

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Legionella pneumophila* ÜZERİNE BİYOFİLM**
ARAŞTIRMALARI VE ÇEŞİTLİ DOĞAL ÜRÜNLERİN
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM
ETKİLERİNİN DENENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÜLENT TURASAY

OCAK 2015
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

BÜLENT TURASAY tarafından hazırlanan *Legionella pneumophila* ÜZERİNE BİYOFİLM ARAŞTIRMALARI VE ÇEŞİTLİ DOĞAL ÜRÜNLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ETKİLERİNİN DENENMESİ başlıklı tezinin, 18/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Aysel UĞUR* (**Jüri Başkanı**)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Gazi Üniversitesi, Ankara

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Özgür CEYLAN** (**Danışman**)

Ula Ali Koçman MYO, Arıcılık Programı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN(**Üye**)

Biyoloji Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Özgür CEYLAN

Ula Ali Koçman MYO, Arıcılık Programı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 18/12/2014

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Bülent Turasay

18/12/2014



ÖZET

***Legionella pneumophila* ÜZERİNE BİYOFİLM ARAŞTIRMALARI VE ÇEŞİTLİ DOĞAL ÜRÜNLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ETKİLERİNİN DENENMESİ**

Bülent TURASAY

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özgür CEYLAN

Aralık 2014, 95 sayfa

Çalışmada Muğla ilindeki çeşitli binalara ait su şebeke sistemlerinden alınan numunelerden izole edilmiş 11 adet *L. pneumophila* suşu kullanılmıştır. Bu suşların Buffered Yeast Extract (BYE) besiyeri ve steril musluk suyu ortamlarındaki biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenmiş ve BYE’de oluşan biyofilmlere ait optik dansite değerlerinin steril musluk suyundaki değerlerin yaklaşık 2 katı olduğu tespit edilmiştir.

L. pneumophila’nın biyofilm özellikleri bakımından, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *Enterococcus faecalis* gibi sularda bulunabilen bakterilerle ilişkisi araştırılmıştır. *L. pneumophila* bakterisinin *P.fluorescens*, *E.faecalis*, *P.putida* ile birlikte anlamlı derecede fazla biyofilm oluşturduğu, *P.aeruginosa* ile birlikte ise biyofilm miktarında azalma olduğu görülmüştür. Bahsedilen bakterilere ait 24 saatlik biyofilmlerin olduğu ortama *L. pneumophila* eklendiğinde ise *P.aeruginosa*’ya ait biyofilm üzerinde tutunma oranı negatif kontrollere göre daha yüksek bulunmuştur. Tüm *L. pneumophila* suşları en fazla *K.pneumoniae* biyofilmleri üzerinde biyofilm oluşumu göstermiştir. Bu sonuçlar *L.pneumophila*’nın tutunma özelliklerinin farklı tür bakterilere ait planktonik hücreler veya biyofilm varlığında değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çalışmada *L. pneumophila* suşlarının ölü bakteri hücreleri içeren steril musluk suyu ortamında biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmış ve bu suşların ölü bakteri hücrelerini kullanarak oluşturdukları biyofilm oranlarının, steril musluk suyundakilerden ve negatif kontrollerden anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür. *L. pneumophila* hücrelerinin biyofilm oluşumu esnasında ölü bakteri hücrelerinden yararlanma miktarının BYE besiyeri seviyesine ulaşamadığı görülmüştür.

Çalışmada ticari preparat olarak satın alınan Adaçayı, Defne, Kekik, Limon ve Nane yağlarının *L. pneumophila* suşları üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri araştırılmıştır. Antibakteriyel aktivite sonuçları çalışmada kullanılan tüm yağların antibakteriyel etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle defne yağı ve limon yağı

yüksek antibakteriyel etki göstermiştir. Minimum inhibisyon (MİK) ve minimum bakterisidal (MBK) konsantrasyonlar sırasıyla, defne yağı için 0.044-0.100 ve 0.16-0.31 µl/ml, limon yağı için 0.83-1.25 ve 1.25-3.75 µl/ml olarak tespit edilmiştir.

Yağların antibiyofilm etkileri biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve önceden oluşmuş biyofilmin giderimi şeklinde, MİK, MİK/2, MİK/4, MİK/8 ve MİK/16 konsantrasyonlarında denenmiştir. Tespit edilen en yüksek biyofilm inhibisyonu ve giderimi değerleri: Defne yağı için %78 - %49.1, limon yağı için %63.3 - %34.2, nane yağı için %45.5 - 16.7, adaçayı yağı için %35.6 - 39.4 ve kekik yağı için %23 - 31.9 oranındadır. Defne yağı antibakteriyel etki yanısıra en yüksek antibiyofilm etkiye sahip yağ olarak da tespit edilmiştir. En düşük antibiyofilm etki oranları kekik yağında tespit edilmiştir. Tüm yağların biyofilm oluşumunu inhibe edici aktiviteleri, biyofilm giderici aktivitelerine göre daha fazla bulunmuştur.

Çalışma sonuçları *L. pneumophila*'nın nekrotrofik ortamlarda biyofilm oluşturabildiğini ve farklı bakteri türleri ile biyofilm oluşumu yönünden etkileşim içinde olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan yağların yüksek antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri nedeniyle *L. pneumophila*'nın dezenfeksiyonu amacıyla kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Legionella pneumophila*, Lejyoner hastalığı, Biyofilm, Antibiyofilm aktivite, Antimikrobiyal aktivite, Esansiyel yağlar.

ABSTRACT

BIOFILM EXPERIMENTS ON *Legionella pneumophila* and INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF NATURAL PRODUCTS

Bülent TURASAY

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Özgür CEYLAN

December 2014, 95 pages

Eleven *L. pneumophila* strains were used in the study, which have been isolated from water samples of supply systems of various buildings in Muğla. Biofilm production capabilities of the strains in Buffered Yeast Extract (BYE) medium and sterile tap water (STW) were investigated, and it was founded that optical density values of BYE biofilms was approximately two-fold higher than of STW biofilms.

Relationship of *L. pneumophila* was investigated with other bacteria that can be found in water such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Klebsiella pneumonia*, in terms of biofilm features. It was observed that *L. pneumophila* formed significantly greater biofilms with *P.fluorescens*, *E.faecalis* and *P.putida*, but biofilms formed with *P. aeruginosa* were significantly lower. Contrarily, when *L.pneumophila* added to preformed 24h biofilms of other bacteria, attachment of *L. pneumophila* to *P. aeruginosa* biofilms was significantly higher than negative controls. *L. pneumophila* strains produced highest biofilms on *K. pneumoniae* biofilms. Results showed that biofilm production features of *L. pneumophila* might change in the presence of planktonic or attached cells of other bacterial species.

In the study, biofilm formation of *L. pneumophila* in STW containing dead bacteria cells was investigated, and it was shown that necrotrophic biofilms of *L. pneumophila* has significantly higher values than negative controls and medium contain only STW. It was observed that the amount of the benefits of *L.pneumophila* from dead cells for the biofilm production did not reach the level of BYE medium.

Antibacterial and antibiofilm activities of sage, laurel, thyme, lemon and peppermint essential oils supplied as commercially were investigated against *L. pneumophila*. Antibacterial activity results showed that all studied oils have antibacterial activities. Above all laurel oil and lemon oil was shown greatest antibacterial activities. Minimum inhibition and minimum bactericidal concentrations was determined as

0.044-0.100 and 0.16-0.31 µl/ml for laurel oil, 0.83-1.25 and 1.25-3.75 for lemon oil, respectively.

Antibiofilm activities of essential oils were studied as inhibition of biofilm formation and as eradication of preformed biofilms, at the concentrations of MIC, MIC/2, MIC/4, MIC/8 and MIC/16. Highest biofilm inhibition and eradication rates detected as: 78% - 49.1% for laurel oil, 63.3% - 34.2% for lemon oil, 45.5% - 16.7% for peppermint oil, 35.6% - 39.4% for sage oil and 23% - 31.9% for thyme oil. Laurel oil was detected to have most antibiofilm effects, as in antibacterial activity. Thyme oil was detected to have lowest antibiofilm activity. It was observed that the rates for inhibition of biofilm production activity were much higher than the rates for eradication of preformed biofilms, for all studied essential oils.

Results of the study reveal the ability of *L. pneumophila* to form biofilm in necrotrophic media, and its interactions with different bacteria in terms of biofilm production. Furthermore, it was shown that the oils employed in the study could be used in disinfection of *L. pneumophila*, because of their high antibacterial and antibiofilm activities.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Legionnaires' disease, Biofilm, Antibiofilm activity, Antimicrobial activity, Essential oils.

ÖNSÖZ

Bu tezin yazarı,

Yüksek lisansı tamamlama kararından başlayarak, bu tezin tamamlanmasına kadar ki tüm süreçlerde sürekli yanında olan, yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özgür CEYLAN'a,

Yüksek lisans öğrenimi süresindeki tüm destek ve yardımları için, Yrd.Doç.Dr. Nurdan SARAÇ, yüksek lisans öğrencileri Filiz ÖZCAN, Halime ALIÇ ve Gültekin AKDAMAR'a,

L. pneumophila suşlarının izolasyonu ve yoğun laboratuvar çalışmaları esnasındaki destek ve sabırları için başta Biyolog Burhan GİRİNCİ olmak üzere, Halk Sağlığı Laboratuvarı Su Mikrobiyolojisi ekibi Misal KARAKUŞ, Emre ÜNAL, Yunus GÜR ve Nezahat OKŞAŞ'a,

Yüksek Lisans eğitimi boyunca her türlü kolaylığı gösteren Muğla Halk Sağlığı Laboratuvar Sorumlusu İsmail KEYİK'e ve spektrofotometri kullanımı ve musluk suyu analizlerindeki yardımları için Kimyasal Analizler Birimi çalışanlarına,

Özellikle yoğun çalışma temposu içinde desteklerini sürekli hissettiğim eşim Nursel TURASAY'a ve çocuklarım Evren ve Nehir'e,

Can-ı gönülden teşekkürlerini sunmaktadır.

Bu tez çalışması, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi tarafından, BAP 2013-139 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	2
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 <i>Legionella pneumophila</i>	3
2.2 Lejyoner Hastalığı	3
2.3 <i>Legionella</i> Türlerinin Doğada Yayılımı	6
2.3.1. Paraziter yaşam döngüsü	7
2.3.2 İnsan yapımı su sistemlerinde <i>Legionella</i>	9
2.3.2.1 Su örneklerinde <i>Legionella</i> tespiti ve izolasyonu	11
2.3.2.2 Su sistemlerinden <i>Legionella</i> dezenfeksiyonu	12
2.3.3 <i>L. pneumophila</i> diğer bakteri türleri ile etkileşimleri	13
2.4 Biyofilm.....	15
2.5 <i>L. pneumophila</i> ve Biyofilm Çalışmaları	19
2.5.1. <i>L. pneumophila</i> biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler	21
2.5.1.1. Tutunma yüzeyi ve sıcaklık	21
2.5.1.2. Adhesinler	22
2.5.1.3. Quorum sensing	23
2.5.1.4. Biyofilm yapısındaki diğer mikroorganizmalarla etkileşim	23
2.5.1.5. Su akış hızı	24
2.5.2. Biyofilm içinde beslenme ve gelişme	25
2.6. <i>L.pneumophila</i> Üzerine Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etki Çalışmaları	26
3. MALZEME ve YÖNTEM	28
3.1 Kullanılan Mikroorganizmalar	28
3.1.1. <i>L. pneumophila</i> suşları.....	28
3.1.2 Diğer mikroorganizmalar.....	29
3.2 Bitkisel Yağlar, Besiyerleri ve Çözeltiler.....	29

3.2.1 Bitkisel yağlar	29
3.2.2. Besiyerleri	30
3.2.3. Steril musluk suyu	33
3.3. Yöntemler	33
3.3.1 Biyofilm oluşumu denemeleri	34
3.3.1.1. Tek tür (Monospecies) biyofilm oluşumu.....	34
3.3.1.2. Biyofilm boyanması ve absorbans ölçümü	34
3.3.1.3. <i>L. pneumophila</i> 'nın farklı tür bakteriler ile birlikte biyofilm oluşturmasının tespit edilmesi	35
3.3.1.4. <i>L. pneumophila</i> 'nın farklı bakteri türleri tarafından oluşturulmuş biyofilm varlığında biyofilm oluşturmasının tespit edilmesi	35
3.3.1.5. Ölü bakteri hücrelerinin varlığında (nekrotrofik) biyofilm oluşumu.	36
3.3.1.6. Biyofilm ölçümünün değerlendirilmesi	36
3.3.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) tespiti	37
3.3.3. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) tespiti	38
3.3.4 Antibiyofilm yöntemleri	38
3.3.4.1 Biyofilm oluşumunu engelleyici etki	38
3.3.4.2. Önceden oluşmuş biyofilmi giderici etki	39
4. SONUÇLAR	40
4.1. <i>L. pneumophila</i> Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özellikleri	40
4.1.1. Steril musluk suyu ve BYE besiyerinde biyofilm oluşumu.....	40
4.1.2. <i>L. pneumophila</i> 'nın ölü bakteri hücresi içeren ortamlarda biyofilm oluşturma kapasitesi	42
4.1.3. <i>L. pneumophila</i> 'nın diğer bakteri türleri ile birlikte biyofilm oluşturması	44
4.1.3.1. Farklı bakteri türlerine ait planktonik hücreler varlığında biyofilm oluşumu	44
4.1.3.2. Farklı bakteri türlerine ait tutunmuş hücreler varlığında biyofilm oluşumu	46
4.2. Bitkisel Yağların <i>L. pneumophila</i> Üzerinde Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etkileri	48
4.2.1. Antibakteriyel aktivite	48
4.2.2. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu	50
4.2.3. Önceden oluşmuş biyofilmin eradikasyonu.....	52
5. TARTIŞMA VE YORUM	55
5.1. <i>L.pneumophila</i> Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özellikleri	55

5.2. Bitkisel Yağların <i>L. pneumophila</i> Üzerine Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etkileri.....	58
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ.....	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Lejyoner hastalığı için kullanılan epidemiyolojik tanımlamalar	5
Çizelge 2.2. Bitkisel ürünlerin antibiyofilm aktivitelerinin tespiti çalışmalarına örnekler.....	18
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>L.pneumophila</i> suşları	28
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan <i>L.pneumophila</i> harici bakteri suşları.....	29
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan bitkisel yağlar	30
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan musluk suyunun fiziko-kimyasal özellikleri	33
Çizelge 4.1. <i>L. pneumophila</i> suşlarının 37°C’de 72s inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma kapasiteleri	40
Çizelge 4.2. <i>L. pneumophila</i> suşlarının ölü bakteri hücreleri içeren ortamda biyofilm oluşturma kapasiteleri	42
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan türlerinin TSB sıvı ortamında biyofilm oluşturma kapasiteleri	45
Çizelge 4.4. <i>L. pneumophila</i> suşlarının önceden oluşmuş biyofilm üzerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri	46
Çizelge 4.5. Bitkisel yağların ve Eritromisinin MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri	48
Çizelge 4.6. Bitkisel yağların MBK (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) değerleri.....	49
Çizelge 4.7. Bitkisel yağların <i>L. pneumophila</i> biyofilm oluşumu inhibisyon oranları	50
Çizelge 4.8. Bitkisel yağların önceden oluşmuş <i>L. pneumophila</i> biyofilmini giderim oranları	53
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan bitkisel yağların farklı mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkilerine dair literatür örnekleri.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>L. pneumophila</i> 'nın konak protozoa hücrelerindeki yaşam döngüsü	8
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları	16
Şekil 2.3. <i>L. pneumophila</i> 'nın biyofilm oluşumunu ve kolonizasyonunu etkileyen faktörler ve çevre koşulları	20
Şekil 3.1. <i>L. pneumophila</i> kolonilerinin BCYE besiyerinde çıplak gözle ve koloni mikroskobu ile görünümü.	32
Şekil 3.2. Biyogüvenlik kabininde preparatların boyanması işlemi	33
Şekil 3.3. Spektrofotometre ile OD ölçümü	35
Şekil 4.1. <i>L. pneumophila</i> suşlarının 37°C'de 72s inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma kapasiteleri	41
Şekil 4.2. Cam tüplerde, kristal viyole ile boyanmış <i>L. pneumophila</i> biyofilmleri ...	41
Şekil 4.3. <i>L. pneumophila</i> suşlarına ait nekrotrofik ortamdaki biyofilmlerin, steril musluk suyu ve BYE'de oluşan biyofilmler ile kıyaslanması	43
Şekil 4.4. Nekrotrofik ortamların biyofilm oluşumu yönünden steril musluk suyu ve BYE ile kıyaslanması.	44
Şekil 4.5. <i>L. pneumophila</i> suşları ile diğer bakteri suşlarının birlikte oluşturdıkları 72 saatlik biyofilmlerin, tek türe ait biyofilmlerle kıyaslanması	45
Şekil 4.6. 24 saatlik biyofilmler üzerine bakteri süspansiyonu ilavesi ile oluşan biyofilmlerin, TSB ilave edilen kontrollere göre % değişim oranları.	47
Şekil 4.7. BCYE plaklarında MBK belirlenmesi	49
Şekil 4.8. Bitkisel yağların <i>L. pneumophila</i> biyofilm oluşumunu önleyici etkileri ...	51
Şekil 4.9. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu çalışması, tüplerde boyanmış biyofilmler.	52
Şekil 4.10. Bitkisel yağların <i>L. pneumophila</i> biyofilm giderici etkileri	54
Şekil 5.1. Bitkisel yağların <i>L. pneumophila</i> üzerine biyofilm oluşumu inhibisyonu ve oluşmuş biyofilmi giderici aktivitelerinin karşılaştırılması	63

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACES	N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid
AHK	α -hidroksiketon
AHL	Açıl homoserine lakton
AI	Autoinducer
AI2	Autoinducer 2
AIDS	Akut Bağışıklık Hasarı Sendromu
BCYE	Tamponlanmış Kömür Maya Ekstrat Agar
BSAC	Britanya Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği
BYE	Tamponlanmış Maya Ekstrat Broth
CDC	ABD Bulaşıcı Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CV	Kristal Viyole
DFA	Direkt Floresan Antikor
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECDC	Avrupa Bulaşıcı Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
EPS	Hücre dışı polisakkarit madde
ER	Endoplazmik retikulum
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
EWGLI	Avrupa <i>Legionella</i> Enfeksiyonları Çalışma Grubu
GAG	Glikozaminoglikan
GVPC	Glisin Vankomisin Polimiksin Sikloheksimid Besiyeri
ISO	Uluslararası Standartlar Enstitüsü
İng.	İngilizce
LAI-1	<i>Legionella</i> Autoinducer 1
Lcl	Kollajen benzeri <i>Legionella</i> proteini
LLAPs	<i>Legionella</i> benzeri amipsel patojenler
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MHSL	Muğla Halk Sağlığı Laboratuvarı
MIF	Yüksek derece enfeksiyöz Yetişkin hücre içi form
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
μ l	Mikrolitre

ml	Mililitre
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MUKK	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kültür Koleksiyonu
MWY	Wakowsky ve Yee Besiyeri
OD	Optik dansite
PCR	Polimerize zincir reaksiyonu
PEX	Çapraz Bağlı Polietilen
PP	Polipropilen
PS	Polistiren
PVC	Polivinil klorür
QS	Quorum sensing
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RSKK	Refik Saydam Kültür Koleksiyonu
s	Saat
SD	Standart sapma
SG	Serogrup
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
VBNC	Canlı fakat kültürde üremeyen bakteri hücresi formu

1. GİRİŞ

1976 yılında Birleşik Devletler Philadelphia kentinde, Amerikan Legion Kongresi sonrasında, kongreye katılanlar arasında pnomoni benzeri, ateşli seyreden bir salgın başgösterir. Kongre 21-24 Temmuz tarihleri arasında gerçekleşmiştir. İlk ölüm 27 Temmuz'da gerçekleşir ve 2 Ağustos'ta hastalıktan ölenlerin sayısı 18'i bulur. Salgının kaynağı olarak tek bir otel gözükmektedir: The Bellevue-Stratford Hotel. Salgın sona erdiğinde toplam 182 kişi hastalığa yakalanmış ve bunlardan 29'u ölmüştür (Fraser vd., 1977). Yapılan rutin laboratuvar taraması ve kültür çalışmalarına rağmen, hiçbir etken izole edilememiş ve salgının sebebi bulunamamıştır. Basında salgından “Philly killer”, “Killer fever” ve “Legion fever” gibi isimlerle bahsedilmektedir. Birleşik Devletler Bulaşıcı Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) 1977 Ocak ayında etkenin izole edildiğini bildirir: Hastaların akciğer dokusunda bulunan, gram (-), müşkülpesent bir basil (Chandler vd., 1977; McDade vd., 1977). Salgının kaynağı ise otel havalandırma sistemi olarak tespit edilmiştir. Hastalığın ve etkeninin adları ilk salgının mağdurlarının isimleriyle anılacaktır: Lejyoner hastalığı ve *Legionella pneumophila*.

Etkeni belirlenememiş eski salgınlara ait hasta numunelerinin araştırılması sonucu, saklanmış klinik örneklerde *Legionella* spp. tespit edilmiş ve eski salgınların nedeni ortaya çıkarılmıştır (Terranova vd., 1978, Imperato, 1981). Hatta lejyoner hastalığı salgınlarının 1947'ye dek uzandığı gösterilmiştir (McDade vd., 1979). Çevresel su örneklerinin laboratuvar analizleri sonucunda ise, bakterinin doğada sucul ortamlarda yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Morris vd., 1979; Fliermans vd., 1979; Fliermans vd., 1981).

1.1. Amaç ve Kapsam

Doğada yaygın olarak bulunan *Legionella* türlerinin insanlara bulaşması sonucu hastalık oluşturmaları, şehirlerin ve su şebeke sistemlerinin giderek büyümesi neticesinde ilk olarak 20.yy'da ortaya çıkmıştır.

Lejyoner hastalığı risk grubunda yüksek ölüm oranına sahiptir. 2011 yılında Avrupa'da hastalığa yakalandığı tespit edilebilen yaklaşık 4800 kişinin %10'u ölmüştür (Anonim, 2013). Günümüzde nüfusun ve şehirlerin hızla büyüdüğü göz önüne alınırsa, *Legionella* salgınlarının artması muhtemeldir. Hastalığın en sık görülen etkeni olan *L. pneumophila*'nın su sistemlerinde çoğalarak hastalık oluşturuca düzeye gelebilmesini sağlayan fenomenlerinin araştırılması, bu bakteri üzerine etkili doğal ürünlerin tespit edilerek su sistemlerinden eliminasyonunun sağlanması gelecek açısından önem arz etmektedir.

L. pneumophila müşkülpesent bir bakteri olup, çoğalabilmek için özel bir ortama ihtiyaç duymaktadır. Doğada, özellikle de su sistemlerinde çoğalabilmesi ve hayatta kalabilmesini hücre içi parazitlik ve biyofilmler sayesinde olmaktadır.

Hastalığın seyahat ilişkili olması turizmin yoğun olduğu bölgeler için ayrı bir hassasiyet noktası oluşturmaktadır. Bu nedenle Muğla ilindeki su şebeke sistemlerinden izole edilmiş yerel *L. pneumophila* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin açığa çıkarılması ve biyofilm oluşturmalarını önlemek üzere bitkisel yağların kullanımının araştırılması bu tez çalışmasının hedefi olarak belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Legionella pneumophila*

L. pneumophila, *Legionellaceae* familyası üyesi, gram negatif, kokobasil formunda, bazı besiyerlerinde uzun filamentöz formda görülebilen, zorunlu aerob, 20-42°C arasında üreyebilen bir bakteridir (Diederer, 2008).

Fry vd. (1991) 7 *Legionella* türü ile yaptıkları 16s ribozomal DNA analizi çalışması sonucunda, *Legionellaceae* familyasının *Proteobacteria* gama 2 subdivisionuna dahil olduğunu göstermişlerdir.

Famlyya sadece *Legionella* genusundan oluşmakta ve 58 tür ile 3 alttür içermektedir (Euzeby, 1997; Ratcliff vd., 1998). En iyi bilinen tür olan *L. pneumophila*, 15 serogruba sahiptir. Ayrı bir tür olarak tanımlanamamış ve protozoa konağı olmadan kültürde üretilmeyen *Legionellae* üyeleri, *Legionella* benzeri amoebal patojenler (LLAPs) olarak adlandırılmaktadırlar (Diederer, 2008).

Legionella üyeleri doğada yaygın olarak bulunmalarına rağmen rastlantısal patojendirler ve insanlarda lejyoner hastalığına sebep olurlar.

2.2. Lejyoner Hastalığı

Lejyoner hastalığı %10–15 vaka/ölüm oranına sahip ciddi bir pnömoni formudur. Hastalık grip benzeri bir tablo ile başlayarak, devamında kuru öksürük ile zatürreye ilerler. Eğer tedavi edilmezse, semptomlar hızla kötüleşir ve solunum yetmezliği, şok, çoklu organ yetmezlikleri ve sonunda ölüm ile sonuçlanabilir (Anonim, 2007).

Hastalık için risk faktörleri yaşlılık, sigara içmek, erkek cinsiyet, kronik akciğer hastalıkları, diyabet, akciğer kanseri ve bağışıklık sisteminin baskılandığı (immunosupresif tedavi, AIDS veya hematolojik maligniteler gibi) durumlardır (Guyard ve Low, 2011).

Diğer pnömonilerden ayrımını sağlayabilecek hiçbir özgül klinik belirtisi yoktur. Laboratuvar tanısında üriner antijen testi ile hızlı sonuç alınmaktadır, fakat bu test sadece *L. pneumophila* SG1'i tespit edebilmektedir (Domínguez vd., 1996). Balgam boyamasında bol nötrofil görülmesine rağmen bakteri görülemez. Kültürde bakterinin üretilmesi tanı için altın standarttır (Den Boer ve Yzerman, 2004).

Bakterinin insanlara bulaşması kontamine aerosollerin solunum yolu ile alınması veya bakteri içeren suyun aspirasyonu yoluyla olur (Guyard ve Low, 2011). İnsandan insana bulaş görülmemektedir. Bakteri içeren aerosol oluşumunun en sık sebepleri ise soğutma sistemleri, duş başlıkları, musluklar ve su fışkıyerleridir. *L. pneumophila* aerosol damlacıkları içinde 2 saate yakın süre hayatta kalabilmektedir (Hambleton vd., 1983).

Legionella'nın insana bulaşması durumunda 3 farklı klinik tablo görülmektedir (Fields vd., 2002):

1. Pontiac ateşi: Akut, grip benzeri ateş görülür. Hafif seyirlidir.
2. Lejyoner hastalığı: Ağır seyirli bir Pnömoni formudur, ölümcül olabilir.
3. Asemptomatik: Serolojik olarak dirençli kişilerde hiçbir semptom görülmeyebilir.

Bu klinik tablolardan ilk ikisi lejyonelloz olarak adlandırılmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan vaka tanımları ve farklı lejyoner hastalığı türleri Çizelge 2.1.'de belirtilmektedir.

Hastalığın moleküler temelinde, bakterinin fagositoz yolu ile makrofaja girişi, komplementer sisteme direnci sayesinde fagozomda lizisten kaçışı, makrofajdaki olgunlaşmayı yeniden programlaması, çoğalarak konak hücrenin içinin tamamen bakteri ile dolması ve hücrenin parçalanması sonucu bakterinin yeni konaklar bulmak üzere ortama salınması süreçleri yer almaktadır (Hoffman, 1997; Steinert vd., 2002). *L. pneumophila*'nın konak hücreyi programlamasında, yaklaşık 200 farklı proteini kodlayan tip IV sekresyon sistemi (Newton vd., 2011) ve konak hücre Rab proteinlerinin adenilasyonu (Itzen ve Goody, 2011) rol oynamaktadır.

Legionella türlerinden 20 tanesi insanlarda hastalık tablosu ile ilgilidir (Muder ve Yu, 2002). Bunlar arasında ise sadece *L. pneumophila* SG1 tüm hastalık tablosunun neredeyse tamamına yakınından sorumludur (Yu vd., 2002). 2011 yılı surveyans

raporlarına göre Avrupa ülkelerinde görülen Lejyoner hastalığı vakalarının %96'sından *L.pneumophila* SG1 sorumludur (Anonim, 2013). Bu durumun tek istisnası olan Güney Avustralya'da ise *L. pneumophila* ilişkili vaka oranı %50 iken, %30'undan fazlasında *L. longbeachae* tespit edilmiştir (Yu vd., 2002). Klinik izolatlardaki *L. pneumophila* SG1 yüksekliğinin nedenleri, serotipler arası genetik ve fenotipik farklılıklar olması yanısıra (Samrakandi vd., 2002), klinik tanı yöntemlerinin *L. pneumophila* SG1 üzerine odaklanmış olmasıdır.

Ayrıca bu durum bakterinin doğadaki yayılımı ile tam olarak örtüşmemektedir. Örneğin Fransa'da çevresel izolatların %28'inin, klinik izolatların ise % 95.4'ünün *L. pneumophila* SG1 olduğu bildirilmiştir (Doleans vd., 2004).

Çizelge 2.1. Lejyoner hastalığı için kullanılan epidemiyolojik tanımlamalar (Anonim, 2007)

Doğrulanmış Vaka	Klinik ve radyolojik pnomoni belirtileri ile birlikte, solunum yolu numunelerinin kültüründe organizmanın tespiti veya serum <i>L. pneumophila</i> serogrup (sg) 1 antikor seviyesinde 4 kat yükselme veya idrarda <i>L. pneumophila</i> antijeni tespiti veya pozitif direk immunofloresan (DFA) test sonucu ile tanısı konmuş vaka.
Şüpheli Vaka	Klinik ve radyolojik pnomoni belirtileri ile birlikte, serum <i>L. pneumophila</i> serogroup (sg) 1 antikor seviyesinde tek bir yüksek sonuç veya <i>L. pneumophila</i> sg 1. harici diğer serogrup ve diğer <i>Legionella</i> türlerine karşı serokonversiyonun gösterilmesi.
Nozokomiyal Vaka	Hastalık başlangıcından önceki 10 gün boyunca hastanede yatmakta olan vakalar kesin hastane kaynaklı, Hastalık başlangıcından önceki 10 günün 1-9 gününü hastanede geçirmiş vakalar, olası hastane kaynaklı vaka olarak tanımlanır.
Seyahat İlişkili Vaka	Hastalık başlangıcından önceki 10 gün içerisinde, en az bir gece, yurt içi veya yurtdışı seyahat öyküsü olan vaka.
Seyahat İlişkili Küme	Aynı konaklama tesisinde kalma öyküsü olan, iki yıl içinde iki veya daha fazla seyahat ilişkili vaka görülmesi.
Toplum Kaynaklı Kümeler	Aynı ikamet, iş veya ziyaret mekanı ile ilişkili, iki veya daha fazla vaka görülmesi ve hastalık başlangıçlarının detaylı araştırma gerektirecek kadar yakın olması.
Salgınlar	Toplumsal küme vakaların ortak bir enfeksiyon kaynağı olduğuna dair, mikrobiyolojik tanı olsun veya olmasın, güçlü epidemiyolojik kanıtlar bulunması ve yanıt olarak şüpheli enfeksiyon kaynaklarına kontrol önlemlerinin uygulanması.
Evsel Kaynaklı Vakalar	Tüm diğer temas kaynaklarının elimine edildiği ve inkübasyon periyodu süresince sadece evsel su sistemini kullandığı bilinen ve çevresel ve klinik örneklerde <i>Legionella</i> pozitif sonucuna sahip vakalardır.

Hastalığın nüfusa oranla görülme sıklığı Avrupa’da $9.7/10^6$ (2011 yılı), Amerika’da ise $11.5/10^6$ (2009 yılı) olarak hesaplanmıştır ve özellikle Temmuz, Ağustos, Eylül aylarında artışa geçmektedir (Anonim, 2011a; Anonim, 2013). Yoğun yağış dönemlerinin de sporadik lejyoner hastalığı için risk faktörü olabileceği ortaya konulmuştur (Garcia-Vidal vd., 2013).

Lejyoner hastalığı vaka sayılarının gerçek değerlerinin çok altında olduğu, çoğu vakanın tanı koyulamadığı veya bildirilmediği düşünülmektedir. Bu durumun en muhtemel nedenleri şöyle sıralanabilir (Anonim, 2012a):

- Pnomoni hastalarının ayırt edici tanıya gerek duyulmaksızın ampirik antibiyotik tedavisi ile iyileşmeleri,
- Duyarlılığı düşük tanı metotları nedeniyle hatalı negatif sonuçlar alınması,
- En çok kullanılan tanı testi olan üriner antijenin sadece *L. pneumophila* SG1’i tespit edebilmesi nedeniyle diğer serogrup veya türlere bağlı vakaların tespit edilememesi,
- Lejyoner hastalığı ağır bir hastalık olarak bilindiğinden, hafif atlatılan vakalarda hastalığın akla gelmemesi,
- Bazı ülkelerde, özellikle seyahat ilişkili vakaların tespit edilmesine rağmen gerekli makamlara bildirilmemesidir.

Avrupa’da lejyoner hastalığı sürveyansı Avrupa Bulaşıcı Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC) tarafından yürütülmektedir. Seyahat ilişkili olduğu tespit edilen vakalarda, konaklamanın gerçekleştiği ülkeye bildirim yapılarak, ilgili turistik tesiste gerekli önlemlerin ve incelemelerin yapılması istenmektedir. Alınan önlemlere ait raporların ECDC’ye gönderilmediği küme vaka durumlarında tesisin ismi ECDC internet sitesinde afişe edilmekte ve hatta tur operatörlerine bilgilendirme yapılmaktadır (Anonim, 2012a).

2.3 *Legionella* Türlerinin Doğada Yayılımı

Legionella türleri doğada tüm sucul ekosistemlerde ve nemli ortamlarda yaygın olarak bulunurlar (Fliermans vd., 1981). Termal kaplıca suları (Alim vd., 2002;

Liguori vd., 2014) ve yeraltı suları (Costa vd., 2005) *Legionella* spp. izole edildiği bildirilmiş ilginç örnekler arasındadır.

L. pneumophila'nın sucul ortamlarda yaygın olarak bulunmasının sebepleri: farklı nişlerde hayatta kalma yeteneği (Hilbi vd., 2011); protozoaları enfekte ederek, hücre içi replikasyon yapabilmesi (Rowbotham, 1980) ve farklı mikroorganizmalar tarafından oluşturulmuş biyofilmlerde hayatta kalabilmesidir (Declerck, 2010). Bakteri doğada biyofilmler ve konak hücrelerde parazitlik haricinde, canlı fakat kültürde üremeyen (Viable but not culturable - VBNC) veya serbest planktonik formlarda da bulunabilmektedir (Mekkour vd., 2013).

Doğal su ekosistemlerinin lejyoner hastalığı için kaynak oluşturmadıkları kabul edilir, çünkü çevresel koşullar *Legionella* türlerinin hastalık oluşturacak sayıda üremesine uygun değildir (Declerck, 2010). Hastalığın epidemiyolojik kaynağı içme kullanma su sistemleridir (Ruf vd., 1988). Japonya'daki bir kaplıca, lejyoner hastalığı sebebi olarak kayıtlara girmiş istisnai doğal su örneklerinden birisidir (Mashiba vd., 1993). *L. pneumophila* çevresel izolatları ile klinik izolatlarının kültürde gelişim özellikleri bakımından önemli farklılıkları olmadığı (Orrison vd., 1981), fakat çevresel izolatların virulans özelliklerinin değişken olabildiği (Bollin vd., 1985) gösterilmiştir.

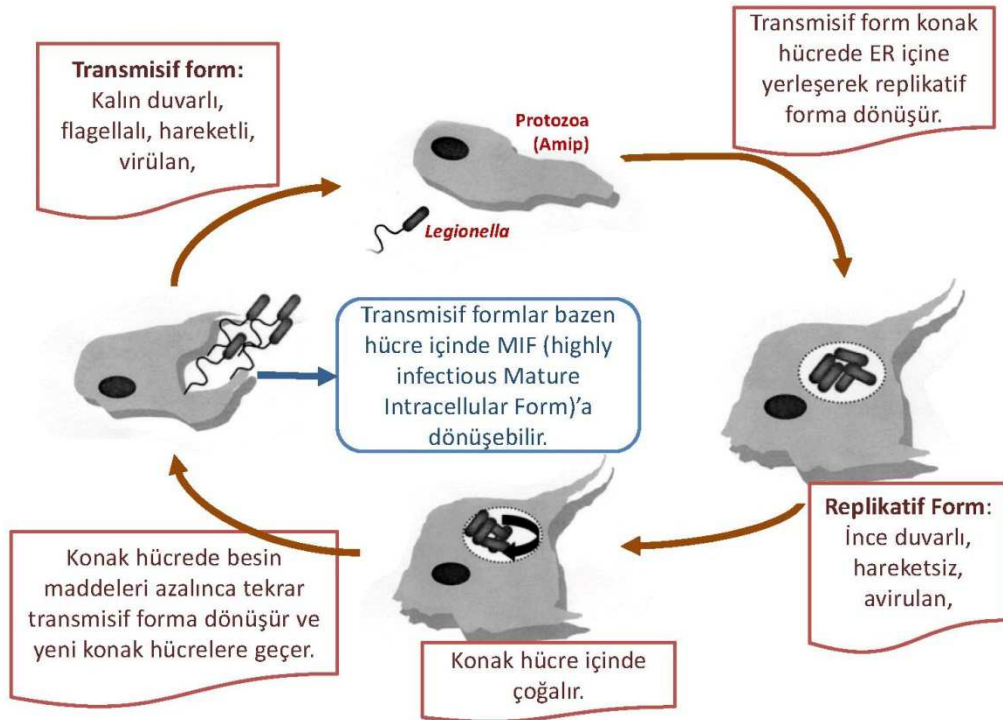
Legionella türleri ekstrem koşullarda hayatta kalabilirler. Örneğin: algler tarafından oluşturulmuş pH 2.7 asidik biyofilm ortamında *Legionella* türleri izole edilmiştir (Sheehan vd., 2005).

2.3.1. Paraziter yaşam döngüsü

Protozoalar, *Legionella* türlerine hücre içinde çoğalabilecekleri ve çevresel şartlardan korunacakları bir ortam sağladıklarından, hayat döngülerinde önemli bir role sahiptirler (Kwaik vd., 1998; Molmeret vd., 2005). Sucul ekosistemlerde protozoalar çoğunlukla biyofilmlerde bulunan bakterilerle beslenirler ki, bu durum *Legionella* türlerine hücre içine geçme ve çoğalma şansı sunmaktadır (Valster vd., 2010; Valster vd., 2011). Amiplerin çevresel stres durumunda kist oluşturmaları ve *Legionella*'nın kist içinde hayatını devam ettirebilmesi, bakterinin besin kıtlığı ve dezenfektanlar

gibi olumsuz koşullarda hayatta kalma şansını büyük ölçüde artırmaktadır (Richards vd., 2013).

Amip hücrelerindeki parazitik yaşam döngüsü, *Legionella*'nın amiplere yapısal olarak benzeyen insan makrofajlarında tutunabilmesinde de anahtar rol oynamaktadır (Harb vd., 2000). *L. pneumophila* ve konak protozoalar arasındaki ilişki, genetik materyalin adaptasyonuna ve ökaryotlardakilere benzer pek çok proteininin, prokaryot genomuna dahil olmasına neden olmuştur (Jules ve Buchrieser, 2007). Bu genlerin bazıları yatay gen transferi veya nonvertikal kalıtım, bazıları ise konvergent evrim ile kazanılmıştır (Coscolla vd., 2011). Bu durum *Legionella*'ya hem amip hücrelerinde parazitlik konusunda, hem de benzer şekilde insan fagositik hücrelerine giriş ve çoğalmada kolaylık sağlamaktadır (Gomez-Valero vd., 2009). *L. pneumophila* 25-42°C arasında üreyebilme özelliğine sahiptir, fakat motilite ve konak hücrelere tutunma özellikleri 37°C'de optimum seviyededir (Richards vd., 2013).



Şekil 2.1. *L. pneumophila*'nın konak protozoa hücrelerindeki yaşam döngüsü.

Fields vd. (2002) yararlanılarak hazırlanmıştır.

L. pneumophila hayat döngüsü boyunca birbirinden tamamen farklı iki fenotipik forma dönüşmektedir (Şekil 2.1.). Replikatif formdaki bakteriler avirulan, tuza dirençli ve flagellasız iken, transmisif formdakiler virulan, flagellalı ve hareketlidirler (Molofsky ve Swanson, 2004).

Legionella spp. tarafından konak olarak kullanıldığı tespit edilmiş protozoa türleri şunlardır (Lau ve Ashbolt, 2009; Taylor vd., 2009):

Amipler: *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis*, *A. royreba*, *Amoeba proteus*, *Balamuthia mandrillaris*, *Comandonia operculata*, *Echinamoeba exudans*, *Filamoeba nolandii*, *Hartmanella cantabrigiensis*, *H. vermiformis*, *Naegleria fowleri*, *N. gruberi*, *N. jadini*, *N. lovaniensis*, *Paratetramitus jugosis*, *Vahlkampfia jugosa*, *V. ustiana*.

Siliatlar: *Tetrahymena pyriformis*, *T. thermophila*, *T. vorax*.

Cıvık Küf: *Dictyostelium discoideum*.

Pek çok endoparazit bakteri türünün aksine, *L. pneumophila* zorunlu hücre içi parazit değildir (Taylor vd., 2009). Halbuki yakın zamanlarda keşfedilmiş 2 *Legionella* türü zorunlu hücreiçi parazitlerdir ve yapay kültür ortamında konak hücreleri olmaksızın çoğaltılamamışlardır: *Legionella drancourtii* (La Scola vd., 2004) ve *Legionella jeonii* (Park vd., 2004).

Legionella türleri konak amip hücreleri içinde çoğaldığında, planktonik formlarından farklı özellikler kazanabilmektedirler. Örneğin biosidlere duyarlılıkları azalmakta (Barker vd., 1992) veya insan hücrelerindeki patojeniteleri artmaktadır (Cirillo vd., 1999; Neumeister vd., 2000).

2.3.2 İnsan yapımı su sistemlerinde *Legionella*

Legionella türleri yapay su sistemlerinde çok yaygın olarak bulunabilirler (Borella vd., 2004; Hrubá, 2009). *L. pneumophila* şebeke sularında 25 - 37°C sıcaklıklarda, 5.5 - 9.2 pH aralığında ve 6.0 – 6.7 mg/L çözünmüş oksijen aralıklarında çoğalabilmektedir (Yee ve Wadowsky, 1982; Wadowsky vd., 1985).

Wang vd. (2012) ABD Virginia'daki iki farklı su şebeke sisteminde, numune noktalarının %69'undan fazlasında *Legionella* tespit etmişlerdir. Polonya'daki benzer bir çalışmada kentsel şebekelerde %77.5, kırsalda ise %4 oranında *Legionella* tespit edilmiştir (Stojek ve Dutkiewicz, 2011). İtalya'daki *Legionella* tespit oranları ise %47.5 (Bargellini vd., 2011) ve %60 (Borella vd., 2005) olarak bildirilmiştir. Tayvan'daki kaplıca tesislerinde ise numune noktalarının %27.8'sinde *Legionella* cinsi bakteriler izole edilmiştir (Huang vd., 2010). İtalya'daki farklı binalardaki su sistemlerinde yapılan bir araştırmada ise numunelerin genelinde %40 *Legionella* tespiti yapılmışken, hastane sıcak su sistemlerine ait oran %93.7 olarak bulunmuştur (Leoni vd., 2005).

Soğutma kulesi su tanklarında oluşan biyofilmler, *L. pneumophila* kolonizasyonuna uygun komunitelerdir (Carvalho vd., 2007). Soğutma kulesi sularının periyodik incelenmesi, genel bakteriyel yapıda önemli bir farklılık olmamasına rağmen, *Legionella* popülasyonunun değişiklikler gösterdiği, özellikle temmuz ayında *L. pneumophila* sayısında kayda değer bir artış olduğunu ortaya koymuştur (Wery vd., 2008).

Ülkemizdeki su sistemlerinde *Legionella* varlığının araştırılmasına yönelik araştırmalarda ise, soğutma kulelerinde %26 (Türetgen vd., 2005), kaplıca sularında %11.5 (Alim vd., 2002), evsel su depolarında %6.6 (Akkaya ve Özbal, 2011), evsel sıcak su sistemlerinde %21 (Burak ve Zeybek, 2011) oranlarında, ayrıca dış ünitesi sularında (Türetgen vd., 2009) ve üniversite hastanesi su sistemlerinde (İğnak ve Gürler, 2012) *Legionella* spp. tespit edildiği bildirilmiştir. Zeybek vd., (2009) ise İstanbul'dan izole edilmiş *L. pneumophila* suşlarının RAPD metodu ile DNA profillerini çıkartmışlardır.

Lejyoner hastalığının seyahat veya hastane ilişkili olması, özellikle turistik tesisler ve hastanelerin su sistemlerindeki kontaminasyonun araştırılmasını daha ön plana çıkarmaktadır. Bina yaşı, tesisin sezonluk çalışması, oda sayısının fazlalığı, su ısıtma sisteminin yapısı, su deposu bulunması, bağımsız dezenfeksiyon sisteminin bulunmaması, su şebekesindeki total koloni sayımının limitlerin üstünde olması gibi değişkenler konaklama tesislerindeki *Legionella* kontaminasyonu ile yakın ilişkili görünmektedir (Mouchtouri vd., 2007). *Legionella* kolonizasyonunu destekleyen

faktörler ise su sıcaklığı, sıcak su tankının yapısı ve yaşı, suyun fiziko-kimyasal bileşenleri, tesisat malzemesi ve kommensal floradır (Lin vd., 1998).

Wullings vd. (2011) tarafından yeraltı suyuna bağlı şebeke sistemlerinden alınan su ve biyofilm örneklerinde 10^4 hücre/L'ye varan oranlarda *Legionella spp.* tespit edilmiştir. Fakat şebekenin bağlı olduğu yeraltı suyunun direkt analizi sonucu *Legionella* içermediği gösterilmiştir. Bu durum *Legionella* kontaminasyonunun sadece suyun menşinden değil, şebeke sistemi içindeki faktörlerden de kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır.

L. pneumophila çok kısıtlı çevre koşullarında bile serbest organizma olarak uzun süre metabolik aktivitelerini sürdürme ve hayatta kalabilme potansiyeline sahiptir (Ohno vd., 2003). Biyofilm, konak hücreler, sıcaklık, besin miktarı gibi pek çok çevresel faktör bu potansiyele etkilidir (Guerrieri vd., 2005).

2.3.2.1 Su örneklerinde *Legionella* tespiti ve izolasyonu

Çevresel su örneklerinde *Legionella* türlerinin tespit edilmesi ve izolasyonu, bakterinin büyüme gereksinimleri, kültürde üremeyen VBNC formuna dönüşebilmesi, protozoa ile ilişki içinde oluşu ve biyofilmlerde bulunması nedeni ile zor ve uzun bir süreçtir (Atlas, 1999). Gelişen teknolojiyle birlikte PCR, DFA gibi pek çok metot ortaya çıksa da, altın standart “kültür” yöntemidir (Diederer, 2008).

L. pneumophila müşkülpesent karakterde bir bakteridir ve standart besiyeri ortamlarında üreyemez. L-sistein, demir, glisin ve tampon madde ilavesi içeren Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) besiyeri *Legionella* kültürü için yaygın olarak kullanılmaktadır (Feeley vd., 1979; Ristroph vd., 1980, Edelstein ve Edelstein, 2010). Bu besiyerine çeşitli antibiyotiklerin ilavesi ile selektif besiyerleri elde edilmektedir, örneğin MWY ve GVPC (Bopp vd., 1981; Edelstein, 1981, Wadowsky ve Yee, 1981). Antibiyotik içeren seçici besiyerleri *Legionella* harici bakterilerin yoğun olduğu örneklerde kontaminasyonu önleyerek sayımı kolaylaştırır, fakat BCYE besiyeri daha yüksek koloni sayısı ve üreme oranı sağlamaktadır (Ditommaso vd., 2011).

Uluslararası Standartlar Enstitüsü, su numunelerinden kültür metodu ile *Legionella* izolasyonu ve sayımını standartize etmiştir (Anonim, 1998). İngiltere Çevre

Bakanlığı da sulardan numune alma ve *Legionella* tespit metotlarını düzenleyen bir rehber yayımlamıştır (Anonim 2005). Ülkemizde çalışmalar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü tarafından hazırlanan analiz prosedürü kapsamında, Halk Sağlığı Laboratuvarlarında yürütülmektedir.

ISO standart metodunun, özellikle sıcaklık uygulaması ve seçici besiyerine ekimin (Leoni ve Legnani, 2001; Bartie vd., 2003) veya asitte bekletme sonrası BCYE besiyerine ekimin (Ta vd., 1995) diğer kültür metotlarına oranla daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Ne var ki ISO standart kültür metoduna göre *Legionella* olarak tanımlanan bakterilerin, serolojik veya genetik testlerle doğrulanmaması durumunda hatalı sonuçlar alınabilmektedir (Borges vd., 2012). Ayrıca VBNC formunun kültürde ürememesi ve kültür yöntemlerinin genellikle *L. pneumophila*'ya optimize olması, sudaki *Legionella* konsantrasyonunun %10-60 arası eksik tespitine neden olabilmektedir (Buse vd., 2012).

PCR gibi genetik materyalin tanımlanmasına yönelik yöntemler daha yüksek spesifiteye sahiptirler (Merault vd., 2011). Ancak dezenfeksiyon sonrası sistemde bulunan ölü bakterilere ait DNA'nın da pozitif olarak yorumlanabilmesi bu yöntemlerin duyarlılığını düşürmektedir. Epifluoresans mikroskopiye dayalı geliştirilmiş bir yöntem ile kültür metoduna göre çok daha hızlı sonuç almak, ve canlı-ölü hücreleri ayırabilmek mümkün olmuştur (Delgado-Viscogliosi vd., 2005). Fakat bu tarz metotlar rutin analizler için pahalı ve karmaşıktır.

2.3.2.2 Su sistemlerinden *Legionella* dezenfeksiyonu

Lejyoner hastalığının insandan insana bulaştığı yönünde hiçbir kanıt yoktur. Bu nedenle tek epidemiyolojik kaynak olan insan yapımı su sistemlerindeki bakteri popülasyonunun takip ve elimine edilebilmesi, hastalık insidansını kontrol altına almak açısından hayati önem taşımaktadır (Hilbi vd., 2010).

Farhat vd. (2010, 2011, 2012) pilot sıcak su sisteminde yaptıkları çalışmalar ile önemli sonuçlar elde etmişler: Sıcaklık ile dezenfeksiyon (70°C sıcaklıkta 30 dk) ve biodispersant & biosit kombinasyonu ile yapılan kimyasal dezenfeksiyonlardan sonra alınan biyofilm numunelerinin analizleri, *Legionella* türleri ve konak ökaryotların tamamen yok edilemediğini göstermiştir. Kimyasal dezenfeksiyondan sonra 3 gün

boyunca biyofilm örneklerinde *Legionella* tespit edilemezken, 7. günde dezenfeksiyondan önceki konsantrasyona dönüş gözlenmiştir. Öte yandan *Legionella* hücrelerinin klorla dezenfeksiyon sonrası VBNC formuna dönüşerek, 4 ay boyunca hayatta kalabildikleri de bildirilmiştir (Alleron vd., 2008).

Benzer şekilde, ısı işlem ile dezenfekte edilmiş durgun şebeke suyunda, *L. pneumophila* eskisinden daha hızlı çoğalabilmektedir (Vervaeren vd., 2006). *L. pneumophila* konak amip hücreleri içinde çoğaldığında, biosidlere direnci planktonik formuna göre artmaktadır (Barker vd., 1992). *Legionella* türlerinin konaklarından birisi ve sularda serbest olarak bulunan bir amip olan *Acanthamoebae* kistleri, 10 dakikalık 100 mg/L serbest klor veya 80°C sıcaklık gibi hiper dezenfeksiyon uygulamalarında bile canlı kalabilmektedir (Storey vd., 2004b).

Yao vd. (2011) hava filtrelerinde kullanılan titanyum dioksit kaplı kordiyerit köpük maddesinin, *L. pneumophila* üzerine bakteri öldürücü özellikleri olduğunu ortaya koymuşlardır. Bakır ve gümüş iyonları (Kusnetsov vd. 2001; Lin vd. 2002; Shih ve Lin 2010), klor ve 2,2dibromo3nitropropionamid (Skaliy vd., 1980), klor (Bodet vd., 2012), ve elektrokimyasal dezenfeksiyon (Delaedt vd., 2008) *Legionella*'nın su sistemlerinden dezenfeksiyonu araştırmalarına örnek olarak verilebilir.

Hastane su sistemlerinden *Legionella* dezenfeksiyonu çok önem arz eden ve üzerinde durulan bir problemdir (Zhang vd., 2009; Lin vd., 2011). Bu sorunun çözümü için uzun yıllar boyu yapılan gözlemler sonucunda klor dioksit ve elektrikli boylerin beraber kullanımı önerilmektedir (Marchesi vd., 2011). Kim vd. (2002) yaptıkları literatür derlemesi ile su sistemlerinden *Legionella* dezenfeksiyonu konusunu ele almışlar ve okside edici ajanların (en başta klor), diğerlerinden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

ECDC ve EWGLI (Avrupa Lejyoner hastalığı çalışma grubu) tarafından özellikle turistik tesisler için *Legionella* ile mücadelede yol gösterici ve bilgilendirici bir teknik doküman yayımlanmıştır (Anonim, 2011b).

2.3.3 *L. pneumophila* diğer bakteri türleri ile etkileşimleri

Legionella türleri doğada çoğalma, tutunma ve hayatta kalma süreçlerinde, protozoalar ile olduğu kadar diğer bakteriyel türler ile de etkileşim içindedirler

(Wadowsky ve Yee, 1985). Fotosentetik siyanobakteriler, hetetrofik bakteriler, amipler ve siliatlar *L. pneumophila*'nın çoğalmasını destekleyen mikroorganizmalara örnek olarak verilebilir (Wadowsky vd., 1988).

L. pneumophila'nın in vitro gelişimi için gerekli şartların bulunmadığı besiyerinde *Flavobacterium brieve* ile etkileşim içinde gelişebildiği gösterilmiştir (Wadowsky ve Yee, 1983). Bu durum diğer bakteri atıkları üzerinde gelişebildiğine işaret etmektedir. Temmerman vd. (2006) *L. pneumophila* hücrelerinin steril su ortamında ısıtıl işlemle öldürülmüş bakteri hücrelerini kullanarak nekrotrofik büyüme gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Gram-negatif bakterilerin çoğalması sonucu oluşan yan ürünlerin, bakteri hücreleri ortamdan filtrasyon ile uzaklaştırılsa bile, *L. pneumophila* büyümesini destekleyebileceği ortaya konulmuştur (El Zanfaly vd., 2011).

L. pneumophila benzer şekilde siyanobakteriler ile etkileşerek gelişim yeteneğine de sahiptir (Tison vd., 1980; Bohach ve Snyder, 1983). Bu durum ışığa maruz kalan su sistemlerinin algilere ve dolayısıyla *Legionella* kolonizasyonuna açık olacağı anlamına gelmektedir. Ayrıca *Fischerella* sp., *L. pneumophila*'nın aerosoller içindeki dayanıklılığı üzerinde de pozitif etkiye sahiptir (Berendt, 1981).

Anti-*legionella* aktiviteye sahip olduğu bildirilen ilk bakterilerden birisi *Staphylococcus warneri*'dir (Hécharde vd., 2005). Yapılan çalışmada, bu bakteri türünün sadece *Legionella* türleri üzerine etkili olduğu belirlenen, bakteriosin benzeri bir peptid salgıladığı tespit edilmiştir. İleri çalışmalar, *S. warneri*'nin salgıladığı anti-*legionella* peptid sayısının daha fazla olduğunu (Verdon vd., 2008) ve 12 farklı *Staphylococcus* türünün daha benzer etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Marchand vd., 2011).

Guerrieri vd., (2008) bakteriosin benzeri maddelerin (BLSs) üretimi yönünden inceledikleri, 11 farklı akuatik bakteri türüne ait 80 suştan, 53 tanesinin *Legionella* türleri üzerinde antagonistik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada *L. pneumophila* ise, diğer bakteri türleri üzerine antagonistik etki göstermemiştir.

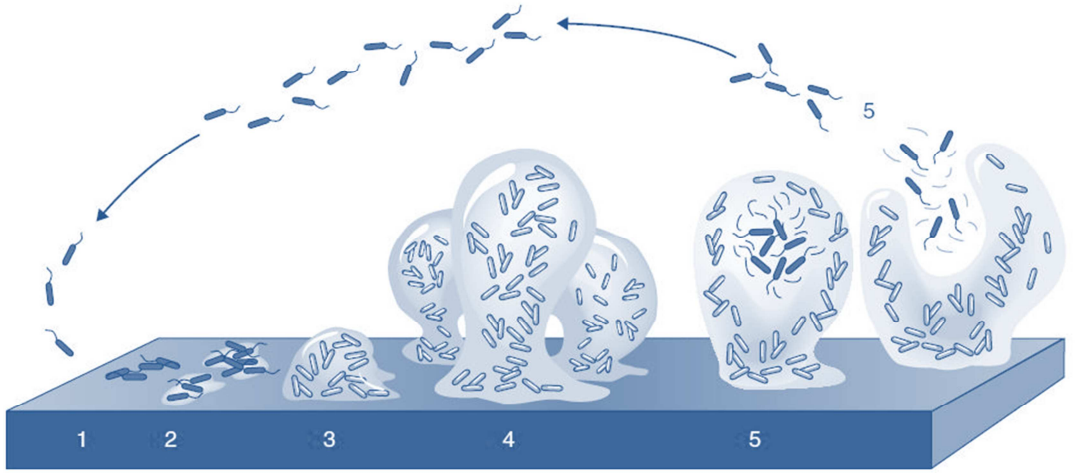
Sucul ortamlarda bulunabilen bakteriler olan *Acidovorax* sp. ve *Sphingomonas* sp., *L. pneumophila*'nın VBNC forma dönüşmesine neden olurken, *Mycobacterium chelonae* tam tersi etki göstermektedir (Giao vd., 2011).

Su sistemlerinde *Legionella* türleri ile birlikte bulunma sıklığı yönünden pozitif bir korelasyon tespit edilmiş bakteriler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.* ve *Xanthomonas spp.* gibi Enterobacteriaceae harici Gram-negatif türlerdir (Stojek ve Dutkiewicz, 2011). Bunun yanısıra *Legionella* gelişimini inhibe ettiği bildirilmiş bakteriler arasında *P. aeruginosa* (Kimura vd., 2009) ve *Aeromonas spp.* (Al-Sulami vd., 2013) bulunmaktadır. Çotuk vd. (2005) yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri* ve *Aeromonas spp.* suşlarının, *L. pneumophila* gelişimi üzerine inhibitör etki gösterirken, *Pseudomonas alcaligenes* ve *P. fluorescens*'in stimüle ettiğini bildirmişlerdir.

2.4 Biyofilm

Biyofilm, basit olarak, bir yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar topluluğu olarak tanımlanabilir (O'toole vd., 2000). Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar kendi ürettikleri hücre dışı polimerik (EPS) bir matriks içindedirler. Bu sayede çevresel etmenlere daha dayanıklı hale gelebilirler (Hall-Stoodley ve Stoodley, 2005). Biyofilmler tek bir türe ait bir populasyon şeklinde olabileceği gibi, farklı mikrobiyal türlerden meydana gelmiş komüniteler şeklinde de olabilir (Davey ve O'toole, 2000).

Biyofilm oluşumu birkaç basamakta gerçekleşmektedir (Şekil 2.2.): 1- tutunma, 2- geri dönüşsüz tutunma, 3- mikrokolonizasyon ve ilk olgunlaşma, 4- kompleks biyofilm yapısı ve 5- yayılma (Sauer, 2003). Biyofilm oluşumu esnasında hücrelerarası iletişim ve planktonik hücrelerinkinden farklı bir gen transkripsiyon profili gereklidir (Watnick ve Kolter, 2000). İlk basamak olan tutunma, tutunulacak yüzey, büyüme ortamı ve hücre yüzeyinin etkisi altında gerçekleşen bir süreçtir (Donlan, 2002). Tutunan hücreler bölünmeye başlayarak önce mikrokoloniler oluştururlar ve ardından EPS matriks salgılayarak biyofilm oluşumu tamamlanır (Donlan, 2001b). Olgun biyofilm yapısı mikroorganizmaya ve çevresel faktörlere bağlı olarak şekillenmektedir. Olgun biyofilm, homojen hücre tabakalarından oluşan ince bir yapı olabileceği gibi, besinlerin girişi ve atıkların çıkışını sağlayan kanallar ve destek sütunları içeren kompleks bir yapı da olabilir (Stanley ve Lazarra, 2004).



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları (Stoodley vd., 2002)

Biyofilm oluşumunu etkileyen başlıca faktörler şu şekilde sıralanmaktadır (Kim vd., 2012):

- Yüzeysel özellikler: Yüzey düzgünlüğü, polaritesi, yüzeysel katyonlar, porozite, nanostructure, vs.
- Hidrodinamik koşullar: Bekleme süresi, yüzey gerilimi, vs.
- Quorum sensing sinyalleri
- Sucul ortamın karakteristikleri: Besin kaynağı, besin kıtlığı, oksijen ve karbondioksit konsantrasyonları vs.

Su şebeke borularında oluşan biyofilm, pek çok patojen mikroorganizmanın tutunarak uzun süre hayatta kalabilmesini sağlamakta ve hatta kültür metodu ile bu mikroorganizmaların tespit edilebilmesini engellemektedirler (Wingender ve Flemming, 2011). Su şebeke sistemleri dışında, besin endüstrisi, atık su arıtımı, kağıt üretimi gibi endüstriyel alanlarda da biyofilm, çözümü zor problemlere neden olabilmektedirler (Bott, 2011). Biyoremediasyon, biyokorozyon kontrolü, biyolojik yakıt ve kimyasalların üretimi, ilaç denemeleri gibi uygulamalar ise endüstriyel olarak biyofilm, yararlanılan alanlara örnek olarak verilebilir (Wood vd., 2011).

Biyofilm, direkt insan sağlığı üzerine de etkili olabilirler. Kistik fibrozis, doğal kapak endokarditi, otitis media, periodontit ve kronik prostat iltihabı gibi hastalıklar patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturan biyofilm, ilişkilidirler (Donlan, 2002). Kateterler, protezler ve tıbbi cihazlara bağlı enfeksiyonların sebebi de, bu tür

vücut içi cihazlarda oluşan biyofilmlerdir (Donlan, 2001a). Ayrıca biyofilm yapısındaki patojenler, antibiyotiklere ve vücudun doğal savunma mekanizmalarına karşı daha dirençlidirler ve bu nedenle biyofilm ilişkili hastalıklarda tedavi daha zor ve uzun sürmektedir (Olson vd., 2002; Hall-Stoodley vd., 2004). Revdiwala vd. (2012) bir yoğun bakım ünitesindeki cihazlardan izole edilmiş bakteriyel patojen suşların % 88'inin biyofilm oluşturabildiğini ve %85'inin çoklu ilaç direncine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Biyofilm oluşumunun önlenmesi veya oluşmuş biyofilmlerin giderimi son yıllarda önem kazanan bir konudur. Antimikrobiyal ajanlar, bitkisel yağlar, biyofilm yapısını bozan enzimler, şelatlayıcı ajanlar, biosüpfaktanlar, tuzlar ve laktik asit, asetil sistein, ibuprofen gibi farklı amaçlı kimyasallar antibiyofilm etkileri bakımından denenmiş maddelerdir (Ceyhan, 2008; Taraszkievicz vd., 2013). Bakterilerin hücre dışına salgıladıkları polisakkaritler hücreler arası ve hücre-yüzey etkileşimlerinde rol alarak biyofilm oluşumuna yardımcı oldukları gibi (Vu vd., 2009), bazı bakteriyel polisakkaritler tersine antibiyofilm etkinlik göstermektedirler (Rendueles vd., 2013). Endüstriyel ölçekte ise elektriksel alanlar, katalize modifiye yüzeyler, ultrason, enzimler, amonyak ve formaldehit, deterjan maddeleri ve yüksek basınçlı temizleme sistemleri gibi yöntemlerle biyofilmlerin engellenmesine çalışılmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009).

Su dağıtım sistemlerinde biyofilmlerin engellenmesi amacıyla anti-mikrobiyal ajanların kullanımı kısıtlıdır, çünkü hem biyofilm içindeki hücrelerin bu ajanlara direnci artmış durumdadır, hem şebeke sistemlerine bu tarz kimyasalların rahatlıkla uygulanması mümkün değildir. Bitkisel doğal ürünlerle biyofilm oluşumunun önlenmesine yönelik çalışmalar bu nedenlerle artış göstermektedir (Çizelge 2.2.). Çalışmaların özellikle halk arasında tıbbi kullanımı olan bitkilerin esansiyel yağları üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Esansiyel yağlar, aromatik veya tıbbi bitkilerin sekonder metabolizmaları sonucu oluşan uçucu moleküllerin kompleks karışımlarıdır ve farklı bitki kısımlarının distilasyonu ile elde edilebilirler (Faleiro, 2011). Esansiyel yağlar geçmiş çağlardan beri halk arasında tıbbi veya kozmetik amaçlarla kullanılmaktadırlar ve sitotoksik, genotoksik, antimutajenik ve karsinojenik gibi pek çok biyolojik özellikleri olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (Bakkali vd., 2008).

Çizelge 2.2. Bitkisel ürünlerin antibiyofilm aktivitelerinin tespiti çalışmalarına örnekler

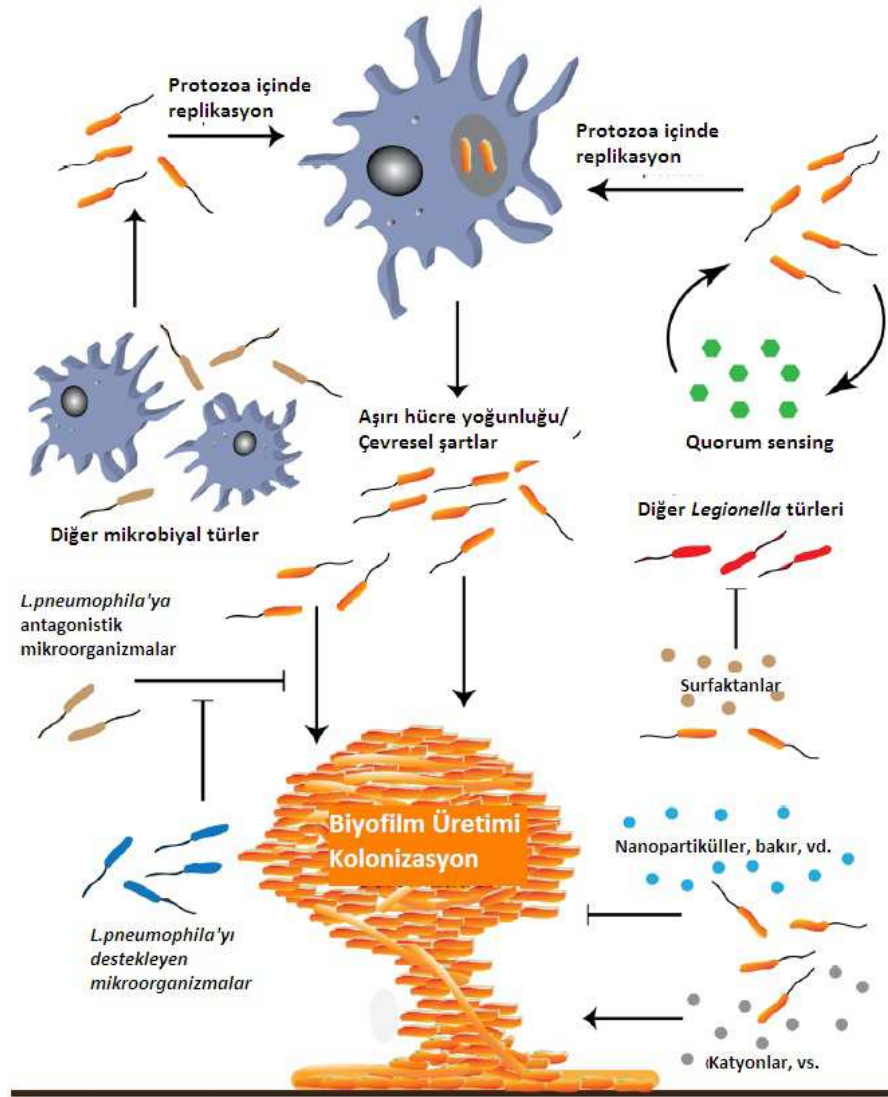
Antibiyofilm etkisi deneneni bitki veya bitkisel ürün	Mikroorganizmalar	Referans
<i>Capparis spinosa</i>	<i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> ve <i>P.mirabilis</i>	Abraham vd., 2011
<i>Salvia</i> türleri	MRSA	Al-Bakri vd., 2010
<i>Couroupita guianensis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Al-Dhabi vd., 2012
<i>Lonicera tatarica</i> ve <i>Viburnum opulus</i>	<i>Staphylococcus</i> suşları	Bubulica vd., 2012
<i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> <i>Melissa officinalis</i>	<i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i>	Budzynska vd., 2011
<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>viride</i>	<i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> <i>P.aeruginosa</i> , <i>P.fluorescens</i> , <i>C.albicans</i>	Ceylan vd., 2014a
<i>Epimedium brevicornum</i> , <i>Malus pumila</i> , <i>Polygonum cuspidatum</i> , <i>Rhodiola crenulata</i> , <i>Dolichos lablab</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	Coenye vd., 2012
Dentol (<i>Satureja khuzestanica</i>)	<i>P.aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Hosainzadegan ve Delfan (2007)
Okaliptus yağı, Çay ağacı yağı ve thymol	<i>S.epidermidis</i>	Karpanen vd., 2008
<i>Cinnamomum aromaticum</i> <i>Myroxylon balsamum</i> <i>Thymus vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>S.aureus</i>	Kavanaugh ve Ribbeck, 2012
Eugenol ve cinnemaldehid	<i>C.albicans</i>	Khan ve Ahmad, 2012
<i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Mentha spicata</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Leonard vd., 2010
<i>Boesenbergia pandurata</i> , <i>Eleutherine americana</i> , <i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Limsuwan ve Voravuthikunchai, 2008
Curcumin, (<i>Curcuma longa</i>)	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Moshe vd., 2011
<i>Andrographis paniculata</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Murugan vd., 2011
<i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Cymbopogon nardus</i>	<i>E. coli</i>	Niu ve Gilbert, 2004
Oregano, carvacrol ve thymol (<i>Origanum vulgare</i>)	<i>S. aureus</i> , <i>S.epidermidis</i>	Nostro vd., 2007 ve 2009

Çizelge 2.2. (devam)

Antibiyofilm etkisi denenene bitki veya bitkisel ürün	Mikroorganizmalar	Referans
<i>Lonicera alpigena</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Ballota nigra</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Leopoldia comosa</i> , <i>Malva sylvestris</i> , <i>Cyclamen hederifolium</i> , <i>Rosa canina</i> , <i>Rubus ulmifolius</i>	MRSA	Quave vd., 2008
<i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Mentha piperita</i> <i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Sandasi vd., 2009
<i>Mentha piperita</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>	Sandasi vd., 2011
<i>Zingiber officinale</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Yahya vd., 2013

2.5 *L. pneumophila* ve Biyofilm Çalışmaları

Biyofilmler mikroorganizmalar için, ekstrem çevre şartlarından korunacakları ve besin maddelerine nispeten kolay erişebilecekleri bir ortam sağlar. Sulak ekosistemlerde yaygın olarak bulunan *L. pneumophila*, özellikle su şebeke sistemlerinde çeşitli yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabilen ve biyofilm içerisinde gelişebilen bir bakteridir (Wright vd, 1989).



Şekil 2.3. *L. pneumophila*'nın biyofilm oluşumunu ve kolonizasyonunu etkileyen faktörler ve çevre koşulları (Abdel-Nour vd., 2013).

Biyofilm oluşumu, kolonizasyon ve protozalarda replikasyonu etkileyen çevresel şartlar Şekil 3.3.'te özetlenmiştir. Şekilde *L.pneumophila* hücreleri turuncu renklerle gösterilmiştir. Ortamda protozoa hücrelerinin ve diğer mikroorganizmaların bulunması, Quorum sensing gibi faktörler hücre içi replikasyonu desteklerken, aşırı popülasyon ve olumsuz çevre şartları biyofilm oluşumu ve kolonizasyonunu indüklemektedir.

Nanopartiküller, bakır ve bazı bakteri türleri, örneğin *P. aeruginosa*, *L. pneumophila* kolonizasyonu üzerine olumsuz etkili iken, *Klebsiella pneumoniae* gibi bakteri türleri ve katyonlar *L. pneumophila* biyofilm kolonizasyonunu artırıcı etki göstermektedirler (Abdel-Nour vd., 2013). Nanopartiküllere maruz bırakılan

L. pneumophila biyofilmlerinin morfolojik olarak bozulmaya uğradığı Stojak vd. (2011) tarafından gösterilmiştir.

Biyofilm oluşturan *L. pneumophila* suşlarının bazı metabolik ve morfolojik değişimler geçirdiği (örn. patojenitelerinin arttığı) bilinmektedir. Biyofilmden izole edilmiş *L. pneumophila* hücrelerinin, kemirgen makrofajlarında planktonik olanlara nazaran daha fazla çoğaldığı gösterilmiştir (Khweek vd., 2013). Aynı çalışmada planktonik bakterilerin %72'sinin makrofajlarda lizozomların içinde hızlıca parçalandığı, ancak biyofilm kökenlilerin yarıya yakınının lizozomlarda parçalanmaktan kaçtıkları ortaya konulmuştur.

Chaabna vd. (2013) ise sıcak kaynak suyundaki biyofilmlerden izole ettikleri *L.pneumophila* suşlarının *A.castellanii*'ye karşı daha yüksek sitotoksiste ve virulans gösterdiklerini bulgulamışlardır.

2.5.1. *L. pneumophila* biyofilm oluşumunu etkileyen faktörler

L. pneumophila'nın in vitro kültür ortamında gelişebilmesi için hücre içi koşulları taklit eden spesifik besiyeri ortamına ihtiyacı vardır. Bu nedenle besin içeriği düşük doğal su sistemlerinde tek başına biyofilm oluşturmak yerine, halihazırdaki biyofilmlerin yapısına katıldığı kabul edilmektedir (Declerck, 2010).

Yapılan çalışmalar *L. pneumophila*'nın düşük besin içerikli ortamlarda, farklı mikroorganizma türlerine ait tek bir türden oluşan (Stewart vd., 2012) veya farklı türler içeren (Vervaeren vd., 2006; Declerck vd., 2009) biyofilmlere çok kısa sürede kolonize olabildiğini göstermiştir. Model şebeke suyu sisteminde *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Flavobacterium sp.* ve *Hartmannella vermiformis* tarafından oluşturulmuş biyofilmlerdeki *L. pneumophila* konsantrasyonunun, ortama inokülasyonu yapıldıktan 2 gün sonra 10^3 cfu/yüzey seviyesine çıktığı bildirilmiştir (Murga vd., 2001).

2.5.1.1. Tutunma yüzeyi ve sıcaklık

Şebeke su sistemlerinde *L. pneumophila*'nın biyofilm oluşturmak üzere tutunmasındaki en önemli faktörlerden birisi yüzey materyalidir (Rogers vd., 1994b).

L. pneumophila'nın statik kültür ortamında, 42°C'ye kadar olan sıcaklıklarda, cam, PP ve PS yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir (Piao vd., 2006).

L. pneumophila su tesisatlarında kullanılan pek çok plastik tipi üzerinde tutunarak kolonizasyon yapabilmekte, ancak bakır üzerinde tutunamamaktadır (Rogers vd., 1994a). Ayrıca paslanmaz çelik ve PEX yüzeyler ile kıyaslandığında, bakır yüzeylerin *Legionella* biyofilm oluşumu ve çoğalmasını sınırladığı görülmektedir (Kooij vd., 2005, Tai vd., 2012). Buna rağmen, su sistemlerinde sık kullanılan PVC ve bakır yüzeylerin karşılaştırıldığı bir çalışmanın sonuçlarına göre, *L. pneumophila*'nın bakır yüzeyde daha uzun süre hayatta kalabildiği gösterilmiştir (Buse vd., 2014).

2.5.1.2. Adhesinler

Bakteri hücreleri adhesin adı verilen ve hücrenin çeşitli yüzeylere tutunabilmesinde rol oynayan maddeler salgırlarlar. Adhesinlerin, konak hücre yapılarına tutunma esnasında rolleri olduğu gibi, biyofilm oluşumunda da rol oynarlar (Dunne Jr., 2002; Kline vd., 2009).

Lcl (*Legionella* collagen-like) proteini konak hücrelere tutunma ve invazyonda rol almaktadır ve yapısındaki tekrarlayan birimlerin sayısı tutunma özelliklerini etkilemektedir (Vandersmissen vd., 2010). Duncan vd. (2011) Lcl'nin akciğer epitel hücreleri yanısıra, biyofilm matriksindeki GAG yapısına bağlanmada da rol oynadığını ve Lcl üretemeyen mutant suşun biyofilm oluşumunun azaldığını ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada *L. pneumophila* dışındaki *Legionella* türlerinde Lcl tespit edilemediği bildirilmiştir. Piao vd. (2006) 38 farklı *Legionella* türü ile yaptıkları biyofilm çalışmasında *L. pneumophila*'nın, diğer türlere kıyasla dikkate değer ölçüde fazla biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu Lcl hakkındaki bilgiler ile uyumlu görünmektedir. Lcl'nin biyofilm oluşumundaki rolü, ilk yüzeye tutunma evresi ile hücreler arası ve hücre-matriks arası etkileşimlerde yer almaktadır (Mallegol vd., 2012).

Tip IV pilusların, *L. pneumophila*'nın akciğer dokusunda kolonizasyonu ve protozoa hücrelerine invazyonunda yardımcı rol oynadığı (Stone ve Kwaik, 1998), ancak

ortamda konak hücreler bulunuyorsa biyofilm oluşumu için şart olmadığı gösterilmiştir (Lucas vd., 2004).

2.5.1.3. Quorum sensing

Quorum sensing (QS), mikrobiyal hücre topluluklarının, çok hücreli bir birim gibi davranabilmesini sağlayan, hücreden hücreye moleküler düzeydeki iletişim türüdür (Whitehead vd., 2001). Gram (-) negatif bakteriler Autoinducer (AI), yani hücreler arası iletişim molekülü olarak genellikle açıl homoserine laktonları (AHL) kullanırlar (Miller ve Bassler, 2001).

Birden fazla tür içeren biyofilmlerin yapısına farklı türlerin tutunabilmesini sağlayan faktörlerden birisinin de, AI-2 (Auto Inducer 2) tipi türler arası hücre sinyalleri olduğu belirtilmiştir (Rickard vd., 2006). Ne var ki *L. pneumophila*, AI-2 de dahil olmak üzere, *N*-açıl homoserine lakton tabanlı bir quorum sensing sistemine sahip değildir. Spirig vd. (2008) *L. pneumophila* hücrelerinin, α -hidroksiketon (AHK) sinyal molekülleri içeren farklı bir haberleşme yöntemi kullandığını açığa çıkarmış ve *Legionella* Auto Inducer-1 (LAI-1) olarak adlandırmışlardır. LAI-1 üretiminden sorumlu gen bölgesi (*lqs*), *Vibrio cholerae* *cqsAS* geni ile homolog yapıdadır (Tiaden vd., 2007) ve her iki bakteri de AHK sinyal molekülleri üretirler (Tiaden vd., 2010). *Lqs* gen bölgesi çıkarılmış mutant *L. pneumophila* hücrelerinin özellikle virulansla ilgili özelliklerini kaybettiği Tiaden vd. (2008) tarafından gösterilmiştir. Daha sonraki araştırmalar *lqs* gen bölgesinin kodladığı başlıca genlerin, bir LAI-1 autoinducer sentaz, iki adet sensör kinaz *LqsS* ve *LqsT*, regülatör *LqsR*'den oluştuğunu ortaya koymuştur (Kessler vd., 2013).

L. pneumophila bifazik hayat döngüsü boyunca çeşitli prosesleri koordine etmek için AHK sinyallerini kullanmaktadır: patojen-konak etkileşimleri, virulans faktörlerinin üretimi, biyofilm oluşumu, filament gelişimi ve genomik düzenlemeler (Tiaden ve Hilbi, 2012).

2.5.1.4. Biyofilm yapısındaki diğer mikroorganizmalarla etkileşim

Doğal ortamlarda bulunan biyofilmler genellikle farklı bakteri türlerini birarada içerirler (Rendueles ve Ghigo, 2012). Biyofilm içinde ve biyofilme yeni

mikroorganizmaların tutunması esnasında tür içi ve türler arası etkileşimler olduğu bilinmektedir. Özellikle *L. pneumophila* çevresel ortamlarda tek başına biyofilm oluşturmak yerine hazır biyofilm yapısına katılmayı tercih eden bir türdür.

L. pneumophila tarafından salgılanan TolC surfaktan proteini diğer *Legionella* türleri üzerinde antagonistik etkiye sahipken, farklı türler üzerinde bir etki göstermediği Stewart vd. (2011) tarafından ortaya konulmuştur.

P. aeruginosa tarafından salgılanan quorum sensing molekülleri *Legionella* türleri üzerinde büyümeyi ve biyofilm oluşumunu baskılayıcı etki göstermektedir (Kimura vd., 2009). Ne var ki kompleks biyofilm yapısında (Declerck vd., 2007) ve konak amip hücrelerinin ortamda bulunduğu durumlarda (Declerck vd., 2005) *P. aeruginosa* ve *L. pneumophila* biyofilm yapısında beraber bulunabilmektedirler.

Pseudomonas fluorescens, *Klebsiella pneumoniae* ve *Flavobacterium sp.* tarafından oluşturulmuş biyofilmlerde *L. pneumophila*'nın tutunarak hayatta kalabildiği gösterilmiştir (Stewart vd., 2012).

2.5.1.5. Su akış hızı

Yapay su sistemlerinde *L. pneumophila*'nın kolonizasyonunu kolaylaştıran etkenlerden birisi de sistemdeki durgunluktur (Ciesielski vd., 1984). Borulardaki ölü noktalar, kullanılmayan kısımlar veya uzun süre kullanılmayan bina tesisatı durgun su oluşumu için zemin hazırlar.

Hareketli sıvı kültür biyofilmlerinde *L. pneumophila* hücrelerin gelişimi, statik sıvı kültürdekilere oranla daha az bulunmuştur (Konishi vd., 2011).

Ne var ki Liu vd. (2006) yaptıkları çalışmada, bir su şebekesi modeli üzerinde türbülent akım, laminar akım ve durgun akıma sahip bölgeleri karşılaştırarak; en düşük *Legionella* konsantrasyonlarının durgun akımdaki biyofilmlerde, en yüksek konsantrasyonların ise türbülent akımdaki biyofilm örneklerinde olduğunu belirtmişlerdir. *L. pneumophila*'nın türbülent akımda direnç gösterebilmesinin sebebi, türbülantstan daha az etkilendiği sedimentte lokalize olması ile açıklanabilir (Stout vd., 1985; Storey vd., 2004a).

2.5.2. Biyofilm içinde beslenme ve gelişme

L. pneumophila farklı tür mikroorganizmalar tarafından oluşturulmuş biyofilmlere tutunabilmektedir. Bu tür biyofilmlerde *L. pneumophila* hücrelerinin konak protozoa varlığında çoğalabildikleri, tersine konak hücrelerin yokluğunda çoğalamadıkları farklı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Murga vd., 2001; Kuiper vd., 2004; Declerck vd., 2009). Bunun aksine Rogers ve Keevil (1992) konak protozoaların olmadığı multispecies biyofilm yapısında *L. pneumophila* hücrelerinin mikrokoloniler oluşturabildiklerini belirtmişlerdir.

Mampel vd. (2006) BYE broth statik kültür ortamında *L. pneumophila* biyofilmlerindeki gelişimin, planktonik olarak gelişen hücrelerin biyofilm yüzeyinde birikmesine dayandığını göstermişlerdir. Planktonik hücreler uzaklaştırıldığında biyofilme tutunmuş hücreler kayda değer bir gelişim göstermemişlerdir.

Diğer yandan, demir-sistein supplementi (10^{-1} BYE) ilave edilmiş biyofilm broth'da, *L. pneumophila*'nın planktonik olarak gelişmemesine rağmen, biyofilm oluşturabildiği ve oluşan biyofilmlerin geliştiği ortaya konulmuştur (Pecastaings vd., 2010).

Konishi vd. (2011) hareketli sıvı ortamında oluşan *L. pneumophila* biyofilmlerinde, sıcaklık yükseldikçe mikrokoloni sayısının azaldığı, ancak koloni çaplarının arttığını tespit etmişlerdir. Sonuçların önceki bir çalışma (Konishi vd., 2006) ile kıyaslanması, bakteri hücre boylarının hareketli sıvı ortamda, agar plakları ve statik sıvı ortamına göre dikkate değer ölçüde küçük olduğu ve her 3 ortamda da sıcaklık artışı ile doğru orantılı arttığını açığa çıkarmıştır. Piao vd. (2006)'nin benzer sonuçlarına göre 25°C'deki biyofilmler çubuk şekilli hücrelerden oluşurken, 37°C ve 42°C'de çok nukleuslu, septasız, misel benzeri hücre yapısı tespit edilmiştir. Aynı koşullardaki planktonik hücreler ise basil formunda olup bir değişim gözlenmemiştir.

Çevresel ortamlardaki demir konsantrasyonları *L. pneumophila* çoğalması üzerine önemli etkilere sahiptir (Cianciotto, 2007). Örneğin besiyeri ortamındaki yüksek demir konsantrasyonları *L. pneumophila* biyofilm oluşumunu ve gelişimini engelleyici etki göstermektedir (Hindre vd., 2008).

2.6. *L.pneumophila* Üzerine Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etki Çalışmaları

Literatürde *L.pneumophila* üzerine yapılmış antibakteriyel etki çalışmalarının çoğu tedavide kullanılan antimikrobiyal ajanların denendiği çalışmalardır. *L. pneumophila* beta laktam grubu antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir (Fu ve Neu, 1979). Bu nedenle Lejyoner hastalığı tedavisi kinolon ve makrolid grubu antibiyotikler üzerinde yoğunlaşmaktadır.

ABT-773 ve azitromisin (Stout vd., 2005), kinolonlar ve rifampisin (Gomez-Lus vd., 2001), antranilik asit (Sasaki vd., 2012), quinupristin/dalfopristin (Edelstein ve Edelstein, 2000), kinolonlar ve makrolidler (Pedro-Botet ve Yu, 2006), rifampisin ve siprofloksasin (Birteksöz vd., 2004), rifampisin ve makrolidler (Erdoğan vd., 2010) *Legionella* üzerinde etkinliği gösterilmiş antibiyotik gruplarına örnek olarak verilebilir.

Antibiyotik ilaçlar dışında dezenfektanların *Legionella* üzerine etkinliklerini araştıran çalışmalarda mevcuttur. Bu çalışmalardan “2.3.2.2. Su sistemlerinden Legionella dezenfeksiyonu” bölümünde bahsedilmiştir.

Doğal ürünlerin *Legionella* üzerinde antibakteriyel etkilerinin denendiği çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. Chang vd. (2008b) *Cinnamomum osmophloeum* (Yalancı tarçın) ve *Cryptomeria japonica* (Japonya’ya endemik bir selvi türü) esansiyel yağlarının etkilerini denedikleri çalışmalarında *C.osmophloeum* yapraklarında bulunan sinamaldehydin anti *L. pneumophila* aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Cinnamon yağının biyoaktivitesi, pH 8-10 arasında daha etkili bulunmuştur (Chang vd., 2008a).

Japonya’ya özgü bir selvi türü olan *Chamaecyparis obtusa* uçucu yağının, *Legionella anisa*’nın plakta gelişimini inhibe ettiği Hong vd. (2004) tarafından gösterilmiştir.

Avustralya çay ağacı yağının (*Melaleuca alternifolia*), bakterinin izolasyon yeri ve serogrubuna bağlı olarak değişmekle birlikte, *L. pneumophila* üzerine antibakteriyel etki gösterdiği rapor edilmiştir (Mondello vd., 2009).

Deniz kabuklularından elde edilen bir ticari ürün olan chitosan solusyonunun *L. pneumophila* ve *E.coli* üzerinde bakterisidal aktivitesi Fujimoto vd. (2006) tarafından gösterilmiştir. Suarez vd. (2003) ise, geleneksel olarak içme suyu

temizliğinde kullanılan *Moringa oleifera* (Tropik bir ağaç türü) tohumlarının, Stafilocoklar, Streptekoklar ve *Legionella* gibi suda bulunan pek çok patojen üzerinde bakterisidal etkileri olduğunu ortaya koymuşlardır.

Koruyucu bir gıda katkısı olarak kullanılan greyfurt tohum ekstratı ticari preparatının, banyo küvetlerinden izole edilmiş *L. pneumophila* izolatları üzerinde denemeleri, bu preparatın başarılı bir doğal bakterisid olduğunu ortaya koymuştur (Furuhata vd., 2003).

Furuhata vd., (2000) Japonya’da kullanılan 28 çeşit kurutulmuş bitkinin *L. pneumophila* üzerine antibakteriyel özelliklerini disk difüzyon metodu ile araştırmışlar ve 22 tanesinde inhibisyon zonu tespit etmişlerdir. Çalışmada 28 adet farklı *L. pneumophila* suşu kullanılmış olup; ahududu, adaçayı, melisa ve nane tüm suşlarda, kekik 27, geyikotu 26, yaban gülü 23, frenk maydanozu ve okaliptus 20, tarhun otu 17, hibiscus ve japon nanesi 15 suş üzerinde anti-legionella etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Geyik otu (*Satureja spp*, ing.Savory) ve hibiscusun 16 kat dilusyonda bile aynı etkiyi göstermeye devam ettikleri rapor edilmiştir. Fakat elde edilen zon çapları, MİK veya MBK değerleri belirtilmemiştir.

Çeşitli doğal parfüm bileşenleri anti-*Legionella* etkileri bakımından incelenmiş olup, meşe yosunu ve huş ağacı katran yağının en düşük MİK değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Shimizu vd., 2009). Meşe yosunu, *Evernia prunastri* (ing. oakmoss) parfümeride hammadde olarak kullanılan bir liken türüdür. Meşe yosunundan izole edilen maddelerin *Legionella* türleri üzerine antibakteriyel (Nomura vd., 2012) ve biyofilm giderici (Nomura vd., 2013) etkileri olduğu gösterilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Mikroorganizmalar

3.1.1. *L. pneumophila* suşları

Çalışmada 11 adet *L. pneumophila* suşu kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Suşlar Muğla Halk Sağlığı Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan alınmış olup, Seyahat İlişkili Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı (Anonim, 2001) çerçevesinde analizi yapılan Muğla yöresine ait su numunelerinden izole edilmişlerdir. Su numuneleri Muğla ilindeki bazı bina ve tesislerin sıcak veya soğuk su sistemlerindeki musluklardan alınmıştır. Şuşların serogrupları lateks aglütinasyon kiti (Oxoid) ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *L.pneumophila* suşları

Suş No	MHSL Stok No	Tür-Serogrup	İzole Edildiği İlçe	İzole Edildiği Sıcaklık
L1	MHSL 2013-159	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Fethiye	23.8°C
L2	MHSL 2013-162	<i>L. pneumophila</i> SG 1	Fethiye	26.0°C
L3	MHSL 2013-170	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Bodrum	52.0°C
L4	MHSL 2013-181	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Bodrum	48.5°C
L5	MHSL 2013-239	<i>L. pneumophila</i> SG 1	Fethiye	52.3°C
L6	MHSL 2013-241	<i>L. pneumophila</i> SG 1	Fethiye	53.0°C
L7	MHSL 2013-248	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Bodrum	62.0°C
L8	MHSL 2013-272	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Milas	24.6°C
L9	MHSL 2013-384	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Menteşe	59.0°C
L10	MHSL 2013-393	<i>L. pneumophila</i> SG 1	Menteşe	26.2°C
L11	MHSL 2013-414	<i>L. pneumophila</i> SG 2-14	Fethiye	49.6°C

Tüm suşlar -20°C’de, cryovial içerisinde saklanmaktadır. Çalışmada suşlar her test için dondurulmuş stoktan BCYE agara ekim yapılarak, 37°C’de 3-4 gün inkübasyon sonrası çoğaltılmıştır.

3.1.2 Diğer mikroorganizmalar

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan *L.pneumophila* harici bakteri suşları

Suş No	Tür-Serogrup	Kaynak
MHSL02	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
MHSL10	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
MHSL11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	RSKK
MHSL20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
MU171	<i>Pseudomonas putida</i>	MUKK
MU87	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MUKK

Tüm suşlar -20°C’de, cryovial içerisinde saklanmıştır. Suşlar dondurulmuş stoktan Triptik Soy Agara (TSA) ekim yapılarak, 37°C’de 1 gün inkübasyon sonrası aktifleştirilmiştir.

3.2 Bitkisel Yağlar, Besiyerleri ve Çözeltiler

3.2.1 Bitkisel yağlar

Çalışmada kullanılan bitkisel yağlar ticari olarak temin edilmiştir (Çizelge 3.2.). Türkiye’de üretilmiş, herhangi bir katkı maddesi içermeyen saf yağlar tercih edilmiştir.

Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan bitkisel yağlar

Yağın Adı	İçeriği	Markası	Üretim Tarihi	Ambalajı
Adaçayı Yağı	<i>Salvia</i> yaprak yağı %100	Biotama	08.2013	20 ml
Defne Yağı	<i>Laurus nobilis</i> yaprak yağı %100	Biotama	03.2013	20 ml
Kekik Yağı	<i>Thymus vulgaris</i> yağı %100	Biotama	05.2013	20 ml
Limon Yağı	<i>Citrus</i> Limon yağı %100	Biotama	09.2013	20 ml
Nane Yağı	<i>Mentha piperita</i> yağı %100	Mecitefendi	01.2013	20 ml

3.2.2. Besiyerleri

Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE) (Oxoid)

Maya ekstraktı	10 g/L
Aktif kömür	2 g/L
Agar	13 g/L

***Legionella* BCYE Growth Supplement (Oxoid)**

ACES Buffer /potasyum hidroksit	5 g/500 ml
Ferrik pirofosfat	0.125 g/500 ml
L-sistein HCl	0.20 g/500 ml
α -ketoglutarat	0.50 g/500 ml

Toz besiyeri 900 ml distile suda çözüldükten sonra, 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. 2 adet Growth Supplement 50’şer ml steril distile su ile çözülerek, sterilizasyondan sonra besiyerine ilave edilmiştir. Ardından steril potasyum hidroksit (KOH) ile pH 6.90 – 6.97 aralığına ayarlanmıştır.

Bu besiyeri *L.pneumophila* suşlarının stoktan canlandırılmasında, çoğaltılmasında ve MBK tespiti için kullanılmıştır.

Buffered Yeast Extract Broth (BYE)

Maya ekstraktı (MERCK) 10 g/L

***Legionella* BCYE Growth Supplement (Oxoid) (BCYE ile aynı)**

Maya ekstraktı 900 ml suda eritilerek, ardından 50'şer ml steril distile su ile çözülmüş 2 adet growth supplement ilave edilmiştir. KOH ile pH 6.90 – 6.97 arasına ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 0.20 nm por çaplı filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiştir.

Bu besiyeri *L.pneumophila* suşlarının biyofilm oluşturma denemelerinde ve MİK değerlerinin tespitinde kullanılmıştır.

Triptik Soy Agar (TSA) (Oxoid)

Pancreatic digest of casein	15.0 g/L
Enzymatic digest of soya bean	5.0 g/L
NaCl	5.0 g/L
Agar	15.0 g/L

Besiyeri hazırlanarak pH 7.3 ± 0.2 ayarlanmıştır. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir. Bu besiyeri *L. pneumophila* harici bakterilerin stoktan alınarak çoğaltılmasında kullanılmıştır.

Triptik Soy Broth (TSB)

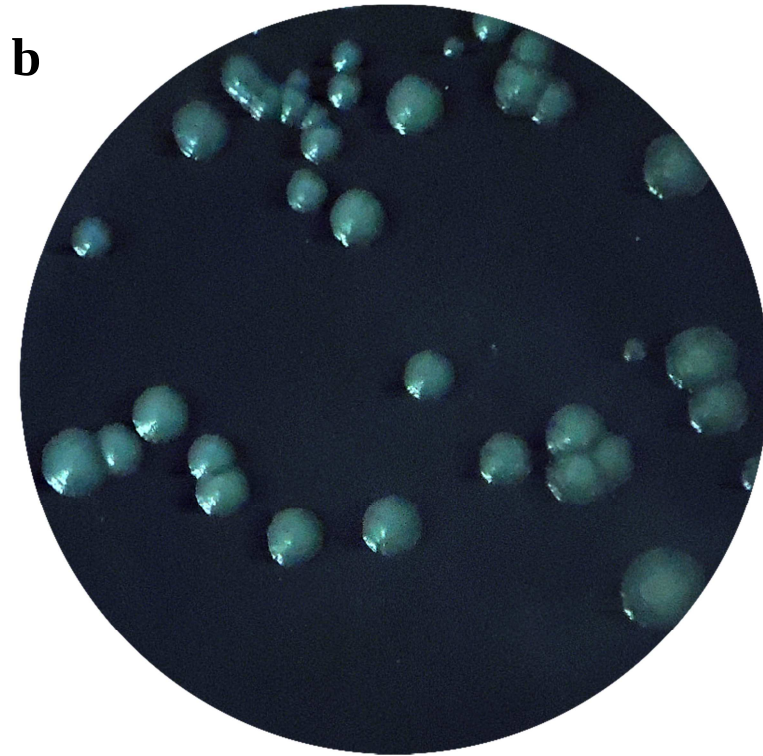
Pepton from casein	20.0 g/L
Glukoz	2.50 g/L
NaCl	5.0 g/L
K ₂ HPO ₄	2.5 g/L

Besiyeri hazırlanarak pH 7.3 ± 0.2 ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 0.20 nm por çaplı filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiştir. Bu besiyeri *L. pneumophila* ve diğer bakterilerin biyofilm oluşturma özelliklerinin denenmesinde sıvı ortam olarak kullanılmıştır.

Kristal Viyole % 0.3

Toz Kristal viyole (MERCK)	3 g
Distile su	1000 ml

% 0.3 Kristal Viyole boya çözeltisi, cam tüplere tutunmuş bakteriyel biyofilmlerin boyanmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *L. pneumophila* kolonilerinin BCYE besiyerinde a) çıplak gözle ve b) koloni mikroskobu ile görünümü.

3.2.3. Steril musluk suyu

Çalışmada, biyofilm oluşumu için ortam olarak kullanılan steril musluk suyu laboratuvarın şebeke sisteminden alınmıştır. Su, Sodyum Tiyosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) içeren şişelere alınmış ve klor içermediğinden emin olmak için ölçüm yapılmıştır. 0.20 nm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Suyun fiziko kimyasal özellikleri Muğla Halk Sağlığı Laboratuvarı Kimyasal Analizler Biriminde analiz edilerek aşağıdaki değerler bulunmuştur (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan musluk suyunun fiziko-kimyasal özellikleri

pH: 7.55	İletkenlik: 623 $\mu\text{s}/\text{cm}$		
Fe: 22.8 $\mu\text{g}/\text{L}$	Al: 8.33 $\mu\text{g}/\text{L}$	Cu: TE	Hg: TE
Cr: 2.96 $\mu\text{g}/\text{L}$	Zn: 1.22 mg/L	Pb: 0.002 mg/L	As: 0.4 $\mu\text{g}/\text{L}$
Na: 8.86 mg/L	K: 0.96 mg/L	Ca: 93.43 mg/L	Mg: 16.55 mg/L

TE: Tespit edilemedi.

3.3. Yöntemler

L. pneumophila'nın biyogüvenlik düzeyi 2 (BG2)'dir. Bu nedenle *L. pneumophila* kullanıldığı tüm mikrobiyolojik ekim ve boyama çalışmaları BG2 düzeyi biyogüvenlik kabiniinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Biyogüvenlik kabiniinde preparatların boyanması işlemi

3.3.1 Biyofilm oluşumu denemeleri

Bakterilerin farklı ortam ve koşullarda biyofilm oluşturma kapasitelerinin tespiti için kristal viyole metodu (Christensen vd., 1985) kullanılmıştır. Metod, Mampel vd. (2006), Merritt vd. (2011) ve O'Toole (2011) tarafından kullanılan yöntemlerden yararlanılarak modifiye edilmiş ve 100x16 mm cam tüplerde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

L.pneumophila suşları BCYE agarda 3 gün inkübasyonu takiben, besiyerinden öze ile toplanarak BYE broth veya steril musluk suyunda süspansiyon hazırlanmıştır. Diğer bakteri suşları ise TSA agarda 37°C'de bir gün inkübasyonu takiben, TSB Broth ile süspansiyon hazırlanmıştır. Spektrofotometri (Hach DR 6000) ile süspansiyonlar OD 0.2 (600nm) olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.3.1.1. Tek tür (*Monospecies*) biyofilm oluşumu

Steril cam tüplere, yukarıda hazırlanmış anlatılan bakteri süspansiyonlarından 2'şer ml konularak 37°C'de, *L. pneumophila* 3 gün, diğer bakteri suşları 1 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Her numune 3'er tekrar çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak 3 adet 2'şer ml steril BYE ve/veya TSB içeren tüpler kullanılmıştır.

3.3.1.2. Biyofilm boyanması ve absorbans ölçümü

İnkübasyon sonunda tüpteki besiyeri ve planktonik hücreler steril pipetle nazikçe uzaklaştırılmıştır. Tutunmuş hücrelerin daha iyi tespiti için tüpler 80°C'de 10 dk bekletilmiştir. Her tüpe 2 ml % 0.3 Kristal viyole eklenerek, oda sıcaklığında 15 dk boyanmaya bırakılmıştır. Boyamanın ardından her tüp steril distile su ile 3'er kez yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek oda sıcaklığında yaklaşık 3-4 s. kurumaya bırakılmıştır. Biyofilme tutunmuş kristal viyolenin çözünmesi amacıyla tüplere 2'er ml % 96 etanol ilave edilerek, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. Boya içeren etanol numuneleri, 12x92 mm'lik PS tüplere alınarak Spektrofotometrede (Hach DR 6000) 570 nm'de OD ölçümü yapılmıştır.



Şekil 3.3. Spektrofotometre ile OD ölçümü

3.3.1.3. *L. pneumophila*'nın farklı tür bakteriler ile birlikte biyofilm oluşturmalarının tespit edilmesi

Yukarıda anlatıldığı şekilde 0.2 OD olarak TSB besiyerinde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından, her tüpe 1 ml *L. pneumophila*, 1 ml diğer bakteri süspansiyonlarından olacak şekilde toplam 2'şer ml dağıtılmıştır. Çalışmada 6 farklı bakteri suşu ve 4 *L.pneumophila* suşu kullanılmıştır.

Her numune 3'er tekrar çalışılmıştır. Negatif kontrol olarak 3 adet 2'şer ml steril TSB içeren tüp, ayrıca çalışmadaki her suş ayrı ayrı (3 tüp x 2 ml) kontrol olarak kullanılmıştır.

Tüm tüpler 37°C'de 3 gün inkübe edilmiştir. Biyofilm boyanması ve OD ölçümü 3.3.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.4. *L. pneumophila*'nın farklı bakteri türleri tarafından oluşturulmuş biyofilm varlığında biyofilm oluşturmalarının tespit edilmesi

Önceden anlatıldığı şekilde TSB besiyerinde hazırlanmış *L. pneumophila* harici bakteri süspansiyonlarından, her suş için 24 adet cam tüpe 2'şer ml paylaştırılarak, 37°C'de 24 s. inkübasyon ile biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Kontrol olarak steril TSB içeren 18 adet tüp kullanılmıştır.

İnkübasyon sonunda, her suş için hazırlanan 24 tüpten, 3 tanesi 24 saatlik biyofilmin ölçümü için kullanılmıştır. Kalan 21 tüpteki planktonik hücreler ve sıvı ortam alınarak, 3 tanesine aynı suşa ait süspansiyon, 3 tanesine steril TSB besiyeri ve diğerlerine 2'şer ml *L. pneumophila* süspansiyonu ilave edilmiştir.

Kontrol olarak sadece steril TSB içeren tüplerdeki besiyerleri ve sıvı ortam alınarak, 3 tanesine tekrar steril TSB, diğerlerine *L. pneumophila* süspansiyonlarından 2'şer ml ilave edilmiştir. Tüm tüpler 37°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda *L. pneumophila*'nın ortamda diğer türlere ait biyofilmler mevcutken, bu biyofilmlere tutunarak oluşturduğu biyofilmlerin boyanması ve ölçümü bölüm 3.3.1.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.3.1.5. Ölü bakteri hücrelerinin varlığında (nekrotrofik) biyofilm oluşumu

TSA agarda çoğaltılan *L. pneumophila* harici bakteri suşlarından, steril musluk suyunda 600 nm'de OD 0.2 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Süspansiyonlar 70°C'de 45 dk bekletilerek, bakteri hücreleri öldürülmüştür. Ölü bakteri hücresi süspansiyonlarından 0.1'er ml TSA agara inoküle edilerek canlı hücre kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir.

Kullanılacak *L. pneumophila* suşları, BCYE agarda çoğaltmayı takiben, steril musluk suyunda 600 nm'de OD 0.2 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Cam deney tüplerine 1 ml *L. pneumophila* ve 1 ml ölü bakteri hücresi süspansiyonu olacak şekilde dağıtılarak 37°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak sadece ölü bakteri hücresi süspansiyonu içeren tüpler kullanılmıştır. Ayrıca karşılaştırma amacıyla, BYE+*L. pneumophila* ve Steril musluk suyu+*L. pneumophila* tüpleri ve bunların negatif kontrolü için, steril BYE ve musluk suyu içeren tüplerde biyofilm denemeleri eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.6. Biyofilm ölçümünün değerlendirilmesi

Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde Stepanovic vd. (2000)'nin metodu kullanılmıştır. Buna göre her denemede steril besiyeri içeren negatif kontrol numunelerinin absorbans ölçüm sonuçlarının ortalaması bulunmuştur. Negatif kontrol ortalamasına +3 SD ilavesi ile cut-off değeri bulunmuştur. Numunelerin

ortalama OD değerleri, cut-off değerine bölünmüştür. Çıkan sonuçlara göre değerlendirme şu şekilde yapılmıştır:

$(\text{Numune OD} / \text{Cut-off}) \leq 0.99 = \text{Biyofilm oluşumu yok (-)}$

$1 \leq (\text{Numune OD} / \text{Cut-off}) \leq 1.99 = \text{Zayıf Biyofilm oluşumu (+)}$

$2 \leq (\text{Numune OD} / \text{Cut-off}) \leq 3.99 = \text{Orta Biyofilm oluşumu (++)}$

$(\text{Numune OD} / \text{Cut-off}) \geq 4 = \text{Kuvvetli Biyofilm oluşumu (+++)}$

Biyofilm denemelerinde negatif kontrol grubu ile test grubu arasındaki farklılıkların istatistiksel analizi amacıyla MS Excel programında T.Test fonksiyonu ile P değerleri hesaplanmıştır.

3.3.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) tespiti

MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi çalışmaları, EUCAST (Anonim, 2003) ve CLSI (Anonim, 2012b) prosedürleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir. *L. pneumophila* suşlarının 2×10^6 bakteri/ml olacak şekilde BYE broth'ta süspansiyonu hazırlanmıştır. Denemede kullanılacak bitkisel yağlar DMSO ile 1:5 oranında çözülerek, steril BYE ilavesi ile istenen konsantrasyona ayarlanmıştır. 16x100 mm'lik cam tüplere 1'er ml BYE+Bitkisel yağ+DMSO çözeltisi, 1'er ml *L. pneumophila* süspansiyonu ilave edilmiştir. Tüplerdeki son bakteri konsantrasyonu 1×10^6 /ml olmuştur. Pozitif kontrol olarak sadece *L.pneumophila* süspansiyonu içeren tüpler, negatif kontrol olarak ise sadece bitkisel yağ+BYE ve steril BYE içeren tüpler kullanılmıştır. Her numune 3 tekrar hazırlanmıştır.

Tüm tüpler 37°C'de 4 gün inkübasyonu takiben gözle ve OD ölçümü ile bulanıklık tespiti yapılarak, üremenin olmadığı en düşük yağ konsantrasyonu MİK olarak tespit edilmiştir.

Pozitif kontrol olarak Eritromisin antibiyotiği kullanılmış ve *L. pneumophila* suşları için MİK değerleri agar difüzyon metodu (Anonim, 2000) ile tespit edilmiştir

3.3.3. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) tespiti

MİK tespiti çalışmasında üreme olmayan tüplerden 0.1'er ml alınarak BCYE agar besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C'de 3 gün inkübasyon sonucunda üremenin görülmediği konsantrasyon MBK olarak belirlenmiştir. Tüm ekimler 3'er tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 Antibiyofilm yöntemleri

3.3.4.1 Biyofilm oluşumunu engelleyici etki

Çalışmada kullanılan bitkisel yağların biyofilm oluşumunu engelleyici etkilerinin ortaya konulması amacıyla Nomura vd. (2013) kullandığı metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

L. pneumophila suşları BCYE agarda 37°C'de 3 gün inkübasyonu takiben, BYE broth ile 600 nm'de OD 0.2 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Denemeye alınan bitkisel yağlar DMSO ile 1:5 oranında çözüldükten sonra, çalışma konsantrasyonları BYE kullanılarak elde edilmiştir. 16 x 100 mm'lik cam tüplere 1 ml *L. pneumophila* süspansiyonu ve 1 ml bitkisel yağ+DMSO+BYE karışımı, son konsantrasyonları MİK/2, MİK/4, MİK/8 ve MİK/16 olacak şekilde ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak 1 ml BYE + 1 ml *L. pneumophila* süspansiyonu içeren tüpler, negatif kontrol olarak bakteri içermeyen, bitkisel yağ+DMSO+BYE içeren tüpler kullanılmıştır.

Tüm tüpler 37°C'de 3 gün inkübasyonu takiben, 3.3.1.2.'de anlatıldığı şekilde, boyama, tespit, kurutma, etanolde çözünme ve 570 nm'de OD ölçüm işlemlerine tabi tutulmuştur.

Biyofilm oluşumu (%) ve biyofilm inhibisyonu (%) oranları aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır:

$$\text{Biyofilm oluşumu (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Örnek}} - \text{OD}_{\text{Negatif Kontrol}}}{\text{OD}_{\text{Pozitif Kontrol}} - \text{OD}_{\text{Negatif Kontrol}}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Biyofilm inhibisyonu (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{Poz Kont}} - \text{OD}_{\text{Neg Kont}}) - (\text{OD}_{\text{Örnek}} - \text{OD}_{\text{Neg Kont}})}{\text{OD}_{\text{Pozitif Kontrol}} - \text{OD}_{\text{Negatif Kontrol}}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.4.2. Önceden oluşmuş biyofilmi giderici etki

Bitkisel yağların önceden oluşmuş biyofilm üzerine etkileri Sandasi vd. (2010) ve Murugan vd. (2011) tarafından kullanılan metotların modifiye edilmesi sonucunda elde edilen metotla tespit edilmiştir.

L. pneumophila suşları BCYE agarda 37°C’de 3 gün inkübasyonu takiben, BYE broth ile 600 nm’de OD 0.2 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon deney tüplerine 2 ml paylaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak 2 ml steril BYE içeren tüpler kullanılmıştır. 3. gün tüplere, 0.1 ml BYE+DMSO+bitkisel yağ süspansiyonu ilave edilerek, tüplerdeki bitkisel yağ konsantrasyonları MİK, MİK/2, MİK/4 ve MİK/8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Pozitif kontrol tüplerine sadece BYE, negatif kontrol tüplerine ise DMSO+Bitkisel yağ ilave edilmiştir. Bitkisel yağ ilavesinden sonra 24 s. 37°C’de inkübasyona devam edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda tüm tüpler, 3.3.1.2.’de anlatıldığı şekilde, boyama, tespit, kurutma, etanolde çözünme ve 570 nm’de OD ölçüm işlemlerine tabi tutulmuştur.

Önceden oluşmuş biyofilmi inhibisyon etkisi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Biyofilm inhibisyonu (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{Poz Kont}} - \text{OD}_{\text{Neg Kont}}) - (\text{OD}_{\text{Örnek}} - \text{OD}_{\text{Neg Kont}})}{\text{OD}_{\text{Pozitif Kontrol}} - \text{OD}_{\text{Negatif Kontrol}}} \times 100 \quad (3.3)$$

4. SONUÇLAR

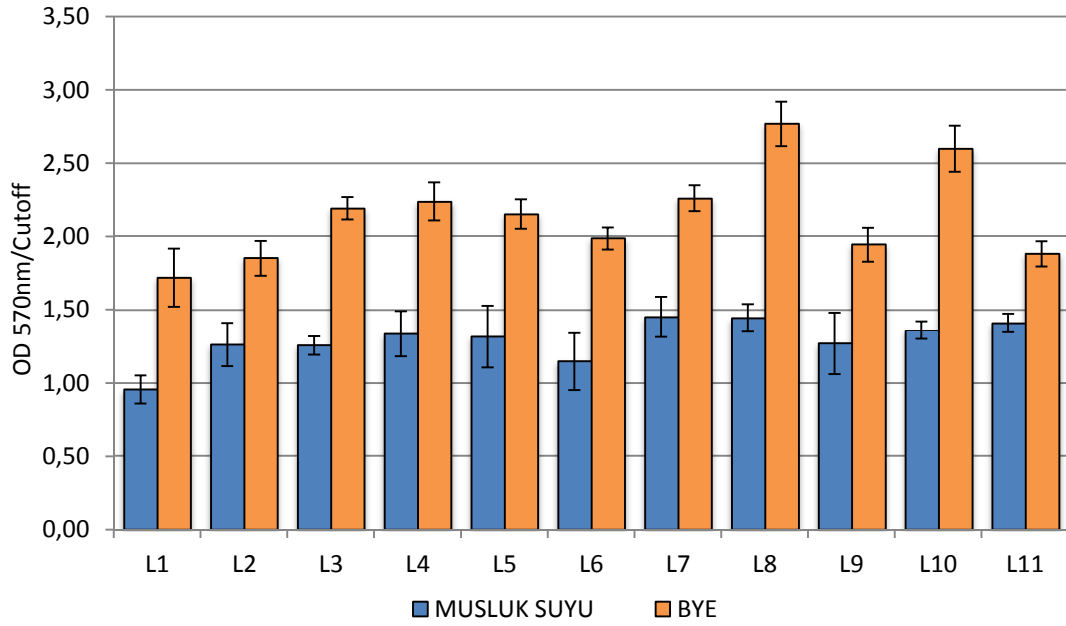
4.1. *L. pneumophila* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özellikleri

4.1.1. Steril musluk suyu ve BYE besiyerinde biyofilm oluşumu

Muğla ilindeki bazı binaların su sistemlerinden izole edilmiş 11 adet *L. pneumophila* suşunun 37°C’de 72 saatte biyofilm oluşturma kapasiteleri, filtrasyon ile steril edilmiş musluk suyu ve BYE sıvı besiyeri ortamında olmak üzere Çizelge 4.1.’de verilmiştir. Steril musluk suyunda en fazla biyofilm oluşturan suşlar sırasıyla L7, L8 ve L11 olarak tespit edilmiştir. L1 suşunda negatif kontrol değerlerine kıyasla biyofilm oluşumu tespit edilmezken, diğer tüm suşlarda zayıf (+) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. BYE sıvı besiyerinde ise suşlardan 5 tanesinin zayıf (+), 6 tanesinin orta (++) seviye biyofilm oluşturabildiği bulunmuştur. OD değerleri 0.840 ile 1.354; OD/Cut off değerleri 1.72 ile 2.77 arasında değişmektedir. BYE besiyerinde en fazla biyofilm oluşturan suşlar ise sırasıyla L8, L10 ve L7 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. *L. pneumophila* suşlarının 37°C’de 72s inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma kapasiteleri

Suşlar	Steril Musluk Suyu			BYE Broth		
	OD570nm	OD/Cut off	Değ.	OD570nm	OD/Cut off	Değ.
L1	0.404±0.040	0.96	-	0.840±0.097	1.72	+
L2	0.534±0.062	1.26	+	0.905±0.058	1.85	+
L3	0.532±0.027	1.26	+	1.072±0.037	2.19	++
L4	0.565±0.065	1.34	+	1.095±0.064	2.24	++
L5	0.557±0.089	1.32	+	1.053±0.049	2.15	++
L6	0.485±0.083	1.15	+	0.971±0.037	1.98	+
L7	0.614±0.057	1.45	+	1.106±0.043	2.26	++
L8	0.611±0.038	1.44	+	1.354±0.074	2.77	++
L9	0.537±0.088	1.27	+	0.951±0.057	1.94	+
L10	0.575±0.025	1.36	+	1.270±0.077	2.60	++
L11	0.596±0.026	1.41	+	0.920±0.042	1.88	+



Şekil 4.1. *L. pneumophila* suşlarının 37°C’de 72s inkübasyon sonucunda biyofilm oluşturma kapasiteleri

Suşların çoğu için BYE besiyerindeki biyofilm oluşturma değerlerinin, steril musluk suyundaki değerlerin 2 katına yaklaştığı Şekil 4.1.’deki grafikte daha iyi anlaşılmaktadır.

Sonuçlara göre en iyi biyofilm oluşturma oranına sahip 6 suş sırasıyla L8, L10, L7, L4, L3 ve L5 olarak belirlenmiştir ve bu suşlar daha sonraki biyofilm oluşumu ve antibiyofilm denemelerinde kullanılmak üzere seçilmişlerdir.



Şekil 4.2. Cam tüplerde, kristal viyole ile boyanmış *L. pneumophila* biyofilmleri (BYE)

4.1.2. *L. pneumophila*'nın ölü bakteri hücresi içeren ortamlarda biyofilm oluşturma kapasitesi

L.pneumophila suşlarının, besiyeri ortamı olarak ölü bakteri hücreleri ilave edilmiş steril musluk suyundaki biyofilm oluşturma kapasiteleri Çizelge 4.2.'de görülmektedir.

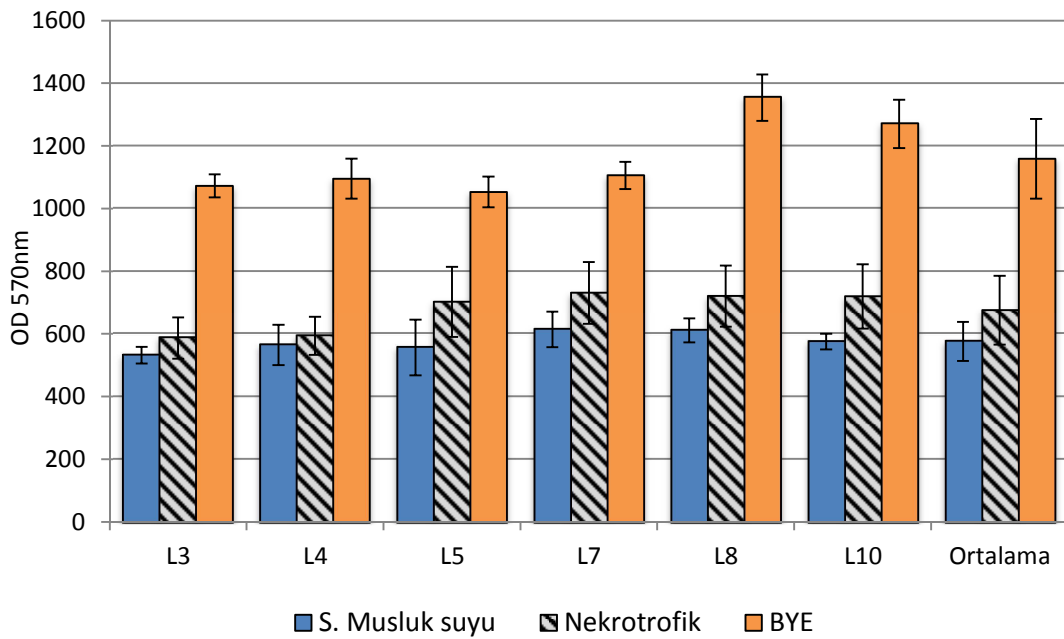
Çizelge 4.2. *L. pneumophila* suşlarının ölü bakteri hücreleri içeren ortamda biyofilm oluşturma kapasiteleri

Suşlar	L3	L4	L5	L7	L8	L10
<i>E.faecalis</i> ölü hücreleri 10 ⁹ ml ⁻¹						
OD _{570nm}	0.664±0.07	0.597±0.08	0.765±0.08	0.799±0.04	0.634±0.09	0.783±0.02
OD/Cut off	1.23	1.11	1.42	1.48*	1.17	1.45**
Değ.	+	+	+	+	+	+
<i>E.aerogenes</i> ölü hücreleri 10 ⁹ ml ⁻¹						
OD _{570nm}	0.561±0.05	0.542±0.09	0.532±0.03	0.657±0.09	0.833±0.07	0.556±0.04
OD/Cut off	1.37	1.32	1.29	1.60	2.03**	1.35
Değ.	+	+	+	+	++	+
<i>K.pneumoniae</i> ölü hücreleri 10 ⁹ ml ⁻¹						
OD _{570nm}	0.589±0.06	0.586±0.05	0.643±0.06	0.663±0.05	0.725±0.07	0.718±0.06
OD/Cut off	1.30	1.30	1.42	1.47	1.60	1.59*
Değ.	+	+	+	+	+	+
<i>P.putida</i> ölü hücreleri 10 ⁹ ml ⁻¹						
OD _{570nm}	0.519±0.02	0.585±0.02	0.796±0.06	0.851±0.09	0.620±0.02	0.777±0.10
OD/Cut off	0.99	1.12	1.53*	1.63*	1.19	1.49*
Değ.	-	+	+	+	+	+
<i>P.fluorescens</i> ölü hücreleri 10 ⁹ ml ⁻¹						
OD _{570nm}	0.601±0.08	0.657±0.05	0.776±0.06	0.683±0.07	0.791±0.03	0.765±0.10
OD/Cut off	1.10	1.20	1.42*	1.25	1.45**	1.40*
Değ.	+	+	+	+	+	+

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Negatif kontrol değerine kıyasla biyofilm oluşumu görülmeyen (-) tek sonuç, L3 suşunun *P.putida* ölü hücreleri içeren ortamdaki denemesidir. L8 suşu, *E. aerogenes* ölü hücre ortamında orta seviye biyofilm (++) oluşturmuştur. Diğer tüm deneme ortamlarında zayıf (+) biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

Ölü bakteri hücresi ortamlarındaki biyofilm değerlerinden L3 ve L5 suşları için 2, L8 suşu için 3, L7 ve L10 suşları için 4 tanesinin steril musluk suyundaki değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuçların steril musluk suyu değerlerine göre istatistiksel olarak farklılıkları “P” değeri olarak hesaplanmış ve çizelgede belirtilmiştir.

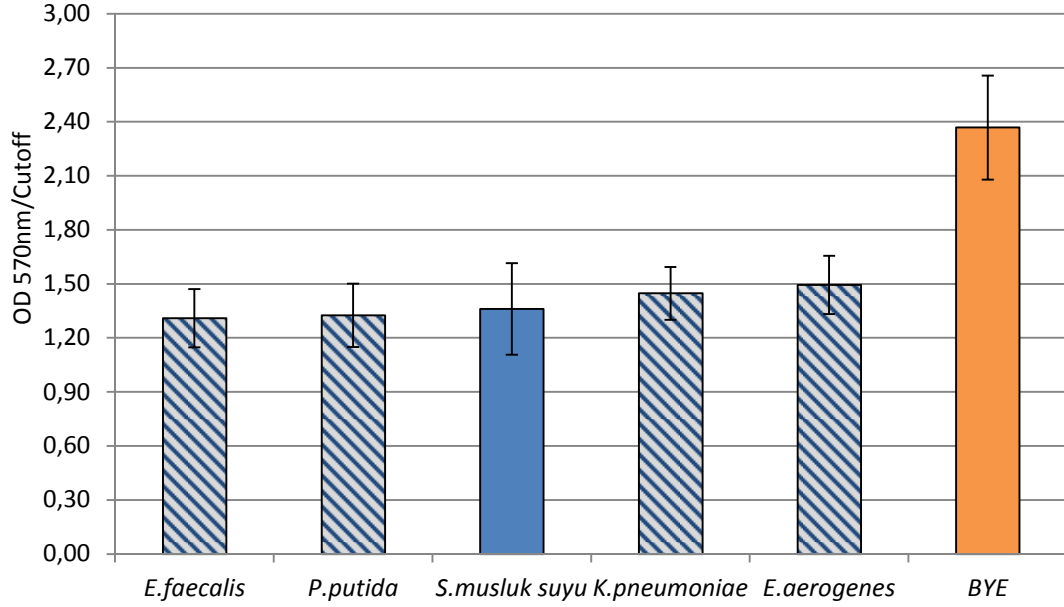


Şekil 4.3. *L. pneumophila* suşlarına ait nekrotrofik ortamdaki biyofilmlerin, steril musluk suyu ve BYE’de oluşan biyofilmler ile kıyaslanması

L. pneumophila suşlarının nekrotrofik ortamda biyofilm oluşumu kapasitelerine göre sıralaması büyükten küçüğe doğru L7, L8, L10, L5, L4 ve L3 şeklindedir. Şekil 4.3.’de görüldüğü gibi nekrotrofik ortamda oluşan ortalama biyofilm miktarları, steril musluk suyundan bir miktar fazla olmakla birlikte, BYE’de oluşan biyofilmlere ait değerlerin epey altındadır.

Çalışmada kullanılan ölü bakteri hücresi ortamlarındaki ortalama OD değerlerinin, steril musluk suyu ve BYE’de oluşan biyofilmlere ait değerlerle karşılaştırılması Şekil 4.4.’teki grafikte görülmektedir. Tüm *L.pneumophila* suşlarının ortalama

değerlerinin, negatif kontroller (cut/off) ile kıyaslanmasına göre, en fazla biyofilm oluşumu *E.aerogenes* ölü hücrelerini içeren ortamda gözlenmiştir. *E.faecalis* ve *P.putida* ölü hücre ortamlarındaki biyofilm miktarları ise steril musluk suyundakinden daha düşük bulunmuştur.

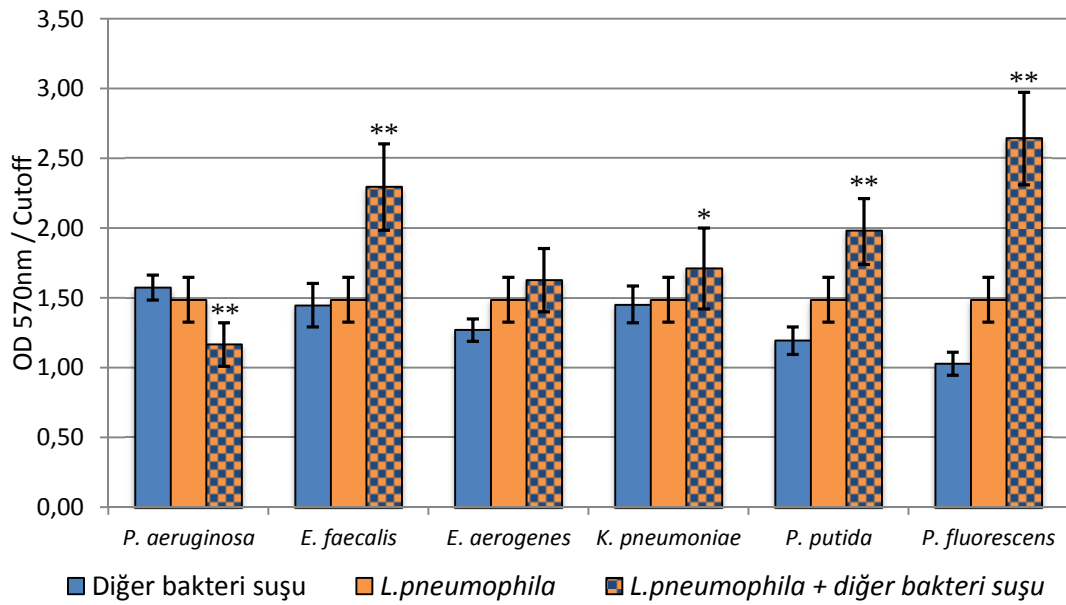


Şekil 4.4. Nekrotrofik ortamların biyofilm oluşumu yönünden steril musluk suyu ve BYE ile kıyaslanması.

4.1.3. *L. pneumophila*'nın diğer bakteri türleri ile birlikte biyofilm oluşturmaları

4.1.3.1. Farklı bakteri türlerine ait planktonik hücreler varlığında biyofilm oluşumu

Dört *L.pneumophila* suşu ile altı farklı bakteri suşunun TSB ortamında 37°C'de, 72 saat inkübasyonda biyofilm oluşturma özellikleri incelenmiştir. Oluşan çoklu biyofilmlerin tek türe ait biyofilmlerle karşılaştırılması Şekil 4.5.'te görülmektedir. *L.pneumophila* suşlarının *P.aeruginosa* ile birlikte oluşturduğu biyofilm miktarının, tek türe ait biyofilmlerden daha az olduğu, diğer biyofilmlerin ise, tek türe ait olanlardan fazla olduğu tespit edilmiştir. *L.pneumophila*'nın, *P.fluorescens* ve *E.faecalis* ile birlikte oluşturduğu biyofilmler negatif kontrol değerlerine kıyasla orta seviye (++) olarak hesaplanmıştır. Diğer türlerle birlikte oluşturduğu biyofilmlerin değerlendirilmesi ise zayıf (+) aralıkta bulunmuştur.



Şekil 4.5. *L. pneumophila* suşları ile diğer bakteri suşlarının birlikte oluşturdukları 72 saatlik biyofilmlerin, tek türe ait biyofilmlerle kıyaslanması. (* $P<0.05$; ** $P<0.01$)

Tez çalışmasında kullanılan tüm bakteri suşlarının TSB broth besiyerindeki 24 ve 72s inkübasyon sonunda oluşturdukları biyofilm miktarları Çizelge 4.3.'te verilmiştir. 24s inkübasyon sonunda *E.aerogenes* ve *P.aeruginosa* çok iyi (+++) biyofilm üretimi gösterirken, *E.faecalis* ve *K.pneumoniae* (++) orta, *P.fluorescens* ve *P.putida* (+) zayıf biyofilm oluşturmuştur. 72s inkübasyon sonunda tüm suşlarda zayıf (+) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. *L.pneumophila*'ya ait sonuçlar 4 suşun (L4, L7, L8, L10) ortalaması alınarak bulunmuştur ve 24s inkübasyon sonunda biyofilm oluşumu tespit edilememiştir.

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan türlerinin TSB sıvı ortamında biyofilm oluşturma kapasiteleri

Suşlar	24 h			72 h		
	OD _{570nm}	OD/Cut off	Değ.	OD _{570nm}	OD/Cut off	Değ.
<i>E.aerogenes</i>	2.174±0.081	6.22	+++	0.689±0.044	1.27	+
<i>P.aeruginosa</i>	2.062±0.144	5.90	+++	0.854±0.049	1.57	+
<i>E.faecalis</i>	0.998±0.066	2.86	++	0.786±0.085	1.45	+
<i>K.pneumoniae</i>	0.930±0.064	2.66	++	0.789±0.072	1.45	+
<i>P.fluorescens</i>	0.601±0.036	1.72	+	0.558±0.045	1.03	+
<i>P.putida</i>	0.579±0.038	1.66	+	0.648±0.054	1.19	+
<i>L.pneumophila</i>	NT	NT	NT	0.807±0.088	1.49	+

NT: Tespit edilmedi.

4.1.3.2. Farklı bakteri türlerine ait tutunmuş hücreler varlığında biyofilm oluşumu

L.pneumophila harici bakteri suşlarının 24s inkübasyon sonunda oluşan biyofilmlerini içeren tüplere, *L.pneumophila* ilavesi sonucu oluşan biyofilmler incelenmiştir. Dört *L.pneumophila* suşuna karşılık, altı adet farklı bakteri suşu kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4.'te verilmiştir. *P.putida* hariç tüm bakteri suşlarında, *L.pneumophila* ilavesi ile oluşan biyofilm miktarları, TSB veya aynı bakterinin ilave edilmesinden fazla bulunmuştur.

Kontrol olarak 24 saatlik biyofilm içeren tüplere steril TSB ilavesi ve biyofilmin ait olduğu aynı bakteri suşunun ilavesi sonucu elde edilen değerler tespit edilmiştir. Bu kontrol değerleri genellikle birbirlerine yakın bulunmuş olup, sadece *P.fluorescens*'e ait değer TSB ilavesine göre yaklaşık %30 oranında düşük tespit edilmiştir.

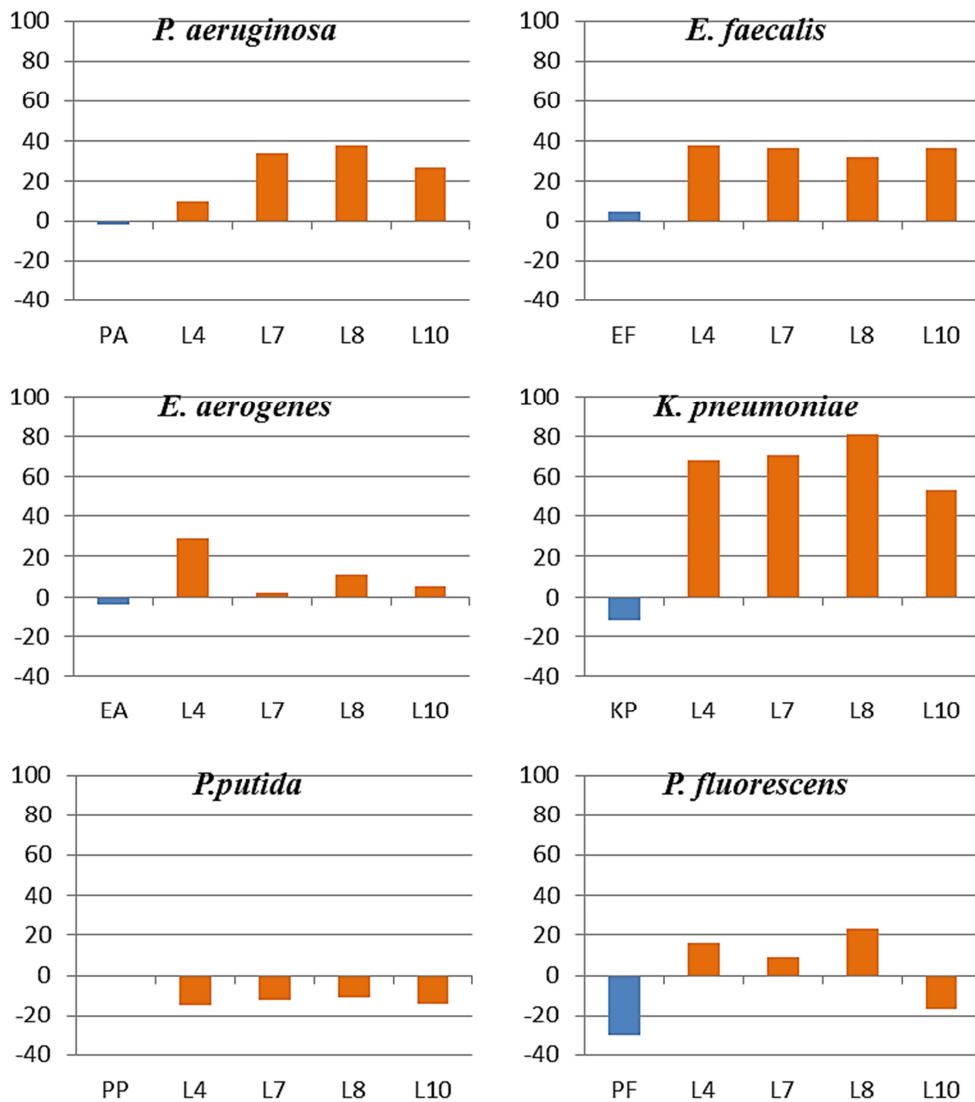
Çizelge 4.4. *L. pneumophila* suşlarının önceden oluşmuş biyofilm üzerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri (OD 570 nm)

<i>P.aeruginosa</i> 24h biyofilm +					
TSB	<i>P.aeruginosa</i>	L4	L7	L8	L10
0.764±0.11	0.749±0.12	0.837±0.09	1.025±0.07*	1.055±0.10*	0.969±0.05*
<i>E.aerogenes</i> 24h biyofilm +					
TSB	<i>E.aerogenes</i>	L4	L7	L8	L10
1.457±0.18	1.407±0.19	1.878±0.16*	1.489±0.12	1.620±0.13	1.532±0.16
<i>K.pneumoniae</i> 24h biyofilm +					
TSB	<i>K.pneumoniae</i>	L4	L7	L8	L10
0.980±0.10	0.863±0.04	1.650±0.15**	1.669±0.11**	1.774±0.05**	1.502±0.16**
<i>P.putida</i> 24h biyofilm +					
TSB	<i>P.putida</i>	L4	L7	L8	L10
2.232±0.17	2.225±0.21	1.912±0.16	1.968±0.11	1.988±0.11	1.925±0.09
<i>P.fluorescens</i> 24h biyofilm +					
TSB	<i>P.fluorescens</i>	L4	L7	L8	L10
1.584±0.07	1.105±0.10	1.837±0.16	1.730±0.07	1.948±0.06**	1.324±0.09
<i>E.faecalis</i> 24h biyofilm +					
TSB	<i>E.faecalis</i>	L4	L7	L8	L10
0.520±0.05	0.542±0.08	0.715±0.01**	0.710±0.04**	0.687±0.08*	0.709±0.06*

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ (Karşılaştırma TSB değerleri ile yapılmıştır)

Kontrol değerleri ile deney sonuçları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırma testlerine göre toplam 24 sonuçtan 6 tanesi $P<0.05$ ve 7 tanesi $P<0.01$ seviyesinde farklılık göstermektedir.

K.pneumoniae 24s inkübasyon sonucu oluşan biyofilm zerine *L.pneumohila* suşlarının ilave edilmesi sonucu elde edilen biyofilm verileri, TSB ilavesi ile elde edilen değerden ortalama %68 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.6.). Bu değer *E.faecalis* için %36, *P.aeruginosa* için %27, *E.aerogenes* için %12 ve *P.fluorescens* için %8 olarak bulunmuştur. *P.putida* biyofilmi üzerinde ise, TSB kontrol değerinden ortalama %13 daha düşük biyofilm oluştuğu llmştir.



şekil 4.6. 24 saatlik biyofilmler üzerine bakteri süspansiyonu ilavesi ile oluşan biyofilmlerin, TSB ilave edilen kontrollere göre % değişim oranları.

4.2. Bitkisel Yağların *L. pneumophila* Üzerinde Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etkileri

4.2.1. Antibakteriyel aktivite

Çalışmada kullanılan 5 adet ticari bitkisel yağın, çalışmamızdaki 11 adet *L. pneumophila* suşu üzerine antibakteriyel etkilerinin tespiti amacıyla MİK (Minimum inhibe edici konsantrasyon) ve MBK (Minimum bakterisidal konsantrasyon) değerleri bulunmuştur. Kullanılan yağların hepsinin *L. pneumophila* üzerine antibakteriyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bulunan MİK değerleri Çizelge 4.5.'te, MBK değerleri ise Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Bitkisel yağların ve Eritromisin MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri

Suşlar	Bitkisel Yağlar					Eritromisin
	Adaçayı	Kekik	Limon	Defne	Nane	
			µl/ml			mg/L
L1	20.0	1.80	1.25	0.100	1.25	0.06
L2	13.3	1.20	0.83	0.067	2.50	0.03
L3	13.3	1.20	0.83	0.067	2.50	0.03
L4	20.0	1.20	1.25	0.100	1.25	0.06
L5	13.3	1.80	1.25	0.067	1.25	0.06
L6	20.0	1.20	0.83	0.044	1.25	0.06
L7	13.3	1.80	1.25	0.067	2.50	0.06
L8	13.3	1.80	1.25	0.100	1.25	0.06
L9	13.3	1.20	0.83	0.044	1.25	0.03
L10	13.3	1.20	0.83	0.067	1.25	0.06
L11	13.3	1.20	0.83	0.100	1.25	0.06

Bitkisel yağlardan *L. pneumophila* üzerine en yüksek antibakteriyel etki defne yağında bulunmuştur (MİK: 0.067-0.1 µl/ml). Elde edilen MİK sonuçları Limon, Kekik ve Nane yağlarının benzer antibakteriyel etkiye sahip olduklarını göstermiştir; limon yağı 0.83-1.25 µl/ml, kekik yağı 1.20-1.80µl/ml ve nane yağı 1.25-2.5 µl/ml. Çalışmada kullanılan yağlar arasında en düşük anti-legionella aktivite ise 13.3-20 µl/ml MİK değeri ile adaçayı yağında tespit edilmiştir.

L. pneumophila suşlarının yağların antibakteriyel etkilerine karşı duyarlılıkları incelendiğinde suşlar arasında anlamlı farklılıklar bulunmadığı görülmektedir.

Eritromisin'e ait MİK değerleri ise 0.03 – 0.06 mg/L olarak tespit edilmiştir. BSAC tarafından yabancı tip *L. pneumophila* için eritromisine duyarlılık aralığı 0.06-0.5 mg/L olarak verilmiştir (Anonim, 2013b). Çalışmamızda bulunan MİK değerlerinden 8 tanesi bu aralık içerisinde iken, 3 suş (L2, L3 ve L9) daha duyarlı bulunmuşlardır.

Çizelge 4.6. Bitkisel yağların MBK (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) değerleri

Suşlar	Bitkisel Yağlar				
	Adaçayı	Kekik	Limon	Defne	Nane
	µl/ml				
L1	>20.0	4.00	3.75	0.31	5.0
L2	>20.0	2.70	2.50	0.31	5.0
L3	>20.0	4.00	1.25	0.16	5.0
L4	>20.0	2.70	1.25	0.31	5.0
L5	>20.0	4.00	2.50	0.31	2.5
L6	>20.0	4.00	2.50	0.16	2.5
L7	>20.0	4.00	2.50	0.31	5.0
L8	>20.0	4.00	2.50	0.31	5.0
L9	20.0	2.70	1.25	0.16	5.0
L10	>20.0	4.00	1.25	0.31	5.0
L11	>20.0	4.00	1.25	0.31	2.5

Minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) defne yağı için 0.16-0.31 µl/ml, limon yağı için 1.25-3.75 µl/ml, kekik yağı için 2.7-4.0 µl/ml, nane yağı için 2.5-5.0 µl/ml ve adaçayı için ≥ 20 µl/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7. BCYE plaklarında MBK belirlenmesi

4.2.2. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu

Bitkisel yağların *L. pneumophila*'nın biyofilm oluşumu inhibe edici etkilerinin tespiti amacıyla, BYE ortamında en iyi biyofilm oluşturduğu tespit edilen altı suş kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkisel yağların farklı oranlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7.).

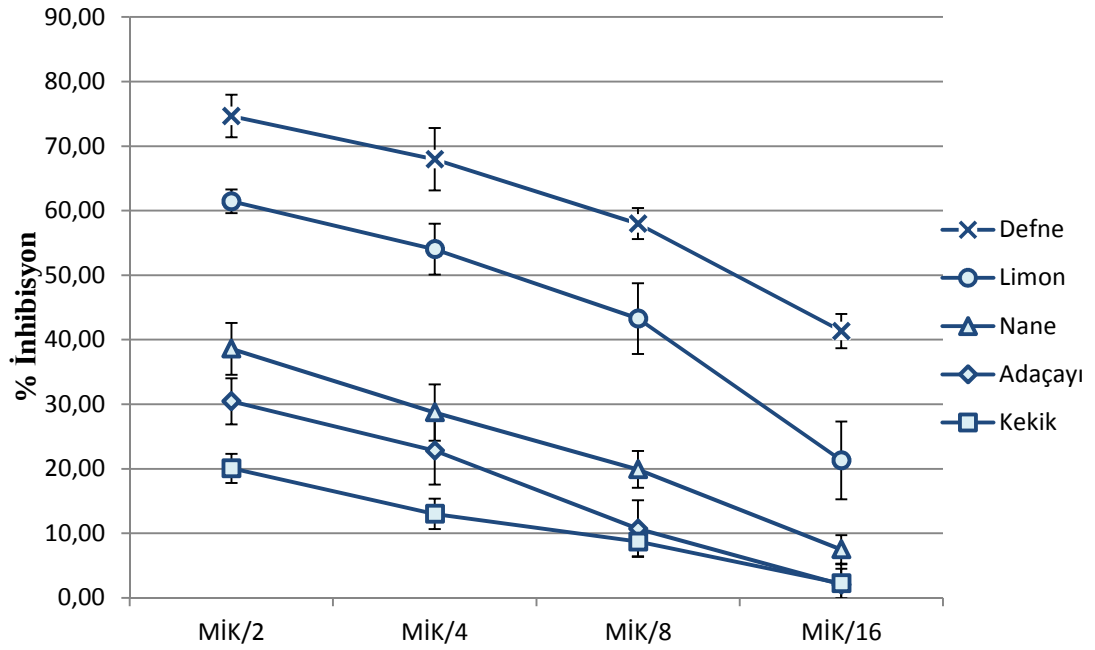
Çizelge 4.7. Bitkisel yağların *L. pneumophila* biyofilm oluşumu inhibisyon oranları

Suşlar	L3	L4	L5	L7	L8	L10
Adaçayı yağı (% İnhibisyon)						
MİK/2	28.1±3.7	32.9±3.9*	24.3±5.5	30.8±5.5	35.6±3.2	31.1±7.2**
MİK/4	21.3±4.1	26.4±3.9*	14.4±3.9	23.2±6.1	31.4±1.3	20.2±7.2**
MİK/8	7.5±3.3	18.7±5.5	6.8±1.7	11.1±3.9	13.7±1.1	6.5±3.6
MİK/16	TE	4.0±1.4	TE	TE	8.3±2.4	TE
Kekik yağı (% İnhibisyon)						
MİK/2	17.9±2.2	22.6±5.2	16.8±2.1	19.9±3.3	23.0±8.7	20.2±6.4
MİK/4	10.3±2.9	11.5±6.1	12.2±6.2	12.6±4.8	17.7±4.1	13.7±3.9
MİK/8	5.1±2.9	7.0±4.0	10.5±3.5	9.3±6.7	8.3±4.0	12.0±5.8
MİK/16	3.6±2.8	TE	5.1±2.0	4.7±1.9	TE	TE
Nane yağı (% İnhibisyon)						
MİK/2	36.9±2.1*	45.5±4.2*	39.1±8.6*	41.2±6.1**	35.7±2.7*	33.1±6.8**
MİK/4	32.3±3.3	29.9±4.8*	26.4±5.3	35.7±8.3**	24.9±3.6	23.1±8.7*
MİK/8	22.9±3.3	22.6±4.6	19.2±5.2	19.6±3.3**	20.7±5.8	14.3±4.8
MİK/16	6.9±3.8	8.1±2.0	9.8±2.4	3.0±2.4	8.4±2.7	8.8±4.7
Defne yağı (% İnhibisyon)						
MİK/2	74.5±7.4**	67.9±4.2**	75.5±5.6**	78.0±6.4*	74.6±6.3**	77.5±7.5*
MİK/4	62.2±6.3**	62.4±7.5**	66.1±6.2*	71.5±7.5*	70.3±3.1**	75.3±7.9*
MİK/8	57.6±3.8**	58.6±5.1**	60.8±5.5*	56.2±1.7*	54.1±1.1**	60.7±6.1*
MİK/16	43.3±3.3**	43.3±3.3**	41.0±4.6*	41.3±6.0	38.7±2.3*	40.5±4.7
Limon yağı (% İnhibisyon)						
MİK/2	60.0±5.0*	59.5±9.8**	61.2±9.7*	63.3±4.8**	62.0±8.8**	62.7±6.7**
MİK/4	54.7±2.2*	46.3±8.8**	57.5±7.8*	54.2±7.2**	58.4±6.1**	53.1±6.5**
MİK/8	44.8±8.0*	40.2±4.9**	39.2±7.2	48.5±8.8*	51.4±9.3**	35.6±6.9**
MİK/16	22.3±7.2	16.3±8.2	21.3±8.2	23.4±8.0	31.9±4.1*	12.6±3.7*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ TE: Tespit Edilemedi

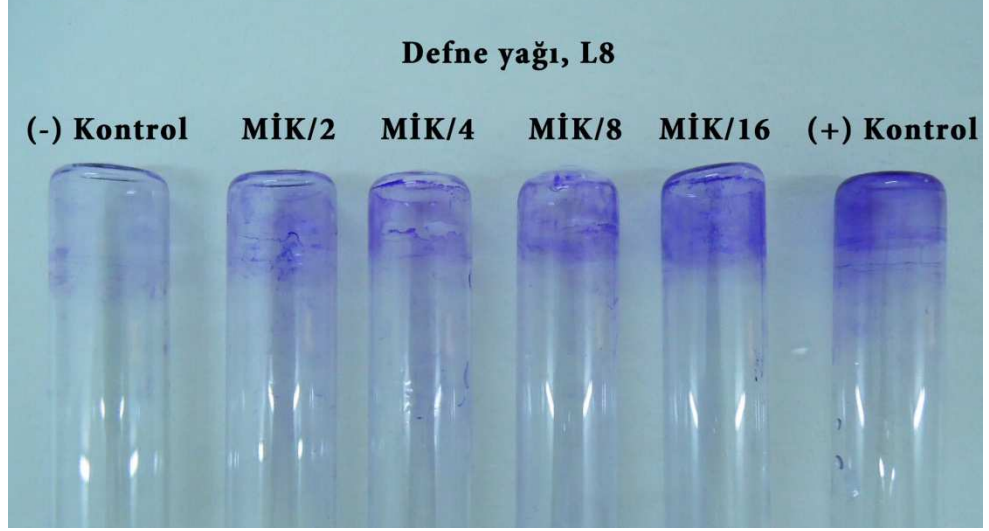
En yüksek biyofilm inhibisyonu defne yağında tespit edilmiştir (78.0 ± 6.4). Defne, limon ve nane yağlarının, MİK altı konsantrasyonlarda tüm suşlar üzerinde biyofilm oluşumunu inhibe ettiği, kekik ve adaçayı yağlarının ise MİK/16 konsantrasyonda tüm suşlar üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği bulunmuştur.

Bulunan yüzde inhibisyon değerlerinin, pozitif kontrollerle karşılaştırılmaları sonucu elde edilen P değerleri ($P < 0.01$ ve $P < 0.05$) Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Bitkisel yağların *L. pneumophila* biyofilm oluşumunu önleyici etkileri.

Biyofilm oluşumunun inhibisyonu çalışmasına alınan *L. pneumophila* suşlarına ait inhibisyon değerlerin ortalamasına göre en yüksek biyofilm oluşumu inhibisyonu defne yağında, sonra sırasıyla limon yağı, nane yağı, adaçayı yağı ve kekik yağında tespit edilmiştir (Şekil 4.8.). MİK/8 konsantrasyonlarda Adaçayı ve kekik, MİK/16 konsantrasyonlarda ise adaçayı, kekik ve nane yağlarına ait ortalama inhibisyon yüzdeleri birbirlerine çok yakın bulunmuştur.



Şekil 4.9. Biyofilm oluşumunun inhibisyonu çalışması, tüplerde boyanmış biyofilmler.

4.2.3. Önceden oluşmuş biyofilmin eradikasyonu

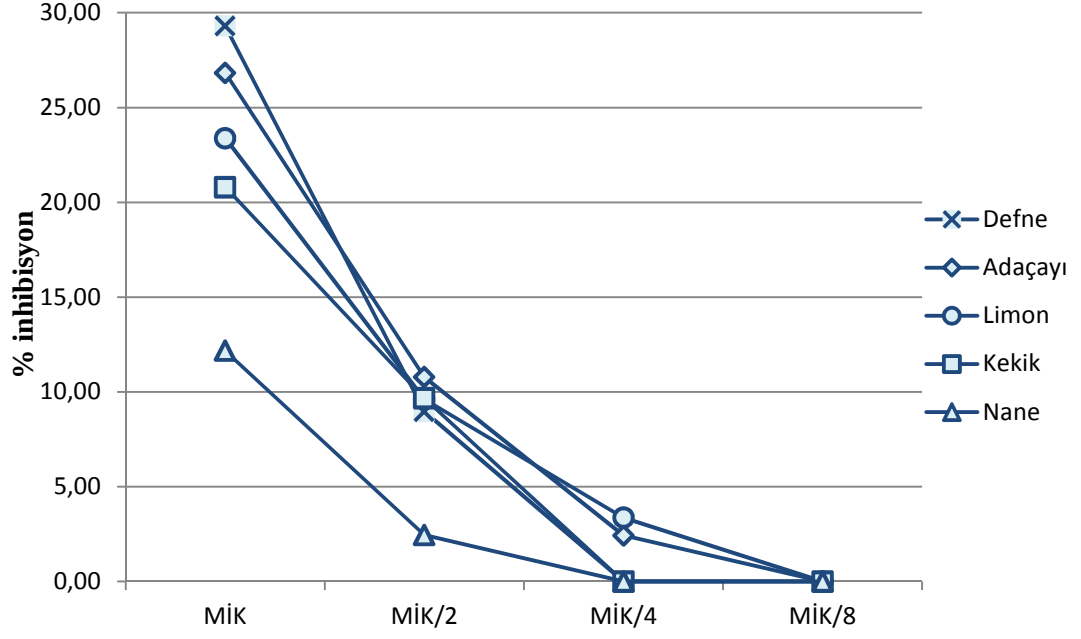
72s. inkübasyon sonucu oluşmuş *L. pneumophila* biyofilmleri içeren ortamlara MİK ve MİK altı konsantrasyonlarda bitkisel yağların ilave edilmesi sonucu mevcut biyofilm oranındaki azalma tespit edilmeye çalışılmıştır.

Sonuçlara göre tüm yağların MİK konsantrasyonlarında biyofilm giderimi etkileri tespit edilmiş, ancak MİK/8 konsantrasyonlarında biyofilm giderici etki göstermedikleri görülmüştür (Çizelge 4.8.). En yüksek biyofilm giderimi defne yağının MİK konsantrasyonunda, 49.1 ± 2.7 oranında inhibisyon ile L10 suşu üzerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Bitkisel yağların önceden oluşmuş *L. pneumophila* biyofilmini giderim oranları

Suşlar	L3	L4	L5	L7	L8	L10
Adaçayı yağı (% İnhibisyon)						
MİK	21.6±3.3*	17.6±2.9	39.4±6.5**	26.9±4.0*	20.3±2.2*	35.2±6.8*
MİK/2	6.2±1.6	4.5±2.8	19.9±7.0*	12.9±3.5*	5.5±3.5	15.7±5.5
MİK/4	TE	TE	4.7±3.0	3.3±2.5	TE	6.6±2.3
MİK/8	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Kekik yağı (% İnhibisyon)						
MİK	15.5±4.4	22.0±2.7	25.4±2.0*	31.9±2.4*	15.4±1.7	14.6±2.5
MİK/2	13.5±4.1	10.8±3.1	15.4±3.1	8.8±1.2	6.2±2.3	3.3±1.5
MİK/4	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MİK/8	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Nane yağı (% İnhibisyon)						
MİK	16.6±2.5	9.6±2.6	11.5±3.9	8.6±2.9	10.0±4.0*	16.7±1.5**
MİK/2	9.2±2.6	TE	TE	TE	5.5±2.5	TE
MİK/4	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MİK/8	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Defne yağı (% İnhibisyon)						
MİK	40.9±2.8*	13.6±3.6	22.4±7.0*	29.1±2.7*	20.7±5.7	49.1±2.7*
MİK/2	15.5±5.0	4.8±2.2	TE	9.9±7.4	1.7±1.5	21.9±4.2
MİK/4	TE	TE	TE	TE	TE	TE
MİK/8	TE	TE	TE	TE	TE	TE
Limon yağı (% İnhibisyon)						
MİK	24.1±4.8*	11.8±3.6	19.9±6.2*	25.9±2.4*	24.4±6.0*	34.2±2.7*
MİK/2	16.7±4.3*	4.2±2.2	TE	8.8±4.6	15.1±3.4	12.9±3.6
MİK/4	15.3±1.4	TE	TE	TE	4.9±2.1	TE
MİK/8	TE	TE	TE	TE	TE	TE

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ TE: Tespit Edilemedi



Şekil 4.10. Bitkisel yağların *L. pneumophila* biyofilm giderici etkileri.

L. pneumophila suşlarının ortalama değerlerine göre yağların biyofilm giderim oranları birbirlerine çok yakın seviyelerde bulunmuştur (Şekil 4.10.). MİK konsantrasyonlarında en yüksek giderim defne yağına ait iken, diğerleri adaçayı yağı, limon yağı, kekik yağı ve nane yağı şeklinde sıralanmaktadır. MİK/2 konsantrasyonlarında nane yağı hariç tüm yağlar birbirlerine çok yakın değerlerde biyofilm giderimine sahipken, MİK/4 konsantrasyonlarında tüm değerlerin sıfıra yaklaştığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE YORUM

5.1. *L.pneumophila* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özellikleri

L. pneumophila müşkülpesent üreme özelliklerine sahip bir bakteridir. Doğada aquatik ortamlarda protozoa hücreleri veya biyofilm içerisinde olmadığı takdirde çoğalamadığı kabul edilmektedir. Bir mikroorganizmanın çoğalamadığı bir ortamda, yüzeye tutunarak biyofilm oluşturması da oldukça zor bir süreçtir. Elde ettiğimiz biyofilm oluşumu sonuçlarına göre *L. pneumophila* suşları, çoğalamadıkları steril musluk suyu ortamında, zayıf da olsa biyofilm oluşturmaktadırlar. OD sonuçları 570nm’de 0.404 - 0.614 ve biyofilm (OD/cutoff) değerleri 0.96 – 1.45 arasında bulunmuştur. Steril musluk suyu elde edilirken, besin olarak kullanılabilecek ölü bakteri hücrelerine engel olmak amacıyla, musluk suyu 0.20 nm por çaplı membran filtre ile steril edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan *L. pneumophila* suşlarının BYE besiyerinde 6 tanesi orta (++) , 5 tanesi zayıf (+) derecede biyofilm üretimi göstermiştir. Steril musluk suyundaki en yüksek biyofilm OD/cutoff değeri 1.45 iken, BYE’deki en düşük değer 1.72’dir. Bu durum suşların çoğalabildikleri besiyeri ortamındaki biyofilm yeteneklerinin de orta seviyeyi geçemediğini ortaya koymuştur. Bu açıdan bakıldığında steril musluk suyundaki biyofilm değerleri daha anlamlı gözükmemektedir. Sonuçlar çalışmamızdaki *L. pneumophila* suşlarının musluk suyunda herhangi besin maddesi veya önceden oluşmuş biyofilm olmaksızın tutunarak, biyofilm oluşturabildiklerini göstermektedir.

Mampel vd. (2006) benzer bir yöntemle *L. pneumophila* suşlarının BYE’de oluşturdukları biyofilmler için 600nm’deki absorbansını OD 3.0 olarak tespit etmişlerdir. Tai vd. (2012) ise 550 nm’de OD 0.2 ila 0.8 arasında değişen değerler bulmuşlardır. Çalışmamızdaki biyofilm sonuçları Mampel vd. (2006)’ya göre yaklaşık 3 kat daha düşük olmakla birlikte, Tai vd. (2012)’nin sonuçları ile uyumlu gözükmemektedir. Burada dikkat çeken nokta Mampel vd. (2006) klinik ve çevresel

izolatlar kullanırken, Tai vd. (2012) bizim çalışmamızda da olduğu gibi su sistemlerinden izole edilmiş *L. pneumophila* suşları kullanmışlardır. Aradaki 3 kat absorbans farkının, yöntemler arası küçük farklılıklardan ziyade, kullanılan suşlara bağlı olması muhtemel gözükmemektedir.

Su sistemlerinde dezenfeksiyon işlemleri ile mikroorganizmalarının çoğunun ölmesi sonucunda, dezenfeksiyondan kurtulabilen mikroorganizmalar için rekabetin olmadığı ve ölü hücre atıklarının bol bulunduğu bir ortam oluşmaktadır. *L. pneumophila*'nın su sistemlerinde yüksek sıcaklık ile dezenfeksiyonu takiben daha yüksek konsantrasyonlara ulaşabildiği bildirilmiştir (Kooij vd., 2005; Vervaeren vd., 2006). Temmerman vd. (2006) yaklaşık 10^6 cfu/ml *L. pneumophila* hücresi ve 10^9 /ml ölü *P.putida* hücresi içeren inokulumdaki *L. pneumophila* konsantrasyonunun 96 s sonunda 1.1×10^7 'ye yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuç *L. pneumophila*'nın ölü bakteri hücrelerini besin olarak kullanarak gelişebildiğini göstermektedir. Bu sayede su sistemlerinde diğer bakterilerin ölmelerini sağlayan dezenfeksiyon işlemlerinin, hayatta kalabilen *L. pneumophila* hücreleri için üreme fırsatı yaratabileceği anlaşılmaktadır.

Bizim çalışmamızda ise, *L. pneumophila*'nın benzer ölü hücre ortamlarında biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmıştır. Altı *L. pneumophila* suşuna karşı 5 farklı ölü bakteri hücresi içeren ortamın denenmesi ile ortaya çıkan 30 adet biyofilm oluşumu sonucundan, 7 tanesi $P < 0.05$ ve 3 tanesi $P < 0.01$ seviyesinde steril musluk suyunda oluşan biyofilmlerden fazla bulunmuştur. Başka bir deyişle, nekrotrofik ortamda yapılan denemelerin 3'te birinde *L.pneumophila* hücrelerinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede biyofilm oluşturabildikleri tespit edilmiştir.

Literatür taramasında, ölü hücre ortamında biyofilm oluşumunun araştırıldığı başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sonuçlar *L. pneumophila* hücrelerinin ölü bakteri hücreleri üzerinde üreyebildiği bilgisini tamamlayıcı niteliktedir. Bu sonuçlar ışığında, su sistemlerinde *Legionella* dezenfeksiyonu çalışmalarının sık aralıklarla ve farklı metotlar denenerek birkaç kez tekrar edilmesi gerektiği ve özellikle su depolarında sedimentin uzaklaştırılması gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Gerek doğada ve gerekse su şebeke sistemlerinde mikroorganizmalar birbirleriyle ilişki içerisinde yaşamaktadır. Protozoalar *L. pneumophila*'nın hayat döngüsünde konak rolü oynamaktadırlar ve bu nedenle özellikle biyofilm içinde birlikte

bulunmaktadırlar. Fakat biyofilmlerin içerisinde sadece protozalar değil, farklı bakteri türleri de *L. pneumophila* ile birarada bulunabilmektedir. Çalışmamızın bu bölümü su sistemlerinde bulunabilen diğer bakteri türlerinin biyofilm oluşturma açısından *L. pneumophila* ile ilişkilerini incelemeyi amaçlamaktadır.

L. pneumophila'nın farklı mikroorganizmalar tarafından oluşturulmuş biyofilm yapılarına katılabilirdiği bilinmektedir. Bu konuda laboratuvar ortamında ve doğada yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır.

Murga vd. (2001) *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* ve *Flavobacterium sp.* tarafından oluşturulmuş biyofilm içinde *L. pneumophila*'nın 15 gün boyunca tutunabildiğini göstermişlerdir. Stewart vd. (2012) ise yukarıda sayılan 3 bakteri türü ve *P.fluorescens* tarafından oluşturulmuş biyofilmler ile yaptıkları denemelerde, *L. pneumophila*'nın *P. aeruginosa* tarafından oluşturulmuş biyofilmlerde tutunamadığı, diğer bakterilere ait biyofilmlerde ise 12 güne kadar tutunabildiğini göstermişlerdir. Kimura vd. (2009) *P.aeruginosa* QS moleküllerinin *L.pneumophila*'nın üremesini ve biyofilm oluşturmalarını baskıladığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise *L. pneumophila*'nın, gram (+) bir bakteri olan *E. faecalis* ve gram (-) bakteriler *K. pneumoniae*, *P.fluorescens* ve *P.putida* ile pozitif yönde biyofilm oluşturma etkileşimine sahip olduğu ortaya konulmaktadır. Bahsedilen türlerle birlikte oluşturdukları biyofilmler istatistiksel olarak anlamlı seviyede, tek bir türe ait biyofilm değerlerinden fazla bulunmuştur (Şekil 4.4.). Bu sonuçlar *L. pneumophila*'nın bahsedilen bakteri türleri ile birlikte biyofilm oluşturabildiğini göstermektedir.

Sonuçlarımıza göre, literatür bilgileriyle de uyumlu olarak, *L. pneumophila* ile *P.aeruginosa* (-) negatif yönde biyofilm oluşturma etkileşimine sahiptirler. İki bakteri türünün birlikte inkübasyonu sonucu oluşan biyofilm değeri, tek başlarına oluşturdukları biyofilmlere ait değerlerden daha düşük değerde bulunmuştur. Fakat tam tersine önceden oluşmuş *P.aeruginosa* biyofilmi üzerine *L. pneumophila* ilave edildiğinde kontrol değerlerine nispeten anlamlı bir artış gözlenmiştir. Çalışma sonuçları *L. pneumophila* suşlarının *P. aeruginosa* biyofilmlerine tutunabildiğini ve literatürde yer alan sonuçların bir genel kural olmayabileceğini göstermiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *L. pneumophila* çalışmamızdaki türler arasında en fazla *K.pneumoniae*'ye ait biyofilm üzerinde tutunarak gelişebilmektedir. *K.pneumoniae*

ve *E.faecalis*'in hem birlikte biyofilm oluşturma, hem mevcut biyofilm üzerine kolonizasyon yönünden *L. pneumophila* ile pozitif etkileşim içerisinde oldukları görülmüştür. *E.aerogenes* ise ne biyofilm oluşturma, ne de biyofilm üzerine tutunabilme yönünden *L.pneumophila* ile herhangi bir etkileşim göstermemiştir.

Çalışmamızdaki diğerk *Pseudomonas* türleri olan *P.putida* ve *P.fluorescens* ise *L. pneumophila* ile birlikte biyofilm oluşturmalarına rağmen, bu türlere ait mevcut biyofilmlere *L. pneumophila*'nın kolonize olamadığı sonuçlardan anlaşılmaktadır. Hatta *P.putida* biyofilmlerinde sadece TSB ilave edilen kontrol değerlerine nazaran, *L. pneumophila* ilave edilen örneklerin değerlerinde düşüş saptanmıştır.

Bu bulgulara dayanılarak iki bakteri türü arasındaki biyofilm oluşumu esnasında görülen etkileşimlerin, aynı türlerden birisine ait mevcut biyofilme diğerkinin yerleşmeye çalışması sırasında ters yönde etki gösterdiği söylenebilir.

Çalışmamızdaki *L. pneumophila* harici bakteri türlerinin 24s. inkübasyon sonunda oluşturdukları biyofilm üzerine sadece TSB'nin veya biyofilmi oluşturan bakterinin TSB'deki solusyonunun eklenmesinin birbirlerine çok yakın sonuçlar verdiğı görülmüştür. Bu durum 72s.lik inkübasyon süresinin, müşkülpesent üreme özellikli *L. pneumophila* hücrelerinin statik kültürde tutunarak üreyebilmesi için optimum iken, diğerk türler için uzun olduğı ve biyofilmden ayrılmalar olduğı şeklinde yorumlanabilir. Çizelge 4.3.'te de görüleceğı gibi *L. pneumophila* harici bakteri türlerine ait biyofilm miktarları 24s'te maksimum seviyede iken, 72s'te belirgin olarak düşmektedir.

5.2. Bitkisel Yağların *L.pneumophila* Üzerine Antibakteriyel ve Antibiyofilm Etkileri

Bitkiler geleneksel tıp alanında pek çok hastalığa karşı kullanılmaktadırlar (Cornara vd., 2010; Kargioğlu vd., 2010; Sarı vd., 2010). Bu nedenle ilaç ve antimikrobiyal madde araştırmalarında bitki ekstratları çok önemli bir yere sahiptir (Fabricant ve Farnsworth, 2001). Özellikle esansiyel yağlar biyolojik etkileri yönünden pek çok araştırmaya konu olmuşlardır (Bakkali vd., 2008; Faleiro, 2011).

Çalışmamızda kullanılan bitkisel yağların literatürde pek çok farklı mikroorganizmaya karşı antibakteriyel etkileri gösterilmiştir. Çizelge 5.1.'de bu

çalışmalara ve bulunan MİK değerlerine örnekler verilmektedir. Çizelge yağlara ve referans gösterilen yayımlara göre düzenlemiştir.

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan bitkisel yağların farklı mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkilerine dair literatür örnekleri

Esansiyel Yağ	Kaynak	Mikroorganizma	MIC değeri
Adaçayı yağı (<i>Salvia officinalis</i>)	Sookto vd. (2013)	<i>C. albicans</i>	2.78 g/L
		<i>S. aureus</i>	60 ppm
	Jirovetz vd. (2006)	<i>E. faecalis</i>	60 ppm
		<i>E. coli</i>	60 ppm
		<i>P. aeruginosa</i>	6 ppm
		<i>K. pneumoniae</i>	600 ppm
		<i>P. vulgaris</i>	60 ppm
		<i>S. aureus</i>	1.25 µl/ml
	Mitic-Culafic vd. (2005)	<i>B. subtilis</i>	0.30 µl/ml
	Pierozan vd. (2009)	<i>E. coli</i>	4.62-6.93 mg/ml
		<i>K. pneumoniae</i>	6.93 mg/ml
		<i>S. marcescens</i>	6.93 mg/ml
		<i>S. flexneri</i>	6.93 mg/ml
		<i>B. subtilis</i>	3.42 mg/ml
		<i>E. faecalis</i>	2.87 mg/ml
		<i>M. luteus</i>	6.93 mg/ml
		<i>S. mutans</i>	4.62 mg/ml
Kekik yağı (<i>Thymus vulgaris</i>)	Thosar vd. (2013)	<i>E. faecalis</i>	32 µl/ml
		<i>E. coli</i>	2 µl/ml
		<i>S. aureus</i>	32 µl/ml
		<i>C. albicans</i>	16 µl/ml
	Sokovic vd. (2009)	Fungus	0.05-0.25 µl/ml
	Sadiki vd. (2014)	<i>E. coli</i>	0.03 (% v/v)
		<i>S. aureus</i>	0.03 (% v/v)
	Al-Shuneigat vd. (2014)	<i>E. coli</i>	0.0625 (% v/v)
		<i>K. pneumoniae</i>	0.125 (% v/v)
		MRSA	0.25 (% v/v)
		<i>P. aeruginosa</i>	0.5 (% v/v)
		<i>P. mirabilis</i>	0.25 (% v/v)
	Khan vd. (2014)	<i>S. epidermidis</i>	0.125 (% v/v)
		<i>Candida sp.</i>	90-360 µg/ml
	Gonçalves vd. (2011)	<i>S. mutans</i>	NT*
	Millezi vd. (2012)	<i>L. monocytogenes</i>	0.5 (%)
		<i>P. aeruginosa</i>	5 (%)
		<i>S. aureus</i>	0.5 (%)
		<i>E. coli</i>	50 (%)
	Millezi vd. (2012)	<i>S. enteridis</i>	10 (%)
	Sandasi vd. (2011)	<i>P. aeruginosa</i>	1-8 mg/ml
		<i>C. albicans</i>	1-1.25 mg/ml
Nane yağı (<i>Mentha piperita</i>)	Thosar vd. (2013)	<i>E. faecalis</i>	32 µl/ml
		<i>E. coli</i>	1 µl/ml
		<i>S. aureus</i>	2 µl/ml
		<i>C. albicans</i>	0.5 µl/ml
	Sokovic vd. (2009)	Fungus	1-3 µl/ml

Çizelge 5.1. (devam)

	Ertürk (2006)	<i>E. coli</i>	5 mg/ml	
		<i>S. aureus</i>	5 mg/ml	
		<i>P. aeruginosa</i>	5 mg/ml	
		<i>B. subtilis</i>	5 mg/ml	
	Ceylan vd. (2014b)	<i>S. aureus</i>	1 µl/ml	
		<i>S. epidermidis</i>	>25 µl/ml	
		<i>P. aeruginosa</i>	>25 µl/ml	
	İşcan vd.	<i>E.coli</i>	1.25-2.5 mg/ml	
		<i>S. aureus</i>	0.625-2.5 mg/ml	
		<i>P. aeruginosa</i>	2.5-5.0 mg/ml	
		<i>E. aerogenes</i>	1.25-2.5 mg/ml	
		<i>P. vulgaris</i>	1.25-5.0 mg/ml	
		<i>S. typhimurium</i>	1.25-2.5 mg/ml	
		<i>L. monocytogenes</i>	0.156-2.5 mg/ml	
		<i>Y. enterocolitica</i>	2.5 mg/ml	
	Saharkhiz vd. (2012)	<i>Candida sp.</i>	0.5 – 40 µl/ml	
		<i>Aspergillus sp.</i>	0.5 – 40 µl/ml	
	Tsai vd. (2013)	<i>E. coli</i>	0.15-0.23 (% v/v)	
		<i>S. aureus</i>	0.08-0.09 (% v/v)	
		<i>P. aeruginosa</i>	0.92-1.22 (% v/v)	
	Sandasi vd. (2011)	<i>P. aeruginosa</i>	0.75-1 mg/ml	
		<i>C. albicans</i>	1-2.5 mg/ml	
Limon yağı (<i>Citrus limon</i>)	Prabuseenivasan vd. (2006)	<i>S. aureus</i>	>12.8 mg/ml	
		<i>B. subtilis</i>	>12.8 mg/ml	
		<i>K. pneumoniae</i>	>12.8 mg/ml	
		<i>P. vulgaris</i>	>6.4 mg/ml	
		<i>E. coli</i>	>6.4 mg/ml	
		<i>P. aeruginosa</i>	12.8 mg/ml	
	Dhanavade vd. (2011)	<i>S.typhimurium</i>	NT*	
		<i>M. aureus</i>	NT*	
		<i>P. aeruginosa</i>	NT*	
	Upadhyay vd. (2010)	<i>K. pneumoniae</i>	0.25 µl/ml	
		<i>E. coli</i>	0.125 µl/ml	
		<i>M. luteus</i>	1.0 µl/ml	
		<i>S. pneumoniae</i>	1.0 µl/ml	
		<i>S. aureus</i>	2.0 µl/ml	
		<i>B. cereus</i>	0.125 µl/ml	
		<i>L. acidophilus</i>	0.25 µl/ml	
	Defne yağı (<i>Laurus nobilis</i>)	Derwich vd. (2009)	<i>S. aureus</i>	0.35 mg/L
			<i>S. intermedius</i>	0.56 mg/L
			<i>K. pneumoniae</i>	0.70 mg/L
Simic vd. (2004)		Fungus	10-40 µl/ml	
Ertürk (2006)		<i>E. coli</i>	5 mg/ml	
		<i>S. aureus</i>	5 mg/ml	
Ertürk (2006)		<i>P. aeruginosa</i>	5 mg/ml	
		<i>B. subtilis</i>	5 mg/ml	
Al-Hussaini ve Mahasneh (2009)		<i>S. aureus</i>	0.5-0.75 mg/disk	
		<i>E. coli</i>	0.5-3.0 mg/disk	
		<i>P. aeruginosa</i>	0.5-3.0 mg/disk	
		<i>B. subtilis</i>	0.5-1.0 mg/disk	
		<i>K. pneumoniae</i>	0.5-2.4 mg/disk	

Çizelge 5.1. (devam)

Millezi vd. (2012)	<i>L. monocytogenes</i>	5 (%)
	<i>P. aeruginosa</i>	15 (%)
	<i>S. aureus</i>	50 (%)
	<i>E. coli</i>	0.5 (%)
	<i>S. enteridis</i>	1.5 (%)
Babic vd. (2014)	<i>L. pneumophila</i>	0.4 µg/ml

*NT: Antibakteriyel etki tespit edilmiş, MİK değeri bildirilmemiş.

Mitic-Culafic vd. (2005) sonuçlarına göre, adaçayı esansiyel yağı *B.subtilis* (MİK:0.30 µl/ml) ve *S.aureus* (MİK:1.25 µl/ml) gibi gram pozitif bakterilere karşı, *L. pneumophila*'ya karşı bulunandan 10 ila 50 kat daha fazla antimikrobiyal aktivite göstermektedir.

Kekik yağı için aynı bakterilere karşı değişken MİK değerleri bildirildiği görülmektedir. Örneğin *S. aureus* için 32 µl/ml (Thosar vd., 2013) ve %0.03 (v/v) (Sadiki vd., 2014) gibi birbirinin yaklaşık 10 katı konsantrasyonlar bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda *L. pneumophila* için bulunan değerler literatürdeki kekik yağına ait MİK yelpazesi içinde yer almaktadır.

Upadhyay vd. (2010) tarafından limon yağı için farklı bakteri türlerine karşı bulunan MİK değerleri (0.125 – 2.0 µl/ml), bu tez çalışmasında *L. pneumophila* için bulunan MİK değerleri (0.83 - 1.25 µl/ml) ile uyumlu gözükmemektedir.

Nane yağının *E.coli*, *S.aureus* ve funguslara karşı bildirilen MİK değerleri (Sokovic vd. 2009; Thosar vd., 2013; Tsai vd., 2013; Ceylan vd., 2014b) ile *L.pneumophila*'ya karşı bulduğumuz MİK değerleri, birbirlerine yakın değerler içermektedir.

Çizelge 5.1.'deki farklı bakterilere karşı sonuçlar ile *L. pneumophila*'ya karşı bulduğumuz MİK değerlerinin birlikte yorumlanması, kekik, limon ve nane yağlarının literatürde bildirilen diğer mikroorganizmalar ile *L. pneumophila*'ya karşı birbirine yakın antimikrobiyal aktiviteler sergilediğini göstermektedir. Adaçayı yağının *L.pneumophila*'ya karşı antibakteriyel etkisinin ise diğer mikroorganizmalara göre daha düşük olduğu görülmektedir.

Defne yağının ise *L. pneumophila*'ya karşı literatürde yer alan bakterilerin çoğundan daha düşük MİK değerlerine sahip olduğu, yani daha fazla antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Tez çalışmamızda kullanılan suşların eritromisine karşı duyarlı oldukları görülmektedir. Suşlardan 3 tanesi BSAC (Anonim 2013b) tarafından yabancı tip *L. pneumophila* suşları için bildirilen eritromisine duyarlılık seviyesinden daha düşük MİK oranlarına sahipken, 8 tanesinin MİK değerleri bu aralık içerisinde. Bu durum kullanılan suşların antibiyotiklere aşırı dirençli mutant suşlar olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan bitkisel yağların pek çok bakteri türü üzerine antibakteriyel etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, *L. pneumophila* üzerine etkilerini ortaya koyan sadece iki çalışma bulunabilmiştir. Babic vd. (2014) defne esansiyel yağının *L.pneumophila* için MİK ve MBK değerlerini, sırasıyla 0.4 ve 3.2 µg/ml olarak bildirmişlerdir. MİK değerlerini ağırlık/hacim cinsinden bildirdiklerinden dolayı, Babic vd. (2014) sonuçları ile bu çalışmadaki sonuçlar arasında tam bir mukayese yapmak mümkün olmamıştır.

Furuhata vd. (2000) aralarında kekik, nane ve adaçayının da bulunduğu 28 türe ait kurutulmuş bitki ekstratının *L. pneumophila* üzerine antibakteriyel etkilerini disk difüzyonu yöntemi ile denemiş ve 22 bitki ekstratının antibakteriyel etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle geyik otu, ebegümeci, kekik, nane ve adaçayının düşük dilusyon oranlarında bile antibakteriyel etkilerini sürdürdüklerini belirtmişlerdir. Ancak Furuhata vd. (2000) sadece inhibisyon zon çaplarını belirtip, MİK veya MBK değerlerini bildirmediğinden ve bitkisel yağ değil bitki ekstraktı kullanıldığından dolayı, bu çalışmadaki sonuçlar ile kıyaslama yapılamamıştır. Britanya Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği (BSAC), disk difüzyon metodunun müşkülpesent bakteriler için uygun olmadığını bildirdiğinden (Anonim, 2013b) tez çalışmamızda bu metod kullanılmamıştır.

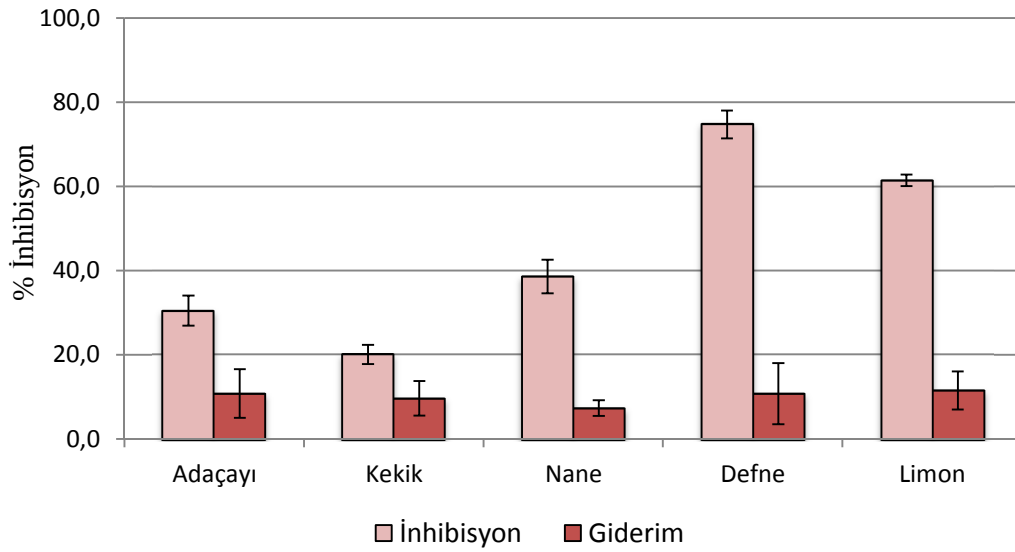
Furuhata vd. (2003) tarafından greyfurt (*Citrus paradisi*) tohum ekstraktının *L. pneumophila* üzerine antibakteriyel etkisi gösterilmiş ve MİK değerleri 98-390 mg/l olarak bildirilmiştir.

Mondello vd. (2009) *Melaleuca alternifolia* (Avustralya çay ağacı) yağının *L. pneumophila* için MİK değerlerini %0.125-0.5 (v/v) olarak bildirmişlerdir. Bu değerlere göre defne ve limon yağları *M. alternifolia*'dan daha fazla anti-legionella etkiye sahiptirler.

Meşe yosunu ve huş ağacı katran yağının *L. pneumophila* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip oldukları Shimizu vd. (2009) tarafından gösterilmiştir. MİK değerleri sırasıyla %0.0020 ve %0.0024 (v/v) olarak bildirilmiştir. Bu değerler bizim çalışmamızdaki en küçük MİK değerinden (Defne yağı, 0.044-0.1 µl/ml) 1/2 ila 1/5 oranında daha düşüktürler.

Çalışmamızda kullanılan bitkisel yağların tamamının MİK altı konsantrasyonlarda *L. pneumophila*'nın biyofilm oluşturmalarını önleyici, MİK ve MİK/2 konsantrasyonlarında ise oluşmuş biyofilmi giderici aktivitelere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Biyofilm oluşumunun önlenmesi ile mevcut biyofilmin giderimi aktivitelerinin birbirlerinden oldukça farklı oldukları anlaşılmaktadır. İki aktivitenin MİK/2 konsantrasyonu için karşılaştırılması Şekil 5.1.'de verilmiştir. Kekik yağında iki aktivite arasındaki % inhibisyon farkı yarı yarıya iken, defne yağında biyofilm oluşumunun önlenmesi oranı, giderim oranının yaklaşık 7 katı olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5.1. Bitkisel yağların MİK/2 konsantrasyonda *L. pneumophila* üzerine biyofilm oluşumu inhibisyonu ve oluşmuş biyofilmi giderici aktivitelerinin karşılaştırılması.

Literatürdeki *L. pneumophila* üzerine tek antibiyofilm çalışması, Nomura vd. (2013)'nin *Evernia prunastri* (meşe yosunu-oakmoss) ile yaptıkları çalışmadır. Bildirdikleri sonuçlara göre absolute oakmoss preparatlarının *L. pneumophila*

biyofilmleri üzerine inhibe edici etkisi bulunmamaktadır. Ancak didepside ve fenol türevi oakmoss bileşenlerinin MİK/2 konsantrasyonlarının %82-%83'e varan oranlarda biyofilm oluşumunu engelledikleri rapor edilmiştir. Bu oranlar bizim çalışmamızda denediğimiz bitkisel yağlara ait oranlardan daha yüksek seviyelerdedir. Sadece defne yağı %78'lere varan biyofilm inhibisyonu göstermiştir.

Kekik yağı ve nane yağının literatürde pek çok mikroorganizmaya karşı antibiyofilm etkileri bildirilmektedir. *Thymus vulgaris* esansiyel yağının *Candida albicans*'ın biyofilm oluşumunu MİK/2 konsantrasyonda %92.51 ve MİK/4 %88.3 oranında önlediği tespit edilmiştir (Khan vd., 2014). Kekik yağı bileşeni olan thymol ise *Gardnerella vaginalis* biyofilm oluşumunu MİK/2 konsantrasyonda %25 inhibe etmiştir (Braga vd., 2010). Al- Shuneigat vd. (2014) kekik yağının *S.aureus*, *S.epidermidis*, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *P.mirabilis* ve *P.aeruginosa* gibi pek çok bakteri türünde antibiyofilm aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada %inhibisyon oranları yerine OD değerlerinde %30'luk düşüş sağlayan yağ konsantrasyonlarını belirtmişlerdir.

Nane yağının *C.albicans* biyofilmini MİK altı konsantrasyonlarda % 21.8 - %60 oranında (Saharkhiz vd. 2012), *L.monocytogenes*'in biyofilm oluşturmamasını ise %60-70 oranında (Sandasi vd., 2009) inhibe ettiği bildirilmiştir. Ceylan vd. (2014) ise doza bağımlı olarak nane yağının *S.aureus* (%5.12-61.93), *P. aeruginosa* (%8.35-32.25), *S.epidermidis* (%5.12-31.97), *P.fluorescens* (%20-84.5) ve *C.albicans* (%10-52) oranlarında biyofilm inhibisyonu aktivitesini tespit etmişlerdir. Sandasi vd. (2011) nane yağının *P.aeruginosa* biyofilm oluşumunu %57 önlediğini, aynı bakteriye ait mevcut biyofilmi ise %38 giderdiğini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda en yüksek antibiyofilm aktiviteye sahip yağ olan defne yağının, *S.epidermidis* biyofilm oluşumunu da %8.5 ila %37.75 oranında önlediği bildirilmiştir (Chmit vd., 2014).

Limon yağının *E.coli*, *E.faecalis* ve *C.albicans* tarafından oluşturulmuş biyofilm üzerine uygulanması ile *E.coli* ve *C.albicans* üremesini %100, *E.faecalis*'i ise %49.3 inhibe ettiği Oliveira vd. (2014) tarafından bildirilmiştir.

Tüm bu sonuçlar, tez çalışmasında kullanılan bitkisel yağların *L. pneumophila* haricinde birçok farklı mikroorganizma üzerine de antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelere sahip olduklarını göstermektedir. Bu yağların veya yağlardan elde

edilecek maddelerin *L. pneumophila* dezenfeksiyonu amacıyla su şebeke sistemlerinde kullanılması, suda bulunan pek çok diğer mikroorganizmanın da etkisiz hale getirilmesini sağlayacaktır.

Biyofilm oluşumu *L. pneumophila*'nın yayılımı ve hastalık oluşturmak üzere insanlara geçişinde kilit nokta konumundadır. Tek hastalık kaynağı insan yapımı su sistemleridir. Biyofilmler sayesinde su sistemlerinde tutunabilmekte ve uzun süre hayatta kalabilmektedir. Bu nedenle *L. pneumophila* eliminasyonunda biyofilm oluşumunun önlenmesi de önemli bir yer tutmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, denenen bitkisel yağların hepsinin *L. pneumophila*'ya karşı antibakteriyel, bakterisidal ve antibiyofilm aktivitelere sahip olduklarını koymaktadır. Bu özellikleri ile *L. pneumophila*'nın dezenfeksiyonu çalışmalarında kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır. Bu bitkisel yağlar kozmetik ve koku özellikleri nedeniyle küvet, jakuzi gibi lejyoner hastalığı kaynağı olabilecek yerlerde direkt olarak da kullanılabilirler.

KAYNAKLAR

- Abraham, S.V.P.I., Palani, A., Ramaswamy, B.R., Shunmugiah, K.P. ve Arumugam, V.R. (2011) Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*, *Arch. Med. Res.*, 42: 658-668.
- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D.E. ve Guyard, C. (2013) Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila*, *Int.J.Mol.Sci.*, 14: 21660-21675.
- Akkaya, Z. ve Özbal, Y. (2011) Kayseride’ki farklı binaların su depolarında *Legionella* araştırması, *Sağlık bilimleri dergisi*, 20: 9-17.
- Al-Bakri, A.G., Othman, G. ve Afifi, F.U. (2010) Determination of the antibiofilm, antiadhesive, and anti-MRSA activities of seven *Salvia* species, *Pharmacogn Mag.*, 6: 264–270.
- Al-Dhabi, N.A., Balachandran, C., Raj, M.K., Duraipandiyan, V., Muthukumar, C., Ignacimuthu, S., Khan, I.A. ve Rajput, V.S. (2012) Antimicrobial, antimycobacterial and antibiofilm properties of *Couroupita guianensis* Aubl. fruit extract, *BMC Complement Altern Med*, 12: e242.
- Al-Hussaini, R. ve Mahasneh, A.M. (2009) Microbial Growth and Quorum Sensing Antagonist Activities of Herbal Plants Extracts, *Molecules*, 14: 3425-3435.
- Alim, A., Hakküden, Y. ve Poyraz, Ö. (2002) İç anadolu bölgesinde bulunan kaplıcaların termal havuz sularında *Legionella pneumophila* araştırması, *Mikrobiyol Bul*, 36: 237-246.
- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C. ve Frere, J. (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment, *Curr Microbiol*, 57: 497-502.
- Al-Shuneigat, J., Al-Sarayreh, S., Al-Saireh, Y., Al-Qudah, M. ve Al-Tarawneh, I. (2014) Effects of wild *Thymus vulgaris* essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria, *IOSR J Dental Med Sci*, 13(9): 62-66.

- Al-Sulami, A.A., Al-Tae, A.M. ve Yehyazarian, A.A. (2013) The effect of *Aeromonas spp.* on the growth of *Legionella pneumophila* in vitro, *Air Water Borne Diseases*, 2: e108.
- Anonim, *ISO 11731:1998 Water quality- Detection and enumeration of Legionella*, International Standards Organisation, 1998, 16s.
- Anonim (2000) EUCAST Definitive Document E.Def 3.1: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution, *Clin. Microbiol. Infect.*, 6(9): 509-515.
- Anonim, *Genelge 2001-34, Seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı kontrol programı*, T.C. Sağlık Bakanlığı T.S.H.G.M., Ankara, 2001, 25s.
- Anonim (2003) EUCAST Discussion Document E.Dis 5.1: Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution, *Clin. Microbiol. Infect.*, 9: ix-xv.
- Anonim, *The determination of Legionella bacteria in water and other environmental samples*, Environmental Agency of England, 2005, 40s.
- Anonim, *Legionella and the prevention of legionellosis*, WHO, India, 2007, 252s.
- Anonim (2011a) Legionellosis-United States, 2000–2009, *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 60(32): 1083-1086.
- Anonim, *EWGLI Technical guidelines for the investigation, control and prevention of travel associated Legionnaires' disease, version 1.1*, ECDC, 2011b, 73s.
- Anonim, *European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet): Operating procedures*, ECDC, Stockholm, 2012a, 18s.
- Anonim, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9. Edition (M07-A9)*, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne PA, 2012b, 68s.
- Anonim (2013a), *Legionnaires' disease in Europe, 2011*, ECDC, Stockholm, 2013, 34s.

- Anonim (2013b), *BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing, version 12*, British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Birmingham, United Kingdom, Mayıs 2013, 87s.
- Atlas, R.M. (1999) *Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control*, *Environ. Microbiol.*, 1: 283-293.
- Babić, A., Crnković, G., Malenica Staver, M. ve Gobin, I. (2014) Anti – *Legionella* activity of selected plant essential oils from Croatia, *24th International Medical Sciences Student Congress*, 17-18 Mayıs 2014, İstanbul.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils-a review, *Food Chem Toxicol.*, 46(2): 446-475.
- Bargellini, A., Marchesi, I., Righi, E., Ferrari, A., Cencetti, S., Borella, P. ve Rovesti, S. (2011) Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: Association with trace elements and heterotrophic plate counts, *Water Res.*, 45: 2315-2321.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I. ve Gilbert, P. (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: Physiological status and susceptibility to chemical inactivation, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2420-2425.
- Bartie, C., Venter, S.N. ve Nel, L.H. (2003) Identification methods for *Legionella* from environmental samples, *Water Res.*, 37: 1362-1370.
- Berendt, R. F. (1981) Influence of blue-green algae (cyanobacteria) on survival of *Legionella pneumophila* in aerosols, *Infect. Immun.*, 32: 690-692.
- Birteksöz, A.S., Zeybek, Z. ve Çotuk, A. (2002) In vitro activities of various antibiotics against *Legionella pneumophila* (P903), *Clin. Microbiol. Infect.*, 8(Supp.1): 195.
- Bodet, C., Sahr, T., Dupuy, M., Buchrieser, C. ve Hechard, Y. (2012) *Legionella pneumophila* transcriptional response to chlorine treatment, *Water Res.*, 46: 808-816.
- Bohach, G.A. ve Snyder, I.S. (1983) Cyanobacterial stimulation of growth and oxygen uptake by *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 528-531.

- Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F. ve Prior, R.B. (1985) Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Microbiol.*, 21: 674-677.
- Bopp, C.A., Sumner J.W., Morris, G.K. ve Wells, J.G. (1981) Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium, *J. Clin. Microbiol.*, 13: 714-719.
- Borella, P., Montagna, M. T., Romano-Spica, V., Stampi, S., Stancanelli, G., Triassi, M., Neglia, R., Marchesi, I., Fantuzzi, G., Tatò, D., Napoli, C., Quaranta, G., Laurenti, P., Leoni, E., De Luca, G., Ossi, C., Moro, M. ve D'Alcalà, G. R. (2004) *Legionella* infection risk from domestic hot water, *Emerging infectious diseases*, 10: 457-464.
- Borella, P., Montagna, M. T., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., Marchesi, I., Bargellini, A., Tatò, D., Napoli, C., Zanetti, F., Leoni, E., Moro, M., Scaltriti, S., D'Alcalà, G. R., Santarpia, R. ve Boccia, S. (2005) *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 5805-5813.
- Borges, A., Simoes, M., Murcia, A.M. ve Saavedra, M.J. (2012) Detection of *Legionella* spp. in natural and man-made water systems using standart guidelines, *J Microbiol Res*, 2: 95-102.
- Bott, T.R. (2011) Biofilms in Industry, 181-201, *Industrial Biofouling*, 1. Baskı, Elsevier, G. Britain, 220s.
- Braga, P.C., Sasso, M.D., Culici, M. ve Spallino, A. (2010) Inhibitory activity of thymol on native and mature *Gardnerella vaginalis* biofilms: in vitro study, *Arzneimittelforschung*, 60(11): 675-681.
- Bubulica, M.V., Anghel, I., Grumezescu, M., Saviuc, C., Anghel, G.A., Chifiriuc, M.C., Gheorghe, I., Lazar, V. ve Popescu, A. (2012) In vitro evaluation of bactericidal and antibiofilm activity of *Lonicera tatarica* and *Viburnum opulus* plant extracts on *Staphylococcus* strains, *Farmacia*, 60: 80-91.
- Budzynska, A., Wieckowska-Szakiel, M., Sadowska, B., Kalembe, D. ve Rozalska, B. (2011) Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components, *Pol. J. Microbiol.*, 60: 35-41.

- Burak, D.M. ve Zeybek, Z. (2011) Investigation of *Legionella pneumophila* and free living amoebas in the domestic hot water systems in İstanbul, *Turk J Biol*, 35: 679-685.
- Buse, H.Y., Schoen, M.E. ve Ashbolt, N.J. (2012) Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure, *Water Res.*, 46: 921-933.
- Buse, H.Y., Lu, J., Struewing, I.T. ve Ashbolt, N.J. (2014) Preferential colonization and release of *Legionella pneumophila* from mature drinking water biofilms grown on copper versus unplasticized polyvinylchloride coupons, *Int J Hyg Environ Health*, 217: 219-225.
- Carvalho, F.R.S., Foronda, A.S. ve Pellizari, V.H. (2007) Detection of *Legionella pneumophila* in zater and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in Sao Paulo-Brazil, *Braz. J.Microbiol.*, 38:743-751.
- Ceyhan, N. (2008) Klinikte biyofilmlerin önlenmesi için antibiyofilm stratejileri, *Turkish Journal of Infection*, 22(4): 227-240.
- Ceylan, Ö., Saraç, N., Uğur, A. ve Şahin, M.D. (2014a) The antimicrobial and antibiofilm activities of *Origanum vulgare* ssp. *viride* essential oils, endemic in Turkey, *J. Selçuk Uni Nat App Sci*, 3(2):28-34.
- Ceylan, Ö., Uğur, A., Saraç, N. ve Şahin, M.D. (2014b) The antimicrobial and antibiofilm activities of *Mentha x piperita* L. essential oil, *J. BioSci. Biotech.*, Special Edition/Online: 23-27.
- Chaabna, Z., Forey, F., Reyrolle, M., Jarraud, S., Atlan, D., Fontvieille, D. ve Gilbert, C. (2013) Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa, *BMC Microbiol.*, 13: e17.
- Chandler, F.W., Hicklin, M.D. ve Blackmon, J.A. (1977) Demonstration of the agent of legionnaires' disease in tissue, *N. Engl. J. Med.*, 297: 1218-1220.
- Chang, C.W., Chang, W.L. ve Chang, S.T. (2008a) Influence of pH on bioactivity of cinnamon oil against *Legionella pneumophila* and its disinfection efficacy in hot springs, *Water Res.*, 42: 5022-5030.

- Chang, C.W., Chang, W.L., Chang, S.T. ve Cheng, S.S. (2008b) Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*, *Water Res.*, 42: 278-286.
- Chmit, M., Kanaan, H., Habib, J., Abbass, M., Mcheik, A. ve Chokr, A. (2014) Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon, *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(12): 976-982.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. ve Beachey, E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices, *J. Clin. Microbiol.*, 22: 996-1006.
- Cianciotto, N.P. (2007) Iron acquisition by *Legionella pneumophila*, *Biometals*, 20: 323-331.
- Ciesielski, C.A., Blaser, M.J. ve Wang, W.L. (1984) Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 984-987.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S. ve Tompkins, L.S. (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*, *Infect. Immun.*, 67: 4427-4434.
- Coenye, T., Brackman, G., Rigole, P., Witte, E.D., Honraet, K., Rossel, B. ve Nelis, H.J. (2012) Eradication of *Propionibacterium acnes* biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds, *Phytomedicine*, 19: 409-412.
- Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S. ve Mariotti, M.G. (2009) Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy), *J Ethnopharmacol* 125: 16-30.
- Coscolla, M., Comas, I. ve Gonzalez-Candelas, F. (2011) Quantifying nonvertical inheritance in the evolution of *Legionella pneumophila*, *Mol. Biol. Evol.*, 28: 985-1001.
- Costa, J., Tiago, I., Da Costa, M.S. ve Verissimo, A. (2005) Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:663-671.

- Çotuk, A., Doğruöz, N., Zeybek, Z., Kimiran-Erdem, A. ve İlhan-Sungur, E. (2005) The effects of *Pseudomonas* and *Aeromonas* strains on *Legionella pneumophila* growth, *Ann. Microbiol.*, 55: 219-224.
- Davey, M.E. ve O'Toole G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 847-867.
- Den Boer, J.W. ve Yzerman, E.P. (2004) Diagnosis of *Legionella* infection in Legionnaires' disease, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 23: 871-878.
- Declerck, P., Behets, J., Delaedt, Y., Margineanu, A., Lammertyn, E. ve Ollevier, F. (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*, *Microb. Ecol.*, 50: 536-549.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., ve Ollevier, F. (2007) Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms, *Curr. Microbiol.*, 55: 435-440.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B. ve Ollevier, F. (2009) Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes, *Microbiol. Res.*, 164: 593-603.
- Declerck, P. (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*, *Environ. Microbiol.*, 12: 557-566.
- Delaedt, Y., Daneels, A., Declerck, P., Behets, J., Ryckeboer, J., Peters, E. ve Ollevier, F. (2008) The impact of electrochemical disinfection on *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* in tap water, *Microbiol. Res.*, 163: 192-199.
- Delgado-Viscogliosi, P., Simonart, T., Parent, V., Marchand, G., Dobbelaere, M., Pierlot, E., Pierzo, V., Menard-Szczebara, F., Gaudard-Ferveur, E., Delabre, K., ve Delattre, J.M. (2005) Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4086-4096.
- Derwich, E., Benziane, Z. ve Boukir, A. (2009) Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco, *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 3(4): 3818-3824.

- Dhanavade, M.J., Jalkute, C.B., Ghosh, J.S. ve Sonawane, K.D. (2011) Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract, *Br. J. Pharmacol. Toxicol.*, 2(3): 119-122.
- Diederer, B.M.W. (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease, *J. Infect.*, 56: 1-12.
- Ditommaso, S., Gentile, M., Giacomuzzi, M. ve Zotti, C.M. (2011) Recovery of *Legionella* species from water samples using an internal method based on ISO 11731: suggestions for revision and implementation, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 70: 200-206.
- Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J. ve Jarraud, S. (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different, *J. Clin. Microbiol.*, 42: 458-460.
- Domínguez, J.A., Manterola, J.M., Blavia, R., Sopena, N., Belda, F.J., Padilla, E., Giménez, M., Sabrià, M., Morera, J. ve Ausina, V. (1996) Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration, *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2334-2336.
- Donlan, R.M. (2001a) Biofilms and device-associated infections, *Emerging Infect. Dis.*, 7: 277-281.
- Donlan, R.M. (2001b) Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process, *Clin. Infect. Dis.*, 33: 1387-1392.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infect. Dis.*, 8: 881-889.
- Duncan, C., Prashar, A., So, J., Tang, P., Low, D.E., Terebiznik, M. ve Guyard, C., (2011) Lcl of *Legionella pneumophila* is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation, *Infect. Immun.*, 79: 2168-2181.
- Dunne, W.M. Jr. (2002) Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 155-166.

- Edelstein, P.H. (1981) Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 14: 298-303.
- Edelstein, P.H. ve Edelstein, M.A.C. (2000) In vitro activity of quinupristin/dalfopristin (Synercid, RP 59500) against *Legionella* spp., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 36: 49-52.
- Edelstein, P.H. ve Edelstein, M.A.C. (2010) Comparison of the plating efficiencies and shelf lives of three different commercial buffered charcoal yeast extract media supplemented with α -ketoglutaric acid, *J. Clin. Microbiol.*, 48: 1882-1883.
- El Zanfaly, H.T., Rüden, H. ve Weist, K. (2011) Possibility of symbiosis between some gram negatif bacteria and *Legionella pneumophila*, *Nature and Science*, 9: 19-28.
- Erdoğan, H., Can, F., Demirbilek, M., Timurkaynak, F. ve Arslan, H. (2010) In vitro activity of antimicrobial agents against *Legionella* isolated from environmental water systems, *Environ Monit Assess*, 171: 487-491.
- Ertürk, Ö. (2006) Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants, *Biologia*, 61(3): 275-278.
- Euzéby, J.P. (1997) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>)
- Fabricant, D.S. ve Farnsworth, N.R. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, *Environ Health Perspect*, 109(suppl 1): 69–75.
- Faleiro, M.L. (2011) The mode of antibacterial action of essential oils, 1143-1156, Mendez-Vilas, A. (Editör), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 1. Baskı, Formatex, Spain, 1348s.
- Farhat, M., Trouilhe, M.C., Briand, E., Moletta-Denat, M., Robine, E. ve Frere, J. (2010) Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation, *J. Appl. Microbiol.*, 108: 1073-1082.

- Farhat, M., Trouilhe, M.C., Foret, C., Hater, W., Moletta-Denat, M., Robine, E. ve Frere, J. (2011) Chemical disinfection of *Legionella* in hot water systems biofilm: a pilot-scale 1 study, *Water Sci. Technol.*, 64: 708-714.
- Farhat, M., Moletta-Denat, M., Frere, J., Onillon, S., Trouilhe, M.C. ve Robine, E. (2012) Effects of disinfection on *Legionella* spp., eukarya, and biofilms in a hot water system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 6850-6858.
- Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C. ve Baine, W.B. (1979) Charcoal-Yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*, *J.Clin. Microbiol.*, 10: 437-441.
- Fields, B.S., Benson, R.F. ve Besser, R.E. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 506-526.
- Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H. ve Thacker, L. (1979) Isolation of *Legionella pneumophila* from nonepidemic-related aquatic habitats, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1239-1242.
- Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L. ve Pope, D.H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 9-16.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., Brachman, P.S. ve The Field Investigation Team (1977) Legionnaires' Disease: Description of an epidemic of pneumonia, *N.Eng.J.Med.*, 297: 1189-1197.
- Fry, N.K., Warwick, S., Saunders, N.A. ve Embley, T.M. (1991) The use of 16s ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*, *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1215-1222.
- Fu, K.P. ve Neu, H.C. (1979) Inactivation of B-Lactam antibiotics by *Legionella pneumophila*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 561-564.
- Fujimoto, T., Tsuchiya, Y., Terao, M., Nakamura, K. ve Yamamoto, M. (2006) Antibacterial effects of Chitosan solution® against *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Food Microbiol.*, 112: 96-101.

- Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M. ve Fukuyama, M. (2000) Antibacterial activities of several herbs on *Legionella pneumophila*, *J. Azabu Univ.*, 1.2: 15-20.
- Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M. ve Fukuyama, M. (2003) Inactivation of *Legionella pneumophila* from whirlpool bath waters by grapefruit (*Citrus paradisi*) seed extract, *Biocontrol Sci*, 8: 129-132.
- Garcia-Vidal, C., Labori1, M., Viasus, D., Simonetti, A., Garcia-Somoza, D., Dorca, J., Gudiol, F. ve Carratala. J. (2013) Rainfall is a risk factor for sporadic cases of *Legionella pneumophila* pneumonia, *Plos ONE*, 8(4): e61036.
- Giao, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J. ve Keevil, C.W. (2011) Interaction of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori* with bacterial species isolated from drinking water biofilms, *BMC Microbiol.*, 11: e57.
- Gomez-Lus, R., Adrian, F., Del Campo, R., Gomez-Lus, P., Sanchez, S., Garcia, C. ve Rubio, M.C. (2001) Comparative in vitro bacteriostatic and bactericidal activity of trovafloxacin and moxifloxacin against clinical and environmental isolates of *Legionella* spp., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 18: 49-54.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C. ve Buchrieser, C. (2009) *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics, *Infect.Genet.Evol.*, 9: 727-739.
- Gonçalves, G.M.S., Bottaro, M. ve Nilson, A.C. (2011) Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*, *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 32(3): 375-380.
- Guerrieri, E., Bondi, M., Ciancio, C., Borella, P. ve Messi, P. (2005) Micro- and macromethod assays for the ecological study of *Legionella pneumophila*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 252: 113-119.
- Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., Niederhausern, S.D., Borella, P. ve Messi, P. (2008) Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*, *Curr. Microbiol.*, 57: 532-536.
- Guyard, C. ve Low, D.E. (2011) *Legionella* infections and travel associated legionellosis, *Travel Med Infect Dis*, 9: 176-186.

- Gün, İ. ve Ekinci, F.Y. (2009) Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam, *Gıda*, 34: 165-173.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. ve Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 95-108.
- Hall-Stoodley, L. ve Stoodley, P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, *Trends Microbiol.*, 13: 7-10.
- Hambleton, P., Broster, M.G., Dennis, P.J., Henstridge, R., Fitzgeorge, R. ve Conlan, J.W. (1983) Survival of virulent *Legionella pneumophila* in aerosols, *J.Hyg.,Camb.*, 90: 451-460.
- Harb, O.S., Gao, L.Y. ve Kwaik, Y.A. (2000) From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens, *Environ. Microbiol.*, 2: 251-265.
- Hécharde, Y., Ferraz, S., Bruneteau, E., Steinert, M. ve Berjeaud, J.M. (2005) Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide, *FEMS Microbiol. Lett.*, 252: 19-23.
- Hilbi, H., Jarraud, S., Hartland, E. ve Buchrieser, C. (2010) Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control, *Mol. Microbiol.*, 76: 1-11.
- Hilbi, H., Hoffmann, C. ve Harrison, C.F. (2011) *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence, *Environ Microbiol Rep*, 3: 286-296.
- Hindre, T., Brüggemann, H., Buchrieser C. ve Hechard, Y. (2008) Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation, *Microbiology*, 154: 30-41.
- Hrubá, L. (2009) The colonization of hot water systems by *Legionella*, *Ann Agric Environ Med*, 16: 115-119.
- Hoffman, P.S. (1997) Invasion of eukaryotic cells by *Legionella pneumophila*: A common strategy for all hosts? *Can.J. Infect. Dis.*, 8: 139-146.

- Hong, E.J., Na, K.J., Choi, I.G. ve Jeung, E.B. (2004) Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees, *Biol.Pharm. Bull.*, 27: 863-866.
- Hosainzadegan, H. ve Delfan, B. (2007) Evaluation of antibiofilm activity of dentol, *Acta Med Iran*, 47: 35-40.
- Huang, S.W., Hsu, B.M., Wub, S.F., Fan, C.W., Shih, F.C., Lin, Y.C. ve Ji, D.D. (2010) Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies, *Water Res.*, 44: 4805-4811.
- Imperato, P.J. (1981) Legionellosis and the indoor environment, *Bull. N.Y. Acad. Med.*, 57: 922-935.
- Itzen, A. ve Goody, R.S. (2011) Covalent coercion by *Legionella pneumophila*, *Cell Host Microbe*, 10: 89-91.
- İğnak, S. ve Gürler, B. (2012) Bir üniversite hastanesi su sistemlerinde *Legionella* türlerinin araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 42:110-114.
- İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H.C. ve Demirci, F. (2002) Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils, *J. Agric Food Chem.*, 50: 3943-3946.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A. ve Schmidt, E. (2006) Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of various *Salvia sp.* and *Thuja sp.* essential oils, *Ernahrung/Nutrition*, 9: 152-159.
- Jules, M. ve Buchrieser, C. (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: Clues from genomics and transcriptomics, *FEBS Lett.*, 581: 2829-2838.
- Kargıoğlu, M., Cenkci, S., Serteser, A., Konuk, M. ve Vural, G. (2010) Traditional uses of wild plants in the Middle Aegean Region of Turkey, *Hum Ecol*, 38: 429–450.
- Karpanen, T.J., Worthington, T., Hendry, E.R., Conway, B.R. ve Lambert, P.A. (2008) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*, *J. Antimicrob. Chemother.*, 62: 1031 –1036.

- Kavanaugh, N.L. ve Ribbeck, K. (2012) Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 4057-4061.
- Kessler, A., Schell, U., Sahr, T., Tiaden, A., Harrison, C., Buchrieser, C. ve Hilbi, H. (2013) The *Legionella pneumophila* orphan sensor kinase Lqst regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit, *Environ. Microbiol.*, 15: 646-662.
- Khan, M.S.A. ve Ahmad, I. (2012) Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms, *J Antimicrob Chemother*, 67: 618-621.
- Khan, M.S.A., Ahmad, I., Cameotra, S.S. ve Botha, F. (2014) Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp, *BMC Complement Altern Med.*, 14:337-350.
- Khweek, A.A., Davila, N.S.F., Caution, K., Akhter, A., Abdulrahman, B.A., Tazi, M., Hassan, H., Novotny, L.A., Bakaletz, L.O. ve Amer, A.O. (2013) Biofilm derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages, *Front Cell Infect Microbiol*, 3: e18.
- Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A. ve Kendall, A.M. (2002) Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems, *Water Res.*, 36: 4433-4444.
- Kim, J., Park, H.D. ve Chung, S. (2012) Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation, *Molecules*, 17: 9818-9834.
- Kimura, S., Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Miyairi, S., Gotoh, N., Ishiguro, M. ve Yamaguchi, K. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species, *Microbiology*, 155: 1934-1939.
- Kline, K.A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S. ve Henriques-Normark, B. (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions, *Cell Host Microbe*, 5: 580-592.

- Kooij, D.V.D., Veenendaal, H.R. ve Scheffer, W.J.H. (2005) Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene, *Water Res.*, 39: 2789-2798.
- Konishi, T., Yamashiro, T., Koide, M. ve Nishizono, A. (2006) Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator, *J. Biosci. Bioeng.*, 101: 478-484.
- Konishi, T., Nishizono, A., Yamashiro, T. ve Koide, M. (2011) Comparison of *Legionella* biofilm formations at three different temperatures in liquid flow, in static liquid and on agar plate, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 6: 160-172.
- Kuiper, M.W., Wullings, B.A., Akkermans, A.D.L., Beumer, R.R. ve Kooij, D.V.D. (2004) Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 6826-6833.
- Kusnetsov, J., Iivanainen, E., Elomaa, N., Zacheus, O. ve Martikainen, P.J. (2001) Copper and silver ions more effective against *Legionellae* than against *Mycobacteria* in a hospital warm water system, *Water Res.*, 35: 4217-4225.
- Kwaik, Y.A., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C. ve Harb, O.S. (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3127-3133.
- La Scola, B., Birtles, R.J., Greub, G., Harrison, T.J., Ratcliff, R.M. ve Raoult, D. (2004) *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 699-703.
- Lau, H.Y. ve Ashbolt, N.J. (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water, *J. Appl. Microbiol.*, 107: 368-378.
- Leonard, C.M., Virijevic, S., Regnier, T. ve Combrinck, S. (2010) Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms, *S. Afr. J. Bot.*, 76: 676-680.

- Leoni, E. ve Legnani, P.P. (2001) Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems, *J. Appl. Microbiol.*, 90: 27-33.
- Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P.P., Sacchetti, R., Stampi, S. ve Zanetti, F. (2005) *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems, *J. Appl. Microbiol.*, 98: 373-379.
- Liguori, G., Di Onofrio, V., Galle, F., Liguori, R., Nastro, R.A. ve Guida, M. (2014) Occurrence of *Legionella* spp. in thermal environments: virulence factors and biofilm formation in isolates from a spa, *Microchem J*, 112: 109-112.
- Limsuwan, S. ve Voravuthikunchai, S.P. (2008) *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Eleutherine americana* Merr. and *Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk. as antibiofilm producing and quorum sensing in *Streptococcus pyogenes*, *Immunol Med Microbiol*, 53: 429-436.
- Lin, Y.E., Stout, J.E., Yu, V.L. ve Vidic, R.D. (1998) Disinfection of water distribution systems for *Legionella*, *Semin Respir Infect*, 13: 147-159.
- Lin, Y.E., Vidic, R.D., Stout, J.E. ve Yu, V.L. (2002) Negative effect of high pH on biocidal efficacy copper and silver ions in controlling *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 2711-2715.
- Lin, Y.E., Stout, J.E. ve Yu, V.L. (2011) Controlling *Legionella* in hospital drinking water: An evidence-based review of disinfection methods, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 32: 166-173.
- Liu, Z., Lin, Y.E., Stout, J.E., Hwang, C.C., Vidic, R.D. ve Yu V.L. (2006) Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system, *J. Appl. Microbiol.*, 101: 437-442.
- Lucas, C.E., Brown, E. ve Fields B.S. (2006) Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention, *Microbiology*, 152: 3569-3573.
- Mallegol, J., Duncan, C., Prashar, A., So, J., Low, D.E., Terebeznik, M. ve Guyard, C. (2012) Essential roles and regulation of the *Legionella pneumophila* collagen-like adhesin during biofilm formation, *PloS ONE*, 7: e46462.

- Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Haegensen, J.A.J., Molin, S. ve Hilbi, H. (2006) Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2885-2895.
- Marchand, A., Verdon, J., Lacombe, C., Crapart, S., Hechard, Y. ve Berjeaud, J.M. (2011) Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides, *Peptides*, 32: 845-851.
- Marchesi, I., Marchegiano, P., Bargellini, A., Cencetti, S., Frezza, G., Miselli, M. ve Borella, P. (2011) Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital, *J. Hosp. Infect.*, 77: 47-51.
- Mashiba, K., Hamamoto, T. ve Torikai, K. (1993) A case of Legionnaires' disease due to aspiration of hot spring water and isolation of *Legionella pneumophila* from hot spring water, *Kansenshogaku Zasshi*, 67:163-166.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., Dowdle, W.R. ve The Laboratory Investigation Team (1977) Legionnaires's Disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in respiratory disease, *N. Engl.J. Med.*, 297: 1197-1203.
- McDade, J.E., Brenner, D.J. ve Bozeman, F.M. (1979) Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947, *Ann. Intern. Med.*, 90: 659-661.
- Mekkour, M., Driss, E.K.B., Tai, J. ve Cohen, N. (2013) *Legionella pneumophila*: An environmental organism and accidental pathogen, *International Journal of Science and Technology*, 2: 187-196.
- Merault, N., Rusniok, C., Jarraud, S., Gomez-Valero, L., Cazalet, C., Marin, M., Brachet, E., Aegerter, P., Gaillard, J.L., Etienne, J., Herrmann, L., the DELPH-I Study Group, Lawrence, C. ve Buchrieser, C. (2011) Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 1708-1717.
- Merritt, J.H., Kadouri, D.E. ve O'Toole, G.A. (2011) Growing and analyzing static biofilms, 1B.1.1–1B.1.17, Coico, R., McBride, A., Quarles, J.M., Stevenson, B., Taylor, R.K. (editörler), *Current Protocols in Microbiology*, Supp. 22, Wiley Online, New York.

- Miller, B.M. ve Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 165–199.
- Millezi, A.F., Caixeta, D.S., Rossoni, D.F., Cardoso, M.G. ve Piccoli, R.H. (2012) In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens, *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 32(1): 167-172.
- Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Knezević-Vukcević, J., Stanković, S. ve Simić, D. (2005) Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.), *Arch. Biol. Sci.*, 57(3): 173-178.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. ve Kwaik, Y.A. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 20-28.
- Molofsky, A.B. ve Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle, *Mol. Microbiol.*, 53: 29-40.
- Mondello, F., Girolamo, A., Scaturro, M. ve Ricci, M.L. (2009) Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions, *J. Microbiol. Methods*, 77: 243-248.
- Morris, G.K., Patton, C.M., Feeley, J.C., Johnson, S.E., Gorman, G., Martin, W.T., Skaliy, P., Mallison, G.F., Politi, B.D. ve Mackel, D.C. (1979) Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples, *Ann Intern Med.*, 90: 664-666.
- Moshe, M., Lellouche, J. ve Banin, E. (2011) Curcumin: a natural antibiofilm agent, 89-93, Mendez-Vilas, A. (Editör), *Science and Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation, Proceedings of the International Conference on Antimicrobial Research*, 1. Baskı, World Scientific, Singapore, 432s.
- Mouchtouri, V., Velonakis, E., Tsakalof, A., Kapoula, C., Goutziana, G., Vatopoulos, A., Kremastinou, J. ve Hadjichristodoulou, C. (2007) Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by *Legionella* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 1489–1492.

- Muder, R.R. ve Yu, V.L. (2002) Infection Due to *Legionella* Species Other Than *L. pneumophila*, *Clin. Infect. Dis.*, 35: 990-998.
- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S. ve Donlan, R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system, *Microbiology*, 147: 3121-3126.
- Murugan, K., Selvanayagi, K. ve Al-Sohaibani, S. (2011) Antibiofilm activity of *Andrographis paniculata* against cystic fibrosis isolate *Pseudomonas aeruginosa*, *World J Microbiol Biotechnol*, 27: 1661-1668.
- Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Dietz, K., Northoff, H. ve Lang, F. (2000) Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 914-919.
- Newton, H.J., Ang, D.K.Y., Driel, I.R. ve Hartland, E.L. (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 23: 274-298.
- Niu, C. ve Gilbert, E.S. (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 6951-6956.
- Nomura, H., Isshiki, Y., Sakuda, K., Sakuma, K., ve Kondo, S. (2012) The antibacterial activity of compounds isolated from oakmoss against *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp., *Biol. Pharm. Bull.*, 35: 1560-1567.
- Nomura, H., Isshiki, Y., Sakuda, K., Sakuma, K., ve Kondo, S. (2013) Effects of oakmoss and its components on biofilm formation of *Legionella pneumophila*, *Biol. Pharm. Bull.*, 36: 833-837.
- Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F. ve Blanco, A.R. (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms, *J. Med. Microbiol.*, 56: 519-523.
- Nostro, A., Marino, A., Blanco, A.R., Cellini, L., Giulio, M.D., Pizzimenti, F.C., Roccaro, A.S. ve Bisignano, G. (2009) In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact, *J. Med. Microbiol.*, 58: 791-797.

- Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. ve Yamaguchi, K. (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2540-2547.
- Oliveira, A. ve Cunha, M.L.R.S. (2010) Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci, *BMC Res Notes*, 3: e260.
- Oliveira, S.A.C., Zambrana, J.R.M., Di Iorio, F.B.R., Pereira, C.A. ve Jorge, A.O.C. (2014) The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms, *Braz Oral Res.*, 28(1): 22-27.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. ve Read, R.R. (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can. J. Vet. Res.*, 66: 86-92.
- Orrison, L.H., Cherry, W.B., Fliermans, C.B., Dees, S.B., McDougal, L.K. ve Dodd, D.J. (1981) Characteristics of environmental isolates of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 109-115.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. ve Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development, *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 49-79.
- O'Toole, G. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay, *J Vis Exp*, 47: e2437.
- Park, M., Yun, S.T., Kim, M.S., Chun, J. ve Ahn, T.I. (2004) Phylogenetic characterization of Legionella-like endosymbiotic X-bacteria in *Amoeba proteus*: a proposal for 'Candidatus *Legionella jeonii*' sp. nov., *Environ Microbiol*, 6:1252–1263.
- Pecastaings, S., Berge, M., Dubourg, K.M. ve Roques, C. (2010) Sessile *Legionella pneumophila* is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms, *Biofouling*, 26: 809-819.
- Pedro-Botet, L. ve Yu, V.L. (2006) *Legionella*: macrolides or quinolones?, *Clin Microbiol Infect*, 12: 25–30.
- Piao, Z., Sze, C.C., Baryseva, O., Iida, K. ve Yoshida, S. (2006) Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1613-1622.

- Pierozan, M.K., Pauletti, G.F., Rota, L., Santos, A.C.A., Lerin, L.A., Di Luccio, M., Mossi, A.J., Atti-Serafini, L., Cansian, R.L. ve Vladimir Oliveira, J. (2009) Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia L.* species, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 29(4): 764-770.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. ve Ignacimuthu, S. (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils, *BMC Complement Altern Med*, 6: 39-46.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T. ve Bennett, B.C. (2008) Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Ethnopharmacol.*, 118: 418-428.
- Ratcliff, R.M., Lanser, J.A., Manning, P.A. ve Heuzenroeder, M.W. (1998) Sequence based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene, *J. Clin. Microbiol.*, 36: 1560-1567.
- Rendueles, O. ve Ghigo, J.M. (2012) Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors, *FEMS Microbiol Rev*, 36: 972-989.
- Rendueles, O., Kaplan, J.B. ve Ghigo, J.M. (2013) Antibiofilm polysaccharides, *Environ. Microbiol.*, 15: 334-346.
- Revdiwala, S., Rajdev, B.M. ve Mulla, S. (2012) Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup, *Crit Care Res Pract*, 2012: e945805 6s.
- Richards, A.M., Dwingelo, J.E.V., Price, C.T. ve Kwaik, Y.A. (2013) Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction, *Virulence*, 4: 307-314.
- Rickard, A.H., Palmer, R.J., Blehert, D.S., Campagna, S.R., Semmelhack, M.F., Egland, P.G., Bassler, B.L. ve Kolenbrander, P.E. (2006) Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth, *Mol. Microbiol.*, 60: 1446-1456.
- Ristroph, J.D., Hedlund, K.W. ve Allen, R.G. (1980) Liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*, *J. Clin. Microbiol.*, 11: 19-21.

- Rogers, J. ve Keevil, C.W. (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2326-2330.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. ve Keevil, C.W. (1994a) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1585-1592.
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V. ve Keevil, C.W. (1994b) Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1842-1851.
- Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae, *J Clin Pathol*, 33: 1179-1183.
- Ruf, B., Schürmann, D., Horbach, I., Seidel, K. ve Pohle, H.D. (1988) Nosocomial legionella pneumonia: demonstration of potable water as the source of infection, *Epidem. Inf.*, 101: 647-654.
- Sadiki, M., Balouiri, M., Barkai, H., Maataoui, H., Koraichi, A.I. ve Elabed, S. (2014) Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index, *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(6):121-124.
- Samrakandi, M.M., Cirillo, S.L.G., Ridenour, D.A., Bermudez, L.E. ve Cirillo, J.D. (2002) Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains, *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1352-1362.
- Sandasi, M., Leonard, C.M. ve Viljoen, A.M. (2009) The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 50: 30-35.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Van Vuuren, S.F. ve Viljoen, A.M. (2011) Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro, *S. Afr. J. Bot.*, 77: 80-85.

- Sarı, A.O., Oğuz, B., Bilgiç, A., Tort, N., Güvensen, A. ve Şenol, S.G. (2010) Ege ve Güney Marmara Bölgelerinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler, *Anadolu J AARI*, 20(2): 1-21.
- Sasaki, T., Mizuguchi, S. ve Honda, K. (2012) Growth inhibitory effects of anthranilic acid and its derivatives against *Legionella pneumophila*, *J. Biosci. Bioeng.*, 113: 726-729.
- Sauer, K. (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation, *Genome Biol.*, 4: e219.
- Saharkhiz, M.J., Motamedi, M., Zomorodian, K., Pakshir, K., Miri, R. ve Hemyari, K. (2012) Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L., *ISRN Pharm*, 2012: 718645.
- Sheehan, K.B., Henson, J.M. ve Ferris, M.J. (2005) *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in yellowstone national park, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 507-511.
- Shih, H.S. ve Lin, Y.E. (2010) Efficacy of copper-silver ionization in controlling biofilm and plankton associated waterborne pathogens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 2032-2035.
- Shimizu, I., Isshiki, Y., Nomura, H., Sakuda, K., Sakuma, K., ve Kondo, S. (2009) The antibacterial activity of fragrance ingredients against *Legionella pneumophila*, *Biol. Pharm. Bull.*, 32: 1114-1117.
- Simić, A., Soković, M.D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J. ve Marin, P.D. (2004) The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and Their Antifungal Activities, *Phytother. Res.*, 18: 713-717.
- Skaliy, P., Thompson, T.A., Gorman, G.W., Morris, G.K., McEachern, H.V. ve Mackel, D.C. (1980) Laboratory studies of disinfectants against *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 697-700.
- Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V. ve Van Griensven, L.J.L.D. (2009) Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities, *Molecules*, 14: 238-249.

- Sookto, T., Srithavaj, T., Thaweboon, S., Thaweboon, B. ve Shrestha, B. (2013) In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*, *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(5): 376-380.
- Spirig, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J.A. ve Hilbi, H. (2008) The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an α -hydroxyketone signaling molecule, *J. Biol. Chem.*, 283: 18113-18123.
- Stanley, N.R. ve Lazazzera, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation, *Mol. Microbiol.*, 52: 917–924.
- Steinert, M., Hentschel, U. ve Hacker, J. (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray, *FEMS Microbiol Rev.*, 26: 149-162.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. ve Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J. Microbiol. Methods*, 40: 175-179.
- Stewart, C.R., Burnside, D.M., ve Cianciotto, N.P. (2011) The surfactant of *Legionella pneumophila* is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species, *J. Bacteriol.* 193: 5971–5984.
- Stewart, C.R., Muthye, V. ve Cianciotto, N.P. (2012) *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under dynamic flow conditions, *Plos ONE*, 7: e50560.
- Stojak, A.R., Raftery, T., Klaine, S.J. ve Mcnealy, T. (2011) Morphological responses of *Legionella pneumophila* biofilm to nanopartical exposure, *Nanotoxicology*, 5: 730-742.
- Stojek, N.M. ve Dutkiewicz, J. (2011) Co-existence of *Legionella* and other gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources, *Ann Agric Environ Med*, 18: 330-334.
- Stone, B.J. ve Kwaik, Y.A. (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: Identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells, *Infect.Immun.*, 66: 1768-1775.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. ve Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities, *Annu Rev Microbiol*, 56:187-209.
- Storey, M.V., Langmark, J., Ashbolt, N.J. ve Stenström, T.A. (2004a) The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment, *Water Sci. Technol.*, 49: 269-275.
- Storey, M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J. ve Stenström, T.A. (2004b) The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*, *Scand.J.Infect.Dis.*, 36: 656-662.
- Stout, J.E., Yu, V.L. ve Best, M.G. (1985) Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 221-228.
- Stout, J.E., Sens, K., Mietzner, S., Obman, A. ve Yu, V.L. (2005) Comparative activity of quinolones, macrolides and ketolides against *Legionella* species using in vitro broth dilution and intracellular susceptibility testing, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25: 302-307.
- Suarez, M., Entenza, J.M., Doerries, C., Meyer, E., Bourquin, L., Sutherland, J., Marison, I., Moreillon, P. ve Mermoud, N. (2003) Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities, *Biotechnol Bioeng*, 81: 13-20.
- Ta, A.C., Stout, J.E., Yu, V.L. ve Wagener, M.M. (1995) Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods, *J. Clin. Microbiol.*, 33: 2118-2123.
- Tai, J., Mliji, M., Benckroun, M.N., Ennaji, M.M., Mekhour, M., Ennaji, H. ve Cohen, N. (2012) Biofilm formation by *Legionella pneumophila* in water distribution systems: role of supports and temperatures, *Int. J. Hydraulic Engineer.*, (2012) 1: 48-54.
- Taraszkiewicz, A., Fila, Grzegorz, F., Grinholc, M. ve Nakonieczna, J. (2013) Innovative strategies to overcome biofilm resistance, *Biomed Res Int*, 2013: e150653.
- Taylor, M., Ross, K. ve Bentham, R. (2009) *Legionella*, Protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial system, *Microb. Ecol.*, 58: 538-547.

- Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N. ve Verstraete, W. (2006) Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4323-4328.
- Terranova, W., Cohen, M.L. ve Fraser, D.W. (1978) 1974 outbreak of legionnaires' disease diagnosed in 1977, *Lancet*, 15 July 1978: 122-124.
- Thosar, N., Basak, S., Bahadure, R.N. ve Rajurkar, M. (2013) Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study, *Eur J Dent*, 7: 71-77.
- Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S.S., Brüggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C. ve Hilbi, H. (2007) The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA, *Cell. Microbiol.*, 9: 2903-2920.
- Tiaden, A., Spirig, T., Carranza, P., Brüggemann, H., Riedel, K., Eberl, L., Buchrieser, C. ve Hilbi, H. (2008) Synergistic contribution of the *Legionella pneumophila* *lqs* genes to pathogen-host interactions, *J. Bacteriol.*, 190: 7532-7547.
- Tiaden, A., Spirig, T. ve Hilbi, H. (2010) Bacterial gene regulation by α -hydroxyketone signaling, *Trends Microbiol.*, 18: 288-297.
- Tiaden, A. ve Hilbi, H. (2012) α -Hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*, *Sensors*, 12: 2899-2919.
- Tison, D.L., Pope, D.H., Cherry, W.B. ve Fliermans, C.B. (1980) Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 456-459.
- Tsai, M.L., Wu, C.T., Lin, T.F., Lin, W.C., Huang, Y.C. ve Yang, C.H. (2013) Chemical Composition and Biological Properties of Essential Oils of Two Mint Species, *Trop J Pharm Res*, 12(4): 577-582.
- Türetgen, I., Sungur, E.I. ve Çotuk, A. (2005) Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems, *Environ Monit Assess*, 100: 53-58.

- Türetgen, I., Göksay, D. ve Çotuk, A. (2009) Comparison of the microbial load of incoming and distal outlet waters from dental unit water systems in Istanbul, *Environ Monit Assess*, 158: 9-14.
- Upadhyay, R.K., Dwivedi, P. ve Ahmad, S. (2010) Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains, *Asian J. Med. Sci*, 2(3): 152-158.
- Valster, R.M., Wullings, B.A., ve van der Kooij, D. (2010) Detection of protozoan hosts for *Legionella pneumophila* in engineered water systems by using a biofilm batch test, *Appl Environ Microbiol*, 76: 7144-7153.
- Valster, R.M., Wullings, B.A., van der Berg, R. ve van der Kooij, D. (2011) Relationships between free-living protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 7321-7328.
- Vandersmissen, L., De Buck, E., Saels, V., Coil, D.A. ve Année, J. (2010) A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells, *FEMS Microbiol Lett*, 306: 168-176.
- Verdon, J., Berjeaud, J.M., Lacombe, C. ve Hechard, Y. (2008) Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*, *Peptides*, 29: 978-984.
- Vervaeren, H., Temmerman, R., Devos, L., Boon, N. ve Verstraete, W. (2006) Introduction of a boost of *Legionella pneumophila* into a stagnant-water model by heat treatment, *Microbiol. Ecol.*, 58: 583-592.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J. ve Ivanova, E.P. (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, *Molecules*, 14: 2535-2554.
- Wadowsky, R.M. ve Yee, R.B. (1981) Glycine containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 768-772.
- Wadowsky, R.M. ve Yee, R.B. (1983) Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 1447-1449.

- Wadowsky, R.M. ve Yee, R.B. (1985) Effect of non-*Legionellaceae* bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1206-1210.
- Wadowsky, R.M., Wolford, R., McNamara, A.M., ve Yee, R.B. (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1197-1205.
- Wadowsky, R.M., Butler, L.J., Cook, M.K., Verma, S.M., Paul, M.A., Fields, B.S., Keleti, G., Sykora, J.L. ve Yee, R.B. (1988) Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2677-2682.
- Wang, H., Edwards, M., Falkinham, J.O. ve Pruden, E. (2012) Molecular survey of the occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 6285-6294.
- Watnick, P. ve Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes, *J. Bacteriol.*, 182: 2675-2679.
- Wery, N., Bru-Adan, V., Minevini, C., Delgenes, J.P., Garrelly, L. ve Godon, J.J. (2008) Dynamics of *Legionella* spp. And bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tozer facility, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 3030-3037.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. ve Salmond, G.P.C. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria, *FEMS Microbiol Rev.*, 25: 365-404.
- Wingender, J. ve Flemming, H.C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens, *Int J Hyg Environ Health*, 214: 417-423.
- Wood, T.K., Hong, S.H. ve Ma, Q. (2011) Engineering biofilm formation and dispersal, *Trends Biotechnol.*, 29: 87-94.
- Wright, J.B., Ruseska, I., Athar, M.A., Corbett, S. ve Costerton, J.W. (1989) *Legionella pneumophila* grows adherent to surfaces in vitro and in situ, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 10: 408-415.

- Wullings, B.A., Bakker, G. ve Kooij, D.V.D. (2011) Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 634-641.
- Yahya, M.F.Z.R., Saifuddin, N.F.H.A. ve Hamid, U.M.A. (2013) *Zingiber officinale* ethanolic extract inhibits formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 3: 46-54.
- Yao, Y., Ochiai, T., Ishiguro, H., Nakano, R. ve Kubota, Y. (2011) Antibacterial performance of a novel photocatalytic-coated cordierite foam for use in air cleaners, *Appl Catal B*, 106: 592-599.
- Yee, W. ve Wadowsky, R.M. (1982) Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1330-1334.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L. ve Chereschsky, A. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey, *J. Infect. Dis.*, 186: 127-128.
- Zeybek, Z., Türetgen, İ., Erdem, A.K., Filoğlu, G. ve Çotuk, A. (2009) Profiling of environmental *Legionella pneumophila* strains by randomly amplified polymorphic DNA method isolated from geographically nearby buildings, *Environ Monit Assess*, 149: 323-327.
- Zhang, Z., McCann, C., Hanrahan, J., Jencson, A., Joyce, D., Fyffe, S., Piesczynski, S., Hawks, R., Stout, J.E., Yu, V.L. ve Vidic, R.D. (2009) *Legionella* control by chlorine dioxide in hospital water systems, *J. AWWA*, 101: 117-127.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Bülent TURASAY
Uyruk : T.C.
Doğum Tarihi : 22.04.1977
Medeni Hali : Evli, 2 Çocuk Babası
Telefon : 0 505 629 5107
E-posta : Bulent.Turasay@saglik.gov.tr

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Kütahya 75.Yıl Cumhuriyet Sağ.Mes. Lisesi	1995
Lisans	Muğla Üniversitesi – Biyoloji Bölümü	2000

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2001-2002	Muğla İl Çevre Müdürlüğü	Biyolog
2002-2008	Bodrum Devlet Hastanesi	Sağlık Memuru
2008-2010	Bodrum Devlet Hastanesi	Biyolog
2010-2013	Bodrum Halk Sağlığı Laboratuvarı	Biyolog&Lab. Sorumlusu
2013-	Muğla Halk Sağlığı Laboratuvarı	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma			X
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma			X

Bilimsel Faaliyetler

- Bürün, B., Altan, F., **Turasay, B.** (2001) The using in vitro techniques on propagation plants commercially, XII. Biyoteknoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2001, Ayvalık-Balıkesir.