan tatlı su midyelerinin özellikle mikrobiyolojisi hakkında kapsamlı araştırmaların sayısı azdır. Bu çalışmada; kültür ve PZR tekniğinin kombinasyonu ile Elazığ Keban Baraj gölündeki tatlı su midyelerinde (*Unio elongatulus eucirrus*) Salmonella spp.'lerin saptanması ve PZR'nin konvansiyonel identifikasyon yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Materyal

Keban Barajı, Elazığ ilinin 45 km kuzey batısında Keban ilçesi yakınında, Fırat nehri üzerinde inşa edilmiştir. Göl sahası; Elazığ, Tunceli, Erzincan, Sivas ve Malatya sınırları içerisinde olup, 67,500 hektarlık rezervuar alanına sahiptir. Elektrik üretimi, sulama ve balıkçılık amaçlı kullanılan bir göldür (26). Midyeler (*Unio elongatulus eucirrus*), Eylül 1999 – Nisan 2000 tarihleri arasında Keban Baraj gölünün Elazığ şehir kanalizasyonunun döküldüğü yere yakın, Koçkale ve herhangi bir atık su karışmayan Pertek yörelerinden temin edildi. Koçkale'den 397, Pertek'ten ise 230 adet olmak üzere toplam 627 tatlı su midyesi toplandı. Bakteriyolojik incelemeler Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi ile Veteriner Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Metot

Mikrobiyolojik incelenmesi yapılacak midyelerin üzerlerindeki çamurlar klorsuz musluk suyu ile yıkandı ve kurutuldu. Aseptik koşullar altında midyelerin ön ve arka taraflarında bulunan iki adet kuvvetli kas sistemi steril iğne ile uyarılarak kabukları açıldı. Çıkarılan yumuşak dokuların tamamı vücut sıvıları ile birlikte steril kapaklı tüplere bırakılarak, homojenizatörde homojenize edildi.

Steril pipetlerle midye homojenizatından 1 ml alınarak, muhtemel Salmonella aranması amacıyla 10 ml Rappaport Vassiliadis besiyerine ekimler yapıldı. Bu besiyeri etüvde 42 ºC'de 24-48 saat süreyle inkübe edildikten sonra; MacConkey agar, Salmonella - Shigella agar ve Brilliant Green Phenol Red Laktoz agar selektif katı besiyerlerine sürme ekimler yapıldı ve aerob koşullarda 35-37 ºC'de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu besiyerlerinde üreyen Salmonella şüpheli kolonilerden preparat hazırlanarak Gram boyama yapıldı. Gram negatif çomak şeklinde olan mikroorganizmaların Nutrient broth ve kanlı agarda kültürleri hazırlandı. Salmonella şüpheli, oksidaz negatif kolonilere biyokimyasal testler uygulanarak identifikasyonları yapıldı (27-30).

Salmonella'ların PZR ile İdentifikasyonu

Selektif agarda üreyen kolonilerden öze ile örnek alınarak, eppendorf tüp içerisinde 300 mikrolitre (µl) distile suda iyice süspanse edildi. Tüpteki mikroorganizmalar, 56 ºC'ye ayarlı su banyosunda 30 dakika bekletilerek inaktive edildi. Daha sonra süspansiyona eşit hacimde zirkonyum boncukları ilave edildi ve bir mini çalkalayıcıda yüksek devirde 2 x 90 sn süreyle çalkalanarak etkenin hücre duvarının mekanik olarak yıkılması işlemi gerçekleştirildi. Üstteki sıvı alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve 300 µl Tris-HCl ile sature edilmiş fenol ilave edildi. Süspansiyon 5 dakika elle çalkalandıktan sonra 11,000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Fenollü kısma dokunmadan üstteki sıvı bir mikro

pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde başka bir tüpe aktarıldı. DNA'nın presipitasyonu amacıyla süspansiyona 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol ilave edilerek –20 ºC'de 1-2 saat bekletildi. Yüksek devirde 10 dakika santrifüjden sonra tüpteki sıvı döküldü ve elde edilen tortu sırasıyla % 90 ve % 70'lik etanol ile iki defa yıkandı. Bu işlemler arasında 11,000 g'de 5 dakika süreyle santrifüj uygulandı. Son olarak elde edilen tortu kurutuldu ve 50 µl distile su ile süspanse edildi. Bu süspansiyondan 5 µl alınarak PZR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

PZR'de; 10 x PZR buffer'ından (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, %1 Triton X -100) 5 µl, deoksinükleotid trifosfatların (adenin, guanin, sitozin ve timin) her birinden 250 µM, 2U Taq DNA polimeraz enzimi (Promega), Salmonella'ların 16S rRNA geninden üretilen 16SF1 (5'–TGTTGTGGTTAATAACCGCA – 3') ve 16SIII (5'–CACAAATCCATCTCTGGA – 3') (Promega), primer çiftinin (32) her birinden 10 pg ve 5 µl hedef DNA olmak üzere toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımının üzeri 40 µl mineral yağ ile kaplandı ve PZR Touchdown Thermocycler'da (Hybaid, İngiltere) gerçekleştirildi. DNA amplifikasyonu; denatürasyon için 95 ºC'de 1 dakika, hibridizasyon için 58 ºC'de 2 dakika ve polimerizasyon için 72 ºC'de 2 dakika olmak üzere 35 siklus halinde gerçekleştirildi. Son siklusdan sonra 72 ºC'de 5 dakika'lık bir sentez basamağı uygulandı.

PZR'de amplifiye edilen DNA ürünlerinden, 7 µl alınıp, 3 µl blue-orange yükleme solüsyonu ile karıştırılarak daha önce hazırlanan % 1,5'luk agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirildi. Son kuyucuğa da PZR markeri bırakıldı. Jel, Tris-borik asit- EDTA (TBE) buffer'ı kullanılarak 75 voltta 1 saat süreyle elektroforeze bırakıldı. Bu süre sonunda jel, ethidium bromide (0,5 µg / ml) ile oda ısısında 30 dakika süreyle boyandı ve sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. Çalışmada kullanılan primerlerin amplifiye ettiği genom bölgesine tekabül eden 572 bp uzunluğunda bantların elde edildiği numuneler pozitif olarak değerlendirildi.

Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla, gerek DNA ekstraksiyonu aşamasında gerekse PZR'de pozitif kontrol olarak Ankara Etlik Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen Salmonella enteritidis referans suşu ve negatif kontrol olarak da *E. coli* kullanıldı.

Bulgular

İncelenen 627 adet midyeden, Koçkale yöresine ait 397'sinin 19'unda (%4,8) Salmonella izolasyonu yapılırken, Pertek bölgesinden çıkarılan 230 midyede Salmonella'lara rastlanılmadı. İzole edilen Gram negatif çomak şekilli 19 suşun nutrient broth ve kanlı agarda hazırlanan saf kültürlerinden biyokimyasal özellikleri belirlendi. Bu biyokimyasal test sonuçlarına göre 19 suş (% 3,03) Salmonella spp. olarak identifiye edildi (Tablo 1).

Salmonella'ların PZR ile İdentifikasyonu

Selektif besiyerlerinde üreyen Salmonella şüpheli kolonilerden izole edilen 19 izolatın DNA'larının PZR ile amplifikasyonunda oluşan PZR ürünleri, % 1,5'luk agaroz jelde elektroforezden geçirildi. Daha sonra ultraviyole transilluminatörde bakılan numunelerin hepsinden, 572 bp uzunluğunda elde edilen bantlara göre, on dokuz suşun Salmonella spp. olduğu saptandı (Şekil 1).

Tartışma

Bu çalışmada Keban Baraj gölünden toplanan tatlı su midyelerinde, insan ve hayvanlar için patojen olan ve kontamine gıdalarla alındığında gastroenteritis başta olmak üzere ciddi enfeksiyonlara neden olan Salmonella'lara % 4,8 oranında rastlanıldı. Salmonella'ların midyelerde veya diğer su ürünlerinde hastalık oluşturabildiği konusu netlik kazanmamıştır. Çalışmada Salmonella izole edilen midyelerde herhangi bir lezyona rastlanmaması, su ürünlerinin bu etken için sadece portörlük yaptığı fikrini desteklemektedir. Nitekim Salmonella'ların midyelerde 6 ile 30 gün arasında canlı kaldığı ifade edilmiştir (14, 32-34). Her ne kadar bölgede tatlı su midyelerinin yenmesi yaygın değil ise de, bu çalışmada 19 midyede Salmonella bulunmuş olması, bu gıdaların çiğ veya az pişmiş olarak tüketilmesinin enfeksiyon riskini artıracağı kuvvetle muhtemeldir. 1380 sayılı Su Ürünleri Kanununda (35) belirtildiği üzere, Salmonella'ların kabuklu ve yumuşakçaların etlerinde hiç bulunmaması gereklidir. Bu durumda Keban Baraj gölünün Elazığ şehir kanalizasyon arıtma istasyonuna yakın, Koçkale yöresinden toplanan midyelerden Salmonella spp izolasyonu, bu bölgenin kirlenmeyle karşı karşıya olduğu, bu nedenle buradaki tatlı su midyelerinin tüketilmelerinin sağlık açısından uygun olmadığı görüldü. Ayrıca enfekte midyelerin, bu bakteriyi sulara bulaştırması

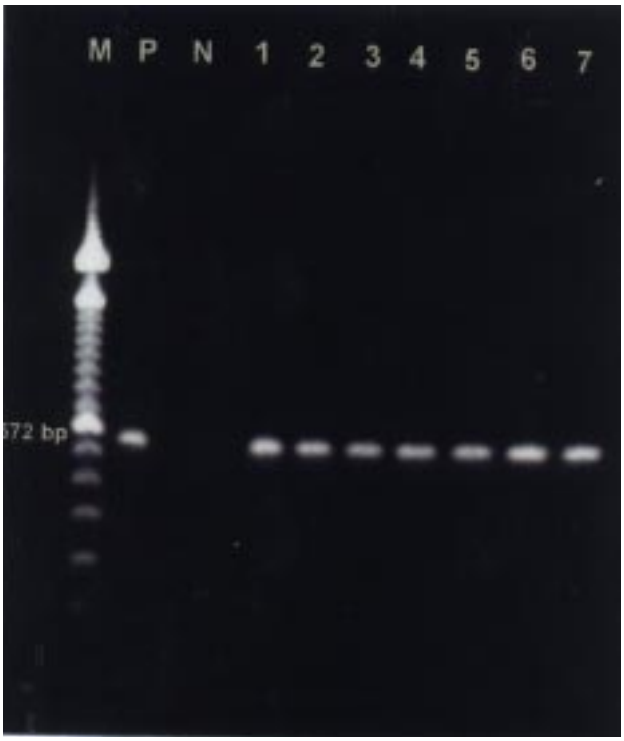
Tablo 1. Tatlı Su Midyelerinden İzole Edilen 19 Salmonella spp'nin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.

	İZOLE EDİLEN 19 SALMONELLA ŞÜPHELİ SUŞ																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Gram Boyama	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Oxidaz	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	–	+	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–
İndol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Metil Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sitrat	+	–	+	+	–	+	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+	+
Üreaz	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ONPG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gaz Oluşumu	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+
Ornitindekarboksilaz	–	–	–	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	+	–	+	+	+
Fenilalanindeaminaz	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Lizin dekarboksilaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triptofandeaminaz	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Jelatin hidrolizi	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Nitrat redüksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulsitol	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–
Sakkaroz	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Arabinoz	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–
İnositol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Rhamnoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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

da söz konusu olduğundan, yöre balıkçıları başta olmak üzere su ürünleri ile uğraşan insanlar enfeksiyon riski taşımaktadır. Buna karşılık Keban Baraj gölünün herhangi bir atık su karışmayan Pertek sahasındaki tatlı su midyelerinde Salmonella'lara rastlanmadı.

Salmonella'ların geleneksel metotlarla identifikasyonunda, biyokimyasal ve serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak klasik testlerde özellikle kültür saf olmadığında hatalı sonuçlar alınmakta, ayrıca izolasyon ve identifikasyonları oldukça zor ve uzun



Şekil 1. Tatlı Su Midyesinden izole edilen Salmonella spp.'lerden elde edilen DNA'ların, PZR'de analizi sonucu oluşan 572 bp'lik bantları gösteren ethidium bromide ile boyanmış % 1,5'luk bir agaroz jel. (1-7 : Midyelerden elde edilen Salmonella şüpheli örnekler; p : Pozitif kontrol (*S. enteritidis* referans kültürü); n : Negatif kontrol (E. coli); m : 100 bp'lik moleküler marker).

zaman (5-7 gün) gerektirmektedir. Buna karşılık, PZR tekniği ile hastalık etkenlerinin identifikayonu kısa sürede ve doğru olarak yapılmakta, saf ya da karışık kültürlerde bulunan az sayıdaki mikroorganizmalar dahi bir gün gibi kısa sürede identifiye edilebilmektedir (21,23,24,32). Tatlı su midyesinde PZR tekniği ile yapılan bu araştırmada da Salmonella'ların 16S rRNA geninden üretilen cins spesifik 16SFII primerlerinin kullanılması ile farklı bakterilerin yanlış pozitif reaksiyon vermesi önlenmiştir. Ayrıca tekniğin bütün basamaklarının negatif kontrolle birlikte yürütülmesi ve sonuçta kontaminasyonun meydana gelmemesi PZR tekniğinin başarılı bir şekilde çalıştığını göstermiştir.

Bu çalışmada tatlı su midyelerinde (*Unio elongatulus eucirrus*) Salmonella'ların identifikasyonunda, uzun zaman gerektiren konvansiyonel yöntemlere alternatif olarak PZR tekniği ilk kez başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Kaynaklar

1. Hickman-Brenner, F.W., Stubbs, A.D., Farmer, J.J.: Phage Typing of Salmonella *enteritidis* in the United States. J. Clin. Microbiol., 1991; 29: 2817-2823.
2. Pohl, P., Lintermans, H., Marin, M., Couturier, M.: Epidemiological Study of Salmonella *enteritidis* Strains of Animal Origin in Belgium. Epidemiol. Infect., 1991; 106: 11-16.
3. Bernoth, E.M.: Risiken Beim Umgang mit Fischen Durch Bewegliche Aeromonaden. Arztl. Lab., 1990; 36: 213-217.
4. Love, T.D., Minkler, B.H.: Studies of Salmonella Potential in Catfish Feeds. Com. Fish. Rev., 1972; 34: 5-7.
5. Sarıeyyüpoğlu, M.: Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Mide ve Barsak Bakteriyel Florasının Aerobik Yönden İncelenmesi. Doğa Bilim Dergisi., 1984; D1; 8: 281-287.
6. Taylor, J.: Salmonella in Wild Animals., Symp. Zool. Soc. London., 1968; 24: 51-73.
7. Şeker, E., Sarıeyyüpoğlu, M: Keban Baraj Gölünün Koçkale Bölgesinden Toplanan Tatlı Su Midyesinde (*Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat,1860) Mide ve Bağırsakların Fekal Koliformlar Yönünden İncelenmesi. F.Ü. Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi, 1998; 10: 45-53.
8. Martinez, E., Morinigo, M.A., Cornax, R., Egea, A.F., Borrego, J.: Relationship between Classical Indicators and Several Pathogenic Microorganisms Involved in Shellfish-Borne Diseases. J. Food. Protec., 1991; 54: 711-717.
9. Reda, W.W.: Studies on Fish as a Source of Salmonella Serotypes in Fish in Retail Trade in Kochi. Fish. Technol. Soc., 1993; 41: 13-16.
10. Youssef, H., El-Timawy, A.K., Ahmed, S.: Role of Aerobic Intestinal Pathogens of Fresh-Water Fish in Transmission of Human Diseases. J. Food Prot., 1992; 55: 739-740.
11. İnal, T.: Besin Hijyeni. İkinci Baskı, Final Ofset A.Ş., İstanbul, 1992, 783 s.
12. WHO, Salmonellosis Control. The Role of Animal and Product Hygiene. WHO Expert Committee Technical Report Series 774 World Health Organization, 1984, Geneva.
13. Barrow, P.A.: Salmonella Control, Past, Present and Future. Avian Pathol., 1993; 22: 651-699.
14. Bocek, A.J., Brady, Y.J., Rogers, W.A.: Exposure of Silver carp, Hypophthalmichthys, to Salmonella *typhimurium*. Aquaculture, 1992; 103: 9-16.

15. Guthrie, R.K.: Salmonella CRC Press Inc., London, 1992.

16. Ertaş, H.B., Çetinkaya, B., Şeker, E., Muz, A., Sarıeyyüpoğlu, M., Elazığ ve Çevresindeki Çeşitli Su Kaynaklarından Temin Edilen Balıklardan Salmonella İzolasyonu ve PCR ile Teyit Edilmesi. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi,1999; 13(2): 15-20

17. Meçgel, E.: Balık ve Midyelerde Salmonella, Vibrio ve Aeromonas Cinsi Bakteriler (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1992.

18. Morse, E.V., Greenwood, D.E., Meyers, E.P., Anderson, V.L., Duncan, M.A., Experimental Salmonella Infections in *Carassius auratus* (Goldfish). J. Environ. Sci. Health; 1978; 13: 325-335.

19. Sarıeyyüpoğlu, M.: Salmonella Potential in Aquarium Fish Feeds. Fırat Üniv. Dergisi; 1987; 2(2): 59-62.

20. Bullock, A.M.: Laboratory Methods. In Fish Pathology, Roberts, R., Second Edition. Bailliere Tindall, London, 1989; 374-407.

21. Çetinkaya, B.: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temel Prensipler. F. Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi., 1998; 12, 149-156.

22. Plumb, A.J., Bowser, R.P.: Microbial Fish Disease Laboratory Manual. Auburn, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 95 p., 1983.

23. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science, 1988; 239: 487-491.

24. Bailey, J.S.: Detection of Salmonella Cells within 24 to 26 Hours in Poultry Samples with the Polymerase Chain Reaction BAX System. J. Food Prot., 1998; 61: 792-795.

25. Erlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J.: Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. Science, 1991; 252: 1643-1651.

26. Anonim: Keban Baraj Gölü Limnolojik Raporu. Bayındırlık ve İskan Bakanlığı Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü. IX. Bölge Müdürlüğü. Su Ürünleri Başmühendisliği. Elazığ, 1994.

27. Lassen, J.: Rapid Identification of Gram-Negative Rods Using a Three-Tube Method Combined with a Dichotomic Key. Acta Path. Microbiol., 1975; 83: 525-533.

28. Arda, M.: Özel Mikrobiyoloji. A.Ü. Vet. Fak. Medisan Yayın Serisi No. 26, Medisan Yayınevi, Ankara, 1997.

29. Bilgehan, H.: Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, Şafak Matbaacılık, Ankara II. Baskı, 1995; 364-451.

30. Bekar, M.: Salmonella'ların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri Etlik Vet. Kont. Araşt. Enst., Ankara, 1997.

31. Lin, C.K., Tsen H.Y.: Use of two 16S DNA Targeted Oligonucleotides as PCR Primers for the Specific Detection of Salmonella in Foods. J. Appl. Bacteriol., 1996; 80 : 659-666.

32. Connel, J.J.: Control of Fish Quality. 2nd Ed., Fishing News Books Ltd. Farnham, Surrey. England, 1980.

33. Göğüş, A.K., Kolsarıcı, N.: Su Ürünleri Teknolojisi. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, Ankara, 1992; 1243: 261

34. Turick, C.E., Sextone, A.J., Bissonnete, G.K.: Freshwater Mussels as Monitors of Bacteriological Water Quality. Water- Air- Soil-Pollut., 1988; 40: 449-460.

35. Anonim: Su Ürünleri Kanunu ve Su Ürünleri Yönetmeliği. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müd., Ankara, 1995.